

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

Jessica Corrêa Bezerra Bellei

**PROSPECÇÃO *IN SILICO*, *IN VITRO* E *IN VIVO* DE
DERIVADOS AMINOQUINOLÍNICOS E β -CARBOLÍNICOS COM
POTENCIAL ANTIMALÁRICO**

**JUIZ DE FORA
2022**

JESSICA CORRÊA BEZERRA BELLEI

**PROSPECÇÃO *IN SILICO*, *IN VITRO* E *IN VIVO* DE DERIVADOS
AMINOQUINOLÍNICOS E β -CARBOLÍNICOS COM POTENCIAL
ANTIMALÁRICO**

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e
Doenças Infecto-Parasitárias/ Genética e
Biotecnologia, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências Biológicas: Área:
Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias/
Genética e Biotecnologia”

Orientadora: Prof. Dra. Kézia Katiani Gorza Scopel

Juiz de Fora - MG
2022

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

Corrêa B. Bellei, Jessica.

Prospecção in silico, in vitro e in vivo de derivados aminoquinolínicos e beta-carbolínicos com potencial antimalárico / Jessica Corrêa B. Bellei. -- 2022.

224 p. : il.

Orientadora: Kézia K. G. Scopel

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2022.

1. malária cerebral. 2. quimioterapia. 3. 4-aminoquinolinas. 4. alcaloides beta-carbolínicos. I. K. G. Scopel, Kézia, orient. II. Título.

Jessica Corrêa Bezerra Bellei

Prospecção *in silico*, *in vitro* e *in vivo* de derivados aminoquinolínicos e β -carbolínicos com potencial antimalárico

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias/ Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias/ Genética e Biotecnologia”

Aprovada em: 16 de dezembro de 2022

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Kézia Katiani Gorza Scopel – Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dr^a. Clarice Abramo

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Guilherme Diniz Tavares

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dr^a. Erika Martins Braga

Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Bruno Antônio Marinho Sanchez

Universidade Federal do Mato Grosso

Juiz de Fora - MG
2022

Juiz de Fora, 19/12/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Kezia Katiani Gorza Scopel, Professor(a)**, em 19/12/2022, às 10:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Diniz Tavares, Professor(a)**, em 19/12/2022, às 11:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Erika Martins Braga, Usuário Externo**, em 19/12/2022, às 21:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Antonio Marinho Sanchez, Usuário Externo**, em 20/12/2022, às 11:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro](#)

[de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Clarice Abramo, Professor(a)**, em 21/12/2022, às 09:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jessica Corrêa Bezerra Bellei, Servidor(a)**, em 22/12/2022, às 07:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro](#)

[de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-U f (www2.u f.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1083873** e o código CRC **37D3456B**.

Dedico este trabalho aos meus pais Norma♥ e Raimundo♥ e ao meu marido Pedro, pelo amor, carinho, incentivo e por acreditar que esse sonho seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por iluminar meu caminho, nunca me desamparar, guiar e direcionar todos os meus passos até aqui.

Aos meus pais (*in memoriam*), que apesar de não estarem comigo fisicamente, estão espiritualmente comemorando mais uma etapa vencida.

Ao meu marido Pedro, peça fundamental desta conquista. Aquele que acreditou em mim quando eu mesma não acreditava. Quem, por inúmeras vezes, me levantou, apoiou, pegou na minha mão e caminhou comigo e, inclusive, colocou a mão na massa, fosse auxiliando em algum experimento, etiquetando lâminas ou lendo e relendo essa tese a cada nova versão. Obrigada por ser meu melhor amigo, companheiro, maior fã e incentivador. Você tornou essa trajetória mais amena e agradável e sem você essa conquista não seria possível. Amo você.

À minha orientadora Kézia Scopel, que foi muito mais do que isso pra mim e se tornou uma amiga. Agradeço por sua orientação, disponibilidade, apoio, saber transmitido, opiniões e críticas, auxílio na resolução dos problemas que surgiram ao longo do trabalho e por todas as palavras de incentivo. Através de sua forma de conduzir/orientar seus alunos (“não entregando o peixe, mas ensinando-os a pescar”) evoluí, desenvolvi habilidades e amadureci na pesquisa.

Ao Fernando Varotti que me adotou como aluna em 2018 e tanto me ensinou ao longo desses anos. Com seu jeito acelerado me fez amadurecer “50 anos em 5” como pesquisadora. Tenho muito orgulho de citá-lo como um dos responsáveis pela minha formação, não só profissional, mas também pessoal.

Aos meus tios e tias, que são meu alicerce, a base da minha formação educacional e do meu caráter. Ao meu tio Carlinhos, que me ensinou o valor do estudo e plantou em mim essa semente que germinou e floresceu.

Aos meus sogros, Rita e Márcio e também à Tia Lucinha que sempre se fizeram presentes durante essa trajetória, vibrando comigo a cada nova conquista. À Mariana e Marcelo, pela parceria, torcida e por terem paciência e interesse em escutar minhas histórias de laboratório e experimentos. Agradeço ainda a todos os meus familiares de Goianá que sempre compreenderam minhas inúmeras ausências nos finais de semana e eventos familiares (quem cultiva plasmódio sabe do que eu estou falando).

Agradeço à minha chefe, Vera Peters pela compreensão, apoio e incentivo ao longo desses anos. Obrigada por entender minhas necessidades e por incentivar minha capacitação. Agradeço também à Professora Martha Guerra, que foi a responsável pela minha iniciação na pesquisa e com quem aprendi os primeiros passos da pesquisa experimental.

Aos meus colegas de pesquisa em malária: Bárbara e Daniela, pelos ensinamentos e parcerias em extensos experimentos. À Carolina Brandi e Izabella, alunas de iniciação científica, que dividiram comigo responsabilidades deste trabalho. À Carolina David, Cinthia e Felipe, pela amizade. A todos os colegas de laboratório, incluindo Juliane Marinho, Juliana Granato, Ayla, Luciana, Patrícia, Ari, Cristina e Anselmo, pela amizade, auxílio e por tornarem a rotina do dia a dia mais leve.

Agradeço às professoras da Parasito: Elaine, Clarice e Florence, pelos ensinamentos e por contribuírem para minha formação como parasitologista.

À Ana Claudia, que se tornou muito mais que uma colega de laboratório. Com ela adquiri grande aprendizado nas mais diversas áreas da pesquisa de quimioterapia antimalárica. Dividimos conhecimentos, protocolos, medos, anseios, dificuldades e também vibramos juntas a cada vitória. Obrigada também pelos memes diários que tornaram meus dias mais alegres. Você se tornou uma grande amiga que levarei para a vida.

Aos Professores, Adilson e Guilherme, pelo fornecimento dos compostos a serem testados e pela parceria nos trabalhos. Ao Nícolas Glazmann pela paciência e constante disponibilidade para esclarecer minhas dúvidas quanto à síntese e análises químicas das moléculas.

Aos meus colegas de trabalho: Mariana, Raquel, Julieta, Andressa e Evelise pela amizade e torcida para que desse tudo certo. Ao Maycon e Leda, pela amizade, conselhos, por todo apoio durante essa jornada. Agradeço a todos os demais colegas que torceram por mim, em especial ao Bruno que, literalmente, deu o sangue por este trabalho como doador de hemácias para o cultivo *in vitro* do parasito e à Mariana, responsável pelas várias coletas.

Agradeço à UFJF e ao programa de Pós-Graduação por permitirem a execução deste trabalho. Ao LIP pelas instalações e equipamentos. Ao CBR pelo fornecimento do modelo experimental. A todos os animais de laboratório, com muito respeito à suas vidas, que participaram deste trabalho, contribuindo para o desenvolvimento da ciência. Às agências de fomento: CNPq, Capes e Fapemig, pelo financiamento à pesquisa.

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

Muito obrigada!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Madre Teresa de Calcuta)“

RESUMO

Com 241 milhões de novos casos e 650.000 mortes estimadas em 2020, a malária continua sendo um dos maiores desafios de saúde pública em todo o mundo, com maior incidência de casos (94%) na África Subsaariana. Dentre as espécies de *Plasmodium* responsáveis pela malária humana, *P. falciparum* é a mais prevalente na África e a responsável pela complicação mais grave da infecção, a malária cerebral. Na ausência de uma vacina eficaz e devido à disseminação da resistência dos plasmódios aos antimaláricos disponíveis, é urgente a necessidade de desenvolvimento de novas drogas eficazes contra *P. falciparum*. Nesse contexto, os alcaloides representam um importante grupo de moléculas que têm sido utilizados como ferramenta na busca de novos fármacos. Dentre as diversas classes de alcaloides existentes na natureza destacam-se os quinolínicos e os β -carbolínicos que possuem diversas atividades biológicas, inclusive antimalárica. Com base nessas afirmações, esse trabalho se propôs a avaliar derivados sintéticos de 4-aminoquinolinas e β -carbolinas quanto ao potencial antimalárico *in silico* e *in vitro* a fim de selecionar as drogas mais promissoras para estudos *in vivo* contra a malária cerebral experimental (MCE). Os derivados β -carbolínicos foram inicialmente testados contra 35 alvos moleculares de *P. falciparum*, selecionando 7 moléculas com provável interação com enzimas essenciais para o metabolismo do parasito, podendo causar sua morte. As propriedades físico-químicas e farmacocinéticas de absorção dessas moléculas, bem como dos derivados quinolínicos, foram analisadas por meio de ferramentas computacionais. Os parâmetros de citotoxicidade foram avaliados em fibroblastos de pulmão humano (WI26VA4) e em células de hepatocarcinoma humano (HepG2) e a atividade antiplasmodial foi avaliada contra cepa *P. falciparum* cloroquina-resistente (W2). Um provável mecanismo de ação foi investigado, *in vitro*, através da interação com a ferriprotoporfirina ou inibição da síntese de óxido nítrico. Finalmente, a atividade antimalárica *in vivo* foi determinada pelos testes curativo e/ou supressivo de Peters, realizado em camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA e tratados com os candidatos a fármacos. Em geral as moléculas apresentaram boa biodisponibilidade via oral, predita *in silico*, com baixa citotoxicidade e adequada seletividade para os parasitos nos ensaios *in vitro*, destacando o quinolínico 3 e o β -carbolínico 10. Em relação à atividade *in vivo*, o tratamento com o derivado quinolínico 3 resultou em valores importantes de inibição da multiplicação do parasito (IMP) no 7°

dia pós infecção (dpi) (76,9% (15mg/kg), 90,1% (30mg/kg) e 92,9% (50mg/kg)), com altas taxas de sobrevivência ao período crítico da MCE e perfil de toxicidade hepática e renal melhores do que a cloroquina. Este resultado pode estar relacionado à interação do composto teste com a ferriprotoporfirina, identificada através de ensaio *in vitro*, impedindo a formação de cristais de hemozoína no vacúolo digestivo do parasito, causando sua morte. Com relação à atividade *in vivo* dos alcaloides β -carbolínicos, o composto 10 apresentou importantes valores de IMP no 5º dpi (67,92% (10mg/kg) e 82,07% (10mg/kg)) no esquema de tratamento curativo e supressivo, respectivamente, com altas taxas de sobrevivência ao período crítico da MCE e ausência de hemorragia e oclusão vascular observados macro e microscopicamente em tecido cerebral. Entretanto, apesar da sobrevivência, os animais desenvolveram hiperparasitemia nos dias subseqüentes, sugerindo que o composto possa apresentar fraca atividade antimalárica *in vivo*, porém adequada atividade anti-inflamatória para impedir o quadro de MCE. Tal atividade, determinada *in vitro* através da redução da síntese de óxido nítrico por macrófagos peritoneais estimulados e tratados com o composto teste, pode estar relacionada à interação do composto 10 como a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) predita através de modelagem molecular. Em conjunto, nossos resultados sugerem que as duas classes de compostos testadas apresentam importantes características para drogas antimaláricas, destacando o derivado quinolínicos 3 e o β -carbolínicos 10 como compostos HIT (bioativos), dado seus baixos valores de CI_{50} , elevados CC_{50} e IS, adequado perfil farmacocinético de absorção e predição *in silico* de boa biodisponibilidade pela via oral. Sugerimos ainda que o derivado quinolínicos 3 é um candidato a composto “early lead” (líder precoce), por apresentar IC_{50} em escala nM, redução da parasitemia com valores superiores a 90%, alta taxa de sobrevivência proteção contra o desenvolvimento da MCE além de segurança hepática e renal. Sendo assim, o processo de síntese da série de derivados 4-aminoquinolínicos e β -carbolínicos deste estudo foi promissor, produzindo HITs antimaláricos.

Palavras chaves: malária cerebral, quimioterapia, 4-aminoquinolinas, alcaloides β -carbolínicos.

ABSTRACT

With 241 million new cases and 650,000 deaths estimated in 2020, malaria remains one of the greatest public health challenges worldwide, with the highest incidence of cases (94%) in sub-Saharan Africa. Among the *Plasmodium* species responsible for human malaria, *P. falciparum* is the most prevalent in Africa and responsible for the most serious infection, cerebral malaria. In the absence of an effective vaccine and due to the spread of *Plasmodium* resistance to antimalarials available, there is an urgent need to develop new drugs that are effective against *P. falciparum*. In this context, alkaloids represent an important warning group that have been used as a tool in the search for new drugs. Among the different classes of alkaloids existing in nature, the quinoline and β -carboline stand out, which have different biological activities, including antimalarials. Based on this assumption, this work controlled synthetics of 4 aminoquinolines and β -carbolines for their antimalarial potential *in silico* and *in vitro* in order to select the most promising drugs for *in vivo* studies against experimental cerebral malaria (ECM). The β -carbolines were initially tested against 35 molecular targets of *P. falciparum*, selecting 7 with interaction with essential enzymes for the metabolism of the parasite, which could cause its death. The physicochemical and pharmacokinetic properties of absorption of these symptoms, as well as the quinoline derivatives, were symptoms using computational tools. Cytotoxicity parameters were evaluated in human lung fibroblasts (WI26VA4) and in human hepatocarcinoma cells (HepG2) and an antiplasmodial activity was evaluated against chloroquine-resistant *P. falciparum* strain (W2). A mechanism of action was investigated, *in vitro*, through interaction with ferriprotoporphyrin or following nitric oxide synthesis. Finally, *in vivo* antimalarial activity was determined by Peters' curative and/or suppressive testes, performed in C57BL/6 mice infected with *P. berghei* ANKA and treated with the drug candidates. In general, the molecules showed good oral bioavailability, predicted *in silico*, with low cytotoxicity and adequate selectivity for the parasites in the *in vitro* assays, highlighting quinolinic 3 and β -carbolinic 10. Quinolinic derivative 3 resulted in important parasite multiplication inhibition (IMP) values on the 7th day post infection (dpi) (76.9% (15mg/kg), 90.1% (30mg/kg) and 92.9% (50mg/kg)), with high survival rates to the critical period of ECM and a better liver and kidney toxicity profile than chloroquine. This result may be related to the interaction of the test compound with ferriprotoporphyrin, identified through an *in vitro* assay, preventing the formation of

hemozoin crystals in the parasite's digestive vacuole, causing its death. Regarding the *in vivo* activity of β -carboline alkaloids, compound 10 showed important IMP values at the 5th dpi (67.92% (10mg/kg) and 82.07% (10mg/kg)) in the curative treatment scheme and suppressive, respectively, with high rates of survival to the critical period of ECM and absence of hemorrhage and vascular occlusion observed macro and microscopically in brain tissue. However, despite survival, the animals developed hyperparasitemia in the subsequent days, suggesting that the compound may have weak antimalarial activity *in vivo*, but adequate anti-inflammatory activity to prevent ECM. Such activity, determined *in vitro* through the reduction of nitric oxide synthesis by peritoneal macrophages stimulated and treated with the test compound, may be related to the interaction of compound 10 with the inducible nitric oxide synthase enzyme (iNOS) predicted through molecular modeling. Together, our results suggest that the two classes of compounds tested have important characteristics for antimalarial drugs, highlighting the quinolinic derivative 3 and the β -carbolic 10 as HIT (bioactive) compounds, given their low IC₅₀ values, high CC₅₀ and IS, adequate pharmacokinetic absorption profile and *in silico* prediction of good oral bioavailability. We also suggest that the quinolinic derivative 3 is a candidate for an early lead compound, as it presents IC₅₀ in nM scale, reduction of parasitemia with values above 90%, high survival rate, protection against the development of ECM, in addition to Liver and kidney safety. Therefore, the process of synthesizing the series of 4-aminoquinoline and β -carboline derivatives in this study was promising, producing antimalarial HITs.

Key words: cerebral malaria, chemotherapy, 4-aminoquinolines, β -carboline alkaloids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa da taxa de incidência de casos de malária (casos por 1000 habitantes em risco) por país, 2018.....	24
Figura 2: Mapa da distribuição da malária no Brasil em 2021.....	26
Figura 3: Ciclo biológico de espécies de parasitos do gênero <i>Plasmodium</i> no hospedeiro vertebrado e invertebrado. Representação dos estágios pré-eritrocítico e eritrocítico dos parasitos.	28
Figura 4: Trânsito de esporozoítio no hepatócito, formação de vacúolo parasitóforo e desenvolvimento do esquizonte.	29
Figura 5: Formação e liberação de merossomas, contendo merozoítos, na corrente sanguínea.	30
Figura 6: Representação esquemática de estruturas e organelas do merozoítio de <i>Plasmodium</i>	31
Figura 7: Representação esquemática do processo de invasão do merozoítio em eritrócitos.....	32
Figura 8: Adesão de eritrócitos infectados por <i>P. falciparum</i> a células humanas.	35
Figura 9: Representação esquemática dos alvos dos principais antimaláricos esquizonticidas sanguíneos em parasitos <i>Plasmodium</i> spp.	42
Figura 10: Fórmula estrutural da quinina e seus derivados.....	44
Figura 11: Fórmula estrutural da artemisinina e seus derivados e outros fármacos utilizados no tratamento da malária.	46
Figura 12: Esquema cronológico da descoberta dos antimaláricos e surgimento da resistência de <i>P. falciparum</i> aos mesmos.	49
Figura 13: Etapas no processo de desenvolvimento de fármacos.	53
Figura 14 : Esqueletos de alcaloides indólicos derivados do aminoácido triptofano. 56	
Figura 15: Anel quinolínico com grupo amino na posição 4.....	57
Figura 16: Estruturas do núcleo indólico (A) e anel piridínico (B) presente nos alcaloides β -carbolínicos.....	58
Figura 17: Estruturas dos alcaloides β -carbolínicos: norharmano (23), harmina (24), harmano (25), harmol (26), harmalina (27) e 1,2,3,4-tetrahidroharmalina (28).	58
Figura 18: Delineamento Experimental.	64
Figura 19: Sais de derivados quinolínicos (QDS) obtidos a partir de derivados quinolínicos (QD).....	65
Figura 20: Desenho experimental: esquematização dos processos de infecção, tratamento e eutanásia realizados no desenvolver deste projeto.	76
Figura 21: Titulação espectroscópica de Fe(III)PPIX com composto 3.....	87
Figura 22: Eficácia do tratamento com o composto 3 sobre a sobrevivência, parasitemia e avaliação clínica	92
Figura 23: Testes de função hepática [ALT (A), AST (B)] e renal [ureia (C), creatinina (D)] em camundongos.....	93

Figura 24: Eficácia do tratamento com o composto 3 e/ou VD sobre a sobrevivência, parasitemia e avaliação clínica.	96
Figura 25: Análise macroscópica do encéfalo dos animais.....	97
Figura 26: Delineamento Experimental.	101
Figura 27: Estrutura química de todos os compostos possíveis de serem sintetizados dentro dos aldeídos disponíveis.....	102
Figura 28: Desenho experimental: esquematização dos processos de infecção, tratamento curativo com alcaloides β -carbolínicos e eutanásia realizados no desenvolver deste projeto.	106
Figura 29: Desenho experimental: esquematização dos processos de infecção, tratamento supressivo com alcaloides β -carbolínicos e eutanásia realizados no desenvolver deste projeto.	106
Figura 30: Mapa farmacofórico de compostos, testados <i>in vitro</i> , gerados por docking molecular contra 2OK8.....	116
Figura 31: Via sintética dos alcaloides β -carbolínicos 3-6 e 8-10.....	117
Figura 32: Efeito do tratamento curativo com alcalóides β -carbolínicos em parâmetros distintos de camundongos C57BL/6 infectados com <i>P. berghei</i> ANKA.....	123
Figura 33: Imagens de cortes histológicos de tecido cerebral corados com hematoxilina-eosina (HE).....	124
Figura 34: Efeito do tratamento supressivo com alcaloides de β -carbolínicos em parâmetros distintos de camundongos C57BL/6 infectados com <i>P. berghei</i> ANKA	127
Figura 35: Viabilidade celular e atividade anti-inflamatória do composto 10.	129
Figura 36: Avaliação da interação do composto 10 com os resíduos do sítio ativo iNOS de <i>Mus musculus</i>	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Infecção por <i>Plasmodium</i> em diferentes linhagens de camundongos e seu uso experimental.....	38
Tabela 2: Comparação de características da malária cerebral humana vs. malária cerebral experimental no modelo de infecção de camundongo por <i>Plasmodium berghei</i>	39
Tabela 3: Principais antimaláricos disponíveis e seus estágios alvo no parasito.....	42
Tabela 4: Fórmulas Estrutural e Molecular dos compostos sintéticos derivados de Aminoquinolinas.....	66
Tabela 5: Grupos experimentais e seus respectivos esquemas de tratamento, dose e tamanho amostral (n) utilizados no teste antiplasmodial curativo do composto 3 isolado.....	77
Tabela 6: Grupos experimentais e seus respectivos esquemas de tratamento, dose e tamanho amostral (n) utilizados no Teste antiplasmodial curativo do composto 3 associado à vitamina D.....	77
Tabela 7: Parâmetros observados, de acordo com sua classificação categórica, na avaliação clínica dos animais determinada pela Escala Rápida de Coma e Comportamento Murino (ERCCM).....	79
<i>Tabela 8: Avaliação in silico, através da regra dos 5 de Lipinski, das propriedades físico-químicas das moléculas sintéticas derivadas de 4-aminoquinolinas.....</i>	<i>84</i>
Tabela 9: Avaliação da citotoxicidade em células WI26VA4 e/ou HepG2, da atividade antiplasmodial sobre a cepa W2 (cloroquina resistente) e determinação do índice de seletividade dos derivados 4-aminoquinolínicos.....	85
Tabela 10: Avaliação in silico das propriedades farmacocinéticas de absorção do composto QDS3 e da Cloroquina através do programa AdmetSar.....	89
Tabela 11: Valores da redução da parasitemia no 7°, 8° e 9° dias pós infecção, após teste curativo com o composto 3 (15, 30 e 50mg/Kg).....	91
Tabela 12: Grupos experimentais e seus respectivos esquemas de tratamento, dose e tamanho amostral (n) utilizados no Teste antiplasmodial curativo dos alcaloides β -carbolínicos.....	107
Tabela 13: Grupos experimentais e seus respectivos esquemas de tratamento, dose e tamanho amostral (n) utilizados no Teste antiplasmodial supressivo dos alcaloides β -carbolínicos.....	108
Tabela 14: Energia de ligação (kcal/mol) de derivados de β -carbolinas contra alvos BraMMt.....	114

Tabela 15: Avaliação da citotoxicidade em células WI26VA4, da atividade antiplasmodial sobre a cepa W2 (cloroquina resistente) e determinação do índice de seletividade dos alcaloides β -carbolínicos.	118
Tabela 16: Avaliação in silico, através da regra dos 5 de Lipinski, das propriedades físico-químicas dos alcaloides β -carbolínicos e da cloroquina. Resultados obtidos pelo programa SwissADME online.....	120
Tabela 17: Avaliação in silico das propriedades farmacocinéticas de absorção dos alcaloides β -carbolínicos e da cloroquina através do programa AdmetSar.....	121
Tabela 18: Valores da redução da parasitemia no 5° e 7° dias pós infecção após teste curativo com os alcaloides β -carbolínicos (10mg/Kg) ou com a Cloroquina (10mg/Kg).	122
Tabela 19: Valores da redução da parasitemia no 5° e 7° dias pós infecção após teste supressivo com alcaloides β -carbolínicos (10 mg/Kg).	125

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µg – micrograma

µL – microlitro

µM – micromolar

ACT – terapia combinada com a artemisinina

ADMET – absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade

ALT – alainina aminotransferase

AMA-1 – antígeno 1 de membrana apical do merozoíto

ANOVA – análise de variância

ANVISA – agência nacional de vigilância sanitária

ART – artesunato

AST – aspartato aminotransferase

BHE – barreira hematoencefálica

CBR – Centro de Biologia da Reprodução

CC₅₀ – concentração que reduz a viabilidade celular em 50%

CEUA – comissão de ética no uso de animais

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

CO₂ - gás Carbônico

CONCEA – conselho nacional de controle de experimentação animal

CQ – cloroquina

CSA - *Chondroitin Sulfate A*

CSP – proteína circunsporozoíta

DMSO – dimetilsulfóxido

dpi – dias pós infecção

early lead – líder precoce

EI – eritrócitos infectados

EIH – epitélio intestinal humano

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ERCCM – escala rápida de coma e comportamento murino

GPI – glicosilfosfatidilinositol
HE – hematoxilina-eosina
HIT – molécula bioativa
HRPII - proteína 2 Rica em Histidina
ICAM-1 - *Intercelular Adhesion Molecule 1*
IFA – insumo farmacêutico ativo
IFN- γ - interferon gama
IL-1 – interleucina 1
IL-10 – interleucina 10
IL-2 – interleucina 2
IL-6 – interleucina 6
IMP – inibição da multiplicação do parasito
iNOS – óxido nítrico sintase induzível
IS – índice de seletividade
kg - kilograma
Lead – líder
logP – coeficiente de partição
M – molar
MC – malária cerebral
MCE – malária cerebral experimental
mg – miligrama
mM – micromolar
MSP-1 – proteína 1 de superfície de merozoíto
MTT – 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolina
N+O – número de aceptores de hidrogênio
NH+OH – número de doadores de hidrogênio
nm – nanômetros
nM - nanomolar
NO – óxido nítrico
NOS – óxido nítrico sintase

OMS – organização mundial de saúde

P&D – pesquisa e desenvolvimento

PAMP – padrão molecular associado a patógenos

PbA – *Plasmodium berghei* ANKA

PBS - phosphate-buffered saline

PfEMP-1 - proteína de *Membrana 1 Do Eritrócito Infectado por P. falciparum*

PNH – primatas não humanos

PQ – primaquina

rpm – rotações por minute

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

SFB – Soro Fetal Bovino

SMILES - Simplified Molecular Input Line Entry System

TMB - 3,3',5'-Tetrametilbenzidina

TNF- α – fator de necrose tumoral α

TPSA – área de superfície polar

TRAP – proteína adesiva relacionada a trombospodina

VCAM-1 - Vascular Adhesion Molecule 1

VD – vitamina D

VP – vacúolo parasitóforo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1- A Malária no Brasil e no Mundo	24
1.2- Ciclo de vida do Plasmódio.....	27
1.3- Aspectos Clínicos	32
1.4- Imunopatogênese da Malária Cerebral.....	34
1.4.1. Modelo murino de MC como alternativa para estudo da malária cerebral humana	37
1.5- Tratamento.....	40
1.5.1. Principais antimaláricos usados na terapêutica	43
1.6- Resistência aos antimaláricos.....	48
1.7- Desenvolvimento de fármacos	52
1.8. Os alcaloides e potencial antimalárico	55
2. JUSTIFICATIVA.....	60
3. OBJETIVOS	61
3.1-Geral	61
3.2- Específicos	61
4. CAPÍTULO I: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTIPLASMODIAL <i>IN SILICO</i>, <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DE COMPOSTOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE AMINOQUINOLINAS	62
4.1. INTRODUÇÃO	62
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	64
4.2.1. Delineamento Experimental	64
4.2.2. Síntese dos derivados aminoquinolínicos para testes de atividade biológica.....	65
4.2.3. Avaliação <i>in silico</i>	67
4.2.3.1. Avaliação <i>in silico</i> das propriedades físico químicas.....	67
4.2.3.2. Avaliação <i>in silico</i> das Propriedades Farmacocinéticas de Absorção ..	67
4.2.4. Ensaios <i>in vitro</i> de Citotoxicidade.....	68
4.2.4.1. Cultivo das células WI e HepG2	68
4.2.4.2. Ensaio de Viabilidade Celular:.....	69
4.2.5. Avaliação da atividade antiplasmodial <i>in vitro</i>	70
4.2.5.1. Cultivo Contínuo da fase eritrocítica do parasito.....	70
4.2.5.2. Teste de avaliação da atividade antimalárica <i>in vitro</i> pelo ensaio de HRPII (Proteína 2 Rica em Histidina)	71

4.2.5.3. Teste de avaliação da atividade antimalárica <i>in vitro</i> pelo ensaio de SYBR GREEN	72
4.2.6. Índice de Seletividade.....	74
4.2.7. Interação com ferriprotoporfirina (Fe(III)PPIX).....	74
4.2.8. Testes antimaláricos <i>in vivo</i>	75
4.2.8.1. Animais	75
4.2.8.2. Delineamento Experimental <i>in vivo</i>	76
4.2.8.3. Solubilização dos compostos e grupos experimentais.....	76
4.2.8.4. Teste antiplasmodial curativo isolado e associado à VD.....	77
4.2.8.5. Determinação da Parasitemia Sanguínea.....	78
4.2.8.6. Determinação da Inibição da Multiplicação do Parasito (IMP)	78
4.2.8.7. Avaliação Clínica.....	79
4.2.8.8. Eutanásia.....	80
4.2.8.9. Análise macroscópica do encéfalo	80
4.2.8.10. Análise Histopatológica do cérebro.....	80
4.2.8.11. Análise Bioquímica.....	81
4.3. Análise Estatística	82
4.4. RESULTADOS	83
4.4.1. Avaliação <i>in silico</i> das propriedades físico-químicas dos derivados 4-aminoquinolínicos	83
4.4.2. Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade e atividade antiplasmodial	85
4.4.3. Avaliação <i>in vitro</i> da interação com a ferriprotoporfirina Fe(III)PPIX	86
4.4.4. Avaliação <i>in silico</i> das propriedades farmacocinéticas da absorção dos derivados 4-aminoquinolínicos.....	88
4.4.5. Avaliação <i>in vivo</i>	90
4.4.5.1. Teste antiplasmodial curativo do composto 3 isolado.....	90
4.4.5.2. Dosagens Bioquímicas.....	92
4.4.5.3. Teste antiplasmodial curativo do composto 3 associado à VD	94
4.5. CONCLUSÃO	97
5. CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL <i>IN SILICO</i>, <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DE ALCALOIDES β-CARBOLÍNICOS	99
5.1. INTRODUÇÃO	99
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	101
5.2.1. Delineamento Experimental	101
5.2.2. Síntese Química	102
5.2.3. Obtenção e solubilização/ armazenamento dos alcaloides β -carbólicos para testes de atividade biológica.....	103

5.2.4.	Ensaio <i>in vitro</i> de Citotoxicidade.....	103
5.2.4.1.	Cultivo das células WI e Ensaio de Viabilidade Celular:	103
5.2.5.	Avaliação da atividade antiplasmodial <i>in vitro</i>	104
5.2.5.1.	Cultivo Contínuo da fase eritrocítica do parasito.....	104
5.2.5.2.	Avaliação da atividade antimalárica <i>in vitro</i> através do teste tradicional	104
5.2.6.	Índice de Seletividade.....	105
5.2.7.	Avaliação <i>in silico</i>	105
5.2.7.1.	Avaliação <i>in silico</i> das Propriedades Físico-químicas e Farmacocinéticas de Absorção.....	105
5.2.8.	Testes antimaláricos <i>in vivo</i>	106
5.2.8.1.	Animais	106
5.2.8.2.	Delineamento Experimental	106
5.2.8.3.	Solubilização dos compostos e grupos experimentais.....	107
5.2.8.4.	Teste antiplasmodial curativo	108
5.2.8.5.	Teste antiplasmodial supressivo	109
5.2.8.6.	Determinação da Parasitemia Sanguínea.....	109
5.2.8.7.	Determinação da Inibição da Multiplicação do Parasito (IMP)	109
5.2.8.8.	Avaliação Clínica.....	110
5.2.8.9.	Eutanásia.....	110
5.2.8.10.	Análise macroscópica do encéfalo	110
5.2.8.11.	Análise histopatológica do cérebro	110
5.2.9.	Avaliação, <i>in silico</i> e <i>in vitro</i> , do potencial de inibição da síntese de óxido nítrico	110
5.2.9.1.	Citotoxicidade <i>in vitro</i> contra células de mamíferos.....	110
5.2.9.2.	Avaliação da atividade anti-inflamatória do composto 10 por dosagem de NO	111
5.2.9.3.	Avaliação da interação com iNOS por simulações de docking molecular	111
5.3.	Análise Estatística	112
5.4.	RESULTADOS	113
5.4.1.	Screening Virtual.....	113
5.4.2.	Síntese Química	117
5.4.3.	Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade e atividade antiplasmodial	117
5.4.4.	Avaliação <i>in silico</i> das propriedades físico-químicas e farmacocinéticas da absorção dos alcaloides β -carbolínicos	119
5.4.5.	Avaliação <i>in vivo</i> da Atividade Antimalárica dos Alcaloides β -carbolínicos	121

5.4.5.1.	Teste antiplasmodial curativo.....	121
5.4.5.2.	Teste antiplasmodial supressivo	124
5.4.6.	Avaliação, <i>in silico</i> e <i>in vitro</i> , do potencial de inibição da síntese de NO	128
5.4.6.1.	Avaliação da produção de NO	128
5.4.6.2.	Avaliação da interação com iNOS por simulações de docking molecular	130
5.5.	CONCLUSÃO	131
6.	DISCUSSÃO GERAL	132
7.	CONCLUSÃO GERAL	140
	APÊNDICE A – PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO CLÍNICA (ESCORE CLÍNICO)	167
	ANEXO A – SÍNTESE DOS DERIVADOS 4-AMINOQUINOLÍNICOS	171
	ANEXO B – CERTIFICADO CEUA - UFJF 055/2018	176
	ANEXO C – ARTIGO DERIVADOS QUINOLÍNICOS.....	177
	ANEXO D – SÍNTESE DOS ALCALOIDES β -CARBOLÍNICOS.....	187
	ANEXO E – CERTIFICADO CEUA - UFJF 022/2020.....	191
	ANEXO F: ARTIGO ALCALOIDES β -CARBOLÍNICOS	192
	ANEXO G: ARTIGO PUBLICADO, EM COLABORAÇÃO, DURANTE O DOUTORADO	212

1. INTRODUÇÃO

1.1- A Malária no Brasil e no Mundo

A malária constitui um dos maiores problemas de saúde pública, sendo endêmica nas regiões tropicais e subtropicais do globo, onde se distribui de forma heterogênea (Figura 1) (WHO, 2020). Essa protozoose é considerada uma das mais agressivas, devido aos seus altos índices de morbimortalidade e ao grande impacto econômico que causa onde ocorre (WHITE et al., 2014). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2020, a doença afligiu cerca de 241 milhões de pessoas, causando aproximadamente 627 mil mortes em todo o mundo (WHO, 2021).

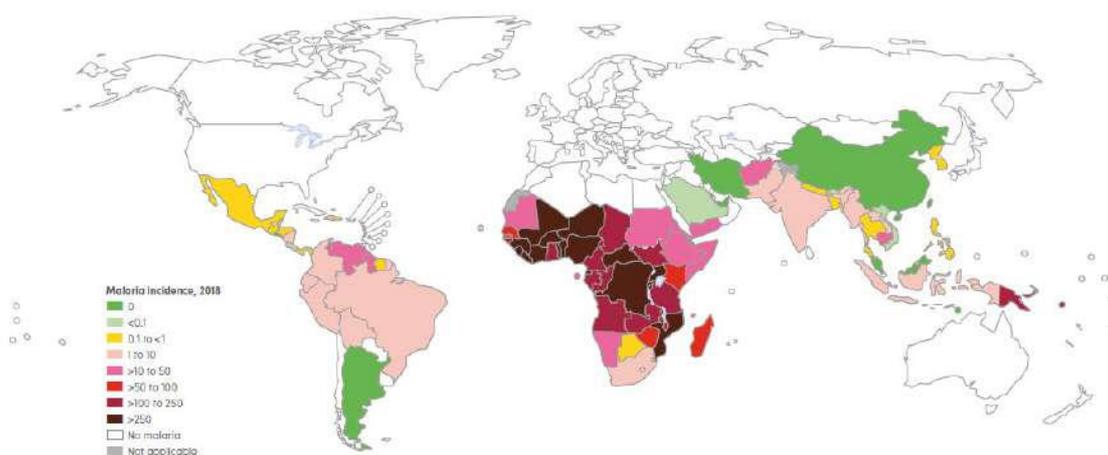


Figura 1: Mapa da taxa de incidência de casos de malária (casos por 1000 habitantes em risco) por país, 2018. (Fonte: WHO, 2019).

Transmitida pela fêmea do mosquito *Anopheles* infectado, a malária é causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium*. Cinco espécies têm sido descritas como agentes causadores da infecção natural em seres humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovalae* e *Plasmodium knowlesi*. Contudo, as duas espécies infectantes mais relevantes do ponto de vista clínico são *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium*

vivax, sendo *P. falciparum* a espécie mais virulenta e, portanto, responsável pela maioria das mortes por malária no mundo (WHO, 2020).

P. knowlesi, anteriormente restrito à infecção de primatas não humanos (PNH), foi classificado como o quinto parasito da malária humana após reconhecimento de seu potencial zoonótico no Sudeste Asiático (SINGH et al., 2004; ANTINORI et al., 2013; YUSOF et al., 2014). Outras duas espécies de plasmódios símios têm sido alvo de estudos devido à sua capacidade de infectar humanos: *Plasmodium simium*, na América do Sul e *Plasmodium cynomolgi*, no Sudeste Asiático (TA et al., 2014; BRASIL et al., 2017; DE ALVARENGA et al., 2018; IMWONG et al., 2019). A infecção humana por *P. cynomolgi* foi relatada após uma transmissão acidental em um laboratório nos Estados Unidos em 1956 e, posteriormente, por ensaios experimentais (CHEONG; COOMBS, 1970; COATNEY et al., 1971). Uma única infecção por *P. cynomolgi* adquirida naturalmente por ser humano foi descrita na Península da Malásia em 2014 a qual foi confirmada por meio de caracterização molecular (TA et al., 2014). Da mesma maneira, apesar da susceptibilidade de humanos ao *P. simium*, até o momento, haviam sido descritas apenas infecções acidentais, entretanto, passou a ser sugerido que casos autóctones de malária humana na Mata Atlântica pudessem estar associadas a *P. simium*, que é morfológica, imunológica e geneticamente indistinguível de *P. vivax* (FONSECA, 1951; DEANE et al., 1966; COLLINS et al., 1969; COATNEY et al., 1971; GOLDMAN et al., 1993). Recentemente, um estudo realizado por BRASIL e colaboradores (2017), confirmou a ocorrência de infecções humanas naturais por *P. simium* na região da Mata Atlântica Brasileira, e levantou a possibilidade de que esse parasito, erroneamente diagnosticado como *P. vivax* devido à ausência de técnicas de tipagem molecular, sempre infectou seres humanos nessa região ou que tenha adquirido esse potencial zoonótico recentemente.

Em 2019 quase metade da população mundial estava sob risco de contrair malária, sendo a maior concentração de risco na África Subsaariana, onde *P. falciparum* é a espécie mais prevalente (WHO, 2020). Alguns grupos populacionais possuem risco consideravelmente maior de desenvolver a forma grave da doença, entre eles crianças menores de cinco anos e mulheres grávidas. Dados recentes mostraram que em 2020 a região africana abrigou cerca de 94% de todos os casos e mortes por malária sendo que crianças

menores de 5 anos representaram 67% de todas as mortes registradas no mundo (WHO, 2021).

Enquanto *P. falciparum* predomina no continente africano, *P. vivax* é a espécie mais prevalente nas outras áreas onde a doença é endêmica, como por exemplo, sul e sudeste da Ásia, Pacífico Ocidental, leste do Mediterrâneo, América Central e América do Sul (BASSAT; ALONSO, 2011). *P. vivax* não causa exacerbada mortalidade; porém, elevada morbidade. Entretanto, a ocorrência de casos graves e de óbitos têm sido associadas a essa espécie em distintas regiões do mundo, incluindo na região endêmica brasileira (FARRAR et al., 2014; GREENWOOD et al., 2008).

No Brasil, a malária é causada por três espécies de *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*. A transmissão de *Plasmodium vivax* é a mais predominante no país, alcançando cerca de 89% dos casos registrados enquanto *P. falciparum* e infecções mistas somam 11% das taxas de incidência (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010; BRASIL, 2020).

Em 2020, foram registrados 145.205 casos da doença no Brasil, sendo que 99.9% dessas ocorrências se deram na região da Amazônia Legal Brasileira, formada pelos estados do Amazonas, Pará, Acre, Rondônia, Amapá, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão (Figura 2; BRASIL, 2022). Registros fora da região Amazônica são, geralmente, casos importados ou autóctones, sendo que a ocorrência desse último vem diminuindo ao longo dos últimos três anos (BRASIL, 2019; BRASIL, 2020; BRASIL 2021).

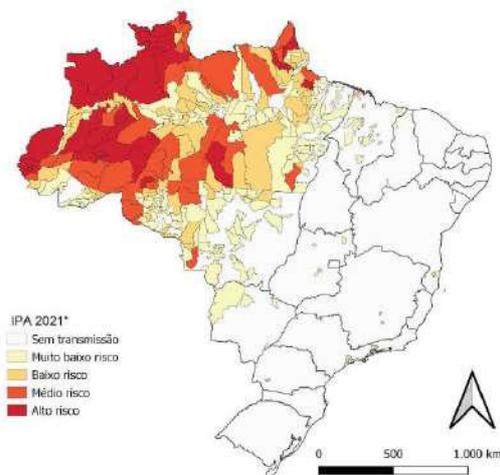


Figura 2: Mapa da distribuição da malária no Brasil em 2021. (Fonte: BRASIL, 2022).

Apesar do progresso obtido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) no combate à malária até finais da década de 70, ela atualmente é ainda um dos mais sérios problemas mundiais de saúde pública (FRANÇA et al., 2008). Diante da necessidade de acelerar os processos na redução da doença a OMS desenvolveu a estratégia técnica mundial (Global Technical Strategy – GTS) para o Paludismo 2016-2030, que estabelece metas mundiais ambiciosas, mas exequíveis para 2030. São elas: (1) reduzir a incidência de casos e as taxas de mortalidade por paludismo, a nível mundial, em pelo menos 90% até 2030; (2) eliminar a doença em pelo menos 35 países até 2030; e (3) evitar o reestabelecimento da infecção, em países que tiverem o paludismo erradicado (WHO, 2015a). Essas estratégias foram ameaçadas pela pandemia do Covid-19 em virtude das interrupções nos programas de tratamento da malária durante a pandemia e com isso, segundo a OMS, o número de mortes por malária pode exceder o número de óbitos da Covid-19 na África subsaariana (WHO, 2020).

1.2- Ciclo de vida do Plasmodio

Os parasitos causadores de malária pertencem ao gênero *Plasmodium*, família *Plasmodiidae* e filo Apicomplexa, cujos representantes são parasitos intracelulares obrigatórios (ASHLEY et al., 2018). Seu ciclo de vida é heteroxênico com um invertebrado, onde ocorre a reprodução sexuada do parasito sendo considerado, portanto, o hospedeiro definitivo; e outro vertebrado (homem) onde a reprodução é assexuada, sendo este o hospedeiro intermediário. De maneira geral, este ciclo pode ser dividido em três fases (Figura 3): (a) a fase sexuada também chamada de ciclo esporogônico e duas fases assexuadas: (b) o ciclo exoeritrocítico, no fígado; e (c) o ciclo eritrocítico, onde o parasito se desenvolve no interior dos eritrócitos (MUELLER et al., 2009).

No mosquito, a infecção ocorre durante o repasto sanguíneo através da ingestão de gametócitos, presentes no sangue de um indivíduo infectado. De forma resumida, esses gametócitos sofrem gametogênese no interior do estômago do inseto, onde ocorre a fecundação. Após a formação do zigoto, o mesmo sofre maturação, alonga-se e adquire motilidade, passando a ser chamado de oocineto. Ele atravessa a membrana epitelial do órgão onde encista-se e passa a ser chamado de oocisto. Nesse momento ocorre a esporogonia, processo de divisão celular que leva à formação dos esporozoítos

que serão liberados no momento da ruptura do oocisto. Ao serem liberados eles serão distribuídos pelo corpo do inseto através da hemolinfa até atingirem as glândulas salivares, quando serão injetados na derme do hospedeiro vertebrado durante novo repasto sanguíneo (ASHLEY et al., 2018).

Nesse momento inicia-se o ciclo assexuado, quando cerca de 15 a 200 esporozoítos são inoculados sob a derme do homem, os quais podem ser drenados até os linfonodos para serem degradados, ou podem atingir a corrente sanguínea dando sequência à infecção (GUEIRARD et al., 2010; AMINO et al., 2006). No sistema circulatório, após cerca de 60 minutos, inicia-se o ciclo exoeritrocítico com a invasão dos hepatócitos pelos esporozoítos, cujo processo é dependente da interação entre o parasito e a célula hospedeira (COPPI et al., 2007).

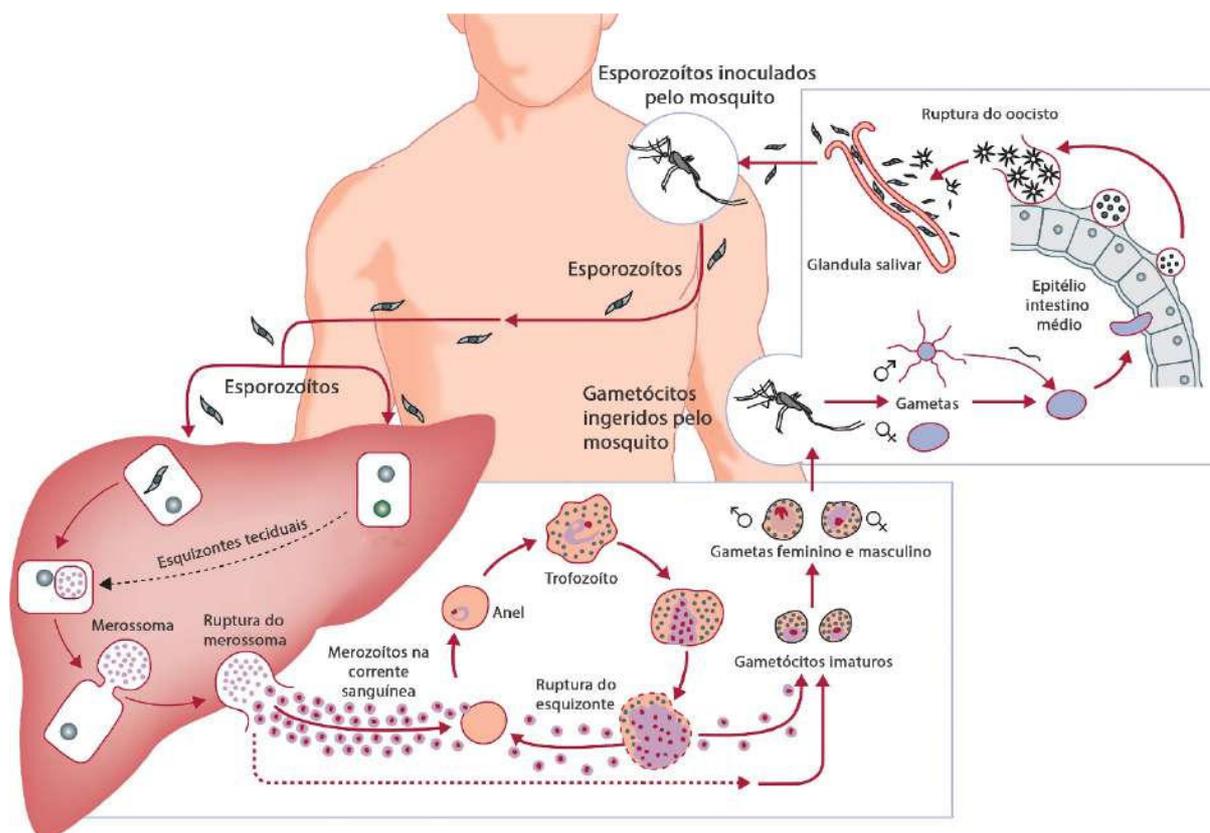


Figura 3: Ciclo biológico de espécies de parasitos do gênero *Plasmodium* no hospedeiro vertebrado e invertebrado. Representação dos estágios pré-eritrocítico e eritrocítico dos parasitos.

Fonte: Adaptado de MUELLER et al. (2009).

O reconhecimento dos hepatócitos pelos esporozoítos envolve a participação de duas proteínas de superfície: a proteína adesiva relacionada a trombospondina (TRAP) e a proteína circunsporozoíta (CSP) que medeiam sua locomoção. Além disso, a CSP ao interagir com os proteoglicanos dos hepatócitos determina o rápido sequestro do parasito pela célula hospedeira (SULTAN et al., 2007; LINDNER; MILLER; KAPP, 2012).

O processo invasivo ocorre com a ação das roptrias, proteínas análogas aos grânulos lisossomais das células de mamíferos, que promovem sua penetração na célula hospedeira (JAYABALASINGHAM, et al., 2010). Esse se dá com a projeção do plasmódio para o interior do hepatócito formando uma invaginação da membrana plasmática que, posteriormente, é remodelada por proteínas do parasito dando origem ao vacúolo parasitóforo (VP). O parasito se reproduz por esquizogonia dentro do VP, que o protege da degradação lisossomal, dando origem a esquizontes teciduais e posteriormente milhares de merozoítos que se desenvolvem no interior de vesículas chamadas merossomas (Figura 4) (BANO et al., 2007; BELACHEW, 2018). Com a liberação dos merossomas na corrente sanguínea (Figura 5) e o posterior rompimento de sua membrana, os merozoítos irão infectar hemácias dando início ao ciclo eritrocítico, responsável pela patologia da malária (MILLER et al., 2013).

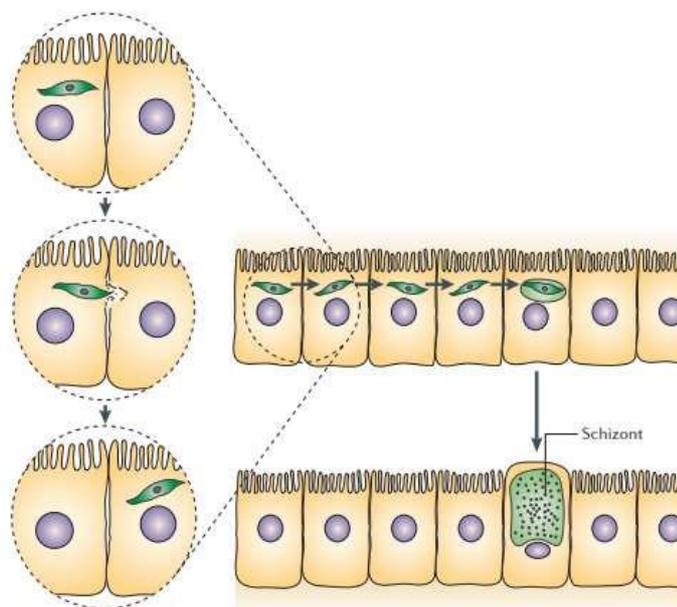


Figura 4: Trânsito de esporozoíto no hepatócito, formação de vacúolo parasitóforo e desenvolvimento do esquizonte.
Fonte: PRUDÊNCIO; RODRIGUEZ; MOTA (2006).

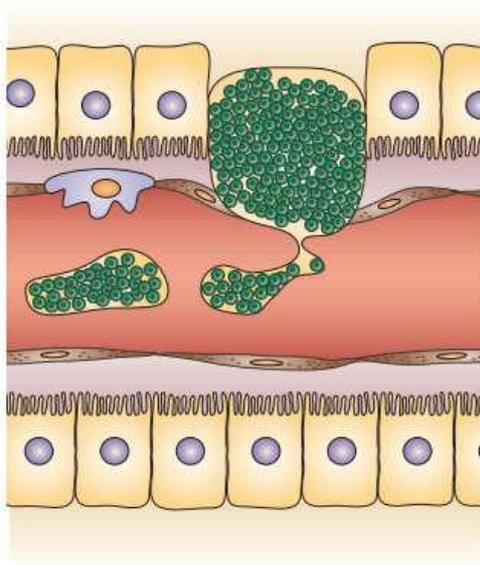


Figura 5: Formação e liberação de merossomas, contendo merozoítos, na corrente sanguínea.
Fonte: PRUDÊNCIO; RODRIGUEZ; MOTA (2006).

Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale* alguns esporozoítos podem não se desenvolver produzindo formas latentes, os chamados hipnozoítos, que permanecem dormentes nos hepatócitos com diferentes períodos de quiescência variando de 15 dias (zonas tropicais) a 20 meses (zonas temperadas) podendo se estender por anos (KROTOSKI, 1985; ASHLEY et al., 2018).

Na circulação sanguínea existem hemácias jovens (reticulócitos) e maduras e as diferentes espécies dos plasmódios mostram distintas preferências pelo tipo de eritrócito a ser invadido. *P. vivax* invade somente reticulócitos utilizando a interação com o grupo sanguíneo Duffy, enquanto *P. falciparum* e *P. malariae* são capazes de invadir todos os tipos de eritrócitos. *P. ovale* também é restrito a reticulócitos enquanto *P. knowlesi*, apesar de possuir preferência por hemácias jovens, é capaz de se adaptar e invadir, também, eritrócitos maduros (IYER et al., 2007; MOON et al., 2013).

A proteína 1 de superfície de merozoítio (MSP-1) desempenha o papel principal na adesão dos merozoítos aos eritrócitos, seguido de sua reorientação, mediada pelo antígeno 1 de membrana apical do merozoítio (AMA-1), que resulta na justaposição da sua extremidade apical com a membrana do eritrócito (COWMAN; CRABB, 2006; BELACHEW, 2018). Uma forte junção entre o

parasito e a membrana do eritrócito é formada, promovendo a liberação de organelas apicais (grânulos densos, micronemas e róptrias) (Figura 6), facilitando a invasão dessas células. Nesse momento, o parasito sofre processo de invaginação para o interior da hemácia, sendo circundado por um anel que é formado pela junção apical e que dará origem ao VP (CHITNIS, 2001; DE NIZ et al., 2017). Essas etapas estão demonstradas na figura 7.

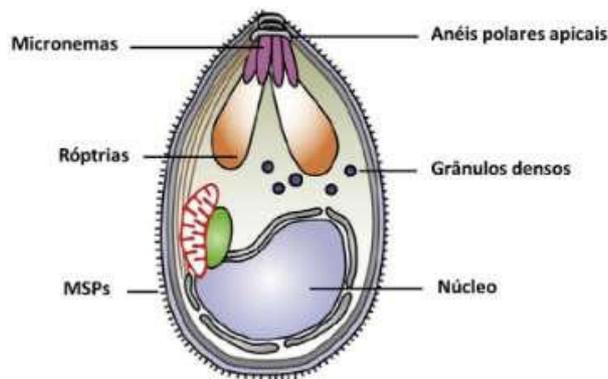


Figura 6: Representação esquemática de estruturas e organelas do merozoíto de *Plasmodium*.

Fonte: THAM; BEESON; RAYNER (2016).

Uma vez interiorizados, os parasitos iniciam novo ciclo de reprodução assexuada com formação de trofozoítos jovens, trofozoítos maduros e posteriormente esquizontes multinucleados, os quais originarão merozoítos sanguíneos que romperão a membrana celular e poderão dar início a um novo ciclo de invasão eritrocítica. Esse ciclo sanguíneo se repete sucessivas vezes, a cada 48 horas, nas infecções, por *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*, e a cada 72 horas, nas infecções por *P. malariae* (ASHLEY et al., 2018). Após diversos ciclos de replicação, os merozoítos eritrocíticos podem desenvolver formas sexuadas, chamados gametócitos, que serão ingeridas pela fêmea do mosquito vetor durante repasto sanguíneo (BRUCE-CHWATT, 1985; PHIMPRAPHI et al., 2008). Ao picarem outro hospedeiro, os mosquitos poderão, então, dar prosseguimento a disseminação da doença.

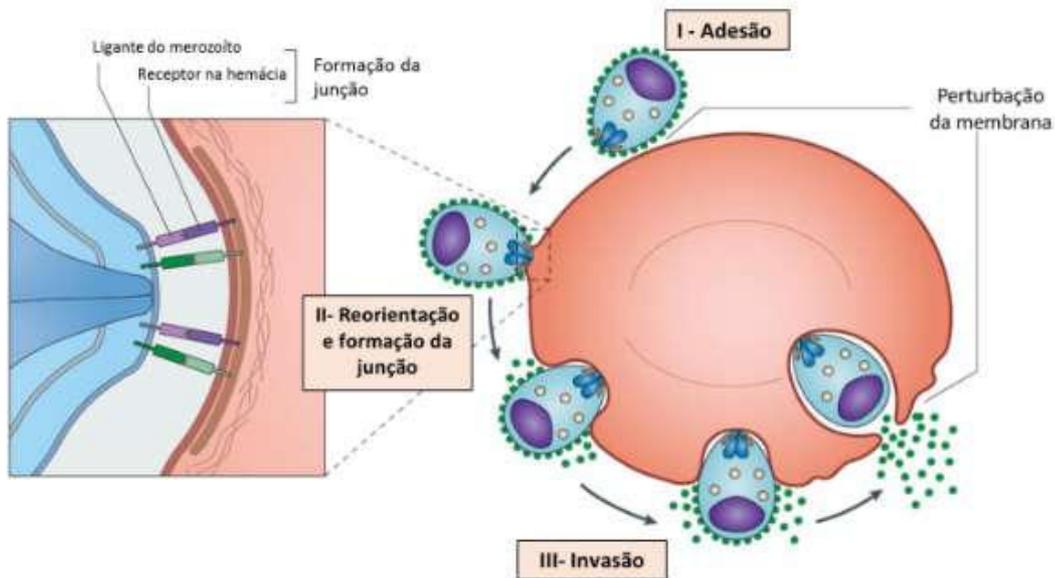


Figura 7: Representação esquemática do processo de invasão do merozoíto em eritrócitos. Fonte: Adaptado de DE NIZ et al. (2017)

1.3- Aspectos Clínicos

Ao serem injetados no hospedeiro vertebrado, os plasmódios enfrentam seu primeiro obstáculo: a pele, uma barreira física que atua como primeira linha de defesa. Porém a permanência dos esporozoítos nesse tecido é transitória e não causa patologia, assim como a fase hepática que é clinicamente silenciosa (SCHOFIELD; GRAU, 2005; YAM; PREISER, 2017).

A fase sintomática corresponde ao período de desenvolvimento intraeritrocítico do ciclo assexuado do parasito, compreendido entre 10 a 15 dias após a picada do mosquito infectado (SCHUMANN 2007; MBENGUE; YAN; BRAUN-BRETON, 2012). Os sintomas envolvem a clássica tríade: febre, calafrio e dor de cabeça. Outros sintomas como mal-estar, dor muscular, sudorese, náusea e tontura podem preceder ou acompanhar a tríade sintomática. Esses primeiros sinais e sintomas da malária são inespecíficos e semelhantes aos de uma doença viral sistêmica, o que geralmente está associado a um diagnóstico mal elaborado (GREENWOOD et al., 1987; WEINBERG; MOON 2009).

As manifestações clínicas, específicas da malária, ocorrem no momento do rompimento das hemácias, quando substâncias tóxicas ao hospedeiro, como a GPI (glicosilfosfatidilinositol) e hemozoína (pigmento malárico), são liberadas na corrente sanguínea. Essas substâncias induzem uma resposta imunológica

através da liberação de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-1 e 6 (IL-1 e IL-6) por macrófagos, ocasionando o aparecimento de febre alta e calafrios, um processo conhecido como acesso malárico (CLARK; SCHOFIELD, 2000). Como os parasitos se multiplicam sincronicamente esse ciclo febril se manifesta a cada 48h ou 72h, dependendo da espécie de plasmódio. No primeiro caso, quando causada por *P. vivax* ou *P. ovale* é chamada febre terçã benigna e quando causada por *P. falciparum* é chamada febre terçã maligna, devido a maior possibilidade de causar complicações que predisõem o óbito. O termo febre quartã corresponde às infecções causadas por *P. malariae* (ALVES et al., 2007). Entretanto, se houver assincronismo na maturação dos plasmódios o paroxismo febril pode estar ausente, fato importante a ser considerado quando se realiza o diagnóstico precoce da doença (MOHAPATRA et al., 2002).

As respostas imunes inatas, que são iniciadas em resposta à infecção por malária, desempenham papéis importantes tanto no desenvolvimento da imunidade protetora quanto na patogênese (ANGULO; FRESNO, 2002; SCHOFIELD; GRAU, 2005; CLARK et al., 2008; DEROOST et al., 2015; DUNST; KAMENA; MATUSCHEWSKI, 2017). Respostas pró-inflamatórias precoces direcionam para um perfil de resposta de células Th1, estimulando células efetoras a controlarem a infecção efetivamente. Porém, à medida que a infecção progride, as respostas pró-inflamatórias são contra reguladas com aumento paralelo das respostas antiinflamatórias, direcionando para uma resposta de células Th2 (PERRY et al., 2005). Geralmente isso leva ao equilíbrio de respostas pro/antiinflamatória, entretanto, dependendo da dinâmica de interação parasito-hospedeiro as respostas pró-inflamatórias podem ser reguladas em excesso a favor do parasito resultando, assim, no desenvolvimento do quadro grave da doença.

A doença causada por *P. ovale*, *P. malariae* e *P. vivax*, normalmente é mais branda, porém essa última espécie, está sendo, cada vez mais, associada a casos de malária grave nos últimos anos (ANSTEY et al., 2009; KOCHAR et al., 2005; GENTON et al., 2008; BAIRD, 2013; NAING et al., 2014). Entretanto, o desenvolvimento da malária grave é comumente decorrente de infecções por *P. falciparum* e pode ser definida com base em diversos quadros clínicos, dentre eles a malária cerebral, a qual se manifesta com comprometimento neurológico,

convulsões e coma podendo levar ao óbito (DUNST et al., 2017; WASSMER; GRAU, 2017).

A malária cerebral ocorre com uma frequência variável, atingindo entre 0,01% a 16% dos pacientes infectados e é a principal causa de óbito, com uma letalidade de 10% a 50%, mesmo com o tratamento adequado (BREMAN, 2001; BRAGA et al., 2004; ALVES et al., 2007). Dos pacientes que sobrevivem a este quadro, cerca de 10% sofrem lesões cerebrais significativas desenvolvendo graves déficits neurológicos, principalmente em crianças (BREWSTER et al., 1990; NEWTON; KRISHNA, 1998). Embora alguns déficits graves, como cegueira, ataxia e hipotonia central melhorem com o tempo, 25% dos indivíduos acometidos têm deficiências de longo prazo, especialmente cognição, função motora ou comprometimento do comportamento e epilepsia (CARTER et al., 2005; NGOUNGOU; PREUX, 2008; JOHN et al., 2014). Assim, além de causar milhares de mortes, a malária cerebral também é considerada uma das principais causas de neurodeficiência em crianças africanas, sendo que os principais fatores de risco para seu desenvolvimento incluem convulsões repetidas, coma profundo e prolongado, hipertensão intracraniana e hipoglicemia (IDRO et al., 2010).

1.4- Imunopatogênese da Malária Cerebral

A fisiopatologia da MC (malária cerebral) é complexa e envolve dois conceitos centrais: a hipótese da oclusão vascular, e a hipótese da inflamação (STORM; CRAIG, 2014). A primeira envolve mecanismos de sequestro de eritrócitos infectados que se ligam ao endotélio vascular e induzem a ativação das células endoteliais, processo conhecido como citoaderência, que provoca a obstrução do fluxo sanguíneo e, conseqüente hipóxia cerebral (BERENDT et al., 1994). A segunda hipótese sugere que a MC é resultado de uma resposta imune exacerbada, na qual citocinas do tipo Th1, especialmente TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e IFN- γ (interferon gama), apresentam papel central no processo (CLARK; ROCKETT, 1994; WHO, 2014; WASSMER; GRAU, 2017; SIERRO; GRAU, 2019). Porém, nenhum desses mecanismos por si só explica totalmente a patogênese da MC. As duas hipóteses são mutuamente dependentes, ou seja, interações dinâmicas ocorrem entre esses mecanismos,

explicando a complexidade desta infecção potencialmente fatal (STORM; CRAIG, 2014; BRUNEEL, 2019).

A citoaderência refere-se a um conjunto de mecanismos no qual os eritrócitos infectados (EI) por formas maduras de *P. falciparum* se ligam a receptores expressos na superfície de diferentes células do hospedeiro. Dentre esses mecanismos destacam-se (Figura 8): sequestro de EI, que corresponde à retirada das formas maduras do parasito da circulação periférica para a microvasculatura, onde aderem às células endoteliais (UDEINYA et al., 1981) a formação de rosetas, que é a adesão de eritrócitos infectados a outros não infectados (UDOMSANGPETCH et al., 1989; HANDUNETTI et al., 1992); e a autoaglutinação, que corresponde à adesão entre EI, podendo esta ser mediada por plaquetas (PAIN et al., 2001).

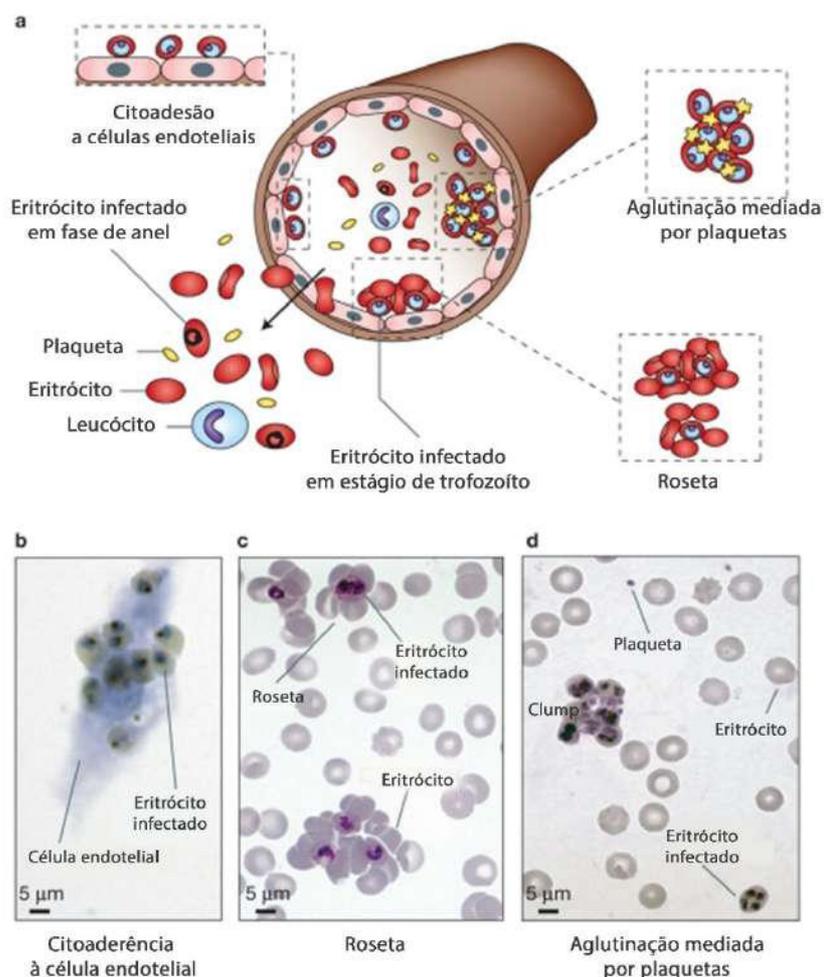


Figura 8: Adesão de eritrócitos infectados por *P. falciparum* a células humanas.

Fonte: adaptado de ROWE et al., 2009.

A citoaderência está relacionada à gravidade da doença e por isso, os fatores que medeiam a adesão têm sido o foco de numerosos estudos (FRANKE-FAYARD et al., 2010). Estes estudos resultaram na identificação de proteínas do parasito (ligantes) e do endotélio do hospedeiro (receptores) que estão diretamente envolvidas no processo (SHARMA, 1991; BARUCH, 1999; SHERMAN et al., 2003; KRAEMER; SMITH, 2006; GAMAIN et al., 2007).

A infecção do eritrócito por *P. falciparum* acarreta em modificações morfológicas e estruturais da membrana eritrocítica, com o aparecimento de projeções, semelhantes a protuberâncias, denominadas *knobs*. Os *knobs* são constituídos por diversos polipeptídeos, tais como a PfEMP-1 (*Proteína de Membrana 1 Do Eritrócito Infectado por P. falciparum*), e são os locais pelos quais os eritrócitos infectados por *P. falciparum* aderem às superfícies endoteliais (SHARMA, 1991). Essa proteína é capaz de mediar uma ampla gama de interações adesivas a diversos receptores endoteliais, incluindo o CD36 (*Cluster of Differentiation 36*) que é expresso em diversos tecidos, inclusive na superfície de linfócitos, monócitos, macrófagos e no endotélio vascular, sendo particularmente abundante no endotélio dos vasos sanguíneos cerebrais; ICAM-1 (*Intercelular Adhesion Molecule 1*) e VCAM-1 (*Vascular Adhesion Molecule 1*) presentes principalmente nos microvasos cerebrais e outros órgãos vitais; e a CSA (*Chondroitin Sulfate A*) expressa, em sua maioria, no tecido placentário (OCKENHOUSE et al., 1989; BERENDT et al., 1989; ROBERT et al., 1995; ROGERSON et al., 1995). Esses eventos de ligação permitem que os parasitos sequestram em órgãos como o cérebro, que embora seja vantajoso para a sobrevivência do plasmódio contribui para a obstrução microvascular e hipóxia que pode levar a MC

Além disso, acredita-se que a citoaderência pode promover aumento da taxa de reinvasão de eritrócitos, elevando a densidade populacional. Nesse contexto, a formação de rosetas propiciaria um maior contato entre os merozoítos liberados pelos esquizontes e os eritrócitos não infectados, aumentando a eficiência da reinvasão (HANDUNNETTI et al., 1989).

A citoaderência e o acúmulo de parasitos amplificam as respostas imunes *in situ*, promovendo a infiltração de células imunes, dano endotelial, disfunção e falha de órgãos (PHILLIPS et al., 2017; ASHLEY et al., 2018; GOWDA; WU, 2018). À medida que os parasitos sequestrados amadurecem, eles produzem

uma variedade de moléculas bioativas que regulam positivamente ou negativamente os processos patogênicos no sistema imunológico inato. As respostas imunes às infecções são iniciadas principalmente pela interação de PAMPs (*Padrões moleculares associados a patógenos*) com receptores expressos por células hospedeiras. A hemozoína e o GPI (*Glicosilfosfatidilinositol*) de *P. falciparum* são classificados como PAMPs e induzem a expressão de muitos genes envolvidos na patogênese da malária. São exemplos: genes que codificam citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas-1 e 2 (IL-1 e IL2), óxido nítrico sintase e várias moléculas de adesão que são expressas na superfície do endotélio vascular e são reconhecidas por *P. falciparum* (HOWES et al., 2016; PHILLIPS et al., 2017). O resultado é um acúmulo de células imunes na microvasculatura e uma resposta inflamatória sistêmica com secreção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF α , IFN γ e linfotóxina. Essas citocinas, mais notavelmente o TNF α , geram um círculo vicioso de ativação de macrófagos, aumento do sequestro e produção regulada de espécies reativas de oxigênio, incluindo óxido nítrico (NO) na circulação geral e *in situ*. Células T CD8+ específicas do parasito são importantes na secreção de granzimas e perforinas, os quais são mediadores que contribuem para ocorrência de danos locais citotóxicos ao endotélio da barreira hematoencefálica (BHE), induzindo edema citotóxico que deve contribuir para o edema cerebral (WHO, 2014; WASSMER; GRAU, 2017; SIERRA; GRAU, 2019).

1.4.1. Modelo murino de malária cerebral

O estudo da MC em humanos é limitado a observações *post-mortem* e, por esse motivo, uma das opções mais utilizadas para estudar os fenômenos histológicos e os mecanismos imunopatogênicos da malária cerebral é através do uso de modelos animais. Nesse contexto, o camundongo é o modelo animal mais utilizado, pois mimetiza, embora não em sua totalidade, as características da doença humana (LOU et al., 2001). O modelo mais utilizado é aquele que emprega camundongos infectados por diferentes espécies de *Plasmodium* murinos adaptados (Tabela 1), que acaba permitindo um melhor estudo e elucidação de aspectos e características patogênicas da doença. Entretanto, o

modelo murino apresenta algumas diferenças em relação à doença em humanos (Tabela 2), como por exemplo o tipo predominante de célula sequestrada na microcirculação que no caso dos camundongos são os leucócitos, enquanto no homem são os eritrócitos (ADAMS et al., 2000; QUEIROZ et al, 2008; TORRE et al., 2018).

Tabela 1: Infecção por *Plasmodium* em diferentes linhagens de camundongos e seu uso experimental.

Parasito	Cepa	Linhagem do Camundongo	Letalidade	Uso Experimental
<i>P. chabaudi</i>		CBA	Não letal	Mecanismo imune
		C57Bl/6 BALB/c		Sinais clínicos associados à malária e mecanismos de adesão celular
	AS	129sv A/J DBA/2	Letal	Patogênese Quimioterapia Resistência e Susceptibilidade Mecanismo imune
<i>P. berghei</i>	ANKA	C57Bl/6 BALB/c CBA	Letal	Patogênese Malária Cerebral Experimental (MCE) Mecanismos de adesão celular
		NK65	C57Bl/6 BALB/c CBA DBA	Letal
<i>P. yoelii</i>	17XL	C57Bl/6 BALB/c CBA DBA Swiss	Letal	Mecanismo imune Patogênese Mecanismos de adesão celular Malária Cerebral Experimental (MCE)
		YM	C57Bl/6 BALB/c CBA DBA	Letal
	17XNL	C57Bl/6 BALB/c CBA DBA	Não Letal	Resposta imune Vacinação
<i>P. vinckei</i>		BALB/c	Letal	Sinais clínicos e sequestro Patogênese

Tabela adaptada de QUEIROZ et al., 2008.

Tabela 2: Comparação de características da malária cerebral humana vs. malária cerebral experimental no modelo de infecção de camundongo por *Plasmodium berghei*.

Parâmetros	MC Humana	MC Experimental
Físicos e comportamentais		
Convulsão, paralisia,	+	+
Febre	+	-
Hipotermia	-	+
Histopatologia cérebro		
Mudanças nos astrócitos e micróglia	+	+
Sequestro de eritrócitos parasitados	+	+
Sequestro de leucócitos	+	+
Sequestro de plaquetas	+*	+
Protusões tipo Knob nos eritrócitos	+	-
Hemorragia parenquimatosa	+	+
Dano neuronal	+	+
Edema	+	+
Imunológicos		
Expressão citocinas pró-inflamatórias	+	+
Alta expressão de MHC classe I e II	+	+
Aumento de moléculas de adesão celular	ICAM-1, VCAM-1, TSP, E-selectina, ácido hialurônico, CSA	ICAM-1, VCAM-1
Bioquímicas		
Aumento de lactato	+	+
Aumento de metabólitos da via da quinurenina	+	+

*Presente em crianças com MC da África Subsaariana, mas não reportado em adultos

Fonte: TORRE et al., 2018.

A maioria dos estudos de malária cerebral provêm do modelo de infecção por *Plasmodium berghei* ANKA (PbA), que apresenta uma divisão segura entre as linhagens de camundongos resistentes e susceptíveis. Camundongos C57Bl/6 são uma linhagem susceptível ao desenvolvimento da MC, e nesse modelo, a MC se apresenta como uma síndrome neurológica, que se

desenvolve de 6 a 12 dias após a infecção (dpi), com mortalidade de cerca de 90%. No momento da morte a parasitemia dos animais é relativamente baixa e as manifestações neurológicas incluem piloereção, postura arqueada, desequilíbrio, paralisia dos membros, convulsões e coma além de alterações cerebrais microscópicas, como ativação de células endoteliais e micróglia, identificadas em portadores desta manifestação clínica (MEDANA; HUNT; CHAN-LING, 1997). Os 10% dos animais que sobrevivem à malária cerebral experimental (MCE), morrem em torno do 20º dpi, em razão de anemia resultante da hiperparasitemia e outros fatores, porém, sem sinais neurológicos (FRANKE-FAYARD et al., 2010). Em contrapartida, as linhagens resistentes exibem uma resposta diferencial ao parasito, não desenvolvem MC e morrem, aproximadamente, 20 dias após a infecção devido à anemia grave e hiperparasitemia (KOSSODO; GRAU, 1993).

Outro modelo de estudo para a MC é aquele induzido por *P.yoelii* 17XL. A infecção por esse parasito apresenta um processo inflamatório menos intenso que o PbA e sequestro de eritrócitos parasitados na microcirculação (SHEAR et al., 1998; SARFO et al., 2005). Já infecção por *P. chabaudi chabaudi* pode cursar de maneira letal ou não, dependendo da genética do hospedeiro (FOOTE et al., 1997). Apesar de não haver envolvimento cerebral nesse modelo de infecção, em animais deficientes para o gene da IL-10 ocorre comprometimento cerebral, com a presença de edema e hemorragias, o que fortalece o papel da resposta pró-inflamatória como um importante fator na patogênese de complicações cerebrais (SANNI et al., 2004).

1.5- Tratamento

Em regiões endêmicas, muitos pacientes são presumivelmente tratados para malária com base apenas no sintoma febril. Porém, essa prática incentiva o uso excessivo e indiscriminado de medicamentos antimaláricos e, conseqüentemente, o desenvolvimento de resistência aos medicamentos. Como parte dos esforços para erradicação da doença, além do controle de vetores, diretrizes para tratamento da malária de 2015 recomendam que todos os casos suspeitos sejam confirmados com um teste de diagnóstico antes do início da terapia medicamentosa, a menos que as capacidades de diagnóstico parasitológico não estejam disponíveis (WHO, 2015a).

O diagnóstico rápido e preciso permite o direcionamento para o tratamento adequado, visto que a terapia medicamentosa da malária é espécie-específica (WHO 2015b). Seus principais objetivos são: (1) reduzir a morbidade e a mortalidade; (2) garantir a cura da infecção prevenindo a progressão da doença não complicada para forma grave; (3) reduzir a transmissão da doença e (4) evitar o surgimento e a disseminação da resistência aos antimaláricos (WHO 2015b).

Os medicamentos com eficácia na terapêutica antimalárica atuam em pontos específicos do ciclo evolutivo do parasito, por isso, diferentes tipos de agentes antimaláricos são classificados com base em sua estrutura química e pelo seu alvo no ciclo biológico do parasito. De acordo com a atividade antiplasmodial, os agentes antimaláricos foram divididos em quatro classes: gametocidas, esquizontocidas sanguíneos, esquizontocidas teciduais e esporontocidas. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Os gametocidas (primaquina e derivados de artemisinina) inibem a transmissão da doença, impedindo o desenvolvimento de formas sexuadas dos parasitos (gametócitos) na fase sanguínea do ciclo de vida do plasmódio. Enquanto os esquizontocidas teciduais (primaquina e tafenoquina) previnem as chamadas recaídas tardias causadas por hipnozoítos de *P. ovale* e *P. vivax* (WELLS et al., 2010) os esquizontocidas sanguíneos, dentre eles, cloroquina, mefloquina, amodiaquina, lumefantrina e derivados de artemisinina, atuam nos parasitos assexuados circulantes (OLLIARO, 2001). Eles interrompem o desenvolvimento das formas eritrocitárias assexuadas dos plasmódios, que são responsáveis pela patogenia e manifestações clínicas da infecção, através da ação em diferentes alvos conforme demonstrado na Figura 9 (WHO, 2000). Os esporontocidas (primaquina) também inibem a transmissão da doença, mas através do bloqueio do desenvolvimento de oócitos do ciclo de vida do *Plasmodium sp.* no hospedeiro invertebrado.

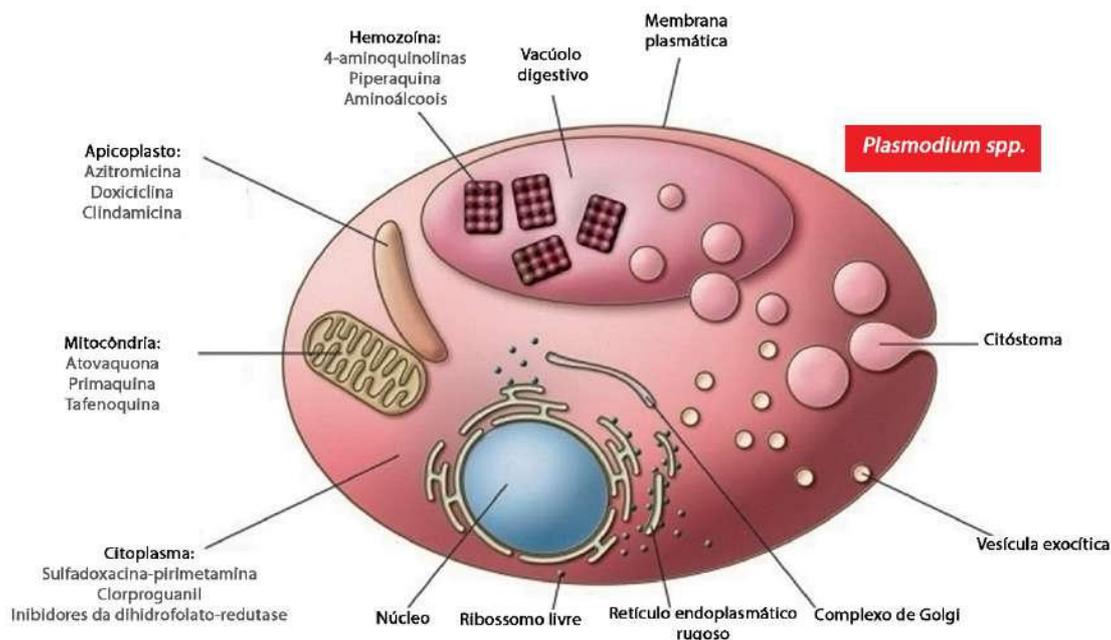


Figura 9: Representação esquemática dos alvos dos principais antimaláricos esquizontocidas sanguíneos em parasitos *Plasmodium* spp.

Fonte: Adaptado de GREENWOOD et al., 2008.

Quanto à estrutura química os antimaláricos disponíveis são classificados como quinolinas (4-aminoquinolinas; 8-aminoquinolinas), aminoálcoois, sulfonamidas, biguanidas, diaminopirimidinas, lactonasesquiterpênicas (artemisinina e seus derivados semissintéticos), naftoquinonas e antibióticos (WHO 2015a). Os principais antimaláricos estão listados na Tabela 3.

Tabela 3: Principais antimaláricos disponíveis e seus estágios alvo no parasito.

Antimalárico	Classificação Química	Estágios alvo no parasito			
		GM	ER	HP	ESP
Amodiaquina	4-aminoquinolina		*		
Cloroquina			*		
Primaquina	8-aminoquinolina	*	*	*	*
Tafenoquina				*	
Arteméter	Endoperóxido semissintético (derivados de artemisinina)	*	*		
Artesunato		*	*		
Dihidroartemisinina		*	*		
Quinina	Aminoálcool		*		
Mefloquina			*		

Lumefantrina			*		
Clorproguanil			*	*	
Proguanil	Biguanidas		*	*	
Atovaquona	Naftoquinona		*	*	
Piperaquina	Bisquinolina		*	*	
Pirimetamina	Diaminopirimidina		*	*	*
Sulfadoxina	Sulfonamida		*	*	
Azitromicina	Antibiótico macrolídeo			*	
Clindamicina	Antibiótico lincosamidas			*	
Doxiciclina	Antibiótico Tetraciclina			*	
Tetraciclina	Antibiótico			*	

GM – gametócitos; ER – formas eritrocíticas; HP – hipnozoítos; ESP – esporozoíto
Tabela adaptada de AGUIAR *et al.*, 2012.

1.5.1. Principais antimaláricos usados na terapêutica

A descoberta do primeiro medicamento antimalárico ocorreu, através da observação de pacientes que se curavam da doença febril aguda após ingestão de infusões de casca de plantas da espécie *Cinchona calisaya* (TALISUNA *et al.*, 2004). Anos depois, em 1820, foi caracterizada a substância ativa presente nesta infusão, a qual foi denominada quinina. Sua estrutura química é composta principalmente por um alcaloide, sendo este o responsável pela atividade antimalárica (LA-SCALEA *et al.*, 2007).

Até o século XIX a quinina era o único antimalárico conhecido, mas após a Primeira Guerra Mundial diversos antimaláricos sintéticos foram desenvolvidos a partir do seu anel quinolínico, dando origem às 4- e 8-aminoquinolinas, dentre eles a cloroquina (Figura 10).

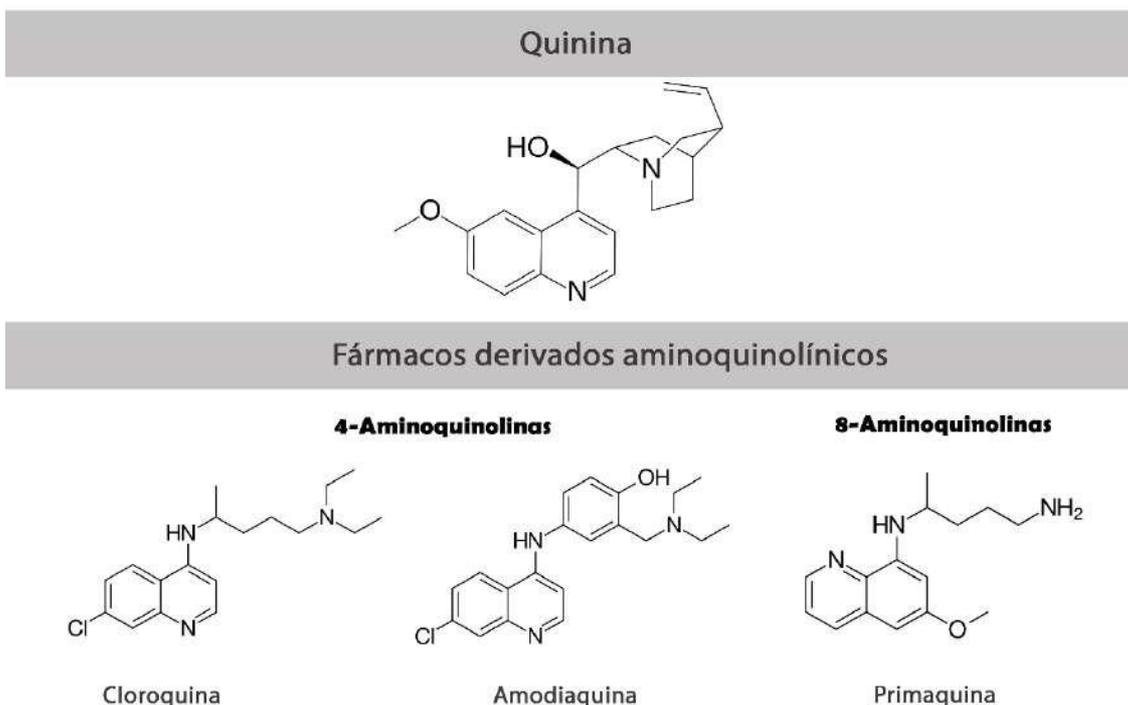


Figura 10: Fórmula estrutural da quinina e seus derivados.
Adaptado de CUNICO et al., 2008.

A cloroquina, uma 4-aminoquinolina, foi o mais eficaz dentre esses fármacos e a droga antimalárica mais amplamente usada para profilaxia e tratamento de malária grave e não grave. Atua como um agente esquizotocida sanguíneo e em dose antimalárica terapêutica apresenta baixa toxicidade. Entretanto, pacientes que recebem tratamento com cloroquina em altas doses e/ou longo prazo, devem ser submetidos às avaliações oftalmológicas e neurológicas periodicamente, pois seu uso prolongado pode levar a efeitos tóxicos graves, ou até mesmo, irreversíveis (FIGUEIREDO et al., 2004; LACAVAL, 2010). Apesar da alta eficácia, seu uso profilático levou à resistência de *P. falciparum* em todos os países endêmicos, reduzindo sua utilização como monoterapia. Atualmente é utilizada em combinação com outros antimaláricos ou como monoterapia no tratamento da malária causada por *P. vivax* em regiões onde há pouca ou nenhuma resistência documentada (WHO, 2011).

O mecanismo de ação das 4-aminoquinolinas ocorre através da inibição da formação da hemozoína, promovendo a morte do parasito. Durante o desenvolvimento eritrocítico, os parasitos digerem a hemoglobina em seu vacúolo digestivo, gerando aminoácidos que são utilizados para sua maturação

e também o grupamento heme (ferroprotoporfirina IX- Fe(II)PPIX), que é oxidado em ferriprotoporfirina IX - Fe(III)PPIX e fica acumulado no vacúolo digestivo do protozoário (SHERMAN, 1977; YAYON et al., 1984). O heme livre é altamente tóxico por gerar espécies reativas de oxigênio e induzir estresse oxidativo levando à morte do parasito. Para contornar esse problema os parasitos, então, convertem o heme em hemozoína, um polímero inerte, insolúvel e não tóxico (KUMAR; BANDYOPADHYAY, 2005). Os 4-aminoquinolínicos atuam inibindo esse processo de conversão do heme em cristais de hemozoína, promovendo a morte do parasito (SHERMAN, 1998; SILVA et al., 2005).

A primaquina (PQ), uma 8-aminoquinolina, por ser ativa contra os hipnozoítos hepáticos, é utilizada na prevenção de recaídas tardias, frequentes na malária causada por *P. vivax* e *P. ovale* (WELLS et al., 2010). Apesar de não afetar os esporozoítos e possuir baixa atividade contra o estágio eritrocítico do parasito, possui ação gametocitocida, sendo também utilizada como bloqueadora da transmissão da doença (BRUECKNER et al., 2001). É o fármaco mais utilizado do grupo das 8-aminoquinolinas, sendo geralmente coadministrado com um agente esquizonticida sanguíneo (FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008). Seu mecanismo de ação não está bem esclarecido, mas a droga parece atuar nas mitocôndrias interferindo no processo de geração de energia ou ainda podendo ser capaz de gerar radicais livres nocivos ao parasito (HILL et al., 2006).

Outros derivados quinolínicos foram introduzidos posteriormente e incluíam compostos como a amodiaquina que também foi amplamente utilizada, inclusive para o tratamento de malária causada por cepas de *P. falciparum* resistente à cloroquina (PETERS, 1973; ACHAN et al., 2017). Durante a Segunda Guerra Mundial novos antimaláricos foram descobertos como as sulfonamidas, sulfonas, proguanil e, posteriormente, pirimetamina que, juntamente com a cloroquina, forneceu um bom arsenal de antimaláricos sintéticos que foram usados por vários anos para quimioprofilaxias e quimioterapia (PETERS, 1973; ACHAN et al., 2017).

A mefloquina, um 4-quinolinometanol de efeito esquizonticida sanguíneo, também foi sintetizada a partir do anel quinolínico e foi muito utilizada no tratamento da malária a partir dos anos 80 (PALMER et al., 1993). A mefloquina apesar de ser mais ativa do que a cloroquina podendo ser utilizada em dose

única, mostrou-se tóxica, ocasionando efeitos colaterais graves, inclusive sintomas neurológicos (PATCHEN et al., 1989). Atualmente seu uso é recomendado somente em combinação a outros antimaláricos, principalmente artemisinina, no tratamento de *P. falciparum* multirresistente (WHO 2006).

Durante a década de 1970, pesquisadores chineses descobriram o potencial antimalárico da artemisinina, um sesquiterpeno lactona extraído da planta *Artemisa annua* (KLAYMAN, 1985; PACKARD, 2014). Por apresentar baixa solubilidade, a artemisinina foi modificada quimicamente e a partir dessas modificações foram sintetizados derivados mais estáveis, como o arteméter, artesunato e diidroartemisinina (Figura 11) (FAURANT, 2011).

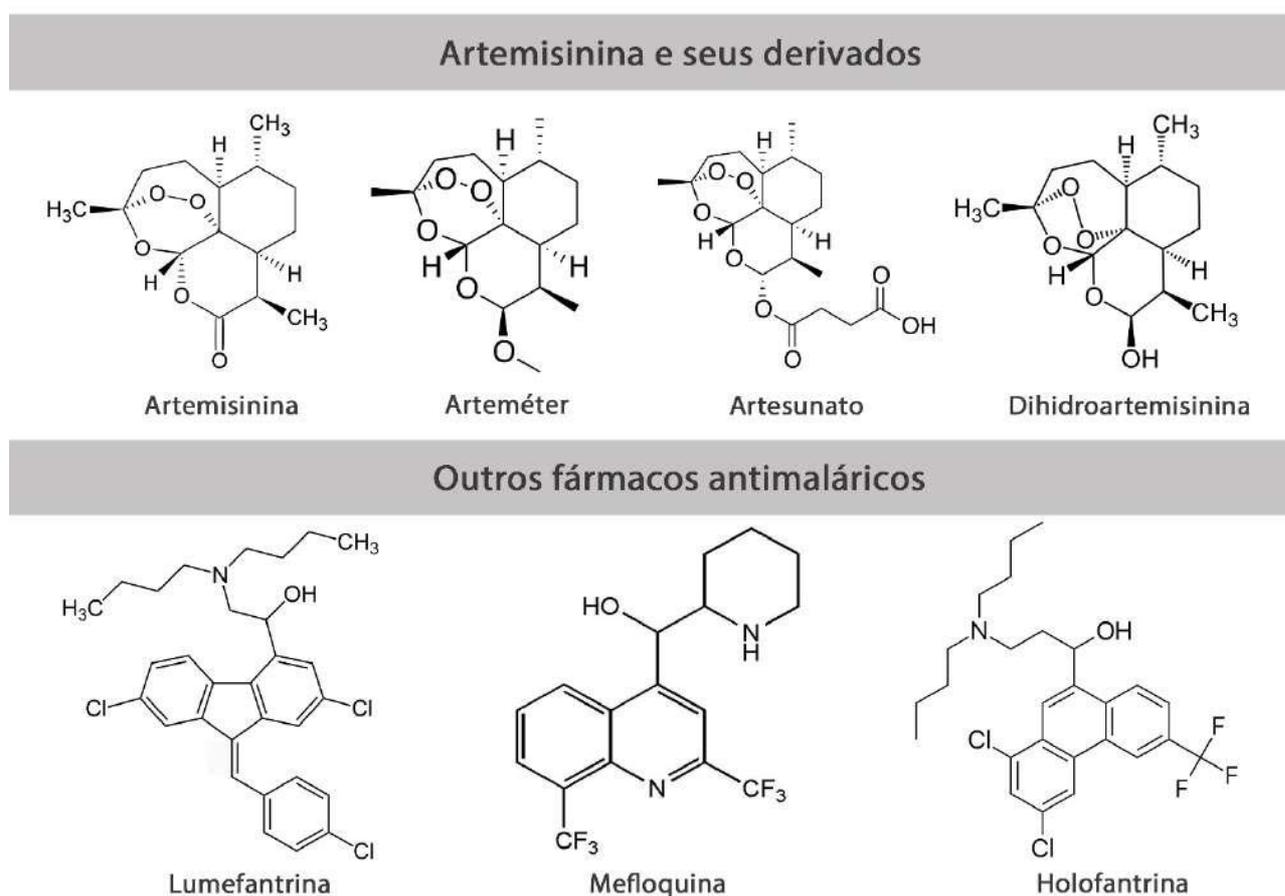


Figura 11: Fórmula estrutural da artemisinina e seus derivados e outros fármacos utilizados no tratamento da malária.

Adaptado de CUNICO et al., (2008).

Esses derivados da artemisinina possuem várias características farmacológicas importantes, incluindo ação rápida, meia-vida curta, atividade contra vários estágios do parasito e um excelente perfil de segurança (WHITE,

2008). Atuam como esquizonticidas sanguíneos, mas seu mecanismo de ação não está bem descrito. Acredita-se que possam agir através da formação de radicais livres pela clivagem dos endoperóxidos dos compostos pelo grupo heme da hemoglobina (FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008). Outros estudos indicam que o mecanismo de ação é similar ao das quinolinas, onde os fármacos se acumulam no vacúolo digestivo do parasito e interferem na formação da hemozoína (HYDE, 2002). Além dos efeitos sobre a esquizogonia sanguínea os derivados de artemisinina também apresentam atividade gametocida, entretanto, não se sabe se este efeito é ou não somente reflexo de rápida ação sobre as formas sanguíneas do parasito, impedindo o surgimento dos gametócitos (FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008).

Esses compostos são ativos contra cepas de *Plasmodium* resistentes a todos os outros fármacos e têm aplicação crescente no tratamento da malária *falciparum* aguda. Entretanto, sua meia vida curta gera a necessidade de esquemas de tratamento longos o que diminui a adesão. Devido a isso, foi introduzida a terapia combinada a base de artemisinina (ATC) com o intuito de reduzir a duração do tratamento e eliminar os parasitos restantes (que escapam com a monoterapia por artemisinina), através da combinação de compostos com perfis farmacocinéticos diferentes, uma estratégia para evitar o avanço da resistência (WHITE, 2004; WHO, 2010).

Conforme diretrizes do Ministério da Saúde, no Brasil atualmente os esquemas terapêuticos são: (1) para tratar a malária não complicada por *P. vivax* é recomendado o uso da cloroquina por 3 dias combinada com primaquina por 7 dias, caracterizando o tratamento curto, ou ainda o tratamento longo com 3 dias com cloroquina e 14 dias com primaquina. A primaquina tem também ação sinérgica com a cloroquina contra formas assexuadas, portanto, quando essa não é utilizada, o clareamento da parasitemia é mais lento e maior é a chance de recrudescência; (2) o tratamento de *P. malariae* assemelha-se ao tratamento para malária *vivax* (apenas cloroquina por três dias), porém sem a necessidade do uso da primaquina; (3) nas infecções por *P. falciparum* utiliza-se a ACT, com artesunato e mefloquina ou arteméter e lumefantrina, por 3 dias para tratamento contra as formas eritrocíticas e primaquina, em dose única para eliminação dos gametócitos; (4) para tratamento da malária por infecções mistas por *P. falciparum* e *P. vivax* (ou *P. ovale*) o tratamento deve incluir

artemerter/lumefantrina ou artesunato/mefloquina, que são drogas esquizotomicidas sanguíneas eficazes para todas as espécies, associando-as à primaquina por sete dias (para o tratamento radical de *P. vivax*) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

1.6- Resistência aos antimaláricos

A resistência aos antimaláricos é definida como a capacidade do parasito em sobreviver e/ou multiplicar-se apesar da administração e absorção de determinado medicamento em doses iguais ou superiores às usualmente recomendadas, mas dentro dos limites de tolerância do paciente (WHO, 2011).

Dois processos são importantes para o estabelecimento de cepas capazes de continuar seu ciclo de desenvolvimento e disseminação mesmo após a introdução do tratamento com fármacos: (1) a ocorrência ocasional de uma mutação genética que permita a sobrevivência do parasito na presença de um antimalárico, para o qual ele se torna resistente. A mutação é então passada para seus descendentes, gerando uma população capaz de resistir ao medicamento; (2) a seleção das cepas resistentes por meio do tratamento com esses medicamentos, resultando na eliminação das cepas sensíveis (WHO, 2014). Como resultado, as infecções resistentes têm maior probabilidade de recrudescer e, eventualmente, à medida que a resistência aumenta, essas infecções respondem mais lentamente ao tratamento (ACHAN et al., 2017).

Tanto as taxas aumentadas de recrudescência quanto as respostas iniciais lentas ao tratamento aumentam a probabilidade de ocorrência e disseminação de resistência, em comparação com infecções sensíveis a drogas (WHITE, 2004). A resistência aos medicamentos é o fator mais importante na determinação da vida útil terapêutica de um medicamento. Até o momento, a resistência foi relatada para três das cinco espécies plasmódios que infectam humanos: *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* (ZOFOU, 2011). A figura 12 esquematiza, cronologicamente, a descoberta dos antimaláricos e o surgimento da resistência de *P. falciparum* a eles.

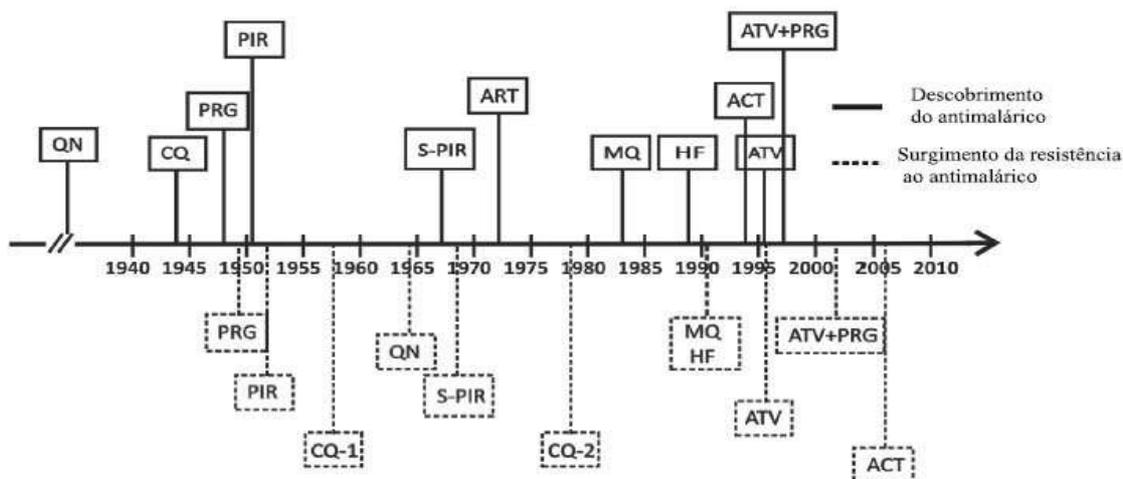


Figura 12: Esquema cronológico da descoberta dos antimaláricos e surgimento da resistência de *P. falciparum* aos mesmos.

Fonte: SOUZA (2015).

QN=Quinina; CQ=Cloroquina; CQ-1=Resistência à Cloroquina no Sudeste Asiático e América do Sul; CQ-2=Resistência à Cloroquina na África; PRG=Proguanil; S-PIR=Sulfadoxina-Pirimetamina; ART=Artemisinina; MQ=Mefloquina; HF=Halofantrina; ACT=Artemisinina Combinada; ATV=Atovaquona+Proguanil.

Os primeiros relatos de resistência à cloroquina por *P. falciparum* ocorreram na década de 1950. Ela ocorreu quase simultaneamente no Sudeste Asiático, em 1957 e na América do Sul em 1959 (WERNSDORFER; PAYNE, 1991; YOUNG; MOORE, 1961). Na África essa resistência surgiu tardiamente, em 1978, e disseminou-se por todas as áreas endêmicas até os anos 1990 (WERNSDORFER; PAYNE, 1991; RIDLEY, 2002). Estudos de cruzamentos genéticos entre uma linhagem sensível e uma linhagem resistente permitiram destacar uma região do cromossomo 7 como responsável pela resistência do parasito à CQ, com o envolvimento do gene *Pfcr1* (*P. falciparum chloroquine resistance transporter gene*) que é altamente polimórfico e codifica um transportador transmembrana do vacúolo digestivo do parasito (BENNET et al., 2004; DURRAND et al., 2004). Entretanto, apenas em 2000 foi identificada que a mutação *Pfcr1 K76T* foi responsável pelo surgimento do fenótipo de resistência à CQ, funcionando como uma espécie de bomba de efluxo, impedindo o acúmulo da droga no parasito, devido à capacidade de *Pfcr1* em exportar a CQ para fora do vacúolo digestivo (TCHEKOUNOU et al., 2022).

Casos de sensibilidade reduzida do *P. falciparum* à quinina foram relatados em 1960 no Sudeste Asiático e com menor frequência na África e América do Sul (ZALIS et al., 1998; JELINEK; GROBUSCH; LOSCHER; 2001; WONGSRICHANALAI et al., 2002). A sensibilidade à quinina independe da sensibilidade à cloroquina ou à mefloquina sugerindo que ocorram por mecanismos de resistência distintos (PRADINES et al., 2010). Estudos in vitro associam um polimorfismo do gene *Pfnhe-1* (*Plasmodium falciparum Na⁺/H⁺ exchanger-1*) com a resistência à quinina. Esse gene codifica o transportador Na⁺/H⁺ na membrana citoplasmática do parasito, regulando o pH citoplasmático. Dessa forma, alterações no pH citoplasmático relacionados a esse transportador podem alterar a atividade da quinina (BENNET et al., 2007).

A terapia antimalárica combinada por sulfadoxina e pirimetamina foi introduzida em 1967 e no ano seguinte já foram relatados os primeiros casos de resistência à essa combinação de fármacos, a qual foi descrita pela primeira vez no Camboja, Tailândia, e disseminou-se rapidamente pelo Sudeste Asiático e África (WOOTTON et al., 2002; ROPER et al., 2004; ACHAN et al., 2017). A resistência à mefloquina foi observada pela primeira vez no início da década de 1990 perto da fronteira com o Camboja tailandês, sendo relatada, posteriormente, com frequência no Sudeste Asiático e em menor grau na África e América do Sul (SHANKS, 1994; PRICE et al., 2004). A resistência in vitro do *P. falciparum* aos antifolatos (pirimetamina, proguanil) e sulfonamidas (sulfadoxina) é devida a uma aquisição sequencial de mutações pontuais específicas nos genes *Pfdhfr* (*P. falciparum dihydrofolate reductase gene*) e *Pfdhps* (*P. falciparum dihydropteroate synthase gene*), respectivamente (COWMAN et al., 1988). Tais mutações alteraram a conformação do sítio ativo onde os inibidores se ligam, diminuindo assim suas afinidades de ligação (PLOWE et al., 1997).

Casos de resistência de *P. falciparum* à atovaquona como monoterapia foram relatados 10 anos após a sua introdução e posteriormente, sua associação ao proguanil também desenvolveu cepas resistentes que foram registradas em 2002 (CHIODINI et al., 1995; LOOAREESUWAN et al., 1996; FIVELMAN et al., 2002). O complexo citocromo *bc1* (ou complexo III) é uma enzima mitocondrial chave que catalisa a transferência de elétrons do ubiquinol para o citocromo c, mantendo assim o potencial de membrana mitocondrial (CROFTS, 2004). A

atovaquona é um análogo estrutural da ubiquinona do parasito, sendo, portanto, um potente inibidor dessa cadeia de transferência de elétrons promovendo a morte parasitária (HAMMOUND et al., 1985). Numerosos polimorfismos de mononucleotídeos no gene do citocromo b de *Plasmodium* spp. estão envolvidos na resistência à atovaquona e na combinação atovaquona-proguanil (SIREGAR et al., 2015; SUTHERLAND et al., 2008).

Também houve relatos adicionais de resistência do *P. falciparum* a outros medicamentos antimaláricos, incluindo amodiaquina, halofantrina, lumefantrina, piperaquina e mais recentemente, artemisinina e seus derivados (HALL et al., 1975; WHITE, 2004; EASTMAN et al., 2011; NOEDL et al., 2008; DONDORP et al., 2009). *Pfmdr1* (*P. falciparum* multi-drug resistance 1 gene), originalmente chamado de gene candidato à resistência a CQ, está localizado no cromossomo 5 e codifica um segundo transmissor, o *Pgh1* (*P. falciparum* P-glycoprotein 1), o qual está localizado na membrana do vacúolo digestivo com seu domínio de ligação ao ATP direcionado para o citoplasma (VAN et al., 1994). No *Plasmodium*, esse suporte induz um mecanismo auxiliar permitindo a entrada de moléculas no vacúolo digestivo. Foram identificadas cinco mutações pontuais neste gene as quais afetam a capacidade de ligação e transferência de moléculas e que foram relacionadas à resistência a lumefantrina, quinina, halofantrina, quinina, artemisinina e cloroquina (REED et al., 2000; SISOWATH et al., 1997).

Os primeiros casos de falha às ACTs para malária *falciparum* foram relatados em 2008 no Camboja e apesar do sucesso dessa família de fármacos a disseminação de resistência a esses compostos já está generalizada no Sudeste Asiático, provavelmente por polimorfismos nos genes *Pfmdr1* e *Pfcr1*, dificultando as medidas de controle da malária (NOEDL et al., 2008; WOODROW; WHITE, 2017; TCHEKOUNOU et al., 2022).

O surgimento de cepas de *P. vivax* resistentes à CQ, foi documentado pela primeira vez em Papua Nova Guiné em 1989 (RIECKMANN et al. 1989). Apesar de poucos, alguns estudos relatam a ocorrência de malária vivax CQ-resistente na América Latina, incluindo no Brasil, desde 1996 (PHILLIPS et al., 1996; de SANTANA FILHO et al., 2007; MARQUES et al., 2013). Entretanto, ainda não foi determinado até que ponto *P. vivax* CQ-resistente representa,

atualmente, uma ameaça significativa aos esforços de controle da malária na América Latina (GONÇALVES et al., 2014).

O desenvolvimento extremamente rápido do fenômeno de resistência aos antimaláricos justifica a busca contínua por novas moléculas (PRADINES et al., 2010). Nesse contexto, novos compostos vêm sendo pesquisados com a cooperação das mais diversas áreas como genômica, bioquímica, química e bioinformática (LEMKE, 2008).

1.7- Desenvolvimento de fármacos

Novos fármacos podem ser descobertos a partir de várias fontes naturais ou serem sintetizados em laboratório (ALLEN et al., 2012). Ao longo da história, as plantas serviram de reservatório para potenciais novos fármacos. Algumas das principais contribuições para a terapia medicamentosa moderna podem ser atribuídas à conversão bem-sucedida da medicina popular em medicamentos efetivos, como por exemplo: a reserpina, um ansiolítico e agente hipotensor, cuja substância ativa foi isolada com base no uso popular da *Rauwolfia serpentina*; e a própria quinina, que teve seu uso terapêutico antimalárico explorado através da observação de pacientes que se curavam da doença após ingestão de infusões de casca de plantas da espécie *Cinchona calisaya* (TALISUNA et al., 2004; ALLEN et al., 2012).

O planejamento racional de fármacos é uma das estratégias da química medicinal que consiste na utilização dos conhecimentos sobre fisiopatologia e das bases moleculares da terapêutica. A partir do alvo que se deseja alcançar, é possível planejar um ligante que atue de forma agonista ou antagonista (GUIDO et al., 2010). Dessa forma, é possível planejar um fármaco utilizando a estrutura topológica do alvo ou a estrutura de algum ligante conhecido, seja ele um fármaco ou uma molécula endógena (LEE et al., 2011; ALVES et al., 2017).

As etapas que fazem parte do desenvolvimento de novos medicamentos, ilustradas na figura 13, são complexas e envolvem grandes investimentos financeiros e requerem tempo (BERNDT et al., 2005). Para que sejam introduzidos no mercado são necessários, em média, 12 a 15 anos em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) com custos variando entre 500 milhões a 1 bilhão de dólares (DiMASI; HANSEN; GRABOWSKI, 2003; LOMBARDINO; LOWE, 2004; NETTERWALD, 2006).

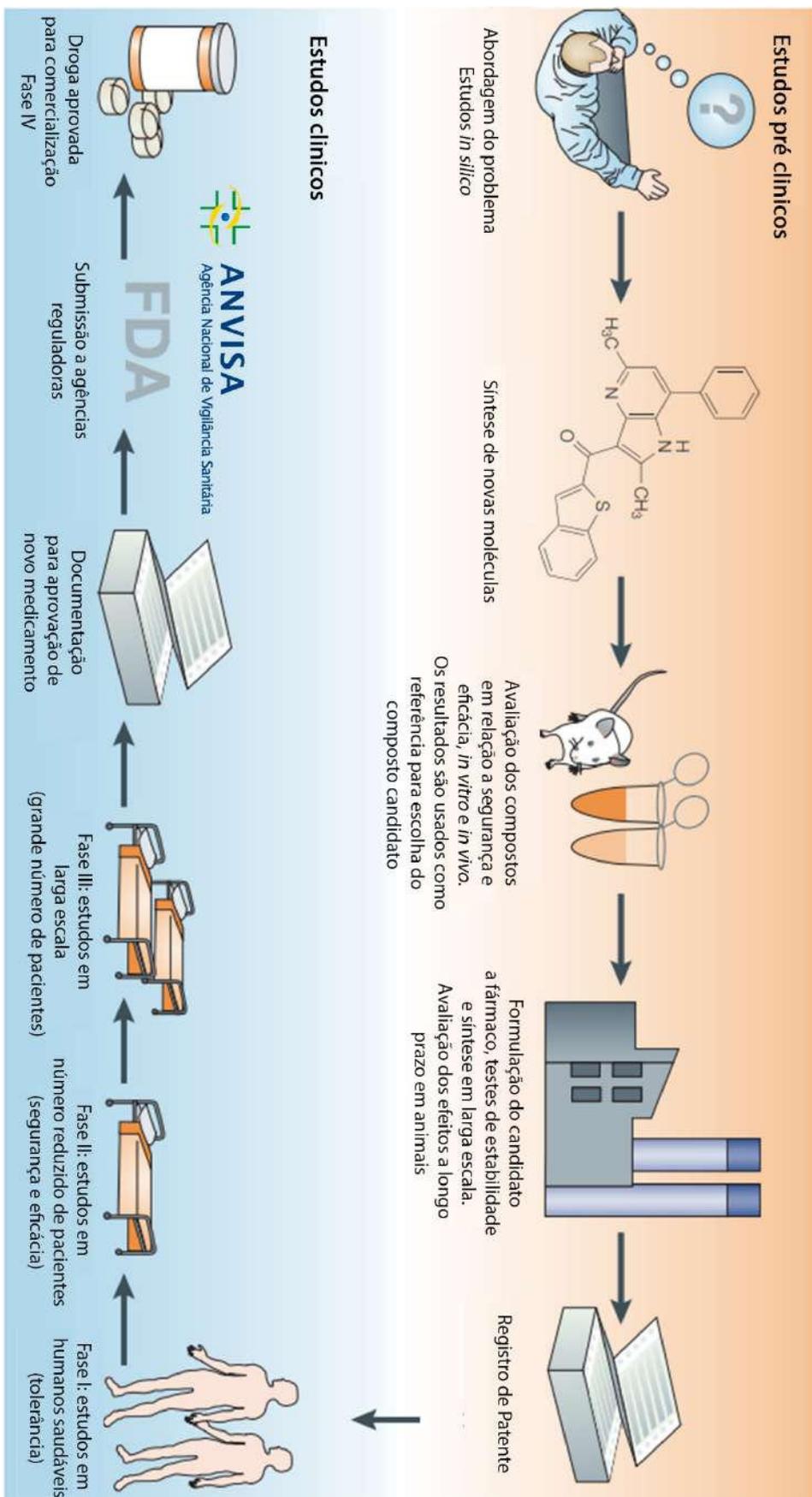


Figura 13: Etapas no processo de desenvolvimento de fármacos.
 Fonte: Adaptado de LOMBARDINO; LOWE (2004).

Com o propósito de reduzir o custo e o tempo em P&D, novas tecnologias vêm sendo empregadas no planejamento de fármacos. Modelos *in silico* (simulação computacional) estão sendo utilizados nos estágios iniciais de P&D para seleção e otimização de moléculas com maior potencial para desenvolvimento. Esses modelos devem ser integrados aos ensaios *in vitro* e *in vivo* com o propósito de diminuir a quantidade de moléculas avaliadas e maximizar as chances de sucesso no desenvolvimento de fármacos (BUTINA; MATTHEW; FRANKCOMB, 2002; BAJORATH, 2004; WEINER, 2006).

Outro ponto importante do desenvolvimento de um medicamento é a farmacodinâmica (dinâmica/ação do medicamento no organismo). Por muito tempo ela foi o alvo principal dos estudos, entretanto, para que os efeitos farmacológicos resultem na ação terapêutica desejada é necessário que o insumo farmacêutico ativo (IFA) apresente farmacocinética apropriada (BERESFORD; SELIK; TARBIT, 2002; MODA, 2011). A farmacocinética é o estudo dos processos de absorção (A), distribuição (D), metabolização (M) e excreção (E) de um composto e é conhecido como estudo das propriedades ADME (MODA, 2011; LIN, 2003).

A maioria dos fármacos desenvolvidos são administrados por via oral, o que implica a necessidade de uma boa biodisponibilidade, ou seja, o composto precisa ser bem absorvido para se tornar disponível na corrente sanguínea e ser distribuído para o local de ação. A absorção de um fármaco pode ser prevista através de suas propriedades físico-químicas e um dos trabalhos pioneiros no sentido de identificar quais propriedades físico-químicas de um composto estão relacionadas com uma adequada biodisponibilidade oral foi desenvolvido por LIPINSKI e colaboradores (1997) e ficou conhecido como a regra dos cinco. Esse estudo estabeleceu que candidatos a fármacos apresentariam baixa absorção e permeabilidade se infringissem pelo menos duas das seguintes propriedades: Massa Molar (MM) > 500; coeficiente de partição (LogP) ≤5; número de átomos doadores de ligação hidrogênio (HBD) ≤5; e número de átomos aceptores de hidrogênio (HBA) ≤10 (LIPINSKI et al., 1997).

Atualmente, encontram-se disponíveis na internet algumas plataformas que ajudam a prever propriedades desses candidatos, quanto aos aspectos físico-químicos e farmacocinéticos, auxiliando na seleção de potenciais candidatos a novos fármacos (CHENG et al., 2012; MABKHOT et al., 2016).

1.8. Os alcaloides e potencial antimalárico

Alcaloides são substâncias orgânicas cíclicas de caráter básico, que possuem um ou mais átomos de nitrogênio e apresentam muitas propriedades farmacológicas (HENRIQUES et al., 2004). De acordo com a sua origem e com a posição do nitrogênio eles são separados em três grandes grupos: os alcaloides verdadeiros, que são derivados de aminoácidos e apresentam o nitrogênio no sistema cíclico; os protoalcaloides, que também são derivados de aminoácidos, mas apresentam o átomo de nitrogênio fora do sistema cíclico; e os pseudoalcaloides, que são substâncias nitrogenadas básicas que apresentam as características dos alcaloides verdadeiros, mas não derivam de aminoácidos (DEWICK, 1997; HENRIQUES et al., 2004). A maioria destas substâncias são de origem vegetal e apenas uma pequena porcentagem é produzida por animais. Esses compostos são formados por diversos tipos de esqueleto e sua classificação é dada de acordo com o aminoácido que lhe deu origem.

A partir dos aminoácidos alifáticos, têm-se os alcalóides pirrolidínicos e tropânicos (Ornitina) e os piperidínicos (Lisina), e dos aminoácidos aromáticos têm-se os alcalóides isoquinolínicos (Tirosina) e os indólicos (Triptofano) (DEWICK, 1997). Dentre as classes de alcaloides existentes destacam-se os alcaloides indólicos, que segundo DEWICK (2002), compreendem mais de 3000 substâncias e são a maior classe de alcaloides encontrados na natureza. São derivados, em sua maioria, do aminoácido triptofano, que sofre uma descarboxilação pela ação enzimática da triptofano descarboxilase, formando a triptamina que através de várias rotas biosintéticas originam seis tipos de esqueleto diferentes: os β -carbolínicos, indólicos simples, ergot, quinolínicos, pirroloindólicos e indólicos terpenóides, os quais estão demonstrados na figura 14, com um exemplo de cada classe (DEWICK, 2002).

Os alcaloides indólicos representam uma importante classe de compostos com propriedades farmacêuticas, inclusive antimalárica. O primeiro antimalárico descoberto foi a quinina, um alcalóide quinolínico (4-aminoquinolínico), que durante muitos anos foi considerado a principal droga contra malária em todo o mundo (FRANÇA et al., 2008). Por volta de 1944 sua síntese completa foi obtida por químicos americanos, mas devido ao alto custo e complexidade do processo sua obtenção ainda é através do isolamento fitoquímico (FRANÇA et al., 2008;

SÁ, 2011). Baseados no esqueleto da quinina, foram obtidos alguns derivados sintéticos que tiveram importante papel no combate à doença, sendo o mais famoso a cloroquina (CUNICO et al., 2008).

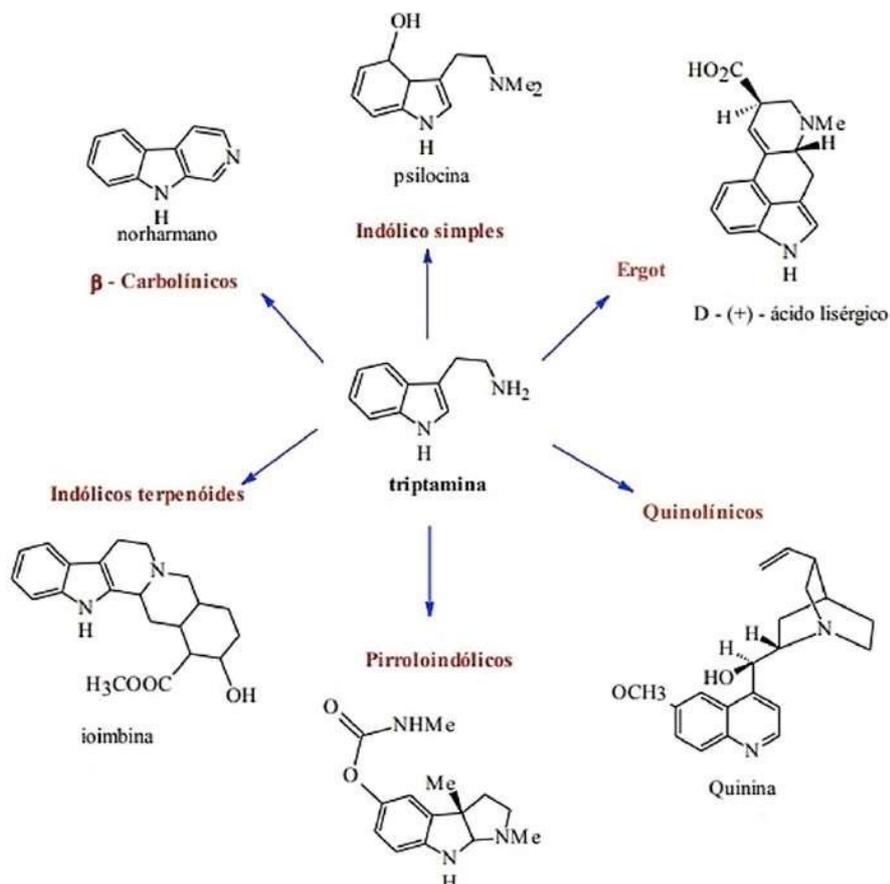


Figura 14 : Esqueletos de alcalóides indólicos derivados do aminoácido triptofano. Fonte: Adaptado de DEWICK, 2002.

Triagens *in vitro*, tem revelado que vários alcalóides indólicos, além dos pertencentes à classe dos quinolínicos, apresentam atividade antimalárica com Cl_{50} na faixa submicromolar, e com ótimos índices de seletividade (FREDERICH et al. 2008; KAUR et al. 2009; PASSEMAR et al. 2011; WRIGHT 2005). Entretanto, em alguns casos, há limitações quanto ao rendimento dos compostos obtidos tanto através de isolamento fitoquímico quanto pela via sintética. Por esse motivo, vários grupos de pesquisa têm investido em compostos que apresentem estrutura simples e bom rendimento e que possam apresentar bons

resultados em relação à atividade antimalárica e seletividade (MONTAIA, 2017). Nesse contexto a classe dos alcaloides β -carbolínicos vem sendo alvo de inúmeros estudos quanto ao potencial antiplasmodial, bem como os alcaloides quinolínicos que possuem muitos derivados efetivos e já comercializados.

- 4-aminoquinolinas

4-Aminoquinolinas são aminoquinolinas que possuem o grupo amina ($-NH_2$) na posição 4 do anel quinolínic (Figura 15). São os derivados da quinolina com importante destaque devido a suas notáveis propriedades antimaláricas.

As características das 4-aminoquinolinas já foram discutidas no item 1.6.1 (Principais antimaláricos usados na terapêutica).

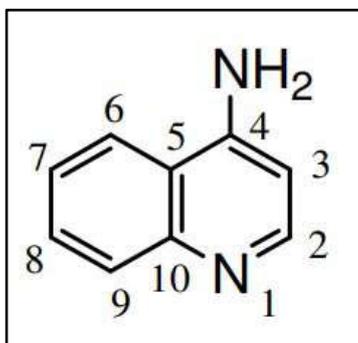


Figura 15: Anel quinolínic com grupo amina na posição 4.

Fonte: Adaptado de SCALERCIO, 2010.

- Alcaloides β -carbolínicos

Os alcaloides β -carbolínicos, ou simplesmente β -carbolinas, pertencem ao grupo indólico, que além de apresentarem um núcleo indólico, possuem um anel piridínico hidrogenado de seis membros (Figura 16) (HENRIQUES et al., 2004). Em geral, são moléculas formadas por um sistema tricíclico pirido[3,4-b]indólico, com pequenas modificações estruturais com relação aos padrões de hidrogenação e substituição nos anéis. Os alcaloides do tipo β -carbolínico também são conhecidos como alcaloides tipo harmala, devido ao fato de terem sido isoladas pela primeira vez a partir da espécie *Peganum harmala* (Zygophyllaceae) (HASHIMOTO et al., 1998; JIMENEZ et al., 2008).

De acordo com a saturação do anel piridínico são classificados em três grupos: as β -carbolinas, que apresentam o anel piridínico completamente insaturado; as diidro- β -carbolinas, com anel parcialmente saturado; e as tetrahidro- β -carbolinas, que possuem anel piridínico completamente saturados (GLENNON et al., 2000; CAO et al., 2007). As principais modificações estruturais encontradas na classe dos β -carbólicos ocorrem nas posições 1 e 7 com a presença de diferentes ligantes (H, OMe, OH, entre outros), como por exemplo: norharmano, harmina, harmano, e o harmol, além de variações quanto ao número de saturações no anel piridínico, podendo ser encontrado sistemas dihidro- β -carbolinas, como no caso da harmalina e tetrahidro- β -carbolina, como o 1,2,3,4-tetrahidroharmalina (Figura 17) (BOEIRA, 2001).

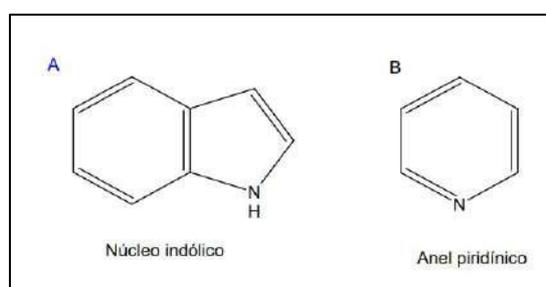


Figura 16: Estruturas do núcleo indólico (A) e anel piridínico (B) presente nos alcaloides β -carbólicos.

Fonte: Adaptado de BOEIRA, 2001.

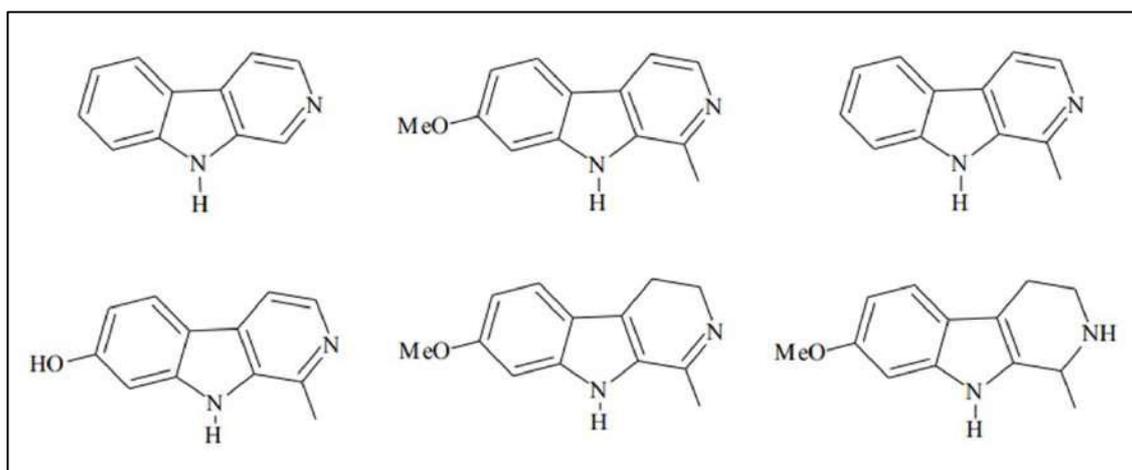


Figura 17: Estruturas dos alcaloides β -carbólicos: norharmano (23), harmina (24), harmano (25), harmol (26), harmalina (27) e 1,2,3,4-tetrahidroharmalina (28).

Fonte: Adaptado de MONTIOIA, 2010.

Um dos principais efeitos relacionados às β -carbolinas são implicações psicotrópicas e alucinógenas, possivelmente associados às atividades neurofarmacológicas desses alcaloides (CALLAWAY et al., 1996; HERRAIZ et al., 2010). Entretanto, outros efeitos farmacológicos são associados a esses compostos e são inúmeros os estudos relacionando os alcaloides β -carbolínicos com atividade antimalárica (YENJAI et al., 2000; TAKASU et al., 2005; FIOT et al., 2006; ASTULLA et al., 2008; VAN BAELEN et al., 2009; BONAZZI et al., 2010; THONGTHOOM et al., 2010; MOLETTE et al., 2013). Nesse contexto, os alcaloides β -carbolínicos são excelentes candidatos ao estudo de potenciais novos compostos com atividade antiplasmodial.

2. JUSTIFICATIVA

Apesar dos programas para controle e erradicação da malária, elaborados pela Organização Mundial da Saúde, e dos avanços obtidos nesse aspecto a doença continua sendo um dos principais problemas de saúde pública mundial, sendo responsável por mais de 620 mil mortes somente no ano de 2020 (WHO, 2021). O diagnóstico precoce e preciso aliado ao tratamento rápido e adequado é a principal medida de controle da doença, visto que não há ainda uma vacina que tenha uma boa eficiência contra a infecção e/ou agravamento das infecções. Entretanto, o surgimento e disseminação generalizada de resistência aos antimaláricos disponíveis, inclusive aos esquemas de tratamento mais recentes tem colocado em alerta os programas voltados para o controle da doença em todo o mundo (NOEDL et al., 2008; MISHRA et al., 2017; WOODROW; WHITE, 2017), justificando, assim, a necessidade de uma busca contínua por novas moléculas seguras e eficazes para o tratamento da malária independentemente da espécie de parasito infectante. Devido às limitações enfrentadas no desenvolvimento de vacinas e nas ações focadas no controle de vetores a quimioterapia é o método fundamental e a alternativa mais viável para controle ou eliminação da malária a longo prazo (PRADINES et al., 2010).

Com base nesses conhecimentos, este trabalho se propôs a avaliar a atividade antiplasmodial e citotóxica de compostos sintéticos derivados de aminoquinolinas e alcaloides β -carbolínicos, a fim de determinar se apresentam potencial para atuarem no tratamento da malária, incluindo casos graves.

3. OBJETIVOS

3.1-Geral

Avaliar a atividade antiplasmodial e citotóxica de derivados sintéticos de 4-amminoquinolinas e alcaloides β -carbolínicos.

3.2- Específicos

- 1- Analisar, *in silico*, as propriedades físico-químicas e farmacocinéticas de absorção dos derivados 4-aminoquinolínicos e dos alcaloides β -carbolínicos.
- 2- Avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade dos compostos em células WI26VA4 e/ou HepG2.
- 3- Determinar, *in vitro*, a atividade esquizonticida sanguínea dos compostos contra a cepa de *P. falciparum* W2 através das técnicas HRPII, SYBR GREEN I ou teste tradicional.
- 4- Determinar o Índice de Seletividade dos compostos
- 5- Avaliar, *in vivo*, a ação antiplasmodial, em modelo murino de malária cerebral, dos compostos selecionados pelos ensaios *in silico* e *in vitro*
- 6- Analisar, *in vivo*, a eficácia do tratamento contra a malária cerebral, considerando-se aspectos macroscópicos e/ou histopatológicos de tecido cerebral tais como hemorragias, inflamação e obstrução vascular.
- 7- Avaliar, *in vitro* e/ou *in silico*, um provável mecanismo de ação dos compostos.

4. CAPÍTULO I: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTIPLASMODIAL *IN SILICO*, *IN VITRO* E *IN VIVO* DE COMPOSTOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE AMINOQUINOLINAS

4.1. INTRODUÇÃO

A malária continua sendo um dos maiores desafios de saúde pública em todo o mundo, sendo endêmica em regiões tropicais e subtropicais do mundo (WHO, 2021). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2020, 241 milhões de pessoas sofreram com a infecção resultando em aproximadamente 627.000 mortes em todo o mundo, principalmente em crianças menores de cinco anos (WHO, 2020).

Dentre as espécies capazes de infectar humanos, as duas mais relevantes do ponto de vista clínico são *P. falciparum* e *P. vivax* (WHO, 2020). *P. falciparum* é a espécie mais virulenta sendo responsável pela malária grave que inclui a síndrome da malária cerebral (MC) (PHILLIPS et al., 2017). Durante a MC, os eritrócitos infectados (EI) são sequestrados em microvasos cerebrais (fenômeno conhecido como citoaderência), levando à obstrução capilar e inflamação (AIKAWA, 1988; BERENDT; TUMER; NEWBOLD, 1994; MOHANTY et al., 1994; TURNER et al., 1994). Em seguida, ocorre hemorragia e edema cerebral devido ao rompimento das junções entre as células endoteliais das paredes capilares que constituem a barreira hematoencefálica (BHE)(HAWKES et al., 2013). Esses processos são considerados um dos principais mecanismos subjacentes ao desenvolvimento da MC (BERENDT et al., 1994; MACPHERSON et al., 1985; TAYLOR et al., 2004). Apesar da gravidade estar associada principalmente ao *P. falciparum*, o *P. vivax* não pode mais ser considerado uma espécie 100% benigna. Em áreas endêmicas de malária onde *P. vivax* é a espécie predominante, casos graves e mortes têm sido relatados (FILHO et al., 2007; MARQUES et al., 2014; PHILLIPS; KEYSTONE; KAIN, 1996; RIECKMANN; DAVIS; HUTTON, 1989).

A cloroquina (CQ), uma 4-aminoquinolina, foi a droga antimalárica mais eficaz e amplamente utilizada para a profilaxia e tratamento da malária grave e não grave causada por *P. falciparum*, atuando como agente esquizotocida sanguíneo. Apesar da alta eficácia da CQ, seu uso profilático levou à resistência do *P. falciparum* em todos os países endêmicos, reduzindo seu uso como

monoterapia (URSOS; ROEPE, 2002). Atualmente, a CQ é recomendada como tratamento para malária vivax em áreas onde há pouca ou nenhuma resistência documentada (WHO, 2021), mas já existem relatos de cepas de *P. vivax* resistentes à CQ que incluem a área endêmica brasileira (FILHO et al., 2007; MARQUES et al., 2014; PHILLIPS; KEYSTONE; KAIN, 1996; RIECKMANN; DAVIS; HUTTON, 1989).

Na tentativa de impedir a disseminação da resistência do *P. falciparum* às terapias antimaláricas, o tratamento da malária falciparum está sendo realizado com terapias combinadas à base de artemisinina (ACT), conforme recomendado pela OMS (BETECK et al., 2014; WHO, 2017). No entanto, já existem registros de diminuição da suscetibilidade de parasitos à artemisinina e seus derivados em alguns países endêmicos da Ásia (DONDORP et al., 2012; NOEDL et al., 2008; WOODROW; WHITE, 2017). Além disso, após o desenvolvimento da MC, não há medicamento com alta eficácia para reverter essa condição, e mesmo pacientes que não morrem após desenvolverem a forma grave da doença podem desenvolver sequelas neurocognitivas irreversíveis (BOIVIN et al., 2007b; DONDORP, 2005). Assim, a necessidade de novos medicamentos para a terapia antimalárica é inquestionável.

Uma estratégia amplamente aplicável na síntese de novas moléculas é a formação de sais orgânicos. Essa estratégia é capaz de melhorar a solubilidade em água de compostos bioativos e pode até potencializar a atividade biológica (KALEPU; NEKKANTI, 2015). Os sais derivados de CQ apresentaram atividade *in vitro* pronunciada em cepas resistentes a CQ de *P. falciparum* e a razão por trás do melhor desempenho dos derivados iônicos em relação a CQ foi atribuída ao caráter anfifílico dos compostos iônicos (SILVA et al., 2020). Em trabalhos anteriores, a formação de sais à base de 1,2,3-triazol foi capaz de fornecer agentes antileishmania e anticancerígenos, enquanto os precursores neutros permaneceram inativos (DE SOUZA-FAGUNDES et al., 2018; MEINEL et al., 2020; STROPPIA et al., 2017).

Em estudos anteriores, nosso grupo de pesquisa mostrou que alguns derivados de quinolina eram ativos contra *P. falciparum in vitro* e contra malária experimental murina, além de apresentar potente atividade antileishmanial (CALIXTO et al., 2018; DE SOUZA et al., 2011; MARINHO et al., 2021; SOARES et al., 2015). Dentre esses derivados, os resultados mais proeminentes foram

obtidos para derivados com alcinos terminais. Compostos contendo o grupo etinil apresentam ampla aplicação no desenvolvimento de fármacos, pois podem atuar como ácidos de Brønsted ou centros reativos e por possuírem propriedades favoráveis que podem levar a um aumento de potência (TALELE, 2020).

Neste capítulo, a fim de obter melhor atividade antimalárica, alguns sais de derivados de quinolina (também ativos contra *Leishmania sp.*) foram testados, juntamente com outros novos derivados de quinolina, quanto a citotoxicidade e atividade contra cepas de *P. falciparum* resistentes à CQ, *in vitro* e em um modelo murino de malária cerebral (MCE) como potenciais protótipos de drogas orais.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Delineamento Experimental

O delineamento experimental foi procedido conforme esquema demonstrado na figura 18.

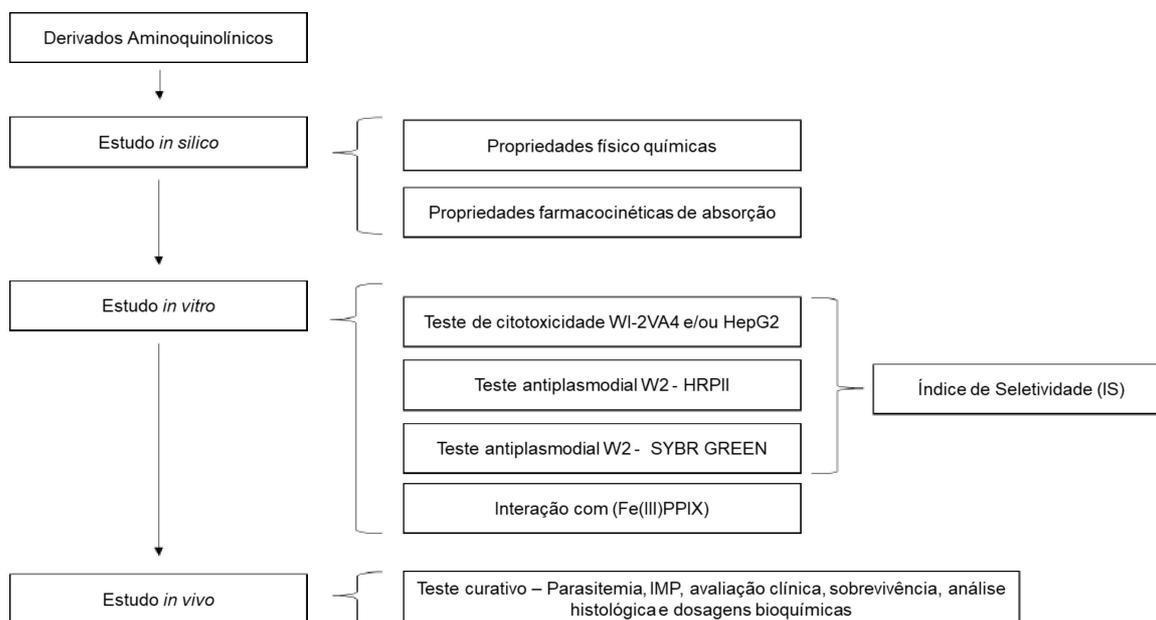


Figura 18: Delineamento Experimental.

Fonte: próprio autor

4.2.2. Síntese dos derivados aminoquinolínicos para testes de atividade biológica

Os compostos, derivados aminoquinolínicos, foram sintetizados no Núcleo de Pesquisas Químicas da Universidade Federal de Juiz de Fora do Instituto de Ciências Exatas (Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF), sob orientação do Prof. Dr. Adilson David da Silva e enviados para os ensaios quimioterápicos. A síntese dos compostos 1, 2 e 3 foi descrita por CALIXTO e colaboradores (2018) e está esquematizada na Figura 19. A síntese dos demais compostos está disponível no ANEXO A.

Os compostos utilizados neste estudo são apresentados na tabela 4. Para a realização dos testes antimaláricos *in vitro* e *in vivo*, os compostos, liofilizados, foram armazenados em geladeira (2 a 8°C) e solubilizados em água somente nos dias de teste ou tratamento.

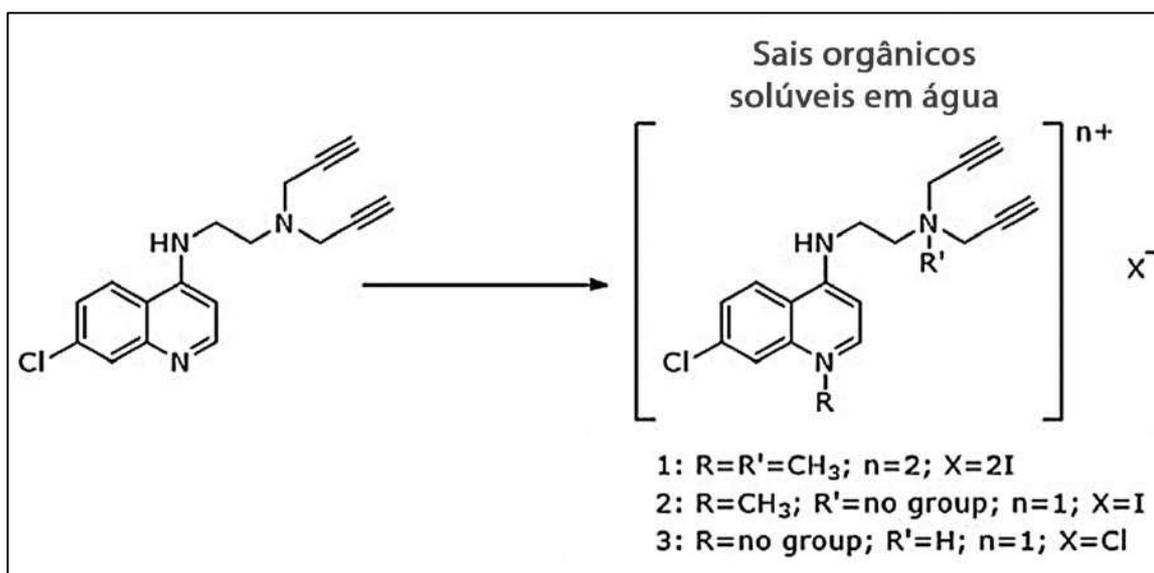


Figura 19: Sais de derivados quinolínicos (QDS) obtidos a partir de derivados quinolínicos (QD).

Fonte: Adaptado de CALIXTO et al., 2018.

Tabela 4: Fórmulas Estrutural e Molecular dos compostos sintéticos derivados de Aminoquinolinas.

Código	Fórmula Estrutural	Fórmula Molecular
1		$C_{19}H_{22}N_3I_2Cl$
2		$C_{18}H_{19}N_3ICl$
3		$C_{17}H_{17}N_3Cl_2$
4		$C_9H_5ClN_4$
5		$C_9H_8ClN_5O_2$
6		$C_9H_8ClN_3$
7		$C_9H_8ClN_3$
8		$C_{37}H_{58}ClN_9$

4.2.3. Avaliação *in silico*

4.2.3.1. Avaliação *in silico* das propriedades físico químicas

As propriedades físico-químicas dos compostos foram analisadas, *in silico*, às quais foi aplicada a regra dos 5 de Lipinski. Para tal, foi utilizado o programa *SwissAdme* (DAINA et al., 2017), uma plataforma gratuita disponibilizada na internet através do site: <http://www.swissadme.ch/index.php>. Nessa plataforma, as estruturas químicas dos compostos foram desenhadas e através delas foram calculados os valores preditivos de massa molecular, coeficiente de partição (log P), TPSA (área de superfície polar), número de aceptores de hidrogênio (N+O) e número de doadores de hidrogênio (NH+OH), que são os parâmetros necessários para prever se a molécula estudada tem características que podem sugerir que o fármaco pode ser administrado pela via oral. O programa também fornece a notação SMILES da molécula (*Simplified Molecular Input Line Entry System*), que pode ser usada para entender a natureza da molécula quanto as suas propriedades farmacocinéticas (DAINA et al., 2017).

Após a predição dos dados físico-químicos das moléculas, foi feita a análise, pela regra dos cinco de Lipinski, para avaliar o número de violações à regra que leva em consideração as seguintes condições: a massa molecular deve ser ≤ 500 g/mol, o $\log P \leq 5$, número de doadores de hidrogênio ≤ 5 e número de aceptores de hidrogênio ≤ 10 . Moléculas que apresentem duas ou mais violações à regra de Lipinski não são considerados compostos com boa biodisponibilidade via oral (LIPINSKI et al., 1997).

4.2.3.2. Avaliação *in silico* das Propriedades Farmacocinéticas de Absorção

A molécula que obteve os melhores resultados quanto às propriedades físico químicas preditivas e quanto às atividades antiplasmodial e citotóxica *in vitro*, foi analisada quanto ao perfil farmacocinético de absorção *in silico*.

Para esta análise foram considerados dados preditivos da absorção ao epitélio intestinal humano (EIH), barreira hematoencefálica (BHE) e células Caco-2. Além desses, também foi considerado o valor do TPSA, que se correlaciona com a capacidade de permeabilidade aos tecidos (ALI et al., 2012; PARAMASHIVAM et al., 2015).

A notação SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) gerada no programa *SwissAdme*, foi utilizada na plataforma AdmetSAR para avaliação do perfil farmacocinéticos dos compostos. Esta plataforma está disponível gratuitamente na internet, através do sítio <http://lmmd.ecust.edu.cn/admetsar2> e fornece dados preditivos sobre parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade de compostos químicos que poderão ser utilizados como fármacos (CHENG et al., 2012).

4.2.4. Ensaios *in vitro* de Citotoxicidade

4.2.4.1. Cultivo das células WI e HepG2

As linhagens aderentes derivadas de fibroblasto de pulmão humano WI-26-VA4 (ATCC CCL-95.1) e de hepatocarcinoma humano HepG2 (ATCC HB 8065) foram cultivadas como recomendado (Calvo-Calle et al., 1994). Brevemente, as células, criopreservadas em solução contendo 5% de dimetilsulfóxido (DMSO - Sigma-Aldrich®, EUA) e 95% de soro fetal bovino (SFB - Thermo Scientific, EUA), foram descongeladas à temperatura ambiente e transferidas para garrafa de cultivo, previamente tratada para promover a adesão celular, contendo 15mL de meio RPMI 1640 (Gibco®, EUA) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SFB-Gibco®, EUA) inativado pelo calor (56°C por 30 min). As células foram mantidas em estufa (Thermo Scientific, EUA) climatizada a 37°C contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade. No dia seguinte após análise, por meio de microscópio invertido, quanto a adesão das células à parede da garrafa bem como a ausência de contaminação o meio de cultivo foi substituído.

Para a manutenção da linhagem, após a adesão celular, o meio de cultura foi substituído a cada 48 horas sendo a morfologia celular e formação da monocamada observadas em microscópio invertido com a objetiva em um aumento de 40x no mesmo intervalo de tempo (modelo Nikon Eclipse TS100, Japão). No momento em que a cultura apresentou confluência de 90%, as células foram tripsinizadas (1mL de tripsina-EDTA-por 10 min a 37°C- Sigma-Aldrich®, EUA) para promover o desprendimento das mesmas do fundo da garrafa. As células soltas foram, então ressuspensas com 8mL de meio e transferidas para tubo de centrifuga de 15mL (Corning, EUA). O tubo foi centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos (HeraeusMegafuge 16, ThermoScientific,

EUA), o sobrenadante foi descartado, o sedimento foi ressuspenso em 1mL de meio rpmi completo. Então, 10 μ L da suspensão foi retirada e diluída em 180 μ L de meio rpmi e 10 μ L de azul de tripan para determinação do número de células viáveis em câmara de Neubauer ao microscópio óptico (objetiva de 20x; Olympus BX41, Japão). Após contagem, a concentração foi ajustada para 10⁵ células/mL e foram dispostas em placas de 96 poços para realização dos ensaios de viabilidade celular.

4.2.4.2. Ensaio de Viabilidade Celular:

Para avaliar o impacto da ativação metabólica dos compostos teste na viabilidade celular foram realizados ensaios de citotoxicidade utilizando-se a metodologia MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolina). O ensaio consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do MTT para formazan, pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria da célula viável (MOSMANN, 1983), permitindo, dessa maneira, quantificar o número de células vivas.

Para este ensaio, após contagem em câmara de Neubauer, a suspensão celular foi ajustada para 10⁵ células/mL, sendo, então, adicionados 100 μ L a cada poço (concentração final de 10⁵ células/poço) de uma microplaca de 96 poços (Corning, EUA). As células foram incubadas por 24h em estufa de CO₂ a 37°C para adesão. Após esse período os poços foram lavados com solução salina tamponada (PBS 1X estéril). Os compostos a serem testados foram diluídos em meio de cultivo contendo 1% de SFB, a fim de obter as concentrações de 100; 10; 1; 0,1 e 0,01 μ g/mL, e adicionados à placa.

Após 48 horas de incubação, os poços foram lavados com PBS 1x novamente, e adicionou-se 100 μ L do sal tetrazólico MTT (Sigma-Aldrich®, EUA) na concentração de 5mg/ml diluído em meio RPMI completo. A placa foi incubada por 3 horas à TA (temperatura ambiente). Então, retirou-se o sobrenadante e aplicou-se 50 μ L de DMSO em cada poço para solubilizar os cristais de formazan. A absorbância por poço foi medida no leitor de microplacas a um comprimento de onda de 570nm utilizando o Gen5 (Data Analysis Software - Bio-Tek, USA). Os dados foram analisados considerando-se três experimentos independentes.

A concentração citotóxica 50 (CC₅₀ -dose letal que inibe em 50% o crescimento das células na presença dos compostos teste), foi determinada utilizando-se o programa Origin5.0 Inc, tendo-se como referência as frequências de sobrevivência obtidas a partir dos valores de absorvância quando as células foram cultivadas na presença e na ausência de qualquer droga. Como drogas controle foram utilizadas drogas antimaláricas recomendadas para o tratamento da malária humana como cloroquina e artesunato. A porcentagem de sobrevivência foi obtida pela razão: $(A/B) \times 100$, onde (A) é a leitura obtida nos poços com células expostas aos compostos teste e (B) é a leitura dos poços controle sem adição de drogas.

4.2.5. Avaliação da atividade antiplasmodial *in vitro*

Os experimentos para avaliação da atividade antiplasmodial, *in vitro*, dos derivados 1, 2 e 3 foram realizados na Universidade Federal de São João Del Rey (UFSJ), campus Dona Lindu, Divinópolis, Minas Gerais, sob supervisão do professor Dr. Fernando de Pilla Varotti através do método HRPII. A análise dos demais compostos (4 a 8) foi realizado pela técnica de SYBR GREEN no Núcleo de Pesquisas em Parasitologia, no Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora sob supervisão da Dra. Kézia K. G. Scopel.

4.2.5.1. Cultivo Contínuo da fase eritrocítica do parasito

Para os ensaios foram utilizadas formas sanguíneas de *P. falciparum* (cepa W2-Cloroquina-resistente). Os parasitos foram, inicialmente, descongelados e cultivados em hemácias humanas O+ sob condições estabelecidas por Trager e Jensen (1976), com modificações. Os cultivos foram realizados em garrafas de 25cm² contendo meio RPMI 1640 suplementado com 25mM de HEPES, 21mM de bicarbonato de sódio, 11mM de glicose, 40µg/mL de gentamicina, 0,05% de albumax e 0,2% de hipoxantina e hemácias humanas O+ com o hematócrito a 5%.

As garrafas foram mantidas em estufas à 37°C com mistura gasogênica contendo 5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂. Diariamente, foram realizadas trocas do meio de cultura e a parasitemia foi monitorada por meio da análise de esfregaços sanguíneos, fixados com metanol, corados com Giemsa (Doles) em

microscópio óptico com objetiva de imersão (1.000x). A parasitemia foi estimada considerando-se o número de hemácias parasitadas em um universo de pelo menos, 1000 hemácias. Para os experimentos foram utilizadas culturas que apresentassem mais de 90% dos parasitos em estágio de anel.

4.2.5.2. Teste de avaliação da atividade antimalárica *in vitro* pelo ensaio de HRPII (Proteína 2 Rica em Histidina)

Os testes de atividade antimalárica dos compostos 1, 2 e 3 foram realizados por meio do ensaio HRPII no Laboratório de Bioquímica Medicinal (UFSJ), sob orientação do professor Dr. Fernando de Pilla Varotti. Para os testes, foram utilizados cultivos de parasitos com predomínio de anéis, que foram obtidos através da sincronização com sorbitol 10% (LAMBROS; VANDERBERG, 1979; FERNANDEZ, 2004). Resumidamente, o sedimento de eritrócitos infectados (EI) com a parasitemia maior que 5%, sendo a maioria das formas no estágio de anel, foi ressuspenso em uma solução 5% de sorbitol (J.T.Baker, USA). Após 10 minutos em TA, a solução foi incubada à 37°C por mais 10 minutos. Então, após centrifugação (1500rpm por 3 minutos) o sedimento foi lavado em meio completo para remover o sorbitol e a cultura foi retomada. Foi feito esfregaço sanguíneo, fixado em metanol e corado por Giemsa, para assegurar a eficácia da sincronização.

Para a realização do teste, os compostos em estudo foram adicionados em diferentes concentrações à placa, no volume de 20µl/poço. Inicialmente foi feita uma triagem nas concentrações de 50 e 25µg/mL para verificar se os compostos apresentavam atividade antiplasmodial. Posteriormente realizou-se a diluição seriada dos compostos que variavam de 0,78 a 50µg/mL (1 e 2) ou de 0,01 a 1 µg/mL (3). A cultura de *P. falciparum* foi ajustada para o hematócrito de 1,5% e parasitemia de 0,05% e posteriormente distribuída nas microplacas, contendo os compostos, em volume final de 180µl/poço. A placa permaneceu incubada, em estufa a 37°C com mistura gasogênica, contendo 5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂, por 48h e em seguida foi congelada e descongelada por duas vezes, para promover a lise das hemácias.

Para o ensaio de ELISA, uma placa de 96 poços (Kasvi) foi sensibilizada com 100µl do anticorpo monoclonal primário anti-HRPII (MPFM-55A, ICLLAB®, EUA) na concentração de 1,35µg/ml. A placa foi incubada, overnight, a 4°C e em

seguida o conteúdo foi desprezado e logo foi adicionado 200µL/poço de uma solução de bloqueio (PBS/BSA 2%). A placa foi mantida em temperatura ambiente por 2 horas e posteriormente seguiu-se o procedimento de lavagem, três vezes, com PBS-Tween 20 a 0,05%. Na etapa seguinte, 100µL do conteúdo de cada poço da placa-teste (cultura tratada com os derivados), foi adicionada à placa contendo anticorpo primário, a qual foi incubada por 1 hora, em câmara úmida, e em seguida foi lavada com PBS-Tween 20 0,05%.

A seguir, 100µL do anticorpo secundário (MPFG559, ICCLAB®, EUA) foi adicionado a cada poço na concentração de 0,05µg/mL seguindo-se incubação por 1 hora. Posteriormente realizaram-se três lavagens e em seguida foi acrescentado 100µL da solução de TMB (3,3,5,'-Tetrametilbenzidina) em cada poço. A placa permaneceu em repouso por 10 minutos, protegida da luz, e a reação foi interrompida pela adição de 50µL de ácido sulfúrico 1M em cada poço. A leitura do teste foi realizada em espectrofotômetro (Biotek Power Wave XS2, EUA). O valor de viabilidade do parasito em relação ao controle de 72 horas foi calculado conforme a seguinte fórmula:

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

Onde:

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

ABR: absorbância média do branco

ABG: absorbância média do *background*

AC72: absorbância do controle de 72 horas

Os valores de viabilidade em relação à concentração foram analisados no programa Origin 8.0, onde se determinou curvas exponenciais que permitiram o cálculo dos valores de CI50 (concentração inibitória que reduz o crescimento do parasito em 50%). Os valores de CI50 foram definidos com base nos resultados obtidos em três experimentos independentes. Todos os testes foram realizados em triplicatas.

4.2.5.3. Teste de avaliação da atividade antimalárica *in vitro* pelo ensaio de SYBR GREEN

O teste de avaliação da atividade antiplasmodial dos compostos 4 a 8 foi realizado pelo ensaio de SYBR GREEN.

Para os testes, foram utilizados cultivos de parasitos com predomínio de anéis, que eram obtidos através da sincronização com sorbitol 10%, conforme descrito acima (LAMBROS; VANDERBERG, 1979; FERNANDEZ, 2004). Em uma placa de 96 poços (Corning, EUA) foi adicionado 180µL/poço da cultura sincronizada de *P. falciparum* com 0,5% de parasitemia em estágio de anel e hematócrito 2%. Os compostos testados foram adicionados (20µL/poço) à placa-teste, em triplicata, e em diferentes concentrações, as quais variaram de de 0,78 a 50µg/mL. Os poços controle continham hemácias infectadas sem adição dos compostos testes (controle negativo). Como antimalárico padrão foram utilizados a cloroquina e artesunato em todos os experimentos realizados, nas diluições seriadas dos compostos teste (controle positivo). Em seis poços foram adicionados 180µL de eritrócitos não parasitados para a exclusão da autofluorescência dos mesmos. Os testes foram realizados em triplicata.

Então, as placas-teste foram incubadas a 37°C, com mistura gasogênica contendo 5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂, por 48h. Então, para avaliar a sensibilidade dos parasitos aos compostos, foi realizado o teste de fluorescência de acordo com SMILKSTEIN et al. (2004). Para tal, após incubação, o sobrenadante foi removido e 150µL de PBS 1X foram adicionados em cada poço. As placas foram centrifugadas a 700g por 5 minutos, o sobrenadante novamente removido e 120µL de tampão de lise com SYBR GREEN (20mM TRIS-base, 5mM EDTA, 0,008%p/v Saponina, 0,08%v/v Triton X-100, 0,2µL/mL Sybrsafe) foram adicionados.

Após a lise dos eritrócitos, os poços foram homogeneizados e 100µL do conteúdo de cada poço foi adicionado a uma nova placa contendo 100µL de PBS e 0,2 µL de SYBR GREEN I (Sigma Aldrich® EUA). A leitura da fluorescência foi realizada após a incubação por 30 minutos a TA ao abrigo da luz em fluorímetro com excitação de 485nm e emissão de 535nm.

Visto que o SYBR GREEN é um intercalante de DNA a fluorescência observada em poços com presença de parasitos é superior a observada em poços com número reduzido. Assim, a resposta dos compostos testes é

inversamente proporcional à emissão da fluorescência, comparada aos poços sem adição de compostos.

Através dessa triagem é possível determinar a CI_{50} dos compostos. Esse valor corresponde à dose letal mínima que inibe em 50% o crescimento dos parasitos na presença dos compostos teste, ou seja, metade da concentração inibitória máxima do crescimento parasitário, sendo obtido pela comparação com eritrócitos infectados cultivados sem a presença de compostos.

4.2.6. Índice de Seletividade

O índice de seletividade (IS) corresponde à relação entre as atividades citotóxicas e antiparasitárias de cada composto. O IS foi obtido através da razão entre o valor de CC_{50} WI-26VA4 e/ou HepG2 e o valor de CI_{50} obtido para *P. falciparum* cepa W2. Valores maiores que 10 são indicativos de alta seletividade, considerando ausência de toxicidade e potencial antimalárico, enquanto substâncias com valores abaixo de 10 são consideradas tóxicas e não seletivas (BÉZIVIN et al., 2003; KATSUNO; BURROWS et al. 2015).

4.2.7. Interação com ferriprotoporfirina (Fe(III)PPIX)

A determinação da constante de associação entre o composto teste e a protoporfirina de ferro IX (Fe(III)PPIX) foi realizada conforme descrito anteriormente (EGAN et al., 1997). Uma solução de hemina 0,54 mM foi preparada usando 5 mL de água desionizada, 1 mL de tampão tris(hidroximetil)aminometano (pH - 7,5) e 4 mL de DMSO. A solução branco foi preparada da mesma maneira, sem adição de hemina. Uma solução 0,3 mM do composto teste em DMSO também foi preparada. Na sequência, foi realizada uma titulação de 2 mL do Fe(III)PPIX através de adições sucessivas de alíquotas de 20 μ L da solução do composto teste. Simultaneamente, a solução branco foi titulada da mesma forma. Os espectros UV-Vis foram medidos para a solução de Fe(III)PPIX após cada adição, descontando a absorção do branco. A absorbância em 402 nm (banda Soret) foi registrada antes da titulação e após cada adição. Os valores de absorbância foram ajustados pela equação racional $A = (A_0 + A_{\infty}K[C]) / (1 + K[C])$ para um modelo de complexação 1:1 pelo método

dos mínimos quadrados não linear. A_0 é a absorvância da solução de Fe(III)PPIX antes da titulação, A_∞ é a absorvância do composto-hemina aduto após a saturação (após a titulação), A é a absorvância em cada ponto da titulação, K é a constante de associação e $[C]$ é a concentração do composto 3 em cada ponto da titulação.

4.2.8. Testes antimaláricos *in vivo*

O composto que apresentou melhor índice de CI_{50} e IS nos ensaios *in vitro* foi selecionado para os testes *in vivo*.

Os testes *in vivo* foram realizados em camundongos C57BL/6 infectados com formas sanguíneas de *Plasmodium berghei* ANKA (PbA). Essa cepa de plasmódio é considerada de alta virulência por induzir quadro de malária cerebral semelhante ao observado em humanos infectados com *P. falciparum* (LOU et al, 2001; REST, 1982).

4.2.8.1. Animais

Para a realização dos experimentos propostos foi utilizado o modelo murino de MCE para avaliar a atividade antimalárica do composto 3 isoladamente e em associação à vitamina D (VD). Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) C57BL/6 fêmeas de 6 a 8 semanas de idade, fornecidos pelo Centro de Biologia da Reprodução (CBR) - CIAEP 02.0048.2019 - da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFJF, sob o parecer nº 055/2018 -CEUA- UFJF (ANEXO B).

Aos animais (5/gaiola) foi oferecido água e ração *ad libitum*. As gaiolas foram mantidas na sala de experimentação do Núcleo de Pesquisas em Parasitologia em armários climatizados ALESCO® com fluxo de ar controlado, temperatura de $22\pm 2^\circ\text{C}$ e controle de luminosidade, respeitando o ritmo circadiano dos animais (ciclo de claro/escuro de 12 horas). O protocolo experimental, seguiu as normas internacionais preconizadas no Manual sobre cuidados e usos de animais de laboratório (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2011) e os preceitos éticos para experimentação animal definidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2013).

4.2.8.2. Delineamento Experimental *in vivo*

Os testes antiplasmodiais curativos do composto 3 isolado ou associado à VD (descrito no tópico 4.2.7.4) foram realizados conforme demonstrado abaixo (Figura 20).

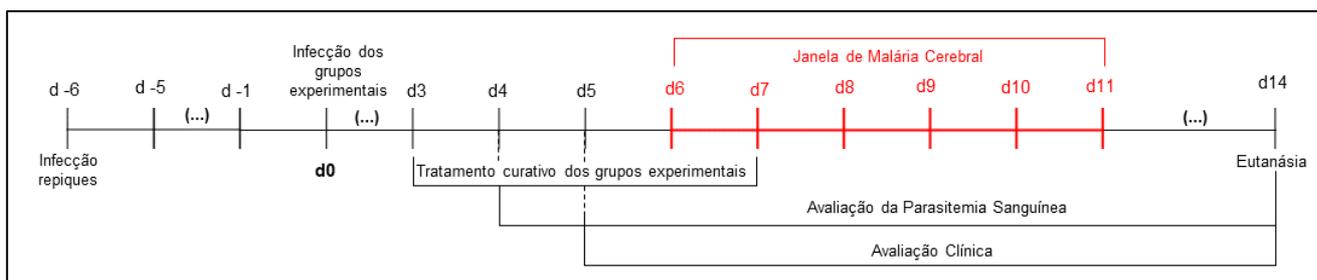


Figura 20: Desenho experimental: esquematização dos processos de infecção, tratamento e eutanásia realizados no desenvolver deste projeto, além de ilustração do período correspondente ao período crítico para o desenvolvimento de malária cerebral; d-6: dia -6, d0: dia zero, d3: dia 3; d4: dia 4; d5: dia 5; d6: dia 6; d7: dia 7; d8: dia 8; d9: dia 9; d10: dia 10; d11: dia 11 e d14: dia 14 pós infecção (dpi).

Fonte: próprio autor

4.2.8.3. Solubilização dos compostos e grupos experimentais

O composto teste e a cloroquina foram pesados, individualmente, em quantidades suficientes para tratamento de cada grupo/dia. Os mesmos foram, então, diluídos em água filtrada somente no momento do tratamento dos animais, que foi iniciado assim que os primeiros parasitos circulantes foram observados, microscopicamente, em esfregaço sanguíneo.

A vitamina D (VD - Cholecalciferol - Sigma Aldrich®), por ser uma vitamina lipossolúvel, foi diluída em óleo de soja (WU et al., 2018). Foi feita uma diluição estoque, a qual foi armazenada sob refrigeração (2 a 8°C) durante o experimento. As diluições para tratamento dos animais eram realizadas, também em óleo de soja, no momento em que os animais receberam a suplementação vitamínica. Para os grupos que foram tratados com VD em associação ao composto teste, o tratamento foi feito individualmente com 100µL de cada um, via oral, totalizando 200µL de volume total administrado. Os grupos experimentais e esquemas de tratamento estão descritos nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5: Grupos experimentais e seus respectivos esquemas de tratamento, dose e tamanho amostral (n) utilizados no teste antiplasmodial curativo do composto 3 isolado.

Grupo	Tratamento	Dose	n
Q15	composto 3 (3° ao 7°dpi)	15mg/kg	15
Q30	composto 3 (3° ao 7°dpi)	30mg/kg	12
Q50	composto 3 (3° ao 7°dpi)	50mg/kg	13
CQ	Cloroquina (3° ao 7°dpi)	10mg/kg	09
PbA	Água	-	13

dpi: dia pós infecção

Tabela 6: Grupos experimentais e seus respectivos esquemas de tratamento, dose e tamanho amostral (n) utilizados no Teste antiplasmodial curativo do composto 3 associado à vitamina D.

Grupo	Tratamento	Dose	n
VD160	Vitamina D (3° ao 7°dpi)	160 µg/kg	5
VD320	Vitamina D (3° ao 7°dpi)	320 µg/kg	5
QVD160	Vitamina D+composto 3 (3° ao 7°dpi)	160 µg/kg + 15mg/kg	5
QVD320	Vitamina D+ composto 3 (3° ao 7°dpi)	320 µg/kg + 15mg/kg	5
CQ	Cloroquina (3° ao 7°dpi)	10mg/Kg/dia	9
PbA	água (3° ao 7°dpi)	-	13

dpi: dia pós infecção

4.2.8.4. Teste antiplasmodial curativo isolado e associado à VD

Para o teste antiplasmodial *in vivo* os camundongos foram infectados por via intraperitoneal (ip) com 200µl de PBS contendo 10^5 EI de PbA previamente obtidos a partir de um animal repique apresentando parasitemia sanguínea $\geq 5\%$. Os mesmos foram, então, divididos aleatoriamente em grupos experimentais, os quais receberam doses orais (200µL) da droga em diferentes concentrações (15, 30 e 50mg/kg/dia) ou da VD (160 e 320 µg/kg/dia), ou doses de 100 µL/cada (droga + VD) em esquema de tratamento associado (composto 3 15mg/kg + VD 160 ou 320 µg/kg/dia) durante 5 dias consecutivos. O grupo controle tratado

recebeu a droga padrão cloroquina na dose de 10mg/Kg/dia e o grupo controle não tratado recebeu água filtrada.

A partir do 3º dia pós infecção (dpi) foram confeccionados, diariamente, esfregaços sanguíneos da ponta de cauda dos animais, os quais foram fixados em metanol, corados por Giemsa e examinados em microscopia de imersão para determinação de parasitos circulantes. O tratamento dos animais foi iniciado no 3º dpi, assim que os primeiros parasitos foram observados microscopicamente. Para determinar a eficácia do tratamento foi avaliado, diariamente, a parasitemia sanguínea e o escore clínico. Datas de morte dos animais também foram registradas com o intuito de obter dados sobre a sobrevivência dos mesmos em decorrência do tratamento com os compostos avaliados.

4.2.8.5. Determinação da Parasitemia Sanguínea

Para determinar o efeito dos tratamentos no desenvolvimento parasitário, foram realizados esfregaços sanguíneos diários do 3º ao 14º dpi. Para tal, uma gota de sangue da veia caudal de cada animal foi coletada. Procedeu-se a confecção dos esfregaços sanguíneos, os quais foram fixados em metanol, corados com corante hematológico Giemsa (Doles) e analisados microscopicamente em aumento 100x. A porcentagem de parasitemia foi determinada calculando-se o número de EI em um total de 1000 hemácias.

4.2.8.6. Determinação da Inibição da Multiplicação do Parasito (IMP)

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

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

Onde:

A: média da parasitemia no grupo de controle não tratado

B: média da parasitemia no grupo teste.

IMP: inibição da multiplicação do parasito (%)

4.2.8.7. Avaliação Clínica

A MCE ocorre, neste modelo experimental, entre o 6° ao 11° dpi, chamado de período crítico para MC. Para determinar o desenvolvimento da MCE foi utilizado a escala rápida de coma e comportamento murino (ERCCM) que consiste na análise de 10 parâmetros onde são atribuídas pontuações de 0 a 2, sendo 0 o grau mais baixo e 20 o grau mais alto de normalidade clínica (CARROL et al., 2010). A ERCCM é dividida em cinco categorias, são elas: Coordenação, Comportamento Exploratório, Força e Tônus Muscular, Reflexos de Autopreservação e Higiene, conforme tabela 7. Nos primeiros 90 segundos os camundongos foram avaliados quanto à higiene, comportamento, marcha, posição do corpo, comportamento exploratório e equilíbrio. Os outros 90 segundos foram para avaliação dos reflexos, força dos membros e comportamento de auto-preservação. O protocolo completo de avaliação da ERCCM pode ser encontrado em anexo (APÊNDICE A).

Tabela 7: Parâmetros observados, de acordo com sua classificação categórica, na avaliação clínica dos animais determinada pela Escala Rápida de Coma e Comportamento Murino (ERCCM).

ESCALA RÁPIDA DE COMA E COMPORTAMENTO MURINO	
Coordenação	Força e Tônus Muscular
Marcha	Posição do Corpo
Balanço/Equilíbrio	Força dos Membros
Comportamento Exploratório	Higiene
Desempenho Motor	Grooming
Reflexos de Autopreservação	
Fuga ao toque	Reflexo Plantar
Reflexo do pavilhão auricular	Agressão

Foi considerado sinal característico de desenvolvimento da MCE os animais que atingiram pontuação variando de 0-5 nessa avaliação clínica, os

quais foram, imediatamente, eutanasiados. Os animais que apresentaram pontuação entre 6-20 sobreviveram ao desenvolvimento da MCE.

4.2.8.8. Eutanásia

Os animais que foram avaliados clinicamente com pontuação variando entre 0-5 foram eutanasiados com associação de Xilazina 1% e Quetamina 5%, via intraperitoneal, procedendo-se perfusão cardíaca com PBS 1X, para remoção das hemácias não aderidas. Posteriormente foi realizada laparotomia para retirada do cérebro dos animais, os quais foram fixados em formaldeído 10% para posterior inclusão e análise histológica. Os animais que não apresentaram escore clínico compatível com danos neurológicos foram acompanhados até o 14º dia da infecção, quando, então, foram eutanasiados conforme procedimentos experimentais descritos anteriormente.

4.2.8.9. Análise macroscópica do encéfalo

Após a eutanásia, o crânio dos animais foi fotografado com o intuito de registrar danos cerebrais macroscópicos. Para tal, a pele da porção superior da cabeça dos animais foi completamente removida deixando a calota craniana exposta para a realização do registro fotográfico.

4.2.8.10. Análise Histopatológica do cérebro

Para avaliar o efeito dos componentes testados sobre o tecido cerebral, o cérebro dos animais foi removido e fixado em formalina 10% para posterior inclusão em parafina. Brevemente, após 24h de fixação, os tecidos foram transferidos para uma solução de álcool 70%, dando início ao processamento histológico. Após 30 minutos de imersão os tecidos foram transferidos para concentrações graduais de etanol (80%, 90%, 100%, 100% e 100%), recebendo, ao final, três imersões em etanol 100% para promover a completa desidratação do tecido. Após a desidratação realizou-se a diafanização do tecido através de três imersões de 20 minutos no solvente orgânico xilol. Posteriormente, os tecidos receberam três banhos em parafina para posterior inclusão e formação dos blocos.

Os blocos confeccionados foram submetidos à microtomia de 5µm de espessura para confecção das lâminas, as quais foram coradas por

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

A análise da histopatologia do cérebro dos animais foi realizada em microscópio óptico (AX10, Zeiss) em lentes de aumento 40X e 100X para observação das alterações histopatológicas. De maneira geral foram observadas áreas de inflamação, hemorragias e obstrução vascular.

4.2.8.11. Análise Bioquímica

Para análise bioquímica, amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca dos animais e centrifugadas para obtenção do soro, os quais foram armazenados a -20°C para posterior análise. A toxicidade *in vivo* foi avaliada por meio da dosagem de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), que foram utilizadas como marcadores de dano hepático, e de uréia e creatinina, que foram utilizados como marcadores de dano renal. As análises foram realizadas com kits comerciais (Labtest Diagnostica®, Belo Horizonte) de acordo com as instruções do fabricante.

4.3. Análise Estatística

Para análise estatística dos dados obtidos durante o desenvolvimento do presente trabalho foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk ($n < 30$ amostras) e posteriormente análise de variância por OneWay-ANOVA, com post-test para comparação múltipla de Tukey. As análises foram realizadas por meio do software GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad Software). Valores encontrados para $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente distintos.

4.4. RESULTADOS

Os resultados apresentados neste capítulo foram publicados na *Chemico-Biological Interactions* em fevereiro de 2022, no artigo intitulado “A simple quinoline salt derivative is active *in vitro* against *Plasmodium falciparum* asexual blood stages and inhibits the development of cerebral malaria in murine model” (Anexo C) (DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.109848>).

4.4.1. Avaliação *in silico* das propriedades físico-químicas dos derivados 4-aminoquinolínicos

Como a via oral é a principal via de administração de medicamentos é imprescindível que um candidato a fármaco apresente boa biodisponibilidade, ou seja, o composto precisa ser bem absorvido para se tornar disponível na corrente sanguínea e ser distribuído para o local de ação (LIN et al., 2003; GLEESON, 2008).

A absorção de um fármaco pode ser prevista através de suas propriedades físico-químicas e a regra dos 5 de Lipinski é um filtro importante na avaliação dessas propriedades que irão predizer se o composto apresentará boa biodisponibilidade quando administrado via oral. Segundo esta regra, o composto deve ter peso molecular ≤ 500 g/mol, coeficiente de partição octanol/água (Log P) ≤ 5 , número de doadores de hidrogênio (NH+OH) ≤ 5 e número de aceptores de hidrogênio (N+O) ≤ 10 (LIPINSKI et al, 1997).

A plataforma online SwissADME fornece as informações sobre as propriedades físico-químicas de um composto através de sua estrutura molecular ou do código SMILES da molécula. Através dessas propriedades é aplicado a regra dos 5 de Lipinski que estabelece que candidatos a fármacos podem apresentar baixa absorção e permeabilidade se violarem pelo menos duas regras. Os resultados da predição para os derivados 4-aminoquinolínicos são apresentados na tabela 8.

Tabela 8: Avaliação, *in silico*, através da regra dos 5 de Lipinski, das propriedades físico-químicas das moléculas sintéticas derivadas de 4-aminoquinolinas.

Resultados obtidos pelo programa SwissADME online.

Composto	MM	LogP	nON	nOHNH	NV
1	581,66*	0,04	0	1	1
2	439,72	2,26	1	1	0
3	334,24	2,11	1	2	0
4	204,62	2,66	4	0	0
5	249,61	1,85	6	0	0
6	193,63	1,54	1	2	0
7	193,63	1,87	2	2	0
8	664,37*	8,06*	6	1	2*
CQ	319,87	4,15	2	1	0

MM: massa molecular; Log P: Coeficiente de partição; nOH: número de aceptores de hidrogênio; nOHNH: número de doadores de hidrogênio; NV: número de violações à regra de Lipinski; *resultado viola a regra de Lipinski. Fonte: resultados obtidos através da plataforma SwissADME.

Após análise pode-se observar que o composto 8 apresentou 2 violações à regra dos 5 de Lipinski, sendo, por isso, considerado um composto com baixa biodisponibilidade via oral. O coeficiente de partição (LogP), que expressa a lipossolubilidade do composto, foi superior a 5 para o composto 8 indicando uma molécula mais lipofílica do que os demais derivados, que pode, portanto, apresentar maior dificuldade para ser distribuída e absorvida pelas células. Além disso, o composto violou a regra da massa molecular, a qual foi superior a 500. Esse resultado está associado a uma baixa permeabilidade da molécula na membrana plasmática, o que indica tendência para ocorrência de problemas relacionados à farmacocinética do composto.

O composto 1, violou a regra da Massa Molar (MM=581,66), mas embora o peso molecular (MW <500) de um fármaco desempenhe um papel importante em sua biodisponibilidade, isoladamente não é um parâmetro que classifica, significativamente, os compostos em boa ou baixa biodisponibilidade oral.

Apenas os compostos com dois ou mais parâmetros que violam a regra dos cinco de Lipinski não são considerados biodisponíveis por via oral.

As propriedades físico-químicas dos demais compostos seguiram a Regra dos Cinco de Lipinski, o que é preditivo de boa biodisponibilidade oral e propriedades ADME suficientemente aceitáveis.

4.4.2. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade e atividade antiplasmodial

Para avaliar a atividade citotóxica dos compostos o ensaio de MTT foi conduzido em células da linhagem WI-26VA4 e/ou HepG2. Foi observado que nenhum dos compostos apresentaram toxicidade até a maior concentração testada (100µM) (Tabela 9).

Tabela 9: Avaliação da citotoxicidade em células WI26VA4 e/ou HepG2, da atividade antiplasmodial sobre a cepa W2 (cloroquina resistente) e determinação do índice de seletividade dos derivados 4-aminoquinolínicos.

Código Composto	CC ₅₀ (µM)		CI ₅₀ (µM)	IS
	WI	HepG2	<i>P. falciparum</i> W2 ± DP	
1	>100	>100	61,15 ± 13,85	>1
2	>100	>100	9,23 ± 0,54	>10
3	>100	>100	0,27 ± 0,09	>370
4	>100	NA	16,37 ± 0,20	>6
5	>100	NA	141,74 ± 8,49	>0,7
6	>100	NA	40,13 ± 1,55	>2
7	>100	NA	12,40 ± 0,36	>8
8	>100	NA	8,50 ± 0,54	>11
CQ	>100	NA	0,06 ± 0,03	>1000
ART	>100	NA	<2,03	>49

CC₅₀: Concentração citotóxica que inibe 50% do crescimento celular; CI₅₀: Concentração que inibe em 50% o crescimento parasitário; IS: índice de seletividade; WI e HepG2: linhagens celulares; W2: cepa cloroquina resistente; CQ: cloroquina; ART: artesunato; NA: não se aplica.

Os compostos derivados de 4-aminoquinolinas foram testados para atividade antiplasmodica contra *P. falciparum* W2 resistente à cloroquina e os

resultados estão apresentados na tabela 9. Os compostos apresentaram valores de CI_{50} variando entre 0,27 a 141 μ M.

Os compostos 2, 3, 4 e 7 foram classificados com alta atividade antiplasmodial, enquanto o 6 e 8 foram considerados drogas promissoras e o 1 e 5 apresentaram baixa atividade contra os plasmódios nos ensaios *in vitro*. Nenhum dos compostos do estudo foi classificado como inativo (Tabela 9). Destaca-se, entre todos os compostos, o 3 por apresentar CI_{50} mais próximo ao da CQ, droga padrão.

Avaliando o índice de seletividade (IS), apenas os compostos 2, 3 e 8 demonstraram seletividade satisfatória para os parasitos (IS>10) (Tabela 9). Apesar dessa seletividade, os compostos 2 e 8 apresentaram CI_{50} >1 μ M e apenas o composto 3 demonstrou CI_{50} <1 μ M. Sendo assim, a atividade antiplasmodial *in vitro* do composto 3 atinge um conjunto de critérios recentemente estabelecido para antimaláricos HITs (compostos bioativos), que inclui: conhecimento da estrutura-atividade; uma concentração inibitória (CI_{50}) <1 μ M; e SI maior que 10 vezes contra uma linhagem de células humanas (KATSUNO et al., 2015a).

4.4.3. Avaliação *in vitro* da interação com a ferriprotoporfirina Fe(III)PPIX

Considerando o promissor CI_{50} (correspondente a 0,27 μ M) e o valor do IS (> 370) observados para o composto 3, seu provável mecanismo de ação foi investigado. Para avaliar a capacidade do composto 3 em inibir a formação de hemozoína como um de seus mecanismos de ação antiplasmodial, foi realizado um teste de interação entre este composto e Fe(III) PPIX, conforme procedimento descrito anteriormente (EGAN et al., 1997). Neste ensaio, foi realizada uma titulação de uma solução de Fe(III) PPIX com uma solução de composto 3, que causou um hipocromismo de 29% na banda de Soret da porfirina (402 nm), mostrando uma interação entre o titulante e o título. Uma constante de associação de $\log K = 4,61$ foi obtida para o composto 3. Em um estudo recente, valores de constante de associação ligeiramente superiores foram encontrados para outro derivado de quinolina ($\log K = 4,77$) e para CQ ($\log K = 4,97$) (MARINHO et al., 2021), o que sugere que o composto 3 interage com o Fe(III)PPIX de forma semelhante à CQ, potencialmente inibindo a formação de

hemozoína. Os espectros na região UV-Vis para cada concentração do composto 3, bem como a absorbância em 402 nm para cada concentração podem ser vistos na figura 21.

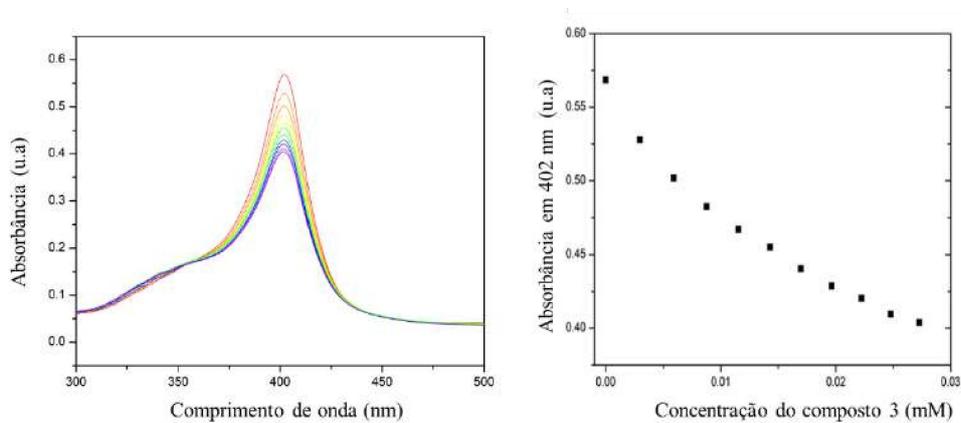


Figura 21: Titulação espectroscópica de Fe(III)PPIX com composto 3

O mecanismo de ação do CQ baseia-se na inibição da formação da hemozoína, promovendo a morte do parasito (IRWIN W SHERMAN, 1998; SILVA et al., 2005). Durante o desenvolvimento eritrocitário, os parasitos digerem a hemoglobina em seu vacúolo digestivo, gerando aminoácidos, que são utilizados para a maturação do parasito, e também o grupo heme (ferroprotoporfirina IX - Fe(II)PPIX), que é oxidado a ferriprotoporfirina IX - Fe(III)PPIX e acumulado no vacúolo digestivo do protozoário (SHERMAN, 1977). O heme livre é altamente tóxico para os parasitos, que o convertem em hemozoína, um polímero inerte, insolúvel e inócuo ao parasito, mas tóxico ao hospedeiro (SILVA et al., 2005). Os compostos 4-aminoquinolínicos atuam inibindo esse processo de conversão do heme em cristais de hemozoína, promovendo a morte do parasito (SHERMAN, 1977). Compostos químicos que interferem na formação deste cristal, como CQ, têm sido altamente bem sucedidos no combate à infecção por plasmódio por muitos anos (AMARATUNGA et al., 2016; MILLER et al., 2013; O'BRIEN et al., 2011; WHO, 2020).

4.4.4. Avaliação *in silico* das propriedades farmacocinéticas da absorção dos derivados 4-aminoquinolínicos

Devido à seletividade *in vitro* e provável mecanismo de ação semelhante à CQ, decidimos avaliar a predição *in silico* dos farmacocinéticos de absorção para avaliar a biodisponibilidade do composto 3 quando administrado por via oral. Como a via oral é a principal via de administração de fármacos, é imprescindível que um candidato a fármaco apresente boa biodisponibilidade e para isto, composto precisa ser bem absorvido para se tornar disponível na corrente sanguínea e ser entregue ao local de ação (GLEESON, 2008; LIN et al., 2003; RUIZ; SCIOLI MONTOTO, 2018).

Quando um medicamento, administrado por via oral, se dissolve no trato gastrointestinal, ele deve ser suficientemente permeável às membranas celulares para entrar na circulação sistêmica (GLEESON, 2008). Como o comportamento farmacocinético de um composto pode determinar o sucesso ou fracasso de sua atividade biológica, novos candidatos a fármacos devem apresentar boa biodisponibilidade oral e boa permeabilidade de membrana como propriedades que podem levar experimentos *in vivo* a alcançarem sucesso (KIRK; HORNER; KIRK, 1996; FONSECA et al., 2016). Nesse sentido, a ferramenta AdmetSAR Web (YANG et al., 2018) permite uma inferência *in silico* das principais características farmacocinéticas dos compostos.

O AdmetSar vem sendo utilizado em diversos estudos de novas compostos candidatos a fármacos com a finalidade de analisar o perfil farmacocinético preditivo dos mesmo (PRADEEPKIRAN; REDDY, 2019; DESALE et al., 2020; NILKANTH et al., 2020; ZADOROZHNI, et al., 2020; TARONCHER et al., 2021). Apesar da plataforma SwissAdme também gerar os dados preditivos da farmacocinética dos compotos, a escolha pela plataforma AdmetSar foi feita devido a paramentos importantes que são analisados através dessa última plataforma, como permeabilidade a células Caco-2. Além disso, a plataforma online AdmetSar apresenta numericamente a probabilidade de ocorrer aquela predição analisada. Na Tabela 10 são apresentados parâmetros de absorção do perfil ADME do composto 3 em comparação com à CQ.

Tabela 10: Avaliação *in silico* das propriedades farmacocinéticas de absorção do composto QDS3 e da Cloroquina através do programa AdmetSar

Composto	TPSA	EIH (p)	Caco-2 (p)	BHE (p)
3	29,41Å ²	+ (0.93)	+ (0.70)	+ (0.99)
CQ	28,16Å ²	+ (0.99)	+ (0.66)	+ (1.00)

TPSA: área superficial polar topológica; AIH: epitélio intestinal humano; Caco-2: células de adenocarcinoma de cólon humano; BHE: barreira hematoencefálica; Sinal “+” indica que o composto é permeável ao modelo; (p): probabilidade de ocorrer o evento. Fonte: resultados obtidos através da plataforma AdmetSar.

Um dos maiores desafios enfrentados por um medicamento administrado via oral é sua passagem através do epitélio intestinal, que determina a extensão de sua absorção e, conseqüentemente, afeta sua biodisponibilidade (THE et al., 2011). Vários ensaios de permeabilidade *in vitro* que mimetizam as características de absorção *in vivo* foram desenvolvidos e são uma boa escolha para o estudo da permeabilidade de drogas devido ao baixo custo e bom rendimento em relação aos ensaios *in vivo*. O “padrão ouro” para estudo da permeabilidade de drogas, *in vitro*, é o modelo de cultura de células em monocamada Caco-2 (adenocarcinoma do cólon humano), devido à sua correlação com as células intestinais humanas (CALDWELL et al., 2009). Porém, com advento dos estudos *in silico*, é possível prever se um composto será capaz de permear as células Caco-2, e conseqüentemente ser absorvido pelo epitélio intestinal. Dentre as informações fornecidas pelo programa AdmetSar *in silico*, foi possível prever o comportamento da molécula nessa cultura de células, a qual se mostrou permeável assim como o antimalárico padrão (CQ).

A área superficial polar topológica (TPSA) também é um descritor importante para a caracterização da absorção de fármacos, incluindo a permeabilidade pelas células Caco-2, absorção intestinal, biodisponibilidade, e penetração pela barreira hematoencefálica (PARAMASHIVAM et al., 2015). ALI e colaboradores (2012) afirmaram que moléculas com TPSA < 140Å² apresentam boa absorção intestinal. Através da análise dos descritores moleculares, observamos que o TPSA do composto 3 (29,41Å²) é inferior a 140Å² além de ser semelhante à cloroquina (28,16Å²), indicando boa absorção intestinal. Tal propriedade foi corroborada pelos dados preditivos de alta

absorção do composto 3 pelo intestino humano, o qual demonstrou 93% de probabilidade de ser permeável. Além disso, o composto 3 se mostrou altamente permeável (99%) à BHE, característica semelhante à CQ. Esta observação demonstra que, além de ser absorvidos pelo intestino e alcançar a circulação sanguínea, o derivado 4-aminoquinolínico em estudo também pode atravessar a barreira hematoencefálica.

Analisando a estrutura molecular é possível notar que o composto 3 é um sal, como a CQ, o que justifica seu perfil farmacocinético semelhante. Os sais envolvem espécies iônicas que provavelmente apresentam boa solubilidade em água e são frequentemente utilizados por empresas farmacêuticas para melhorar o perfil físico, químico e farmacocinético de certos produtos (GUPTA et al., 2018; PAULEKUHN; DRESSMAN; SAAL, 2007). Devido a essas características de alto potencial antimalárico, baixa toxicidade e um perfil farmacocinético sugestivo de boa biodisponibilidade oral, o composto 3 foi considerado adequado para ensaios *in vivo*.

4.4.5. Avaliação *in vivo*

4.4.5.1. Teste antiplasmodial curativo do composto 3 isolado

Para os ensaios *in vivo*, foram testadas, inicialmente, três doses (15, 30 e 50mg/kg) via oral, por cinco dias, iniciando o tratamento no 3ºdpi, após o surgimento dos primeiros eritrócitos infectados. A recomendação para eficácia *in vivo* é que um composto líder deve atingir a eliminação do parasito em uma dose que erradique 90% do patógeno alvo, quando administrado por via oral (<50mg/kg) nos estágios sanguíneos da infecção (tipicamente quatro doses em 4 dias), no modelo de camundongo com malária grave (KATSUNO et al., 2015). Conforme mostrado na Tabela 11, a parasitemia de camundongos infectados e tratados com o composto 3 nas três dosagens foi estatisticamente menor do que o grupo não tratado no 7º dpi (Tukey Test, $p < 0,05$) e a inibição da multiplicação do parasito (IMP) foi de até 92%. Essa diferença foi mantida para as doses de 30 e 50mg/kg no 8º e 9º dpi, mas não para 15 mg/kg no 9º dpi. Da mesma forma, não foi observada diferença na proporção de parasitos circulantes nos grupos tratados com o composto 3 nas três dosagens em relação ao CQ no 7º dpi, assim como para 30 e 50mg/kg nos dias subsequentes (Tukey Test, $p > 0,05$). No

entanto, a dose de 15 mg/kg, apesar de apresentar diferença estatística em relação ao grupo controle não tratado no 8º dpi, também apresentou diferença em relação ao grupo controle CQ.

Tabela 11: Valores da redução da parasitemia no 7º, 8º e 9º dias pós infecção, após teste curativo com o composto 3 (15, 30 e 50mg/Kg).

Composto	Dose (mg/Kg)	Parasitemia ± DP (% Redução)			n
		7º dpi	8ºdpi	9ºdpi	
3	15	1,58 ± 1,72 ^{a,b} (76,9)	2,23 ± 2,61 ^a (58,7)	4,73 ± 4,97 (15,5)	15
	30	0,68 ± 0,67 ^{a,b} (90,1)	0,63 ± 0,80 ^{a,b} (88,3)	1,12 ± 1,56 ^{a,b} (80,0)	12
	50	0,49 ± 0,43 ^{a,b} (92,9)	0,49 ± 0,74 ^{a,b} (90,9)	0,67 ± 1,17 ^{a,b} (88,0)	13
CQ	10	0,24 ± 0,05 ^a (96,5)	0,21 ± 0,27 ^a (96,1)	0,13 ± 0,14 ^a (97,7)	9
Água (PbA)	-	6,85 ± 2,57	5,4 ± 2,22	5,60 ± 1,53	13

dpi= dia pós infecção; CQ: Cloroquina; DP=Desvio Padrão

^a = valor p < 0.05 (comparado ao grupo tratado com água)

^b = valor p > 0.05 (comparado ao grupo tratado com CQ)

Camundongos C57BL/6 infectados com PbA, sem qualquer tratamento, desenvolvem sinais neurológicos (comportamento exploratório reduzido, reflexo diminuído, autopreservação, coma e epilepsia) resultando em morte entre os dias 6 e 11 p.i. (HE et al., 2014; JIANG et al., 2020; MEDANA; HUNT; CHAN-LING, 1997) o que foi consistente com os resultados obtidos neste estudo (Figura 22A e 22C). Curiosamente, 90%, 70% e 100% dos camundongos tratados com 15, 30 e 50mg/kg do composto 3, respectivamente, sobreviveram a esse período crítico de infecção sem apresentar sinais de MC (Figura 22A e 22C). Além disso, camundongos tratados, independentemente da concentração do composto 3, apresentaram taxas de parasitemia abaixo de 10% até o 11º dpi. (Figura 22B).

Consistente com a avaliação clínica, os camundongos que desenvolveram MC apresentaram hemorragia observada macro (Figura 22 D-E) e microscopicamente com áreas hemorrágicas claras (Figura 22 H). Por outro lado, camundongos protegidos contra ECM não apresentaram danos cerebrais nem macro (Figura 22 F-G) nem microscopicamente (Figura 22I).

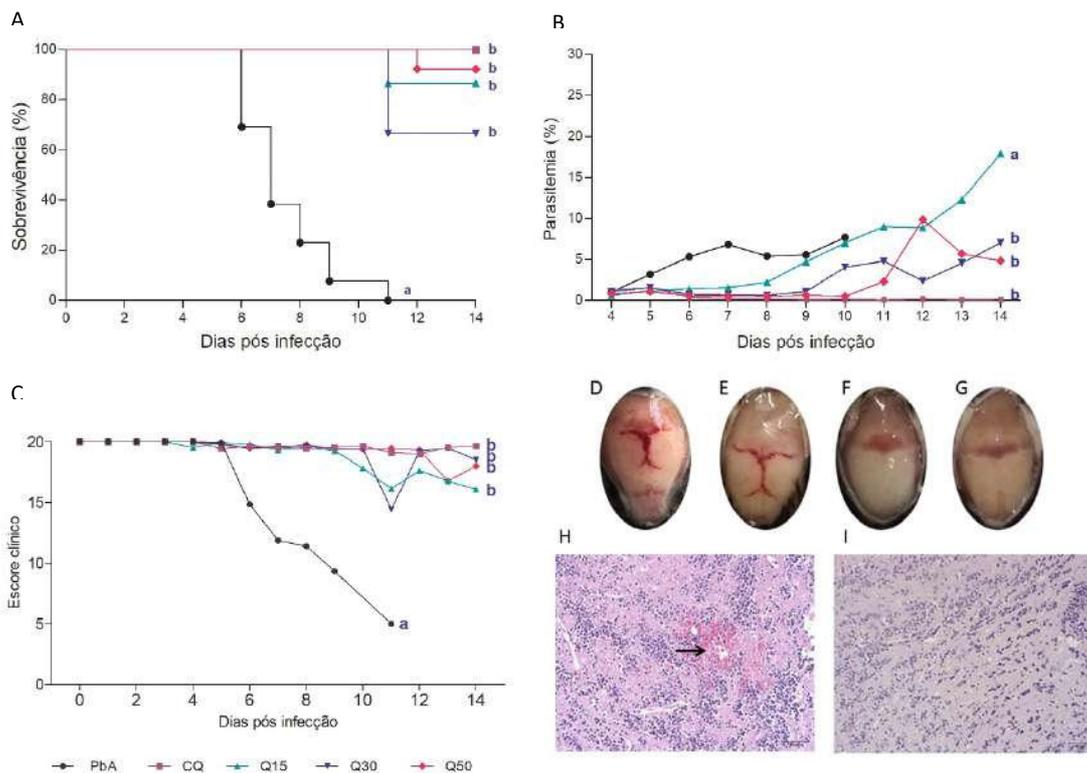


Figura 22: Eficácia do tratamento com o composto 3 sobre a sobrevivência, parasitemia e avaliação clínica. **(A)** Análise da Sobrevivência de camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA e tratados com cloroquina ou composto 3 (15, 30 e 50mg/Kg). **a** = valor $p < 0.05$ (comparado ao grupo tratado com água); **b** = valor $p > 0.05$ (comparado ao grupo tratado com CQ) (Teste Tukey). **(B)** Análise do percentual médio de parasitemia diária de camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA e tratados com cloroquina ou composto 3 (15, 30 e 50mg/Kg). **(C)** Avaliação clínica (escore) diária, através da ERCCM, de camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA e tratados com cloroquina ou composto 3 (15, 30 e 50mg/Kg). **(D-G)** Análise macroscópica do encéfalo e **(H-I)** microscópica do cérebro de camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA e tratados com cloroquina ou composto 3 (15, 30 e 50mg/Kg).

4.4.5.2. Dosagens Bioquímicas

Analisando as enzimas hepáticas, as observações feitas na presente investigação estão de acordo com a literatura (AL-SALAHY et al., 2016; GORKI et al., 2020; MISRA et al., 2011; MIZOBUCHI et al., 2018), com níveis de ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase) significativamente elevados ($p < 0,05$) no grupo controle não tratado (infectado por PbA) (Figura 23A-B). É interessante notar que, camundongos que receberam o composto 3, independentemente da dose, exibiram um nível reduzido de AST em comparação com camundongos tratados com CQ (Figura 23B), indicando segurança do composto para a função hepática do hospedeiro.

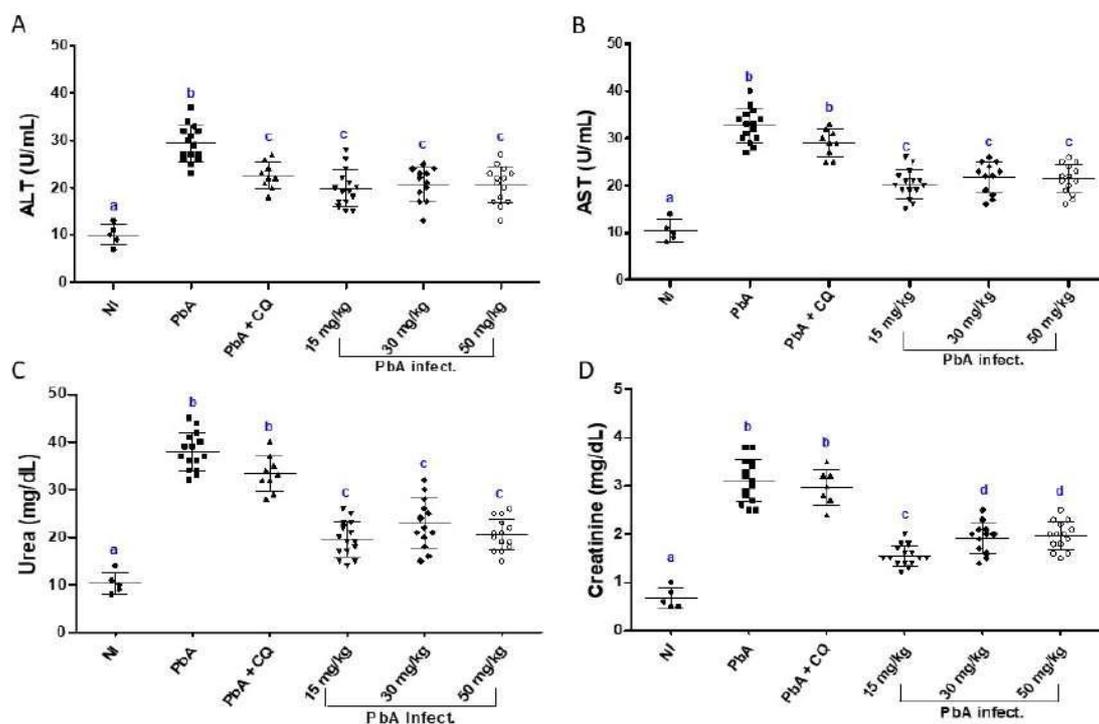


Figura 23: Testes de função hepática [ALT (A), AST (B)] e renal [ureia (C), creatinina (D)] em camundongos não infectados, infectados com PbA sem tratamento ou tratados com composto 3 (15, 30 e 50 mg /kg) ou CQ (10 mg/kg). NI: não infectado; PbA: *Plasmodium berghei* ANKA; CQ: cloroquina. Letras iguais (a, b ou c) não indicam diferença significativa (valor de $p > 0,05$ (ANOVA + pós-teste Tukey). Letras diferentes (a, b ou c) indicam diferença significativa (valor de $p < 0,05$ (ANOVA + pós-teste de Tukey).

Os parâmetros renais também foram analisados pela dosagem de creatinina e uréia. Em conjunto, os níveis desses marcadores foram maiores no grupo PbA (Figura 23C-D). No entanto, no grupo tratado com o composto 3, independentemente da dose, (Figura 23C-D) os níveis de uréia e creatinina foram significativamente reduzidos em comparação com camundongos infectados não tratados e com aqueles tratados com CQ, indicando a segurança do composto para os rins de o hospedeiro do roedor. Os resultados mostram que os camundongos tratados exibiram menos lesões hepáticas e renais agudas, o que pode ser devido à redução na carga parasitária (AL-SALAHY et al., 2016). No entanto, o grupo CQ não apresentou melhora significativa desses parâmetros, apesar da depuração da parasitemia, sugerindo que o composto 3 pode ser mais seguro que o antimalárico padrão, além de ter um possível perfil farmacocinético melhor.

O fígado e os rins são os órgãos responsáveis pelo metabolismo e excreção dos fármacos, portanto, a função renal ou hepática alterada pode afetar significativamente as concentrações dos fármacos (MARRA et al., 2021). Além de alterar a eliminação, o metabolismo de primeira passagem também pode ser afetado e, assim, a absorção e a biodisponibilidade dos fármacos. Essas alterações na farmacocinética podem levar ao aumento ou diminuição da exposição, resultando em toxicidade ou eficácia reduzida, o que pode ter relevância clínica com base na janela terapêutica e na farmacodinâmica do medicamento específico (MARRA et al., 2021).

A malária grave pode levar a disfunção hepática em associação com falência múltipla de órgãos. Assim, elevações das enzimas citoplasmáticas hepáticas são comuns, incluindo aumento da aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) (ANAND et al., [s.d.]; DAS et al., 2007; MIZOBUCHI et al., 2018). Da mesma forma, os níveis séricos de creatinina e ureia são de importância clínica para a avaliação da função renal. Níveis elevados indicam a incapacidade renal de filtrar a creatinina e a ureia, o que corresponde à deposição de hemozoína nos rins e insuficiência renal que aumenta a aparente baixa taxa de filtração glomerular e insuficiência renal aguda (EIAM-ONG; SITPRIJA, 1998).

4.4.5.3. Teste antiplasmodial curativo do composto 3 associado à VD

Concluimos, com o experimento anterior, que a dose de 15mg/Kg do composto 3 apresentou melhores resultados, pois apesar de ter reduzido a parasitemia em menor grau, em relação às demais doses testadas, ela foi tão eficaz quanto a dose de 50mg/Kg em proteger os animais quanto ao desenvolvimento do quadro mais grave dessa patologia, a MC. Com base nisso, decidimos testar o composto 3 na dose de 15mg/Kg associado à vitamina D (VD), uma vitamina sabidamente anti-inflamatória, para avaliar se a proteção contra a MC seria potencializada com a introdução de uma terapia alternativa.

Para isso utilizamos duas concentrações de VD (160 e 320 µg/Kg) isoladamente e associados ao composto 3 (15mg/Kg). Essas concentrações foram determinadas com base no estudo de HE e colaboradores (2014). Como pode ser observado na figura 24 (A), todos os animais somente desafiados sucumbiram ao óbito após desenvolvimento de MC (entre o 6° e o 11° dpi),

evidenciado por parasitemia média inferior a 10% (Figura 24B), escore clínico médio ≤ 8 (Figura 24), e presença de hemorragia cerebral observadas macroscopicamente na calota craniana (Figura 25A).

A VD administrada, isoladamente, na dose 160 e 320 μ g/Kg, protegeu 40% e 60%, respectivamente o desenvolvimento da MC, porém, os animais que sobreviveram ao período crítico da MC (Figura 24A) apresentaram médias de parasitemias superiores aos animais pertencentes aos grupos que receberam a VD associada ao composto 3 no 14^o dpi (Figura 24B). Quando associados ao composto 3, a taxa de proteção contra MC (Figura 24A) foi de 80 e 60%, respectivamente. Todos os animais que não desenvolveram MC, desenvolveram anemia em função da hiperparasitemia (média de 47,8%, 40,8%, 52,65% e 56,2% para os grupos VD160, VD320, QVD160 e QVD320) sendo os dois primeiros eutanasiados no 16^o e os outros dois grupos eutanasiados no 20^o dpi (dados não apresentados).

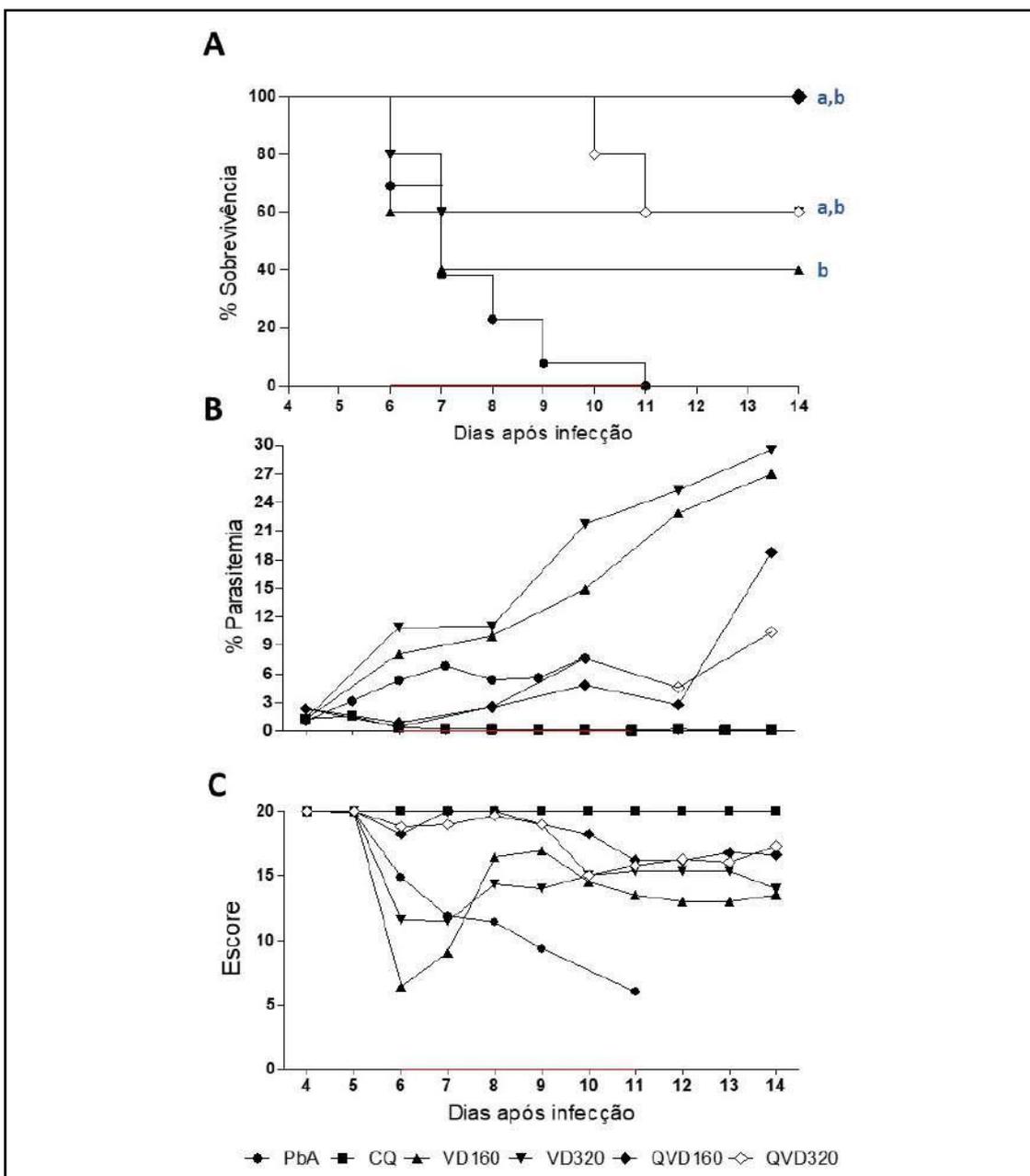


Figura 24: Eficácia do tratamento com o composto 3 e/ou VD sobre a sobrevivência, parasitemia e avaliação clínica. **(A)** Análise da Sobrevivência de camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA e tratados com cloroquina ou Vitamina D (160 e 320 μ g/kg) isolada ou associada ao composto 3 (15 mg/Kg). **a** = valor $p < 0.05$ (comparado ao grupo tratado com água), **b** = valor $p > 0.05$ (comparado ao grupo tratado com CQ) (teste Tukey). **(B)** Análise do percentual médio de parasitemia diária de camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA e tratados com cloroquina ou Vitamina D (160 e 320 μ g/kg) isolada ou associada ao composto 3 (15 mg/Kg). **(C)** Avaliação clínica (escore) diária, através da ERCCM, de camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA e tratados com cloroquina ou Vitamina D (80, 160 e 320 μ g/kg) isolada ou associada ao composto 3 (15 mg/Kg). Traço vermelho indica a Janela de MC.

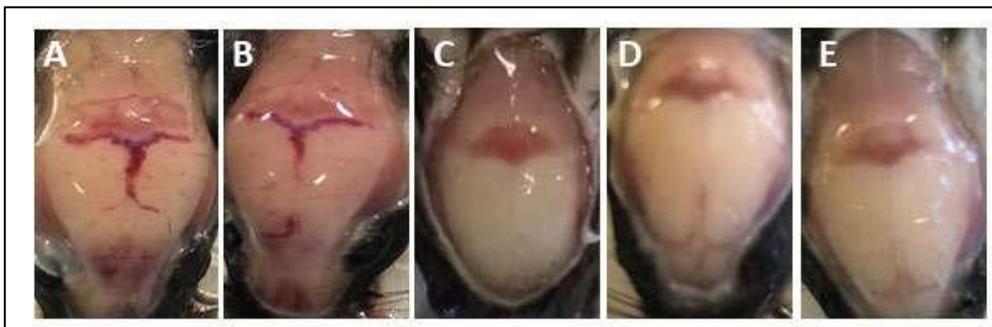


Figura 25: Análise macroscópica do encéfalo dos animais somente infectados (A), tratados com VD e que desenvolveram MC (B), tratados com cloroquina (C), tratados com VD e protegidos contra MC (D) e tratados com VD e composto 3 e que foram protegidos contra MC (E).

4.5. CONCLUSÃO

A malária é uma grave doença de saúde pública que afeta milhões de pessoas em todo o mundo e sua forma grave é responsável por milhares de mortes anualmente, o que torna emergente a necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos. A seleção de compostos bioativos (HITs) apropriados é um critério importante para o desenvolvimento de compostos líderes e exige uma investigação completa no estágio inicial para a probabilidade de sucesso clínico. Para isso, potência *in vitro* aceitável, eficácia oral e biodisponibilidade; bom índice de seletividade sem qualquer toxicidade; propriedades físico-químicas aceitáveis e um bom perfil farmacocinético são critérios importantes para a pesquisa de novos medicamentos. Especificamente, no caso da malária, $CI_{50} < 1 \mu M$ para cepas sensíveis e resistentes de *Plasmodium* spp. com seletividade de 10 vezes é recomendado para o composto HIT além da eficácia *in vivo*, para o qual a recomendação é que um composto líder deva atingir a depuração do parasito em uma dose que erradique 90% do patógeno alvo, quando administrado por via oral (<50mg/kg) nos estágios sanguíneos da infecção (tipicamente quatro doses ao longo de 4 dias), no modelo de camundongo com malária grave (KATSUNO et al., 2015a).

Neste estudo, identificamos um composto HIT (composto 3) apresentando atividade antimalárica proeminente mesmo contra *P. falciparum* resistente à CQ. Além disso, no ensaio *in vivo*, o composto 3 também exibiu atividade contra uma cepa virulenta de *P. berghei* (ANKA) inibindo o desenvolvimento de parasitas sanguíneos assexuados (taxas variando de 15,5 a 92%) e prevenindo o

desenvolvimento de MC. Este composto também pode atuar contra outros parasitos como demonstrado por nosso grupo de pesquisa em uma publicação recente descrevendo uma potente atividade antileishmanial (CALIXTO et al., 2018). Além disso, o composto 3 pode ser promissor como terapia adjuvante para melhorar o tratamento da malária grave, no entanto, os mecanismos pelos quais esse composto atua para prevenir a gravidade da infecção da malária ainda precisam ser melhor investigados.

5. CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL *IN SILICO*, *IN VITRO* E *IN VIVO* DE ALCALOIDES β -CARBOLÍNICOS SINTÉTICOS

5.1. INTRODUÇÃO

A malária ainda continua sendo um flagelo para muitos países do mundo (GUINOVART et al., 2022), tendo uma longa abrangência em regiões tropicais subdesenvolvidas, incluindo países da África, Ásia e América do Sul, causando aproximadamente 241 milhões de casos que resultaram em quase 650 mil mortes em 2020 (WHO, 2021).

Embora indivíduos de todas as idades estejam em risco de adoecer e morrer de malária, as crianças menores de cinco anos compõem o grupo que mais frequentemente desenvolve a malária cerebral (MC), a forma mais grave da infecção causada, principalmente, pelo *P. falciparum* (PHILLIPS et al., 2017). Os mecanismos que conduzem à patogênese da MC não são totalmente conhecidos, mas o sequestro de eritrócitos infectados (EI) no cérebro causando obstrução capilar, inflamação, hemorragia e edema cerebral, que ocorrem devido ao rompimento da barreira hematoencefálica, desempenha um papel crítico no desenvolvimento da encefalopatia (BERENDT et al., 1994; COBAN; LEE; ISHII, 2018; MOHANTY et al., 1994). Embora 85% dos indivíduos que desenvolvem MC sejam capazes de se recuperar completamente após o tratamento antimalárico adequado, é preocupante o fato de cerca de 25% deles permanecerem com sequelas neurocognitivas significativas ao longo da vida (BOIVIN et al., 2007a; IDRO; JENKINS; NEWTON, 2005; MAGEN et al., 2017).

O atual arsenal terapêutico para o tratamento da malária inclui a combinação de antimaláricos com diversos modos de ação. Compostos como a cloroquina inibem a polimerização da hemoglobina nas fases sexuais dos parasitos, enquanto compostos como a artemisinina prejudicam mais de um alvo pela destruição de proteínas do parasito devido à produção de radicais centrados no carbono resultantes da metabolização da artemisinina em diidroartemisinina (DE ARAÚJO et al., 2020). No entanto, o surgimento e disseminação de isolados resistentes de *P. falciparum* aos atuais esquemas de tratamento torna urgente a busca de novos candidatos antimaláricos que possam contribuir para o tratamento da doença, evitando um pior prognóstico (JOHN et al., 2010; VARO et al., 2020; WICHT; MOK; FIDOCK, 2020).

As β -carbolinas são alcalóides naturais, contendo uma estrutura atraente, que são encontrados em muitos medicamentos comercializados (DAI et al., 2018) e candidatos a medicamentos antimaláricos (JAROMIN et al., 2021). Esses compostos apresentam grande diversidade química, podendo ser encontrados na forma de monômeros ou dímeros. A saturação do anel de seis membros contendo N é usada para classificar os monômeros tricíclicos como β -carbolinas para membros insaturados e di-hidro- β -carbolinas (DH β C) e tetra-hidro- β -carbolinas (TH β C) para membros parcialmente saturados. Portanto, uma ampla gama de atividade biológica para esses compostos tem sido relatada (ASHOK; GANGULY; MURUGESAN, 2013; DAI et al., 2018).

O sucesso na descoberta de medicamentos requer a identificação de moléculas que possuam propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas ótimas. Ao longo dos anos, os químicos medicinais desenvolveram ferramentas (ABRAHAM et al., 2002; GLEESON, 2008; LEESON; DAVIS; STEELE, 2004; LIPINSKI et al., 2001), que permitem a seleção de moléculas contendo atributos de segurança e propriedades semelhantes a medicamentos na fase de projeto, a fim de aumentar a sobrevivência de candidatos a medicamentos (WAGER et al., 2010).

Aqui, descrevemos os estudos de escolha e otimização guiados in silico, a síntese e ensaios biológicos de novos derivados de β -carbolinas com atividade antimalárica visando uma potencial molécula para o desenvolvimento de antimalárico.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Delineamento Experimental

O delineamento experimental foi procedido conforme esquema demonstrado na figura 26.

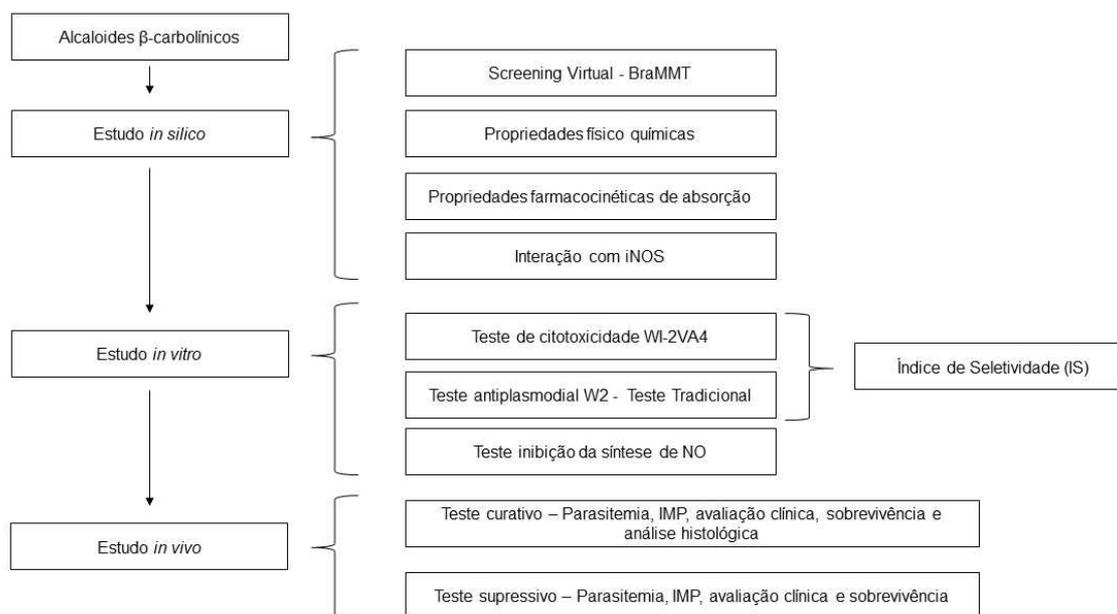


Figura 26: Delineamento Experimental.
Fonte: próprio autor

Uma biblioteca interna de 20 entidades químicas virtuais (Figura 27), que foram possíveis de serem sintetizadas dentro dos reagentes disponíveis comercialmente, foi construída para identificar entidades químicas exibindo atividades antiplasmodiais promissoras usando a abordagem de triagem virtual.

Essas 20 entidades químicas virtuais foram projetadas usando o software MarvinSketch® (ChemAxon, Cambridge, MA, EUA). O software MOPAC® (STEWART, 1990) foi usado para refinar todas as estruturas moleculares através do método semi-empírico PM7, rotina EigenFollowing (EF) para otimização de geometria e a carga foi ajustada de acordo com o estado de protonação em pH 7,4 (DOYE; WALES, 1997; DUTRA et al., 2013).

Em seguida, todas as estruturas foram submetidas aos cálculos de docking molecular pelo programa AutoDock Vina® (TROTT; OLSON, 2009) utilizando a plataforma OCTOPUS® e os arquivos de configuração foram determinados através de uma etapa de re-docking (MAIA et al., 2017). Assim, a

triagem virtual de potenciais candidatos a antimaláricos foi realizada usando o banco de dados BraMMT (NUNES et al., 2019). Valores de energia de ligação, valores de Δ (energia de ligação do ligante cristalográfico - energia de ligação do composto) foram calculados (BANFI et al., 2021), e esses valores foram empregados como um primeiro passo no processo de seleção aplicado para escolher as estruturas mais promissoras a serem sintetizadas.

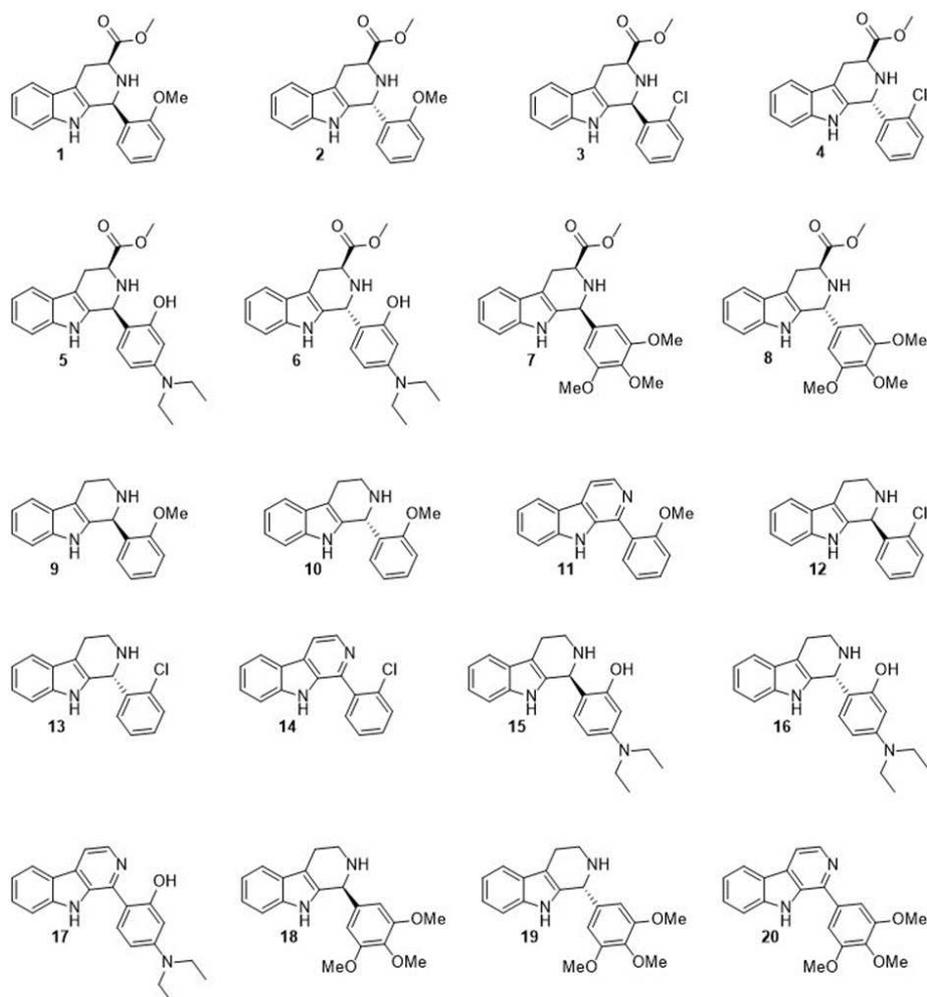


Figura 27: Estrutura química de todos os compostos possíveis de serem sintetizados dentro dos aldeídos disponíveis.
Fonte: Próprio autor.

5.2.2. Síntese Química

Os alcaloides β -carbolínicos, foram sintetizados no Núcleo de Pesquisas em Química Biológica da Universidade Federal de São João Del Rey, Campus de Divinópolis (NQBio - UFSJ), sob supervisão do Prof. Dr. Gustavo Henrique Ribeiro Viana.

Os reagentes e solventes foram adquiridos da Sigma-Aldrich e usados sem purificação adicional. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram registrados usando um Bruker Avance DRX-200 ou DRX-400 e um Bruker AC300. Os deslocamentos químicos são relatados como δ (ppm) a partir de tetrametilsilano (TMS) e os valores J relatados em Hz. A espectrometria de massa de alta resolução (HRMS) foi registrada usando um espectrômetro de massa ESI micrOTOF-QII Bruker. A síntese assistida por micro-ondas foi realizada no reator de micro-ondas monomodo CEM Discover. A cromatografia em coluna foi realizada com sílica gel 60, 70-230 mesh (Merck, Darmstadt, Alemanha).

A descrição da síntese desses compostos está demonstrada no Anexo D.

5.2.3. Obtenção e solubilização/ armazenamento dos alcaloides β -carbolínicos para testes de atividade biológica

Os compostos sintetizados foram testados quanto à citotoxicidade e atividade antiplasmodial no Laboratório de Bioquímica Medicinal (UFSJ) sob supervisão do Professor Dr. Fernando de Pilla Varotti e da Dra Amanda Luisa da Fonseca.

Para a realização dos testes antimaláricos *in vitro* e *in vivo*, os compostos, liofilizados, foram armazenados em geladeira (2 a 8°C) e posteriormente solubilizados em DMSO para preparo da solução estoque (250mg/mL), a qual foi também mantida sob refrigeração.

5.2.4. Ensaios *in vitro* de Citotoxicidade

5.2.4.1. Cultivo das células WI e Ensaio de Viabilidade Celular:

As linhagens aderentes derivadas de fibroblastos de pulmão humano WI-26-VA4 (ATCC CCL-95.1) foram cultivadas como recomendado (CALVO-CALLE et al., 1994), para posterior ensaio de viabilidade celular sob metodologias descritas nos itens 4.2.4.1 e 4.2.4.2.

5.2.5. Avaliação da atividade antiplasmodial *in vitro*

5.2.5.1. Cultivo Contínuo da fase eritrocítica do parasito

Os experimentos para avaliação da atividade antiplasmodial *in vitro* dos alcaloides β -carbolínicos foram realizados na Universidade Federal de São João Del Rey (UFSJ), campus Dona Lindu, Divinópolis, Minas Gerais, sob orientação do professor Dr. Fernando de Pilla Varotti e da Dra. Amanda Luisa da Fonseca, através do teste tradicional.

Para os ensaios foram utilizadas formas sanguíneas de *P. falciparum* (cepa W2-Cloroquina-resistente) cultivadas em hemácias humanas sob condições estabelecidas por TRAGER e JENSEN (1976). Elas foram mantidas em placas de petri com meio RPMI-1640 suplementado com 25mM de HEPES, 21mM de bicarbonato de sódio, 300 μ M de hipoxantina, 2g/L de glicose, 40 μ g/ml de gentamicina, 10% (v/v) de plasma humano A+ inativado (meio completo) e hematócrito a 5%.

As hemácias humanas eram obtidas do Hemocentro de Divinópolis lavadas com meio RPMI incompleto através de centrifugação a 2000 rpm por 30 minutos para retirada das células brancas. As placas de petri contendo os parasitos foram mantidas à 37° C em dessecadores, nos quais a concentração adequada de O₂ era obtida pela combustão de uma vela. Diariamente era realizada a troca de meio completo do cultivo.

5.2.5.2. Avaliação da atividade antimalárica *in vitro* através do teste tradicional

Para os testes, foram utilizados cultivos de parasitos com predomínio de anéis, que eram obtidos através da sincronização com sorbitol 10%, conforme descrito no item 4.2.5.2 (LAMBROS; VANDERBERG, 1979; FERNANDEZ, 2004). As culturas sincronizadas com 1% de parasitemia no estágio de anel e 2% de hematócrito foram distribuídas em microplacas de 96 poços (Corning/EUA)/200 μ l por poço (volume final). Os compostos testados foram adicionados em diferentes concentrações (0,50 μ g/mL a 0,008 μ g/mL, determinadas por meio de diluição seriada) na placa contendo os parasitos (CARVALHO et al., 1991). Os poços controle continham hemácias infectadas sem adição dos compostos testes (controle negativo). Como antimalárico padrão foram utilizados a cloroquina ou artemeter em todos os experimentos realizados,

nas diluições seriadas dos compostos teste (controle positivo). Em seis poços foram adicionados 180µL de eritrócitos não parasitados para a exclusão da autofluorescência dos mesmos.

Então, as placas-teste foram incubadas em dessecadores a 37°C, por 48h, com trocas diárias do meio. Após incubação, foram confeccionados esfregaços decorrentes de cada poço para avaliar a sensibilidade dos parasitos ao compostos. Após fixação com metanol e coloração com Giemsa, os esfregaços foram utilizados para proceder à contagem da parasitemia ao microscópio óptico (1000x). A atividade dos compostos foi expressa pela porcentagem de redução da parasitemia em relação aos controles sem fármacos, que foi considerada como 100% de crescimento do parasito. Os experimentos foram realizados em duplicatas e a leitura através de lâminas codificadas. A parasitemia foi calculada conforme a fórmula abaixo:

$$\text{Redução da parasitemia (\%)} = 100 - \frac{(\text{Parasitemia do composto} \times 100)}{\text{Parasitemia controle}}$$

5.2.6. Índice de Seletividade

O índice de seletividade (IS) dos compostos foi determinado conforme descrito no item 4.2.6.

5.2.7. Avaliação *in silico*

5.2.7.1. Avaliação *in silico* das Propriedades Físico-químicas e Farmacocinéticas de Absorção

As propriedades físico-químicas dos compostos foram analisadas, *in silico*, através da plataforma online *SwissAdme*, disponível gratuitamente através do sítio: <http://www.swissadme.ch/index.php>, conforme descrito no item 4.2.3.1.

As moléculas que obtiveram os melhores resultados quanto às propriedades físico químicas preditivas e quanto às atividades antiplasmodial e citotóxica, *in vitro*, foram analisadas quanto ao perfil farmacocinético de absorção *in silico*. A análise foi realizada através da plataforma online *AdmetSar*, disponível gratuitamente através do sítio: <http://lmm.d.ecust.edu.cn/admetsar2> conforme descrito no item 4.2.3.2.

5.2.8. Testes antimaláricos *in vivo*

5.2.8.1. Animais

Para a realização dos experimentos propostos foi utilizado o modelo murino de malária cerebral experimental (MCE) para avaliar a atividade antimalárica dos alcaloides.

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) C57BL/6 fêmeas de 6 a 8 semanas de idade, fornecidos pelo Centro de Biologia da Reprodução (CBR) - CIAEP 02.0048.2019 - da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF e com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFJF, sob o parecer nº 022/2020 -CEUA- UFJF (ANEXO E).

Os animais foram mantidos sob condições descritas no item 4.2.8.1.

5.2.8.2. Delineamento Experimental

Os testes antiplasmodial curativo (descrito no tópico 5.2.8.4) e supressivo (descrito no tópico 5.2.8.5) foram procedidos conforme demonstrado abaixo nas figuras 28 e 29, respectivamente.

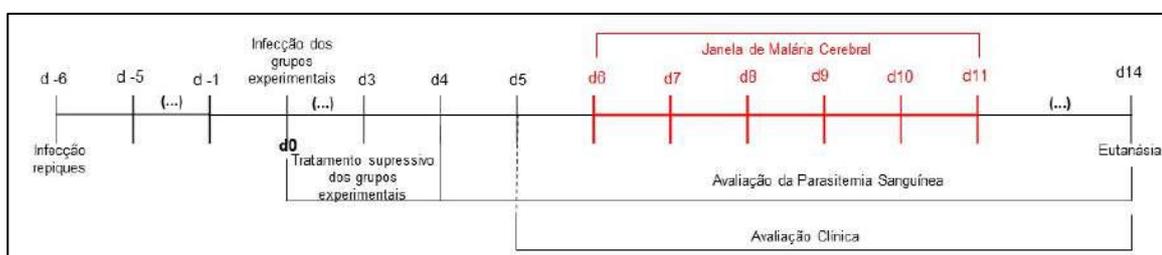


Figura 28: Desenho experimental: esquematização dos processos de infecção, tratamento curativo com alcaloides β -carbólicos e eutanásia realizados no desenvolver deste projeto, além de ilustração do período correspondente ao período crítico para o desenvolvimento de malária cerebral; d-6: dia 6 antes da infecção; d-5: dia 5 antes da infecção; d -1: dia 1 antes da infecção, d0: dia zero, d3: dia 3; d4: dia 4; d5: dia 5; d6: dia 6; d7: dia 7; d8: dia 8; d9: dia 9; d10: dia 10; d11: dia 11 e d14: dia 14 pós infecção (dpi).

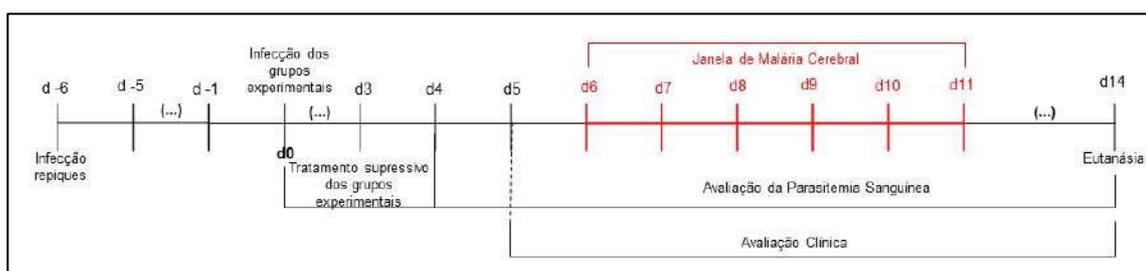


Figura 29: Desenho experimental: esquematização dos processos de infecção, tratamento supressivo com alcaloides β -carbólicos e eutanásia realizados no desenvolver deste projeto,

além de ilustração do período correspondente ao período crítico para o desenvolvimento de malária cerebral; d-6: dia 6 antes da infecção; d-5: dia 5 antes da infecção; d -1: dia 1 antes da infecção, d0: dia zero, d3: dia 3; d4: dia 4; d5: dia 5; d6: dia 6; d7: dia 7; d8: dia 8; d9: dia 9; d10: dia 10; d11: dia 11 e d14: dia 14 pós infecção (dpi).

5.2.8.3. Solubilização dos compostos e grupos experimentais

A droga padrão, cloroquina, foi pesada, individualmente, em quantidades suficientes para tratamento de um grupo/dia. A mesma foi, então, diluída em água filtrada somente no momento do tratamento dos animais.

Os alcaloides β -carbolínicos foram diluídos em DMSO para uma solução estoque de concentração igual a 250mg/mL. No momento do tratamento dos animais a solução estoque foi diluída em água filtrada para a concentração de tratamento, equivalente a 10mg/mL, totalizando 200 μ L de volume final administrado/animal/dia. Os grupos experimentais estão descritos nas tabelas 12 e 13.

Tabela 12: Grupos experimentais e seus respectivos esquemas de tratamento, dose e tamanho amostral (n) utilizados no Teste antiplasmodial curativo dos alcaloides β -carbolínicos.

Grupo	Composto (dias de Tratamento)	Dose	N
3	Alcaloide 3 (3° ao 7°dpi)	10 mg/kg	10
4	Alcaloide 4 (3° ao 7°dpi)	10 mg/kg	10
5	Alcaloide 5 (3° ao 7°dpi)	10 mg/kg	10
6	Alcaloide 6 (3° ao 7°dpi)	10 mg/kg	10
10	Alcaloide 10 (3° ao 7°dpi)	10 mg/kg	10
CQ	Cloroquina (3° ao 7° dpi)	10mg/Kg	09
PbA	água (3° ao 7°dpi)	-	13

dpi: dia pós infecção

Tabela 13: Grupos experimentais e seus respectivos esquemas de tratamento, dose e tamanho amostral (n) utilizados no Teste antiplasmodial supressivo dos alcaloides β -carbólicos.

Grupo	Composto (dias de Tratamento)	Dose	N
3	Alcaloide 3 (0 ao 4°dpi)	10 mg/kg	10
4	Alcaloide 4 (0 ao 4°dpi)	10 mg/kg	10
10	Alcaloide 10 (0 ao 4°dpi)	10 mg/kg	10
CQ	Cloroquina (0 ao 4° dpi)	10mg/Kg	09
PbA	água (0 ao 4°dpi)	-	13

dpi: dia pós infecção

5.2.8.4. Teste antiplasmodial curativo

Para avaliação do potencial curativo dos compostos alcaloides β -carbólicos sobre o quadro de MCE os camundongos foram divididos, aleatoriamente, em 7 grupos experimentais: um grupo controle tratado com a droga padrão (CQ); um grupo controle não tratado (PbA) e cinco grupos tratados com as drogas experimentais.

No d0 todos os animais foram infectados por via intraperitoneal (i.p.) com 200ul de PBS contendo 10^5 EI por *P. berghei* ANKA (PbA) previamente obtidos a partir de um animal repique apresentando parasitemia sanguínea $\geq 5\%$.

A partir do 3° dia pós infecção (dpi) foram confeccionados, diariamente, esfregaços sanguíneos da ponta de cauda dos animais, fixados em metanol, corados por Giemsa e examinados em microscopia de imersão para determinação de parasitos circulantes. O tratamento curativo dos animais foi realizado durante 5 dias consecutivos, iniciando no 3° dpi, assim que os primeiros parasitos foram observados microscopicamente, e finalizado no 7° dpi. Os animais pertencentes ao grupo 3, 4, 5, 6 e 10 receberam o alcaloide correspondente ao grupo experimental na dose de 10mg/kg (volume total 200 μ L). O grupo controle tratado recebeu a droga padrão cloroquina (200uL) na dose de 10mg/Kg/dia e o grupo controle não tratado recebeu água filtrada (200uL).

Para determinar a eficácia do tratamento foi avaliado, diariamente, a parasitemia sanguínea e o escore clínico. Datas de morte dos animais também foram registradas com o intuito de obter dados sobre a sobrevivência dos mesmos em decorrência do tratamento com os compostos avaliados.

5.2.8.5. Teste antiplasmodial supressivo

Para avaliação do potencial supressivo dos alcaloides β -carbolínicos sobre o quadro de MCE os camundongos foram divididos, aleatoriamente, em 5 grupos experimentais: um grupo controle tratado com a droga padrão (CQ); um grupo controle não tratado (PbA) e três grupos tratados com as drogas experimentais.

O teste supressivo foi realizado conforme PETERS (1965), com modificações. No d0 todos os animais foram infectados por via intraperitoneal (i.p.) com 200 μ l de PBS contendo 10^5 EI por *P. berghei* ANKA previamente obtidos a partir de um animal repique apresentando parasitemia sanguínea $\geq 5\%$. Após 4 horas da infecção, os animais foram tratados pela via oral (gavagem) com 200 μ l dos alcaloides na dose de 10mg/Kg. O grupo controle tratado recebeu a droga padrão cloroquina (200uL) na dose de 10mg/Kg/dia e o grupo controle não tratado recebeu água filtrada (200uL). Todos os animais receberam tratamento supressivo por 5 dias consecutivos.

A partir do 3º dpi o sangue da veia caudal dos animais foi coletado para confecção dos esfregaços sanguíneos, os quais foram fixados em metanol, corados por Giemsa e examinados em microscopia de imersão para determinação de parasitos circulantes. O escore clínico e a sobrevivência dos animais foram avaliados durante todo o experimento ou até o óbito.

5.2.8.6. Determinação da Parasitemia Sanguínea

Para determinar o efeito dos tratamentos no desenvolvimento parasitário, foram realizados esfregaços sanguíneos diários do 3º ao 14º dpi, conforme descrito no item 4.2.8.5.

5.2.8.7. Determinação da Inibição da Multiplicação do Parasito (IMP)

A atividade antimalárica dos derivados foi verificada por meio do cálculo de inibição da multiplicação do parasito (IMP), descrito no item 4.2.8.6.

5.2.8.8. Avaliação Clínica

Para determinar o desenvolvimento da MCE foi utilizado a escala rápida de coma e comportamento murino (ERCCM), conforme descrito no tópico 4.2.8.7. Protocolo completo de avaliação da ERCCM em anexo (APÊNDICE A).

5.2.8.9. Eutanásia

A eutanásia dos animais foi procedida conforme descrito no item 4.2.8.8.

5.2.8.10. Análise macroscópica do encéfalo

Após a eutanásia, o crânio dos animais foi fotografado com o intuito de registrar danos cerebrais macroscópicos, conforme descrito no item 4.2.8.9.

5.2.8.11. Análise histopatológica do cérebro

Para avaliar o efeito dos componentes testados sobre o tecido cerebral, a análise histopatológica foi procedida conforme descrito no item 4.2.8.10.

5.2.9. Avaliação, *in silico* e *in vitro*, do potencial de inibição da síntese de óxido nítrico

5.2.9.1. Citotoxicidade *in vitro* contra células de mamíferos

Macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c previamente inoculados com meio de tioglicolato a 3% foram utilizados para avaliação da viabilidade celular. Os macrófagos foram cultivados em frascos de cultura com meio RPMI-1640 suplementado com 2 mM de L-glutamina, 100 µg/mL de antibióticos (estreptomicina e penicilina), 5% de SFB e mantidos em estufa a 5% de atmosfera de CO₂ a 37 °C até o dia do teste. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora (n° 007/2018-CEUA).

A citotoxicidade foi avaliada pela viabilidade celular usando o ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) (MOSMANN, 1983). O ensaio para avaliação da viabilidade baseia-se na redução metabólica do MTT a formazan. Resumidamente, os macrófagos em 2x10⁶ células/poço foram transferidos para microplacas de 96 poços e tratados com o composto 10 em concentrações de 18 a 150 µM/mL. Para o controle negativo, as células foram

tratadas apenas com 0,06% de DMSO (veículo). As células foram incubadas por 48h a 37°C e 5% de atmosfera de CO₂. A absorbância foi lida a 570 nm e a viabilidade celular (%) dos macrófagos foi obtida pela seguinte fórmula: % de células viáveis = [(AUSample) / AU0,06% DMSO] × 100, onde: AUSample: A absorbância medida após o tratamento das células com a amostra; AU0,06% DMSO: A absorbância medida após o tratamento das células com 0,06% de DMSO. O experimento foi realizado em triplicata.

5.2.9.2. Avaliação da atividade anti-inflamatória do composto 10 por dosagem de NO

A produção de NO foi determinada nos sobrenadantes de cultura de macrófagos após incubados por 48h na presença do composto 10 (18 a 150 µM/mL) e estimulados com LPS a 1 µg/mL e IFN-γ a 1 ng/mL. O controle negativo foi estimulado com LPS e IFN-γ e tratado com 0,06% de DMSO (veículo). As células foram incubadas por 48h a 37°C e 5% de atmosfera de CO₂. Posteriormente, a produção de NO foi avaliada pelo método de Griess (uma medição indireta de NO por dosagem de nitrito) no sobrenadante de cultura recuperado dos estímulos de 48h e tratamento conforme descrito por (SUN et al., 2003). A quantidade de NO (µM) foi determinada por comparação com uma solução padrão de nitrito de sódio. A medição espectrofotométrica foi realizada em 540 nm e o experimento foi realizado em triplicata.

5.2.9.3. Avaliação da interação com iNOS por simulações de docking molecular

A estrutura 2D do composto 10 foi desenhada usando o software Chem Sketch® e otimizada no software Avogadro v1.1, usando o campo de força MMFF94s e o algoritmo *steepest descended*. Na segunda etapa, os ligantes foram preparados no AutoDock Tools (ADT) v1.5.6, onde foram adicionadas as cargas parciais *Gasteiger*, as ligações rotativas e os hidrogênios foram definidos e os arquivos pdbqt foram gerados. A enzima iNOS (arquivo 3EAI.pdb) foi utilizada como receptor flexível e os compostos como ligantes flexíveis (XIA et al., 2017). A estrutura tridimensional do iNOS foi obtida do RCSB Protein Data Bank e teve sua estrutura preparada no AutoDock Tools onde foram adicionados os hidrogênios e as cargas *Gasteiger* e gerado o arquivo pdbqt. A *grid box*

utilizada foi: *grid box* com dimensões de 22 Å × 22 Å × 22 Å, coordenadas de X = 126,798, Y = 115,912 e Z = 89,696, e *spacing* de 0,375 Å. O encaixe molecular foi realizado com o AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2009). O programa forneceu várias conformações do docking (9 poses) que foram avaliados no software Pymol 2.4.1®. A estrutura mais promissora, com base nos parâmetros energéticos e nas interações formadas entre a iNOS e os ligantes, foi selecionada.

5.3. Análise Estatística

A análise estatística dos dados obtidos durante o desenvolvimento do presente trabalho foi realizada conforme descrito no item 4.3.

5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste capítulo foram publicados no periódico Pathogens em dezembro de 2022 no artigo intitulado “Rational-based discovery of novel β -carbolines derivatives as potentials antimalarials: from *in silico* identification of novel targets to inhibition of experimental cerebral malária” (Anexo F) (DOI: [10.3390/pathogens11121529](https://doi.org/10.3390/pathogens11121529)).

5.4.1. Screening Virtual

Para identificação de possíveis alvos dos alcaloides β -carbolínicos, realizamos simulações *in silico* usando docking molecular contra BRAMMt. Os alvos que exibiram energia de ligação com compostos inferiores aos dos ligantes cristalográficos são apresentados na Tabela 14.

O modelo 2OK8 é uma *P. falciparum* ferredoxina-NADP+-redutase (PfFNR), localizada no apicoplasto, atua transferindo um par de elétrons para a proteína ferro-enxofre-ferredoxina (Fd) (MILANI et al., 2007). O par PfFNR/Fd participa de várias vias biossintéticas no apicoplasto, realizando transferência de elétrons do NADPH para proteínas em vias de síntese de ácidos graxos e vias isoprenóides independentes de mevalonato (BALCONI et al., 2009; LESANAVIČIUS et al., 2020).

A inibição do PfFNR interrompe a atividade da HMB-PP redutase (IspH), e conseqüentemente reduz a síntese de dimetilalil pirofosfato (DMAPP) e isopentenil pirofosfato (IPP) e seus derivados, levando à morte do protozoário (GUGGISBERG; AMTHOR; ODOM, 2014). Esses resultados reforçam a hipótese de que as β -carbolinas atuariam inibindo a síntese de isoprenóides em parasitos da malária (ALMOLHIM et al., 2022; BROKAMP et al., 2014; DING et al., 2020; JAROMIN et al., 2021; MATHEW et al., 2022).

Os resultados também indicam uma possível inibição de outros alvos do parasito, sugerindo que os compostos podem estar atuando na inibição de mais de uma via metabólica. Entre os outros alvos inibidos estão proteínas como PfPK7 (modelo 2PML) (MERCCKX et al., 2008), uma quinase que atua no desenvolvimento e proliferação do parasito, PfGrx1 (modelo 4N0Z) (RAHLFS; FISCHER; BECKER, 2001), que atua nas vias de controle do estresse oxidativo e PfATP6 (KRISHNA et al., 2010), que participa da homeostase do íon cálcio.

Tabela 14: Energia de ligação (kcal/mol) de derivados de β -carbolinas contra alvos BraMMt.

MODELOS	Compostos							
	Ligante Cristalográfico	3	4	5	6	8	9	10
2OK8	-2.0	-5.3	-5.0	-5.2	-5.0	-4.9	-4.8	-4.7
2PML	-6.9	-9.0	-8.8	-9.4	-9.0	-8.6	-7.9	-8.8
4N0Z	-4.3	-5.8	-6.1	-6.1	-6.3	-5.6	-5.3	-5.5
PfATP6	-7.2	-8.9	-8.3	-9.0	-8.8	-7.8	-7.4	-7.4

Para avaliar um possível perfil de interação foi realizada uma análise do perfil de interação de derivados de β -carbolinas contra 2OK8. O composto 3 (Figura 30A) apresentou duas ligações de hidrogênio, uma entre o nitrogênio do anel piridina com resíduo Asp301, e outra entre o oxigênio ligado ao anel D e um resíduo Lys307. Também demonstrou uma ligação Pi-Anion entre o anel D e o Asp301. Da mesma forma, o composto 4 (Figura 30B) apresentou uma ligação de hidrogênio e uma ligação Pi-Anion com o resíduo Asp301.

O complexo formado entre 8 e o modelo 2OK8 (Figura 30C), faz três ligações Pi-Anion e uma ligação Alquil com um resíduo Lys278, uma ligação Alquil com Arg310, uma ligação carbono hidrogênio e uma ligação Pi-Anion com um resíduo Lys306 e um Ligação Pi-Alquil com um Lys307.

Embora houvesse uma ligação desfavorável entre o nitrogênio do anel piridina e Lys306, o maior número de ligações apresentado por 8 foi compensatório para a redução da energia de ligação. Diferentemente dos outros compostos testados, a amina ligada ao anel D é um substituinte mais longo, que promove mais ligações apolares, mas altera a conformação do ligante para evitar a interação com o Asp301, como observado nos demais derivados.

O composto 5 (Figura 30D) apresentou apenas duas ligações com o resíduo Asp301, sendo uma ligação de hidrogênio e uma ligação Pi-Anion, mantendo o mesmo padrão dos demais derivados testados. O composto 6 (Figura 30E) realiza, além das ligações com o resíduo Asp301, uma ligação entre o substituinte cloro do anel D e um resíduo Asn275, além de uma ligação hidrogênio carbono com este mesmo resíduo.

Em comparação com o composto 5, 9 (Figura 30F) compensou a ligação desfavorável com um maior número de ligações. Neste caso, houve ligações de hidrogênio com os resíduos Asp301, Gln302, Lys307 e Asn276, além da ligação Pi-Anion com Asp301, que era comum a todos os derivados. As ligações com o resíduo Asp301 também foram mantidas no composto 10 (Figura 30G), além de uma ligação de hidrogênio entre o resíduo Asn272 e o oxigênio ligado ao anel D.

A análise dos perfis de interação dos compostos testados mostrou que em todos os casos a inibição do resíduo Asp301 esteve presente e promoveu a maior redução na energia de ligação, sugerindo que a inibição do P_fFNR ocorreria através da interação entre o motivo das β -carbolinas e esse resíduo de aspartato.

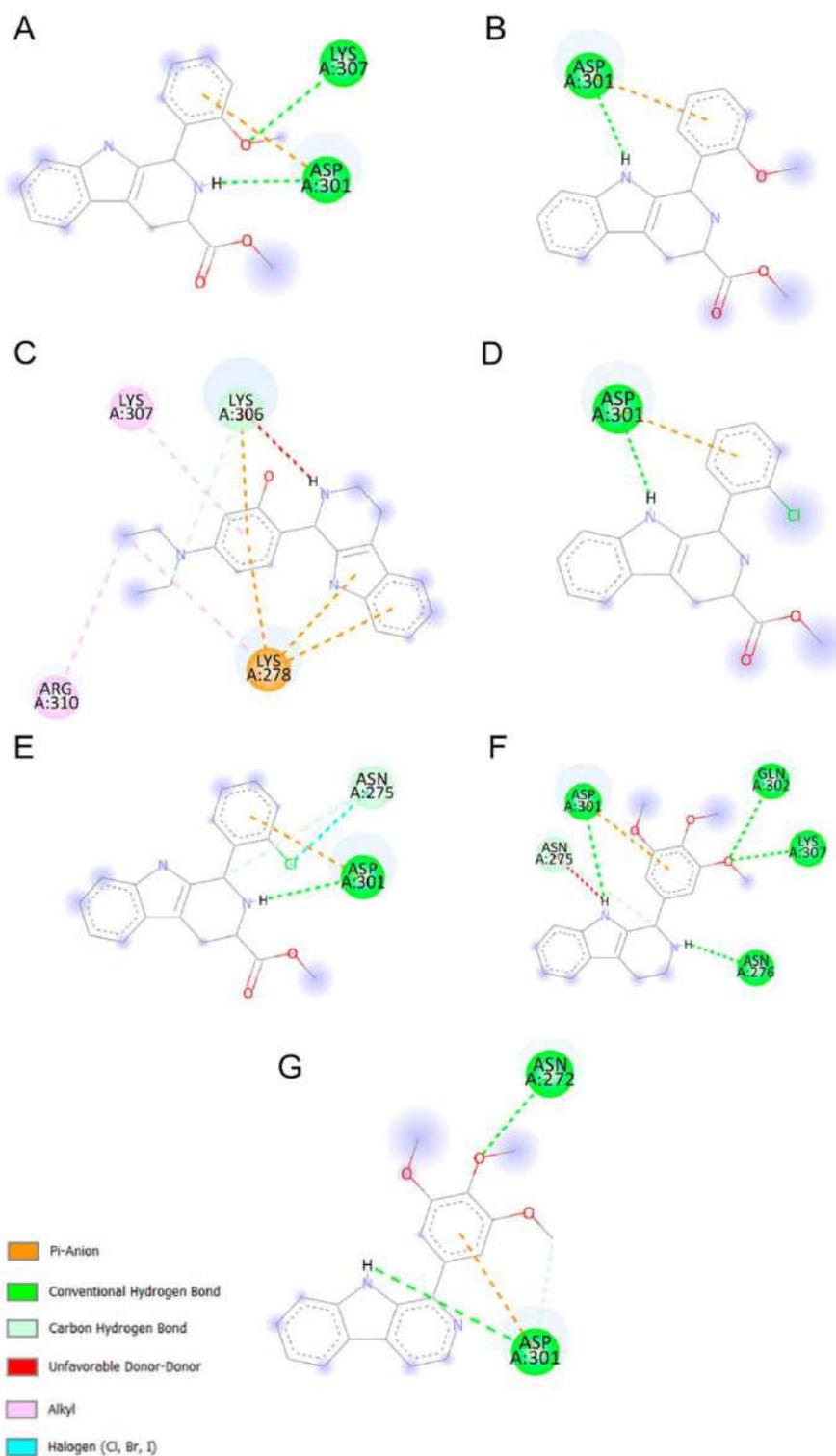


Figura 30: Mapa farmacofórico de compostos, testados *in vitro*, gerados por docking molecular contra 2OK8; (A) Composto 3; (B) Composto 4; (C) Composto 8; (D) Composto 5; (E) Composto 6; (F) Composto 9; (G) Composto 10.

5.4.2. Síntese Química

A rota sintética para os derivados de β -carbolinas 3-6 e 8-10 é descrita na figura 31. Na primeira etapa, o L-triptofano comercialmente disponível foi convertido em L-triptofano metil éster em uma reação de esterificação usando ácido sulfúrico e metanol. O éster metílico de L-triptofano previamente sintetizado e a triptamina comercialmente disponível foram submetidos à reação de Pictet-Spengler para obtenção dos derivados tetrahydro- β -carbolina 3-6, 8 e 9 mediante reação com diferentes benzaldeídos aromáticos na presença de ácido trifluoroacético e clorofórmio como solvente sob irradiação de micro-ondas. A oxidação de 9 com permanganato de potássio e DMF como solvente à temperatura ambiente proporcionou o composto 10.

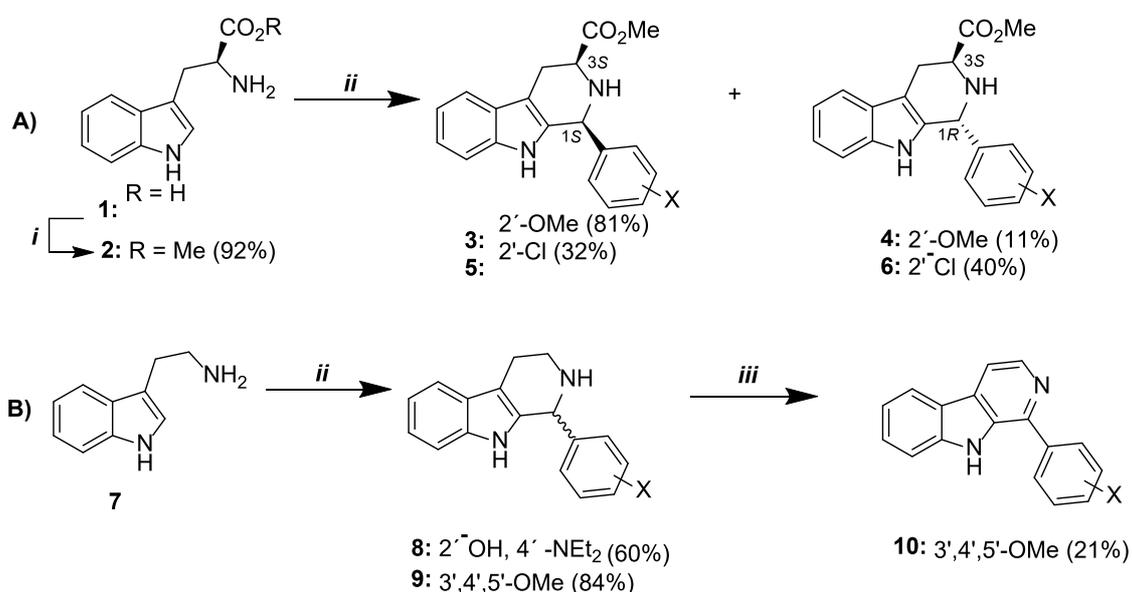


Figura 31: Via sintética dos alcaloides β -carbolínicos 3-6 e 8-10. Reagentes e condições: (i) MeOH, H₂SO₄, refluxo; (ii) Derivados de aldeído aromáticos, TFA/CHCl₃, MW, 100W, 30min; (iii) DMF, KMnO₄, 3h, rt.

5.4.3. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade e atividade antiplasmodial

A citotoxicidade de todos os compostos foi avaliada contra uma linhagem de fibroblastos de células humanas (WI-26-VA4 # ATCC CCL-95.1). Nenhum dos compostos foi citotóxico até a máxima concentração testada (100 μ M) (Tabela 15).

A atividade antiplasmodial de compostos contendo a estrutura de β -carbolinas tem sido relatada por muitos pesquisadores ao longo dos anos

(ALMOLHIM et al., 2022; JAROMIN et al., 2021; MATHEW et al., 2022; POJE et al., 2022; YAO et al., 2015). A avaliação da atividade antiplasmodial, realizada contra *P. falciparum* resistente à cloroquina (cepa W2), mostrou valores de CI_{50} variando de 0,51 a 1,82 μM (Tabela 15). Em relação ao IS, todos os compostos apresentaram alta seletividade para os parasitos ($IS > 10$) (os valores variaram de >55 a >196) (Tabela 15).

Tabela 15: Avaliação da citotoxicidade em células WI26VA4, da atividade antiplasmodial sobre a cepa W2 (cloroquina resistente) e determinação do índice de seletividade dos alcaloides β -carbólicos.

Composto	<i>P. falciparum</i> (W2)	WI-26-VA4	IS
	$CI_{50} \pm DP$ (μM)*	$CC_{50}^a \pm DP$ (μM)*	
3	0.71 \pm 0.012	>100	>141
4	1.04 \pm 0.021	>100	>96
5	1.41 \pm 0.018	>100	>71
6	0.67 \pm 0.019	>100	>149
8	1.82 \pm 0.011	>100	>55
9	1.12 \pm 0.014	>100	>89
10	0.51 \pm 0.011	>100	>196
ART	0.095 \pm 0.010	>100	>1000
CQ	0.59 \pm 0.015	>100	>169

CC_{50} : Concentração citotóxica que inibe 50% do crescimento celular; CI_{50} : Concentração que inibe em 50% o crescimento parasitário; DP: Desvio Padrão; IS: índice de seletividade; CQ: cloroquina; ART: artesunato. *Média e desvio padrão (DP) de experimentos em triplicata.

A atividade antiplasmodial *in vitro* relatada de todos os compostos atinge um conjunto de critérios recentemente estabelecido para HITS antimaláricos, que inclui: conhecimento da estrutura-atividade; uma resposta meia-máxima de concentração inibitória (CI_{50}) $< 1 \mu\text{M}$; e IS maior que 10 vezes contra uma linhagem celular humana (KATSUNO et al., 2015a). Apesar da alta seletividade, os alcaloides 4, 5, 8 e 9 apresentaram $CI_{50} > 1 \mu\text{M}$, o que os desqualifica como

potencial HIT antimalárico. No entanto, como 4 e 5 são isômeros dos compostos 3 e 6, respectivamente, que apresentaram $CI_{50} < 1\mu M$, eles também foram selecionados para ensaios *in vivo* (juntamente com o composto 10), pois se sabe que compostos isoméricos podem apresentar diferentes atividades biológicas (LIMA, 1997).

5.4.4. Avaliação *in silico* das propriedades físico-químicas e farmacocinéticas da absorção dos alcaloides β -carbolínicos

Devido aos baixos valores de CI_{50} e alta seletividade, decidimos avaliar a predição *in silico* dos parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos de absorção para avaliar a biodisponibilidade dos alcaloides 3-6 e 10 quando administrados por via oral. Como a via oral é a principal via de administração de fármacos, é imprescindível que um candidato a fármaco apresente boa biodisponibilidade e para isto, o composto precisa ser bem absorvido para se tornar disponível na corrente sanguínea e ser entregue ao local de ação (GLEESON, 2008; LIN et al., 2003; RUIZ; SCIOLI MONTOTO, 2018).

A absorção de um fármaco pode ser prevista através de suas propriedades físico-químicas e a regra do 5 de Lipinski é um filtro importante na avaliação dessas propriedades que predizem se o composto apresentará boa biodisponibilidade quando administrado por via oral. De acordo com esta regra, o composto deve ter peso molecular ≤ 500 g/mol, coeficiente de partição octanol/água ($\log P$) ≤ 5 , número de doadores de hidrogênio (NH + OH) ≤ 5 e número de aceitadores de hidrogênio (N + O) ≤ 10 (LIPINSKI et al., 1997).

A plataforma online SwissADME (DIANA et al., 2017) fornece informações sobre as propriedades físico-químicas de um composto por meio de sua estrutura molecular ou da notação SMILES (sistema simplificado de entrada de linha de entrada molecular) da molécula. Por meio dessas propriedades, aplica-se a regra do 5 de Lipinski, que estabelece que os candidatos a fármacos podem ter baixa absorção e permeabilidade se violarem pelo menos duas regras.

As propriedades físico-químicas dos alcaloides, determinadas pelo SwissADME, encontram-se dispostas na tabela 16 e é possível inferir que todos os compostos em estudo apresentaram $\log P < 5$ e $MW < 500$, demonstrando bom equilíbrio hidrofílico-lipofílico e peso molecular dentro da faixa ideal para

permitir distribuição e absorção adequadas pelas membranas plasmáticas. Além disso, todos os compostos apresentaram um número adequado de doadores a aceitadores de ligações de hidrogênio, de acordo com a Regra dos 5 de Lipinski, o que sugere boa biodisponibilidade oral.

Tabela 16: Avaliação *in silico*, através da regra dos 5 de Lipinski, das propriedades físico-químicas dos alcaloides β -carbolínicos e da cloroquina. Resultados obtidos pelo programa *SwissADME online*.

Composto	MM	LogP	nON	nOHNH	NV
3	336,38	2,81	4	2	0
4	336,38	2,80	4	2	0
5	340,80	3,35	3	2	0
6	340,80	3,33	3	2	0
10	334,37	3,50	4	1	0
CQ	319,87	4,15	2	1	0

MM: massa molecular; Log P: Coeficiente de partição; nOH: número de aceptores de hidrogênio; nOHNH: número de doadores de hidrogênio; NV: número de violações à regra de Lipinski. Fonte: resultados obtidos através da plataforma *SwissADME*.

Quando um fármaco administrado por via oral se dissolve no trato gastrointestinal, deve ser suficientemente permeável através das membranas biológicas presentes para entrar na circulação sistêmica. Como todos os compostos foram ativos nos experimentos de quimioterapia *in vitro*, procedemos com sua análise farmacocinética (Tabela 17) usando o software *AdmetSar 2.0* (CHENG et al., 2012). A partir dos resultados obtidos, observou-se que todos os alcaloides avaliados apresentaram $TPSA < 140 \text{ \AA}^2$, o que é preditivo de boa absorção (ALI et al., 2012; PARAMASHIVAM et al., 2015). Corroborando com essa informação, a previsão *in silico* dos alcalóides mostrou alta permeabilidade nas células *Caco-2*, epitélio intestinal e barreira hematoencefálica, sugerindo que os compostos têm alta probabilidade (> 95%) de serem absorvidos pelo intestino humano e atingirem a circulação sistêmica além de serem capazes de atravessar a barreira hematoencefálica. Uma vez que a análise das propriedades ADME dos alcaloides β -carbolínicos sugere boa biodisponibilidade oral, bem como boa absorção por membranas biológicas, apresentando perfil farmacocinético

semelhante ao da CQ, todos os compostos foram selecionados para ensaios *in vivo* de atividade antiplasmodial.

Tabela 17: Avaliação *in silico* das propriedades farmacocinéticas de absorção dos alcaloides β -carbolínicos e da cloroquina através do programa AdmetSar.

Composto	TPSA	EIH (p)	Caco-2 (p)	BHE (p)
3	63,35Å ²	+ (0.98)	+ (0.84)	+ (0.95)
4	63,35Å ²	+ (0.98)	+ (0.84)	+ (0.95)
5	54,12Å ²	+ (0.98)	+ (0.87)	+ (0.97)
6	54,12Å ²	+ (0.98)	+ (0.87)	+ (0.97)
10	56,37Å ²	+ (0.99)	+ (0.82)	+ (0.96)
CQ	28,16Å ²	+ (0.99)	+ (0.66)	+ (1.00)

TPSA: área superficial polar topológica; EIH: epitélio intestinal humano; Caco-2: células de adenocarcinoma de cólon humano; BHE: barreira hematoencefálica; Sinal “+” indica que o composto é permeável ao modelo; (p): probabilidade de ocorrer o evento. Fonte: resultados obtidos através da plataforma AdmetSar.

5.4.5. Avaliação *in vivo* da Atividade Antimalárica dos Alcaloides β -carbolínicos

5.4.5.1. Teste antiplasmodial curativo

Para os testes *in vivo*, inicialmente foi realizado o experimento curativo, no qual os derivados dos alcaloides 3, 4, 5, 6 e 10 foram testados por via oral (10 mg/kg) por cinco dias, iniciando o tratamento no 3º dpi, após o aparecimento do primeiro EI. A recomendação para eficácia *in vivo* é que um composto líder (LEAD) deve atingir a eliminação do parasito em uma dose que erradique 90% do patógeno alvo quando administrado por via oral (<50 mg/kg) nos estágios sanguíneos da infecção (tipicamente quatro doses em 4 dias) no modelo de malária murina grave (KATSUNO et al., 2015a).

Conforme mostrado na Tabela 18, a parasitemia média dos camundongos infectados e tratados com os compostos 4, 6 e 10 foi estatisticamente menor do que o grupo não tratado no 5º dpi (teste de Tukey, $p < 0,05$). Da mesma forma,

não foi observada diferença na proporção de parasitos circulantes nos grupos tratados com os alcaloides 4, 6 e 10 em relação ao antimalárico padrão no 5º dpi (Tukey Test, $p > 0,05$). No entanto, no 7º dpi a parasitemia média observada para todos os alcaloides testados foi equivalente à observada para o grupo não tratado (Tabela 19), sugerindo perda de eficácia.

Tabela 18: Valores da redução da parasitemia no 5º e 7º dias pós infecção após teste curativo com os alcaloides β -carbólicos (10mg/Kg) ou com a Cloroquina (10mg/Kg).

Composto	Dose (mg/Kg)	Parasitemia \pm DP (% IMP)		n
		5º dpi	7º dpi	
3	10	1.87 \pm 1,02 ^b (41,19)	7.50 \pm 2.49 (0)	10
4	10	0.79 \pm 0,63 ^{a,b} (75,16)	5.48 \pm 3.64 (20,00)	10
5	10	5.00 \pm 1,59 (0)	7.20 \pm 4.57 (0)	10
6	10	1.13 \pm 0,48 ^{a,b} (64,36)	5.48 \pm 3.27 (0)	10
10	10	1.02 \pm 0,93 ^{a,b} (67,92)	8.37 \pm 2.26 (0)	10
CQ	10	0.24 \pm 0,05 ^a (96,5)	0.21 \pm 0.27 ^a (96.1)	09
Água	-	3.18 \pm 2,68	6.85 \pm 2.57	13

dpi= dia pós infecção; CQ: Cloroquina; Água: Grupo infectado Não Tratado (PbA) DP=Desvio Padrão.

^a = valor $p < 0.05$ (comparado ao grupo tratado com água)

^b = valor $p > 0.05$ (comparado ao grupo tratado com CQ)

Camundongos C57BL/6 infectados com PbA, sem qualquer tratamento, desenvolvem sinais neurológicos (comportamento exploratório reduzido, reflexo diminuído, autopreservação, coma e epilepsia) resultando em morte entre os dias 6 e 11 p.i. (HE et al., 2014; JIANG et al., 2020; MEDANA; HUNT; CHAN-LING, 1997) o que foi consistente com os resultados obtidos neste estudo (Figura 32A-C). No entanto, os animais tratados com o alcaloide 4 foram resistentes ao desenvolvimento de MC, pois 90% deles permaneceram vivos até o 14º dpi (Figura 32A-C). Em contraste, apenas 30% dos animais tratados com seu isômero sobreviveram até o 14º dpi sem demonstrar qualquer sinal de MC. O tratamento com o composto 10 também foi capaz de prevenir o desenvolvimento

de MC em 70% (Figura 32A-C) dos animais. Não foi observado efeito protetor contra o desenvolvimento do MC quando os animais foram tratados com os alcalóides 5 e 6. Na Figura 32D-E é possível observar extensas áreas de hemorragia craniana nos animais que não foram protegidos do MC, seguindo ou não o tratamento com compostos. Em consonância com a avaliação clínica, os camundongos que desenvolveram MC apresentaram nítidas áreas hemorrágicas que puderam ser observadas macro (Figura 32D-E) e microscopicamente (Figura 33A-C) bem como áreas de obstrução vascular (Figura 33C e D). Por outro lado, camundongos protegidos contra MC não apresentaram danos cerebrais nem macro (Figura 32F-G) nem microscopicamente (Figura 33E-F).

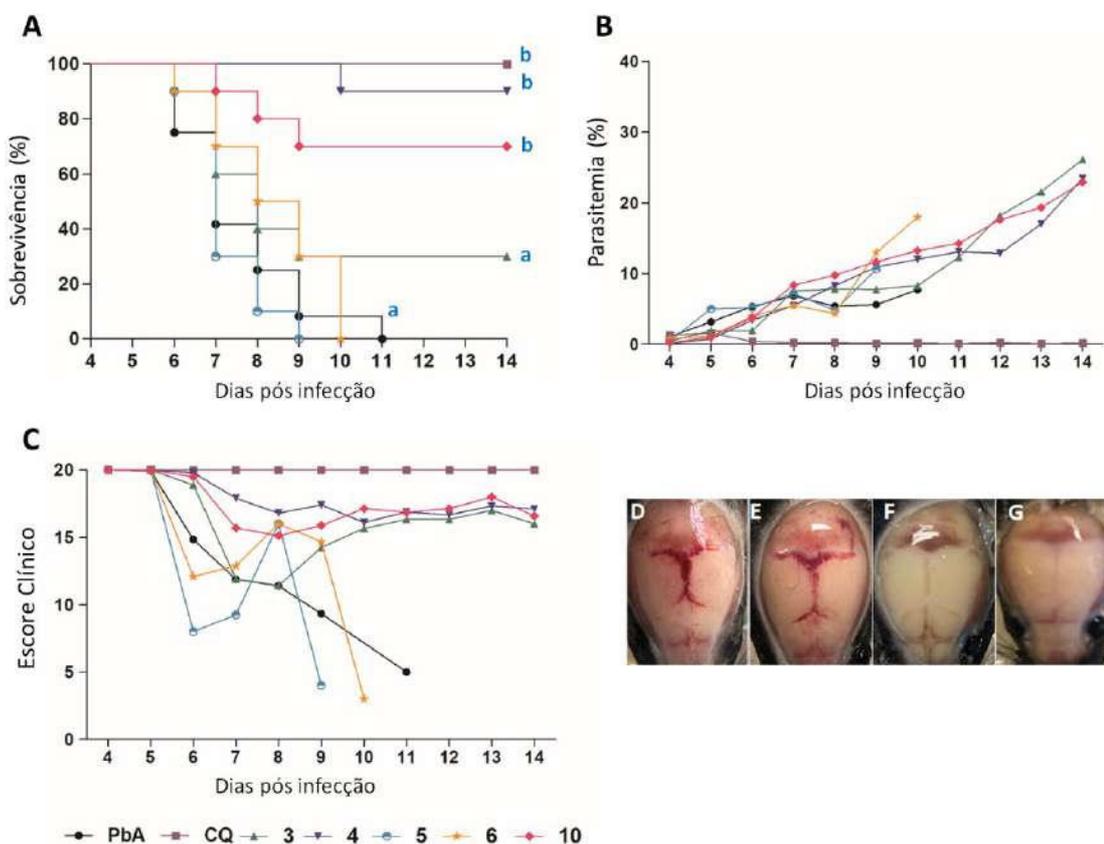


Figura 32: Efeito do tratamento curativo com alcalóides β -carbolínicos (10 mg/kg) em parâmetros distintos de camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA. (A) alcalóides β -carbolínicos 4 e 10 prolongaram significativamente a sobrevivência de camundongos inibindo o desenvolvimento de MC; (B) Efeito de alcalóides de β -carbolínicos na parasitemia de camundongos infectados com PbA; (C) Escore Clínico (D-G) Análise macroscópica do cérebro: (D) Animais infectados com PbA, (E) PbA infectados e tratados com alcalóides β -carbolínicos que desenvolveram MC, (F) PbA infectados e tratados com cloroquina e (G) PbA infectado e tratado com alcalóides β -carbolínicos e protegidos contra MC. Letras iguais (a ou b) não indicam diferença significativa (valor de $p > 0,05$ (ANOVA + Pós-teste Tukey) e letras diferentes (a ou b) indicam diferença significativa (valor de $p < 0,05$ (ANOVA + pós-teste de Tukey). **a** = valor $p < 0,05$ (comparado ao grupo tratado com água); **b** = valor $p > 0,05$ (comparado ao grupo tratado com CQ) (Teste Tukey).

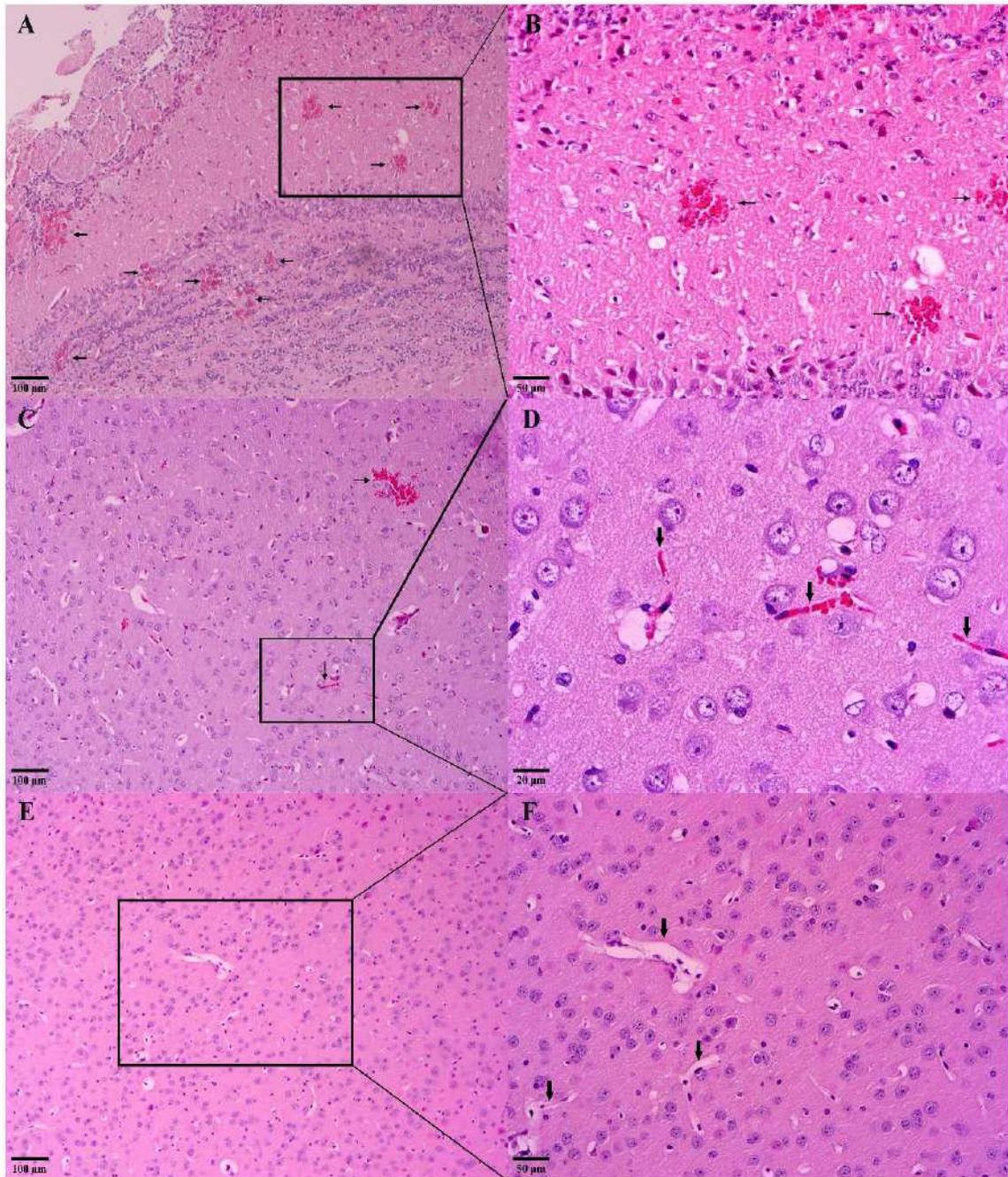


Figura 33: Imagens de cortes histológicos de tecido cerebral corados com hematoxilina-eosina (HE). (A-D) Corte histológico representativo do cérebro de animais que não receberam tratamento. (A-B) Animais infectados apenas com PbA: seta preta mostra área hemorrágica; (C-D) Animais infectados apenas com PbA: seta preta mostra área hemorrágica e obstrução vascular; (E-F) Representação esquemática de corte histológico do cérebro de animais que receberam tratamento e não desenvolveram MC, independente do composto (10mg/kg); (F) Animais infectados e tratados com PbA: seta preta mostra ausência de obstrução vascular.

5.4.5.2. Teste antiplasmodial supressivo

Considerando que o tratamento curativo com os alcaloides 4 e 10 foi capaz de proteger contra MC, mas não impediu o crescimento parasitário,

realizamos o teste supressivo, utilizando ambos os compostos e o isômero correspondente, para avaliar se o método de tratamento poderia influenciar na eficácia das drogas. Para isso, quatro horas após a infecção, os animais foram tratados oralmente com os alcaloides e este tratamento foi mantido por cinco dias nas mesmas doses do regime de tratamento curativo (10 mg/kg). À partir do 4º dpi (último dia de tratamento), os animais foram acompanhados quanto à parasitemia sanguínea, escore clínico e sobrevivência.

Conforme visto na Tabela 19, a parasitemia de camundongos infectados e tratados em regime supressivo com composto 10 foi estatisticamente menor do que o grupo não tratado no 5º dpi (teste de Tukey, $p < 0,05$). No entanto, o potencial IMP não foi sustentado nos dias subsequentes e no 7º dpi o grupo tratado com o alcaloide 10 apresentou redução de quase 50% no potencial IMP em relação ao 5ºdpi. Mesmo assim, este composto ainda pode ser considerado ativo neste momento do estudo. O alcaloide 4, apesar de ter apresentado um potencial IMP de 40% no 5º dpi, não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo não tratado, mas infectado. Já seu isômero, o alcaloide 3, não foi eficaz em inibir o crescimento do parasito em regime de tratamento supressivo. Esse resultado sugere a total ineficácia dos alcaloides 3 e 4 na redução da parasitemia quando administrados em regime supressivo.

Tabela 19: Valores da redução da parasitemia no 5º e 7º dias pós infecção após teste supressivo com alcaloides β -carbolínicos (10 mg/Kg).

Composto	Dose (mg/Kg)	Parasitemia \pm DP (% Redução)		n
		5º dpi	7º dpi	
3	10	3,56 \pm 2,57 (0)	7,96 \pm 3,26 (0)	10
4	10	1,88 \pm 2,46 ^b (40,88)	6,18 \pm 4,75 (9,78)	10
10	10	0,57 \pm 0,94 ^{a,b} (82,07)	3,72 \pm 3,93 ^b (45,69)	10
CQ	10	0,24 \pm 0,05 ^a (96,5)	0,21 \pm 0,27 ^a (96,1)	9
Água	-	3,18 \pm 2,68	6,85 \pm 2,57	13

dpi= dia pós infecção; CQ: cloroquina; Água = Grupo infectado não tratado (PbA); DP=Desvio Padrão

^a = valor $p < 0.05$ (comparado ao grupo tratado com água)

Os tratamentos supressivos com os alcaloides 3 e 10 também foram capazes de inibir o desenvolvimento de MC de forma mais eficiente do que os

curativos (Figura 34A-C). Entretanto, no regime de tratamento supressivo, o alcaloide 4 apresentou redução na taxa de proteção contra MC em relação ao experimento curativo, embora tenha continuado significativa, protegendo 60% dos animais (Figura 34A). Todos os animais pertencentes ao grupo controle não tratado (PbA) desenvolveram MC entre o 6º e o 11º dpi, evidenciado por parasitemia média inferior a 10% (Figura 34B), escore clínico médio ≤ 8 (Figura 34C), e presença de hemorragia cerebral observada macroscopicamente (Figura 34D-E).

Dentre as várias classes de alcaloides existentes, destacam-se os alcaloides indólicos, que são a maior classe encontrada na natureza. São derivados do aminoácido triptofano, que, por descarboxilação, forma triptamina e dá origem a seis subclasses de alcalóides indólicos por meio de variadas vias biossintéticas, incluindo β -carbolinas e quinolinas (DEWICK, 2002; RYAN; DRENNAN, 2009). A importância dos alcaloides no tratamento da malária vem de longe, desde a descoberta do primeiro antimalárico (TALISUNA; BLOLAND; D'ALESSANDRO, 2004). Originário da espécie *Cinchona calisaya*, a quinina foi isolado e caracterizado como uma substância ativa, cuja estrutura química é composta principalmente de um alcalóide, que é responsável por sua atividade antimalárica (ACHAN et al., 2011; ANDRADE-NETO et al., 2003).

A partir do anel quinolínicos da quinina, foram sintetizados diversos antimaláricos, entre eles a cloroquina, que foi o principal fármaco amplamente utilizado no tratamento da malária grave e não grave [48]. Apesar da conhecida atividade antimalárica dos alcaloides quinolínicos, outra subclasse de alcaloides indólicos, as β -carbolinas, vem se destacando, pois alguns estudos demonstraram sua eficácia contra *Plasmodium sp.* *in vitro* e *in vivo* (ALMOLHIM et al., 2022; FIOT et al., 2006; GORKI et al., 2020; JAROMIN et al., 2021; MATHEW et al., 2022; POJE et al., 2022; TAKASU et al., 2005; YAO et al., 2015; YENJAI et al., 2000).

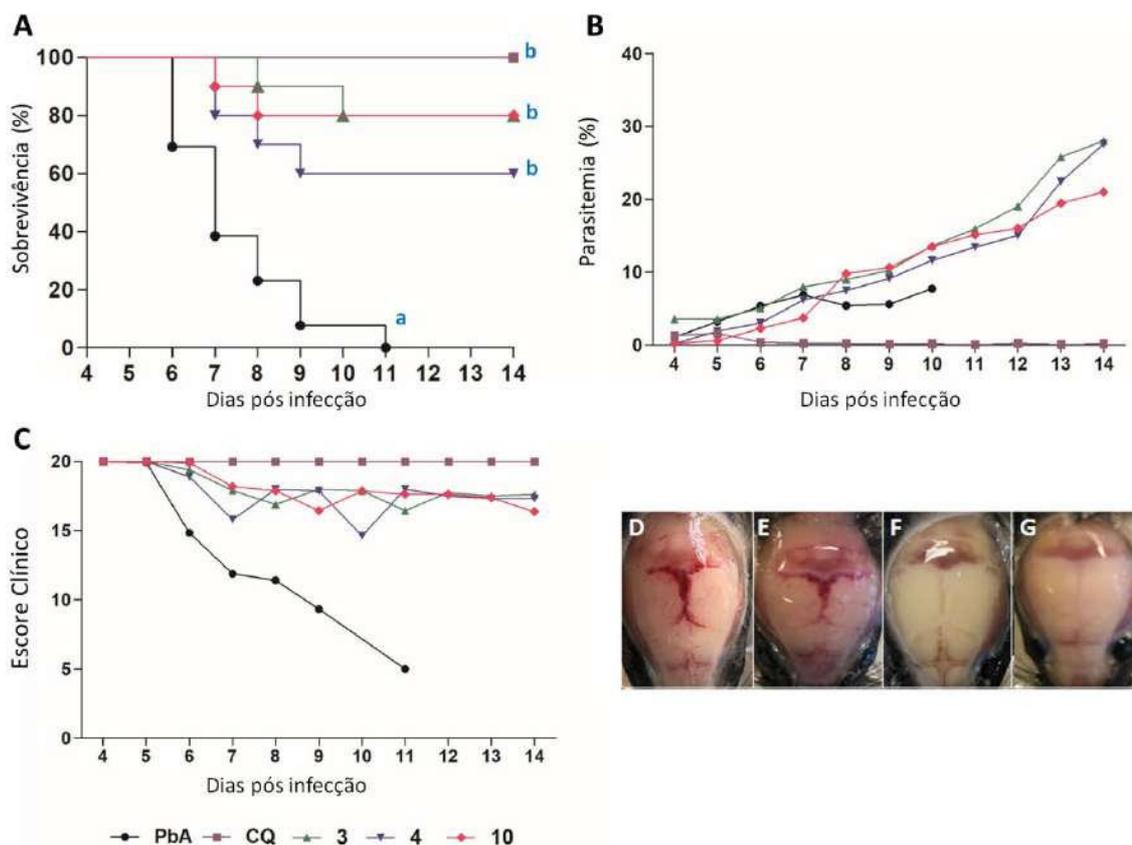


Figura 34: Efeito do tratamento supressivo com alcalóides de β -carbolínicos (10 mg/kg) em parâmetros distintos de camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA. (A) alcalóides β -carbolínicos prolongaram a sobrevivência de camundongos inibindo o desenvolvimento de MC; (B) Efeito de alcalóides β -carbolínicos na parasitemia de camundongos infectados com PbA; (C) Escore Clínico (D-G) Análise macroscópica do cérebro: (D) Animais infectados com PbA, (E) PbA infectados e tratados com alcalóides β -carbolínicos que desenvolveram MC, (F) PbA infectados e tratados com cloroquina e (G) PbA infectado e tratado com alcalóides β -carbolínicos e protegido contra MC. Letras iguais (a ou b) não indicam diferença significativa (valor de $p > 0,05$ (ANOVA + Pós-teste Tukey) e letras diferentes (a ou b) indicam diferença significativa (valor de $p < 0,05$ (ANOVA + pós-teste de Tukey).

Alguns derivados de β -carbólinas foram ativos *in vitro* contra cepas sensíveis ou multirresistentes ao *P. falciparum*, apresentando valores baixos de CI_{50} e importantes IS (GORKI et al., 2020; TAKASU et al., 2005). No entanto, esses estudos encontraram valores de CI_{50} , tanto para cepas sensíveis quanto resistentes, superiores aos nossos compostos. Em ensaios *in vivo*, ambos os estudos usaram um modelo de malária não grave induzida por *P. berghei* NK65 com um regime de tratamento supressivo e encontraram alguma redução na parasitemia.

A supressão da parasitemia encontrada por Gorki, et al. (2020) no 5º dpi variou de 40,49% a 91,19% para doses de 10 e 100mg/kg, respectivamente. Em nosso estudo, encontramos um percentual de redução de 82,07% e 67,92% no 5º dpi, para o composto 10, no regime de tratamento supressivo e curativo, respectivamente, na dose de 10mg/kg, em modelo experimental de malária cerebral, que sugere melhor potencial antimalárico do que os outros alcaloides β -carbolínicos previamente testados (GORKI et al., 2020; TAKASU et al., 2005). É interessante notar que um derivado do antimalárico MMV008138 foi eficaz *in vivo* no modelo de malária em camundongos, embora este seja o primeiro relato a descrever a proteção de β -carbolinas contra MC (MATHEW et al., 2022).

Assim, o alcalóide 10 se destacou frente aos demais compostos sendo capaz de proteger, pelo menos, 60% dos animais contra o desenvolvimento de MC tanto no regime curativo quanto no supressivo. Considerando que a MC está relacionada a um processo inflamatório exacerbado, buscou-se investigar se o alcaloide 10 possui atividade anti-inflamatória por redução do óxido nítrico (NO).

5.4.6. Avaliação, *in silico* e *in vitro*, do potencial de inibição da síntese de NO

5.4.6.1. Avaliação da produção de NO

Para tanto, avaliamos, *in vitro*, a produção de NO por macrófagos peritoneais murinos estimulados com LPS + TNF e tratados com o alcaloide 10 em diferentes concentrações (Figura 35). No entanto, para garantir que uma redução na produção de NO fosse resultado de uma inibição dessa via pelo composto teste e não por uma redução de macrófagos devido a um possível efeito tóxico do composto contra essas células, primeiro realizamos o ensaio MTT em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.

Os resultados demonstraram que o alcaloide 10 não apresenta toxicidade para as células testadas, pois não foi observada diferença estatística em nenhuma das concentrações testadas em relação ao controle de viabilidade celular (Figura 35A). Após investigação da viabilidade celular, a atividade anti-inflamatória do composto 10 foi avaliada através da dosagem de NO (Nitrito equivalente). Os resultados mostraram que o composto 10 foi capaz de reduzir os níveis de NO em todas as concentrações testadas ($P < 0,05$) (Figura 35B).

Além disso, as concentrações de 150 e 74 μ M foram consideradas estatisticamente semelhantes ao grupo basal ($P > 0,05$) (Figura 35B).

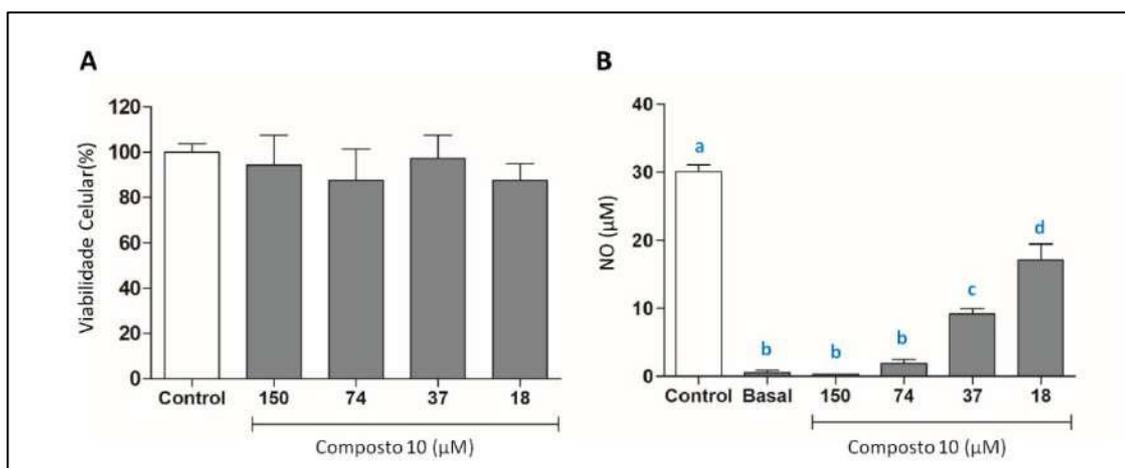


Figura 35: Viabilidade celular e atividade anti-inflamatória do composto 10. A) Ensaio de MTT realizado em macrófago peritoneal murino. B) Dosagem do nível de nitrito. Controle: células estimuladas com LPS e IFN- γ ; Basal: Células sem estimulação. Os resultados foram expressos como média \pm DP de três experimentos independentes. Letras iguais (a, b, c ou d) não indicam diferença significativa (valor de $p > 0,05$ (ANOVA + Pós-teste Tukey)). Letras diferentes (a, b, c ou d) indicam diferença significativa (valor de $p < 0,05$ (ANOVA + Pós-teste) Tukey).

O óxido nítrico (NO) é uma molécula sinalizadora, produzida por uma família de enzimas óxido nítrico sintase (NOS), que atua em múltiplas funções no organismo (KHAZAN; HDAYATI, 2014). Fisiologicamente, o NO é produzido em baixas concentrações (iNOS – 2 a 200nM), e em condições patológicas pode atingir concentrações micromolares (BROWN, 2010). Nesse contexto, seu papel é amplamente discutido e parece ser controverso, podendo proporcionar benefícios ou efeitos deletérios, dependendo do tempo de exposição, quantidade de produção e local biológico onde é liberado (BRUNET, 2001).

Existem três isoformas da enzima NOS, mas a forma induzível (iNOS) é observada na membrana da célula com função imune, como macrófagos e micróglia, cuja expressão é ativada em processos inflamatórios (BOGDAN, 2015; KHAZAN; HDAYATI, 2014; YUSTE et al., 2015). Em infecções parasitárias como a malária, o NO tem sido descrito como uma molécula importante, sendo produzido em grande quantidade pela iNOS em resposta ao estímulo do patógeno e citocinas pró-inflamatórias (FORSTERMANN; SESSA, 2012; WINK et al., 2011).

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS/NOS) são produzidas durante o MC e o aumento dessas substâncias está associado ao desenvolvimento de MC em humanos (AL YAMAN et al., 1996; PERCÁRIO et al., 2012). Alguns autores sugerem que o NO tem efeito citotóxico, sendo capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e interferir na neurotransmissão, liberando grandes quantidades de glutamato durante o processo excitotóxico (FUJIKAWA, 2015; IDRO et al., 2010; LAI; ZHANG; WANG, 2014). O resultado desse processo é a liberação de ROS/NOS, promovendo a morte neuronal e contribuindo assim para casos de perda de consciência ou coma reversível (FUJIKAWA, 2015; LAI; ZHANG; WANG, 2014).

Através dos resultados encontrados foi possível observar que o composto 10 reduziu significativamente os níveis de NO em macrófagos estimulados, mostrando que é um bom candidato a droga para o controle da inflamação.

5.4.6.2. Avaliação da interação com iNOS por simulações de docking molecular

Para entender como o composto 10 pode levar à redução do NO, realizamos docking molecular no iNOS. Primeiramente, realizamos o redocking para o ligante cristalográfico presente na enzima (RMSD = 0,972) (Figura 36A) e foi observado que este composto apresentou alta afinidade para o sítio catalítico (-9,9 kcal/mol) e pôde interagir com o Resíduo TYR 367B por ligação de hidrogênio (Figura 36B). Após essa etapa, realizamos análise *in silico* para o composto 10 e mostramos que ele tem a capacidade de interagir com os resíduos Glu 371 e ARG 260 por meio de ligações de hidrogênio e apresenta um valor de energia de inibição promissor (-9,6 kcal/mol) (Figura 36C e D).

A óxido nítrico sintase induzível (iNOS) é uma proteína heme que requer tetrahydrobiopterina (H4B) para sua atividade (GHOSH et al., 1999). Entre os resíduos do sítio ativo, o resíduo Glu371 desempenha um dos papéis mais importantes, sendo crítico para a ligação do substrato nesta enzima (CRANE et al., 1998). Assim, a interação do composto 10 com um resíduo do sítio catalítico da iNOS pode ser o motivo de sua inibição e também dos resultados encontrados pela dosagem de NO.

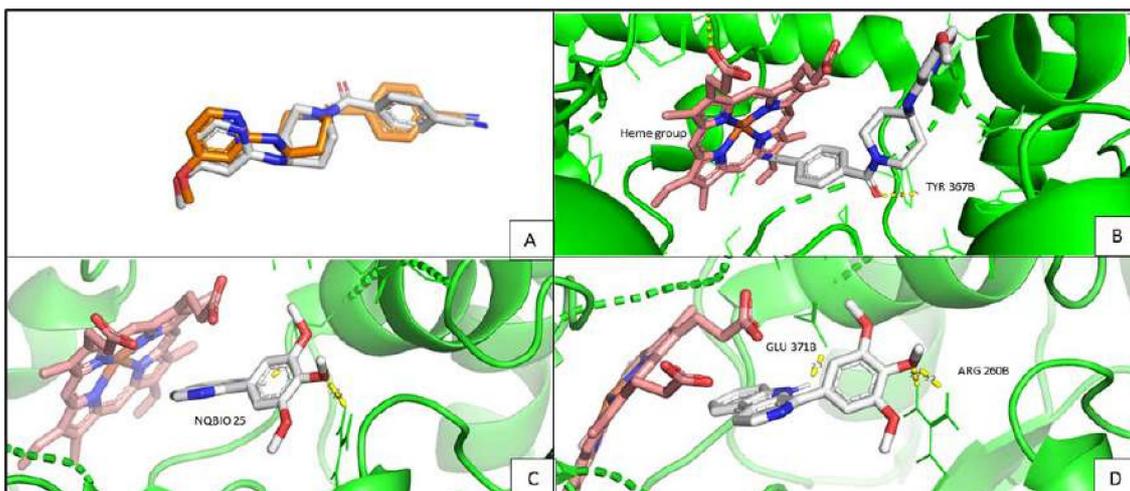


Figura 36: Avaliação da interação do composto 10 com os resíduos do sítio ativo iNOS de *Mus musculus*. A) Redocking do ligante cristalográfico presente no sítio ativo da iNOS. B) Interação do ligante cristalográfico no sítio ativo da iNOS por ligação de hidrogênio com o resíduo TYR 367B (linhas tracejadas amarelas). C) Docking molecular do composto 10 no sítio iNOS. D) Interação do composto 10 dentro do sítio ativo da iNOS por pontes de hidrogênio com os resíduos GLU 371 e ARG 260.

5.5. CONCLUSÃO

Em resumo, dentre todos os compostos testados destacamos o composto 10, pois: a) as previsões *in silico* sugerem que este composto pode causar a morte do parasito pela inibição do PfFNR; b) foi capaz de inibir o crescimento do parasito tanto *in vitro* quanto *in vivo*; c) foi capaz de proteger camundongos contra o desenvolvimento de MC; d) mostrou um bom potencial de interação com a iNOS, levando à redução da síntese de NO, que pode ser uma das vias de proteção contra a MCE.

6. DISCUSSÃO GERAL

Neste estudo, hipotetizamos que compostos derivados de aminoquinolinas e alcaloides β -carbolínicos são ativos contra *Plasmodium* sp *in vitro* e *in vivo*. Para verificar essa hipótese, os compostos sintéticos foram testados contra a cepa de *P. falciparum* W2. Como esperado, todos os compostos testados apresentaram atividade antiplasmodial demonstrando CI_{50} variando entre 0,27 – 141,74 μ M.

Na última década, extensas pesquisas sobre os dois principais patógenos causadores da doença (*P. falciparum* e *P. vivax*) ajudaram a estabelecer alguns critérios muito específicos para obtenção de sucesso na pesquisa de medicamentos antimaláricos (WELLS; VAN HUIJSDUIJNEN; VAN VOORHIS, 2015). Mais de 5 milhões de compostos foram selecionados contra os estágios sanguíneos assexuados de *P. falciparum* e a potência de corte *in vitro* tem sido principalmente em torno de 1–2 μ M (KATSUNO et al., 2015). Sendo assim, a atividade antiplasmodial *in vitro* do derivado quinolínico 3 e dos alcaloides β -carbolínicos (3, 4, 5, 6 e 10) atinge ao critério estabelecido para HITs (compostos bioativos) antimaláricos com uma concentração inibitória (CI_{50}) <1-2 μ M.

Naturalmente, a atividade deve ser confirmada com um composto puro, e os HITs devem ter seletividade 10 vezes superior para o parasito em relação a uma linhagem celular de mamífero (KATSUNO et al., 2015). Para isso, os compostos foram testados contra a linhagem de fibroblasto de pulmão humano (WI-2VIA4) e nenhum deles apresentou toxicidade até a máxima concentração testada (100 μ M). Entretanto, ao calcular o IS, encontramos valores variando entre >0,7 a >370. Tendo em vista que o IS é calculado pela diferença entre o CI_{50} e CC_{50} , os baixos valores de IS (<10) encontrados para os derivados quinolínicos 1, 4, 5, 6 e 7 justificam-se pelo elevado valor de CI_{50} determinado para esses compostos. Apesar dos derivados quinolínicos 2 e 8 apresentarem $IS > 10$ (>10 e >11, respectivamente), os mesmos não atendem ao critério estabelecido para a concentração inibitória, sendo por isso, desclassificados como potenciais HITs antimaláricos.

Apesar do ponto de corte para a CI_{50} variar entre valores menores que 1-2 μ M, Katsuno e colaboradores (2015), ao reunirem esses critérios, determinaram que um potencial HIT antimalárico deve apresentar CI_{50} inferior a

1 μM para cepas sensíveis e resistentes de *P. falciparum*. Sendo assim, somente o derivado quinolínico 3, bem como os alcaloides 3, 6 e 10 atendem a estes critérios, sendo portanto selecionados para os demais ensaios de triagem pré-clínicos. Entretanto, os alcaloides 4 e 5 também foram selecionados, visto que ambos são diastereoisômeros dos alcaloides 3 e 6, respectivamente.

Diastereoisômeros são estereoisômeros cujas moléculas possuem diferentes arranjos espaciais de seus ligantes, porém não são imagens especulares sobreponíveis umas das outras (ELIEL; WILEN, 1994; SOLOMONS; FRYHLE, 2000). Não é possível ver a diferença entre esses isômeros somente analisando a fórmula estrutural plana, porque eles possuem o mesmo tipo de cadeia carbônica, o mesmo grupo funcional, a mesma insaturação e o mesmo substituinte ou heteroátomo, diferenciando apenas nas fórmulas estruturais espaciais (ORLANDO et al., 2007).

Os diastereoisômeros tem diferentes propriedades físicas e químicas e apresentam efeito fisiológico distinto (LIMA, 1997). A discriminação estereosseletiva de dois diastereoisômeros por receptores biológicos deve-se à interação espacial-específica fármaco-receptor, explicada pela teoria dos três pontos, proposta por Easson e Stedman e, segundo a qual, somente um dos diastereoisômeros é capaz de apresentar três pontos de interação complementares, dispostos espacialmente de tal maneira que possam se ligar ao receptor, promovendo o efeito máximo (SOLOMONS; FRYHLE, 2000; BARREIRO; FRAGA, 2001;). Dada essa característica de diferente interação biológica, selecionamos também os compostos 4 e 5 para continuidade dos ensaios de triagem pré clínica.

Outro critério desejável para um HIT é o conhecimento preliminar da relação estrutura-atividade (KATSUNO et al., 2015). Em química medicinal, o termo "relação estrutura-atividade" compreende o estudo dos efeitos que a estrutura química de um composto (ligante) pode causar durante sua interação com o receptor biológico e, conseqüentemente, identificar os principais fatores que medeiam esta interação (ARROIO; HONÓRIO; SILVA, 2010). Esta relação pode ser avaliada através de ensaios bioquímicos e/ou biológicos e também através de triagens computacionais. Neste trabalho utilizamos as duas metodologias para identificação dos potenciais alvos dos candidatos a fármacos.

O derivado quinolínico selecionado foi analisado através do ensaio bioquímico *in vitro* de interação com a ferriprotoporfirina (Fe(III)) PPIX). Como trata-se de um derivado de 4-aminoquinolina, hipotetizamos que o composto teste pudesse agir de forma semelhante ao fármaco referência desta classe, a cloroquina (CQ). Sabe-se que a CQ atua por inibição da formação da hemozoína, promovendo a morte do parasito (SHERMAN, 1998; SILVA et al., 2005). Durante o desenvolvimento eritrocitário os parasitos digerem a hemoglobina em seu vacúolo digestivo, gerando aminoácidos que são utilizados para a maturação do parasito. Entretanto, esse processo de digestão da hemoglobina leva à produção do grupo heme (ferroprotoporfirina IX - Fe(II)PPIX), o qual é oxidado a ferriprotoporfirina IX - Fe(III) PPIX e acumulado no vacúolo digestivo do protozoário (SHERMAN, 1977). O heme livre é altamente tóxico para os parasitos, que o convertem em hemozoína, um polímero inerte, insolúvel e inócuo ao parasito, mas tóxico ao hospedeiro (SILVA et al., 2005). A CQ atua inibindo esse processo de conversão do heme em cristais de hemozoína, promovendo a morte do parasito (SHERMAN, 1977). Através deste ensaio identificamos que o composto 3 interage com o Fe(III)PPIX de forma semelhante à CQ, potencialmente inibindo a formação de hemozoína. Sendo assim, este pode ser um possível alvo de ação do composto teste.

Os potenciais alvos dos alcaloides β -carbolínicos foram avaliados através de ensaios *in silico* usando o banco de dados BraMMT (Brazilian malária molecular targets) (NUNES et al., 2019). O BraMMT possui 35 alvos moleculares de *P. falciparum*, os quais foram construídos e avaliados contra compostos antimaláricos conhecidos, sendo capazes de prever o alvo molecular de novos medicamentos (NUNES et al., 2019). Os alvos que exibem energia de ligação com os compostos inferiores aos dos ligantes cristalográficos indicam uma ligação mais estável e, portanto, um provável sítio de interação destes (FORLI et al., 2016; NUNES et al., 2019). Dessa forma, identificamos quatro enzimas de *P. falciparum* que são potenciais alvos desses alcaloides: PfFNR, PfPK7, PfGrx1 e PfATP6.

A PfFNR (*P. falciparum* ferredoxina-NADP+-redutase) está localizada no apicoplasto do *P. falciparum* e atua transferindo um par de elétrons para a proteína ferro-enxofre-ferredoxina (Fd) (MILANI et al., 2007). O par PfFNR/Fd participa de várias vias biossintéticas no apicoplasto, realizando transferência de

elétrons do NADPH para proteínas em vias de síntese de ácidos graxos e vias isoprenóides independentes de mevalonato (BALCONI et al., 2009; LESANAVIČIUS et al., 2020). Portanto, sua inibição da PfFNR resulta na inibição da síntese de isoprenóides nos parasitos.

As demais enzimas identificadas como potenciais alvos dos alcaloides β -carbolínicos são: PfPK7 uma quinase que atua no desenvolvimento e proliferação do parasito; PfGrx1, que atua nas vias de controle do estresse oxidativo e PfATP6, que participa da homeostase do íon cálcio (KRISHNA et al., 2010).

Observamos que os compostos 3 a 6 e 8 a 10 apresentam interação com esses quatro alvos de *P. falciparum*, sugerindo que estas drogas podem estar atuando na inibição de mais de uma via metabólica, levando à morte do protozoário (GUGGISBERG; AMTHOR; ODOM, 2014).

Por fim, o último critério exigido para classificar um composto como HIT é o “druglikeness”. “Druglikeness” é um conceito qualitativo usado no design de drogas para determinar o quão semelhante a droga uma substância é em relação a fatores como biodisponibilidade (TIAN et al., 2015; URSU et al., 2011). O druglikeness é estimado a partir da estrutura molecular dos compostos, através de softwares durante a triagem *in silico* (KATSUNO et al., 2015b; TIAN et al., 2015; URSU et al., 2011). Para isso, a molécula deve passar por filtros básicos de semelhança a drogas (drug-like), sendo preferida a conformidade com a “regra dos cinco” de Lipinski (LIPINSKI, 1997; KATSUNO et al., 2015).

Em 1997, Christopher A. Lipinski e colaboradores, trabalhando para a Indústria Farmacêutica Pfizer, realizaram um estudo com mais de 2000 fármacos, no qual observaram que algumas propriedades físico-químicas eram necessárias para que as drogas apresentassem boa solubilidade em água e permeabilidade intestinal, características essenciais para a disponibilidade oral. Os resultados alcançados pelo estudo gerou a chamada “regra dos cinco de Lipinski”, a qual tem o intuito de auxiliar os químicos medicinais nas decisões relacionadas às modificações moleculares e, assim, reduzir o número de compostos sintetizados com propriedades físico-químicas indesejadas. De acordo com esta regra, a má absorção ou permeação é mais provável quando a molécula possui mais que 5 doadores de ligação de hidrogênio, mais que 10 aceptores de ligação de hidrogênio, peso molecular maior do que 500 daltons e

log P calculado (Clog P) maior do que 5, sendo todos os parâmetros múltiplos de cinco.

Atendendo a esta recomendação, todos os compostos em estudo foram avaliados quanto às propriedades físico-químicas, sendo aplicada à elas a regra dos cinco de Lipinsk. Através dessa análise, somente um derivado quinolínico (composto 8) não apresentou propriedades preditivas para boa biodisponibilidade via oral, visto que houve violação à duas regras de Lipinsk, sendo elas a massa molar e o LogP. Para complementar esta análise, foi procedida a predição *in silico* de parâmetros farmacocinéticos de absorção, os quais também se mostraram favoráveis. Dessa maneira, com exceção do derivado quinolínico 8, os demais compostos, de ambas as classes testadas, foram classificados como substâncias “drug-like” estando aptos para o seguimento na triagem pré-clínica.

Em conjunto, esses resultados destacam o derivado quinolínico 3 e os alcaloides β -carbolínicos 3, 4, 5, 6 e 10, os quais atingem ao conjunto de critérios estabelecido para HITs antimaláricos, que inclui: conhecimento da estrutura-atividade; uma concentração inibitória (CI_{50}) $<1 \mu\text{M}$; IS 10 vezes superior contra uma linhagem de células humanas; e características físico-químicas semelhante a drogas (KATSUNO et al., 2015). Sendo assim, essas moléculas foram selecionadas para os estudos *in vivo*.

Nesta etapa, hipotetizamos que os compostos selecionados, através das triagens *in silico* e *in vitro* apresentam atividade antimalárica protegendo camundongos contra malária cerebral (MC), a síndrome mais letal dentro do contexto da gravidade da doença. Para isso, fêmeas de camundongos C57BL/6 foram infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) para induzir o modelo de malária cerebral experimental (MCE). Os animais foram divididos em grupos experimentais os quais foram tratados com as respectivas drogas teste, ou droga padrão e o grupo controle foi infectado e não tratado. Os grupos experimentais foram tratados via oral, por cinco dias, com início no 3° dia pós infecção (dpi), após o surgimento dos primeiros eritrócitos infectados (EI).

Como esperado, os animais não tratados desenvolveram sintomas neurológicos caracterizados por inatividade, ataxia, tremor e perda da função motora culminando em 100% de morte entre o 6° e 11° dpi. Este achado está de acordo com a literatura onde MC induzido em modelo murino reflete dano

acentuado no SNC com conseqüente morte, além da presença de áreas hemorrágicas macro e microscopicamente (Bagot et al., 2002; Carroll et al., 2010).

Os animais tratados com o derivado quinolínico, nas três dosagens (15, 30 e 50mg/Kg) apresentaram consideráveis taxas de sobrevivência (90, 70 e 100%) durante a janela de MC, sendo protegidos contra o desenvolvimento desta forma grave da infecção. Embora o composto não tenha promovido a eliminação completa dos parasitos circulantes, ela foi estatisticamente inferior em relação ao grupo não tratado no 7º dpi (Tukey Test, $p < 0,05$) e a inibição da multiplicação do parasito (IMP) foi de até 92%. Apesar da redução na IMP, essa diferença estatística foi mantida para as doses de 30 e 50mg/kg no 8º e 9º dpi, mas não para 15 mg/kg no 9º dpi.

O experimento *in vivo* com os alcaloides β -carbolínicos também resultou em 100% de mortalidade entre o 6º e 11º dpi dos animais não tratados com desenvolvimento sintomas neurológicos compatíveis com a MC e observação de áreas hemorrágicas macro e microscopicamente (Bagot et al., 2002; Carroll et al., 2010). Os animais que receberam os alcaloides (10mg/Kg), também demonstraram altas taxas de sobrevivência (90 e 70%), no 5º dpi, nos grupos tratados com os compostos 4 e 10, respectivamente, bem como proteção contra o desenvolvimento da MC. Entretanto, a redução da parasitemia foi inferior àquela observada para o derivado quinolínico 3, com valores de IMP variando entre 0 a 75% (entre os 5 compostos testados).

Devido a estes resultados, selecionamos os alcaloides 10 e 4, bem como seu isômero (3), os quais apresentaram melhores resultados de IMP e sobrevivência, para conduzirmos o experimento supressivo. Observamos resultados semelhantes ao esquema curativo quanto às taxas de sobrevivência dos grupos tratados com os compostos 4 e 10, porém, houve um aumento na IMP do composto 10 (82%) no 5º dpi. Entretanto, em ambos esquemas de tratamento o IMP não foi sustentado nos dias subseqüentes da infecção.

De acordo com o trabalho de Carvalho e colaboradores (1991), drogas são consideradas ativas quando reduzem a parasitemia em pelo menos 30%. Com base nesse estudo, tanto o derivado quinolínico 3, quanto os alcaloides β -carbolínicos 4 e 10 podem ser classificados como ativos. Entretanto, dentre os critérios mais recentes, a recomendação para eficácia *in vivo* é que um composto

líder precoce (early lead) deve atingir a eliminação do parasito em uma dose que erradique 90% do patógeno alvo quando administrado por via oral em dose inferior a 50 mg/kg, nos estágios sanguíneos da infecção (tipicamente quatro doses em 4 dias), no modelo de camundongo com malária grave (KATSUNO et al., 2015). Considerando que o esquema de tratamento curativo é iniciado no 3^o dpi e que os tratamentos foram realizados após confecção diária dos esfregaços sanguíneos, podemos determinar que a parasitemia observada no 7^o dpi corresponde a quatro dias de tratamento com os compostos teste. Dessa forma, atendendo a este critério, podemos classificar somente o derivado quinolínico 3 como um candidato a composto líder.

Entretanto, outros critérios são necessários para classificar um composto como líder precoce, são eles: IS 100 vezes superior para o parasito em relação a uma linhagem celular de mamífero; $Cl_{50} < 100nM$ contra cepas sensíveis e resistentes de *P. falciparum*; devem ser testados em todos os estágios do ciclo de vida do *plasmodium* de modo a garantir uma compreensão do alvo do candidato a fármaco, bem como proceder ensaios mecanísticos para determinar os mecanismos de ação (de preferência novos) (KATSUNO et al., 2015). Diante disso, destacamos que o derivado quinolínico 3 atende a mais um critério para composto líder, apresentando $IS > 370$. Entretanto não foram realizados ensaios em outros estágios do ciclo de vida do parasito, bem como ensaios mecanísticos. Além disso, ao fazermos a conversão da Cl_{50} de micro para nanomolar, encontramos um valor igual a 270nM, o que não enquadra o composto 3 nos demais critérios exigidos para um composto líder precoce.

Apesar disso, foi realizada a avaliação dos parâmetros bioquímicos do perfil hepático e renal, através da dosagem de AST, ALT, uréia e creatinina, dos animais tratados com o derivado quinolínico 3. Através desta análise, observamos resultados interessantes quanto à segurança do composto 3 para as funções hepática e renal tanto em relação ao grupo não tratado quanto em relação àquele tratado com a droga padrão. Esses resultados colocam o derivado quinolínico novamente como candidato a fármaco, visto que um dos critérios para classificação como composto líder é a segurança hepática da droga (KATSUNO et al., 2015). Dessa forma, são necessários outros estudos para verificar se o perfil do composto 3 atende aos demais critérios exigidos para ser efetivamente classificado como antimalárico líder, bem como estudos para

otimização da molécula com o intuito de reduzir da CI_{50} para atender ao critério de líder precoce (<100nM), bem como aos demais parâmetros que se fizerem necessários.

O alcaloide β -carbolínico 10, apesar de não cumprir a nenhum dos critérios necessários para um composto líder precoce, apresentou importantes valores de sobrevivência e proteção contra MC, o que nos levou a investigar um provável potencial anti-inflamatório do composto. Para isto, dosamos a concentração de óxido nítrico (NO) no sobrenadante de macrófagos peritoneais murinos estimulados e tratados com o alcaloide e observamos expressiva redução na produção de NO em todas as concentrações testadas. Sabe-se que o NO é uma molécula sinalizadora, produzida por uma família de enzimas óxido nítrico sintase (NOS), que atua em múltiplas funções no organismo (KHAZAN; HDAYATI, 2014). Fisiologicamente o NO é produzido em baixas concentrações e em condições patológicas pode atingir concentrações micromolares, sendo sua produção estimulada pela citocina pró-inflamatória TNF- α (BROWN, 2010). Para entender como o composto 10 pode levar à redução do NO, realizamos docking molecular na enzima iNOS. Observamos interação do alcaloide 10 com um resíduo do sítio catalítico da iNOS o que pode ser o motivo de sua inibição e também dos resultados encontrados pela dosagem de NO.

O papel do NO no contexto da MC é controverso, mas alguns autores sugerem que em infecções parasitárias, como a malária, o NO é uma molécula importante, sendo produzido em grande quantidade pela iNOS em resposta ao estímulo do patógeno e citocinas pró-inflamatórias (FORSTERMANN; SESSA, 2012; WINK et al., 2011). Através desses dados, sugerimos que o alcaloide 10 é um bom candidato a droga para o controle da inflamação, entretanto mais estudos são necessários para classificá-lo efetivamente como anti-inflamatório e compreender seu papel biológico na MC.

7. CONCLUSÃO GERAL

Em conjunto, nossos resultados sugerem que as duas classes de compostos testadas apresentam importantes características para drogas antimaláricas, destacando o derivado quinolínico 3 e os alcaloides β -carbolínicos 4 e 10 como compostos HIT, dado seus baixos valores de CI_{50} , elevados CC_{50} e IS, adequado perfil farmacocinético de absorção e predição in silico de boa biodisponibilidade pela via oral.

Sugerimos ainda que o derivado quinolínico 3 é um candidato a composto líder precoce, por apresentar CI_{50} em escala nM, redução da parasitemia com valores superiores a 90%, alta taxa de sobrevivência proteção contra o desenvolvimento da MC além de segurança hepática e renal. Entretanto, mais estudos são necessários para verificar a adequação aos demais critérios exigidos para ser efetivamente classificado como composto antimalárico líder, bem como estudos para otimização da molécula com o intuito de reduzir da CI_{50} para atender ao critério de líder precoce (<100nM), e aos demais parâmetros que se fizerem necessários.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, M. H. et al. Application of hydrogen bonding calculations in property based drug design. **Drug Discovery Today**, v. 7, n. 20, p. 1056–1063, out. 2002.
- ACHAN, J. et al. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. **Malaria Journal**, v. 10, n. 1, p. 144, 24 dez. 2011.
- ACHAN, J.; MWESIGWA, J.; EDWIN, C.P.; D’ALESSANDRO, U. Malaria medicines to address drug resistance and support malaria elimination efforts. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v.11, n.1, p.1-10, 2017.
- ADAMS, S.; TURNER, G. D.; NASH, G. B.; MICKLEM, K.; NEWBOLD, C. I.; CRAIG, A. G. Differential binding of clonal variants of *Plasmodium falciparum* to allelic forms of intercellular adhesion molecule 1 determined by flow adhesion. **Infection and Immunity**, v.68, p.264-269, 2000.
- AGUIAR, A.C.C.; SANTOS, R.M.; FIGUEIREDO, F.J.B.; CORTOPASSI, W.A.; PIMENTEL, A.S.; FRANÇA, T.C.C., MENEGHETTI, M.R.; KRETTLI, A.U. Antimalarial activity and mechanisms of action of two novel 4-aminoquinolines against chloroquine-resistant parasites. *Plos One*, v.7, n.5, p. 1-9, 2012.
- AIKAWA, M. Human Cerebral Malaria *. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 39, n. 1, p. 3–10, 1 jul. 1988.
- ALI, J. et al. Revisiting the general solubility equation: In silico prediction of aqueous solubility incorporating the effect of topographical polar surface area. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 2, p. 420–428, 2012.
- ALMOLHIM, H. et al. Enantiopure Benzofuran-2-carboxamides of 1-Aryltetrahydro- β -carbolines Are Potent Antimalarials *In Vitro*. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 3, p. 371–376, mar. 2022.
- AL-SALAHY, M. et al. Parasitaemia and Its Relation to Hematological Parameters and Liver Function among Patients Malaria in Abs, Hajjah, Northwest Yemen. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2016, p. 1–5, 2016.
- ALVES, A.; MARTINS, A.; ADOLPHSSON, S.; BOCKORNY, B.; CARLETI, G.; CABRAL, G; SOUZA, A.C.P.; VIANNA, A. Malária grave importada: relato de caso. **Rev Bras Ter Intensiva**, v.19, n.2, p. 231-236, 2007.
- ALVES, V.M.; BRAGA, R.C.; MURATOVA, E.N.; ANDRADE, C.H. Químioinformática: uma introdução. **Química Nova**, v.41, n.2, p.202-212, 2017.
- AL YAMAN, F. M. et al. Association between serum levels of reactive nitrogen intermediates and coma in children with cerebral malaria in Papua New Guinea. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 3, p. 270–273, maio 1996.
- AMARATUNGA, C. et al. Dihydroartemisinin–piperaquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: a multisite prospective cohort study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 357–365, mar. 2016.

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

ANAND, A. C. et al. Malarial hepatitis: a heterogeneous syndrome? **The National medical journal of India**, v. 5, n. 2, p. 59–62, [s.d.].

ANDRADE-NETO, V. F. et al. Antimalarial activity of Cinchona-like plants used to treat fever and malaria in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, n. 2–3, p. 253–256, 2003.

ANGULO, I.; FRESNO, M. Cytokines in the pathogenesis of and protection against malaria. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.9, p.1145–1152, 2002.

ANSTEY, N.M.; RUSSELL, B.; YEO, T.W.; PRICE, R.N. The pathophysiology of vivax malaria. **Trends in Parasitology**, v.25, p.220-227, 2009.

ANTINORI, S., GALIMBERTI, L., MILAZZO, L. & CORBELLINO, M. *Plasmodium knowlesi*: the emerging zoonotic malaria parasite. 2013. **Acta Trop**, **125**: 191-201.

ARROIO, A.; HONÓRIO, K. M.; SILVA, A. B. F. DA. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 694–699, 2010.

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

ASHOK, P.; GANGULY, S.; MURUGESAN, S. Review on in-vitro anti-Malarial activity of Natural β -carboline Alkaloids. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 12, p. 1778–1791, set. 2013

ASTULLA, A.; ZAIMA, K.; MATSUNO, Y.; HIRASAWA, Y.; EKASARI, W.; WIDYAWARUYANTI, A.; ZAINI, N. C.; MORITA, H. Alkaloids from the seeds of *Peganum harmala* showing antiplasmodial and vasorelaxant activities. 2008. **Journal of Natural Medicinal**, **62**: 470-472.

AYAD, F.; TILLEY, L.; DEADY, L.W. Synthesis, antimalarial activity and inhibition of haem detoxification of novel bisquinolines. 2001. **Bioorg Med Chem Lett**, **11**: 2075-2077.

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

BAJORATH, J. Positioning ADME in silico tools in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v.9, p.14-15, 2004.

BALCONI, E. et al. The ferredoxin-NADP + reductase/ferredoxin electron transfer system of *Plasmodium falciparum*. **FEBS Journal**, v. 276, n. 14, p. 3825–3836, jul. 2009.

BANFI, F. F. et al. Dehydrobufotenin extracted from the Amazonian toad *Rhinella*

marina (Anura: Bufonidae) as a prototype molecule for the development of antiplasmodial drugs. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 27, 2021.

BANO, N.; ROMANO, J. D.; JAYABALASINGHAM, B.; COPPENS, I. Cellular interactions of *Plasmodium* liver stage with its host mammalian cell. 2007. **International Journal for Parasitology** **37(12)**: 1329-1341.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos. Rio de Janeiro: Artmed, 2001.

BARUCH, D.I., Adhesive receptors on malaria-parasitized red cells. **Baillieres Best Practice & Research Clinical Haematology**, v.12, n.4, p.747-761, 1999.

BASSAT, Q.; ALONSO, P.L. Defying malaria: fathoming severe *Plasmodium vivax* disease. 2011. **Nature Medicine**, **17(1)**, 48-49.

BELACHEW, E.B. Immune response and evasion mechanisms of *Plasmodium falciparum* parasites. 2018. **Journal of Immunology Research**, **2018**: 1-6.

BENNETT T.N., KOSAR A.D., URSOS L.M., DZEKUNOV S., SINGH SIDHU A.B., FIDOCK D.A., ROEPE P.D. Drug resistance-associated Pfcr1 mutations confer decreased *Plasmodium falciparum* digestive vacuolar pH. 2004. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **133(1)**: 99–114. doi:10.1016/j.molbiopara.2003.09.008

BENNETT T.N., PATEL J., FERDIG M.T., ROEPE P.D. 2007. *Plasmodium falciparum* Na⁺/H⁺ exchanger activity and quinine resistance. 2007. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **153(1)**: 48–58. doi:10.1016/j.molbiopara.2007.01.018

BERENDT, A.R.; SIMMONS, D.L.; TANSEY, J.; NEWBOLD, C.I.; MARSH, K. Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. **Nature**, v.341, p. 57-79, 1989.

BERENDT, A. R. et al. Molecular mechanisms of sequestration in malaria. **Parasitology**, v. 108, n. S1, p. S19–S28, 1994.

BERENDT, A. R.; TUMER, G. D. H.; NEWBOLD, C. I. Cerebral malaria: The sequestration hypothesis. **Parasitology Today**, v. 10, n. 10, p. 412–414, 1994.

BERESFORD, A.P.; SELICK, H.E.; TARBIT, M.H. The emerging importance of predictive ADME simulation in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v.7, p.109-116, 2002.

BERNDT, E.R.; GOTTSCHALK, A.H.B.; PHILIPSON, T.J.; STROBECK, M.W. Industry funding of the FDA: effects of PDUFA on approval times and withdrawal rates. **Nature Reviews Drug Discover**, v.4, p.545-554, 2005.

BETECK, R. M. et al. Recent progress in the development of anti-malarial quinolones. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2014.

BOEIRA, J.M.; SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES J.A.P. Genotoxic effects of the alkaloids Harman and Harmine by Comet assay and chromosome aberration test in mammalian cells *in vitro*. 2001. **Pharmacology and Toxicology**, **89**: 287-294.

BOGDAN, C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. **Trends in Immunology**, v. 36, n. 3, p. 161–178, mar. 2015.

BOIVIN, M. J. et al. Cognitive Impairment After Cerebral Malaria in Children: A Prospective Study. **Pediatrics**, v. 119, n. 2, p. e360–e366, fev. 2007a.

BOIVIN, M. J. et al. Cognitive Impairment After Cerebral Malaria in Children: A Prospective Study. **PEDIATRICS**, v. 119, n. 2, p. e360–e366, 1 fev. 2007b.

BONAZZI, S.; BARBARAS, D.; PATINY, L.; SCOPELLITI, R.; SCHNEIDER, P.; COLE, S.; KAISER, M.; BRUN, R.; GADEMANN, K. Antimalarial and antitubercular nostocarboline and eudistomin derivatives: Synthesis, *in vitro* and *in vivo* biological evaluation. 2010. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, **18**: 1464–1476.

BRAGA, M.D.M.; ALCÂNTARA, G.C.; SILVA, C.N.; NASCIMENTO, C.G.H. Malária cerebral no Ceará: relato de caso. 2004. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **37(1)**: 53-55.

BRASIL, P.; et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. 2017. **The Lancet**, **5**: 1038-1046.

BRASIL (Ministério da Saúde). 2019. Situação Epidemiológica da Malária No Brasil. 22p.

BRASIL (Ministério da Saúde). 2020. Boletim Epidemiológico: Malária 2020. 118p.

BREMAN, J.G. The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden. 2001. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **64**: 1–11.

BREWSTER, D.R.; KWIATKOWSKI, D.; WHITE, N.J. Neurological sequelae of cerebral malaria in children. 1990. **Lancet**, **336**: 1039 –1043.

BROKAMP, R. et al. Stereoselective preparation of pyridoxal 1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline derivatives and the influence of their absolute and relative configuration on the proliferation of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 6, p. 1832–1837, mar. 2014.

BROWN, G. C. Nitric oxide and neuronal death. **Nitric Oxide**, v. 23, n. 3, p. 153–165, nov. 2010.

BRUNET, L. R. Nitric oxide in parasitic infections. **International Immunopharmacology**, v. 1, n. 8, p. 1457–1467, ago. 2001.

BRUCE-CHWATT, L.J. Essential malariology, John Wiley and Sons. 2nd ed. **New York**, 1985. 452p.

BRUECKNER, R.P.; OHRT, C.; BAIRD, J.K.; MILHOUS, W.K. 8-Aminoquinolines. In: Antimalarial chemotherapy: mechanisms of action, resistance, and new directions in drug discovery. (ed. Rosenthal, P.J.), pp. 123-151, 2001.

BRUNEEL, F. Human cerebral malária: 2019 mini review. 2019. **Revue Neurologique**, **175**: 445-450.

BUTINA, D.; MATTHEW, D.S.; FRANKCOMBE, K. Predicting ADME properties in silico: methods and models. **Drug Discovery Today**, v.1, p.83-88, 2002.

CALIXTO, S. L. et al. Novel organic salts based on quinoline derivatives: The *in vitro* activity trigger apoptosis inhibiting autophagy in Leishmania spp. **Chemico-Biological Interactions**, v. 293, n. August, p. 141–151, 2018.

CALLAWAY, J.C.; RAYMON, L.P.; HEARN, W.L.; MCKENNA, D.J.; GROB, C.S.; BRITO, G.S.; MASH, D.C. Quantification of N,N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids in human plasma after oral dosing with ayahuasca. 1996. **Journal Analytical Toxicology**, **20**: 492-497.

CAO, R.; PENG, W.; WANG, Z.; XU, A. β -carboline alkaloids: biochemical and pharmacological functions. **Current Medicinal Chemistry**, **14(4)**: 479-500.

CARTER, J.A.; MUNG'ALA-ODERA, V.; NEVILLE, B.G.; MURIRA, G.; MTURI, N.; MUSUMBA, C.; NEWTON, C.R. Persistent neurocognitive impairments associated with severe falciparum malaria in Kenyan children. 2005. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** **76**: 476 – 481.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. CDC - Malaria - About Malaria - Biology em: <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>

CHENG, F. et al. admetSAR: A Comprehensive Source and Free Tool for Assessment of Chemical ADMET Properties. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 11, p. 3099–3105, 26 nov. 2012.

CHEONG WH, COOMBS GL. Transmission of *Plasmodium cynomolgi* (Perlis strain) to man. 1970. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**,**1**: 302.

CHIODINI, P.L.; COLON, C.P.; HUTCHINSON, D.B.A.; FARQUHAR, J.A.; HALL, A.P.; PETO, T.E; et al. Evaluation of atovaquone in the treatment of patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.36, n.6, p.1073-1078, 1995.

CHITNIS, C. E. Molecular insights into receptors used by malaria parasites for erythrocyte invasion.2001. **Current Opinion in Hematology**, **124**: 755-756.

CLARK IA, ALLEVA LM, BUDD AC, COWDEN WB. Understanding the role of inflammatory cytokines in malaria and related diseases. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v.6, p.67–81, 2008.

CLARK, I. A.; ROCKETT, K. A. The cytokine theory of human cerebral malaria. **Parasitology Today**, v.10, n.10, p.410-412, 1994.

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

COATNEY GR, COLLINS WE, WARREN M, CONTACOS PG. The primate malarias. Washington (DC): **US National Institute of Allergy and Infectious Diseases**; 1971.

COBAN, C.; LEE, M. S. J.; ISHII, K. J. Tissue-specific immunopathology during malaria infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 4, p. 266–278, abr. 2018.

COLLINS WE, CONTACOS PG, GUINN EG. Observations on the sporogonic cycle and transmission of *Plasmodium simium* Da Fonseca. 1969. **J Parasitol.**, **55**: 814–816.

COPPI, A., et al. Heparan Sulfate Proteoglycans Provide a Signal to *Plasmodium* Sporozoites to Stop Migrating and Productively Invade Host Cells. 2007. **Cell Host & Microbe** **2(5)**: 316-327.

COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. 2006. **Cell**, **124 (4)**: 755–766.

COWMAN A.F., MORRY M.J., BIGGS B.A., CROSS G.A., FOOTE S.J. Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. 1988. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 85(23): 9109–9113. doi:10.1073/pnas.85.23.9109

CRANE, B. R. et al. Structure of Nitric Oxide Synthase Oxygenase Dimer with Pterin and Substrate. **Science**, v. 279, n. 5359, p. 2121–2126, mar. 1998.

CROFTS A.R. The cytochrome bc1 complex: function in the context of structure. 2004. **Annual Review of Physiology**, 66: 689–733. doi:10.1146/annurev.physiol.66.032102.150251

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

DAI, J. et al. β -Carboline alkaloid monomers and dimers: Occurrence, structural diversity, and biological activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, p. 622–656, set. 2018.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-13, 2017.

DAS, S. N. et al. Malarial hepatitis as a component of multiorgan failure--a bad prognostic sign. **Journal of the Indian Medical Association**, v. 105, n. 5, p. 247–50, maio 2007.

De ALVARENGA, D.A.M.; et al. Na assay for the identification of *Plasmodium simium* infection for diagnosis of zoonotic malaria in the Brazilian Atlantic Forest. 2018. **Scientific Reports**, **8 (86)**: 1-10.

DEANE LM, DEANE MP, FERREIRA NETO J. Studies on transmission of simian malaria and on the natural infection of man with *Plasmodium simium* in Brazil. 1966. **Bull World Health Organ**, **35**: 805-808.

DE ARAÚJO, R. V. et al. Malaria and tuberculosis as diseases of neglected populations: state of the art in chemotherapy and advances in the search for new drugs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, n. 8, p. 1–20, 2020.

DEROOST, K.; PHAM, T-T.; OPDENAKKER, G.; VAN DEN STEEN, P.E. The immunological balance between host and parasite in malaria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.40, p.208-257, 2015.

DE NIZ, M.; BURDA, P. C.; KAISER, G.; DEL PORTILLO, H. A.; SPIELMANN, T.; FRISCHKNECHT, F.; HEUSSLER, V. T. Progress in imaging methods: insights gained into *Plasmodium* biology. 2017. **Nature Review Microbiology**, **15(1)**: 37-54.

DESALE, V.J.; MALI, S.N.; THORAT, B.R.; YAMGAR, R.S. Synthesis, admetSAR Predictions, DPPH Radical Scavenging Activity, and Potent Antimycobacterial Studies of Hydrazones of Substituted 4-(anilino methyl) benzohydrazides (Part 2). 2020. **Current Computer-Aided Drug Design**, **16**: 1.

de SANTANA FILHO, F.S.; ARCANJO, A.R.; CHEHUAN, Y.M.; COSTA, M.R.; MARTINEZ-ESPINOSA, F.E.; VIEIRA, J.L.; BARBOSA, M.G.; ALECRIM, W.D.; ALECRIM, M.G. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon. 2007. **Emerg Infect Dis**, **13**: 1125-1126.

DE SOUZA-FAGUNDES, E. M. et al. Correlation of structural features of novel 1,2,3-triazoles with their neurotoxic and tumoricidal properties. **Chemico-Biological Interactions**, v. 291, n. June, p. 253–263, 2018.

DE SOUZA, N. B. et al. 4-aminoquinoline analogues and its platinum (II) complexes as antimalarial agents. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 65, n. 4, p. 313–316, jul. 2011.

DEWICK, P.M. (1997) Medicinal natural products: A Biosynthetic Approach. New York :John Wiley e Sons, 466p.

DEWICK, P. **Medicinal Natural Products: A biosynthetic Approach**. 2. ed. West Sussex: John Wiley & Sons LTD, 2002.

DiMASI, J.A.; HANSEN, R.W.; GRABOWSKI, H.G. The price of innovation: new estimates of drug development costs. **Journal of Health Economics**, v.22, p.151-185, 2003.

DING, S. et al. Probing the B- & C-rings of the antimalarial tetrahydro- β -carboline MMV008138 for steric and conformational constraints. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 30, n. 22, p. 127520, nov. 2020.

DONDORP, A. M. Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial. **The Lancet**, v. 366, n. 9487, p. 717–725, ago. 2005.

DONDORP, A. M. et al. Europe PMC Funders Group Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. **N Engl J Med.**, v. 361, n. 5, p. 455–467, 2012.

DOYE, J. P. K.; WALES, D. J. Surveying a potential energy surface by eigenvector-following. In: **Small Particles and Inorganic Clusters**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1997. v. 197p. 194–197.

DUNST, J.; KAMENA, F.; MATUSCHEWSKI, K. Cytokines and chemokines in cerebral malaria pathogenesis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.7, p.1-16, 2017.

DURRAND V., BERRY A., SEM R., GLAZIOU P., BEAUDOU J., FANDEUR T. Variations in the sequence and expression of the Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter (PfCRT) and their relationship to chloroquine resistance in vitro. 2004. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 136(2): 273–285. doi:10.1016/j.molbiopara.2004.03.016

DUTRA, J. D. L. et al. Sparkle/PM7 Lanthanide Parameters for the Modeling of Complexes and Materials. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 9, n. 8, p. 3333–3341, ago. 2013.

EASTMAN, R.T.; DHARIA, N.V.; WINZELER, E.A.; FIDOCK, D.A. Piperaquine resistance is associated with a copy number variation on chromosome 5 in drug-pressured *Plasmodium falciparum* parasites. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.55, n.8, p.3908–3916, 2011.

EGAN, T. J. et al. Thermodynamic factors controlling the interaction of quinoline antimalarial drugs with ferriprotoporphyrin IX. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 68, n. 2, p. 137–145, nov. 1997.

EIAM-ONG, S.; SITPRIJA, V. Falciparum malaria and the kidney: A model of inflammation. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 32, n. 3, p. 361–375, set. 1998.

ELIEL, E. L.; WILEN, S. H. Stereochemistry of organic compounds. 1 ed. Ed. Wiley Interscience.

FAURANT, C. From back to weed: the history of artemisinin. **Parasite**, v.18, p.215-218, 2011.

FIGUEIREDO, M.C.; ATHERINO, C.C.C.T.; MONTEIRO, C.V.; LEVY, R.A. Antimaláricos e Ototoxicidade. 2004. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 44(3): 212-214.

FILHO, F. S. DE S. et al. Chloroquine-Resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 7, p. 1125–1126, jul. 2007.

FIOT, J. et al. Phytochemical and pharmacological study of roots and leaves of *Guiera senegalensis* J.F. Gmel (Combretaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 2, p. 173–178, 2006.

FIVELMAN, Q.L.; BUTCHER, G.A.; ADAGU, I.S.; WARHURST, D.C.; PASVOL, G. Malarone treatment failure and *in vitro* confirmation of resistance of *Plasmodium falciparum* isolate from Lagos, Nigeria. **Malaria Journal**, v.1, p.1, 2002.

FONSECA F. *Plasmodium* of a primate of Brazil. 1951. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, **49**: 543–553.

FOOTE, S.J.; BURT, R.A.; BALDWIN, T.M.; PRESENTE, A.; ROBERTS, A.W.; LAURAL, Y.L.; LEW, A.M.; MARSHALL, V.M. Mouse loci for malária induced mortality and the control of parasitaemia. 1997. **Nature Genetic**, **17(4)**: 380-381.

FORLI, S. et al. Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nature Protocols*, v. 11, n. 5, p. 905–919, 14 maio 2016.

FORSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, p. 829–837, abr. 2012.

FRANÇA, T.C.C.; DOS SANTOS, M.G.; FIGUEROA-VILAR, J. D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. 2008. **Química Nova**, **31(5)**, 1271-1278.

FRANKE-FAYARD, B.; FONAGER, J.; BRAKS, A.; KHAN, S.M.; JANSE, C.J. Sequestration and tissue accumulation of human malaria parasites: can we learn anything from rodent models of malaria?. 2010. **Plos Pathogens**, **6(9)**: 1-10.

FREDERICH, M.; TITS, M.; ANGENOT, L. Potential antimalarial activity of indole alkaloids. 2008. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **102(1)**: 11-19.

FUJIKAWA, D. G. The Role of Excitotoxic Programmed Necrosis in Acute Brain Injury. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 13, p. 212–221, 2015.

GAMAIN, B.; SMITH, J.F.; VIEBIG, N.K. et al., Pregnancy-associated malaria: parasite binding, natural immunity and vaccine development. **International Journal for Parasitology**, v.37, n.3-4, p.273-283, 2007.

GENTON, B.; D'ACREMONT, V.; RARE, L.; et al. *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. **PLoS Medicine**, v.5, n.6, p. 881-889, 2008.

GHOSH, S. et al. Mutational Analysis of the Tetrahydrobiopterin-binding Site in Inducible Nitric-oxide Synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 34, p. 24100–24112, ago. 1999.

GLEESON, M. P. Generation of a set of simple, interpretable ADMET rules of thumb. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 817–834, 2008.

GLENNON, R.A.; DUKAT, M; GRELLA, B.; HONG, S.S.; COSTATINO, L.; TEITLER, M.; SMITH, C.; EGAN, C.; DAVIS, K.; MATTSON, M.V. Binding of beta-carbolines and related agentes at serotonina (5-HT(2) and 5-HT(1A)), dopamine (D(2)) and benzodiazepine receptors. 2000. **Drug and Alcohol Dependence**, **60(2)**: 121-132.

GOLDMAN IF, QARI SH, MILLET PG, COLLINS WE, LAL AA. Circumsporozoite protein gene of *Plasmodium simium*, a *Plasmodium vivax*-like monkey malaria parasite. 1993. **Mol Biochem Parasitol.**, **57**: 177–180.

GONÇALVES, L.A.; CRAVO, P.; FERREIRA, M.U. Emerging *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in South America: an overview. 2014. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **109(5)**: 534-539.

GORKI, V. et al. β -Carboline Derivatives Tackling Malaria: Biological Evaluation and Docking Analysis. **ACS Omega**, v. 5, n. 29, p. 17993–18006, 2020.

GOWDA, D. C.; WU, X. Parasite Recognition and signaling mechanisms in innate immune responses to malaria. 2018. **Frontiers in Immunology**, **9**: 1-17.

GREENWOOD, B.M.; BRADLEY, A.K.; GREENWOOD, A.M.; et al. Mortality and morbidity from malaria among children in a rural area of The Gambia, West Africa. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.81, p.478-486, 1987.

GREENWOOD, B.M.; FIDOCK, D.A.; KYLE, D.E.; et al. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. 2008. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(4): 1266-1276.

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

GUGGISBERG, A. M.; AMTHOR, R. E.; ODOM, A. R. Isoprenoid Biosynthesis in *Plasmodium falciparum*. **Eukaryotic Cell**, v. 13, n. 11, p. 1348–1359, nov. 2014.

GUIDO, R.V.C.; ANDRICOPULO, A.D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. 2010. **Estudos Avançados**, **24(70)**: 81-98.

GUINOVRT, C. et al. The epidemiology of severe malaria at Manhiça District Hospital, Mozambique: a retrospective analysis of 20 years of malaria admissions surveillance data. **The Lancet Global Health**, v. 10, n. 6, p. e873–e881, jun. 2022.

GUPTA, D. et al. Salts of therapeutic agents: Chemical, physicochemical, and biological considerations. **Molecules**, v. 23, n. 7, p. 1–15, 2018.

HALL, A.P.; SEGAL, H.E.; PEARLMAN, E.J.; PHINTUYOTHIN, P.; KOSAKAL, S. Amodiaquine resistant *falciparum* malaria in Thailand. 1975. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **24(4)**: 575-580.

HAMMOND D.J., BURCHELL J.R., PUDNEY M. Inhibition of pyrimidine biosynthesis de novo in *Plasmodium falciparum* by 2-(4-t-butylcyclohexyl)-3-hydroxy-1,4 naphthoquinone in vitro. 1985. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 14(1): 97–109. doi:10.1016/0166-6851(85)90109-4

HANDUNNETTI, S.M.; DAVID, P.H.; PERERA, K.L.; MENDIS, K.N. Uninfected erythrocytes form "rosettes" around *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40, n.2, p. 115-118, 1989.

HASHIMOTO, Y.; KAWANISHI, K.; MOTTIYASU, M. Forensic chemistry of alkaloids. 1998. **The alkaloids: Chemistry and Pharmacology**, 32: 40-45.

HAWKES, M. et al. Contrasting pediatric and adult cerebral malaria: The role of the endothelial barrier. **Virulence**, v. 4, n. 6, 2013.

HE, X. et al. Vitamin D Inhibits the Occurrence of Experimental Cerebral Malaria in Mice by Suppressing the Host Inflammatory Response. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 3, p. 1314–1323, 2014.

HENRIQUES, A.T., LIMBERGER, R.P., KERBER, V.A.; MORENO, P.R.H. (2004) Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROCICK, P.R. (org.) Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, p. 765-92.

HERRAIZ, T.; GONZÁLEZ, D.; ANCÍN-AZPILICUETA, C.; ARÁN, V.J.; GUILLÉN, H. β -carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). 2010. **Food and Chemical Toxicology**, 48: 839-845.

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

HOWES, R.E.; BATTLE, K.E.; MENDIS, K.N.; SMITH, D.L.; CIBULSKIS, R.E.; BAIRD, J.K. Global epidemiology of *Plasmodium vivax*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v.95, p.15–34, 2016.

HYDE, J.E. Mechanisms of resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs. **Microbes and Infection**, v.4, p.165-174, 2002.

IDRO, R. et al. Cerebral malaria: Mechanisms of brain injury and strategies for improved neurocognitive outcome. **Pediatric Research**, v. 68, n. 4, p. 267–274, 2010.

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

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

IRWIN W SHERMAN. **Parasite Biology, Pathogenesis and Protection**. Washington, DC: [s.n.].

IQBAL, J.; SIDDIQUE, A.; JAMEEL, M.; HIRA, P. R. Persistent histidine-rich protein 2, parasite lactate deshydrogenase, and panmalarial antigen reactivity after clearance of *Plasmodium falciparum* mono-infection. 2004. **Journal of Clinical Microbiology**, **42**: 4237-4241.

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

JAROMIN, A. et al. Synthesis, Molecular Docking and Antiplasmodial Activities of New Tetrahydro- β -Carbolines. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 24, p. 13569, dez. 2021.

JAYABALASINGHAM, B.; BANO, N.; COPPENS, I. Metamorphosis of the malaria parasite in the liver is associated with organelle clearance. 2010. **Cell research**, **20(9)**: 1043-1059.

JELINEK, T.; GROBUSCH, M.P.; LOSCHER, T. Patterns of *Plasmodium falciparum* drug resistance in non-immune travellers to Africa. **The European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.20, p.284-286, 2001.

JIANG, X. et al. Synergistic Effect of Combined Artesunate and Tetramethylpyrazine in Experimental Cerebral Malaria. **ACS Infectious Diseases**, v. 6, n. 9, p. 2400–2409, 2020

JIMENEZ, J.; RIVERON-NEGRETE, L.; ABDULLAEV, F.; ESPINOSA-AGUIRRE, J.; RODRIGUEZ-ARNAIZ, R. Cytotoxicity of the beta-carboline alkaloids harmine and harmaline in human cell assays *in vitro*. 2008. **Experimental and Toxicologic Pathology**, **60**: 381-389.

JOHN, C.C.; BANGIRANA, P.; BYARUGABA, J.; OPOKA, R.O.; IDRO, R.; JUREK, A.M.; WU, B.; BOIVIN, M.J. Cerebral malaria in children is associated with long-term cognitive impairment. 2008. **Pediatrics** **122**: 92-99.

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

KALEPU, S.; NEKKANTI, V. Insoluble drug delivery strategies: Review of recent advances and business prospects. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 5, p. 442–453, 2015.

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

KAUR, K.; JAIN, M.; KAUR, T.; JAIN, R. Antimalarials from nature. 2009. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, **17(9)**: 3229-3256.

KHAZAN, M.; HDAYATI, M. The Role of Nitric Oxide in Health and Diseases. **Scimetr**, v. 3, n. 1, dez. 2014.

KLAYMAN, D. L. Qinghaosu (Artemisinin): An Antimalarial Drug from China **Science**, v.228, p.1049-1055, 1985.

KRAEMER, S.M; SMITH, J.D. A family affair: var genes, PfEMP1 binding, and malaria disease. **Current Opinion in Microbiology**, v.9, n.4, p.374-380, 2006.

KRISHNA, S. et al. Artemisinins and the biological basis for the PfATP6/SERCA hypothesis. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 11, p. 517–523, nov. 2010. KROTOSKI, W. A. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. 1985. **Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene**, **79**: 1-11.

KOCHAR, D.K.; SAXENA, V.; SINGH, N.; KOCHAR, S.K.; KUMAR, S.V.; DAS A. *Plasmodium vivax* malaria. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, p.132-134, 2005.

KOSSODO, S.; GRAU, G. E. Profiles of cytokines production in relation with susceptibility to cerebral malaria.1993. **Journal of Immunology**, **151**: 4811-4820.

KUMAR, S.; BANDYOPADHYAY, U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. **Toxicology Letters**, v. 157, n.3, p.175-188, 2005.

LACAVA, A.C. Complicações oculares da terapêutica com a cloroquina e derivados. 2010. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, **73(4)**: 385-389.

LAI, T. W.; ZHANG, S.; WANG, Y. T. Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection. **Progress in Neurobiology**, v. 115, p. 157–188, abr. 2014.

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

LEE, C.H.; HUANG, H.C.; JUAN, H.F. Reviewing ligand-based rational drug design: The search for na ATP Synthase Inhibitor. 2011. **International Journal of Molecular Sciences**, **12(8)**:5304-5318.

LEESON, P. D.; DAVIS, A. M.; STEELE, J. Drug-like properties: guiding principles for design – or chemical prejudice? **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 3, p. 189–195, dez. 2004.

LEMKE, T.L. Antiparasitic agentes. In: LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A.; ROCHE, V. F.; ZITO, S. W. Foye's principles of medicinal chemistry: 6th ed. **New York: Lippincott Willians & Wilkins**, cap. **39**, 2008. P.1084-1111.

LESANAVIČIUS, M. et al. Reactions of *Plasmodium falciparum* Ferredoxin:NADP⁺ Oxidoreductase with Redox Cycling Xenobiotics: A Mechanistic Study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, p. 3234, maio 2020.

LEW, V.L.; TIFFERT, T; GINSBURG, H. Excess hemoglobin digestion and the osmotic stability of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. 2003. **Blood**, **101**: 4189-4194.

LIMA, V. L. E. Os fármacos e a quiralidade: uma breve abordagem. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 657–663, dez. 1997.

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

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

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1–3, p. 3–25, jan. 1997.

LOMBARDINO, J.G.; LOWE, J.A. The role of the medicinal chemist in drug discovery – Then and now. **Nature Reviews Drug Discover**, v.3, p,853-862, 2004.

LOOAREESUWAN, S.; VIRAVAN, C.; WEBSTER, H.K.; KYLE, D.E.; HUTCHINSON, D.B.; CANFIELD, C.J. Clinical studies of atovaquone, alone or in combination with other antimalarial drugs, for treatment of acute uncomplicated malaria in Thailand. **The American Journal of Tropical medicine and hygiene**, v.54, n.1, p.62-66, 1996.

LOU, J.; LUCAS, R.; GRAU, G. E. Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n.4, p.810-820, 2001.

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

MACPHERSON, G. G. et al. Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. **American Journal of Pathology**, v. 119, n. 3, p. 385–401, 1985.

MAGEN, J. et al. Cognitive Outcomes and Psychiatric Symptoms of Retinopathy-Positive Cerebral Malaria: Cohort Description and Baseline Results. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 1, p. 225–231, jul. 2017.

MAIA, E. H. B. et al. Octopus: a platform for the virtual high-throughput screening of a pool of compounds against a set of molecular targets. **Journal of Molecular Modeling**, v. 23, n. 1, p. 26, 7 jan. 2017.

MARINHO, J. A. et al. *In vitro* and *in vivo* antiplasmodial activity of novel quinoline

derivative compounds by molecular hybridization. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 215, 2021.

MARQUES, M. M. et al. *Plasmodium vivax* Chloroquine Resistance and Anemia in the Western Brazilian Amazon. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 342–347, jan. 2014.

MARRA, F. et al. Recommendations for Dosing of Repurposed COVID-19 Medications in Patients with Renal and Hepatic Impairment. **Drugs in R and D**, v. 21, n. 1, p. 9–27, 2021.

MAKLER, M T; GIBBINS, B. Laboratory diagnosis of malaria. 1991. **Clinical in Laboratory Medicine**, **11(4)**: 941-56.

MATHEW, J. et al. Malaria Box-Inspired Discovery of N -Aminoalkyl- β -carboline-3-carboxamides, a Novel Orally Active Class of Antimalarials. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 3, p. 365–370, mar. 2022.

MBENGUE, A.; YAM, X. Y.; BRAUN-BRETON, C. Human erythrocyte remodelling during *Plasmodium falciparum* malaria parasite growth and egress. **British Journal of Haematology**, v.157, n.2, p.171-179, 2012.

MEDANA, I. M.; HUNT, N. H.; CHAN-LING, T. Early activation of microglia in the pathogenesis of fatal murine cerebral malaria. **Glia**, v. 19, n. 2, p. 91–103, 1997.

MEINEL, R. S. et al. Novel functionalized 1,2,3-triazole derivatives exhibit antileishmanial activity, increase in total and mitochondrial-ROS and depolarization of mitochondrial membrane potential of *Leishmania amazonensis*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 315, n. October 2019, p. 108850, 2020.

MERCKX, A. et al. Structures of *P. falciparum* Protein Kinase 7 Identify an Activation Motif and Leads for Inhibitor Design. **Structure**, v. 16, n. 2, p. 228–238, fev. 2008.

MILANI, M. et al. Ferredoxin-NADP⁺ Reductase from *Plasmodium falciparum* Undergoes NADP⁺-dependent Dimerization and Inactivation: Functional and Crystallographic Analysis. **Journal of Molecular Biology**, v. 367, n. 2, p. 501–513, mar. 2007.

MILLER, L. H. et al. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. **Nature Medicine**, v. 19, n. 2, p. 156–167, 6 fev. 2013.

MISRA, D. P. et al. Relationship of hepatic and renal dysfunction with haemorrhological parameters in *Plasmodium falciparum* malaria. **Journal of Association of Physicians of India**, v. 59, n. 9, p. 552–556, 2011.

MIZOBUCHI, H. et al. Exacerbation of hepatic injury during rodent malaria by myeloid-related protein 14. **PLoS ONE**, v. 13, n. 6, p. 1–25, 2018.

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

MOHANTY, D. et al. Vascular Clogging, Mononuclear Cell Margination, and Enhanced Vascular Permeability in the Pathogenesis of Human Cerebral

Malaria. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 5, p. 642–647, 1 nov. 1994.

MOHAPATRA, M.K.; PADHIARY, K.N.; MISHRA, D.P.; SETHY, G. Atypical manifestations of *Plasmodium vivax* malaria. **Indian Journal of Malariology**, v.39, n. 1-2, p. 18-25, 2002.

MOLETTE, J.; ROUTIER, J.; ABLA, N.; BESSON, D.; BOMBRUM, A.; BRUN, R.; BURT, H.; GEORGI, K.; KAISER, M.; NWAKA, S.; MUZARELLE, M.; SCHEER, A.; Identification and Optimization of an Aminoalcohol-Carbazole Series with Antimalarial Properties. 2013. **Medicinal Chemistry Letters**, **4**: 1037–1041.

MONTOIA, A. *Síntese de derivados carbazólicos e β -carbolínicos e avaliação da atividade antimalárica in vitro*. 2017. 208f. Tese (Doutorado em química) - Universidade Federal do Amazonas, 2017.

MOON, R. W.; HALL, J.; RANGKUTI, F.; HO, Y. S.; ALMOND, N.; MITCHELL, G. H.; PAIN, A.; HOLDER, A. A.; BLACKMAN, M. J. Adaptation of the genetically tractable malaria pathogen *Plasmodium knowlesi* to continuous culture in human erythrocytes. 2013. **Proceedings of the National Academy of Science**, **110**(2): 531-536.

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

MUELLER, I.; GALINSKI, M.R.; BAIRD, J.K.; et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. 2009. **The Lancet**, **9**: 555-566.

NAING, C.; WHITTAKER, M.A.; WAI, V.N.; MAK, J.W. Is *Plasmodium vivax* malaria a severe malaria?: a systematic review and meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.8, n.8, p.1-11, 2014.

NETTERWALD, J. Will the sun come out tomorrow? **Drug Discovery and Development**, v.12, p.17-20, 2006.

NEWTON, C.R.J.C.; HIEN, T.T.; WHITE, N. Neurological Aspects of Tropical Disease. 2000. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, **69**: 433-441.

NEWTON, C.R.; KRISHNA, S. Severe falciparum malaria in children: current understanding of pathophysiology and supportive treatment. 1998. **Pharmacol Ther**, **79**: 1–53.

NGOUNGOU, E.B.; PREUX, P.M. Cerebral malaria and epilepsy. 2008. **Epilepsia**, **49**: 19–24.

NILKANTH, P.R.; GHORAI, S.K.; Sathiyarayanan, A.; DHAWALE, K.; AHAMAD, T.; GAWANDE, M.B.; SHELKE, S.N. Synthesis and Evaluation of Anticonvulsant Activity of Some Schiff Base of 1,4-Benzodiazepine Amine. 2020. **Chemistry & Biodiversity**, **17**(9): 1-18.

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

NUNES, R. R. et al. Brazilian malaria molecular targets (BraMMT): selected receptors for virtual high-throughput screening experiments. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, 2019.

O'BRIEN, C. et al. Recent clinical and molecular insights into emerging artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 24, n. 6, p. 570–577, dez. 2011.

OCKENHOUSE, C.F.; MAGOWAN, C.; CHULAY, J.D. Activation of monocytes and platelets by monoclonal antibodies or malaria-infected erythrocytes binding to the CD36 surfacereceptor *in vitro*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 84, n.2, p.468-475, 1989.

OLIVEIRA-FERREIRA, J., et al. 2010. Malária in Brazil: an overview. 2010. **Malaria Journal**, **9(1)**: 1-15.

OLLIARO, P. Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v.89, p.207-219, 2001.

ORLANDO, R. M. Importância Farmacêutica De Fármacos Quirais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 1, p. 8–14, 2007.

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

PAIN, A.; FERGUSON, D.J.P.; KAI, O.; et al., Platelet-mediated clumping of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is a common adhesive phenotype and is associated with severe malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, n.4, p.1805-1810, 2001.

PALMER, K.; HOLLIDAY, S. BROGDEN R. Mefloquine: a review of its antimalarial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. **Drugs**, v.45, p.430-475, 1993.

PALMER, C J; LINDO, J F; KLOSKALA, W I; QUESADA, J A; KAMINSKY, R; BAUM, M K; AGER, A L. Evaluation of the Optimal Teste for rapid diagnosis of *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* malaria. 1998. **Journal of Clinical Microbiology**, **v.36(1)**:203-206.

PARAMASHIVAM, S. K. et al. In silico pharmacokinetic and molecular docking studies of small molecules derived from *Indigofera aspalathoides* Vahl targeting receptor tyrosine kinases. **Bioinformatics**, v. 11, n. 2, p. 73–84, 2015.

PASSEMAR, C.; SALERY, M.; SOH, P.N.; LINAS, M.D.; AHOND, A.; POUPAT, C.; BENOIT-VICAL, F. Indole and aminoimidazole moieties appear as key structural units in antiplasmodial molecules. 2011. **Phytomedicine**, **18(13)**: 1118-1125.

PATCHEN, L.C.; CAMPBELL, C.C.; WILLIAMS, S.B. Neurologic reactions after a therapeutic dose of mefloquine. **New England Journal of Medicine**, v.321, p.1415-1416, 1989.

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

PERCÁRIO, S. et al. Oxidative Stress in Malaria. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 12, p. 16346–16372, dez. 2012.

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

PETERS, W., Antimalarial drugs and their actions. 1973. **Postgrad Med J**, **49(574)**: 573-83.

PHILLIPS, E. J.; KEYSTONE, J. S.; KAIN, K. C. Failure of combined chloroquine and high-dose primaquine therapy for *Plasmodium vivax* malaria acquired in Guyana, South America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 1171–1175, 1996.

PHILLIPS, M. A. et al. Malaria. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 17050, ago. 2017.

PHIMPRAPHI, W.; PAUL, R. E.; YIMSAMRAN, S.; et al. Longitudinal study of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in a Karen population in Thailand. 2008. **Malaria Journal** **7(1)**: 1-11.

PLOWE C.V., CORTESE J.F., DJIMDE A., NWANYANWU O.C., WATKINS W.M., WINSTANLEY P.A., ESTRADA-FRANCO J.G., MOLLINEDO R.E., AVILA J.C., CESPEDES J.L., CARTER D., DOUMBO O.K. Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance. 1997. **The Journal of Infectious Diseases**, 176(6): 1590–1596. doi:10.1086/514159

PRADEEPKIRAN, J.A.; REDDY, P.H. Structure Based Design and Molecular Docking Studies for Phosphorylated Tau Inhibitors in Alzheimer's Disease. 2019. **Cells**, **8(3)**: 2-26.

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

PRICE, R.N.; UHLEMAN, A-C.; BROCKMAN, A.; MCGREADY, R.; ASHLEY, E.; PHAIPUN, L; et al. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. **The Lancet**, v.364, p.438-447, 2004.

PRUDÊNCIO, M.; RODRIGUEZ, A.; MOTA, M. 2006. The silent path to Thousand merozoites: the *Plasmodium* liver stage. **Nature**, **4**: 849-856.

POJE, G. et al. Design and synthesis of harmiquins, harmine and chloroquine hybrids as potent antiplasmodial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 238, p. 114408, ago. 2022. RIDLEY, R.G. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarials drugs. **Nature**, v.415, p.686-693, 2002.

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

RAHLFS, S.; FISCHER, M.; BECKER, K. *Plasmodium falciparum* Possesses a Classical Glutaredoxin and a Second, Glutaredoxin-like Protein with a PICOT Homology Domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 40, p. 37133–37140, out. 2001.

REED M.B., SALIBA K.J., CARUANA S.R., KIRK K., COWMAN A.F. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. 2000. **Nature**, 403(6772): 906–909. doi:10.1038/35002615

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

ROBERT, C.; POUVELLE, B.; MEYER, P.; MUANZA, K.; FUJIOKA, H.; AIKAWA, M.; SCHERF, A.; GYSIN, J. Chondroitin-4-sulphate (proteoglycan), a receptor for *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte adherence on brain microvascular endothelial cells. **Research in Immunology**, v.146, n.6, p. 383-93, 1995.

ROBERT, A.; BENOIT-VICAL, F.; DECHY-CABARET, O.; MEUNIER, B. From classical antimalarial drugs to new compounds based on the mechanism of action of artemisinin. 2001. **Pure and Applied Chemistry**, **73 (7)**: 1173-1188.

ROGERSON, S.J.; CHAIYAROJ, S.C.; NG, K.; REEDER, J.C.; BROWN, G.V. Chondroitin sulfate A is a cell surface receptor for *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v.182, n.1, p.15-20, 1995.

ROPER, C.; PEARCE, R.; NAIR, S.; SHARP, B., NOSTEN, F.; ANDERSON, T. Intercontinental spread of pyrimethamine-resistant malaria. **Science**, v.305, p.1124, 2004.

RUIZ, M. E.; SCIOLI MONTOTO, S. Routes of Drug Administration. In: **ADME Processes in Pharmaceutical Sciences**. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 97–133.

RYAN, K. S.; DRENNAN, C. L. Divergent Pathways in the Biosynthesis of Bisindole Natural Products. **Chemistry & Biology**, v. 16, n. 4, p. 351–364, abr. 2009.

SANNI, L.A.; JARRA, W.; LI, C.; LANGHORNE, J. Cerebral edema and cerebral hemorrhages in interleukin-10-deficient mice infected with *Plasmodium chabaudi*. 2004. **Infect Immun**, **72(5)**: 3054-3058.

SARFO, B. Y.; ARMAH, H. B; IRUNE, I.; ADJEI, A. A.; OLVER, C. S.; SINGH, S.; LILLARD, J. W.; STILES, J. K. *Plasmodium yoelii* 17XL infection up-regulates

RANTES, CCR1, CCR3 and CCR5 expression, and induces ultrastructural changes in the cerebellum. **Malaria Journal**, v.4, p. 63-76, 2005.

SCALERCIO, S.S.R.A. *Estudo teórico do mecanismo redox de derivados quinolínicos na atividade antimalárica*. 2010. 69f. Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas). Universidade Federal do Pará, 2010.

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

SCHUMANN, R. R. Malarial fever: Hemozoin is involved but Toll-free. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n.6, p.1743-1744, 2007.

SHANKS, G.D. The rise and fall of mefloquine as an antimalarial drug in South East Asia. **Military Medicine**, v. 159, n.4, p.275-281, 1994.

SHARMA, Y.D. Knobs, knob proteins and cytoadherence in falciparum malaria. **International Journal of Biochemistry**, v.23, n.9, p.775-89, 1991.

SHEAR HL, MARINO MW, WANIDWORANUN C, BERMAN JW, NAGEL RL. Correlation of increased expression of intercellular adhesion molecule-1, but not high levels of tumor necrosis factor-alpha, with lethality of *Plasmodium yoelii* 17XL, a rodent model of cerebral malaria. 1998. **Am J Trop Med Hyg**, **59(6)**: 852-858.

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

SHERMAN, I.W. Malaria: parasite biology, pathogenesis and protection. ASM Press. Washington DC, 1998

SHERMAN, I. W. Amino acid metabolism and protein synthesis in malarial parasites. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 55, n. 2-3, p. 265-276, 1977.

SHERMAN, I.W.; EDA, S.; WINOGRAD, E. Cytoadherence and sequestration in *Plasmodium falciparum*: defining the ties that bind. **Microbes and Infection**, v.5, n.10, p.897-909, 2003.

SIERRO, F.; GRAU, G.E.R. The ins and outs of cerebral malaria pathogenesis: immunopathology, extracellular vesicles, immunometabolism, and trained immunity. **Frontiers in Immunology**, v.10, p.830-841, 2019.

SILVA, A. T. et al. Building on surface-active ionic liquids for the rescuing of the antimalarial drug chloroquine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 15, p. 1-9, 2020.

SILVA, T. H. Á. DA et al. Estudo de modelagem molecular de complexos ferriprotoporfirina-IX e quinolinocarbinolaminas antimaláricas: proposta de um farmacóforo. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 244-249, 2005.

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

SIREGAR J.E., KURISU G., KOBAYASHI T., MATSUZAKI M., SAKAMOTO K., MI-ICHI F., WATANABE Y., HIRAI M., MATSUOKA H., SYAFRUDDIN D. Direct evidence for the atovaquone action on the Plasmodium cytochrome bc1 complex. 2015. **Parasitology International**, 64: 295–300.

SISOWATH C., FERREIRA P.E., BUSTAMANTE L.Y., DAHLSTROM S., MARTENSSON A., BJORKMAN A., KRISHNA S., GIL J.P. The role of pfmdr1 in Plasmodium falciparum tolerance to artemether-lumefantrine in Africa. 2007. **Tropical Medicine and International Health**, 12(6): 736–742. doi:10.1111/j.1365-3156.2007.01843.x

SOARES, R. R. et al. New quinoline derivatives demonstrate a promising antimalarial activity against *Plasmodium falciparum in vitro* and *Plasmodium berghei in vivo*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 11, p. 2308–2313, 2015.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. Organic chemistry. 7 ed. New York: Ed. John Wiley & Sons, p.184-210, 2000.

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

STEWART, J. J. P. MOPAC: A semiempirical molecular orbital program. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 4, n. 1, p. 1–103, mar. 1990.

STORM, J., CRAIG, A. G. Pathogenesis of cerebral malária – inflammation and cytoadherence. 2014. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, **4**: 1 - 8.

STROPPIA, P. H. F. et al. Effect of 1,2,3-triazole salts, non-classical bioisosteres of miltefosine, on *Leishmania amazonensis*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 12, p. 3034–3045, 2017.

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

SUN, J. et al. Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. **Sensors**, v. 3, n. 8, p. 276–284, ago. 2003.

SUTHERLAND C.J., LAUNDY M., PRICE N., BURKE M., FIVELMAN Q.L., PASVOL G., KLEIN J.L. CHIODINI P.L. Mutations in the Plasmodium falciparum cytochrome b gene are associated with delayed parasite recrudescence in malaria patients treated with atovaquone-proguanil. 2008. **Malaria Journal**, 7: article number 240. doi:10.1186/1475-2875-7-240

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

TAKASU, K. et al. Synthesis and Evaluation of β -Carbolinium Cations as New Antimalarial Agents Based on π -Delocalized Lipophilic Cation (DLC) Hypothesis. **CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN**, v. 53, n. 6, p. 653–661, 2005.

TALELE, T. T. Acetylene Group, Friend or Foe in Medicinal Chemistry. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, n. 11, p. 5625–5663, 2020.

TALISUNA, A. O.; BLOLAND, P.; D’ALESSANDRO, U. History, Dynamics, and Public Health Importance of Malaria Parasite Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 1, p. 235–254, jan. 2004.

TARONCHER, M.; RODRIGUEZ-CARRASCO, Y.; RUIZ, M-J. Interactions between T-2 toxin and its metabolites in HepG2 cells and in silico approach. 2021. **Food and Chemical Toxicology**, **148**:

TAKASU, K.; SHIMOGAMA, T.; SAIIN, C.; KIM, H.S.; WATAYA, Y.; BRUN, R.; IHARA, M. Synthesis and Evaluation of β -Carbolinium Cations as New Antimalarial Agents Based on π -Delocalized Lipophilic Cation (DLC) Hypothesis. 2005. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, **53**: 653-661.

TAYLOR, T. E. et al. Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts. **Nature Medicine**, v. 10, n. 2, p. 143–145, 1 fev. 2004.

THAM, W.H.; BEESON, J.G.; RAYNER, J.C. *Plasmodium vivax* vaccine research – we’ve only just begun. 2017. **International Journal of Parasitology**, **47**: 111-118.

THONGTHOOM, T.; SONGSIANG, U.; PHAOSIRI, C.; YENJAI, C. Biological activity of chemical constituents from *Clausena harmandiana*. 2010. **Archives of Pharmacal Research**, **33**: 675-680.

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

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

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, p. NA-NA, 2009.

TURNER, G. D. H. et al. An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria: Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. **American Journal of Pathology**, v. 145, n. 5, p. 1057–1069, 1994.

UDEINYA, I.J.; SCHMIDT, J.; AIKAWA, M.; MILLER, L.; GREEN, I. Falciparum malaria-infected erythrocytes specifically bind to cultured human endothelial cells. **Science**, v. 213, p. 555-557, 1981.

UDOMSANGPETCH, R; WAHLIN, B.; CARLSON, J.; et al. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes form spontaneous erythrocyte rosettes. **The Journal of Experimental Medicine**, v.169, p.1835-1840, 1989.

URSOS, L. M. B.; ROEPE, P. D. Chloroquine resistance in the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*. **Medicinal Research Reviews**, v. 22, n. 5, p. 465–491, set. 2002.

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

VAN BAELEN, G.; HOSTYN, S.; DHOOGHE, L.; TAPOLCSÁNYI, P.; MÁTYUS, P.; LEMIÈRE, G.; DOMMISSE, R.; KAISER, M.; BRUN, R.; COS, P.; MAES, L.; HAJÓS, G.; RIEDL, Z.; NAGY, I.; MAES, B. U. W.; PIETERS, L. Structure–activity relationship of antiparasitic and cytotoxic indoloquinoline alkaloids, and their tricyclic and bicyclic analogues. 2009. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, **17**: 7209-7217.

VAN HENS BROEK, M.B.; PALMER, A.; JAFFAR, S.; SCHNEIDER, G.; KWIATKOWSKI, D. Residual neurologic sequelae after childhood cerebral malaria. 1997. **J Pediatr**, **131**: 125–129.

VAN ES H.H., KARCZ S., CHU F., COWMAN A.F., VIDAL S., GROS P., SCHURR E. Expression of the plasmodial *pfmdr1* gene in mammalian cells is associated with increased susceptibility to chloroquine. 1994. **Molecular and Cellular Biology**, 14(4): 2419–2428. doi:10.1128/mcb.14.4.2419.

VARO, R. et al. Clinical trials to assess adjuvant therapeutics for severe malaria. **Malaria Journal**, v. 19, n. 1, p. 268, dez. 2020.

WAGER, T. T. et al. Defining Desirable Central Nervous System Drug Space through the Alignment of Molecular Properties, *in Vitro* ADME, and Safety Attributes. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 1, n. 6, p. 420–434, jun. 2010.

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

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

WEINER, D. Modeling, simulation, and the critical path. **Drug Discover Development**, v.12, p.54, 2006.

WELLS, T. N. C.; VAN HUIJSDUIJNEN, R. H.; VAN VOORHIS, W. C. Malaria medicines: a glass half full? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 6, p. 424–442, 22 jun. 2015.

WELLS, T.N.; BURROWS, J.N.; BAIRD, J.K. Targeting the hypnozoite reservoir of *Plasmodium vivax*: the hidden obstacle to malaria elimination. **Trends in Parasitology**, v.26, p.145-151, 2010.

WERNSDORFER, W.; PAYNE, D. The dynamics of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. 1991. **Pharmacology & Therapeutics**, **50(1)**: 95-121.

WHITE, N.J. Antimalarial drug resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v.113, n.8, p.1084-1092, 2004.

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

WHITE, N. J.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; HIEN, T.T; FAIZ, M.A.; MOKUOLU, O.L.; DONDORP, A.M. 2014. Malaria. **The Lancet**, **383**: 723–735.

WHO (World Health Organization). The Use of Antimalarial Drugs Report of an Informal Consultation; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2000. **WHO, 144p.**

WHO (World Health Organization). Severe Malária. 2014. **Tropical Medicine and International Health**, **19 (Suppl. 1)**: 7-131.

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

WHO (World Health Organization). Guidelines for the Treatment of Malária, 2015b. **WHO, 318p.**

WHO (World Health Organization). World Malaria Report, 2017. WHO,160p.

WHO (World Health Organization). World Malaria Report, 2019. **WHO, 50p.** (ou 232p. ??)

WHO (World Health Organization). Malária, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/malaria>. Acesso em 08 de jan de 2021.

WHO. GUIDELINES FOR MALARIA-ENDEMIC COUNTRIES. n. August, 2017.

WHO. **World Malaria Report 2020**. World Health Organization. [s.l: s.n.].

WHO Guidelines for malaria - 31 March 2021. **World Health Organization**, v. 1, p. 210, 2021.

WICHT, K. J.; MOK, S.; FIDOCK, D. A. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. **Annual Review of Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 431–454, set. 2020.

WINK, D. A. et al. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 89, n. 6, p. 873–891, jun. 2011.

WONGSRICHANALAI, C.; PICKARD, A.L.; WERNSDORFER, H.; MESHNICK, S.R. Epidemiology of drug-resistant malaria. **The Lancet Infectious Diseases**, v.2, p.209-218, 2002.

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

WOOTON, J.C.; FENG, X.; FERDIG, M.T.; COOPER, R.A.; MU, J.; BARUCH, D.I.; MAGILL, A.J.; SU, X-Z. Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*. **Nature**, v.418, p.320-323, 2002.

WRIGHT, C.W. Traditional antimalarials and the development of novel antimalarial drugs. 2005. **Journal of Ethnopharmacology**, **100(1-2)**: 67-71.

XIA, G.-Y. et al. Withapubesides A–D: natural inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibitors from *Physalis pubescens*. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 15, n. 47, p. 10016–10023, 2017.

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

YAO, Z.-K. et al. Determination of the active stereoisomer of the MEP pathway-targeting antimalarial agent MMV008138, and initial structure–activity studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 7, p. 1515–1519, abr. 2015.

YAYON, A.; TIMBERG, R.; FRIEDMAN, S.; GINSBURG, H. Effects of Chloroquine on the Feeding Mechanism of the Intraerythrocytic Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*1. *The Journal of Protozoology*, v.31, n.3, p.367-372, 1984.

YENJAI, C. et al. Coumarins and carbazoles with antiplasmodial activity from *Clausena harmandiana*. **Planta Medica**, v. 66, n. 3, p. 277–279, 2000.

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

YUSOF, R.; LAU, Y.L.; MAHMUD, R.; FONG, M.Y.; JELIP, J.; NGIAN, H.U.; MUSTAKIM, S.; HUSSIN, H.M.; MARZUKI, N.; ALI, M.M. High proportion of knowlesi malaria in recent malaria cases in Malaysia. 2014. **Malaria Journal**, **13**: 1-9.

YUSTE, J. E. et al. Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, ago. 2015.

ZADOROZHNI, P.V.; KISELEV, V.V.; KARCHENKO, A.V. In silico toxicity evaluation of Salubrinal and its analogues. 2020. **European Journal of Pharmaceutical Science**, **155**: 1-16.

ZALAIS, M.G.; PANG, L.; SILVEIRA, M.S.; MILHOUS, W.K.; WIRTH, D.F. Characterization of *Plasmodium falciparum* isolated from the Amazon region of

Brazil: evidence for quinine resistance. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.58, n.5, p.630-637, 1998.

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

APÊNDICE A – PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO CLÍNICA (ESCORE CLÍNICO)

O escore clínico foi avaliado diariamente, a partir do 5ºdpi. Para essa avaliação foi utilizada a escala rápida de coma e comportamento murino - ERCCM (Carroll et al., 2010) que consiste na observação de 10 parâmetros pontuados de 0 a 2, totalizando 20 pontos. Essa avaliação é dividida em cinco categorias, sendo elas: Coordenação, Comportamento Exploratório, Força e Tônus Muscular, Reflexo de Autopreservação e Higiene.

ESCALA RÁPIDA DE COMA E COMPORTAMENTO MURINO	
Coordenação	Força e Tônus Muscular
Marcha	Posição do Corpo
Balanço/Equilíbrio	Força dos Membros
Comportamento Exploratório	Higiene
Desempenho Motor	Grooming
Reflexos de Autopreservação	
Fuga ao toque	Reflexo Plantar
Reflexo do pavilhão auricular	Agressão

Em cada categoria são avaliados um ou mais parâmetros, os quais são pontuados de acordo com os seguintes critérios:

- 1) **Marcha:** coloca-se o camundongo no interior de uma gaiola e observa-se a marcha do animal.
 - 2 pontos: camundongo anda normalmente;
 - 1 ponto: camundongo anda com dificuldade;
 - 0 pontos: camundongo não consegue andar ou anda rastejando.

- 2) **Balanço/Equilíbrio:** coloca-se o camundongo na beirada da gaiola e observa-o quanto ao equilíbrio.
 - 2 pontos: camundongo consegue se equilibrar por 5 segundos;
 - 1 ponto: camundongo se equilibra com dificuldade (tempo < 5 segundos)
 - 0 pontos: camundongo não consegue se equilibrar.

- 3) Desempenho Motor: coloca-se o camundongo em gaiola vazia e observa-o quanto ao desempenho exploratório.
 - 2 pontos: camundongo explora/percorre os 4 cantos da gaiola em tempo ≤ 20 segundos;
 - 1 ponto: camundongo explora 1 a 4 cantos em tempo > 20 segundos e < 70 segundos;
 - 0 pontos: camundongo não explora a gaiola por tempo > 70 segundos.

- 4) Posição do Corpo: coloca-se o animal sobre uma superfície plana e observa-o quanto à posição do corpo.
 - 2 pontos: camundongo apresenta posição corporal normal
 - 1 ponto: Camundongo apresenta-se encurvado (sinal de dor);
 - 0 pontos: camundongo apresenta-se deitado, sem conseguir se levantar; e quando colocado em posição dorsal não consegue retornar à posição ventral.

- 5) Força dos Membros: coloca-se o camundongo sobre a grade da gaiola levantando as patas traseiras por suspensão da cauda
 - 2 pontos: camundongo agarra-se à grade com as patas frontais e faz força;
 - 1 ponto: camundongo segura-se à grade com as patas frontais, porém sem fazer força;
 - 0 pontos: camundongo não consegue se segurar à grade.

- 6) Fuga ao Toque: encosta-se um objeto (ex: lápis) no dorso do animal, comprimindo-o, levemente, contra a parede da gaiola e observa-o quanto ao movimento de fuga.
 - 2 pontos: camundongo esquiva-se rapidamente do objeto compressor;
 - 1 ponto: camundongo esquiva-se do objeto, porém, com atraso no reflexo de esquiva;
 - 0 pontos: camundongo permanece inerte.

- 7) Reflexo do Pavilhão Auricular: aproxima-se um objeto (ex: lápis) das orelhas do animal e observa-se sinal de reflexo.

- 2 pontos: camundongo apresenta reflexo forte nas duas orelhas;
 - 1 ponto: camundongo apresenta reflexo fraco ou somente em uma orelha;
 - 0 pontos: camundongo não apresenta reflexo em nenhuma orelha.
- 8) Reflexo Plantar: coloca-se o camundongo sobre a grade levantando as patas traseiras por suspensão da cauda e comprime-se as patas traseiras dos animais com a ponta dos dedos para observação dos reflexos.
- 2 pontos: camundongo retrai rapidamente as duas patas após compressão;
 - 1 ponto: camundongo retrai somente uma das patas após compressão ou retrai lentamente/com atraso as duas patas;
 - 0 ponto: camundongo não retrai nenhuma das patas após compressão.
- 9) Agressão: aproxima-se um objeto (ex:lápis) da lateral da face do camundongo e observa-se sua reação.
- 2 pontos: camundongo olha rapidamente para os dois lados ao aproximarmos o objeto e/ou tentativa de morder o objeto;
 - 1 ponto: camundongo reage a somente um dos lados ou aos dois lados, porém com atraso na reação agressiva;
 - 0 pontos: camundongo não reage à aproximação do objeto.
- 10) Grooming: observa-se o estado de higiene do animal.
- 2 pontos: camundongo apresenta-se limpo e com pelo lustroso;
 - 1 ponto: camundongo apresenta pelo opaco e arrepiado (piloereção);
 - 0 pontos: camundongo apresenta pelo opaco, arrepiado, secreção nos olhos e fezes secas no ânus.

De acordo com a avaliação clínica do animal procede-se nova avaliação em intervalos de tempo pré determinados (conforme tabela abaixo) até o momento de sua eutanásia:

Tempo para Reavaliação Clínica	
Pontuação	Tempo para Reavaliação
20 pontos	24 horas
19 a 16 pontos	12 horas
15 a 11 pontos	4 horas
10 a 6 pontos	2 horas
≤ 5 pontos	Eutanásia

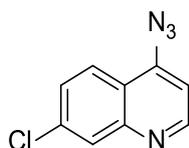
ANEXO A – SÍNTESE DOS DERIVADOS 4-AMINOQUINOLÍNICOS

Os derivados 4-aminoquinolínicos utilizados neste trabalho foram sintetizados pelo doutorando Nicolas Glazmann sob orientação do Prof. Dr. Adilson Silva, os quais tiveram seu processo de síntese realizado conforme descrito abaixo.

A Sigma-Aldrich forneceu todos os produtos químicos utilizados. Um aparelho digital MQAPF-301-Microchemical foi usado para medir os valores da faixa de fusão. Os espectros UV-Vis foram adquiridos usando um Shimadzu UV-1800 com cubetas de quartzo de 1 cm. Os espectros de FTIR foram adquiridos em um Bruker Alpha usando um módulo ATR. Os espectros de RMN ¹H, ¹³C e 2D foram obtidos em um espectrômetro BRUKER AVANCE III 500 MHz e os desvios químicos (δ) são expressos em ppm em relação ao TMS. As análises de HRMS foram realizadas por meio de análise de injeção direta usando o método de ionização por eletrospray (ESI) em um espectrômetro de massa de alta resolução Q-Exactive Plus Orbitrap (ThermoFisher Scientific, Bremen, Alemanha).

• Composto 4

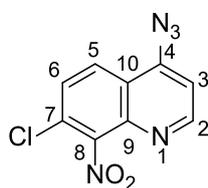
Em um balão de fundo redondo, 3,0 mmol de 4,7-dicloroquinolina foram solubilizados em uma mistura contendo 2,0 mL de etanol e 0,5 mL de água destilada. Em sequência, 6,0 mmol de azida de sódio foram adicionados à mistura reacional, que foi mantida em refluxo e agitação constante por uma noite. Análise por CCD revelou a presença do produto (eluente CH₂Cl₂:MeOH, 9:1, Rf = 0,92, revelador luz UV) e, então, foi realizada uma extração com CH₂Cl₂ e a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e evaporada no rotavapor. O produto foi obtido na forma de um sólido marrom (Rendimento = 92%). F.F. = 112-115°C. As análises espectroscópicas foram condizentes com o que está descrito na literatura (KAMIYA et al., 1980).



Nomenclatura:4-azido-7-cloroquinolina.

- **Composto 5**

O composto foi obtido baseado no procedimento reacional descrito na literatura (STROPPA et al., 2017). Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 1,71 mmol de **4** e, a 0°C com agitação, foi adicionada gota a gota uma mistura de 63,4 µL de H₂SO₄ (solução aquosa 95%) e 12 µL de HNO₃ (solução aquosa 65%). Após 30 min em banho de gelo, a mistura foi submetida a um aquecimento de 80°C por mais 30 min. Em seguida a amostra foi diluída em MeOH e neutralizada com uma solução 2M de NH₄OH para depois ser filtrada a vácuo e lavada com água gelada. **5** foi obtido na forma de um sólido cristalino rosa claro (Rendimento = 90,6%).

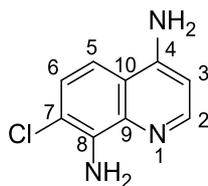


Nomenclatura: 4-azido-7-cloro-8-nitroquinolina.

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm), J (Hz): 7,71 (d, J = 4,7, 1H, H-3); 7,91 (d, J = 9,2, 1H, H-6); 8,23 (d, J = 9,2, 1H, H-5); 8,95 (d, J = 4,8, 1H, H-2). **RMN ¹³C (126 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm):** 112,2 (C-3); 120,2 (C-10); 125,4 (C-7); 125,8 (C-5); 127,2 (C-6); 140,1 (C-9); 145,8 (C-8); 146,7 (C-4); 153,9 (C-2). F.F. = 157-160°C.

- **Composto 6**

Uma solução de 4,7 mL de AcOH contendo 0,2 mmol de **5** foi aquecida a 90°C e em seguida foram adicionados 1,7 mmol de zinco em pó. Após três horas sob agitação a 90°C, o término da reação foi verificado por CCD (eluente CH₂Cl₂:MeOH, 9:1, R_f = 0,5, revelador luz UV) o produto foi filtrado, a solução foi evaporada no rotavapor e o resíduo foi lavado com AcOEt e a solução de AcOEt foi extraída com água saturada de NaCl. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, evaporada no rotavapor e purificada por CCS (eluente CH₂Cl₂:MeOH, 95:5). O produto foi obtido na forma de um sólido lilás escuro (Rendimento = 51,5%) (BURKE; DANHEISER, 2000).

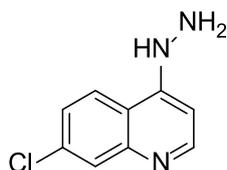


Nomenclatura: 7-cloroquinolina-4,8-diamina.

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm), J (Hz): 5,75 (sl, 2H, NH₂-8); 6,53 (d, J = 5,2, 1H, H-3); 6,73 (sl, 2H, NH₂-4); 7,18 (d, J = 9,0, 1H, H-6); 7,30 (d, J = 9,1, 1H, H-5); 8,21 (d, J = 5,1, 1H, H-2). **RMN ¹³C (126 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm):** 102,9 (C-3); 109,4 (C-6); 112,4 (C-7); 116,9 (C-10); 124,4 (C-5); 139,0 (C-8); 140,8 (C-9); 148,2 (C-2); 151,8 (C-4). F.F. = 110-112°C.

• Composto 7

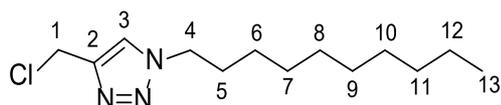
Em um balão de fundo redondo, 4,5 mmol de monocloridrato de hidrazina, 4,5 mmol de bicarbonato de sódio foram dissolvidos em metanol e a mistura foi deixada sob agitação constante por uma hora. Após este intervalo de tempo, foram adicionados 3,0 mmol de 4,7-dicloroquinolina e a mistura reacional foi submetida a uma temperatura de 80°C em refluxo sob agitação constante por uma noite. Foi feita uma análise por CCD (eluente CH₂Cl₂:MeOH, 9:1, R_f = 0,45, revelador luz UV) e o solvente foi evaporado e o produto foi purificado por CCS (eluente CH₂Cl₂:MeOH, 95:5) e, após a evaporação do solvente, o produto foi obtido na forma de um sólido marrom (Rendimento = 51,4%). F.F. 224-228°C. As análises espectroscópicas foram condizentes com o que está descrito na literatura (ANTINARELLI et al., 2015, 2016; SOARES et al., 2017).



Nomenclatura: 7-cloro-4-hidrazinilquinolina.

• Precursor do Composto 8

Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 5,0 mmol de 1-azidodecano, previamente sintetizado seguindo o procedimento de (REN et al., 2011), juntamente com 4,2 mL de DMSO e 3,2 mL de H₂O. Em seguida, o balão foi submetido a banho de gelo e foram adicionados 6,5 mmol de cloreto de propargila, 2,0 mmol de ascorbato de sódio e 0,25 mmol de sulfato de cobre II pentahidratado. A reação foi mantida à temperatura ambiente sob agitação por sete dias. Após esse período, foram adicionados água destilada e CH₂Cl₂ e foi realizada uma extração. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e uma análise por CCD revelou a presença do produto (eluente CH₂Cl₂:MeOH, 95:5, R_f = 0,79, revelador iodo) juntamente com impurezas dos materiais de partida. O produto foi isolado por CCS (eluente hexano:acetato de etila, 1:1) e após a evaporação do solvente, 4-(clorometil)-1-decil-1*H*-1,2,3-triazol foi obtido na forma de um sólido branco (Rendimento = 18,7%). (KOLB; FINN; SHARPLESS, 2001; GLANZMANN et al., 2018)



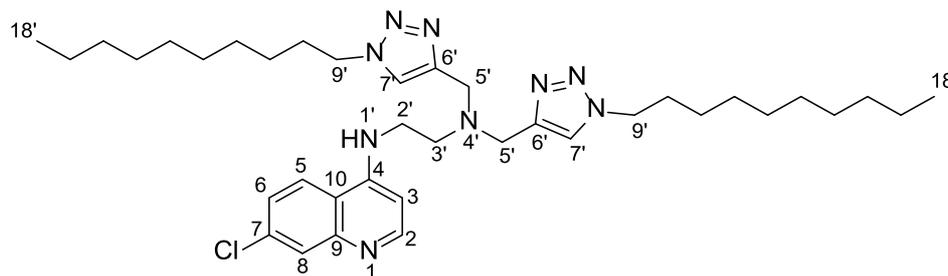
Nomenclatura: 4-(clorometil)-1-decil-1*H*-1,2,3-triazol.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm), J (Hz): 0,86 (t, J = 6,9, 3H, H-13); 1,11 – 1,54 (m, 14H, H-6 a H-12); 1,89 (quint, J = 7,2, 2H, H-5); 4,33 (t, J = 7,3, 2H, H-4); 4,70 (s, 2H, H-1); 7,57 (s, 1H, H-3). **RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ (ppm):** 14,2 (C-13); 22,8 (C-12); 26,6 (C-11); 29,1; 29,3; 29,5; 29,6; 30,4 (C-6 a C-10); 32,0 (C-5); 36,4 (C-1); 50,7 (C-4); 122,6 (C-3); 144,8 (C-2). F.F. = 39-41°C.

• Composto 8

0,58 mmol de 4-(clorometil)-1-decil-1*H*-1,2,3-triazole 0,86 mmol de *N*-(7-cloroquinolin-4-il)-etano-1,2-diamina (CARMO et al., 2011; SOUZA et al., 2011, 2014) foram adicionados a um balão de fundo redondo e dissolvidos em etanol. Após 3 dias submetidos a agitação constante a 60°C, análise por CCD (eluente CH₂Cl₂:MeOH, 9:1, revelador luz UV) revelou a presença do produto (R_f = 0,6). O solvente foi evaporado no rotavapor e os produtos foram isolados por CCS (gradiente CH₂Cl₂/MeOH). O resíduo de 4-(clorometil)-1-decil-1*H*-1,2,3-triazol foi

recuperado com 100% CH_2Cl_2 e o **8** foi obtido com 98% CH_2Cl_2 . O produto foi obtido como um sólido castanho (Rendimento = 21,6%).



Nomenclatura: *N*¹-(7-cloroquinolin-4-il)-*N*²,*N*²-bis((1-decil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)etano-1,2-diamina.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm), J (Hz): 0,87 (t, *J* = 7,0, 6H, H-18'); 1,20 – 1,32 (m, 28H, H-11' a H17'); 1,83 (quint, *J* = 7,0, 4H, H-10'); 2,96 (t, *J* = 5,4, 2H, H-3'); 3,36 (q, *J* = 4,7, 2H, H-2'); 3,88 (s, 4H, H-5'); 4,28 (t, *J* = 7,3, 4H, H-9'); 6,30 (d, *J* = 5,4, 1H, H-3); 6,87 (sl, 1H, NH-1'); 7,45 (dd, *J* = 8,9 e 2,2, 1H, H-6); 7,51 (s, 2H, H-7'); 7,94 (d, *J* = 2,1, 1H, H-8); 8,25 (d, *J* = 9,0, 1H, H-5); 8,48 (d, *J* = 5,3, 1H, H-2). **RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ (ppm):** 14,2 (C-18'); 22,8 (C-17'); 26,6 (C-16'); 29,1; 29,4; 29,5; 29,6; 30,4 (C-11' a C-15'); 32,0 (C-10'); 41,0 (C-2'); 48,3 (C-5'); 50,5 (C-9'); 50,8 (C-3'); 98,9 (C-3); 117,8 (C-10); 122,7 (C-7'); 122,9 (C-5); 125,4 (C-6); 128,4 (C-8); 135,0 (C-7); 144,4 (C-6'); 149,1 (C-9); 150,5 (C-4); 152,0 (C-2). F.F. = 79-81°C.

Abreviações

CCD – cromatografia em camada delgada

CCS – cromatografia em coluna de sílica

F. F. – faixa de fusão

RF – fator de retenção

RMN – ressonância magnética nuclear

ANEXO B – CERTIFICADO CEUA - UFJF 055/2018

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

CERTIFICADO

A COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 12/02/2019, analisou o protocolo nº. 055/2018 intitulado "Avaliação da Atividade Antimalárica de Compostos Sintéticos Derivados de Aminoquinolinas em Modelo Murino de Malária Grave", projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Kézia Katiani Gorza Scopel e colaboração de Adilson David da Silva, Daniela Chaves Renhe e Bárbara Albuquerque Carpinter, a ser realizado no período de 01/04/2019 a 01/04/2021. Por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado pela CEUA. Serão utilizados 135 camundongos C57Bl/6 fêmeas de 6 a 8 semanas, projeto a ser realizado na Sala de manutenção de animais no Núcleo de Pesquisa em Parasitologia no Campos da Universidade Federal de Juiz de Fora. O prazo de validade desse certificado é equivalente à vigência do projeto prorrogável por mais um ano, desde que seja enviada justificativa a CEUA durante a vigência do projeto de acordo com orientação técnica do CONCEA.

CERTIFICATE

We certify that the protocol n. 055/2018 - CEUA about "Avaliação da Atividade Antimalárica de Compostos Sintéticos Derivados de Aminoquinolinas em Modelo Murino de Malária Grave", under responsibility of Kézia Katiani Gorza Scopel and collaboration of Adilson David da Silva, Daniela Chaves Renhe and Bárbara Albuquerque Carpinter, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (Concea) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 12/02/2019. For the development of this research 135 C57Bl/6 female mice, 6 to 8 weeks old, will be delivered as requested in the period of 04/01/2019 to 04/01/2021. The Project will be performed at Parasitology Department located at Federal University of Juiz de Fora/MG. The term of validity of this certificate might be extended for one more year by means of justification during the period of validity.

Juiz de Fora, 20 de fevereiro de 2019.

Coordenadora
CEUA

Vice-Coordenadora
CEUA

ANEXO C – ARTIGO DERIVADOS QUINOLÍNICOS

Chemico-Biological Interactions 355 (2022) 109848



Contents lists available at ScienceDirect

Chemico-Biological Interactions

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chembioint

A simple quinoline salt derivative is active *in vitro* against *Plasmodium falciparum* asexual blood stages and inhibits the development of cerebral malaria in murine model

Jessica Correa Bezerra Bellei^a, Nicolás Glanzmann^b, Bárbara Albuquerque Carpinter^a, Daniela Chaves Renhe^a, Carolina Brandi Marques^a, Marina Rocha Azevedo^a, Livia Maria Barreto^a, Vinicius Novaes Rocha^c, Isabelle Karine da Costa Nunes^d, Henrique Marcelo Gualberto Pereira^d, Elaine Soares Coimbra^a, Eduardo Antônio Ferraz Coelho^e, Adilson David da Silva^b, Fernando de Pilla Varotti^{f,*}, Kézia Katiani Gorza Scopel^{a,**}

^a Research Center Parasitology, Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora/MG 36.036-900, Brazil

^b Department of Chemistry, Institute of Exact Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora/MG 36.036-900, Brazil

^c Research Center of Pathology and Veterinary Histology, Department of Veterinary Medicine / Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora/MG 36.036-900, Brazil

^d Technological Development Support Laboratory, Chemistry Hub, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/RJ 21.941-598, Brazil

^e Postgraduation Program in Health Sciences, Infectology and Tropical Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Av. Alfredo Balena, 190, 30130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^f Research Center on Biological Chemistry (NQBio)/Federal University of São João Del Rei, Divinópolis, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Malaria
Cerebral malaria
Quinoline derivative
Plasmodium falciparum

ABSTRACT

Chloroquine (CQ) was the most effective and widely used drug for the prophylaxis and treatment of severe and non-severe malaria. Although its prophylactic use has led to resistance to *P. falciparum* in all endemic countries, CQ still remains the drug of choice for the treatment of vivax malaria. Otherwise, the speed in which parasite resistance to available antimalarials rises and spreads in endemic regions points to the urgent need for the development of new antimalarials. Quinoline derivatives have been used as a tool in the search for new drugs and were investigated in the present study in an attempt to produce a HIT compound to avoid the cerebral malarial (CM). Seven compounds were synthesized, including three quinoline derivate salts. The cytotoxicity and antiplasmodial activity were assayed *in vitro*, highlighting compound 3 as a HIT, which also showed interaction with ferriprotoporphyrin IX similarly to CQ. Physicochemical and pharmacokinetic properties of absorption were found to be favorable when analyzed *in silico*. The *in vivo* assays, using the experimental cerebral malaria (ECM) model, showed important values of parasite growth inhibition on the 7th day-post infection (Q15 15 mg/kg: 76.9%, Q30 30 mg/kg: 90.1% and Q50 50 mg/kg: 92.9%). Compound 3 also showed significant protection against the development of CM, besides hepatic and renal parameters better than CQ. In conclusion, this quinoline derivative demonstrated promising activity for the treatment of malaria and was able to avoid the development of severe malaria in mice.

1. Introduction

Malaria remains one of the greatest public health challenges worldwide, being endemic in tropical and subtropical regions of the world [1]. According to the World Health Organization (WHO), in 2019,

229 million people suffered with the infection resulting at approximately 409,000 deaths worldwide, especially in children under five years old [1].

Among the species capable of infecting humans, the two most relevant are *P. falciparum* and *P. vivax* from a clinical point of view [1].

** Corresponding author.

* Corresponding author.

E-mail addresses: varotti@ufjf.edu.br (F. de Pilla Varotti), keziagscopel@gmail.com, kezia.scopel@ufjf.edu.br (K.K. Gorza Scopel).

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.109848>

Received 27 October 2021; Received in revised form 28 January 2022; Accepted 7 February 2022

Available online 9 February 2022

0009-2797/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

P. falciparum is the most virulent specie being responsible for severe malaria which includes the CM syndrome [2]. During CM, parasitized red blood cells (pRBCs) are sequestered in cerebral microvessels (phenomenon known as cytoadherence), leading to capillary obstruction and inflammation [3–6]. After that, hemorrhage and cerebral edema occur due to the disruption of the tight junctions between the endothelial cells of the capillary walls that constitute the blood-brain barrier (BBB) [7]. These processes are thought to be a major mechanism underlying the development of CM [8–10]. Despite de severity being associated mostly to *P. falciparum*, *P. vivax* can no longer be considered a 100% benign species. In malaria endemic areas where *P. vivax* is the predominant species, severe cases and deaths have being reported [11–14].

CQ, a 4-aminoquinoline, was the most effective and widely used antimalarial drug for the prophylaxis and treatment of severe and non-severe malaria caused by *P. falciparum*, acting as a blood schizonticidal agent. Despite the high effectiveness of CQ, its prophylactic use has led *P. falciparum* resistance in all endemic countries, reducing its use as monotherapy [15]. Nowadays, CQ is recommended as treatment for malaria *vivax* in areas where there are little or no documented resistance [16], but there are already reports of CQ resistant *P. vivax* strains which includes the Brazilian endemic area [11–14].

In an attempt to stop the spread of *P. falciparum* resistance to antimalarial therapies, treatment of *falciparum* malaria is currently being carried out with artemisinin-based combination therapies (ACT), as recommended by the WHO [17,18]. However, there are already records of decreased susceptibility of parasites to artemisinin and its derivatives in some endemic countries of Asia [19–21]. Furthermore, after the development of CM, there is no drug with high efficacy to reverse this condition, and even patients who do not die after developing the disease severe form can develop irreversible neuro-cognitive sequelae [22,23]. Thus, the need for new drugs for antimalarial therapy is unquestionable.

A widely applicable strategy in the synthesis of new molecules is the formation of organic salts. This strategy is capable of improving the water solubility of bioactive compounds and can even potentialize the biological activity [24]. CQ derived salts have presented pronounced *in vitro* activity in *P. falciparum* CQ-resistant strains and the reason behind the improved performance of the ionic derivatives in relation to CQ was attributed to the amphiphilic character of the ionic compounds [25]. In previous works, the formation of 1,2,3-triazole based salts was able to provide antileishmanial and anticancer agents while the neutral precursors remained inactive [26–28].

In previous studies, our research group showed that some quinoline derivatives were active against *P. falciparum* *in vitro* and against experimental murine malaria, besides showing potent antileishmanial activity [29–32]. Among these derivatives, the most prominent results were obtained for derivatives with terminal alkynes. Compounds containing the ethynyl group present wide application in drug development as they can act as Brønsted acids or reactive centers and because they have favorable properties that can lead to an increased potency [33].

In this study, in order to achieve better antimalarial activity, some quinoline derivative salts (also active against *Leishmania* sp.) were tested, together with other new quinoline derivatives, for cytotoxicity and against CQ-resistant *P. falciparum* strains *in vitro* and in a murine model of cerebral malaria as potential oral drug prototypes.

2. Experimental section

Sigma-Aldrich supplied all chemicals used. A MQAPF-301-Microchemical digital apparatus was used to measure melting range values. UV-Vis spectra were acquired using a Shimadzu UV-1800 with 1 cm quartz cuvettes. FTIR spectra were acquired in a Bruker Alpha using an ATR module. 1H, 13C and 2D NMR spectra were obtained in a BRUKER AVANCE III 500 MHz spectrometer and the chemical shifts (δ) are expressed as ppm in relation to TMS. HRMS analyses were performed through direct injection analysis using the electrospray ionization method (ESI) in a Q-Exactive Plus Orbitrap high resolution mass

spectrometer (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany).

2.1. Synthesis of the tested compounds

The chemical derivatives were obtained as shown in Scheme 1. FT-IR-ATR, NMR and HR-ESI-MS for the novel compounds can be found in the Supplementary Information, as well as NMR and HR-ESI-MS for the main compound 3.

2.1.1. Synthesis

The compounds 1, 2 and 3 were synthesized according to the previously published procedures [31]. Compound 4 was synthesized according to the previously published procedures [34]. Compound 5 was synthesized according to the previously published procedures [35].

2.1.2. Synthesis of compound 6

The synthetic procedure was based on what was used by Stroppa and collaborators to introduce nitro groups in 9-aminoacridine [36]. A mixture containing 64 μ L of H₂SO₄ (95% aqueous solution) and 12 μ L of HNO₃ (65% aqueous solution) was prepared. Then, 1.71 mmol of compound 5 were added to a round-bottom flask and, at 0 °C and, under stirring, the acid mixture was added dropwise. After 30 min at 0 °C, the temperature was raised to 80 °C and the mixture was maintained under stirring for 30 more minutes. Afterwards, the reacting mixture was cooled down, diluted in methanol and neutralized with a 2 M aqueous solution of NaOH, which led to the formation of a light pink solid. The solids were filtered under reduced pressure and washed with cold water to provide the product with a 91% yield. Melting range = 162–165 °C. FT-IR-ATR (cm⁻¹): 2134 (ν_{as} N₃); 1543 (ν_{as} NO₂); 1374 (ν_{s} NO₂); 1308 (ν_{s} N₃). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm), *J* (Hz): 7,71 (d, *J* = 4,7, 1H); 7,91 (d, *J* = 9,2, 1H); 8,23 (d, *J* = 9,2, 1H); 8,95 (d, *J* = 4,8, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 112,2; 120,2; 125,4; 125,8; 127,2; 140,1; 145,8; 146,7; 153,9. HR-ESI-MS: *m/z* calculated for C₉H₄CIN₃O₂ [M+H]⁺ 250.01263, found 250.01083.

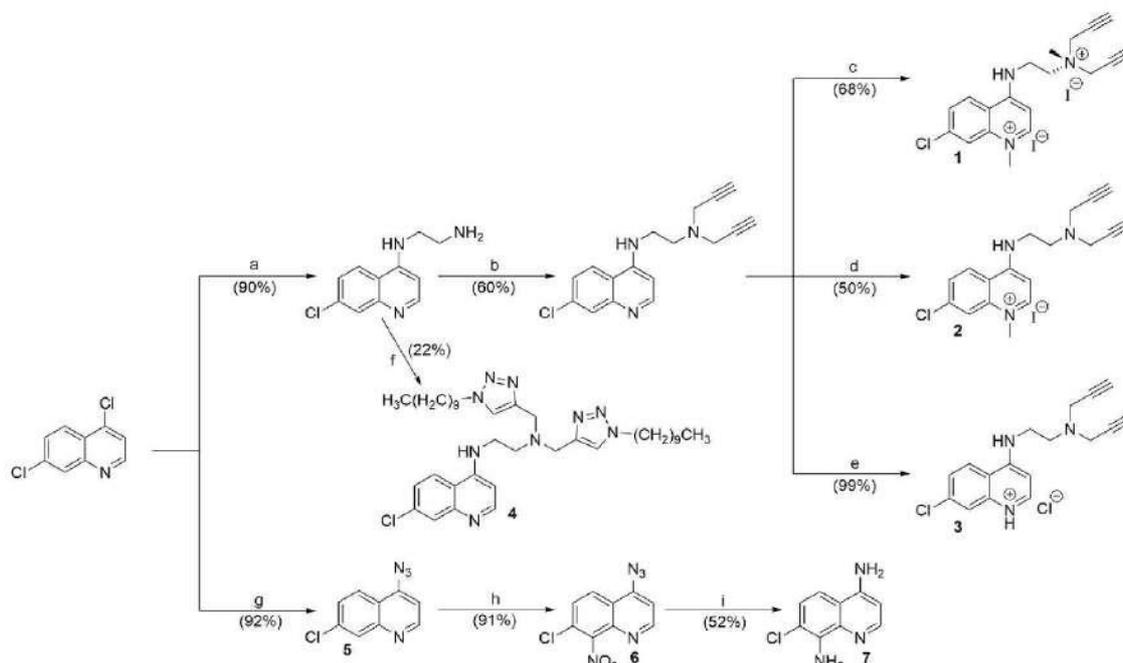
2.1.3. Synthesis of compound 7

The synthetic procedure was adapted from what was described by Burke and Danheiser [37]. In a round-bottom flask, a solution of 4,7 mL acetic acid containing 0,2 mmol of compound 6 was heated until the temperature of 90 °C was reached. Then, 1,7 mmol of powdered zinc were added and the mixture was kept under stirring at 90 °C for 3 h. Afterwards, the solids were filtered off and the solvent was removed under reduced pressure. Ethyl acetate was added to the residue, the solids were filtered off and organic solution was extracted with brine. In sequence, the organics were dried with anhydrous sodium sulfate, filtered and the solvent was removed. Finally, the product was isolated through silica column chromatography (CH₂Cl₂:CH₃OH, 95:5) as a light purple solid with a 52% yield. Melting range = 110–112 °C. FT-IR-ATR (cm⁻¹): 3329 (ν_{as} NH₂); 3222 (ν_{s} NH₂); 1518 (NH₂); 1299 (ν C-N); 763 (NH₂ wagging). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm), *J* (Hz): 5,75 (bs, 2H, NH₂); 6,53 (d, *J* = 5,2, 1H); 6,73 (bs, 2H, NH₂); 7,18 (d, *J* = 9,0, 1H); 7,30 (d, *J* = 9,1, 1H); 8,21 (d, *J* = 5,1, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 102,9; 109,4; 112,4; 116,9; 124,4; 139,0; 140,8; 148,2; 151,8. HR-ESI-MS: *m/z* calculated for C₉H₆CIN₃ [M+H]⁺ 194.04795, found 194.04788.

2.2. Biological experiments

2.2.1. *In vitro* cytotoxicity assay

The *in vitro* cytotoxicity of all compounds was accessed on WI-26VAA4 (ATCC CCL-95.1, USA) human lung fibroblast cells and HepG2 (ATCC HB 8065) human hepatocarcinoma cells. The use of at least a mammalian cell line for cytotoxicity assays have being recommended as a hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases [38]. Cells were cultured in vented bottles with RPMI1640 (Gibco®, EUA) medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and 0.5%



Scheme 1. Synthetic route for the quinoline derivatives. ^a ethylenediamine, 80–110 °C. ^b propargyl bromide, K₂CO₃, ethanol, r. t. ^c CH₃I, acetonitrile, r. t. ^d HCl, acetone, r. t. ^e 4-(chloromethyl)-1-decyl-1H-1,2,3-triazole, ethanol, reflux. ^f NaN₃, ethanol, water, reflux. ^g HNO₃, H₂SO₄, 80 °C. ^h Zn, acetic acid, 90 °C.

of gentamycin in a 5% CO₂ atmosphere and 95% of humidity at 37 °C and cytotoxicity was assessed by the MTT assay (Sigma-Aldrich). Cells were washed with culture medium, trypsinized, distributed in a flat-bottomed 96-well plate (10⁵ cells/well), and incubated for 24 h at 37 °C for adherence [39]. The compounds were diluted (20 µL in culture medium) in different concentrations ranging from 0.01 to 100 µg/mL and incubated with the cells for 48 h under the same conditions of temperature and humidity. CQ, at the same concentrations as the other compounds, was used for comparison purposes.

A 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) solution (5 mg/mL; 20 µL/well) was added to evaluate mitochondrial viability. After 3 h of incubation, the supernatants were carefully removed, 50 µL of DMSO were added to each well, and the reactions were mixed to solubilize the formazan crystals. The optical density was determined at 540 nm to measure the signal and background, respectively [Gen5 (Data Analysis Software- Bio-Tek, USA)] [40]. The absorbance results were calculated as percentage of alive cells in relation to the positive control. Growth inhibition was calculated by the formula: % Inhibition = 1 - (Absorbance of Duplicate Mean × 100) / Absorbance of Negative Control. With the values of the applied concentrations and their percentages of inhibition, log dose response curves were performed in the Origin 8.0 program (Northampton, MA, USA) to calculate the value of CC₅₀ (half-maximal cytotoxic concentration observed to the mammalian cells). The CC₅₀ values are the means of 3 experiments with standard deviation.

2.2.2. *In vitro* antiplasmodial activity

The continuous culture of *P. falciparum* W2 strains (CQ-resistant) was maintained as previously described [41], with minor modifications. Parasites were maintained at 5% hematocrit using type O+ human erythrocytes in RPMI 1640 medium (Gibco®, EUA) supplemented with

25 mM NaHCO₃, 1% albumax, 45 mg/L hypoxanthine, and incubated at 37 °C with a gaseous mixture containing 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂. The parasites at early stages were synchronized at ring stage by 5% sorbitol solution incubation at 37 °C during 10 min [42].

Immediately after synchronization the culture of *P. falciparum* was adjusted to 2% hematocrit and 0.5% parasitemia. A volume of 180 µL/well of the culture was added to the 96 well plate (Corning, EUA), along with 20 µL of the compounds diluted in different concentrations (0,78–50 µg/mL). Thus, *in vitro* antiplasmodial activity of all compounds was assessed via SYBR Green I fluorescence-based assay as described previously [43]. Fluorescence reading was performed in a fluorimeter (Biotek FLX800, USA) with excitation of 484 nm and emission of 535 nm. The half-maximal drug inhibitory response (IC₅₀) was estimated by curve fitting using the software from the Origin 8.0 program (Northampton, MA, USA). The results were compared with drug-free control wells, which were considered to represent 100% parasite viability.

2.2.3. Selectivity index

The selectivity index (SI) correspond to the ratio between the cytotoxic and antiplasmodial activities of each compound tested. The values greater than 10 were considered indicative of lack of toxicity, whereas the compounds with values below 10 were considered toxic [44]. The SI was calculated as follow:

$$SI = \frac{CC_{50} \text{ Cell}}{IC_{50} \text{ P. falciparum}}$$

2.3. Interaction with ferritroporphyrin (Fe(III)PPIX)

The determination of the association constant between compound 3 and the iron protoporphyrin IX (Fe(III)PPIX) was performed as described previously [45]. A 0,54 mM hemin solution was prepared using 5 mL

deionized water, 1 mL tris(hydroxymethyl)aminomethane buffer (pH = 7.5) and 4 mL DMSO. A blank solution was prepared in the same manner, without adding the hemin. A 0.3 mM solution of compound 3 in DMSO was also prepared. In sequence, a titration of 2 mL of the Fe(III) PPIX was performed through successive additions of 20 μ L aliquots of the compound 3 solution. Simultaneously, the blank solution was titrated likewise. The UV-Vis spectra was measured for the Fe(III)PPIX solution after each addition, discounting the blank solution absorption. The absorbance in 402 nm (Soret band) was recorded before the titration and after each addition. The absorbance values were adjusted to the rational equation $A = (A_0 + A_{\infty}K[C]) / (1 + K[C])$ for a 1:1 complexation model through the non-linear least squares method. A_0 is the absorbance for the Fe(III)PPIX solution before the titration, A_{∞} is the absorbance for the compound 3-hemin adduct after saturation (after the titration), A is the absorbance at each point of the titration, K is the association constant and $[C]$ is the concentration of compound 3 at each point of the titration. A value of $\log K = 4.61$ was found for the association constant between compound 3 and hemin. An hypochromism of 29% was calculated through the formula $(A_0 - A_{\infty}) \times 100/A_0$ [32].

2.4. Evaluation of physicochemical properties and absorption pharmacokinetic

Physico-chemical properties were analyzed, *in silico*, in relation to Lipinski's rule of 5 using the SwissADME website [46]. The properties of molecular mass, partition coefficient (ClogP), number of hydrogen donor groups, number of hydrogen acceptor groups and topological polar surface area (TPSA) were predicted.

The absorption pharmacokinetics were estimated by the AdmetSar website [47,48] through the predictive data of absorption to the human intestinal epithelium (HIE), BBB and CACO-2 cell permeability.

2.5. *In vivo* antimalarial activity

2.5.1. Animals

C57BL/6 female mice, 6–8 weeks of age, from the Center of Reproduction Biology (CBR) - CIAEP 02.0048.2019 - of the Federal University of Juiz de Fora - UFJF were used in the *in vivo* experiments, after approval by the ethics committee on animal research (UFJF, number 055/2018). The animals' age was chosen based on previous study which showed that mice younger than 8 weeks are more susceptible to the development of cerebral malaria compared to animals older than 10 weeks [49]. The animals ($n = 5/\text{cage}$) were housed in ALESCO® climate-controlled cabinets with controlled air flow, temperature of 22 ± 2 °C and light control, respecting the animals' circadian rhythm (light/dark cycle of 12 h) with standard rodent food and water *ad libitum*. The care of the laboratory animals and all experimental animal operations were performed according to the international standards recommended in the Manual on the care and use of laboratory animals [50] and the ethical precepts for animal experimentation defined by the National Council for the Control of Animal Experimentation [51].

2.5.2. Murine model of CM

To carry out the proposed experiments, a murine model of CM was used to assess the antimalarial activity of compound with better *in vitro* activity. In mice, CM is observed when animal is infected with *Plasmodium berghei* ANKA (PbA). In this study, the infections were performed by intraperitoneal (i.p.) injection of 10^9 parasitized red blood cells (pRBCs) with PbA as previously described [52,53]. Reduced responsiveness to external stimuli, ataxia, paralysis, coma, and/or convulsions, were considered clinical signals of CM [54].

2.5.3. Drug administration

After infection mice were randomized into six groups: 1) PbA (infected), 2) CQ treated, 3) Non-infected and three treated groups with 15, 30 and 50 mg/kg of compound 3, respectively. The mice were

treated by oral gavage starting from day 3 (when the first PbA asexual blood stages were observed in the blood film) until day 7 post infection (p.i.).

2.5.4. Basic indicator evaluation

Parasitemia was monitored using Giemsa-stained blood smears and inhibition of parasite multiplication (IPM) was calculated by the formula: $[(A - B)/A] \times 100$, where $A =$ parasitemia of the PbA, and $B =$ parasitemia of the group treated with the compounds. The clinical symptoms were evaluated using the rapid murine coma and behavior scale (RMCBS) from day 5 p.i [54] being maintained until the end of experimentation. The RMCBS consists of 10 parameters (gait, balance, motor performance, body position, limb strength, touch escape, pinna reflex, toe pinch, aggression, and grooming). Each parameter is scored 0 to 2, with 0 being the lowest function and 2 being the highest. Animals with clinical score ≤ 5 were euthanized. The survival rate was calculated based in the number of alive animals after 14 days of clinical evaluation.

2.5.5. Macroscopic and histological analysis of the brain

The mice presenting clinical scores ranging from 0 to 5 were anesthetized with an association of 1% xylazine and 5% ketamine, i.p. Macroscopic brain damage, which as hemorrhages, was evaluated by complete removal of the skin on the upper portion of the animals' heads. After photographic recording the animal was euthanized following cardiac perfusion with PBS to remove non-adhered RBC. Animals that did not present clinical score compatible with neurological damage were followed up until the 14th day of infection, when they were euthanized according to the experimental procedures described above.

For histological analysis, the brain was dissected and routinely processed for fixation in formaldehyde 10% for 24 h and paraffin embedding. Sections of 5 μ m were stained by Hematoxylin-Eosin (HE). The histopathology analysis of the mice brains was performed under an optical microscope (AX10, Zeiss) in 40X and 100X magnification lenses to observe areas of inflammation, hemorrhages and vascular obstruction [55].

2.5.6. Biochemical analysis

For biochemical analysis, blood samples were collected by cardiac puncture of the animals and centrifuged to the obtention of serum. Prior to their use, samples were kept at -20 °C. The *in vivo* toxicity was evaluated in the treated and infected mice, by means of dosage of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), which were used as hepatic damage markers, and of urea and creatinine, which were used as renal damage marker. The analyses were performed using commercial kits (Labtest Diagnostica®, Belo Horizonte) according to the manufacturer's instructions.

2.6. Statistical analysis

For the statistical analysis the Shapiro-Wilk normality test ($n < 30$ samples) was performed, followed by analysis of variance by OneWay ANOVA and Tukey post-test for multiple comparisons. Analyses were performed using the GraphPad Prism software version 5.0 for Windows (GraphPad Software). Statistical significance was defined at the 5% level ($P < 0.05$).

3. Results and discussion

The cytotoxicity of the all compounds was evaluated against a human cell fibroblast lineage (WI-26-VA4 # ATCC CCL-95.1) and/or human hepatocarcinoma cells (HepG2 # ATCC HB 8065). The compounds did not show cytotoxic activity up to the highest concentration used (100 μ M) (Table 1). The antiplasmodial activity assessment, conducted against *P. falciparum* (W2 strain), showed IC_{50} values ranging from 0.27 to 141 μ M (Table 1). Regarding the SI, compounds 2, 3 and 4

Table 1
Evaluation of the antiplasmodial activity (IC_{50}) on *P. falciparum* (w2 strain; CQ-resistant) and cytotoxicity (CC_{50}) on WI 26VA-4 and/or HepG2 cells, and determination of the selective index of the quinoline derivatives.

Compound Code	IC_{50} (μ M)	CC_{50} (μ M)		SI	
	<i>P. falciparum</i> W2 \pm SD	WI	HepG2	WI	HepG2
1	61.15 \pm 13.85	>100	>100	>1	>1
2	9.23 \pm 0.54	>100	>100	>10	>10
3	0.27 \pm 0.09	>100	>100	>370	>370
4	8.50 \pm 0.54	>100	NA	>11	NA
5	16.37 \pm 0.20	>100	NA	>6	NA
6	141.74 \pm 8.49	>100	NA	>0.7	NA
7	40.13 \pm 1.55	>100	NA	>2	NA
CQ	0.06 \pm 0.03	>100	NA	>1000	NA
ART	<2.03	>100	NA	>49	NA

CC_{50} : Cytotoxic concentration that inhibits 50% of cell growth; IC_{50} : Concentration that inhibits parasitic growth by 50%; SI: selectivity index; CQ: chloroquine; ART: artesunate; NA: not applicable; SD: Standard Deviation.

showed high selectivity for the parasites (SI > 10) (the values ranged from >10 to >370) (Table 1). Despite the high selectivity, the compounds 2 and 4 showed IC_{50} > 1 μ M and only compound 3 demonstrated IC_{50} < 1 μ M. The reported *in vitro* antiplasmodial activity of the compound 3 reaches a recently established set of criteria for antimalarial hits, which includes: knowledge of the structure-activity; an inhibitory concentration half-maximum response (IC_{50}) < 1 μ M; and SI greater than 10-fold against a human cell line [38].

Considering the promising IC_{50} (corresponding to 0.27 μ M) and SI value (>370) observed for compound 3 the likely mechanism of action was investigated. In order to evaluate the ability of compound 3 to inhibit the formation of hemozoin as one of its antiplasmodial mechanisms of action, an interaction test was carried out between this compound and Fe(III) PPIX, according to previously described procedure [45]. In this assay, a titration of a Fe(III) PPIX solution with a compound 3 solution was performed, which caused a 29% hypochromism in the Soret band of the porphyrin (402 nm), showing an interaction between the titrant and the tided. An association constant of $\log K = 4.61$ was obtained for compound 3. In a recent study, slightly superior association constant values were found for another quinoline derivative ($\log K = 4.77$) and for CQ ($\log K = 4.97$) [32], which suggests that compound 3 interacts with Fe(III)PPIX in a similar way to CQ, potentially inhibiting the hemozoin formation. The spectra in the UV-Vis region for each concentration of compound 3, as well as the absorbance at 402 nm for each concentration can be seen in Fig. 1.

The mechanism of action of CQ is based in the inhibition of hemozoin formation, promoting the death of the parasite [56,57]. During erythrocytic development, the parasites digest hemoglobin in their digestive vacuole, generating amino acids that are used for parasite maturation

and also the heme group (ferroprotoporphyrin IX - Fe(II)PPIX), which is oxidized to ferroprotoporphyrin IX - Fe(III)PPIX and is accumulated in the digestive vacuole of the protozoan [58]. Free heme is highly toxic to the parasites, which converts it into hemozoin, an inert and insoluble polymer innocuous to the parasite, but toxic to the host [57]. The 4-aminoquinolinic compounds act by inhibiting this conversion process of heme into hemozoin crystals, promoting the death of the parasite [58]. Chemical compounds that interfere with the formation of this crystal, such as CQ, have been highly successful in combating malaria for many years [1,59–61].

Due to the *in vitro* selectivity and likely mechanism of action similar to CQ, we next evaluate the *in silico* prediction of physicochemical and pharmacokinetic parameters of absorption in order to assess the bioavailability of compound 3 when administered orally. As oral is the main route of drug administration, it is imperative that a drug candidate present good bioavailability. The compound needs to be well absorbed to become available in the bloodstream and be delivered to the site of action [62–64].

The absorption of a drug can be predicted through its physicochemical properties and Lipinski's rule of 5 is an important filter in the evaluation of these properties that predict whether the compound will present good bioavailability when administered orally. According to this rule, the compound must have molecular weight ≤ 500 g/mol, octanol/water partition coefficient ($\log P$) ≤ 5 , number of hydrogen donors ($NH + OH$) ≤ 5 and number of hydrogen acceptors ($N + O$) ≤ 10 [65].

The SwissADME online platform provides information about the physicochemical properties of a compound through its molecular structure or the molecule's SMILES code. Through these properties, Lipinski's rule of 5 is applied, which establishes that drug candidates may have low absorption and permeability if they violate at least two rules. The physicochemical properties of compound 3 (Table 2) followed Lipinski's Rule of Five, which is predictive of good oral bioavailability and sufficiently acceptable ADME properties.

When a drug, orally administered, dissolves into the gastrointestinal tract, it must be sufficiently permeable to cell membranes to enter the systemic circulation [63,64]. As the pharmacokinetic behavior of a

Table 2
In silico evaluation of physicochemical properties of compound 3 and the antimalarial chloroquine (CQ) the by SwissADME.

Compound Code	MW	LogP	nOH	nOHNH	NV
3	334,24	2,11	1	2	0
CQ	319,87	4,15	2	1	0

MW: molecular weight; Log P: Partition coefficient; nOH: number of hydrogen acceptors; nOHNH: number of hydrogen donors; NV: number of violations of Lipinski's rule; Source: results obtained through the SwissADME online.

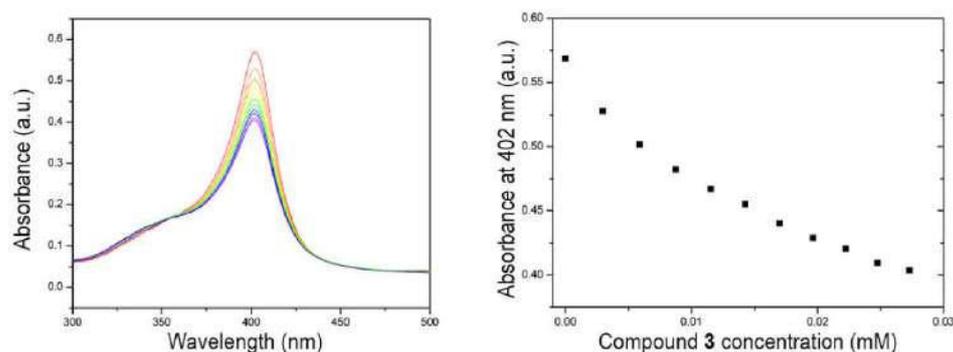


Fig. 1. Spectroscopic titration of Fe(III)PPIX with compound 3.

compound can determine the success or failure of its biological activity, new drug candidates must present good oral bioavailability and good membrane permeability as properties that can lead to successful *in vivo* experiments [66]. In this sense, the AdmetSAR Web tool [48] allows an *in silico* inference of the main pharmacokinetics of the compounds. Table 3 shows the absorption parameters of the compound 3 ADME profile compared to the CQ.

One of the biggest challenges for an orally administered drug is its passage through the intestinal epithelium, which determines the extent of its absorption and, consequently, affects its bioavailability [67]. Several *in vitro* permeability assays that mimic the *in vivo* absorption characteristics have been developed and are a good choice for the study of drug permeability due to their low cost and good yield, compared to *in vivo* assays. The “gold standard” for *in vitro* drug permeability study is the Caco-2 monolayer cell culture model (human colon adenocarcinoma), due to its correlation with human intestinal cells [68]. However, the advent of *in silico* studies makes it possible to predict whether a compound will be able to permeate Caco-2 cells, and consequently be absorbed by the intestinal epithelium. Among the information provided by the AdmetSAR *in silico* program, it was possible to predict the behavior of the molecule in this cell culture, which proved to be permeable as well as the standard antimalarial (CQ).

The topological polar surface area (TPSA) is also an important descriptor for the characterization of drug absorption, including permeability by Caco-2 cells, intestinal absorption, bioavailability, and penetration through the BBB [62]. A study published in 2012 affirmed that molecules with $TPSA < 140 \text{ \AA}^2$ have good intestinal absorption [69]. Through the analysis of molecular descriptors, we observed that the compound 3 TPSA (29.41 \AA^2) is lower than 140 \AA^2 and similar to CQ (28.16 \AA^2), indicating good intestinal absorption. This property was supported by predictive data of high absorption for compound 3 by the human intestine, which demonstrated a 93% probability of being permeable. In addition, compound 3 was highly permeable (99%) to the BBB, a characteristic similar to CQ. This observation demonstrates that, besides being absorbed by the intestine and reaching the bloodstream, the quinoline derivative under study can also cross the BBB.

From the analysis of the absorption pharmacokinetic properties, compound 3 presents a profile that attributes good oral bioavailability, as well as good absorption through biological membranes. Analyzing the molecular structure of this compound, it is possible to notice that compound 3 is a salt, like CQ, which justifies its similar pharmacokinetic profile. Salts involve ionic species that are likely to present good water solubility and are often used by pharmaceutical companies in order to improve the physical, chemical and pharmacokinetic profile of certain products, mainly to improve their absorption [70,71]. Due to these features of high antimalarial potential, low toxicity and a pharmacokinetic profile suggestive of good oral bioavailability, compound 3 was considered suitable for *in vivo* assays.

For the *in vivo* assays, three doses (15, 30 and 50 mg/kg) were orally tested for five days, starting the treatment on the 3rd dpi, after the appearance of the first pRBC. The recommendation for *in vivo* efficacy is that a lead compound should achieve parasite clearance at a dose that eradicates 90% of the target pathogen, when administered orally ($< 50 \text{ mg/kg}$) in the blood stages of infection (typically four doses over 4

days), in the severe malaria mouse model [38]. As shown in Table 4, the parasitemia of infected and treated mice with compound 3 at the three dosages was statistically lower than the untreated group at 7th dpi (Tukey Test, $p < 0.05$) and the IPM was up to 92%. This difference was sustained for the doses of 30 and 50 mg/kg at the 8th and 9th dpi, but not for 15 mg/kg at the 9th dpi. Likewise, no difference was observed in the proportion of circulating parasites in the groups treated with compound 3 at the three dosages in relation to CQ at the 7th dpi, as well as for 30 and 50 mg/kg on subsequent days (Tukey Test, $p > 0.05$). However, the dose of 15 mg/kg, despite showing statistical difference in relation to the untreated control group on the 8th dpi, also presented a difference in relation to the CQ control group.

C57BL/6 mice infected with PbA, without any treatment, develop neurological signs (reduced exploratory behavior, decreased reflex, self-preservation, coma, and epilepsy) resulting in death between days 6 and 11 p.i. [52,53,72] what was consistent with results obtained in this study (Fig. 2A and C). Interestingly, 90%, 70% e 100% of mice treated with 15, 30 and 50 mg/kg of compound 3 survived this critical period of infection without showing any signs of CM (Fig. 2A and C). In addition, treated mice, independently of the concentration of compound 3, presented parasitemia rates under 10% until day 11p.i. (Fig. 2B).

Consistently with clinical assessment, mice who developed CM showed clear hemorrhage areas observed macro (Fig. 2D and E) and microscopically (Fig. 2H). On the other hand, mice protected against CM did not present cerebral damage neither macro (Fig. 2F and G) nor microscopically (Fig. 2I).

Analyzing the hepatic enzymes, the observations made in the present investigation are in accordance with the literature [73–76], with levels of ALT and AST were significantly ($p < 0.05$) elevated in the untreated control (PbA-infected) (Fig. 3). Interestingly, mice receiving compound 3, independently of the dose, exhibited a reduced level of AST in comparison with mice treated with CQ (Fig. 3), indicating safety of the compound to the hepatic function of the host.

The renal parameters were also analyzed by creatinine and urea dosage. Taken together, levels of these markers were found to be higher in PbA group (Fig. 3). However, in the group treated with compound 3, independently of the dose (Fig. 3), levels of urea and creatinine were significantly reduced in comparison with untreated infected mice and with those treated with CQ, indicating the safety of the compound to the kidneys of the rodent host. The results show that the treated mice exhibited less acute hepatic and renal injuries, which may be due to the reduction in parasite burden [74]. However, CQ did not show significant improvement of these parameters, despite the clearance of parasitemia which suggest that compound 3 can be safer than the standard antimalarial as well as have a possible better pharmacokinetic profile.

The liver and kidneys are the organs responsible for the metabolism

Table 3
In silico evaluation of the pharmacokinetic absorption properties of compound 3 and the antimalarial chloroquine (CQ) by AdmetSAR.

Compound Code	TPSA	HIE (p)	Caco-2 (p)	BBB (p)
3	29.41 \AA^2	+ (0.93)	+ (0.70)	+ (0.99)
CQ	28.16 \AA^2	+ (0.99)	+ (0.66)	+ (1.00)

TPSA: topological polar surface area; HIE: human intestinal epithelium; Caco-2: human colon adenocarcinoma cells; BBB: blood-brain barrier; “+” sign: indicates permeability of the compound to the model; (p): probability of the event occurring. Source: Results obtained through the AdmetSAR online.

Table 4
Values of parasitemia reduction on the 7th, 8th and 9th days post infection, after curative test with the compound 3 (15, 30 and 50 mg/Kg).

Compound	Dosage (mg/Kg)	Parasitemia \pm SD (%) Reduction			n
		7th dpi	8th dpi	9th dpi	
3	15	1.58 ± 1.72^a (76,9%)	2.23 ± 2.61^a (58,7%)	4.73 ± 4.97 (15,5%)	15
	30	$0.68 \pm 0.67^{a,b}$ (90,1%)	$0.63 \pm 0.80^{a,b}$ (88,3%)	1.12 ± 1.56 (80,0%)	12
	50	0.49 ± 0.43 (92,9%)	$0.49 \pm 0.74^{a,b}$ (90,9%)	0.67 ± 1.17 (88,0%)	13
CQ	10	0.24 ± 0.05^c (96,9%)	0.21 ± 0.27^c (96,1%)	0.13 ± 0.14^c (97,7%)	9
Water	—	6.85 ± 2.57	5.4 ± 2.22	5.60 ± 1.53	13

dpi: day post infection; CQ: chloroquine; SD: standard deviation; n: number of animals belonging to the group.

- a p value < 0.05 (compared to the water-treated group).
b p value > 0.05 (compared to the CQ-treated group).

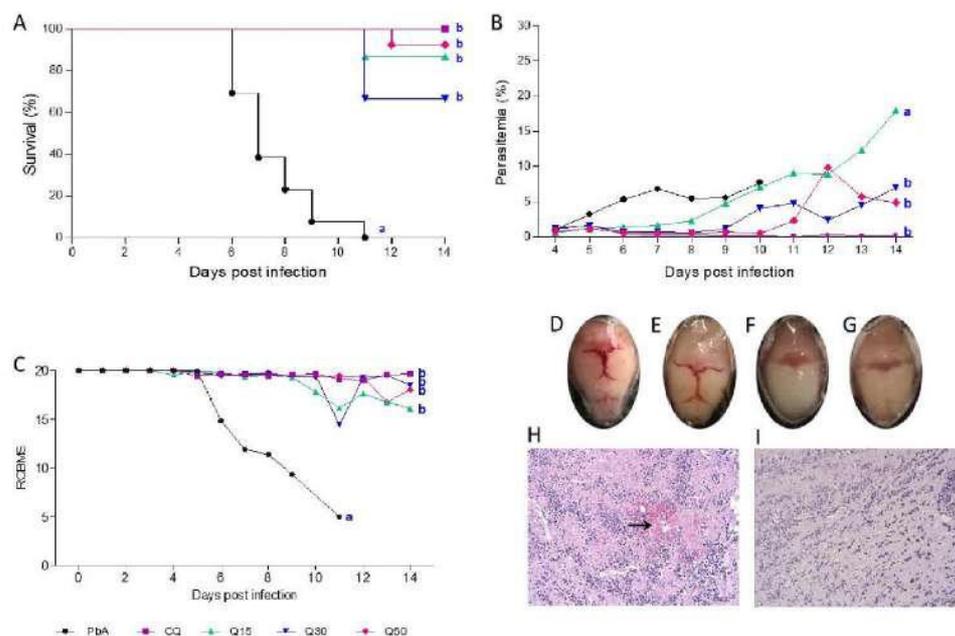


Fig. 2. Effect of compound 3 (15, 30 and 50 mg/kg) on distinct parameters from C57BL/6 mice infected with *P. berghei* ANKA. (A) Compound 3 significantly prolonged the survival of mice inhibiting the CM development; (B) Effect of compound 3 on parasitemia in PbA-infected mice; (C) RCBME score (D–G) Macroscopic analysis of the brain: (D) PbA infected animals, (E) PbA infected and treated with compound 3 who developed CM, (F) PbA infected and treated with chloroquine and (G) PbA infected and treated with compound 3 and protected against CM; and (H–I) microscopic analysis of the brain: (H) PbA infected animals, black arrow shows hemorrhagic area; (I) PbA infected animals and treated with compound 3. Equal letters (a or b) indicate no significant difference (p value > 0.05 (ANOVA + Post Test Tukey)). Different letters (a or b) indicate significant difference (p value < 0.05 (ANOVA + Post Test Tukey)).

and excretion of drugs, so, altered renal or hepatic function can significantly affect drug concentrations [77]. As well as altering elimination, the first pass metabolism can also be affected and thus the absorption and bioavailability of drugs. These changed pharmacokinetics can lead to increased or decreased exposure, resulting in either toxicity or reduced efficacy, which could be of clinical relevance based on the therapeutic window and pharmacodynamics of the specific drug [77].

Severe malaria can lead to hepatic dysfunction in association with multiple organ failure. So, elevations of liver cytoplasmic enzymes are common, including raised AST and ALT [75,78,79]. Likewise, serum levels of creatinine and urea are of clinical importance for the assessment of kidney function. High levels indicate the renal inability to filter out creatinine and urea, which corresponds to the deposition of hemozoin in kidneys and renal impairment that further the apparent low glomerular filtration rate and acute renal failure [80].

4. Conclusion

Malaria is a serious public health disease that affects millions of people around the world and its severe form is responsible for thousands of deaths annually, which makes the need for the development of new drugs emergent. Selection of appropriate HIT compounds is an important criterion for further lead development and demands thorough investigation at the early stage for the likelihood of clinical success. For this, acceptable *in vitro* potency, oral efficacy and bioavailability; good selectivity index without any toxicity; acceptable physicochemical properties and good pharmacokinetic profile are important criteria for drug discovery research. Specifically, the case of malaria, $IC_{50} < 1 \mu\text{M}$ for sensitive and multiple resistant strains of *Plasmodium* spp. With 10-fold selectivity is recommended for the HIT compound besides the *in*

in vivo efficacy, for which the recommendation is that a lead compound should achieve parasite clearance at a dose that eradicates 90% of the target pathogen, when orally administered (< 50 mg/kg) in the blood stages of infection (typically four doses over 4 days), in the severe malaria mouse model [38].

In this study we identified a HIT compound (compound 3) showing prominent antimalarial activity even against the CQ-resistant *P. falciparum*. In addition, for the *in vivo* assay, the compound 3 also exhibited activity against a virulent strain of *P. berghei* inhibiting the asexual blood parasites development (rates ranging from 15.5–92%) and preventing the development of CM. This compound may also act against other parasites as demonstrated by our research group in a recent publication describing potent antileishmanial activity [31]. Besides, the compound 3 may hold promise as an adjuvant therapy to improve the treatment of severe malaria, however, the mechanisms by which this compound acts to prevent the severity of malaria infection remains to be investigated.

Author contributions

NG prepared the synthesis and together with IKCN and HMGP conducted the characterization of compounds; JCB, BAC, DCR and VNR performed *in vitro* and/or *in vivo* experiments; ESC, ADS, EAFC, FPV and KKGS obtained the funding, designed the experimental protocol, supervised the studies, and wrote the manuscript. All authors contributed to the interpretation of the data and reviewed the final manuscript.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial

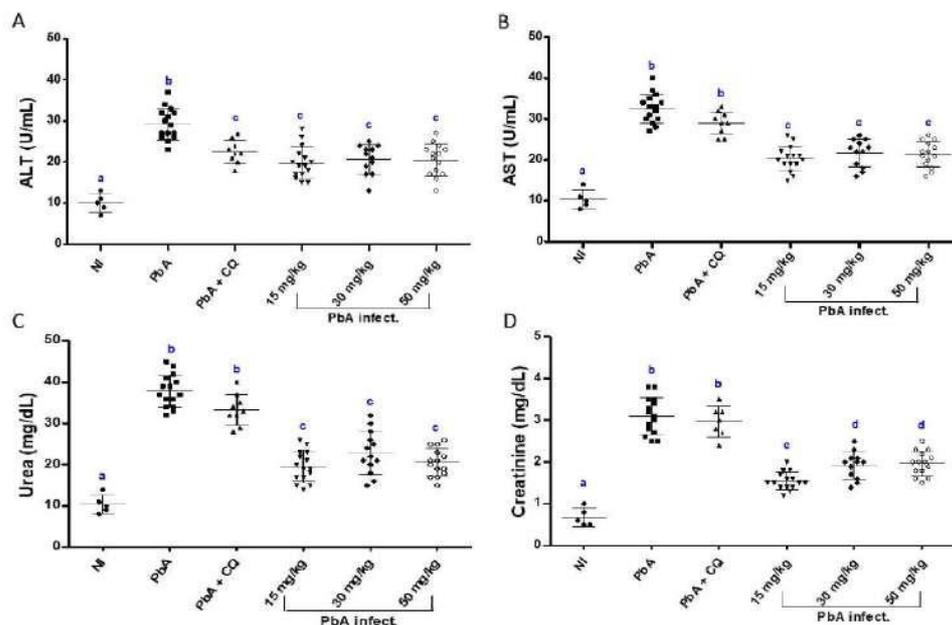


Fig. 3. Liver [ALT (A), AST (B)] and kidney [urea (C), creatinine (D)] function tests in non-infected mice, PbA-infected without treatment or treated with compound 3 (15, 30 and 50 mg/kg) or CQ (10 mg/kg). Equal letters (a, b or c) indicate no significant difference (p value > 0.05 (ANOVA + Post Test Tukey). Different letters (a, b or c) indicate significant difference (p value < 0.05 (ANOVA + Post Test Tukey).

interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgement

This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG:APQ #454575/2014-9 and Rede Mineira #00316-16) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.109848>.

References

- [1] WHO, World Malaria Report 2020, World Health Organization, 2020.
- [2] M.A. Phillips, J.M. Burrows, C. Manyando, R.H. Van Huijsdujnen, W.C. Van Voorhis, T.H.C. Wells, Malaria, *Nat. Rev. Dis. Prim.* 3 (2017), <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.50>.
- [3] M. Aikawa, Human cerebral malaria, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39 (1988) 3–10, <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1988.39.3>.
- [4] A.R. Berendt, D.J.P. Ferguson, J. Gardner, G. Turner, A. Rowe, C. McCormick, D. Roberts, A. Craig, R. Pinches, B.C. Hford, C.I. Newbold, Molecular mechanisms of sequestration in malaria, *Parasitology* 106 (1994) S19–S28, <https://doi.org/10.1017/S0031182000075685>.
- [5] D. Mohanty, J.K. Patnaik, S. Mohanty, S.K. Sarpathy, B.S. Das, S.K. Mishra, Vascular clogging, mononuclear cell margination, and enhanced vascular permeability in the pathogenesis of human cerebral malaria, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51 (1994) 642–647, <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1994.51.642>.
- [6] G.D.H. Turner, H. Morrison, M. Jones, T.M.E. Davis, S. Looareesuwan, I.D. Butley, K.C. Gatter, C.I. Newbold, S. Pukitayakamee, B. Hagschiata, H.J. White, A. R. Berendt, An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria: evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration, *Am. J. Pathol.* 145 (1994) 1057–1069.
- [7] M. Hawkes, R.E. Elphinstone, A.L. Conroy, K.C. Kain, Contrasting pediatric and adult cerebral malaria: the role of the endothelial barrier, *Viralence* 4 (2013), <https://doi.org/10.4161/viru.25949>.
- [8] G.G. MacPherson, M.J. Warrall, H.J. White, S. Looareesuwan, Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration, *Am. J. Pathol.* 119 (1985) 385–401.
- [9] A.R. Berendt, G.D.H. Turner, C.I. Newbold, Cerebral malaria: the sequestration hypothesis, *Parasitol. Today* 10 (1994) 412–414, [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(94\)90238-0](https://doi.org/10.1016/0169-4758(94)90238-0).
- [10] T.E. Taylor, W.J. Fu, R.A. Carr, R.O. Whitten, J.G. Mueller, N.G. Posiko, S. Lewallen, N.G. Liomba, M.E. Molyneux, Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts, *Nat. Med.* 10 (2004) 143–145, <https://doi.org/10.1038/nm986>.
- [11] K.H. Rieckmann, D.R. Davis, D.C. Hutton, Plasmodium vivax resistance to chloroquine, *Lancet* 334 (1989) 1183–1184, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(89\)91792-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(89)91792-3).
- [12] E.J. Phillips, J.S. Keystone, K.C. Kain, Failure of combined chloroquine and high-dose primaquine therapy for Plasmodium vivax malaria acquired in Guyana, South America, *Clin. Infect. Dis.* 23 (1996) 1171–1175, <https://doi.org/10.1093/cid/23.5.1171>.
- [13] F.S. de S. Filho, A.R. de L. Arcaño, Y.M. Chehuan, M.R. Costa, F.E. Martinez-Espinosa, J.L. Vieira, M. das, G.V. Barbosa, W.D. Alccrim, M. das, G.C. Alccrim, Chloroquine-resistant Plasmodium vivax, Brazilian Amazon, *Emerg. Infect. Dis.* 13 (2007) 1125–1126, <https://doi.org/10.3201/eid1307.061386>.
- [14] M.M. Marques, M.R.F. Costa, F.S. Santana Filho, J.L.F. Vieira, M.T.S. Nascimento, L.W. Brasil, E. Nogueira, H. Silveira, R.C. Reyes-Lecca, W.M. Monteiro, M.V. G. Lacerda, M.G.C. Alccrim, Plasmodium vivax chloroquine resistance and anemia in the western Brazilian Amazon, *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (2014) 342–347, <https://doi.org/10.1128/AAC.02779-12>.
- [15] L.M.B. Urso, P.D. Roepe, Chloroquine resistance in the malarial parasite, Plasmodium falciparum, *Med. Res. Rev.* 22 (2002) 465–491, <https://doi.org/10.1002/med.10016>.
- [16] W. Health, O. Who, WHO Guidelines for malaria - 16 February, *WHO Guidelines Malar* 1 (2021) 210.
- [17] WHO, GUIDELINES FOR MALARIA-ENDEMIC COUNTRIES, 2017.
- [18] R.M. Beteck, F.J. Smit, R.K. Haynes, D.D. N'Da, Recent progress in the development of anti-malarial quinolones, *Malar. J.* 13 (2014) 1–10, <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-339>.
- [19] H. Noeld, Y. Se, K. Schaefer, B.L. Smith, D. Socheat, M.M. Fukuda, Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia, *N. Engl. J. Med.* 359 (2008) 2619–2620, <https://doi.org/10.1056/nejme0805011>.
- [20] A.M. Dondorp, F. Mosten, P. Yi, D. Das, W. Harjotohokpong, D. Ph, S.J. Lee, P. Ringwald, M. Imwong, K. Chotivanich, P. Lim, Europe PMC funders group

- Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria, *N. Engl. J. Med.* 361 (2012) 455–467, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa080859.Artemisinin>.
- [21] C.J. Woodrow, H.J. White, The clinical impact of artemisinin resistance in Southeast Asia and the potential for future spread, *FEBS Microbiol. Rev.* 41 (2017) 34–48, <https://doi.org/10.1093/femsre/rwv037>.
- [22] A.M. Dondorp, Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial, *Lancet* 366 (2005) 717–725, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67176-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67176-0).
- [23] M.J. Boivin, P. Bangirana, J. Byarugaba, R.O. Opoka, E. Idro, A.M. Jurek, C. C. John, Cognitive impairment after cerebral malaria in children: a prospective study, *Pediatrics* 119 (2007) e360–e366, <https://doi.org/10.1542/peds.2006-2027>.
- [24] S. Kalepu, V. Nekkanti, Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects, *Acta Pharm. Sin. B.* 5 (2015) 442–453, <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.07.003>.
- [25] A.T. Silva, L. Lobo, I.S. Oliveira, J. Gomes, C. Teixeira, F. Nogueira, E.F. Marques, R. Petraz, P. Gomes, Building on surface active ionic liquids for the resending of the antimalarial drug chloroquine, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 1–9, <https://doi.org/10.3390/ijms21155334>.
- [26] P.H.F. Stroppa, L.M.R. Antinarelli, A.M.L. Carmo, J. Carneiro, E.S. Coimbra, A. D. da Silva, Effect of 1,2,3-triazole salts, non-classical biosisteres of miltefosine, on *Leishmania amazonensis*, *Bioorg. Med. Chem.* 25 (2017) 3034–3045, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.03.051>.
- [27] E.M. de Souza-Fagundes, J. Delp, P.H.D.M. Prazeres, L.B. Marques, A.M.L. Carmo, P.H.F. Stroppa, M. Glanzmann, J. Kisita, D. Szamosvári, T. Bötcher, M. Leist, A. D. da Silva, Correlation of structural features of novel 1,2,3-triazoles with their neurotoxic and tumoricidal properties, *Chem. Biol. Interact.* 291 (2018) 253–263, <https://doi.org/10.1016/j.cb.2018.06.029>.
- [28] R.S. Meind, A. das, C. Almeida, P.H.F. Stroppa, M. Glanzmann, E.S. Coimbra, A. D. da Silva, Novel functionalized 1,2,3-triazole derivatives exhibit antileishmanial activity, increase in total and mitochondrial ROS and depolarization of mitochondrial membrane potential of *Leishmania amazonensis*, *Chem. Biol. Interact.* 315 (2020) 108850, <https://doi.org/10.1016/j.cb.2019.108850>.
- [29] N.E. de Souza, A.M.L. Carmo, D.C. Lagatta, M.J.M. Alves, A.P.S. Fontes, E. S. Coimbra, A.D. da Silva, C. Abramo, 4-aminoquinoline analogues and its platinum (II) complexes as antimalarial agents, *Biomed. Pharmacother.* 65 (2011) 313–316, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2011.03.003>.
- [30] R.R. Soares, J.M.F. Da Silva, B.C. Carlos, C.C. Da Fonseca, L.S.A. De Souza, F. V. Lopes, R.M. De Paula Dias, P.O.L. Moreira, C. Abramo, G.H.R. Viana, F. De Pila Varotti, A.D. Da Silva, K.K.G. Scopel, New quinoline derivatives demonstrate a promising antimalarial activity against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in vivo, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25 (2015) 2308–2313, <https://doi.org/10.1016/j.bml.2015.04.014>.
- [31] S.L. Calixto, M. Glanzmann, M.M. Xavier Silveira, J. da Trindade Granato, K. K. Gorza Scopel, T. Torres de Aguiar, R.A. Daldatto, G.C. Macedo, A.D. da Silva, E. S. Coimbra, Novel organic salts based on quinoline derivatives: the in vitro activity trigger apoptosis inhibiting autophagy in *Leishmania* spp., *Chem. Biol. Interact.* 293 (2018) 141–151, <https://doi.org/10.1016/j.cb.2018.08.003>.
- [32] J.A. Marinho, D.S. Martins Guimarães, M. Glanzmann, G. de Almeida Pimentel, I. Karine da Costa Nunes, H.M. Gualberto Pereira, M. Navarro, F. de Pilla Varotti, A. David da Silva, C. Abramo, In vitro and in vivo antiparasitic activity of novel quinoline derivative compounds by molecular hybridization, *Eur. J. Med. Chem.* 215 (2021), <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113271>.
- [33] T.T. Talele, Acetylurea group: friend or foe in medicinal chemistry, *J. Med. Chem.* 63 (2020) 5625–5663, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01617>.
- [34] M. Glanzmann, L.M.R. Antinarelli, L.K. da Costa Nunes, H.M.G. Pereira, E.A. F. Coelho, E.S. Coimbra, A.D. da Silva, Synthesis and biological activity of novel 4-aminoquinoline, 1,2,3-triazole hybrids against *Leishmania amazonensis*, *Biomed. Pharma* 141 (2021) 111857, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111857>.
- [35] S. Kamiya, S. Saeyoshi, M. Miyahara, K. Yanagimachi, T. Nakashima, Synthesis of 4-azidoquinoline 1-oxides and related compounds, *Chem. Pharm. Bull.* 28 (1980) 1485–1490, <https://doi.org/10.1248/cpb.28.1485>.
- [36] P. Stroppa, M. Glanzmann, I. Duarte, R. Sato, M. de Oliveira, A. da Silva, New 9-aminoquinoline derivative: synthesis, study and potential application as pH indicator in organic solvents, *J. Braz. Chem. Soc.* (2017), <https://doi.org/10.21577/0103-5033.20170084>.
- [37] R.L. Bucke, S. D. DANHEISER, *Handbook of Reagents for Organic Synthesis Oxidizing and Reducing Agents*, 2000. New York.
- [38] K. Katsuno, J.M. Burrows, K. Duncan, R.H. Van Huijdujnen, T. Kaneko, K. Kita, C. E. Mowbray, D. Schmatz, P. Warner, B.T. Slingsby, Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world, *Nat. Rev. Drug Discov.* 14 (2015) 751–758, <https://doi.org/10.1038/nrd4683>.
- [39] F. Denizot, R. Lang, Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, *J. Immunol. Methods* 89 (1986) 271–277, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90368-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90368-6).
- [40] T. Mossmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [41] W. Trager, J. Jensen, Human malaria parasites in continuous culture, *Science* (80-) 193 (1976) 673–675, <https://doi.org/10.1126/science.781840>.
- [42] C. Lambros, J.P. Vanderberg, Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture, *J. Parasitol.* 65 (1979) 418–420, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/383936>.
- [43] M. Snilkstein, N. Srivallajaroen, J.X. Kelly, P. Willarat, M. Riscoe, Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening, *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (2004) 1803–1806, <https://doi.org/10.1128/AAC.48.5.1803-1806.2004>.
- [44] C. Bézián, S. Tomasi, F. Lohézic-Le Dévéhat, J. Boustie, Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines, *Phytomedicine* 10 (2003) 499–503, <https://doi.org/10.1078/094471103322331458>.
- [45] T.J. Egan, W.W. Mavuso, D.C. Ross, H.M. Marques, Thermodynamic factors controlling the interaction of quinoline antimalarial drugs with ferritroporphyrin IX, *J. Inorg. Biochem.* 68 (1997) 137–145, [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(97\)00086-X](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(97)00086-X).
- [46] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–13, <https://doi.org/10.1038/srep42717>.
- [47] F. Cheng, W. Li, Y. Zhou, J. Shen, Z. Wu, G. Liu, P.W. Lee, Y. Tang, admetSAR: a comprehensive Source and free tool for assessment of chemical ADMET properties, *J. Chem. Inf. Model.* 52 (2012) 3099–3105, <https://doi.org/10.1021/ci300367a>.
- [48] H. Yang, C. Lou, L. Sun, J. Li, Y. Cai, Z. Wang, W. Li, G. Liu, Y. Tang, AdmetSAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties, *Bioinformatics* 35 (2019) 1067–1069, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty707>.
- [49] C. Pierrot, E. Adam, S. Lafitte, C. Godin, D. Dive, M. Capron, J. Khalife, Age-related susceptibility and resistance to *Plasmodium berghei* in mice and rats, *Exp. Parasitol.* 104 (2003) 81–85, [https://doi.org/10.1016/S0014-4894\(03\)00134-6](https://doi.org/10.1016/S0014-4894(03)00134-6).
- [50] N.R.C. of the H.A., The. Notice, in: *Guid. Care Use Lab. Anim.*, 2011, p. 246.
- [51] T.E.L. Ministério Da Ciência, C.N.D.C. De, Experimentação animal – CONCEA, Ho title, in: *Dir. Bras PARA O Cuid. E A Util. ANIMAIS PARA FINS CIENTÍFICOS, E DIDÁTICOS - DBCA*, 2013, p. 50.
- [52] I.M. Medina, H.H. Hunt, T. Chan-Ling, Early activation of microglia in the pathogenesis of fatal murine cerebral malaria, *Glia* 19 (1997) 91–103, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199702\)19:2<91::AID-GLIA1>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199702)19:2<91::AID-GLIA1>3.0.CO;2-C).
- [53] X. Jiang, L. Chen, Z. Zheng, Y. Chen, X. Weng, Y. Guo, K. Li, T. Yang, S. Qu, H. Liu, Y. Li, X. Zhu, Synergistic effect of combined artesunate and tetramethylpyrazine in experimental cerebral malaria, *ACS Infect. Dis.* 6 (2020) 2400–2409, <https://doi.org/10.1021/acsnid.0c00124>.
- [54] R.W. Carroll, M.S. Wainwright, K.Y. Kim, T. Kidambi, N.D. Gómez, T. Taylor, K. Halder, A rapid murine cone and behavior scale for quantitative assessment of murine cerebral malaria, *PLoS One* 5 (2010) 1–12, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013124>.
- [55] H. Ngo-Thanh, T. Sasaki, K. Suzue, H. Yokoo, K. Isoda, W. Kamitani, C. Shimokawa, H. Hisaeda, T. Imai, Blood–cerebrospinal fluid barrier: another site disrupted during experimental cerebral malaria caused by *Plasmodium berghei* ANKA, *Int. J. Parasitol.* 50 (2020) 1167–1175, <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.07.007>.
- [56] Irwin W. Sherman, *Parasite Biology, Pathogenesis and Protection*, Washington, DC, 1998.
- [57] T.H.Á. da Silva, M.T. de Oliveira, H.F. dos Santos, A.B. de Oliveira, W.B. De Almeida, Estudo de modagem molecular de complexos ferritropoferrina IX e quinolinocarbinolaminas antimaláricas: proposta de um farmacóforo, *Quim. Nova* 28 (2005) 244–249, <https://doi.org/10.1590/s0100-40422005000200015>.
- [58] I.W. Sherman, Amino acid metabolism and protein synthesis in malarial parasites, *Bull. World Health Organ.* 55 (1977) 265–276.
- [59] L.H. Miller, H.C. Ackerman, X. Su, T.E. Wellens, Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments, *Nat. Med.* 19 (2013) 156–167, <https://doi.org/10.1038/nm.3073>.
- [60] C. Amaratunga, P. Lim, S. Suen, S. Sreng, S. Mao, C. Sopha, B. Sam, D. Dek, V. Try, R. Amato, D. Blessborn, L. Song, G.S. Tullio, M.P. Fay, J.M. Anderson, J. Tarning, R. M. Fairhurst, Dihydroartemisinin–piperaquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: a multi-site prospective cohort study, *Lancet Infect. Dis.* 16 (2016) 357–365, [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00487-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00487-9).
- [61] C. O'Brien, P.P. Henrich, N. Passi, D.A. Pfoefel, Recent clinical and molecular insights into emerging artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*, *Curr. Opin. Infect. Dis.* 24 (2011) 570–577, <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32834c43ed>.
- [62] J. Lin, D. Sahakian, S. de Moraes, J. Xu, R. Polzer, S. Winter, The role of absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity in drug discovery, *Curr. Top. Med. Chem.* 3 (2003) 1125–1154, <https://doi.org/10.2174/15680260335452096>.
- [63] M.P. Gleeson, Generation of a set of simple, interpretable ADMET rules of thumb, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 817–834, <https://doi.org/10.1021/jm701122q>.
- [64] M.E. Ruiz, S. Scellì Montoto, Routes of drug administration, in: *ADME Process. Pharm. Sci.*, Springer International Publishing, Cham, 2018, pp. 97–133, https://doi.org/10.1007/978-3-319-99593-9_6.
- [65] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 23 (1997) 3–25, [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00423-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1).
- [66] A.L. da Fonseca, R.R. Nunes, V.M.L. Braga, M. Comar Jr., R.J. Alves, F. de P. Varotti, A.G. Taranto, Doeking, QM/MM, and molecular dynamics simulations of the hexose transporter from *Plasmodium falciparum* (PfHT), *J. Mol. Graph. Model.* 66 (2016) 174–186, <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2016.03.015>.
- [67] H.P. The, I. González-Álvarez, M. Betreño, V.M. Sanjuan, I. Centelles, T. M. Garrigues, M.Á. Cabrera-Pérez, In silico prediction of caco-2 cell permeability by a classification QSAR approach, *Mol. Inform.* 30 (2011) 376–385, <https://doi.org/10.1002/minf.201000118>.
- [68] G. Caldwell, Z. Yan, W. Tang, M. Dasgupta, B. Hasting, ADME optimization and toxicity assessment in early- and late-phase drug discovery, *Curr. Top. Med. Chem.* 9 (2009) 965–980, <https://doi.org/10.2174/156802609789630929>.

- [69] J. Ali, P. Camilleri, M.B. Brown, A.J. Hutt, S.B. Kirton, Revisiting the general solubility equation: in silico prediction of aqueous solubility incorporating the effect of topographical polar surface area, *J. Chem. Inf. Model.* 52 (2012) 420–428, <https://doi.org/10.1021/ci200387c>.
- [70] G.S. Paulekuhn, J.B. Dressman, C. Sosl, Trends in active pharmaceutical ingredient salt selection based on analysis of the orange book database, *J. Med. Chem.* 50 (2007) 6665–6672, <https://doi.org/10.1021/jm701032y>.
- [71] D. Gupta, D. Bhatia, V. Dave, V. Satariya, S.V. Gupta, Salts of therapeutic agents: chemical, physicochemical, and biological considerations, *Molecules* 23 (2018) 1–15, <https://doi.org/10.3390/molecules23071719>.
- [72] X. He, J. Yan, X. Zhu, Q. Wang, W. Pang, Z. Qi, M. Wang, E. Luo, D.M. Parker, M. T. Cantorna, L. Cui, Y. Cao, Vitamin D inhibits the occurrence of experimental cerebral malaria in mice by suppressing the host inflammatory response, *J. Immunol.* 193 (2014) 1314–1323, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400089>.
- [73] D.P. Mishra, S. Das, M. Patnaik, S.C. Singh, R.K. Jena, Relationship of hepatic and renal dysfunction with haemorrhological parameters in *Plasmodium falciparum* malaria, *J. Assoc. Phys. India* 59 (2011) 552–556, <https://doi.org/10.18410/jebmh/2015/393>.
- [74] M. Al-Salahy, B. Shnawa, G. Abed, A. Mandour, A. Al-Ezzi, Parasitaemia and its relation to hematological parameters and liver function among patients malaria in abs, hajjah, northwest Yemen, *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2016 (2016) 1–5, <https://doi.org/10.1155/2016/5954394>.
- [75] H. Mizobuchi, W. Fujii, S. Isokawa, K. Ishizuka, Y. Wang, S. Watanabe, C. Sanjoba, Y. Matsumoto, Y. Goto, Exacerbation of hepatic injury during rodent malaria by myeloid-related protein 14, *PLoS One* 13 (2018) 1–25, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199111>.
- [76] V. Gorki, M.S. Walter, R. Singh, M. Chanhan, M. Dhiogra, D.B. Salunke, S. Kaur, β -Carboline derivatives tackling malaria: biological evaluation and docking analysis, *ACS Omega* 5 (2020) 17993–18006, <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01256>.
- [77] F. Marra, E.J. Smolders, O. El-Sherif, A. Boyle, K. Davidson, A.J. Sommerville, C. Marzolini, M. Siccardi, D. Burger, S. Gibbons, S. Khoo, D. Back, Recommendations for dosing of repurposed COVID-19 medications in patients with renal and hepatic impairment, *Drugs R 21* (2021) 9–27, <https://doi.org/10.1007/s40268-020-00333-0>.
- [78] A.C. Anand, C. Ranji, A.S. Narula, W. Singh, Malarial hepatitis: a heterogeneous syndrome?, *Ind. Med. J.* India 5 (n.d.) 59–62, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1304265>.
- [79] S.N. Das, B. Mohapatra, R. Mohanty, P.C. Dash, K. Kar, P.K. Dash, Malarial hepatitis as a component of multiorgan failure—a bad prognostic sign, *J. Indian Med. Assoc.* 105 (2007) 247–250, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17915792>.
- [80] S. Bham-Ong, V. Sitpreja, Falciparum malaria and the kidney: a model of inflammation, *Am. J. Kidney Dis.* 32 (1998) 361–375, <https://doi.org/10.1053/ajkd.1998.v32.pm9740151>.

ANEXO D – SÍNTESE DOS ALCALOIDES β -CARBOLÍNICOS

Os alcaloides β -carbolínicos utilizados neste trabalho foram sintetizados no Núcleo de Pesquisas em Química Biológica da Universidade Federal de São João Del Rey, Campus de Divinópolis (NQBio - UFSJ), sob supervisão do Prof. Dr. Gustavo Henrique Ribeiro Viana. O processo de síntese foi realizado conforme descrito abaixo.

Os reagentes e solventes foram adquiridos da Sigma-Aldrich e usados sem purificação adicional. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram registrados usando um Bruker Avance DRX-200 ou DRX-400 e um Bruker AC300. Os deslocamentos químicos são relatados como δ (ppm) a partir de tetrametilsilano (TMS) e os valores J relatados em Hz. A espectrometria de massa de alta resolução (HRMS) foi registrada usando um espectrômetro de massa ESI micrOTOF-QII Bruker. A síntese assistida por micro-ondas foi realizada no reator de micro-ondas monomodo CEM Discover. A cromatografia em coluna foi realizada com sílica gel 60, 70-230 mesh (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Síntese de éster metílico de L-triptofano (2). Rendimento 92%, óleo amarelo. A uma suspensão de L-triptofano comercial (1) (2,45 mmol) em metanol (50 mL) foi adicionado gota a gota ao ácido sulfúrico concentrado (2,81 mmol). A mistura reacional foi deixada sob agitação magnética por 48 h sob refluxo. A solução foi arrefecida, neutralizada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio e extraída com cloreto de metileno. As fases orgânicas combinadas foram secas (Na_2SO_4), filtradas e depois evaporadas sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi filtrado com acetato de etila (70 mL) para produzir o composto puro 2. FT-IR (KBr) ν/cm^{-1} 3444, 3360, 3294, 2949, 1726, 1566, 1400, 1226, 1116. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ ppm: 2,95 (dd, $J=7,2$ Hz, $J=14,3$ Hz, 1H); 3,19 (dd, $J=4,4$ Hz, $J=14,3$ Hz, 1H); 3,59 (s, 3H); 3,74 (dd, $J=4,8$ Hz, $J=7,3$ Hz, 1H); 6,78 (s, 1H); 7,00 – 7,20 (m, 3H); 7,52 (d, $J=7,5$, 1H). ^{13}C RMN (50 MHz, CDCl_3) δ ppm:

30,62; 51,92; 54,81; 111,22; 119,28; 121,91; 123,05; 110,64; 127,32; 136,22; 175,60.

Procedimento geral para a síntese de 3, 4, 5, 6, 8 e 9: Para uma mistura de éster metílico de L-triptofano ou triptamina (0,30 mmol), derivados de benzaldeído aromáticos (0,90 mmol) em cloreto de metileno (35 mL) TFA (0,30 mmol) foi então gota a gota. A mistura resultante foi colocada num forno micro-ondas CEM Discover (modo de recipiente aberto). Foi utilizada irradiação de micro-ondas de 100 W e a temperatura subiu de 25 oC para 90 oC. Uma vez atingidos 90 oC, após cerca de 7 min, a mistura reacional foi mantida nesta temperatura por 30 min sob agitação. Todas as temperaturas foram medidas externamente por um sensor IR. Após arrefecimento da mistura, adicionou-se gota a gota uma solução aquosa de solução saturada de bicarbonato de sódio até pH 5, seguida de extração com EtOAc. As fases orgânicas combinadas foram secas (Na₂SO₄), filtradas e depois evaporadas sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia flash (5: 1: 5 diclorometano/acetato de etila/hexano) para dar os compostos puros 3, 4, 5, 6, 8 e 9.

Metil(1S,3S)-1-(2-metoxi)-2,3,4,9-tetra-hidro-1H-pirido[3,4-b]indole-3-carboxilato (3): Rendimento 81%, sólido amarelo . 1H NMR (DMSO, 400 MHz) δ ppm: 1,24 (s, 1H), 3,01-3,13 (m, 1H), 3,40-3,45 (m, 1H), 3,92 (s, 1H), 6,12 (s, 1H), 6,77-7,07 (m, 4H), 7,13 (t, J=7,7 Hz, 1H), 7,18 (d, J=8,0 Hz, 1H), 7,45 (t, J=6,9 Hz, 1H), 7,54 (d, J =8,0 Hz, 1H), 10,96(s, 1H). 13C NMR (DMSO, 100 MHz) δ ppm: 22.84, 49.13, 51.93, 53.41, 56.26, 106.66, 111.74, 118.62, 119.63, 120.87, 122.67, 125.76, 128.01, 130.51, 136.94, 157.66, 169.99. HRMS (ESI) m/z 337,1545[M + H]⁺ (teórico 337,1546).

Metil(1R,3S)-1-(2-metoxi)-2,3,4,9-tetra-hidro-1H-pirido[3,4-b]indole-3-carboxilato (4): Rendimento 11%, sólido branco . 1H NMR (DMSO, 400 MHz) δ ppm: 1,21 (s, 1H), 2,83 (t, J = 10,9 Hz, 1H), 3,00-3,04 (m, 1H), 3,66 (s, 3H), 3,85 (s, 3H), 3,90 (s, 1H), 5,68 (s, 1H), 6,88-7,02 (m, 4H), 7,10 (t, J=7,8 Hz, 1H), 7,22 (d, J=7,8 Hz, 1H), 7,31(t, J=7,0 Hz, 1H), 7,42(d, J=7,5 Hz, 1H), 10,26 (s, 1H). 13C RMN (DMSO, 100 MHz) Δ ppm: δ 25,42, 52,5, 55,81, 56,28, 107,17, 111,42, 117,69, 118,66, 120,70, 120,92, 126,74, 129.04, 129.16, 1296, 120,70, 120,92,

126,74, 129,04, 129.16, 129. HRMS (ESI) m/z 359,1349[M + Na]⁺ (teórico 359,1474).

Metil(1S,3S)-1-(2-cloro)-2,3,4,9-tetra-hidro-1H-pirido[3,4-b]indole-3-

carboxilato (5): Rendimento 32%, sólido amarelo . 1H NMR (DMSO, 400 MHz) δ ppm: 1,99 (s, 1H), 2,89 (t, J= 11,2 Hz, 2H), 3,69 (s, 3H), 3,94 (d, J= 9,7 Hz, 1H), 5,68 (s, 1H), 6,97 (t, J= 7,0 Hz, 1H), 7,02 (t, J= 7,0 Hz, 1H), 7,22 (d, J=7,8 Hz, 2H), 7,29 (t, J= 7,3 Hz , 1H), 7,36 (t, J= 7,3 Hz, 1H), 7,45 (d, J= 7,5 Hz, 1H), 7,53 (d, J= 7,8 Hz, 1H); 10,44 (s, 1H). 13C NMR (DMSO, 100 MHz) δ ppm: 25,24, 51,79, 56,04, 107,61, 111,27, 117,61, 118,50, 120,89, 126,46, 127,41, 129,42, 133,26, 136,13, 17,42, 133,26, 136,13, HRMS (ESI) m/z 341,1044 [M + H]⁺ (teórico 341,1051).

Metil(1R,3S)-1-(2-cloro)-2,3,4,9-tetra-hidro-1H-pirido[3,4-b]indole-3-

carboxilato (6): Rendimento 40%, sólido branco . 1H NMR (DMSO, 400 MHz) δ ppm: 1,99 (s, 1H), 3,09 (t, J = 10,5 Hz, 2H), 3,33 (s, 3H), 3,69-3,72 (m, 1H), 5,72 (s, 1H) 6,79 (t, J= 7,5 Hz, 1H), 6,99 (t, J= 7,0 Hz, 1H), 7,05 (t, J= 7,5 Hz, 1H), 7,23 (d, J= 7,5 Hz, 2H), 7,32 (t, J= 7,8 Hz, 1H), 7,48 (d, J=7,5 Hz, 1H), 7,53 (d, J=7,8 Hz, 1H), 10,70 (s, 1H). 13C NMR (DMSO, 100 MHz) δ ppm: 24.86, 51.04, 51.42, 51.74, 107.83, 111.14, 117.72, 118.46, 121.06, 126.36, 126.87, 129.14, 129.63, 130.16, 132.85, 133.20, 136.17, 139.62, 173.52. HRMS (ESI) m/z 362,9270 [M + Na] + (teórico 363,0979).

5-(dietilamino)-2-(2,3,4,9-tetra-hidro-1H-pirido[3,4-b]indol-1-il)fenol(8):

Rendimento 60%, sólido amarelo. 1H NMR (DMSO, 400 MHz) δ ppm: 1,08 (t, J = 6,8 Hz, 6H), 1,26 (s, 1H), 3,00 (t, J = 7,9 Hz, 2H), 3,33 (q, J = 7,9 Hz , 2H), 3,75 (t, J= 6,8 Hz, 4H), 5,89 (s, 1H), 6,13 (d, J= 8,6 Hz, 1H), 7,02 (m, 5H), 7,34 (d, J= 7 ,8 Hz, 1H), 7,58 (d, J= 7,8 Hz, 1H), 8,13 (s, 1H), 10,83 (s, 1H). 13C NMR (DMSO, 100 MHz) δ ppm: 12,59, 26,87, 43,74, 56,66, 102,65, 107,80, 111,34, 111,62, 118,23, 118,32, 120,813, 122,92, 127,14, 1,13, HRMS (ESI) m/z 336,2069 [M + H]⁺ (teórico 336,1998).

1-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,3,4,9-tetra-hidro-1H-pirido[3,4-b]indole (9):

Rendimento 84%, sólido branco. ¹H NMR (DMSO, 400 MHz) δ ppm: 3,00 (s, 1H), 3,12 (t, J= 7,8 Hz, 2H), 3,58 (t, J= 12,4 Hz, 2H), 3,74 (s, 9H), 5,59 (s, 1H), 6,75 (s, 1H), 7,05 (t, J= 7,1 Hz, 1H), 7,13 (t, J= 7,6 Hz, 1H), 7,32 (d, J= 8,1 Hz, 1H), 7,54 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 10,89 (s, 1H). ¹³C NMR (DMSO, 100 MHz) δ ppm: 18,20, 40,50, 56,04, 60,03, 107,15, 111,62, 118,28, 119,09, 122,04, 125,70, 128,41, 129,91, 136,59, 153,10. HRMS (ESI) m/z 339,1703 [M + H]⁺ (teórico 339,1630).

1-(3,4,5-trimetoxifenil)-9H-pirido[3,4-b]indole (10):

Rendimento 21%, sólido branco. A uma solução resfriada de tetra-hidro-β-carbolinas 9 (0,50 mmol) em DMF (5 mL) a 0 °C foi adicionado 0,80 mmol de permanganato de potássio. A mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 3h. Depois disso, a mistura de reação foi filtrada e diluída com acetato de etila (25 mL). A fase orgânica foi lavada com salmoura (25 mL), seca (Na₂SO₄) e depois evaporada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia flash (4:6 acetato de etil/hexano) para dar o composto puro 10: ¹H NMR (DMSO, 400 MHz) δ ppm: 3,76 (s, 3H), 3,92 (s, 6H), 7,26 (t, J= 7,3 Hz, 3H), 7,55 (t, J= 7,0 Hz, 1H), 7,65 (d, J= 8,3 Hz, 1H), 8,10 (d, J= 5,1 Hz, 1H), 8,27 (d, J= 7,8 Hz, 1H), 8,44 (d, J= 5,1 Hz, 1H), 11,52 (s, 1H). ¹³C NMR (DMSO, 100 MHz) δ ppm: 56,07, 60,29, 105,88, 112,64, 113,99, 119,71, 121,09, 121,83, 128,33, 133,17, 134,094, 138,02, 1378,38, 134,09, 138,02, 1378,38 HRMS (ESI) m/z 335,1394 [M + Na]⁺ (teórico 335,1389).

ANEXO E – CERTIFICADO CEUA - UFJF 022/2020**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL****UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA****CERTIFICADO**

A COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 03/07/2020, analisou o protocolo nº. 022/2020 intitulado “Avaliação da atividade de alcalóides β -carbolínicos associados a vitamina D na proteção contra o desenvolvimento de malária cerebral em modelo murino”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Kézia Katiani Gorza Scopel e colaboração de Jessica Corrêa Bezerra Bellei, Gustavo Henrique Ribeiro Viana, a ser realizado no período de 01/09/2020 a 01/09/2023. Por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado pela CEUA. Serão utilizados 470 camundongos C57BL/6 fêmeas com 6 a 8 meses de idade, projeto a ser realizado no Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia - UFJF. O prazo de validade desse certificado é equivalente a vigência do projeto prorrogável por mais um ano, desde que seja enviada justificativa a CEUA durante a vigência do projeto de acordo com orientação técnica do CONCEA.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº. 022/2020-CEUA about “Avaliação da atividade de alcaloides β -carbolínicos associados a vitamina D na proteção contra o desenvolvimento de malária cerebral em modelo murino”, under responsibility of Kézia Katiani Gorza Scopel and collaboration of Jessica Corrêa Bezerra Bellei, Gustavo Henrique Ribeiro Viana, is in agrément with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (Concea) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 07/03/2020. For the development of this research 470 females of C57BL/6 mice with 6 to 8 months old, will be delivered as requested in the period of 09/01/2020 to 09/01/2023. The Project will be performed at Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia - UFJF. The term of validity of this certificate might be extended for one more year by means of justification during the period of validity.

Juiz de Fora, 20 de julho de 2020.

Coordenadora
CEUA_____
Vice-Coordenadora
CEUA

ANEXO F: ARTIGO ALCALOIDES β -CARBOLÍNICOS

Article

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

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

- ¹ Research Center on Biological Chemistry (NQBio), Federal University of São João Del Rei, Divinópolis 35501-296, Brazil
² Research Center Parasitology, Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora 36036-900, Brazil
³ Research Center of Pathology and Veterinary Histology, Department of Veterinary Medicine, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora 36036-900, Brazil
* Correspondence: varotti@ufsj.edu.br (F.d.P.V.); kezia.scopel@ufjf.br (K.K.G.S.)
† These authors contributed equally to this work.



Citation: Alves, F.d.M.; Bellei, J.C.B.; Barbosa, C.d.S.; Duarte, C.L.; Fonseca, A.L.d.; Pinto, A.C.d.S.; Raimundo, F.O.; Carpinter, B.A.; Lemos, A.S.d.O.; Coimbra, E.S.; et al. Rational-Based Discovery of Novel β -Carboline Derivatives as Potential Antimalarials: From In Silico Identification of Novel Targets to Inhibition of Experimental Cerebral Malaria. *Pathogens* **2022**, *11*, 1529. <https://doi.org/10.3390/pathogens11121529>

Academic Editors: Nicolò Musso and Andrea Marino

Received: 22 November 2022

Accepted: 11 December 2022

Published: 13 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

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

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

1. Introduction

Malaria still continues scourge many countries in the world [1], having a long range in tropical underdeveloped regions, including countries in Africa, Asia, and South America, and causing approximately 241 million cases, which resulted in almost 627 thousand deaths in 2020 [2].

Although individuals from all ages are at risk of getting sick and dying from malaria, children under five years old compose the group that more frequently develop cerebral

malaria (CM), the most severe form of the infection caused especially by *P. falciparum* [3]. The mechanisms driving the pathogenesis of CM are not fully known, but the sequestration of infected red blood cells (iRBC) and leucocytes in the brain causing capillary obstruction, inflammation, hemorrhage, and cerebral edema, which occur due to the disruption of the blood–brain barrier, play a critical role in the development of encephalopathy [4–6]. This syndrome is, therefore, the result of several mechanical events and a systemic inflammatory response with secretion of pro-inflammatory cytokines, including $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, and lymphotoxin. The cytokines, most notably $\text{TNF}\alpha$, generate a vicious circle of macrophage activation, increasing the cellular sequestration and regulated production of reactive oxygen species, including nitric oxide (NO), in the general circulation and in situ [3,7]. Although 85% of subjects developing CM are able to make full recovery following the adequate antimalarial treatment, it is worryingly that about 25% of them remain with significant neurocognitive sequelae throughout life [8–10].

The current therapeutic arsenal for malaria treatment includes a combination of antimalarial drugs with diverse modes of action. Compounds like chloroquine (CQ) inhibit the hemoglobin polymerization in sexual stages of the parasites, while compounds like artemisinin impair more than one target by the destruction of parasite proteins due to the production of carbon centered radicals, resulting from metabolization of artemisinin (ART) into dihydroartemisinin [11]. However, the emergence and spread of resistant isolates of *P. falciparum* to current regimens of treatments makes it urgent to search for new antimalarial candidates that can contribute to the disease treatment, avoiding a worse prognosis [12–14].

β -carbolines are natural alkaloids, containing an attractive scaffold, that are found in many commercialized drugs [15] and antimalarial drug candidates [16]. These compounds show great chemical diversity and can be found as monomers or dimers. The saturation of the *N*-containing six-membered ring is used to classify the tricyclic monomers as β -carbolines for unsaturated members, and dihydro- β -carbolines (DH β C) and tetrahydro- β -carbolines (TH β C) for partially saturated members. Therefore, a wide range of biological activity for these compounds have been reported [15,17].

The success in drug discovery requires the identification of molecules possessing optimal pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. Over the years, medicinal chemists developed tools [18–21] that allow the selection of molecules containing safety attributes and druglike properties at the design stage, in order to increase the survival of drug candidates [22].

Herein, we describe the *in silico* guided choice and optimization studies, the synthesis and biological assays of new β -carboline derivatives with antimalarial activity aiming at a potential scaffold for antimalarial development.

2. Experimental Design

2.1. Virtual Screening

An *in-house* library of 20 virtual chemical entities (Figure S1), which were possible to be synthesized within the commercially available reagents, was built to identify chemical entities displaying promising antiplasmodial activities using a virtual screening approach.

Twenty virtual chemical entities were designed using MarvinSketch[®] software (ChemAxon, Cambridge, MA, USA); MOPAC[®] software [23] was used to refine all molecular structures through the PM7 semi-empirical method; a EigenFollowing (EF) routine for geometry optimization and the charge was adjusted according with the protonation state in pH 7.4 [24,25]. Following, all structures were submitted to the molecular docking calculations by the AutoDock Vina[®] program [26], by using the OCTOPUS[®] platform, and the configuration files through a re-docking step were determined [27]. Thus, the virtual screening of potential antimalarial candidates was performed by using the BraMMT data bank [28]. Binding energy values, Δ (binding energy of the crystallographic ligand—binding energy of the compound) values, were calculated [29], and these values were employed as a first step in the selection process applied to choose the most promising structures to be synthesized.

2.2. Chemistry

Reagents and solvents were purchased as reagent grade from Sigma-Aldrich and used without further purification. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectra were recorded using a Bruker Avance DRX-200 or DRX-400 and a Bruker AC300. Chemical shifts are reported as δ (ppm) downfield from tetramethylsilane (TMS) and the J-values reported in Hz. High-resolution mass spectrometry (HRMS) was recorded using an ESI micrOTOF-QII Bruker mass spectrometer. Microwave-assisted synthesis was carried out in a CEM Discover single-mode microwave reactor. Column chromatography was performed with silica gel 60, 70–230 mesh (Merck, Darmstadt, Germany).

2.2.1. Synthesis of L-Tryptophan Methyl Ester (2)

Yield 92%, yellow oil to a suspension of commercial L-tryptophan (1) (2.45 mmol) in methanol (50 mL) concentrated sulfuric acid (2.81 mmol) was added dropwise. The reaction mixture was left under magnetic stirring for 48 h under reflux. The solution was cooled, neutralized with a saturated solution of sodium bicarbonate, and extracted with methylene chloride. The combined organic phases were dried (anhydrous Na_2SO_4), filtered, and then evaporated under reduced pressure. The residue obtained was filtered with ethyl acetate (70 mL) to yield the pure compound 2. FT-IR (KBr) ν/cm^{-1} 3444, 3360, 3294, 2949, 1726, 1566, 1400, 1226, 1116. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ ppm: 2.95 (dd, $J = 7.2$ Hz, $J = 14.3$ Hz, 1H); 3.19 (dd, $J = 4.4$ Hz, $J = 14.3$ Hz, 1H); 3.59 (s, 3H); 3.74 (dd, $J = 4.8$ Hz, $J = 7.3$ Hz, 1H); 6.78 (s, 1H); 7.00–7.20 (m, 3H); 7.52 (d, $J = 7.5$, 1H). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ ppm: 30.62; 51.92; 54.81; 111.22; 119.28; 121.91; 123.05; 110.64; 127.32; 136.22; 175.60.

2.2.2. General Procedure for the Synthesis of 3, 4, 5, 6, 8, and 9

To a mixture of L-tryptophan methyl ester or tryptamine (0.30 mmol), aromatic benzaldehyde derivatives (0.90 mmol) in methylene chloride (35 mL) trifluoroacetic acid (TFA) (0.30 mmol) was then added dropwise. The resulting mixture was placed in a CEM Discover microwave oven (open vessel mode). Microwave irradiation of 100 W was used and the temperature ramped from 25 °C to 90 °C. Once 90 °C was reached, after around 7 min, the reaction mixture was held at this temperature for 30 min under stirring. All temperatures were measured externally by an IR sensor. After cooling the mixture, an aqueous solution of a saturated solution of sodium bicarbonate was added dropwise until pH 5, followed by extraction with EtOAc. The combined organic phases were dried (anhydrous Na_2SO_4), filtered, and then evaporated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (5:1:5 dichloromethane/ethyl acetate/hexane) to give the pure compounds 3, 4, 5, 6, 8, and 9.

2.2.3. Methyl (1S,3S)-1-(2-Methoxy)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole-3-carboxylate (3)

Yield 81%, yellow solid. ^1H NMR (DMSO, 400 MHz) δ ppm: 1.24 (s, 1H); 3.01–3.13 (m, 1H); 3.40–3.45 (m, 1H); 3.92 (s, 1H); 6.12 (s, 1H); 6.77–7.07 (m, 4H); 7.13 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H); 7.18 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H); 7.45 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H); 7.54 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H); 10.96 (s, 1H). ^{13}C NMR (DMSO, 100 MHz) δ ppm: 22.84, 49.13, 51.93, 53.41, 56.26, 106.66, 111.74, 118.62, 119.63, 120.87, 122.67, 125.76, 128.01, 130.51, 136.94, 157.66, 169.99. HRMS (ESI) m/z 337.1545[M + H]⁺ (theoretical 337.1546).

2.2.4. Methyl (1R,3S)-1-(2-Methoxy)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole-3-carboxylate (4)

Yield 11%, white solid. ^1H NMR (DMSO, 400 MHz) δ ppm: 1.21 (s, 1H); 2.83 (t, $J = 10.9$ Hz, 1H); 3.00–3.04 (m, 1H); 3.66 (s, 3H); 3.85 (s, 3H); 3.90 (s, 1H); 5.68 (s, 1H); 6.88–7.02 (m, 4H); 7.10 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H); 7.22 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H); 7.31 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H); 7.42 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H); 10.26 (s, 1H). ^{13}C NMR (DMSO, 100 MHz) δ ppm: δ 25.42, 52.5, 55.81, 56.28, 107.17, 111.42, 117.69, 118.66, 120.70, 120.92, 126.74, 129.04, 129.16, 136.35, 157.37, 173.22. HRMS (ESI) m/z 359.1349[M + Na]⁺ (theoretical 359.1474).

2.2.5. Methyl (1S,3S)-1-(2-Chloro)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole-3-carboxylate (5)

Yield 32%, yellow solid. ¹H NMR (DMSO, 400 MHz) δ ppm: 1.99 (s, 1H); 2.89 (t, J = 11.2 Hz, 2H); 3.69 (s, 3H); 3.94 (d, J = 9.7 Hz, 1H); 5.68 (s, 1H); 6.97 (t, J = 7.0 Hz, 1H); 7.02 (t, J = 7.0 Hz, 1H); 7.22 (d, J = 7.8 Hz, 2H); 7.29 (t, J = 7.3 Hz, 1H); 7.36 (t, J = 7.3 Hz, 1H); 7.45 (d, J = 7.5 Hz, 1H); 7.53 (d, J = 7.8 Hz, 1H); 10.44 (s, 1H). ¹³C NMR (DMSO, 100 MHz) δ ppm: 25.24, 51.79, 56.04, 107.61, 111.27, 117.61, 118.50, 120.89, 126.46, 127.41, 129.42, 133.26, 134.13, 136.35, 172.86. HRMS (ESI) m/z 341.1044 [M + H]⁺ (theoretical 341.1051).

2.2.6. Methyl (1R,3S)-1-(2-Chloro)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole-3-carboxylate (6)

Yield 40%, white solid. ¹H NMR (DMSO, 400 MHz) δ ppm: 1.99 (s, 1H); 3.09 (t, J = 10.5 Hz, 2H); 3.33 (s, 3H); 3.69–3.72 (m, 1H); 5.72 (s, 1H); 6.79 (t, J = 7.5 Hz, 1H); 6.99 (t, J = 7.0 Hz, 1H); 7.05 (t, J = 7.5 Hz, 1H); 7.23 (d, J = 7.5 Hz, 2H); 7.32 (t, J = 7.8 Hz, 1H); 7.48 (d, J = 7.5 Hz, 1H); 7.53 (d, J = 7.8 Hz, 1H); 10.70 (s, 1H). ¹³C NMR (DMSO, 100 MHz) δ ppm: 24.86, 51.04, 51.42, 51.74, 107.83, 111.14, 117.72, 118.46, 121.06, 126.36, 126.87, 129.14, 129.63, 130.16, 132.85, 133.20, 136.17, 139.62, 173.52. HRMS (ESI) m/z 362.9270 [M + Na]⁺ (theoretical 363.0979).

2.2.7. 5-(Diethylamino)-2-(2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenol (8)

Yield 60%, yellow solid. ¹H NMR (DMSO, 400 MHz) δ ppm: 1.08 (t, J = 6.8 Hz, 6H); 1.26 (s, 1H); 3.00 (t, J = 7.9 Hz, 2H); 3.33 (q, J = 7.9 Hz, 2H); 3.75 (t, J = 6.8 Hz, 4H); 5.89 (s, 1H); 6.13 (d, J = 8.6 Hz, 1H); 7.02 (m, 5H); 7.34 (d, J = 7.8 Hz, 1H); 7.58 (d, J = 7.8 Hz, 1H); 8.13 (s, 1H); 10.83 (s, 1H). ¹³C NMR (DMSO, 100 MHz) δ ppm: 12.59, 26.87, 43.74, 56.66, 102.65, 107.80, 111.34, 111.62, 118.23, 118.32, 120.88, 122.92, 127.14, 133.04, 136.19, 151.1. HRMS (ESI) m/z 336.2069 [M + H]⁺ (theoretical 336.1998).

2.2.8. 1-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole (9)

Yield 84%, white solid. ¹H NMR (DMSO, 400 MHz) δ ppm: 3.00 (s, 1H); 3.12 (t, J = 7.8 Hz, 2H); 3.58 (t, J = 12.4 Hz, 2H); 3.74 (s, 9H); 5.59 (s, 1H); 6.75 (s, 1H); 7.05 (t, J = 7.1 Hz, 1H); 7.13 (t, J = 7.6 Hz, 1H); 7.32 (d, J = 8.1 Hz, 1H); 7.54 (d, J = 7.8 Hz, 1H); 10.89 (s, 1H). ¹³C NMR (DMSO, 100 MHz) δ ppm: 18.20, 40.50, 56.04, 60.03, 107.15, 111.62, 118.28, 119.09, 122.04, 125.70, 128.41, 129.91, 136.59, 153.10. HRMS (ESI) m/z 339.1703 [M + H]⁺ (theoretical 339.1630).

2.2.9. 1-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)-9H-pyrido[3,4-b]indole (10)

Yield 21%, white solid. To a cooled solution of tetrahydro-β-carbolines **9** (0.50 mmol) in DMF (5 mL) at 0 °C, potassium permanganate (0.80 mmol) was added. The mixture was kept under magnetic stirring at room temperature for 3 h. After, the reaction mixture was filtered and diluted with ethyl acetate (25 mL). The organic phase was washed with brine (25 mL), dried (anhydrous Na₂SO₄), and then evaporated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (4:6 ethyl acetate/hexane) to give the pure compound **10**: ¹H NMR (DMSO, 400 MHz) δ ppm: 3.76 (s, 3H); 3.92 (s, 6H); 7.26 (t, J = 7.3 Hz, 3H); 7.55 (t, J = 7.0 Hz, 1H); 7.65 (d, J = 8.3 Hz, 1H); 8.10 (d, J = 5.1 Hz, 1H); 8.27 (d, J = 7.8 Hz, 1H); 8.44 (d, J = 5.1 Hz, 1H); 11.52 (s, 1H). ¹³C NMR (DMSO, 100 MHz) δ ppm: 56.07, 60.29, 105.88, 112.64, 113.99, 119.71, 121.09, 121.83, 128.33, 133.17, 134.09, 138.02, 138.38, 141.25, 153.27. HRMS (ESI) m/z 335.1394 [M + Na]⁺ (theoretical 335.1389).

2.3. Antimalarial Activity

2.3.1. Antiplasmodial Activity

Plasmodium falciparum W2 strain (CQ-resistant) (MRA-157) was obtained from Malaria Research. Continuous culture was maintained as previously described [30,31]. In vitro antiplasmodial activity of the seven compounds against the *P. falciparum* culture was evaluated using the SYBR test as previously described [32]. Compounds were diluted to concentrations ranging from 10 to 0.0001 μM. Chloroquine (CQ) and artemisinin (ART) were used as reference antimalarial drugs. The plate was read in a fluorometer (Fluoroskan

Ascent, Thermo Laboratories) with excitation at 485 nm and an emission of 535 nm. All experiments were performed in triplicate. The results were expressed as the mean of minimum lethal dose for 50% of the culture (IC_{50}).

2.3.2. In Vitro Cytotoxicity on Mammalian Cells

In vitro cytotoxicity of the compounds was assessed against human pulmonary fibroblast cells WI-26VA4 (ATCC CCL-95.1, USA), by 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT assay) [33]. Cells were cultured in a RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum in a 96-well plate. Compounds were diluted in different concentrations ranging from 100 to 1 μ M and incubated with the cells for 48 h in a 5% CO_2 atmosphere at 37 °C. The optical density was determined at 540 nm to measure the signal and background, respectively (Spectra Max340PC384, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). The minimum lethal dose for 50% of the cells (IC_{50}) was determined as previously described [34].

2.3.3. Selectivity Index (SI)

Selectivity index (SI) is the ratio between the cytotoxic and antiparasitic activities of each compound tested. The values greater than 10 were considered indicative of lack of cytotoxicity, whereas the substances with values below 10 were considered toxic [35].

2.4. Evaluation of Physicochemical and Pharmacokinetic Properties

Physicochemical properties of all chemical entities drawn were in silico analyzed according to Lipinski's rule of 5 using the SwissADME website [36]. The properties of molecular mass (MW), topological polar surface area (TPSA), *consensus* partition coefficient (ClogP), number of hydrogen bond donors (HBD), and number of hydrogen bond acceptors (HBA) were predicted.

The absorption pharmacokinetics were estimated by the AdmetSar website [37] through the predictive data of absorption to the human intestinal epithelium (HIE), blood-brain barrier (BBB), and CACO-2 cell permeability [38,39].

2.5. Evaluation of In Vivo Antimalarial Activity

2.5.1. Animals

C57BL/6 female mice, 6 to 8 weeks of age, from the Center of Reproduction Biology (CBR)-CIAEP 02.0048.2019-of the Federal University of Juiz de Fora—UFJF were used in the in vivo experiments, after approval by the ethics committee on animal research (UFJF, protocol #022/2020). The animals (n = 5/cage) were housed in ALESCO® climate-controlled cabinets with controlled air flow, a temperature of 22 ± 2 °C and light control, respecting the animals' circadian rhythm (light/dark cycle of 12 h), with standard rodent food and water ad libitum.

All experiments were carried out seeking to minimize the suffering of the animals. The care of the laboratory animals and all experimental animal operations was performed according to the international standards recommended in the Manual on the care and use of laboratory animals [40] and the ethical precepts for animal experimentation defined by the National Council for the Control of Animal Experimentation [41].

2.5.2. Mouse Model of ECM

To carry out the proposed experiments, the murine model of ECM was used to assess the antimalarial activity of the compounds. *Plasmodium berghei* ANKA was kindly provided by Claudio Romero Marinho (Federal University of São Paulo-Brazil), and was used to conduct the infections which were performed by intraperitoneal (i.p.) injection of 10^5 parasitized red blood cells (pRBCs) obtained from infected donor mice, as previously described [42,43]. Reduced responsiveness to external stimuli, ataxia, paralysis, coma, and/or convulsions were considered clinical signals of ECM [44].

2.5.3. Drug Administration

After infection, mice were randomized into seven groups: (1) PbA (Infected), (2) CQ treated (positive control), and five treated groups with 10 mg/kg of β -carboline compounds. In the curative test, the mice were treated by oral gavage starting from day 3 (when the first PbA asexual blood stages were observed in the blood film) until day 7 post infection (p.i.). In the suppressive modified test [45], mice were treated daily by oral gavage for five consecutive days, starting four hours after infection.

2.5.4. Basic Indicator Evaluation

Parasitemia was monitored using giemsa-stained blood smears and the inhibition of parasite multiplication (IPM) was calculated by the formula: $[(A-B)/A] \times 100$, where A = parasitemia of the PbA, and B = parasitemia of the group treated with the compounds. The clinical symptoms were evaluated using the rapid murine coma and behavior scale (RMCBS) from day 5 p.i. [44] being maintained until the end of experimentation. The RMCBS consists of 10 parameters (gait, balance, motor performance, body position, limb strength, touch escape, pinna reflex, toe pinch, aggression, and grooming). Each parameter is scored 0 to 2, with 0 being the lowest function and 2 being the highest. Animals with clinical score ≤ 5 were euthanized. The survival rate (SR) was calculated based on the number of alive animals after 14 days of clinical evaluation.

2.5.5. Macroscopic and Histological Analysis of the Brain

Mice presenting clinical scores ranging from 0–5 were anesthetized with an association of xylazine 1% and ketamine 5%, i.p. Macroscopic brain damage, such as hemorrhages, was evaluated by complete removal of the skin on the upper portion of the animals' heads. After photographic recording, the animal was euthanized following cardiac perfusion with PBS to remove non-adhered RBC. Animals that did not present clinical scores compatible with neurological damage were followed up until the 14th day of infection, when they were euthanized according to the experimental procedures described above.

For histological analysis, the brain was dissected and routinely processed for fixation in formaldehyde 10% for 24 h and paraffin embedding. Sections of 5 μ m were stained by Hematoxylin-Eosin (H&E). The histopathology analysis of the mice brains was performed under an optical microscope (AX10, Zeiss, Oberkochen, Germany) in 40 \times and 100 \times magnification lenses to observe, qualitatively, the occurrence of areas of hemorrhages and vascular obstruction [46].

2.6. Evaluation of the *In Silico* and *In Vitro* Inhibition Potential of Nitric Oxide Synthesis

2.6.1. *In Vitro* Cytotoxicity against Mammalian Cells

Macrophages obtained from the peritoneal cavity of BALB/c mice previously inoculated with 3% thioglycollate medium for the evaluation of cell viability were used. The macrophages were seeded in culture bottles with a RPMI-1640 medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 μ g/mL antibiotics (streptomycin and penicillin), 5% fetal bovine serum (FBS) and kept in an incubator at 5% CO₂ atmosphere at 37 °C until the day of the test. The protocol was approved by the Ethical Committee for Animal Research of Federal University of Juiz de Fora (n^o 007/2018-CEUA).

Cytotoxicity was assessed by cell viability using the MTT method [47]. Briefly, the macrophages at 2×10^6 cells/well were transferred to 96-well microplates and treated with compound 10 at concentrations of 18 to 150 μ M. For the negative control, cells were treated only with 0.06% DMSO (vehicle). The cells were incubated for 48 h at 37 °C and 5% CO₂ atmosphere. Absorbance was read at 570 nm and cell viability (%) of macrophages was obtained by the following formula: % viable cells = $[(AU_{\text{Sample}})/AU_{0.06\% \text{ DMSO}}] \times 100$, where: AU_{Sample}: Absorbance was measured after treatment of cells with the sample; AU_{0.06% DMSO}: Absorbance was measured after treatment of cells with 0.06% DMSO. The experiment was performed in triplicate.

2.6.2. Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of Compound 10 by NO Dosage

NO production was determined in the culture supernatants of macrophages after being incubated for 48 h in the presence of compound 10 (18 to 150 $\mu\text{M}/\text{mL}$) and stimulated with LPS at 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and IFN- γ at 1 ng/mL. Negative control was stimulated with LPS and IFN- γ and treated with 0.06% DMSO (vehicle). The cells were incubated for 48 h at 37 $^{\circ}\text{C}$ and 5% CO_2 atmosphere. Subsequently, NO production was evaluated by the Griess method (an indirect NO measurement by nitrite dosing) in the recovered culture supernatant from the 48 h stimuli and treatment as described by [48]. The quantity of NO (μM) was determined by comparison with a standard sodium nitrite solution. The spectrophotometric measurement was performed at 540 nm and the experiment was performed in triplicate.

2.6.3. Evaluation of the Interaction with iNOS by Molecular Docking Simulations

The 2D structure of compound 10 was drawn using Chem Sketch software[®] and their structures optimized in the Avogadro software v1.1 using the MMFF94s force field and the steepest descent algorithm. In the second step, the ligands were prepared in AutoDock Tools (ADT) v1.5.6, where the partial Gasteiger charges were added, rotatable bonds and hydrogens were set, and pdbqt files were generated. The iNOS enzyme (3EAL.pdb file) was used as a receptor and the compound as flexible ligands [49]. The three-dimensional structure of iNOS was downloaded from the RCSB Protein Data Bank and had its structure prepared in AutoDock Tools, where the hydrogens and Gasteiger charges were added and the pdbqt file was generated. The grid box used was: center box with dimensions of 22 $\text{Å} \times 22 \text{Å} \times 22 \text{Å}$; coordinates of X = 126.798, Y = 115.912, and Z = 89.696; and spacing of 0.375 Å . Molecular docking was performed with AutoDock Vina [26]. The program gave numerous feasible docked models (9 poses) that were evaluated in Pymol 2.4.1[®] software. The most plausible structure based on the energetic parameters and interactions formed between the iNOS and ligands was selected.

2.6.4. Statistical Analysis

For the statistical analysis, the Shapiro-Wilk normality test ($n < 30$ samples) was performed, followed by an analysis of variance by OneWay ANOVA and Tukey post-test for multiple comparisons. Analyses were performed using the GraphPad Prism software version 5.0 for Windows (GraphPad Software). Statistical significance was defined at the 5% level ($p < 0.05$).

3. Results and Discussion

3.1. Virtual Screening Results

For identification of possible targets of 20 β -carbolines compounds (Scheme 1 and Figure S1), in silico simulations using molecular docking against BRAMMT were performed. The targets that exhibited binding energy with compounds lower than the crystallographic ligands are presented in Table 1.

Table 1. Binding energy (kcal/mol) of β -carbolines derivatives against BRAMMT targets.

Models	Crystallographic Ligand	Compounds						
		3	4	5	6	8	9	10
2OKS	−2.0	−5.3	−5.0	−5.2	−5.0	−4.9	−4.8	−4.7
2PML	−6.9	−9.0	−8.8	−9.4	−9.0	−8.6	−7.9	−8.8
4NOZ	−4.3	−5.8	−6.1	−6.1	−6.3	−5.6	−5.3	−5.5
PfATP6	−7.2	−8.9	−8.3	−9.0	−8.8	−7.8	−7.4	−7.4

2OKS, *P. falciparum* ferredoxin-NADP+ reductase (PFNR). 2PML, *P. falciparum* Protein Kinase 7. 4NOZ, Protein Kinase PfGrx1. PfATP6, *P. falciparum* ATPase 6.

The 2OK8 model is a *P. falciparum* ferredoxin-NADP⁺-reductase (PfFNR) located in the apicoplast. 2OK8 transfers a pair of electrons to the iron-sulfur protein-ferredoxin (Fd) [50]. The PfFNR/Fd pair participates in several biosynthetic pathways in the apicoplast, performing electron transfer from NADPH to proteins in fatty acid synthesis pathways and mevalonate-independent isoprenoid pathways [51,52].

Inhibition of PfFNR interrupts the activity of HMB-PP reductase (IspH), consequently reducing the synthesis of dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP) and isopentenyl pyrophosphate (IPP) and their derivatives, leading to the death of the protozoan [51]. These results reinforce the hypothesis that β -carboline derivatives would act by inhibiting the synthesis of isoprenoids in malaria parasites [16,53–56].

The results also indicate a possible inhibition of other targets of the parasite, suggesting that the compounds could be acting in the inhibition of more than one metabolic pathway. Among the other targets, proteins such as PfPK7 (2PML model) [57], an important kinase for development and proliferation of the parasite, PfGrx1 (4N0Z model) [58], which acts in the oxidative stress control pathways, and PfATP6 [59], responsible for intracellular calcium ion homeostasis, could be involved in the action mechanism of the β -carboline derivatives.

To evaluate a possible profile of interaction, an analysis of the interaction profile of β -carboline derivatives against 2OK8 was performed. Compound 3 (Scheme 1 and Figure S2A) exhibited two hydrogen bonds, one between the nitrogen of the pyridine ring with Asp301 residue, and another between the oxygen attached to the D-ring and a Lys307 residue. It also demonstrated a Pi-Anion bond between the D-ring and Asp301. Similarly, compound 4 (Scheme 1 and Figure S2B) presented a hydrogen bond and a Pi-Anion bond with Asp301 residue.

The complex formed between compound 8 and the 2OK8 model (Scheme 1 and Figure S2C) forms three Pi-Anion bonds and one Alkyl bond with a Lys278 residue, one Alkyl bond with Arg310, one carbon hydrogen bond and Pi-Anion bond with a Lys306 residue, and a Pi-Alkyl bond with a Lys307. Although, there was an unfavorable binding between the nitrogen of the pyridine ring and Lys306. The greater number of bonds presented by compound 8 was compensatory for the reduction of binding energy. Unlike the other compounds tested, the amine linked to the D-ring is a longer substituent, which promotes more non-polar bonds, but changes the ligand conformation to prevent interaction with Asp301, as observed in the other derivatives.

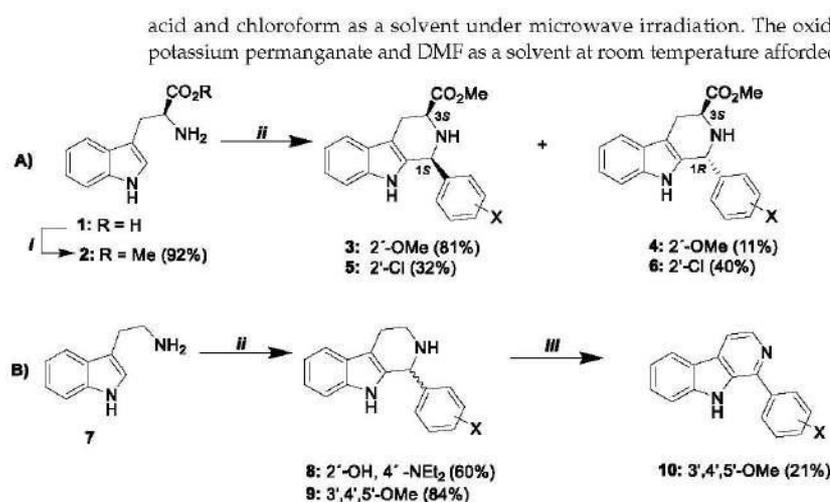
Compound 5 (Scheme 1 and Figure S2D) presented only two bonds with the Asp301 residue, a hydrogen and a Pi-Anion bond, maintaining the same pattern of the other tested derivatives. Compound 6 (Scheme 1 and Figure S2E) forms, in addition to the bonds with the Asp301 residue, a bond between the chlorine substituent of the D-ring and an Asn275 residue, in addition to a hydrogen carbon bond with this same residue.

Compound 9 (Scheme 1 and Figure S2F) exhibited bonds with residues Asp301, Gln302, Lys307, and Asn276, in addition to the Pi-Anion bond with Asp301, which was common to all derivatives. Bonds with the Asp301 residue were also maintained in compound 10 (Scheme 1 and Figure S2G), in addition to a hydrogen bond between the Asn272 residue and the oxygen attached to the D-ring.

The analysis of the interaction profiles of the tested compounds showed that in all cases, the interaction of the Asp301 residue was present and promoted the greatest reduction in the binding energy, suggesting that the inhibition of PfFNR would occur through the interaction between the β -carboline moiety and that aspartate residue.

3.2. Synthesis

The synthetic route for the β -carboline derivatives 3–6 and 8–10 is outlined in Scheme 1. In the first step, the commercially available L-tryptophan was converted to L-tryptophan methyl ester in an esterification reaction using sulfuric acid and methanol. The L-tryptophan methyl ester previously synthesized and the commercially available tryptamine were subjected to a Pictet-Spengler reaction to obtain tetrahydro- β -carboline derivatives 3–6, 8 and 9 upon reaction with different aromatic benzaldehydes in the presence of trifluoroacetic



Scheme 1. Synthetic route to β -carboline alkaloids (A) 3–6 and (B) 8–10. Reagents and conditions: (i) MeOH, H₂SO₄, reflux; (ii) Aromatic aldehyde derivatives, TFA/CHCl₃, MW, 100W, 30 min; (iii) DMF, KMnO₄, 3 h, rt.

3.3. Biological Evaluation

3.3.1. Cytotoxicity on Mammalian Cells and Antiplasmodial Activity

In vitro cytotoxicity of the 07 compounds was evaluated on human cell fibroblast lineage (WI-26-VA4 # ATCC CCL-95.1). None of the compounds were cytotoxic up to the highest concentration used (100 μ M) (Table 2). The antiplasmodial activity assessment, conducted against chloroquine-resistant *P. falciparum* (W2 strain), showed IC₅₀ values ranging from 0.51 to 1.82 μ M (Table 2). It is interesting to point out that the compound 10 showed the better antiplasmodial effect (IC₅₀ = 0.51 μ M) than CQ (IC₅₀ = 0.59 μ M). Regarding the SI, all compounds showed high selectivity for the parasites (SI > 10) (values ranged from >55 to >196) (Table 2).

Table 2. Cytotoxic drug concentration that reduced parasite and cell viability in 50% (IC₅₀).

Compounds	<i>P. falciparum</i> IC ₅₀ \pm SD (μ M) *	WI-26-VA4 IC ₅₀ \pm SD (μ M) *	SI
3	0.71 \pm 0.012	>100	>141
4	1.04 \pm 0.021	>100	>96
5	1.41 \pm 0.018	>100	>71
6	0.67 \pm 0.019	>100	>149
8	1.82 \pm 0.011	>100	>55
9	1.12 \pm 0.014	>100	>89
10	0.51 \pm 0.011	>100	>196
ART **	0.095 \pm 0.010	>100	>1000
CQ ***	0.59 \pm 0.015	>100	>169

SI: selectivity index; *** CQ: chloroquine and ** ART: artesunate (positive controls). * Mean and standard deviation (SD) of triplicate experiments.

The antiplasmodial activity of compounds containing the β -carboline scaffold have been reported over the years [16,55,56,60,61]. The reported in vitro antiplasmodial activity of all compounds reaches a recently established set of criteria for antimalarial hits, which includes: knowledge of the structure-activity; an inhibitory concentration half-maximum response (IC₅₀) < 1 μ M; and an SI greater than 10-fold against a human cell line [62].

3.3.2. Evaluation of In Silico Physicochemical and Pharmacokinetic Parameters

Due to the low IC_{50} values and high selectivity, we decided to evaluate the in silico prediction of physicochemical and pharmacokinetic parameters of absorption to assess the bioavailability of compounds **3–6** and **10** when administered orally. As oral is the main route of drug administration, it is imperative that a drug candidate presents good bioavailability. The compound needs to be well absorbed to become available in the bloodstream and be delivered to the site of action [20,63,64].

The absorption of a drug can be predicted through its physicochemical properties, and the Lipinski's rule of 5 is an important filter in the evaluation of these properties that predict whether the compound will present good bioavailability when administered orally. According to this rule, the compound must have molecular weight ≤ 500 g/mol, octanol/water partition coefficient ($\text{Log } p$) ≤ 5 , number of hydrogen donors ($\text{NH} + \text{OH}$) ≤ 5 , and number of hydrogen acceptors ($\text{N} + \text{O}$) ≤ 10 [18].

The SwissADME online platform provides information about the physicochemical properties of a compound through its molecular structure or the molecule's simplified molecular input line entry system (SMILES) notation. All five compounds selected in the study presented $\text{Log } p < 5$ and $\text{MW} < 500$, featuring a good hydrophilic-lipophilic balance and molecular weight within the ideal range to allow adequate distribution and absorption by the plasma membranes (Table 3). In addition, all compounds showed a number suitable from donors to acceptors of hydrogen bonds, according to Lipinski's Rule of 5, which suggests good oral bioavailability.

When an orally administered drug dissolves in the gastrointestinal tract, it must be sufficiently permeable through the biological membranes present to enter the systemic circulation. Since all compounds were active in the in vitro chemotherapy experiments, we proceeded with their pharmacokinetic analysis using the AdmetSar 2.0 software [37]. As observed in the Table 3, all selected compounds presented $\text{TPSA} < 140 \text{ \AA}^2$, which is predictive of a good absorption [38,39]. Corroborating this information, the in silico prediction of the compounds showed high permeability in Caco-2 cells, intestinal epithelium, and the blood-brain barrier, suggesting that the compounds have a high probability ($>95\%$) of being absorbed by the human intestine, reaching the systemic circulation, and being able to cross the blood-brain barrier. Since the analysis of the ADME properties of β -carboline alkaloids suggests good oral bioavailability, as well as good absorption by biological membranes, presenting a pharmacokinetic profile like CQ, all compounds were selected for in vivo assays of antiplasmodial activity.

Table 3. In silico evaluation of the pharmacokinetic absorption properties of compound **3–6**, **10**, and CQ by AdmetSar.

Compound	HIE (<i>p</i>)	Caco-2 (<i>p</i>)	BBB (<i>p</i>)
3	+(0.98)	+(0.84)	+(0.95)
4	+(0.98)	+(0.84)	+(0.95)
5	+(0.98)	+(0.87)	+(0.97)
6	+(0.98)	+(0.87)	+(0.97)
10	+(0.99)	+(0.82)	+(0.96)
CQ	+(0.99)	+(0.66)	+(1.00)

HIE: human intestinal epithelium; Caco-2: human colon adenocarcinoma cells; BBB: blood-brain barrier; "+" sign: indicates permeability of the compound to the model; (*p*): probability of the event occurring.

3.3.3. In Vivo Antimalarial Activity

For the in vivo assays, the curative experiment was initially carried out, in which the compounds **3**, **4**, **5**, **6**, and **10** were tested orally (10 mg/kg) for five days, starting the treatment on the 3rd dpi, after the appearance of the first iRBC. The recommendation for in vivo efficacy is that a lead compound should achieve parasite clearance at a dose that eradicates 90% of the target pathogen when administered orally (<50 mg/kg) in the blood stages of infection (typically four doses in 4 days) in the severe malaria mouse model [62].

As shown in Table 4, the mean parasitemia of infected mice and treated with compounds 4, 6, and 10, was statistically lower than the observed on the untreated group on the 5th dpi (Tukey test, $p < 0.05$). Likewise, no difference was observed in the proportion of circulating parasites in the treated groups with alkaloids 4, 6, and 10 related to the standard antimalarial at 5th dpi (Tukey Test, $p > 0.05$). However, on the 7th dpi, the mean parasitemia observed for all alkaloids tested was equivalent to that observed for the untreated group (Table 4), suggesting loss of efficacy.

Table 4. Values of parasitemia reduction on the 5th and 7th days post infection, after a curative test with the β -carboline alkaloids (10 mg/Kg).

Compound	Dosage (mg/Kg)	Parasitemia \pm SD (% Reduction)		n
		5th dpi	7th dpi	
3	10	1.87 \pm 1.02 ^b (41.19)	7.50 \pm 2.49 (0)	10
4	10	0.79 \pm 0.63 ^{a,b} (75.16)	5.48 \pm 3.64 (20.00)	10
5	10	5.00 \pm 1.59 (0.00)	7.20 \pm 4.57 (0)	10
6	10	1.13 \pm 0.48 ^{a,b} (64.36)	5.48 \pm 3.27 (0)	10
10	10	1.02 \pm 0.93 ^{a,b} (67.92)	8.37 \pm 2.26 (0)	10
CQ*	10	0.24 \pm 0.05 ^a (96.5)	0.21 \pm 0.27 ^a (96.1)	09
Water	-	3.18 \pm 2.68	6.85 \pm 2.57	13

dpi: day post infection; SD: standard deviation; n: number of animals belonging to the group. ^a = p value < 0.05 (compared to the water-treated group). ^b = p value > 0.05 (compared to the CQ-treated group). * CQ (chloroquine) was used as positive control drug.

C57BL/6 mice infected with PbA, without any treatment, develop neurological signs (reduced exploratory behavior, decreased reflex, self-preservation, coma, and epilepsy) resulting in death between days 6 and 11 p.i. [42,43,65], data consistent with results obtained in this study (Figure 1A–C). However, the animals treated with compound 4 were resistant to the development of CM, as 90% of them remained alive until the 14th dpi (Figure 1A–C). In contrast, only 30% of animals treated with its isomer survived until the 14th dpi without demonstrating any CM signal. Treatment with compound 10 was also able to prevent the development of CM in 70% (Figure 1A–C) of the animals. No protective effect against CM development was observed when the animals were treated with compounds 5 and 6. In Figure 1D,E, it is possible to observe extensive areas of cranial hemorrhage in the animals that were not protected from CM, following or not the treatment with compounds. Consistently with clinical assessment, CM mice clearly showed hemorrhage areas, which could be observed macro (Figure 1D,E) and microscopically (Figure 2A–C), as well as the presence of vascular obstruction areas (Figure 2C,D). On the other hand, mice protected against CM did not present cerebral damage, neither macro (Figure 1E,G) nor microscopically (Figure 2E,F).

Considering that curative treatment with alkaloids 4 and 10 was able to protect against CM, but did not prevent parasitic growth, in order to assess whether the treatment method could influence the effectiveness of drugs, the suppressive tests were performed. For this, four hours after infection, the animals were orally treated with the compounds for five days at the same doses as the curative treatment regimen (10 mg/kg). From the 4th dpi (last day of treatment), blood parasitemia, clinical score, and survival of the animals were followed.

As seen in Table 5, the parasitemia of mice infected and treated in a suppressive regimen with compound 10 was statistically lower than the untreated group on the 5th dpi (Tukey test, $p < 0.05$). However, the IMP potential was not sustained in subsequent days and on the 7th dpi, the group treated with the alkaloid 10 showed a reduction of almost 50% in IMP potential compared to 5th dpi. Even so, this compound can still be considered active at this point in the study. Compound 4, despite having exhibited an IMP potential of 40% at 5th dpi, showed no statistically significant difference compared to the untreated but infected group. Compound 3 was not effective in inhibiting the parasite growth on a suppressive treatment regimen. This result suggests the total ineffectiveness of the compounds 3 and 4 in reducing parasitemia when administered in a suppressive regimen.

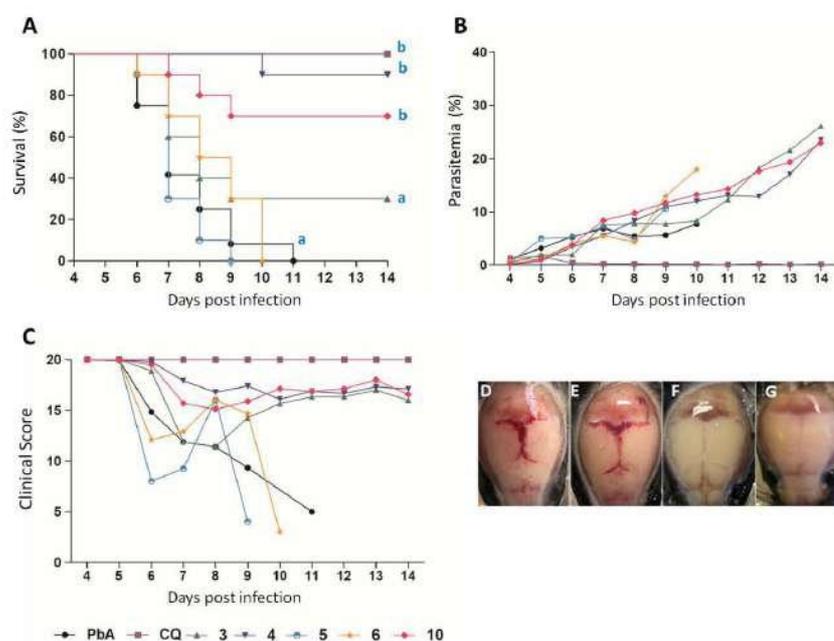


Figure 1. Effect of curative treatment with β -carboline compounds (10 mg/kg) on distinct parameters from C57BL/6 mice infected with *P. berghei* ANKA. (A) β -carboline compound 4 and 10 significantly prolonged the survival of mice inhibiting the CM development; (B) Effect of β -carboline compounds on parasitemia in PbA-infected mice; (C) RMCBS score (D–G) Macroscopic analysis of the brain; (D) PbA infected animals; (E) PbA infected and treated with β -carboline compounds who developed CM; (F) PbA infected and treated with CQ; and (G) PbA infected and treated with β -Carboline compounds and protected against CM. Equal letters (a or b) indicate no significant difference (p value > 0.05 (ANOVA + Post Test Tukey)). Different letters (a or b) indicate significant difference (p value < 0.05 (ANOVA + Post Test Tukey)).

The suppressive treatments with the compounds 3 and 10 were also able to inhibit the development of CM more efficiently than curative assay (Figure 3A–C). However, in the suppressive treatment regimen, compound 4 showed a reduction in the protection rate against CM compared to the curative experiment. Compound 4 continued to be significant, protecting 60% of the animals (Figure 3A). All animals belonging to the untreated control group (PbA) developed CM between the 6th and 11th dpi, evidenced by mean parasitemia of less than 10% (Figure 3B), mean clinical score ≤ 8 (Figure 3C), and presence of cerebral hemorrhage macroscopically observed (Figure 3D,E).

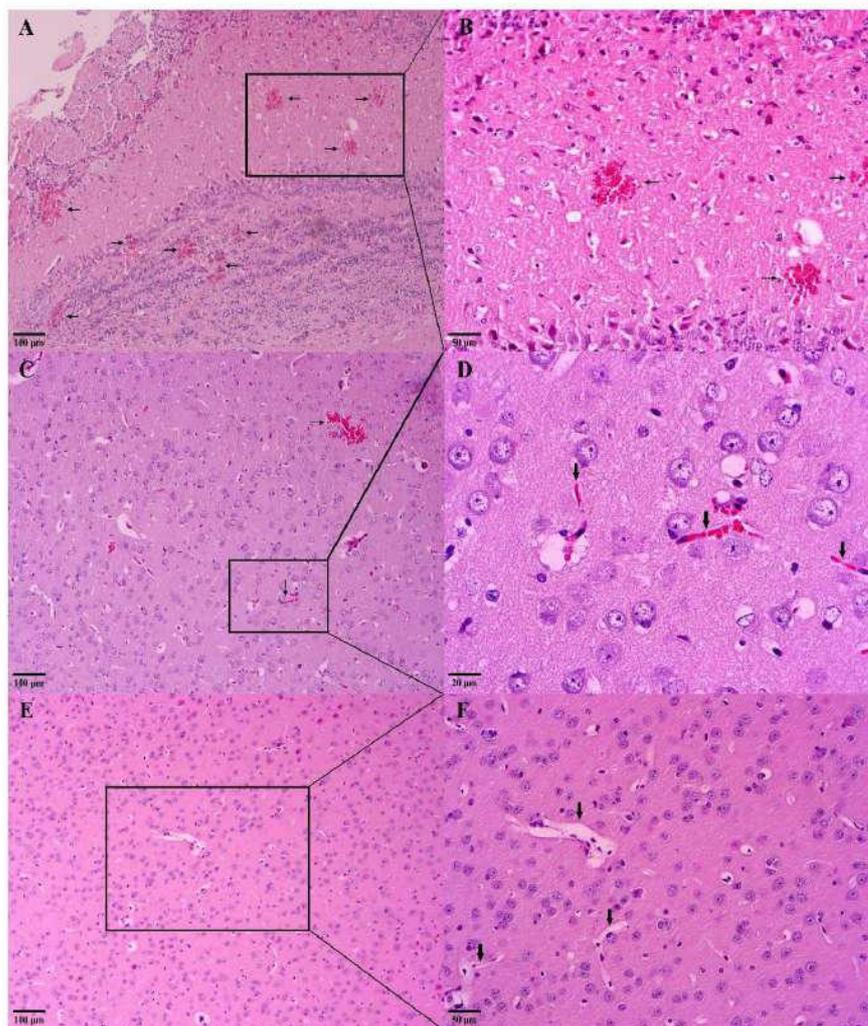


Figure 2. Images of histological sections of brain tissue stained with hematoxylin-eosin (HE). (A–D) Representative histological section of the brain of animals who did not receive treatment; (A,B) PbA only infected animals: black arrow shows hemorrhagic area; (C,D) PbA only infected animals: black arrow shows hemorrhagic area and vascular obstruction; (E,F) Schematic representation of histological section of the brain of animals that received treatment and did not develop CM, independent of the compound (10 mg/kg); (F) PbA infected and treated animals: black arrow shows absence of vascular obstruction.

Table 5. Values of parasitemia reduction on the 5th and 7th days post infection, after suppressive test with the β -carboline compounds (10 mg/Kg).

Compound	Dosage (mg/Kg)	Parasitemia \pm SD (% Reduction)		n
		5th dpi	7th dpi	
3	10	3.56 \pm 2.57 (0.00)	7.96 \pm 3.26 (0)	10
4	10	1.88 \pm 2.46 ^b (40.88)	6.18 \pm 4.75 (9.78)	10
10	10	0.57 \pm 0.94 ^{a,b} (82.07)	3.72 \pm 3.93 ^b (45.69)	10
CQ*	10	0.24 \pm 0.05 ^a (96.5)	0.21 \pm 0.27 ^a (96.1)	9
Water	-	3.18 \pm 2.68	6.85 \pm 2.57	13

dpi: day post infection; SD: standard deviation; n: number of animals belonging to the group. ^a = p value < 0.05 (compared to the water-treated group). ^b = p value > 0.05 (compared to the CQ-treated group). * CQ (chloroquine) was used as positive control drug.

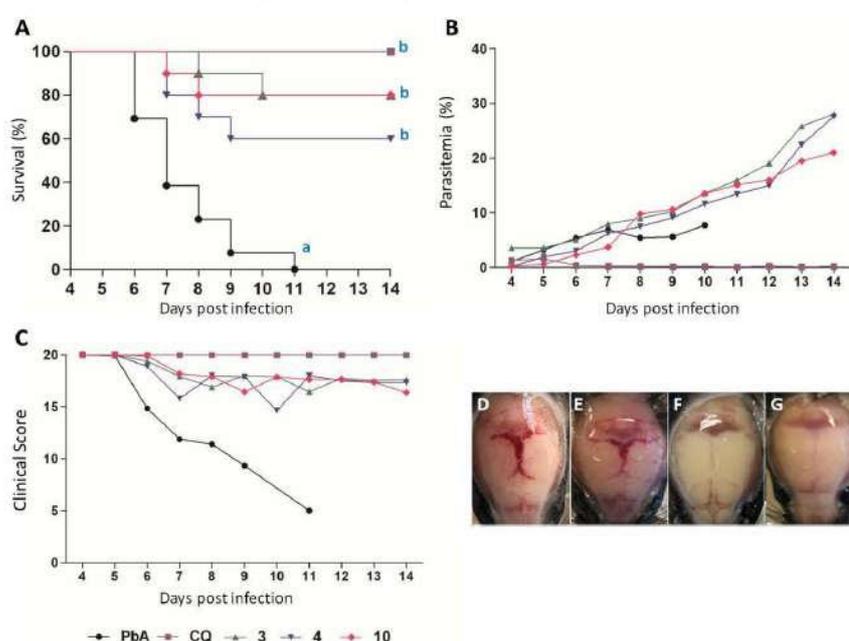


Figure 3. Effect of suppressive treatment with β -carboline compounds (10 mg/kg) on distinct parameters from C57BL/6 mice infected with *P. berghei* ANKA. (A) β -carboline compounds prolonged the survival of mice inhibiting the CM development; (B) Effect of β -carboline compounds on parasitemia in PbA-infected mice; (C) RMCBS score; (D–G) Macroscopic analysis of the brain; (D) PbA infected animals; (E) PbA infected and treated with β -carboline alkaloids who developed CM; (F) PPbA infected and treated with CQ; and (G) PbA infected and treated with β -carboline compounds and protected against CM. Equal letters (a or b) indicate no significant difference (p value > 0.05 (ANOVA + Post Test Tukey)). Different letters (a or b) indicate significant difference (p value < 0.05 (ANOVA + Post Test Tukey)).

Among the various classes of alkaloids, indole alkaloids stand out as the largest class found in nature. They are derived from the amino acid tryptophan, which, through decarboxylation, forms tryptamine and gives rise to six subclasses of indole alkaloids through varied biosynthetic routes, including β -carbolines and quinolines [66,67]. The importance of alkaloids in the treatment of malaria goes back a long way, since the discovery of the quinine, the first antimalarial drug [68]. Originating from the *Cinchona calisaya* species, quinine was isolated and characterized as an active substance, whose chemical structure is

mainly composed of an alkaloid, which is responsible for its antimalarial activity [69,70]. Despite the known antimalarial activity of quinoline alkaloids, another subclass of indole alkaloids, the β -carbolines, has been highlighted since some studies have demonstrated its efficacy in vitro and in vivo against *Plasmodium* spp. [16,55,56,60,61,71–74].

Some β -carboline derivatives were in vitro active against both sensitive or multiresistant *P. falciparum* strains, showing low IC_{50} and important SI values [71,74]. In the in vivo trials, these studies used non-severe malaria induced by the *P. berghei* NK65 model, and an antiplasmodial activity was observed. The suppression of parasitemia found by Gorki et al. (2020), at 5th dpi, ranged from 40.49% to 91.19% at 10 and 100 mg/kg, respectively [74]. In our study, we found in a CM model for the compound 10 at a dose of 10mg/kg, a percentage of reduction of 82.07% and 67.92% at 5th dpi, in the suppressive and curative assays, respectively. These data suggest a better antimalarial potential to this compound, comparing to the others β -carboline alkaloids previously tested [72,74]. It is interesting to note that a derivative from antimalarial MMV008138 was efficacious in vivo mouse model of malaria, although this is the first report to describe the protection of β -carbolines against CM [56].

Compound 10 stood out against the other compounds being able to protect, at least 60%, the animals against the development of CM in both curative and suppressive regimens. Compared to the other tested compounds, the compound 10 presents significant structural changes, such as: (i) lacks of methyl ester substituent, present in compounds 3–6, (ii) lacks of stereocenters, and (iii) presences of an aromatic ring; being these last two structural features absent in all other compounds of the series.

3.3.4. Evaluation of NO Production

Considering that CM is related to an exacerbated inflammatory process [75,76], we sought to investigate whether compound 10 has anti-inflammatory activity by reduction of nitric oxide (NO). For this purpose, the in vitro NO production by murine peritoneal macrophages treated with compound 10 at different concentrations was investigated (Figure 4). However, to ensure that the NO production was the result of an inhibition of this pathway by the compound, and not by a reduction in the macrophage number due to a possible toxic effect of the compound against these cells, firstly, the MTT assay on peritoneal macrophages of BALB/c mice was performed.

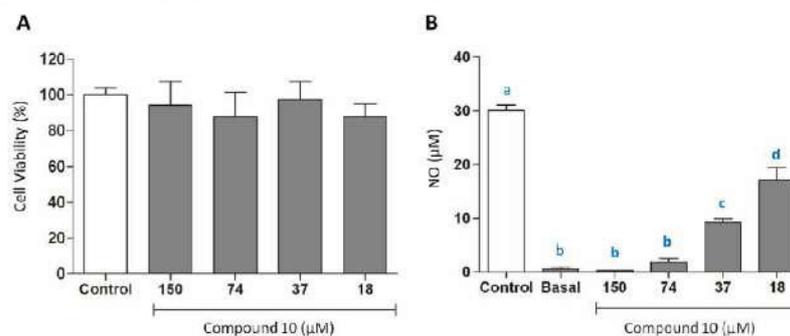


Figure 4. Cell viability and anti-inflammatory activity of compound 10. (A) MTT assay conducted in peritoneal murine macrophage; (B) Dosage of nitrite level. Control: cells stimulated with LPS and IFN- γ ; Basal: Cells without stimulation. Results were expressed as mean \pm SD of three independent experiments. One-way ANOVA followed Tukey's Comparison post-hoc test. Equal letters (a, b, c, or d) indicate no significant difference (p value $>$ 0.05 (ANOVA + Post Test Tukey)). Different letters (a, b, c, or d) indicate significant difference (p value $<$ 0.05 (ANOVA + Post Test Tukey)).

The results demonstrated that alkaloid 10 has no toxicity for the cells tested, since no statistical difference was observed in all tested concentrations (Figure 4A). After investigating the cell viability, the anti-inflammatory activity of 10 was evaluated through the dosage

of NO (Nitrite equivalent). The results showed that compound **10** was able to reduce NO levels at all concentrations tested ($p < 0.05$) (Figure 4B). Furthermore, the concentrations of 150 μM and 74 μM were considered statistically similar to the basal group ($p > 0.05$) (Figure 4B).

Nitric oxide (NO) is a signaling molecule produced by a family of nitric oxide synthase (NOS) enzymes which acts in multiple functions in the body [77]. Physiologically, NO is produced at low concentrations (iNOS-2 to 200 nM), and under pathological conditions can reach micromolar concentrations [78]. In this context, its role is widely discussed and seems to be controversial, which may provide benefits or deleterious effects, depending on the exposure time, amount of production, and the biological site where it is released [79].

There are three isoforms of the NOS enzymes, but the inducible form (iNOS) is observed in the cell's membrane with immune function, such as macrophages and microglia, whose expression is activated in inflammatory processes [77]. In parasitic diseases, such as malaria, NO has been described as an important molecule, being produced in large amounts by iNOS in response to the stimulus of the pathogen and pro-inflammatory cytokines [80,81].

Reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) are produced during CM, and the increase of these substances is associated with the development of CM in humans. Some authors suggest that among RNS, especially NO has a cytotoxic effect, being able to cross the blood–brain barrier and interferes with neurotransmission, releasing large amounts of glutamate during the excitotoxic process [7,82,83]. The result of this process is the releasing of ROS and NO, promoting neuronal death and thus contributing to cases of loss of consciousness or reversible coma [82,83]. Through the results found, it was possible to observe that compound **10** significantly reduced NO levels in stimulated macrophages, showing that it is a good candidate drug for inflammation control.

In order to understand how the compound **10** can lead to NO reduction, molecular docking on iNOS was carried out. Firstly, the redocking for the crystallographic ligand present in the enzyme (RMSD = 0.972) was performed (Figure S3A), and this compound showed high affinity for the catalytic site (-9.9 kcal/mol), interacting with the Tyr 367 residue by hydrogen bonding (Figure S3B). After this step, we performed in silico analysis for compound **10**, and the results showed that the compound **10** was able to interact with the Glu 371 and Arg 260 residues through hydrogen bonding, presenting a promising inhibition energy value (-9.6 kcal/mol) (Figure S3C,D).

Inducible nitric-oxide synthase (iNOS) is a heme protein that requires tetrahydrobiopterin (H4B) for activity [84]. Among the active site residues, the Glu371 residue plays one of the most important roles, being critical for substrate binding in this enzyme [85]. Thus, the interaction of compound **10** with a residue from the catalytic site of iNOS may be the reason for its inhibition and also for the results found by the dosage of NO.

4. Conclusions

In summary, among all the tested compounds, we highlight compound **10** since: 1—in silico predictions suggest that this compound can interact with different chemotherapeutic targets of *P. falciparum*, such as PfFNR, PfPK7, PfGrx1, and PfATP6; 2—is able to inhibit both in vitro and in vivo parasite growth; 3—protected mice against CM development; and 4—showed a good potential for interaction with iNOS, leading to reduction of NO synthesis, which may be one of the pathways of protection against ECM. These results pointed the β -carboline derivatives as potential candidates to fight CM.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pathogens11121529/s1>, Figure S1: Chemical structure of all compounds possible to be synthesized within the available aldehydes, Figure S2: Pharmacophoric map of in vitro tested compounds generated by molecular docking against 2OK8; (A) Compound 3; (B) Compound 4; (C) Compound 8; (D) Compound 5; (E) Compound 6; (F) Compound 9; (G) Compound 10. Figure S3. Evaluation of the interaction of compound 10 with the residues of the iNOS active site from *Mus musculus*. (A) Redocking of the crystallographic ligand present in the active site of iNOS. (B) Interaction of the crystallographic ligand in the active site of iNOS by hydrogen bonding with TYR 367B residue (Yellow dashed lines). (C) Molecular docking of compound 10 in iNOS site. (D) Interaction of compound 10 within the active site of iNOS by hydrogen bonding with GLU 371 and ARG 260 residues through hydrogen bonding.

Author Contributions: F.d.M.A. and C.d.S.B. prepared the synthesis and characterization of compounds; J.C.B.B., A.L.d.F., A.C.d.S.P., F.O.R., B.A.C., A.S.d.O.L., E.S.C. and V.N.R. performed in vitro/in vivo experiments, contributed to the interpretation of the data, and reviewed the final manuscript. C.L.D. and A.G.T. performed in silico experiments. F.d.P.V., G.H.R.V. and K.K.G.S. obtained the funding, designed the experimental protocols, and supervised the studies. All authors wrote and contributed to the interpretation of the data and reviewed the final manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais-Rede Mineira #00313-16; Universal APQ-1365-22), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES)-Finance Code 001, UFJF (Universidade Federal de Juiz de Fora). Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) process 303680/2021-0. A. G. Taranto is grateful to CNPq for the fellowship of 2021 (grant 310108/2020-9).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee on Animal Research of Federal University of Juiz de Fora (protocol code 022/2020).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Guinovart, C.; Sigauque, B.; Bassat, Q.; Loscertales, M.P.; Nhampossa, T.; Acácio, S.; Machevo, S.; Maculube, S.; Bambo, G.; Mucavele, H.; et al. The Epidemiology of Severe Malaria at Manhica District Hospital, Mozambique: A Retrospective Analysis of 20 Years of Malaria Admissions Surveillance Data. *Lancet Glob. Health* **2022**, *10*, e873–e881. [CrossRef]
- World Health Organization. *WHO Guidelines for Malaria-31 March 2021*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2021; Volume 1, p. 210.
- Phillips, M.A.; Burrows, J.N.; Manyando, C.; Van Huijsduijnen, R.H.; Van Voorthis, W.C.; Wells, T.N.C. Malaria. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2017**, *3*, 17050. [CrossRef] [PubMed]
- Mohanty, D.; Patnaik, J.K.; Mohanty, S.; Satpathy, S.K.; Das, B.S.; Mishra, S.K. Vascular Clogging, Mononuclear Cell Margination, and Enhanced Vascular Permeability in the Pathogenesis of Human Cerebral Malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1994**, *51*, 642–647. [CrossRef]
- Berendt, A.R.; Ferguson, D.J.P.; Gardner, J.; Turner, G.; Rowe, A.; McCormick, C.; Roberts, D.; Craig, A.; Pinches, R.; Elford, B.C.; et al. Molecular Mechanisms of Sequestration in Malaria. *Parasitology* **1994**, *108*, S19–S28. [CrossRef] [PubMed]
- Coban, C.; Lee, M.S.J.; Ishii, K.J. Tissue-Specific Immunopathology during Malaria Infection. *Nat. Rev. Immunol.* **2018**, *18*, 266–278. [CrossRef]
- Idro, R.; Marsh, K.; John, C.C.; Newton, C.R.J. Cerebral Malaria: Mechanisms of Brain Injury and Strategies for Improved Neurocognitive Outcome. *Pediatr. Res.* **2010**, *68*, 267–274. [CrossRef]
- Boivin, M.J.; Bangirana, P.; Byarugaba, J.; Opoka, R.O.; Idro, R.; Jurek, A.M.; John, C.C. Cognitive Impairment After Cerebral Malaria in Children: A Prospective Study. *Pediatrics* **2007**, *119*, e360–e366. [CrossRef]
- Magen, J.; Taylor, T.; Brim, R.; Langfitz, J.; Mboma, S.; Semrud-Clikeman, M.; Kampondeni, S. Cognitive Outcomes and Psychiatric Symptoms of Retinopathy-Positive Cerebral Malaria: Cohort Description and Baseline Results. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2017**, *97*, 225–231. [CrossRef]
- Idro, R.; Jenkins, N.E.; Newton, C.R. Pathogenesis, Clinical Features, and Neurological Outcome of Cerebral Malaria. *Lancet Neurol.* **2005**, *4*, 827–840. [CrossRef]

11. de Araújo, R.V.; Santos, S.S.; Sanches, L.M.; Giarolla, J.; El Seoud, O.; Ferreira, E.I. Malaria and Tuberculosis as Diseases of Neglected Populations: State of the Art in Chemotherapy and Advances in the Search for New Drugs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2020**, *115*, e200229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. John, C.C.; Kutamba, E.; Mugarura, K.; Opoka, R.O. Adjunctive Therapy for Cerebral Malaria and Other Severe Forms of Plasmodium Falciparum Malaria. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2010**, *8*, 997–1008. [[CrossRef](#)]
13. Varo, R.; Erice, C.; Johnson, S.; Bassat, Q.; Kain, K.C. Clinical Trials to Assess Adjuvant Therapeutics for Severe Malaria. *Malar. J.* **2020**, *19*, 268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Wicht, K.J.; Mok, S.; Fidock, D.A. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Plasmodium Falciparum Malaria. *Annu. Rev. Microbiol.* **2020**, *74*, 431–454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Dai, J.; Dan, W.; Schneider, U.; Wang, J. β -Carboline Alkaloid Monomers and Dimers: Occurrence, Structural Diversity, and Biological Activities. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *157*, 622–656. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Jaromin, A.; Gryzlo, B.; Jamrozik, M.; Parapini, S.; Basilio, N.; Cegla, M.; Taramelli, D.; Zagórska, A. Synthesis, Molecular Docking and Antiplasmodial Activities of New Tetrahydro- β -Carbolines. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 13569. [[CrossRef](#)]
17. Ashok, P.; Ganguly, S.; Murugesan, S. Review on In-Vitro Anti-Malarial Activity of Natural β -Carboline Alkaloids. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2013**, *13*, 1778–1791. [[CrossRef](#)]
18. Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23*, 3–25. [[CrossRef](#)]
19. Abraham, M.H.; Ibrahim, A.; Zissimos, A.M.; Zhao, Y.H.; Comer, J.; Reynolds, D.P. Application of Hydrogen Bonding Calculations in Property Based Drug Design. *Drug Discov. Today* **2002**, *7*, 1056–1063. [[CrossRef](#)]
20. Gleeson, M.P. Generation of a Set of Simple, Interpretable ADMET Rules of Thumb. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 817–834. [[CrossRef](#)]
21. Leeson, P.D.; Davis, A.M.; Steele, J. Drug-like Properties: Guiding Principles for Design—or Chemical Prejudice? *Drug Discov. Today Technol.* **2004**, *1*, 189–195. [[CrossRef](#)]
22. Wager, T.T.; Chandrasekaran, R.Y.; Hou, X.; Troutman, M.D.; Verhoest, P.R.; Villalobos, A.; Will, Y. Defining Desirable Central Nervous System Drug Space through the Alignment of Molecular Properties, in Vitro ADME, and Safety Attributes. *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, *1*, 420–434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Stewart, J.J.P. MOPAC: A Semiempirical Molecular Orbital Program. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **1990**, *4*, 1–103. [[CrossRef](#)]
24. Dutra, J.D.L.; Filho, M.A.M.; Rocha, G.B.; Freire, R.O.; Simas, A.M.; Stewart, J.J.P. Sparkle/PM7 Lanthanide Parameters for the Modeling of Complexes and Materials. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 3333–3341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Doye, J.P.K.; Wales, D.J. Surveying a Potential Energy Surface by Eigenvector-Following. In *Small Particles and Inorganic Clusters*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 1997; Volume 197, pp. 194–197.
26. Trott, O.; Olson, A.J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J. Comput. Chem.* **2009**, *31*, 455–461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Maia, E.H.B.; Campos, V.A.; dos Reis Santos, B.; Costa, M.S.; Lima, I.G.; Greco, S.J.; Ribeiro, R.I.M.A.; Munayer, F.M.; da Silva, A.M.; Taranto, A.G. Octopus: A Platform for the Virtual High-Throughput Screening of a Pool of Compounds against a Set of Molecular Targets. *J. Mol. Model.* **2017**, *23*, 26. [[CrossRef](#)]
28. Nunes, R.R.; Fonseca, A.L.d.; Pinto, A.C.d.S.; Maia, E.H.B.; Silva, A.M.d.; Varotti, F.d.P.; Taranto, A.G. Brazilian Malaria Molecular Targets (BraMMT): Selected Receptors for Virtual High-Throughput Screening Experiments. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2019**, *114*, e180465. [[CrossRef](#)]
29. Banfi, F.F.; Krombauer, G.C.; da Fonseca, A.L.; Nunes, R.R.; Andrade, S.N.; de Rezende, M.A.; Chaves, M.H.; dos Santos Morção Filho, E.; Taranto, A.G.; de Jesus Rodrigues, D.; et al. Dehydrobufotenin Extracted from the Amazonian Toad *Rhinella Marina* (Anura: Bufonidae) as a Prototype Molecule for the Development of Antiplasmodial Drugs. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* **2021**, *27*, e20200073. [[CrossRef](#)]
30. Lambros, C.; Vanderberg, J.P. Synchronization of Plasmodium Falciparum Erythrocytic Stages in Culture. *J. Parasitol.* **1979**, *65*, 418. [[CrossRef](#)]
31. Trager, W.; Jensen, J. Human Malaria Parasites in Continuous Culture. *Science* **1976**, *193*, 673–675. [[CrossRef](#)]
32. Chiba, P.; Pferschy, S.; Vossen, M.G.; Noedl, H. The SYBR Green I Malaria Drug Sensitivity Assay: Performance in Low Parasitemia Samples. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2010**, *82*, 398–401. [[CrossRef](#)]
33. Costa Júnior, D.B.; Araújo, J.S.C.; de Mattos Oliveira, L.; Neri, F.S.M.; Moreira, P.O.L.; Taranto, A.G.; Fonseca, A.L.; de Pilla Varotti, F.; Leite, F.H.A. Identification of Novel Antiplasmodial Compound by Hierarchical Virtual Screening and in Vitro Assays. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2020**, *39*, 3378–3386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Valsalam, S.; Agastian, P.; Esmail, G.A.; Ghilan, A.-K.M.; Al-Dhabi, N.A.; Arasu, M.V. Biosynthesis of Silver and Gold Nanoparticles Using *Musa Acuminata* Colla Flower and Its Pharmaceutical Activity against Bacteria and Anticancer Efficacy. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2019**, *201*, 111670. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Bell, C.A.; Hall, J.E.; Kyle, D.E.; Groggl, M.; Ohemeng, K.A.; Allen, M.A.; Tidwell, R.R. Structure-Activity Relationships of Analogs of Pentamidine against Plasmodium Falciparum and Leishmania Mexicana Amazonensis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, *34*, 1381–1386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42717. [[CrossRef](#)]

37. Cheng, F.; Li, W.; Zhou, Y.; Shen, J.; Wu, Z.; Liu, G.; Lee, P.W.; Tang, Y. AdmetSAR: A Comprehensive Source and Free Tool for Assessment of Chemical ADMET Properties. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 3099–3105. [\[CrossRef\]](#)
38. Paramashivam, S.K.; Elayaperumal, K.; Natarajan, B.; Ramamoorthy, M.; Balasubramanian, S.; Dhiraviam, K. In Silico Pharmacokinetic and Molecular Docking Studies of Small Molecules Derived from *Indigofera Aspalathoides* Vahl Targeting Receptor Tyrosine Kinases. *Bioinformatics* **2015**, *11*, 73–84. [\[CrossRef\]](#)
39. Ali, J.; Camilleri, P.; Brown, M.B.; Hutt, A.J.; Kirton, S.B. Revisiting the General Solubility Equation: In Silico Prediction of Aqueous Solubility Incorporating the Effect of Topographical Polar Surface Area. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 420–428. [\[CrossRef\]](#)
40. National Research Council (US); Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 8th ed.; National Academies Press (US): Washington, DC, USA, 2011.
41. Henning, A.N.; Roychoudhuri, R.; Restifo, N.P. Epigenetic Control of CD8+ T Cell Differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* **2018**, *18*, 340–356. [\[CrossRef\]](#)
42. Jiang, X.; Chen, L.; Zheng, Z.; Chen, Y.; Weng, X.; Guo, Y.; Li, K.; Yang, T.; Qu, S.; Liu, H.; et al. Synergistic Effect of Combined Artesunate and Tetramethylpyrazine in Experimental Cerebral Malaria. *ACS Infect. Dis.* **2020**, *6*, 2400–2409. [\[CrossRef\]](#)
43. Medana, I.M.; Hunt, N.H.; Chan-Ling, T. Early Activation of Microglia in the Pathogenesis of Fatal Murine Cerebral Malaria. *Glia* **1997**, *19*, 91–103. [\[CrossRef\]](#)
44. Carroll, R.W.; Wainwright, M.S.; Kim, K.Y.; Kidambi, T.; Gómez, N.D.; Taylor, T.; Haldar, K. A Rapid Murine Coma and Behavior Scale for Quantitative Assessment of Murine Cerebral Malaria. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e13124. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Peters, W. Drug Resistance in *Plasmodium Berghiei*. I. Chloroquine Resistance. *Exp. Parasitol.* **1965**, *17*, 80–89. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Ngo-Thanh, H.; Sasaki, T.; Suzue, K.; Yokoo, H.; Isoda, K.; Kamitani, W.; Shimokawa, C.; Hisaeda, H.; Imai, T. Blood–Cerebrospinal Fluid Barrier: Another Site Disrupted during Experimental Cerebral Malaria Caused by *Plasmodium Berghiei* ANKA. *Int. J. Parasitol.* **2020**, *50*, 1167–1175. [\[CrossRef\]](#)
47. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63. [\[CrossRef\]](#)
48. Sun, J.; Zhang, X.; Broderick, M.; Fein, H. Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. *Sensors* **2003**, *3*, 276–284. [\[CrossRef\]](#)
49. Xia, G.-Y.; Yao, T.; Zhang, B.-Y.; Li, Y.; Kang, N.; Cao, S.-J.; Ding, L.-Q.; Chen, L.-X.; Qiu, F. Withapubesides A–D: Natural Inducible Nitric Oxide Synthase (NOS) Inhibitors from *Physalis Pubescens*. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 10016–10023. [\[CrossRef\]](#)
50. Milani, M.; Balconi, E.; Aliverti, A.; Mastrangelo, E.; Seeber, F.; Bolognesi, M.; Zanetti, G. Ferredoxin-NADP+ Reductase from *Plasmodium Falciparum* Undergoes NADP+-Dependent Dimerization and Inactivation: Functional and Crystallographic Analysis. *J. Mol. Biol.* **2007**, *367*, 501–513. [\[CrossRef\]](#)
51. Balconi, E.; Pennati, A.; Crobu, D.; Pandini, V.; Cerutti, R.; Zanetti, G.; Aliverti, A. The Ferredoxin-NADP+ Reductase/Ferredoxin Electron Transfer System of *Plasmodium Falciparum*. *FEBS J.* **2009**, *276*, 3825–3836. [\[CrossRef\]](#)
52. Lesanavičius, M.; Aliverti, A.; Šarlauskas, J.; Čėnas, N. Reactions of *Plasmodium Falciparum* Ferredoxin:NADP+ Oxidoreductase with Redox Cycling Xenobiotics: A Mechanistic Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3234. [\[CrossRef\]](#)
53. Brokamp, R.; Bergmann, B.; Müller, I.B.; Bienz, S. Stereoselective Preparation of Pyridoxal 1,2,3,4-Tetrahydro- β -Carboline Derivatives and the Influence of Their Absolute and Relative Configuration on the Proliferation of the Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum*. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 1832–1837. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Ding, S.; Ghavami, M.; Butler, J.H.; Merino, E.F.; Slebodnick, C.; Cassera, M.B.; Carlier, P.R. Probing the B- & C-Rings of the Antimalarial Tetrahydro- β -Carboline MMV008138 for Steric and Conformational Constraints. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, *30*, 127520. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Almohim, H.; Ding, S.; Butler, J.H.; Bremers, E.K.; Butschek, G.J.; Slebodnick, C.; Merino, E.F.; Rizopoulos, Z.; Totrov, M.; Cassera, M.B.; et al. Enantiopure Benzofuran-2-Carboxamides of 1-Aryltetrahydro- β -Carbolines Are Potent Antimalarials In Vitro. *ACS Med. Chem. Lett.* **2022**, *13*, 371–376. [\[CrossRef\]](#)
56. Mathew, J.; Ding, S.; Kunz, K.A.; Stacy, E.E.; Butler, J.H.; Haney, R.S.; Merino, E.F.; Butschek, G.J.; Rizopoulos, Z.; Totrov, M.; et al. Malaria Box-Inspired Discovery of N-Aminoalkyl- β -Carboline-3-Carboxamides, a Novel Orally Active Class of Antimalarials. *ACS Med. Chem. Lett.* **2022**, *13*, 365–370. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Merckx, A.; Echaliier, A.; Langford, K.; Sicard, A.; Langsley, G.; Joore, J.; Doerig, C.; Noble, M.; Endicott, J. Structures of *P. Falciparum* Protein Kinase 7 Identify an Activation Motif and Leads for Inhibitor Design. *Structure* **2008**, *16*, 228–238. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Rahlfs, S.; Fischer, M.; Becker, K. *Plasmodium Falciparum* Possesses a Classical Glutaredoxin and a Second, Glutaredoxin-like Protein with a PICOT Homology Domain. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 37133–37140. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. Krishna, S.; Pulcini, S.; Fath, E.; Staines, H. Artemisinins and the Biological Basis for the PfATP6/SERCA Hypothesis. *Trends Parasitol.* **2010**, *26*, 517–523. [\[CrossRef\]](#)
60. Yao, Z.-K.; Krai, P.M.; Merino, E.F.; Simpson, M.E.; Slebodnick, C.; Cassera, M.B.; Carlier, P.R. Determination of the Active Stereoisomer of the MEP Pathway-Targeting Antimalarial Agent MMV008138, and Initial Structure–Activity Studies. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 1515–1519. [\[CrossRef\]](#)

61. Poje, G.; Pessanha de Carvalho, L.; Held, J.; Moita, D.; Prudêncio, M.; Perković, I.; Tandarić, T.; Vianello, R.; Rajić, Z. Design and Synthesis of Hamiquins, Harmine and Chloroquine Hybrids as Potent Antiplasmodial Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *238*, 114408. [[CrossRef](#)]
62. Katsuno, K.; Burrows, J.N.; Duncan, K.; Van Huijsduijnen, R.H.; Kaneko, T.; Kita, K.; Mowbray, C.E.; Schmatz, D.; Warner, P.; Slingsby, B.T. Hit and Lead Criteria in Drug Discovery for Infectious Diseases of the Developing World. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14*, 751–758. [[CrossRef](#)]
63. Lin, J.; Sahakian, D.; de Morais, S.; Xu, J.; Polzer, R.; Winter, S. The Role of Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity in Drug Discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 1125–1154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Ruiz, M.E.; Scioli Montoto, S. Routes of Drug Administration. In *ADME Processes in Pharmaceutical Sciences*; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2018; pp. 97–133.
65. He, X.; Yan, J.; Zhu, X.; Wang, Q.; Pang, W.; Qi, Z.; Wang, M.; Luo, E.; Parker, D.M.; Cantorna, M.T.; et al. Vitamin D Inhibits the Occurrence of Experimental Cerebral Malaria in Mice by Suppressing the Host Inflammatory Response. *J. Immunol.* **2014**, *193*, 1314–1323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Dewick, P. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 2nd ed.; John Wiley & Sons Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 2002; ISBN 0471496413.
67. Ryan, K.S.; Drennan, C.L. Divergent Pathways in the Biosynthesis of Bisindole Natural Products. *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 351–364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Talisuna, A.O.; Bloland, P.; D'Alessandro, U. History, Dynamics, and Public Health Importance of Malaria Parasite Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **2004**, *17*, 235–254. [[CrossRef](#)]
69. Achan, J.; Talisuna, A.O.; Erhart, A.; Yeka, A.; Tibenderana, J.K.; Baliraine, F.N.; Rosenthal, P.J.; D'Alessandro, U. Quinine, an Old Anti-Malarial Drug in a Modern World: Role in the Treatment of Malaria. *Malar. J.* **2011**, *10*, 144. [[CrossRef](#)]
70. Andrade-Neto, V.F.; Brandão, M.G.L.; Stehmann, J.R.; Oliveira, L.A.; Kretzli, A.U. Antimalarial Activity of Cinchona-like Plants Used to Treat Fever and Malaria in Brazil. *J. Ethnopharmacol.* **2003**, *87*, 253–256. [[CrossRef](#)]
71. Piot, J.; Sanon, S.; Azas, N.; Mahiou, V.; Jansen, O.; Angenot, L.; Balansard, G.; Ollivier, E. Phytochemical and Pharmacological Study of Roots and Leaves of Guiera Senegalensis J.F. Gmel (Combretaceae). *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *106*, 173–178. [[CrossRef](#)]
72. Takasu, K.; Shimogama, T.; Saiin, C.; Kim, H.-S.; Wataya, Y.; Brun, R.; Ihara, M. Synthesis and Evaluation of β -Carbolinium Cations as New Antimalarial Agents Based on π -Delocalized Lipophilic Cation (DLC) Hypothesis. *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, *53*, 653–661. [[CrossRef](#)]
73. Yenjai, C.; Sriprajon, S.; Sriprajon, P.; Kittakoop, P.; Jintasirikul, A.; Tanticharoen, M.; Thebtaranonth, Y. Coumarins and Carbazoles with Antiplasmodial Activity from Clausena Harmandiana. *Planta Med.* **2000**, *66*, 277–279. [[CrossRef](#)]
74. Gorki, V.; Walter, N.S.; Singh, R.; Chauhan, M.; Dhingra, N.; Salunke, D.B.; Kaur, S. β -Carboline Derivatives Tackling Malaria: Biological Evaluation and Docking Analysis. *ACS Omega* **2020**, *5*, 17993–18006. [[CrossRef](#)]
75. Wassmer, S.C.; Emile, G.; Grau, R. Severe Malaria: What's New on the Pathogenesis Front? Graphical Abstract HHS Public Access. *Int. J. Parasitol.* **2017**, *47*, 145–152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Sierro, F.; Grau, G.E.R. The Ins and Outs of Cerebral Malaria Pathogenesis: Immunopathology, Extracellular Vesicles, Immunometabolism, and Trained Immunity. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 830. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Khazan, M.; Hdayati, M. The Role of Nitric Oxide in Health and Diseases. *Scimetr* **2014**, *4*, 38–43. [[CrossRef](#)]
78. Brown, G.C. Nitric Oxide and Neuronal Death. *Nitric Oxide* **2010**, *23*, 153–165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Brunet, L.R. Nitric Oxide in Parasitic Infections. *Int. Immunopharmacol.* **2001**, *1*, 1457–1467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Wink, D.A.; Hines, H.B.; Cheng, R.Y.S.; Switzer, C.H.; Flores-Santana, W.; Vitek, M.P.; Ridnour, L.A.; Colton, C.A. Nitric Oxide and Redox Mechanisms in the Immune Response. *J. Leukoc. Biol.* **2011**, *89*, 873–891. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Forstermann, U.; Sessa, W.C. Nitric Oxide Synthases: Regulation and Function. *Eur. Heart J.* **2012**, *33*, 829–837. [[CrossRef](#)]
82. Lai, T.W.; Zhang, S.; Wang, Y.T. Excitotoxicity and Stroke: Identifying Novel Targets for Neuroprotection. *Prog. Neurobiol.* **2014**, *115*, 157–188. [[CrossRef](#)]
83. Fujikawa, D.G. The Role of Excitotoxic Programmed Necrosis in Acute Brain Injury. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2015**, *13*, 212–221. [[CrossRef](#)]
84. Ghosh, S.; Wolan, D.; Adak, S.; Crane, B.R.; Kwon, N.S.; Tainer, J.A.; Getzoff, E.D.; Stuehr, D.J. Mutational Analysis of the Tetrahydrobiopterin-Binding Site in Inducible Nitric-Oxide Synthase. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 24100–24112. [[CrossRef](#)]
85. Crane, B.R.; Arvai, A.S.; Ghosh, D.K.; Wu, C.; Getzoff, E.D.; Stuehr, D.J.; Tainer, J.A. Structure of Nitric Oxide Synthase Oxygenase Dimer with Pterin and Substrate. *Science* **1998**, *279*, 2121–2126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

ANEXO G: ARTIGO PUBLICADO, EM COLABORAÇÃO, DURANTE O DOUTORADO



Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine

Vol.:55 | (e0590-2022) | 2022

<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0590-2022>



Major Article

In vitro and *in silico* assessment of new beta amino ketones with antiplasmodial activity

Gabriela Camila Krombauer^[1], Karla de Sena Guedes^[1], Felipe Fingir Banfi^[1], Renata Rachide Nunes^[2], Amanda Luisa da Fonseca^[2], Ezequias Pessoa de Siqueira^[3], Jéssica Córrea Bezerra Bellei^[4], Kézia Katiani Gorza Scopel^[4], Fernando de Pilla Varotti^[2] and Bruno Antônio Marinho Sanchez^[1]

[1]. Universidade Federal de Mato Grosso, Núcleo de Pesquisa e Apoio Didático em Saúde, Laboratório de Imunopatologia e Doenças Tropicais, Sinop, MT, Brasil.

[2]. Universidade Federal de São João del Rei, Campus Centro Oeste, Núcleo de Pesquisa em Química Biológica (NQBio), Divinópolis, MG, Brasil.

[3]. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto René Rachou, Laboratório de Química, Belo Horizonte, MG, Brasil.

[4]. Universidade Federal de Juiz de Fora, Centro de Pesquisas em Parasitologia, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Juiz de Fora, MG, Brasil.

ABSTRACT

Background: Based on the current need for new drugs against malaria, our study evaluated eight beta amino ketones *in silico* and *in vitro* for potential antimalarial activity.

Methods: Using the Brazilian Malaria Molecular Targets (BraMMT) and OCTOPUS® software programs, the pattern of interactions of beta-amino ketones was described against different proteins of *P. falciparum* and screened to evaluate their physicochemical properties. The *in vitro* antiplasmodial activities of the compounds were evaluated using a SYBR Green-based assay. In parallel, *in vitro* cytotoxic data were obtained using the MTT assay.

Results: Among the eight compounds, compound 1 was the most active and selective against *P. falciparum* ($IC_{50} = 0.98 \mu\text{M}$; $SI > 60$). Six targets were identified in BraMMT that interact with compounds exhibiting a stronger binding energy than the crystallographic ligand: *P. falciparum* triphosphate phosphoglycolate complex (1LYX), *P. falciparum* reductase (2OK8), PfPK7 (2PML), *P. falciparum* glutaredoxin (4NOZ), PfATP6, and PfHT.

Conclusions: The physicochemical properties of compound 1 were compatible with the set of criteria established by the Lipinski rule and demonstrated its potential as a drug prototype for antiplasmodial activity.

Keywords: Malaria. Chemotherapy. Antimalarial. Docking.

INTRODUCTION

Malaria continues to be one of the most important public health problems, with an estimated > 400,000 deaths each year^{1,2}. In humans, the disease is caused by the protozoan species of the *Plasmodium* genus³.

Although several substances are used in antimalarial chemotherapy, many of them are no longer used for treatment

because of their side effects or the development of parasitic resistance⁴⁻¹¹. Therefore, new strategies should be used, such as the addition of a third drug with independent antiparasitic activity¹⁰.

Computational tools have been employed to understand complex interactions in biological models¹².

The main objective of the computational model is to replicate the patterns of biological systems¹³ with a high accuracy. *In silico*

Corresponding author: Fernando de Pilla Varotti, e-mail: varotti@ufsj.edu.br

Authors' contribution: GCK, KdeSG, FFB, KKG, CL and JCB: Performed the *In vitro* tests. EPS: Performed the synthesis of the compounds. CdeSB: Structural elucidation of the compounds. ALdeF and RRN: Performed *In silico* tests. BAMS and IdePV: Coordinated the study and project administration. All authors read and approved the manuscript.

Conflict of Interest: The authors declare that there is no conflict of interest.

Financial Support: This work was financially supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso – FAPEMAT (042/2016), National Council for Scientific and Technological Development – CNPq, FAPEMIG, and Capes (Finance Code 001) for postdoctoral fellowship.

Received 7 December 2021 | Accepted 24 June 2022



www.scielo.br/rsbmt | www.rsbtm.org.br

1

models that achieve this goal are an important complement to experimental studies and can provide valuable insights into the mode of action of bioactive compounds¹⁴.

In this context, virtual screening (VS) is an important methodology in the discovery process of new antimalarial candidates¹⁵ and enables the identification of potential targets, contributing to the elucidation of its mechanism of action¹⁶.

Heterocyclic compounds are potential pharmacotherapeutic agents, which include antihypertensive effects and antimicrobials¹⁷⁻²⁰. Morpholine, piperidine, and their derivatives are examples of heterocyclic compounds that contain a nitrogen atom²¹⁻³¹. In the specific context of malaria, piperidine derivatives are low-cost synthesized compounds with efficient antimalarial activity³². In addition, morpholine scaffolds have already been proven to be good starting points for the development of new antimalarial candidates³³.

Thus, VS associated with biological assays is an increasingly useful approach for developing tools to identify potential antimalarial scaffolds³⁴. Therefore, the present study aimed to evaluate the antiplasmodial activities of eight compounds synthesized from beta-amine ketones *in silico* and *in vitro*.

METHODS

Synthesis, Purification and Structural elucidation

Eight molecules were obtained: morpholines (1, 3, 5, and 6) and piperidines (2, 4, 7, and 8) (Figure 1). A description is provided in the supplementary material.

Antiplasmodial activity

P. falciparum strain W2 (chloroquine-resistant) was cultured as previously described^{36,37}. The antiplasmodial activity of β -amino-ketones (compounds 1-8) against *P. falciparum* cultures was evaluated using SYBR³⁸. Ring-stage parasites were equally distributed in 96-well microculture plates. Serial dilutions of the compounds were performed ranging from 0.01 to 100 $\mu\text{g/mL}$. Chloroquine (CQ) was used as the antimalarial control. A fluorometer (Fluoroskan Ascent, Thermo Laboratories) with excitation at 485 nm and emission at 535 nm was used to determine the viability of the parasites. All experiments were performed in triplicates. Results are expressed as the mean of the IC_{50} (drug concentration that reduced parasite viability by 50%).

In vitro cytotoxicity

All compounds were assessed against WI-26VA4 (ATCC CCL-95.1, USA) human pulmonary fibroblast cells by MTT assay³⁹. Cells were cultured in RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum in 96-well plates⁴⁰. Compounds 1-8 were diluted to concentrations ranging from 0.2-200 $\mu\text{g/mL}$ and incubated for 48 h in a 5% CO_2 atmosphere at 37 °C.

Cellular viability was determined at 540 nm to measure the signal and background (Spectra Max340PC, Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA). The minimum lethal dose for 50% of the cells (LD_{50}) was determined as previously described⁴¹.

Selectivity index (SI)

Selectivity index (SI) is the ratio between the values of LD_{50} and IC_{50} , cytotoxicity of each compound tested. Values greater than 10 were considered low cytotoxic, whereas values below 10 were considered cytotoxic⁴².

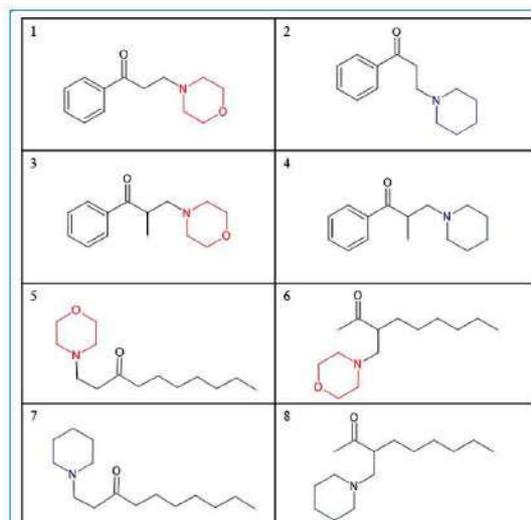


FIGURE 1: Molecular structures of compounds with morpholine (1-4) and piperidine (5-8).

Statistical analysis

IC_{50} and LD_{50} were determined using the equation of the curve obtained by plotting parasitemia reduction (%) or cellular death (%) vs. the concentration of the compound (log scale) using the GraphPad Prism software (version 5.0 for Windows, San Diego, California, USA). Due to the non-normality of the data distribution, the comparison of IC_{50} and LD_{50} between morpholine and piperidine was analyzed using the nonparametric Mann-Whitney U test. Statistical significance was defined at 5% ($p < 0.05$).

Evaluation of virtual screening and ADMET properties

Description is available in the supplementary material.

RESULTS

Antiplasmodial activity

The antiplasmodial activities of these eight compounds are listed in Table 1. IC_{50} values in the *in vitro* antimalarial tests (W2 strain) ranged from 0.98 μM to 47.95 μM . Compounds 1 and 4 had IC_{50} values close to those of chloroquine, a standard antimalarial drug. There was no statistically significant difference in IC_{50} or LD_{50} between parasites treated with morpholine and piperidine ($p = 0.225$ and $p = 0.593$, respectively).

Cytotoxic activity

The compounds did not show cytotoxic activity, since the LD_{50} values ranged from 33.97 μM to > 100 μM compared to the control drug (chloroquine) (Table 1).

Compounds 2, 3, and 8 were not selective, with SI values below 10 (9.46, 3.07, and 0.81, respectively). Compounds 1, 4, 5, 6, and 7 showed the highest selectivity ($\text{SI} > 10$), with values ranging from 20.44 to 128.21 (Table 1).

TABLE 1: Morpholines and piperidines antiparasitodal activity.

Compounds	IC ₅₀ ± SD (µM) ^a	LD ₅₀ ^a ± SD (µM) ^a	SI
Morpholines			
1	0.98 ± 0.01	59.78 ± 6.83	61
3	32.53 ± 0.02	>100	3.07
5	3.93 ± 0.01	80.32 ± 9.03	20.44
6	3.93 ± 0.02	94.45 ± 18.90	24.03
Piperidines			
2	3.59 ± 0.08	33.97 ± 18.91	9.46
4	0.78 ± 0.09	>100	128.21
7	2.49 ± 0.03	>100	40.16
8	47.95 ± 18.51	38.82 ± 1.16	0.81
Chloroquine (CQ)	0.92 ± 0.01	>100	108.70

Drug concentration that reduced parasite viability in 50% (IC₅₀) and WI-26VA4 cells viability in 50% (LD₅₀), and selectivity index (SI) values of the compounds. ^aMean and standard deviation (SD) of triplicate experiments. The test of the hypothesis of equality of IC₅₀ and LD₅₀ between the morpholine and piperidine groups was p=0.225 and 0.593, respectively (Mann-Whitney U test).

Compound 1 stood out for its IC₅₀ corresponding to 0.98, as well as for its SI of 61 and the values of binding energy it exhibited against the targets presented in BraMMT (Brazilian Malaria Molecular Targets), as described below.

Therefore, the docking assay and physicochemical properties of this compound were analyzed.

Virtual screening

Table 2 presents the molecular targets, locations, and enzymatic classes of the 35 proteins listed in the Brazilian Malaria Molecular Targets (BraMMT). Virtual screening of the compounds was performed against all 35 BraMMT.

As shown in Table 3, six of the 35 targets that make up BraMMT interacted with compounds 1-8, presenting binding energies superior to the crystallographic data. The six targets that were linked to the compounds were: *P. falciparum* triphosphate phosphoglycolate complex (1LYX), ferredoxin-NADP + *P. falciparum* reductase (2OK8), crystal structure of PfPK7 (2PML), oxidation protein of *P. falciparum* glutaredoxin (4N0Z), *P. falciparum* ATPase orthologous calcium pump (PfATP6), and *P. falciparum* hexose transporter (PfHT). Compound 4 stood out on presenting the most satisfactory result, establishing a connection with the six targets, and presenting a higher binding value than the crystallographic data.

All tested compounds (1-8) interacted with the 2OK8 target, in which they obtained a stronger binding energy with the target than the crystallographic ligand. Compounds 1, 2, 3, 4, 6, and 8 interacted with the 4N0Z target. Compound 4 interacted with PfATP6, obtaining a similar value of binding energy (-7.3 kcal/mol) with the target compared to the crystallographic ligand (-7.2 kcal/mol).

Compounds 1 (-6.5 kcal/mol), 2 (-6.7 kcal/mol), 3 (-6.3 kcal/mol), 4 (-6.5 kcal/mol), 6 (-5.9 kcal/mol), and 8 (-6.1 kcal/mol) obtained stronger binding energy with the target than the crystallographic ligand (-5.7 kcal/mol), demonstrating interaction with PfHT.

Furthermore, compound 1 stood out in the antimalarial and cytotoxicity tests and was therefore chosen for intermolecular and physicochemical analyses.

Figure 2 shows a two-dimensional map of linker-receptor interactions with PfHT and the chemical bonds between compound 1 and the target. Pharmacophoric groups and possible structural improvements in permeability, absorption, and oral bioavailability have been indicated. By analyzing the molecular interactions of 1 with PfHT, it was possible to observe the interaction of 1 with GLN169 and THR145 residues (Figure 2). Molecular anchoring with D-glucose was performed to recognize the interactions at the PfHT binding site.

Tests of physicochemical properties

Supplementary Table 1 shows SwissADME profiles of compound 1 and chloroquine. Compound 1 had a CLogP <5 (1.67) and a molecular weight less than 500 g/mol (219.28 g/mol) (Supplementary Table 1). There were three hydrogen acceptor groups that performed the interactions and no hydrogen donor groups.

Compounds with CLogP values less than 3 present a low risk of side effects and toxicity, which indicates a low risk of retention and storage of the compound. Patterns of mutagenicity, tumorigenicity, and irritability were not associated with the molecular structure of compound 1, corroborating the literature, since this compound had CLogP <3 (Supplementary Table 1).

In addition, compound 1 had a superior synthetic facility compared to chloroquine, standing out for its solubility in water.

DISCUSSION

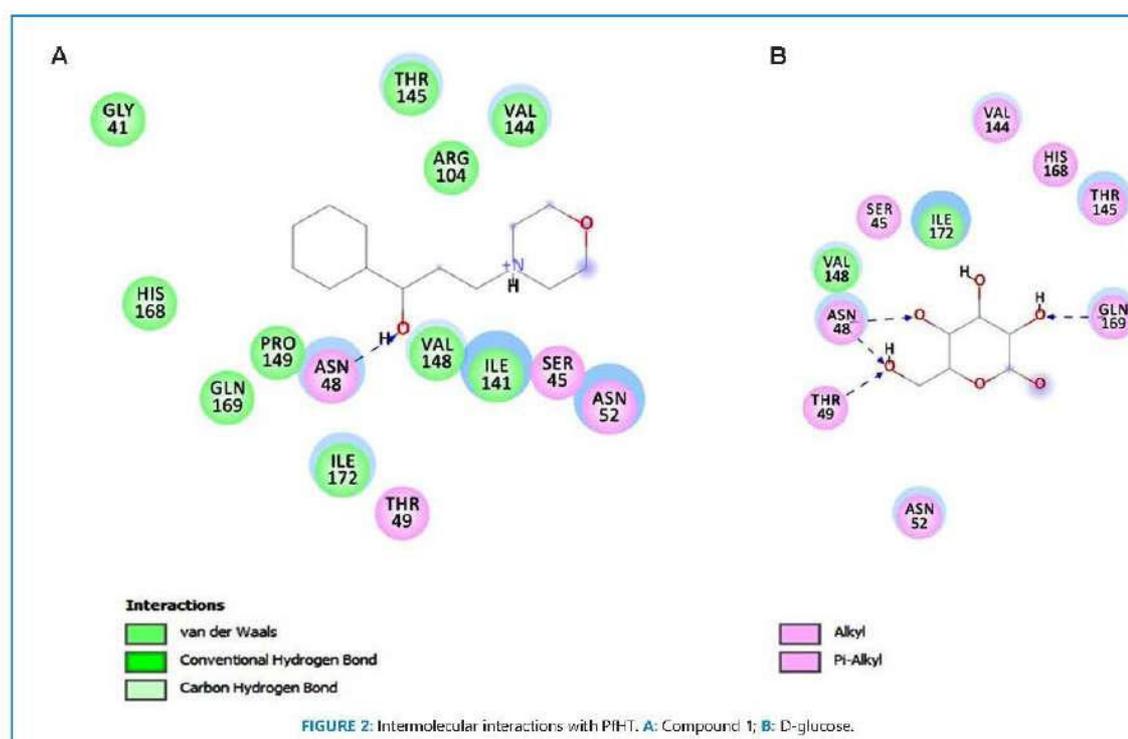
The committee coordinated by the Global Health Innovative Technology (GHIT) foundation, guided by the specific requirements for the disease and considering the target product and candidate profiles, defined a set of criteria in an attempt to validate new antimalarial candidates. These criteria were divided into validation

TABLE 2: Brazilian Malaria Molecular Targets (BraMMT).

PDB Code	Name	Enzymatic class	Location
1LF3	Plasmeprin II	Hydrolase	Digestive vacuole
1LYX	Triosephosphate Isomerase (PFTIM)-Phosphoglycolate	Isomerase	Cytoplasm
1NHW	Enoyl-acyl-carrier-protein reductase	Oxidoreductase	Apicoplast
1O5X	Triosephosphate Isomerase	Isomerase	Cytoplasm
1QNG	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Isomerase	Cytoplasm
1RL4	Formylmethionine deformylase	Hydrolase	Apicoplast
1TV5	Dihydroorotate dehydrogenase	Oxidoreductase	Cytoplasm e Nucleus
1U4O	L-lactate dehydrogenase	Oxidoreductase	Cytoplasm
1YWG	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Oxidoreductase	Cytoplasm
2AAW	Glutathione s-transferase	Transferase	Cytoplasm
2ANL	Plasmeprin IV	Hidrolase	Digestive vacuole
2OK8	Putative ferredoxin--NADP reductase	Oxidoreductase	Apicoplast
2PML	Ser/Thr protein kinase	Transferase	Cytoplasm
2Q8Z	Orotidine-monophosphate-decarboxylase	Liase	Nucleus
2VFA	Hypoxantine-guanine phosphoribosyltransferase	Transferase	Apicoplast
2VN1	70 KDA peptidylprolyl isomerase	Isomerase	Nucleus
2YOG	Thymidylate kinase	Transferase	Nucleus
3AZB	Beta-hydroxyacyl-ACP dehydratase	Lyase	Cytoplasm
3BPF	Falcipain II	Hydrolase	Digestive vacuole
3CLV	Rab5 Protein	Signaling protein	Cytoplasm
3FNU	HAP Protein	Hydrolase	Digestive vacuole
3K7Y	Aspartate aminotransferase	Transferase	Cytoplasm
3N3M	Orotidine 5'-phosphate decarboxylase	Lyase	Apicoplast
3PHC	Purine nucleoside phosphorylase	Transferase	Nucleus
3QS1	Plasmeprin I	Hydrolase	Digestive vacuole
3T64	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	Hydrolase	Nucleus
3TLX	Adenylate kinase 2	Transferase	Cytoplasm and mitochondria
4B1B	Thioredoxin reductase	Oxidoreductase	Cytoplasm
4CB1	22-C-Methyl-D-Erythritol 2,4-Cyclodiphosphate synthase	Lyase	Apicoplast
4J56	Thioredoxin reductase 2	Oxidoreductase	Cytoplasm
4N0Z	Glutaredoxin	Oxidoreductase	Cytoplasm
4P7S	Macrophage migration inhibitory factor-like protein	Cytokine inhibitor	Cytoplasm
4QOX	Calcium-dependent protein kinase 4	Transferase	Cytoplasm
PfATP6	Calcium pump ortholog ATPase	Transporter	Membrane
PfHT (10.5452/ma-aej21)	Hexose carrier protein	Transporter	Membrane

TABLE 3: Binding energies of compounds against BRAMMT targets (kcal.mol⁻¹).

Compounds	Molecular targets Binding energy (kcal.mol ⁻¹)					
	1LYX	2OKB	2PML	4NOZ	PfATP6	PfHT
1	-5.9	-4.4	-6.5	-4.9	-6.3	-6.5
3	-5.5	-4.5	-7.0	-4.9	-6.8	-6.3
5	-5.9	-3.6	-5.9	-4.1	-5.5	-5.6
6	-5.5	-3.7	-6.2	-4.3	-6.0	-5.9
2	-5.8	-4.4	-7.1	-4.6	-6.8	-6.7
4	-5.8	-4.6	-6.9	-4.7	-7.3	-6.5
7	-5.8	-3.7	-5.8	-4.2	-6.1	-5.5
8	-4.8	-3.7	-6.3	-4.3	-6.1	-6.1
Crystallographic	-5.6	-2.0	-6.9	-4.3	-7.2	-5.7



and activity/mechanism of action, LD₅₀ values for cell lines, IC₅₀ of the parasite, and selectivity index. The compounds must be tested according to the study of the life cycle of *Plasmodium* to evaluate their mechanism of action, correlating the manifestations of malaria. The main tests must be performed according to the target to ensure the characterization of the potential target candidate⁴⁹.

The *in vitro* cultivation of *P. falciparum* strains is the main test model for screening new compounds and monitoring resistance to antimalarial drugs, since it is possible to observe the activity, dosage, and resistance of natural and synthetic compounds through these tests⁵⁰.

IC₅₀ values must be <1 μM to validate compounds or effective compounds for *Plasmodium spp.* The selectivity index must be greater than 10 (LD₅₀ for the cell line relative to the IC₅₀ of the parasite) for *Plasmodium spp.*⁴⁸. Thus, compound 1 meets two parameters with IC₅₀ < 0.98 μM and IS=61. Compounds 4, 5, 6, and 7 presented selectivity indices of 128, 20.44, 24, and 40.16, respectively, which are satisfactory; however, the IC₅₀ was higher than 1 μM.

A study evaluating the antimalarial activity of alkaloids isolated from *Aspidosperma ulei* marker demonstrated IC₅₀ values close to 20 μM, indicating moderate activity against chloroquine-resistant *P. falciparum* strains⁵¹. According to these parameters, compounds

1 (0.98 μM), 2 (<3.59 μM), 5 (3.93 μM), and 6 (<3.93) were considered potentially active.

In a study by Ohashi⁵², it was demonstrated that the potential activity of a given compound varies between the protozoan species, obtaining different SI values according to the species analyzed. These results demonstrate that it is essential to understand the mechanisms of action of the compounds and cell lines used in the cell viability tests, in addition to the activity of the analyzed substances. Compound 1 stood out for its IC_{50} of 0.98, as well as an IS of 61. Thus, the physicochemical properties of this compound were analyzed.

Virtual screening of substances derived from the Mannich reaction was performed using 35 molecular targets obtained from BRAMMT. As shown in **Table 3**, 1LYX, 2OK8, 2PML, 4N0Z, PfATP6, and PfHT targets presented the best binding energy values for the compounds.

Using the BraMMT tool, the identification of a potential target is crucial in the discovery and rational development of new drugs to show their biological importance concurrently with the validation of the methodology to be used⁵³. Each *P. falciparum* target present in the bank was used to perform virtual screening and was identified according to its registration in the Protein Data Bank.

Ferredoxin-NADP + reductase from *P. falciparum* (PDB code: 2OK8) is associated with apicoplast metabolic pathways, a key organelle for parasite survival. Thus, *P. falciparum* exhibits a ferredoxin-NADP + reductase, giving rise to reduced ferredoxin for the essential biosynthetic pathways of the apicoplast⁵⁴. All tested substances (1-8) obtained binding energies stronger than the crystallographic ligand with the 2OK8 target.

P. falciparum glutaredoxin 1 (PDB 4N0Z) is an oxireduction protein present in the cytoplasm of the parasite that uses glutathione as a cofactor (glutaredoxin). This protein is exclusively found in *Plasmodium* species and plays a role in the central performance of maintaining parasite homeostasis⁵⁵. Compounds 1, 2, 3, 4, 6, and 8q exhibited stronger binding energies with the 4N0Z target than with the crystallographic ligand.

P. falciparum ATPase orthologous calcium pump (PDB PfATP6) is present in the sarcoplasmic reticulum of *P. falciparum*. The cytoplasmic calcium concentration increases with inhibition and therefore compromises the parasite's signaling pathways⁵⁶. Compound 4 obtained a higher binding energy value with the target than that of the crystallographic ligand, presenting a binding energy of -73 kcal.mol⁻¹ compared to the value of -72 kcal.mol⁻¹ of the crystallographic ligand, demonstrating an interaction with PfATP6.

The hexose transporter of *P. falciparum* (PDB PfHT) is a transmembrane protein responsible for glucose transport. *Plasmodium* requires glucose as its primary energy source during the erythrocytic cycle. Inhibition of glucose transport to infected cells impairs parasite viability. Therefore, substances that inhibit PfHT can be considered promising templates for developing new antimalarial compounds^{57,58,59}.

Compounds 1, 2, 3, 4, 6, and 8 exhibited stronger binding energies with PfHT than with the crystallographic ligand.

The *P. falciparum* Triosphosphate Isomerase Phosphoglycolate complex (PDB 1LYX) was also identified as a *P. falciparum* Triosphosphate isomerase (PFTIM). This consists of a catalytically

active enzyme, which is the subject of many studies because of its particularity at position 96. There is a serine residue in region 96 of triosphosphate isomerase in both humans and other organisms. However, the residue in PFTIM was replaced by a phenylalanine residue, with this enzyme being the only one to have serine in that position; however, so far, no specific role has been attributed to this particularity^{60,61}.

Differences were found when comparing the PFTIM structure with other TIM structures, especially that of humans, which can assist in modeling and developing therapeutic targets. One of these differences and particularities of PFTIM is in position 183, which has a completely exposed leucine, different from TIMs of other organisms, which have glutamate. It is believed that this exposed leucine residue, together with the positively charged surrounding adhesive, may be responsible for TIM binding to the erythrocyte membrane, which is important for the energy production of *Plasmodium*⁶².

The crystalline structure of PfPK7 in complex with an ATP analog (PDB 2PML) is a protein kinase that plays an important role in regulating the development of the parasite, by being involved in the signaling pathway of melatonin and modulating the life cycle of *P. falciparum*^{63,64}. PfPK7 is expressed in both the asexual and sexual stages of the parasite.

Dorin-Semblat et al.⁶⁵ demonstrated that interruption of the PfPK7 gene resulted in a reduction in the number of merozoites produced by each schizont, and the ability to produce oocysts in the mosquito was also impaired. These data reinforce the importance of PfPK7 in the parasite's life cycle⁶³. Several molecular targets, from subcellular organelles to metabolic pathways, have been described in the literature in an attempt to fight infection^{66,67}. Despite the numerous potential targets of pharmacological action, the most used compounds still date back many years: quinine, isolated from the *Cinchona sp.* in 1820 and artemisinin, purified from *Artemisia annua* in 1972, both extracted from natural sources⁶⁸.

P. falciparum hexose transporter (PfHT) has recently been characterized as promising for the development of new drugs^{59,60,69}. The reason for this is that the parasite is found inside erythrocytes surrounded by the parasitophorous vacuole, and glucose molecules must pass through its membrane before being transported to the parasite^{70,71}. Therefore, PfHT was characterized among BraMMT with similar or superior binding energy to the crystallographic ligand as a carrier target, which can contribute to the performance of the prototype compounds.

Compound 1 was chosen for the analysis of its physicochemical properties and intermolecular interactions according to its performance in antimalarial and toxicity tests. Compound 1 interacts with GLN169 and THR145 residues at the same D-glucose binding site in PfHT⁵⁹.

Figure 2 shows the electrostatic bonds and Van der Waals interactions with the PfHT receptor by the GLY41, SER45, ASN48, THR49, ASN52, ARG104, ILE141, VAL144, THR145, VAL148, PRO149, HIS168, GLN169, and ILE172 groups and the SER45, ASN48, ASN52, THR49, VAL144, THR145, VAL148, HIS168, GLN169, and ILE172 nuclei with D-glucose, indicating that the antimalarial activity is associated with the presence of these structures.

The hexose transporter for *P. falciparum* (PfHT) was recently described by molecular anchoring, QM/MM, and simulations of

molecular dynamics by our research group^{59,60}. **Figure 2** shows a two-dimensional map of ligand-receptor interactions with PfHT. The chemical bonds between the compound and the target are indicated. The two-dimensional structure of these compounds is also shown. Molecular anchoring with D-Glucose was performed to recognize the interactions at the PfHT binding site.

Identifying and characterizing pharmacologically active molecules is a necessity that has led to efforts in diverse areas of scientific research worldwide. The applicability of such molecules can be quite variable; however, the main objective of the drug development process is to obtain molecules with efficiency and specificity in relation to the therapeutic target, low cost, and absence or reduction of risks to potential users⁷².

The increase in resistance to current antimalarial drugs drives research that aims to understand the mechanism of action of compounds for parasitic diseases with social and economic impacts. This knowledge will assist in screening bioactive compounds with determined pharmacodynamic and/or pharmacokinetic characteristics⁷³. The methodologies used in this study have the main objective of characterizing potential targets, and these data and discussions allow us to infer the importance of the present study.

PfHT has characteristics similar to those of the human glucose transporter (GLUT1). However, there are some differences in their interactions with the substrates. PfHT can carry both D-glucose and D-fructose, whereas GLUT1 is selective for D-glucose and GLUT5 for D-fructose. Thus, PfHT can function as a pharmacological target in the development of antimalarials because of its selective affinity for different substrates^{74,75}.

In addition, fructose can be used as an energy source in *in vitro* cultures of *P. falciparum*. Concentrations at this stage are lower than those of glucose⁷⁶.

The blood phases of the parasite depend on glycolysis for energy production^{77,78}. Therefore, PfHT is a potential therapeutic target in the exoerythrocytic phase⁶⁹.

The Lipinski rule is one of the main descriptors used to analyze new prototype compounds for drugs. Thus, the physicochemical profiles of orally administered drugs are mainly based on the Lipinski rule, and it is possible to evaluate the absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity of the compound, also known as the ADMET property^{79,80}. The physicochemical characteristics of a compound can be decisive in the success or failure of its biological activity⁶¹. New antimalarial candidates should exhibit good oral bioavailability and membrane permeability⁶². The SwissADME tool allows determination of the main physicochemical and pharmacokinetic *in silico* properties of compounds⁴⁷. **Supplementary Table 1** shows SwissADME profiles of compound 1 and chloroquine.

The partition coefficient (CLogP) is recommended for estimating the toxicological factors⁸³. It is known that compounds with high molecular weights and an excessive number of hydrogen acceptors and donor groups have higher difficulty crossing the lipid bilayer of cell membranes⁸⁴.

According to Lipinski's rule, compound 1 had a CLogP <5 (1.67) and a molecular weight less than 500 g/mol (219.28 g/mol) (**Supplementary Table 1**). There were three hydrogen acceptor groups that interacted, and no hydrogen donor groups. These

data demonstrated that the ADMET properties of compound 1 were acceptable under Lipinski's rule.

A study by Gleeson⁸³ demonstrated that compounds with LogP less than 4 and molecular weight less than 400 g/mol had a promising ADMET profile. Thus, compound 1 also fits the presented criteria and therefore presents the appropriate ADMET properties according to Lipinski and Gleeson^{80,84}. Compounds with CLogP values less than 3 present a low risk of side effects and toxicity, indicating a low risk of the substance being trapped and stored. When analyzing the toxicological characteristics of compound 1, factors such as mutagenicity, tumorigenicity, or irritability were not detected (**Supplementary Table 1**). In addition, compound 1 has a superior synthetic facility compared to chloroquine, standing out for its solubility in water.

In conclusion, compound 1 has potential as a drug prototype owing to the presentation of appropriate characteristics such as absorption, toxicity, good solubility, low molecular weight, and permeability. These data corroborate the growing interest in synthetic morpholines, as well as the usage diversity of these compounds, as described by Kourounakis⁸⁵, since compound 1 stands out for its antiplasmodial and cytotoxic activity.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) process 303680/2021-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - Brasil (FAPEMIG) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso - Brasil (FAPEMAT) for financial support.

REFERENCES

1. World Health Organization (WHO). World malaria report 2018. Geneva: WHO; 2018. 210 p.
2. Organização Panamericana da Saúde (OPAS) [Internet]. Organização Mundial da Saúde (OMS). Malária. Brasília, 2016. [updated 2021 September 15; cited 2021 Sep 15]. Available from: <https://www.paho.org/pt/topicos/malaria>
3. World Health Organization (WHO). World malaria report 2019. Geneva: WHO; 2019. 232 p.
4. Brasil. Ministério da Saúde [Internet]. Situação epidemiológica da malária no Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. [updated 2021 September 15; cited 2021 Sep 15]. Available from: <https://www.saude.gov.br/svs>
5. França TCC, Santos MG, Figueroa-Villar JD. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. Química Nova. 2008;31(5):1271-1278. Available from: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170710>.
6. Menard D, Dondorp A. Antimalarial Drug Resistance: A Threat to Malaria Elimination. Cold Spring Harb Perspect Med. 2017;7(7):a025619. Available from: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025619>
7. Nosten F, White NJ. Artemisinin-Based Combination Treatment of *Falciparum* Malaria. Am J Trop Med Hyg. 2007;77(6 Suppl):181-92.
8. Ocan M, Akena D, Nsohya S, Kanya MR, Senono R, Kinengyere AA, Obuku EA. Persistence of chloroquine resistance alleles in malaria endemic countries: a systematic review of burden and risk factors. Malar J. 2019;18(1):76. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2716-z>.
9. White N. Antimalarial drug resistance and combination chemotherapy. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1999;354(1384):739-49. Available from: <https://doi.org/10.1098/rstb.1999.0426>.

10. White NJ. Antimalarial drug resistance. *J Clin Invest* 2004;113(8):1084-92. Available from: <https://doi.org/10.1172/JCI21682>.
11. Bakhiet AMA, Abdelraheem MH, Kheir A, Omer S, Gismelseed L, Abdel-Muhsin AA, et al. Evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance genes following artemisinin combination therapy in Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2019;113(11):693-700. Available from: <https://doi.org/10.1093/trstmh/trz059>.
12. Singh R, Bhardwaj VK, Sharma J, Das P, Purohit R. Identification of selective cyclin-dependent kinase 2 inhibitor from the library of pyrrolone-fused benzosuberene compounds: an *in silico* exploration. *J Biomol Struct Dyn*. 2021 Mar 22;1-9. doi: 10.1080/07391102.2021.1900918. Epub ahead of print. PMID: 33749525.
13. Brodland, GW. How computational models can help unlock biological systems. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Volumes 47-48, 2015, Pages 62-73, ISSN 1084-9521, <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.07.001>.
14. Bhardwaj VK, Purohit R. Targeting the protein-protein interface pocket of Aurora-A-TPX2 complex: rational drug design and validation. *J Biomol Struct Dyn*. 2021 Jul;39(11):3882-3891. doi: 10.1080/07391102.2020.1772109. Epub 2020 Jun 8. PMID: 32448055.
15. Shibi IG, Aswathy L, Jisha RS, Masand VH, Gajbhiye JM. Virtual Screening Techniques to Probe the Antimalarial Activity of some Traditionally Used Phytochemicals. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2016;19(7):572-91. doi: 10.2174/1386207319666160420141200. PMID: 27095535.
16. Banfi FF, Krombauer GC, da Fonseca AL, Nunes RR, Andrade SN, de Rezende MA, et al. Dehydrobufotenin extracted from the Amazonian toad *Rhinella marina* (Anura: Bufonidae) as a prototype molecule for the development of antiplasmodial drugs. *J Venom Anim Toxins*, v. 27, p. 1-16, 2021.
17. Ghuge RB, Khadse AN. Vicinal Diaryl Pyrroles: Synthesis and Biological Aspects. *Vicinal Diaryl Substituted Heterocycles*. 2018;47-82. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102237-5.00003-1>
18. Roth HJ, Kleemann A, Beissweger T. *Pharmaceutical chemistry: drug synthesis*. Books in Biological Sciences, Series in Pharmaceutical Technology. Hardcover – January 1, 1991.
19. Balaban AT, Oniciu DC, Katritzky AR. Aromaticity as a cornerstone of heterocyclic chemistry. *Chem Rev*. 2004;104(5):2777-2812. Available from: <https://doi.org/10.1021/cr0306790>
20. Kourouakis AP, Xanthopoulos D, Tzara A. Morpholine as a privileged structure: A review on the medicinal chemistry and pharmacological. *Med Res Rev*. 2020;40(2):709-752. Available from: <https://doi.org/10.1002/med.21634>
21. Ghorbani M, Bushra B, Zabiulla S, Mamatha SV. Piperazine and morpholine: Synthetic preview and pharmaceutical applications. *J Chem Pharm Res*. 2015;7(5):281-301. Available from: <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2015.00100.6>
22. Pulch M. Preludin in therapy of obesity. *Deut Med J*. 1955;6(15-16):545-6.
23. Chrysselis MC, Rekka EA, Kourounakis PN. Hypocholesterolemic and hypolipidemic activity of some novel morpholine derivatives with antioxidant activity. *J Med Chem*. 2000;43(4):609-612. Available from: <https://doi.org/10.1021/jm991039l>
24. Kaur H, Sapna DD, Jasbir S, Balasubramanian N. Morpholine based diazenyl chalcones: synthesis, antimicrobial screening and cytotoxicity study. *Anticancer Agents Med Chem*. 2018;18(15):2193-2205. Available from: <https://doi.org/10.2174/1871520618666180830152701>
25. Ahmadi A, Khalili M, Ramin H, Moslem N. New morpholine analogues of phenacyclidine: Chemical synthesis and pain perception in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2011;98(2):227-233. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.12.019>.
26. Arshad F, Khan MF, Akhtar W, Alam MM, Nainwal LM, Kaushik SK, Akhter M, Parvez S, Hasan SM, Shaquiquzzaman M. Revealing quinquennial anticancer journey of morpholine: A SAR based review. *Eur J Med Chem*. 2019;167:324-356. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.02.015>
27. Leathen ML, Brandon RR, Wolfe JP. A new strategy for the synthesis of substituted morpholines. *J Org Chem*. 2009;74(14):5017-5110. Available from: <https://doi.org/10.1021/jo9007223>
28. Ford CW, Zurenko GE, Barbachy MR. The discovery of linezolid, the first oxazolidinone antibacterial agent. *Curr Drug Targets Infect Disord*. 2001;1(2):181-199. Available from: <https://doi.org/10.2174/1568005014606099>
29. Abramova TV, Bakharev PA, Vasilyeva SV. Synthesis of morpholine nucleoside triphosphates. *Tetrahedron Lett*. 2004;45:4361-4364. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.03.193>.
30. Pati B, Banerjee S. Importance of piperidine moiety in medicinal chemistry research: a review. *J Pharm Res*. 2012;5(12):5493-509.
31. Vardanyan R. Piperidine-based drug discovery. University of Arizona Tucson, AZ, United States. 1-347. 2017.
32. Seck R, Gassama A, Cojean S, Cavé C. Synthesis and Antimalarial Activity of 1,4-Disubstituted Piperidine Derivatives. *Molecules*. 2020;25(2):299. Published 2020 Jan 11. doi:10.3390/molecules25020299.
33. Upadhyay C, Sharma N, Kumar S, Sharma PP, Fontinha D, Chhikara BS, et al. 2022. Synthesis of the new analogs of morpholine and their antiplasmodial evaluation against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *New J Chem*, 2022, 46, 250-262. Doi: 10.1039/D1NJ04198C.
34. Fontinha D, Moulesm I, Prudêncio M. Repurposing Drugs to Fight Hepatic Malaria Parasites. *Molecules*. 2020;25(15):3409. Available from: <https://doi.org/10.3390/molecules25153409>
35. Mannich C, Krösche W. Ueber ein Kondensationsprodukt aus Formaldehyd, Ammoniak und Antipyrin. *Arch Pharm*. 1912;647-667.
36. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. 1976;193(4254):673-5.
37. Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol*. 1979;65(3):418-20.
38. Vossen MG, Pferschy P, Chiba H, Noedl AM. The SYBR Green I malaria drug sensitivity assay: performance in low parasitemia samples. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82(3):398-401. Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0417>
39. Costa Junior DB, Araújo JSCA, Oliveira LM, Neri FSM, Moreira POL, Taranto AG, Fonseca AL da, Varotti FP, Leite FHA. Identification of novel antiplasmodial compound by hierarchical virtual screening and assays. *J Biomol Struct Dyn*. 2021;13:1-9. Available from: <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1763837>
40. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*. 1986;89(2):271-7. Available from: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90368-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90368-6)
41. Valsalam S, Agastian P, Esmail GA, Ghilan AM, Al-Dhabi NA, Arasu MV. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Musa acuminata* colla flower and its pharmaceutical activity against bacteria and anticancer efficacy. *J Photochem Photobiol B*. 2019;201:111670. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111670>.

42. Bell CA, Hall JE, Kyle DE, Grogg M, Ohemeng KA, Allen MA, Tidwell RR. Structure-activity relationships of analogs of pentamidine against *Plasmodium falciparum* and *Leishmania mexicana amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990;34(7):1381-6.
43. Jaghoori MM, Bleijlevens B, Olabarriaga SD. 1001 ways to run AutoDock Vina for virtual screening. *J Comput Aided Mol Des*. 2016;30(3):237-249. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10822-016-9900-9>.
44. Nunes R R, Fonseca AL, Pinto ACS, Maia EHB, Silva AM, Varotti FP, Taranto AG. Brazilian malaria molecular targets (BraMMT): selected receptors for virtual high-throughput screening experiments. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2019;114:1-10. Available from: <https://doi.org/10.1590/0074-02760180465>
45. Maia EH, Campos VA, Dos Reis Santos B, Costa MS, Lima IG, Greco SJ, Ribeiro RIMA, Munayer FM, Silva AM da, Taranto AG. Octopus: a platform for the virtual high-throughput screening of a pool of compounds against a set of molecular targets. *J Mol Model*. 2017;23(1):26. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00894-016-3184-9>
46. Maia EHB, Medaglia LR, Silva AM, Taranto AG. Molecular architect: A user-friendly workflow for virtual screening. *ACS Omega*. 2020;5:6628-6640. Available from: <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b04403>
47. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep*. 2017;7:42717. Available from: <https://doi.org/10.1038/srep42717>
48. Sander T, Freyss J, Von Korff M, Rufener C. DataWarrior: an open-source program for chemistry aware data visualization and analysis. *J Chem Inf Model*. 2015;55(2):460-473. Available from: <https://doi.org/10.1021/ci500588j>
49. Katsuno K, Burrows JN, Duncanm K, Huijsduijnenm RHV, Kaneko T, Kita K, Mowbray CE, Schmatz D, Warner P, Slingsby BT. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nat Rev Drug Discov*. 2015;14(11):751-758. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrd4683>
50. Wong RPM, Lautu D, Tayul SLH, Siba P, Karunajeewa HA, Ilett KF, Mueller I, Davis TME. In vitro sensitivity of *Plasmodium falciparum* to conventional and novel antimalarial drugs in Papua New Guinea. *Trop Med Int Health*. 2010;15(3):342-9. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2009.02463.x>
51. Torres ZES, Silveira ER, Silva LFR, Lima ES, Vasconcellos MC, Uchoa DEA, Bra R, Pohlit AM. Chemical composition of *Aspidosperma ulei* Markgr. and antiplasmodial activity of selected indole alkaloids. *Molecules*. 2013;18(6):6281-97. Available from: <https://doi.org/10.3390/molecules18066281>
52. Ohashi M, Amoa-Bosompem M, Kwofie KD, Agyapong J, Adegle R, Sakyiamah MM, et al. In vitro antiprotozoan activity and mechanisms of action of selected Ghanaian medicinal plants against *Trypanosoma*, *Leishmania*, and *Plasmodium* parasites. *Phytother Res*. 2018;32(8):1617-1630. Available from: <https://doi.org/10.1002/ptr.6093>
53. Sousa SF, Cerqueira NMFSA, Fernandes PA, Ramos MJ. Virtual screening in drug design and development. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2010;13(5):442-53. Available from: <https://doi.org/10.2174/138620710791293001>
54. Suwito H, Jumina M, Pudjiastuti P, Fanani MZ, Kimata-Ariga Y, Katahira R, Kawakami T, Fujiwara T, Hase T, Sirat HM, Puspianingsih NNT. Design and Synthesis of Chalcone Derivatives as Inhibitors of the ferredoxin - ferredoxin-NADP+ Reductase Interaction of *Plasmodium falciparum*: Pursuing new antimalarial agents. *Molecules*. 2014;19(12):21473-88. Available from: <https://doi.org/10.3390/molecules191221473>
55. Yogavel M, Tripathi T, Gupta A, Banday MM, Rahlfs S, Becker K, Belrhali H, Sharma A. Atomic resolution crystal structure of glutaredoxin 1 from *Plasmodium falciparum* and comparison with other glutaredoxins. *Acta Crystallogr. D Biol Crystallogr*. 2014;70(1):91-100. Available from: <https://doi.org/10.1107/S1399004713025285>.
56. Hotta CT, Gazarini ML, Beraldo FH, Varotti FP, Lopes C, Markus RP, Pozzan T, Garcia CR. Calcium-dependent modulation by melatonin of the circadian rhythm in malarial parasites. *Nat Cell Biol*. 2000;2(7):466-468. Available from: <https://doi.org/10.1038/35017112>
57. Leite FH, Fonseca AL da, Nunes RR, Comar Júnior M, Varotti FP, Taranto AG. Malaria: From old drugs to new molecular targets. *Biotechnol Rep*. 2013;2(4):59-76.
58. Fonseca AL, Nunes RR, Braga VLM, Comar Júnior M, Alves RJ, Varotti FP, Taranto AG. Docking, QM/MM, and molecular dynamics simulations of the hexose transporter from *Plasmodium falciparum* (PfHT). *J Mol Graph Model*. 2016;66:174-186. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2016.03.015>
59. Fonseca A L da, Nunes RR, Comar Júnior M, Alves RJ, Varotti FP, Taranto AG. Structural determination of hexose transporter *Plasmodium falciparum* (PfHT) by homology modeling. *Model Archive*. 2017. Available from: <https://doi.org/10.5452/ma-aej21>
60. Parthasarathy S, Eazaisai K, Balaran H, Balaran P, Murthy MRN. Structure of *Plasmodium falciparum* Triose-phosphate Isomerase-2-Phosphoglycerate Complex at 1.1-Å Resolution *J Biol Chem*. 2003;278(52):52461-70. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.M308525200>
61. Ravindra G, Balaran P. *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase: New insights into an old enzyme. *Pure Appl Chem*. 2005;77(1): 281-289. Available from: <https://doi.org/10.1351/pac200577010281>
62. Velanker SS, Ray SS, Gokhale RS, Suma S, Balaran P, Murthy MR. Triosephosphate isomerase from *Plasmodium falciparum*: the crystal structure provides insights into antimalarial drug design. *Structure*. 1997;5(6):751-61. Available from: [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(97\)00230-x](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(97)00230-x)
63. Pease BN. Characterization of *Plasmodium falciparum* Atypical Kinase PfPK7-Dependent Phosphoproteome. *J Proteome Res*. 2018;17(6):2112-2123. Available from: <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00062>
64. Koyama FC, Ribeiro RY, Garcia JL, Azevedo MF, Chakrabarti D, Garcia CRS. Ubiquitin proteasome system and the atypical kinase PfPK7 are involved in melatonin signaling in *Plasmodium falciparum*. *J Pineal Res*. 2021;53(2):147-153. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2012.00981.x>
65. Dorin-Semblat D, Sicard A, Doerig C, Ranford-Carwright L, Doerig C. Disruption of the PfPK7 gene impairs schizogony and sporogony in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot Cell*. 2008;7(2):279-285. Available from: <https://doi.org/10.1128/EC.00245-07>
66. Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SHI, Alonso PL, Collins FH, Duffy PE. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J Clin Invest*. 2008;118(4):1266-1276. Available from: <https://doi.org/10.1172/JCI33996>
67. Martin RF, Ginsburg H, Kirk K. Membrane transport proteins of the malaria parasite. *Mol Microbiol*. 2009;74(3):519-528. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06863.x>
68. Croft TSL. Antimalarial Chemotherapy: Mechanisms of Action, Resistance and New Directions in Drug Discovery. *Drug Discov Today*. 2001;6(21):1151. Available from: [https://doi.org/10.1016/s1359-6446\(01\)02035-9](https://doi.org/10.1016/s1359-6446(01)02035-9)

69. Joët T, Eckstein-Ludwig U, Morin C, Krishna S. Validation of the hexose transporter of *Plasmodium falciparum* as a novel drug target. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(13):7476-7479. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.1330865100>
70. Desai SA, Krogstad DJ, McCleskey EW. A nutrient-permeable channel on the intraerythrocytic malaria parasite. *Nature*. 1993;362(6421):643-646. Available from: <https://doi.org/10.1038/362643a0>
71. Desai SA, Rosenberg RL. Pore size of the malaria parasite's nutrient channel. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(5):2045-2049. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.94.5.2045>
72. Bhatnagar ISK. Marine Antitumor Drugs: Status, Shortfalls and Strategies. *Mar Drugs*. 2010;8(10):2702-2720. Available from: <https://doi.org/10.3390/md8102702>
73. Skinner-Adams T, Sumanadasa SDM, Fisher GM, Davis RA, Doolan DL, Andrews KT. Defining the targets of antiparasitic compounds. *Drug Discov Today*. 2016;5(5):725-39. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.01.002>
74. Ionita M, Krishna S, Léo PM, Morin C, Patel AP. Interaction of o-(undec-10-en)-yl-d-glucose derivatives with the *Plasmodium falciparum* hexose transporter (pfht). *Bioorganic Med Chem Lett*. 2007;17(17):4934-4937. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.06.021>
75. Slavic K, Krishna S, Derbyshire T, Staines H. Plasmodial sugar transporters as anti-malarial drug targets and comparisons with other protozoa. *Malar J*. 2011;10:165. Available from: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-165>
76. Woodrow CJ, Burchmore A. Hexose permeation pathways in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(18):9931-6. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.170153097>
77. Krishna S, Eckstein-Ludwig U, Uhlemann AC, Morin C, Webb R, Woodrow C, Kun JFJ, Kremsner PG. Transport processes in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: potential as new drug targets. *Int J Parasitol*. 2002;32(13):1567-1573. Available from: [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(02\)00185-6](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(02)00185-6)
78. Chen X, Chong CR, Shi L, Yoshimoto T, Sulivann Jr D, Liu JO. Inhibitors of *Plasmodium falciparum* methionineaminopeptidase 1b possess antimalarial activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(39):14548-14553. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.0604101103>
79. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Freeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*. 1997;23(1):3-25. Available from: [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0)
80. Lipinski CA. Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. *Drug Discov Today Technol*. 2004;1(4):337-41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007>
81. Doogue MP, Polasek TM. The ABCD of clinical pharmacokinetics. *Ther Adv Drug Saf*. 2013;4(1):5-7. Available from: <https://doi.org/10.1177/2042098612469335>
82. Guimarães DSM, Luz LSS, Nascimento SB do, Silva LR, Martins NRM, Almeida HG de, et al. Improvement of antimalarial activity of a 3-alkylpyridine alkaloid analog by replacing the pyridine ring to a thiazole-containing heterocycle: Mode of action, mutagenicity profile, and Caco-2 cell-based permeability. *Eur J Pharm Sci*. 2019;138:105015. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105015>
83. Silva RL, Ferreira M. Estudo do coeficiente de partição octanol-água de bifenilas policloradas (PCBs) utilizando parâmetros topológicos. *Quím Nova*. 2003;26(3):312-318.
84. Gleeson MP. Generation of a set of simple, interpretable ADMET rules of thumb. *J Med Chem*. 2008;51(4):817-834. Available from: <https://doi.org/10.1021/jm701122q>

SUPPLEMENTARY TABLE 1: Physicochemical properties of compound 1 and chloroquine by SwissADME.

PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES	1	CLOROQUINE
Formula	C ₁₇ H ₁₇ NO ₂	C ₁₈ H ₂₆ N ₃
Molecular weight	219.28 g/mol	319.87 g/mol
Nº, heavy atoms	16	22
Num. heavy atoms	6	10
Fractions Csp3	0.46	0.50
Num. rotate bonds	4	8
Num. H-bond Acceptor	3	2
Num. H-bond Donator	0	1
Molar Refractivity	66.45	97.41
TPSA	36.02 Å ²	28.16 Å ²
LIPOPHILICITY		
Log P _{ow} (ILOGP)	-2.4	3.95
Log P _{ow} (XLOGP3)	1.20	4.63
Log P _{ow} (WLOGP)	1.21	4.62
Log P _{ow} (MLOGP)	-1.05	3.20
Log P _{ow} (SILICOS-IT)	2.5	4.32
Consensus Log P _{ow}	1.67	4.15
WATER SOLUBILITY		
Log S (ESOL)	-1.97	-4.55
Solubility	2.35e+ mg/ml; 1.07e-02 mol/l	9.05e-03 mg/ml; 2.83e-05 mol/l
Class	Soluble	Moderately soluble
Log S (All)	-1.42	-4.95
Solubility	8.40e+00 mg/ml; 3.83e-02 mol/l	3.61e-03 mg/ml; 1.13e-05 mol/l
Class	Soluble	Moderately soluble
Log S (SILICOS-IT)	-3.35	-6.92
Solubility	9.82e-02 mg/ml; 4.48e-04 mol/l	3.86e-05 mg/ml; 1.21e-07 mol/l
Class	Soluble	Poorly soluble
PHARMACOKINETICS		
GI absorption	High	High
BBB permeant	Yes	Yes
P-gp substrate	No	No
CYP1A2 inhibitor	No	Yes
CYP2C19 inhibitor	No	No
CYP2C9 inhibitor	No	No
CYP2D6 inhibitor	No	Yes
CYP3A4 inhibitor	Yes	Yes
Log K _o (skin permeation)	-6.79 cm/s	-4.96 cm/s
DRUGLIKENESS		
Lipinski	Yes; 0 violation	Yes; 0 violation
Ghose	Yes	Yes
Veber	Yes	Yes
Egan	Yes	Yes
Muegge	Yes	Yes
Bioavailability Score	0.55	0.55
MEDICINAL CHEMISTRY		
PAINS	0 alert	0 alert
Brenk	0 alert	0 alert
Leadlikeness	No; 1 violation: MW<250	No; 2 violations: Rotors>7, XLOGP3>3.5
Synthetic accessibility	1.54	2.76

SYNTHESIS, PURIFICATION, AND STRUCTURAL ELUCIDATION

The compounds were synthesized according to the classical Mannich reaction using anhydrous ethanol as the solvent and morpholine and piperidine as secondary bases and respective ketones³⁵.

COMPOUNDS

Compound 1

3-(morpholin-4-yl)-1-phenylpropan-1-one:

First, 100 mL of anhydrous ethanol, 1.69 g of morpholine hydrochloride (13.66 mmol), 0.41 g paraformaldehyde (13.7 mmol), and 1.64 g acetophenone (13.66 mmol) were stirred under reflux in a sealed vial. The system was turned off after four hours and partitioned three times with water/ethyl acetate. The aqueous phase was collected and dried under vacuum. A small amount of solid residue was crystallized on acetone/ethanol to produce 2.1 g of compound 1 (9.6 mmol of hydrochloride salt) with a yield of 70%.

Compound 2

1-phenyl-3-(piperidin-1-yl)propan-1-one:

Second, 100 mL of anhydrous ethanol, 1.68 g of piperidine hydrochloride (13.82 mmol), 0.414 g paraformaldehyde (13.8 mmol), and 5.0 g of acetophenone (41.7 mmol) were stirred under reflux in a sealed vial. The system was turned off after three hours and partitioned three times with water/ethyl acetate. The aqueous phase was collected and dried under vacuum. The small solid residue was solubilized in acetone and crystallized overnight at a low temperature (-4 °C). The crystals were filtered and recrystallized to obtain 3.0 g of compound 2 (11.8 mmol, hydrochloride salt) with a yield of 86%.

Compound 3

2-methyl-3-(morpholin-4-yl)-1-phenylpropan-1-one:

Third, 100 mL of anhydrous ethanol, 5.5 g of morpholine hydrochloride (44.5 mmol), 1.35 g paraformaldehyde (45 mmol), and 1.5 g propylphenone (11.2 mmol) were stirred under reflux in a sealed vial. The system was turned off after four hours and partitioned three times with water/ethyl acetate. The aqueous phase was collected and dried under vacuum. The small amount of solid residue was crystallized in ethanol at 0 °C to produce 2.0 g of compound 3 (8.6 mmol of hydrochloride salt) with a yield of 76%.

Compound 4

2-methyl-1-phenyl-3-(piperidin-1-yl)propan-1-one:

Fourth, 100 mL of anhydrous ethanol, 1.37 g of piperidine hydrochloride (11.3 mmol), 0.336 g paraformaldehyde (11.3 mmol), and 4.5 g of propylphenone (33.58 mmol) were stirred under reflux in a sealed vial. The system was turned off after three hours and partitioned three times with water/ethyl acetate. The aqueous phase was collected and dried under vacuum. The small solid

residue was solubilized in acetone and crystallized overnight at a low temperature (0 °C). The crystals were filtered and recrystallized to obtain 2.0 g of compound 4 (7.5 mmol, hydrochloride salt) with a yield of 66%.

Compounds 5 and 6

1-(morpholin-4-yl)decan-3-one and 3-[(morpholin-4-yl)methyl]nonan-2-one:

For compounds 5 and 6, 100 mL of anhydrous ethanol, 5.5 g of morpholine hydrochloride (44.5 mmol), 1.35 g paraformaldehyde (45 mmol), and 2.46 g 2-nonanone (17 mmol) were stirred under reflux in a sealed vial. The system was turned off after four hours and partitioned three times with water/hexane. The aqueous phase was collected and dried under vacuum. The small brown solid was solubilized in acetone/methanol and crystallized at low temperature (0 °C). The crystals were filtered and recrystallized to obtain a mixture of the two isomeric forms (kinetic and thermodynamic) of compounds 5 and 6 in proportions of 48–52 w/w. As a result, a total yield of 3.85 g (14.0 mmol mixture of hydrochloride salt) was obtained with 82% ketone yield.

Compounds 7 and 8

1-(piperidin-1-yl)decan-3-one and 3[(piperidin-1-yl)methyl]nonan-2-one:

For compounds 7 and 8, 100 mL of anhydrous ethanol, 1.76 g of piperidine hydrochloride (14.5 mmol), 0.446 g paraformaldehyde (14.5 mmol), and 6.15 g of 2-nonanone (43.3 mmol) were stirred under reflux in a sealed vial. The system was turned off after four hours and partitioned three times with water/ethyl acetate. The aqueous phase was collected and dried under vacuum. The small solid residue was solubilized in ethanol and crystallized overnight at a low temperature (0 °C). The crystals were filtered and recrystallized to obtain 3.0 g of a mixture of isomers 7 and 8 (10.89 mmol, hydrochloride salt) in 75% yield. High-resolution mass spectrometry (HRMS) (ESI/Q-TOF) m/z: [M+H]⁺ found for C₁₅H₃₀NO 240.2322, err = -2.6 ppm.

PURIFICATION

The compounds were purified by preparative reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) using a preparative Shim-pack C18 column and Shimadzu HPLC System and CH₃CN-H₂O/MeOH-H₂O as solvents, normal phase (silica gel 60) using hexane/ethyl acetate as solvents, or selective crystallization by partial solubilization and decreasing solvent temperature. TLC using HF254 silica plates (Merck) and MeOH/dichloromethane (DCM) as eluents and spots were visualized under visible light or in a UV chamber to monitor the reactions.

STRUCTURAL ELUCIDATION

The compounds were elucidated using high-resolution mass spectrometry (HRMS) and nuclear magnetic resonance (NMR) of ¹H and ¹³C. HRMS was performed using a maXis ETD high-resolution ESI-QTOF mass spectrometer (Bruker) controlled by the Compass1.5 software package (Bruker). Data-dependent fragment

spectra were recorded in the collision energy range of 15–60 eV. The ion cooler settings were optimized within a 40–1000 m z-1 range using a calibrant solution of 1 mmol l⁻¹ sodium formate in 50% 2-propanol. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra of ¹H and ¹³C were obtained in a Bruker DRX400 device using deuterium oxide as the solvent and 400 MHz and 100 MHz for ¹H and ¹³C, respectively. Infrared spectra were recorded using an FTIR 8400 Shimadzu spectrophotometer.

Compound 1

3-(morpholin-4-yl)-1-phenylpropan-1-one (AB1)

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ = 3.28–3.33 (m, 4H), 3.63–3.73 (m, 4H), 3.94–3.98 (m, 4H), 7.56–7.62 (m, 2H), 7.71–7.76 (m, 1H), 8.01–8.06 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ = 43.11, 52.01, 52.15, 63.68, 128.18, 128.92, 134.52, 135.29, 199.59 ppm. HRMS: *m/z* calcd for C₁₅H₁₈NO₂ [M+H]⁺: 220.1337; found: 220.1332.

Compound 2

1-phenyl-3-(piperidin-1-yl)propan-1-one

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ = 8.02 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 7.72 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz), 7.58 (t, 2H, *J* = 8.08 Hz), 3.59 (d, 2H, *J* = 11.5 Hz), 3.53 (s, 2H), 3.02 (t, 2H, *J* = 10 Hz), 1.95 (s, 2H), 1.78 (d, 4H, *J* = 12 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ = 199.8, 199.8, 135.3, 134.5, 128.9, 128.1, 53.5, 51.7, 51.6, 22.7, 21.0 ppm. HRMS: *m/z* calcd for C₁₄H₂₀NO [M+H]⁺: 218.1545; found: 218.1539.

Compound 3

2-methyl-3-(morpholin-4-yl)-1-phenylpropan-1-one

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ = 8.06 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 7.75 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz), 7.61 (t, 2H, *J* = 8.1 Hz), 4.26–4.17 (m, 1H), 3.97 (t, 1H, *J* = 5.0 Hz), 3.85 (dd, 3H, *J* = 13.3 Hz, 9.2 Hz), 3.35 (d, 2H, *J* = 3.8 Hz), 3.32 (d, 2H, *J* = 3.9 Hz), 1.31 (d, 3H, *J* = 7.3 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ = 203.4, 134.7, 134.1, 129.1, 128.7, 63.5, 63.4, 58.4, 52.4, 43.1, 36.7, 16.6 ppm. HRMS: *m/z* calcd for C₁₄H₂₀NO₂ [M+H]⁺: 234.1494; found: 234.1489.

Compound 4

2-methyl-1-phenyl-3-(piperidin-1-yl)propan-1-one

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ = 8.06 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 7.74 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.60 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz), 4.21–4.13 (m, 1H), 3.73 (dd, 1H, *J* = 13.4 Hz, 9.2 Hz), 3.53 (t, 2H, *J* = 15.4 Hz), 3.25 (d, 2H, *J* = 3.8 Hz), 3.21 (d, 2H, *J* = 3.8 Hz), 2.99 (q, 2H, *J* = 12.0 Hz), 1.91 (d, 2H,

J = 14.4 Hz), 1.49 (t, 1H, *J* = 12.4 Hz), 1.28 (d, 3H, *J* = 7.3 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ = 203.7, 134.7, 134.2, 129.1, 128.7, 57.9, 54.2, 53.7, 44.5, 36.9, 16.7 ppm. HRMS: *m/z* calcd for C₁₆H₂₁NO [M+H]⁺: 232.1701; found: 232.1696.

Compounds 5 and 6 (mixture)

1-(morpholin-4-yl)decan-3-one and 3-[(morpholin-4-yl)methyl]nonan-2-one

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ = 3.69 (dd, 4H, *J* = 13.4 Hz, 9.8 Hz), 3.46 (t, 8H, *J* = 6.9 Hz), 3.24–3.10 (m, 6H), 2.59 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz), 2.33 (s, 8H), 1.79–1.55 (m, 4H), 1.29 (s, 16H), 0.87 (s, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ = 213.5, 212.3, 63.6, 63.4, 56.4, 51.9, 51.7, 46.7, 42.3, 35.7, 30.9, 30.7, 29.4, 28.2, 28.1, 28.0, 25.3, 23.0, 21.9, 21.8, 13.3, 13.2 ppm. HRMS: *m/z* calcd for C₁₄H₂₆NO₂ [M+H]⁺: 242.2120; found: 242.2115.

Compounds 7 and 8 (mixture)

1-(piperidin-1-yl)decan-3-one and 3[(piperidin-1-yl)methyl]nonan-2-one

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ = 3.61–3.50 (m, 2H), 3.37 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz), 3.30–3.24 (m, 10H), 3.13–2.90 (m, 7H), 2.34 (s, 3H), 1.94–1.48 (m, 12H), 1.28 (s, 18H), 0.86 (s, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ = 213.2, 211.3, 56.0, 54.4, 53.4, 51.2, 47.2, 42.4, 36.3, 31.2, 30.9, 29.8, 28.6, 28.5, 28.4, 28.3, 25.5, 23.2, 22.8, 22.6, 22.4, 22.2, 22.0 ppm. HRMS: *m/z* calcd for C₁₅H₃₀NO [M+H]⁺: 240.2327; found: 240.2322.

EVALUATION OF MOLECULAR DOCKING OF PHYSICO-CHEMICAL AND ADMET PROPERTIES

All compounds were designed using the MarvinSketch® software program (ChemAxon, Cambridge, MA, USA), and the molecular structures were refined using the MOPAC® software (Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA). The compounds were subjected to molecular docking calculations using the AutoDock Vina® program⁴². All calculations were performed using OCTOPUS® program to optimize the virtual screening process. The configuration files were determined using a re-docking step^{44,45,46}. Table 1 lists the molecular targets of the BraMMT.

The physicochemical properties of the eight compounds (1-8) were analyzed using the DataWarrior® software and SwissADME website⁴⁷. Finally, toxicological characteristics of the compounds, such as mutagenicity, tumorigenicity, and irritability, were analyzed using DataWarrior^{48,49}.