



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA – UFPB
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – CCS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS

CINTHIA RODRIGUES MELO

ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL *IN VITRO* DE UM DERIVADO DA
N-METIL-ISATINA (CH_3ISACN), E SUA TOXICIDADE *IN SILICO* E
IN VIVO

João Pessoa – PB

2020

Cinthia Rodrigues Melo

**ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL *IN VITRO* DE UM DERIVADO DA
N-METIL-ISATINA (CH₃ISACN), E SUA TOXICIDADE *IN SILICO* E
*IN VIVO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para a obtenção do título de **Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**, na área de concentração: **Farmacologia**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Caliandra Maria Bezerra Luna Lima

João Pessoa – PB
Fevereiro / 2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M528a Melo, Cinthia Rodrigues.

ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL IN VITRO DE UM
DERIVADO DA N-METIL-ISATINA (CH₃ISACN), E
SUA TOXICIDADE IN SILICO

E IN VIVO / Cinthia Rodrigues Melo. - João Pessoa,
2020.

95 f.

Orientação: Margareth de Fátima F Melo Diniz.

Coorientação: Caliandra Maria Bezerra Luna Lima.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

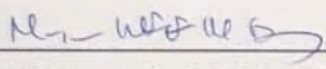
CINTHIA RODRIGUES MELO

**ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL *IN VITRO* DE UM DERIVADO DA
N-METIL-ISATINA (CH₃ISACN), E SUA TOXICIDADE *IN SILICO* E
*IN VIVO***

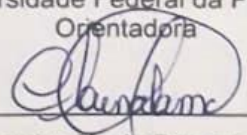
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**.

Dissertação aprovada em 27-02-2020.

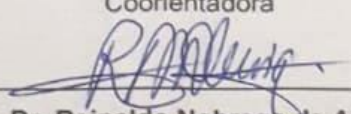
BANCA EXAMINADORA



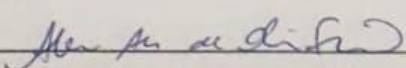
Prof.ª Dr.ª Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientadora



Prof.ª Dr.ª Caliandra Maria Bezerra Luna Lima
(Universidade Federal da Paraíba)
Coorientadora



Prof. Dr. Reinaldo Nobrega de Almeida
(Universidade Federal da Paraíba)
Avaliador Interno



Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho
(Universidade Federal de Campina Grande)
Avaliador Externo

“Não te mandei eu? Esforça-te e tem bom ânimo; não te atemorizes, nem te espantes; porque o Senhor teu Deus está contigo, por onde quer que andares”.

(Josué 1:9)

A minha força vem do Senhor que nunca me abandonou, a Ele dedico este trabalho. Assim como também dedico à minha família, que sempre esteve ao meu lado, sendo meu amparo e fortaleza.

Agradecimentos

A *Deus*, por guiar os meus passos, por nunca me desamparar e ser meu abrigo bem presente na angustia. Ao Senhor todo poderoso que me ama, e cuida de mim em todos os detalhes. Obrigada Senhor, por me fazer entender que a tua vontade é soberana e que teu amor é perfeito.

Aos meus pais, *Antônio Rodrigues Melo* e *Francisca Regina Rodrigues Melo*, pela dedicação, apoio, amor e cuidado demonstrado todos os dias. Agradeço por acreditarem em mim, por toda confiança depositada, permitindo desde cedo que eu fosse em busca dos meus objetivos. Agradeço pela educação que me proporcionaram e por sempre me incentivar a vencer os desafios que a vida impõe. Obrigada pelo cuidado e carinho que a mim é demonstrado todos os dias.

Aos meus irmãos, *Yuri Rodrigues Melo* e *Yorran Rodrigues Melo*, por me apoiarem e torcerem pelo meu melhor. Obrigada pelo carinho, amor e união.

Aos meus tios, *Eva Luana*, *Antônio Robson*, *Fátima Rodrigues*, *Aldenir Damasceno*, por estarem sempre presentes em minha vida torcendo por minhas conquistas.

Ao meu avô, *Antônio Vilemar Lima* pelo carinho e por sempre desejar o meu bem.

A todos os demais *famíliares* que sempre estão me apoiando e manifestando carinho de alguma forma.

Ao meu namorado *Paulo Filho*, por todo amor demonstrado, pela paciência e cuidado. Sendo meu maior apoio nos momentos difíceis, sempre me consolando e incentivando a seguir em frente, e a não desistir dos meus sonhos. Obrigada por ser meu amparo, e ser a personificação do que é o verdadeiro amor.

À minha irmã de coração, *Ana Beatriz Vieira Soares* minha maior confidente. Obrigada por sempre se fazer presente em minha vida, por ser a pessoa na qual eu sei que sempre terei como apoio. Sem você nunca poderia entender o significado da palavra amizade.

Natália Rodrigues de França a irmã que Cristo me deu. Obrigada por tantas e tantas vezes me escutar, aconselhar e principalmente por demonstrar o amor de Deus. Obrigada por sua amizade, pelo seu cuidado, por sempre me fazer sentir amparada.

Larissa Adilís Maria Paiva Ferreira muito obrigada por ter sido o meu maior apoio na realização deste mestrado. Obrigada por ter um coração gigante, que transborda amor e bondade, e me permitir partilhar da sua amizade. Obrigada por ser a melhor dupla, e não deixar com que eu desistisse de lutar pra chegar até aqui.

Agradeço a minha família *Med & Clín*, por todo apoio ao longo destes anos. Obrigada por cada palavra amiga, por cada incentivo, por cada lágrima minha enxugada, por se fazerem presentes e me ajudarem a enfrentar essa etapa da minha vida, à vocês: *Jailza, Lucas, Yuri, Leonardo, Rosângela, Nelson, André, Adriano, Edilene, Polly, Breno, Marcílio e Marlon*.

A minha segunda família: *Telma, Paulo, Bruno, Quezzia, Noah, Breno, Aline, Emilly e Ester*. Obrigada por se fazerem presente nessa etapa, dando todo apoio necessário e incentivo para prosseguir.

Aos meus amigos que ao longo da vida foram se tornando importantes, me ajudando nos momentos difíceis, como também dividindo muitas alegrias: *Amanda Sampaio, Beatriz Lemos, Giselle Carlos, João Ronielly, Wilker Silva, Lidiane Caetano, Geovânia Caroline, Severino Neto, Grasiela Costa, Fernanda Lacerda, Ana Luíza, Letícia Alves, Felipe Araújo, Hélder Fonseca e Idácio Pessoa*.

A minha orientadora *Profa. Dra. Margareth, de Fátima F. Melo Díniz*, por todo carinho e dedicação. Sempre demonstrando afeto e empenho na resolução dos empecilhos que surgiram ao longo desta caminhada.

A minha coorientadora *Profa. Dra Calíandra Maria Bezerra Luna Lima*, por ter sido uma verdadeira mãe. Obrigada por todos os ensinamentos e por sempre buscar fazer o melhor pra mim. Sua garra é uma fonte de inspiração para minha vida.

Kardilândia Mendes obrigada por cada conselho, por toda ajuda na realização deste trabalho. Obrigada por sua bondade, e por ser o coração do LABETOX.

A todos os integrantes do *LABETOX*, pelo apoio e manifestação de carinho: *Tafaela Dias, Igor, Myrella, Thyfanne, Micheline e Hilzeth Pessoa*

Ao *Prof. Dr. Cláudio Gabriel*, por gentilmente ter me cedido a substância na qual foi analisada no presente estudo. Agradeço pela paciência e por todo ensinamento a mim repassado.

Ao *Prof. Dr. Valter Andrade* por ter disponibilizado seu laboratório, e gentilmente me orientado com toda paciência e sabedoria na investigação da atividade antimalárica. Também agradeço a *Brenna Melo*, por ter me acompanhado e ensinado novas metodologias. Obrigada por sua dedicação e por ter sido tão prestativa sempre que precisei.

Aos funcionários da *UPA*, em especial à veterinária *Roberta* que sempre demonstrou afeto e prontidão em ajudar. Também agradeço a *Crispim*, por ser solícito e prestativo.

Aos avaliadores deste trabalho, *Prof. Dr. Reinaldo Nobrega* e *Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho*, pela disponibilidade em participar da banca examinadora, e por partilhar dos conhecimentos através das sugestões propostas.

A todos os *professores deste programa*, pelos ensinamentos repassados, pela dedicação em formar profissionais de qualidade. Também agradeço à UFPB e CNPq.

A todos que de alguma forma contribuíram na realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

A malária é uma doença parasitária que apresenta grande prevalência no mundo. Em 2018 chegou a acometer cerca de 228 milhões de pessoas, e causar 405.000 mortes. Esta doença é ocasionada pelo parasita do gênero *Plasmodium*, que é transmitido ao homem através da picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* infectada. Um dos principais fatores que tem dificultado o controle da malária, é o grande número de parasitos que apresentam resistência aos antimaláricos usuais, incluindo a artemisinina e derivados. Portanto, é necessário a descoberta de novos medicamentos que tenham maior eficácia, e com baixa toxicidade para o ser humano. Os adutos de Morita-Baylis-Hillman apresentam diversas funcionalidades, entre elas, atividades antiparasitárias. Desta forma, o alvo de nosso estudo é um aduto, o 2- (3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila, também chamado por CH₃ISACN. Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar o potencial do aduto CH₃ISACN como antimalárico através de estudos *in vitro*, e avaliar seus efeitos toxicológicos *in silico* e *in vivo*. Para isto, o composto CH₃ISACN foi exposto à cepa W2 de *P. falciparum* em eritrócitos humanos, e avaliado se este era capaz de reduzir a parasitemia. Sendo verificado também se o mesmo era capaz de causar hemólise aos eritrócitos. Além disto, foi investigado as características farmacocinéticas e toxicológicas teóricas do aduto CH₃ISACN, por meio de ensaios *in silico* com os softwares AdmetSAR e Molinspiration. Ainda, foi realizado o estudo toxicológico agudo *in vivo*, seguindo os protocolos experimentais adotados no Laboratório de Ensaios Toxicológicos (LABETOX) e o Guia da OECD 423 (2001). Desta forma, foi administrada uma dose inicial de 300 mg/kg da substância teste, em ratas Wistar e posteriormente, não havendo mortes, foi administrado em outras ratas da mesma espécie, uma dose de 2000 mg/kg. Durante o experimento foram avaliados parâmetros comportamentais, consumo de água, ração e evolução ponderal. Após 14 dias, os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésico, e seu sangue coletado para avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos. Os resultados mostraram que o aduto CH₃ISACN apresentou boa atividade antiplasmodial, e baixa citotoxicidade, tendo uma boa viabilidade celular. Além do que mostrou ter uma boa biodisponibilidade oral teórica e não apresentou riscos de toxicidade nos estudos *in silico*. Ainda, o aduto CH₃ISACN não causou morte em nenhum dos animais, apresentando assim uma alta DL₅₀ e sendo classificado segundo a GSH na categoria 5, como tendo baixa toxicidade. Este também não ocasionou nenhuma alteração comportamental, bem como nos demais parâmetros avaliados a maior dose testada não provocou nenhuma alteração significativa. Apenas uma redução na concentração de ureia, mas que não trouxe significado clínico relevante. Por fim, o aduto CH₃ISACN apresenta-se como um bom candidato à fármaco para o tratamento da malária. Sendo assim, de grande valia a continuação de seu estudo, até alcançar testes de fase clínica, e assim ser incluído no arsenal terapêutico contra a malária.

Palavras-chaves: Malária; *P.falciparum*; Farmacologia; Parasitologia; Toxicologia.

ABSTRACT

Malaria is a parasitic disease that is highly prevalent worldwide. In 2018, it reached about 228 million people and caused 405,000 deaths. This disease is caused by the parasite of the genus *Plasmodium*, which is transmitted by man through the bite of the infected female mosquito of the genus *Anopheles*. One of the main factors that hinder or control malaria is the large number of parasites that are resistant to antimalarials, including an artemisinin and used. Therefore, it is necessary to discover new drugs that have greater efficacy and low toxicity for humans. Morita-Baylis-Hillman adds have several features, including anti-parasitic activities. Thus, the target of our study is an adduct, 2- (3-hydroxy-1-methyl-2-oxoindolin-3-yl) acrylonitrile, also called CH₃ISACN. Thus, the present study aimed to investigate the potential of the CH₃ISACN adduct as an antimalarial through in vitro studies, and to evaluate its toxicological effects in silico and in vivo. For this, the compound CH₃ISACN was exposed to the W2 strain of *P.falciparum* in human erythrocytes, and evaluated if it was able to reduce parasitemia. It was also verified if it was able to cause hemolysis to erythrocytes. In addition, the theoretical pharmacokinetic and toxicological characteristics of the CH₃ISACN adduct were investigated through in silico tests with the software AdmetSAR and Molinspiration. In addition, an acute in vivo toxicological study was carried out, following the experimental protocols adopted at the Toxicological Testing Laboratory (LABETOX) and the OECD Guide 423 (2001). Thus, an initial dose of 300 mg / kg of the test substance was administered to Wistar rats and subsequently, with no deaths, a dose of 2000 mg / kg was administered to other rats of the same species. During the experiment, behavioral parameters, water consumption, feed and weight evolution were evaluated. After 14 days, the animals were euthanized by overdose of anesthetic, and their blood collected for evaluation of biochemical and hematological parameters. The results showed that the CH₃ISACN adduct showed good antiplasmodial activity, and low cytotoxicity, with good cell viability. In addition to what was shown to have a good theoretical oral bioavailability and did not present toxicity risks in in silico studies. Furthermore, the CH₃ISACN adduct did not cause death in any of the animals, thus presenting a high LD₅₀ and being classified according to GSH in category 5, as having low toxicity. There is also no behavioral change, as well as in the other parameters applicable to the highest dose tested, without causing a significant change. Only a reduction in urea concentration, but that did not bring relevant clinical significance. Finally, either CH₃ISACN has a good candidate for malaria treatment. Therefore, it is of great value to continue your study, until reaching clinical phase tests, and thus be included in the therapeutic arsenal against malaria.

Keywords: Malaria; *P.falciparum*; Pharmacology; Parasitology; Toxicology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da 2- (3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila-----	20
Figura 2 - Comparação da incidência atual de malária em todo o mundo, com os casos se fossem mantidos os mesmos níveis do ano 2000-----	21
Figura 3 - Ciclo de vida do <i>P. Falciparum</i> -----	24
Figura 4 - Derivados da Quinolina usados no tratamento da malária-----	28
Figura 5 - Principais antifolatos usados no tratamento da malária-----	28
Figura 6 - Principais derivados de Artemisinina usados no tratamento da malária-	29
Figura 7 - Estrutura da Isatina-----	34
Figura 8 - Procedimento de ensaio de toxicidade aguda com dose inicial de 300 mg/Kg-----	40
Figura 9 – Reação para preparação de CH ₃ I/SACN-----	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem de hemólise ocasionada pela substância CH₃ISACN (µg/ml) em eritrócitos humanos----- 53

Tabela 2: Propriedades moleculares da substância CH₃ISACN calculadas no software *Molinspiration*----- 54

Tabela 3: Propriedades de classificação ADMET, calculadas no software admetSAR, para a substância CH₃ISACN----- 56

Tabela 4- Avaliação do consumo de água e ração de ratas *Wistar tratadas* com CH₃ISACN nas doses de 300 mg/Kg e 2000 mg/Kg----- 58

Tabela 5- Avaliação da evolução ponderal de ratas *Wistar tratadas* com CH₃ISACN nas doses de 300 mg/Kg e 2000 mg/Kg----- 59

Tabela 6- Avaliação bioquímica do sangue periférico das ratas *Wistar tratadas* com CH₃ISACN, nas doses de 300 mg/Kg e 2000 mg/Kg----- 60

Tabela 7- Avaliação hematológica das ratas *Wistar tratadas* com CH₃ISACN, nas doses de 300 mg/Kg e 2000 mg/Kg----- 62

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Avaliação da Inibição do crescimento do <i>Plasmodium falciparum</i> (w2) <i>in vitro</i> após 48h de incubação com o composto CH ₃ ISACN em diferentes concentrações-----	51
Gráfico 2 - Determinação da CI ₅₀ do composto CH ₃ ISACN frente a cepa de <i>Plasmodium falciparum in vitro</i> , após 48 h de incubação. Cloroquina usada em paralelo como controle-----	52
Gráfico 3 - Avaliação hemolítica em eritrócitos humanos, induzida pela CH ₃ ISACN-----	53
Gráfico 4 - Consumo de ração de ratas <i>Wistar</i> tratadas com a substância CH ₃ ISACN.-----	58
Gráfico 5 - Avaliação ponderal das ratas <i>Wistar</i> na segunda semana após a administração da substância CH ₃ ISACN-----	59
Gráfico 6 - Concentração de ureia no sangue periférico das ratas <i>Wistar</i> tratadas com a substância CH ₃ ISACN.-----	61
Gráfico 7 - Concentração dos leucócitos totais no sangue periférico das ratas <i>Wistar</i> tratadas com a substância CH ₃ ISACN-----	63
Gráfico 8 - Concentração dos monócitos no sangue periférico das ratas <i>Wistar</i> tratadas com a substância CH ₃ ISACN-----	63

LISTA DE ABREVIATURAS

ABS - Absorbância

ADME - Absorção, distribuição, metabolização e excreção

ADMET - Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade

ALT - Alanino Aminotransferase

Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AMBH - ADUTO DE MORITA – BAYLIS – HILLMAN

AST - Aspartato aminotransferase

CCS - Centro de Ciências da Saúde

CEUA - Comitê de Ética em Uso Animal

CH₃ISACN - 2- (3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila

CI₅₀ - Concentração Inibitória 50%

DHFR - Dihidrofolatoredutase

DHPS - Dihidropteroatosintase

DL₅₀ - Dose Letal 50%

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetracético

E.P.M - Erro Padrão da Média

FAL - Fosfatase alcalina

GHS - Globally Harmonized Classification System

IP - Intraperitoneal

IPeFarM - Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos

LABETOX - Laboratório de Ensaio Toxicológicos

LABMAT - Laboratório de Biologia da Malária e Toxoplasmoses

LASOMPb - Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Paraíba

MBH - Morita-Baylis-Hillman

MVP - Membrana de Vacúolo Parasitóforo

OECD - Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento

OMS - Organização Mundial da Saúde

PABA - Para Amino Ácido Benzóico

PgPNSB - Programa de Pós-graduação em produtos Naturais e Sintéticos Bioativos

PNCM - Programa Nacional de Controle da Malária

SAR - Relação Estrutura Atividade

TCA - Terapia Combinada com Artemisinina

TGI - Trato Gastrintestinal

UFPB - Universidade Federal da Paraíba

UFRN - Universidade Federal do Rio Grande do Norte

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1 Malária	21
2.1.1 Epidemiologia.....	21
2.1.2 Biologia do <i>Plasmodium</i>	23
2.1.3 Patogenia	25
2.1.4 Antimaláricos e Resistência.....	26
2.1.4.1 Derivados de Quinina	29
2.1.4.2 Antifolatos	30
2.1.4.3 Artemisininas.....	31
2.2 Substâncias Sintéticas.....	32
2.2.1 Síntese Orgânica e seu Desenvolvimento ao Longo dos Anos	32
2.2.2 Isatina e seus Derivados	33
2.2.3 Adutos de Morita – Baylis – Hillman (AMBH)- CH_3ISACN	35
2.3- Avaliação Toxicológica.....	36
2.3.1 Ensaios <i>in silico</i>	36
2.3.2- Ensaios <i>in vivo</i>	38
3. OBJETIVOS.....	41
3.1 Objetivo Geral	41
3.2 Objetivos Específicos.....	41
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 Local da Pesquisa	42
4.2 Materiais	42
4.2.1 Substância Teste.....	42
4.2.2 Eritrócitos Humanos	43

4.2.3 Animais	43
4.3 Métodos	44
4.3.1 Avaliação Antiplasmodial <i>in vitro</i>	44
4.3.1.1 Cultura de <i>Plasmodium falciparum</i>	44
4.3.1.2 Atividade Antiplasmódica <i>in vitro</i>	45
4.3.1.3 Ensaio de Hemólise	45
4.3.2 Ensaios Toxicológicos <i>in silico</i>	46
4.3.2.1 <i>Molinspiration</i>	46
4.3.2.2 AdmetSAR	47
4.3.3 Ensaio Toxicológico <i>In vivo</i>	47
4.3.3.1 Toxicidade Aguda	47
4.3.3.2 Avaliação Comportamental	48
4.3.3.3 Consumo de Água e Alimento	48
4.3.3.4 Avaliação Laboratorial do Sangue.....	48
4.3.3.4.1 Avaliação dos Parâmetros Hematológicos	49
4.3.3.4.2 Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos	49
4.4 Análise Estatística	50
5. RESULTADOS	51
5.1 Estudo Antiparasitário <i>in vitro</i>	51
5.1.2 Atividade Antiplasmódica <i>in vitro</i>	51
5.1.3 Avaliação Hemolítica	52
5.2 Estudos Toxicológicos.....	54
5.2.1 Ensaio <i>in vitro</i>	54
5.2.1.1 <i>Molinspiration</i>	54
5.2.1.2 AdmetSAR	54
5.2.2 Ensaio Toxicológico <i>in vivo</i> Não-Clínico Agudo	57
5.2.2.1 Avaliação Comportamental	57

5.2.2.2 Controle de Água, Ração e Evolução ponderal.....	57
5.2.2.3- Avaliação Bioquímica	60
5.2.2.4- Avaliação Hematológica.....	61
6. DISCUSSÃO	64
7. CONCLUSÕES	75
8. REFERÊNCIAS.....	76
9. ANEXOS	91
Anexo A- Certidão do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).....	91
Anexo B- Certidão do Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA)	92
Anexo C- Produção Científica durante o Mestrado	93

1. INTRODUÇÃO

Os protozoários são seres unicelulares, e são os principais causadores de doenças parasitárias, denominadas de protozooses. Dentre estas doenças, uma das principais é a malária, que é causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium* (FRANÇA *et al.*, 2008). De todas as espécies, o *P. falciparum* é o que causa maior letalidade (SURESH; HALDAR, 2018; WASSMER; GRAU, 2017).

Relatos mostram que a malária vem acometendo o homem desde a Antiguidade (LI *et al.*, 2019). Em 2018, foram registrados cerca de 228 milhões de casos de malária no mundo (WHO, 2019). No Brasil, a região Amazônica é a principal área endêmica da doença, é onde ocorre 99% dos casos registrados no Brasil (MARINHO E SILVA, *et al.*, 2018). De acordo com o boletim do Ministério da Saúde (Brasil) (a), em 2019 foram registrados 71 casos confirmados de malária no Nordeste, sendo a maioria (25 casos) no estado da Paraíba.

A principal causa da malária ser uma das protozooses mais graves do mundo, é devido a resistência do *Plasmodium* aos tratamentos disponíveis no mercado. Até mesmo às medicações a base de Artemisininas, que são consideradas tratamento de primeira linha contra o *P. falciparum*, não tem tido uma boa eficácia (ROCAMORA *et al.*, 2018; SURESH; HALDAR, 2018). Assim, devido à resistência de vários antimaláricos, tem-se a necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos para o combate à malária (ASHLEY; PHYO, 2018; VALE *et al.*, 2019).

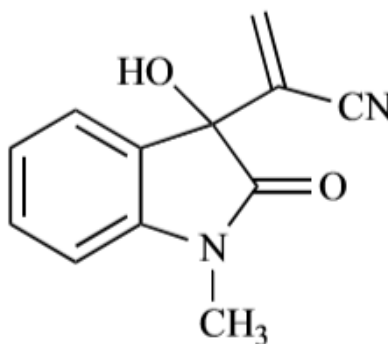
Os adutos de Morita-Baylis-Hillman (MBH) e seus derivados, são compostos valiosos na síntese orgânica devido às suas abundantes funcionalidades (WANG *et al.*, 2017). Kundu (1999), relatou atividade antimalarial de 11 adutos de MBH. E a partir deste trabalho pioneiro, essa classe de compostos vem apresentando uma variedade de atividades, inclusive antiparasitárias. Assim, o composto 2- (3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila, também chamado por CH₃ISACN, que é um aduto de MBH, tem um rendimento de 99%, e é obtido em um curto tempo de reação. O primeiro estudo com este composto o descreve tendo boa atividade *in vitro* contra células leucêmicas (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2016). Desta forma, é uma

substância inédita e com grande potencial farmacológico, sendo ideal para estudos com atividade antimalárica.

Uma substância com potencial farmacológico pode ser predita através de ensaios *in silico*. Ferramentas como o admetSAR, fornecem informações da farmacocinética do composto em estudo, como: absorção, distribuição, metabolismo e excreção. Além de prever sua toxicidade, informando sobre DL₅₀, mutagenicidade e carcinogenicidade (KHANAL *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2018).

Além de estudos farmacológicos, para que uma substância torne-se um potencial medicamento, é imprescindível que sejam realizados testes toxicológicos *in vivo*, a fim de garantir a segurança do uso da substância em seres humanos. Portanto, testes de toxicidade aguda não clínica devem ser realizados antes de passar para fase I da pesquisa clínica (ANVISA, 2013). Este teste pode ser seguido de acordo com diretrizes da *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD). Uma destas é a OECD 423 (2001), que avalia a toxicidade da substância quando administrada em dose única aos animais, avaliando sua letalidade ou não, bem como estimando a DL₅₀ (Dose Letal 50%) da substância e através disso classifica o grau de toxicidade. Além de ser um método no qual instrui sobre o uso reduzido de animais.

Figura 1: Estrutura da 2- (3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila



Fonte: LIMA-JUNIOR *et al.*, 2016

2. REFERENCIAL TEÓRICO

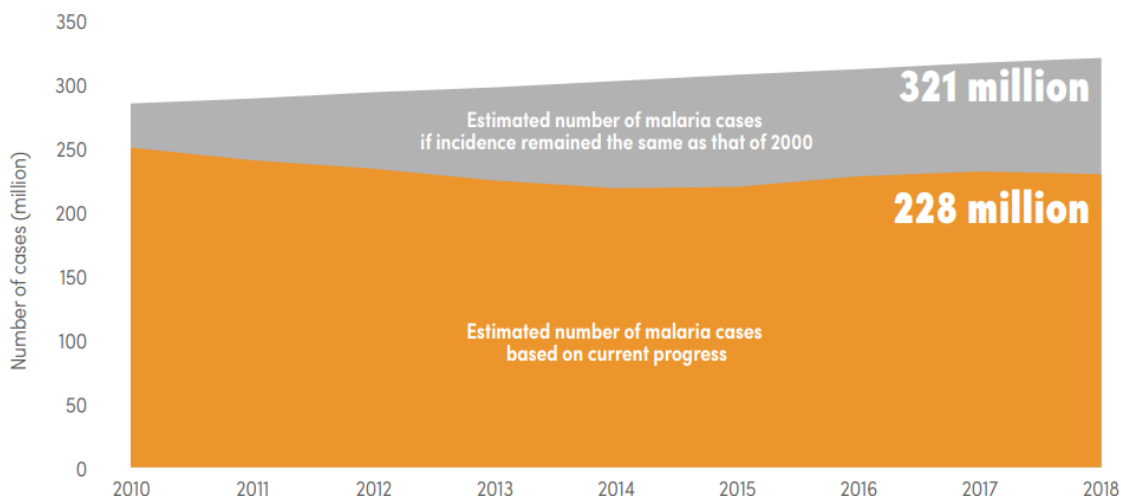
2.1 Malária

2.1.1 Epidemiologia

Apesar da transmissão da malária ter reduzido em muitas partes do mundo, esta ainda é uma doença que tem causado grande preocupação também em regiões não endêmicas. Isto se deve à quantidade de turistas e imigrantes que vem de regiões endêmicas, principalmente os da África Subsaariana e de partes da Oceania. Sendo a maioria dos casos importados serem ocasionados pelo *P. falciparum* e o *P. vivax* (ANGELO *et al.*, 2017; TATEM *et al.*, 2017). Até a década de 1970, a malária era endêmica na Europa, mas atualmente cerca de 99% dos casos registrados de malária na região, deve-se a viagens (ECDC, 2018).

Em 2018 foram registrados cerca de 228 milhões de casos de malária no mundo. Caso não houvessem sido tomadas medidas sérias para seu combate, a taxa de incidência estaria em 321 milhões (FIGURA 2). A maioria dos casos registrados foi na África, sendo 99,7% dos casos ocasionados pelo *P. falciparum* (WHO, 2019).

Figura 2 - Comparação da incidência atual de malária em todo o mundo, com os casos se fossem mantidos os mesmos níveis do ano 2000



Fonte: WHO, 2019

O número de mortes por malária tem diminuído ao longo dos anos, em 2010 haviam sido registrados 585.000 mortes em todo o mundo, já em 2018 esse número caiu para 405.000 mortes (WHO, 2019). Em 2015 a Organização Mundial da Saúde, elaborou um projeto intitulado “*Global Technical Strategy for Malaria 2016-2030*”, no qual visa a diminuição e eliminação da malária no mundo. Por isso estima-se que para 2020 tenha-se uma diminuição $\geq 40\%$ no índice de mortalidade comparado a 2015, e para 2030 uma redução $\geq 90\%$ (WHO_a, 2015).

A malária se instalou no Brasil há muitos anos, sendo a primeira campanha antimalárica realizada em 1905. No início dos anos 90 mais de 600 mil casos foram registrados. Até que foi criado Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM), com o objetivo de diagnosticar precocemente a doença e realizar o devido tratamento (CARLOS *et al.*, 2019).

Tendo em vista a maior busca pela erradicação da malária, com o tempo o número de casos foi reduzindo. E em 2018 no Brasil foram notificados 194.271 casos de malária. Destes, só na região Amazônica foram 193.534 casos e 737 na região extra-Amazônica. Em 2019, do período de janeiro a março, houve uma redução de 38% na incidência da malária comparando com 2018 (MINISTÉRIO DA SAÚDE _b, 2019). Mas em estados como a Paraíba, em 2019 houve um aumento de casos, sendo registrados 25 casos, enquanto que em 2018 apenas 4 (MINISTÉRIO DA SAÚDE _a, 2019).

A maior parte dos casos de malária registrados nas regiões Extra-Amazônica, são ditas malária importada. Ou seja, a doença que foi diagnosticada fora da área de infecção, sendo adquirida por migração para região de infestação. Em um estudo no estado Rio de Janeiro com dados de 2007 -2013, foram registrados 923 casos, sendo 79,7% obtidos de malária importada (ALBUQUERQUE *et al.*, 2019). Em um outro estudo mais recente de 2007-2017, foram registrados 806 casos de malária na região Extra-Amazônica. Evidenciando que apesar da região amazônica ter maior incidência da doença, esta não pode ser negligenciada nas outras regiões (MULTINI *et al.*, 2019).

O *P. falciparum* e o *P. vivax*, são as principais espécies causadoras de malária. Sendo este último o responsável por cerca de 75% da doença em toda América (WHO, 2019). Em 2014 no Brasil, dos casos registrados de malária, 84% foi pelo *P. vivax*, e 16% pelo *P. falciparum* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Os casos

de *P. falciparum* se dão principalmente na parte mais ocidental da Amazônia brasileira. Os casos de *P. falciparum* no período de 2015-2016, 75% foi registrado nos estados do Amazonas e Acre (CARLOS *et al.*, 2019).

2.1.2 Biologia do *Plasmodium*

A malária é uma doença infecciosa febril aguda que tem como agente etiológico, protozoários intracelulares obrigatórios, do filo apicomplexa e gênero *Plasmodium* (NKUMAMA; O'MEARA; OSIER, 2017). É conhecida como febre palustre, febre intermitente. Sendo apenas 5 espécies que causam malária em humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*, destas há três espécies associadas à malária no Brasil: *P. vivax*, *P. malariae* e *P. falciparum*. (DEITSCH; DZIKOWSKI, 2017). As espécies *P. falciparum* e *P. vivax* são responsáveis por aproximadamente 95% dos casos de malária (LOY *et al.*, 2017).

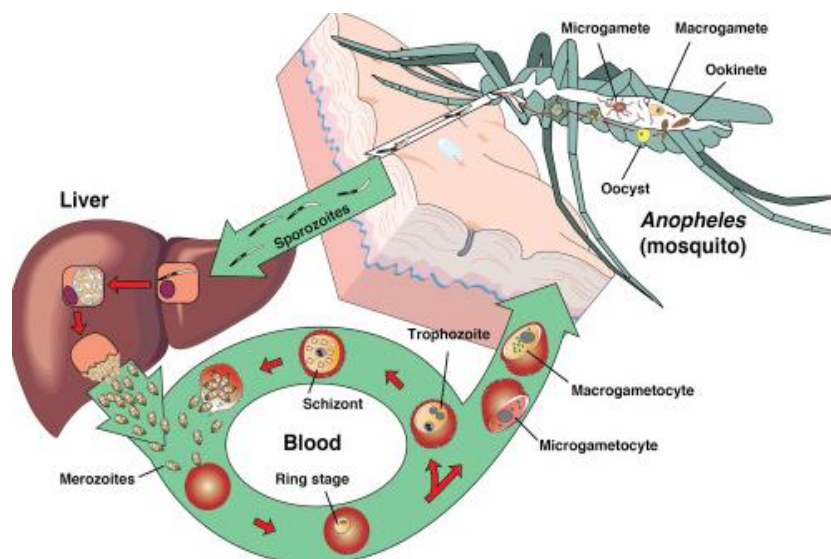
Esta doença é transmitida através da picada do mosquito fêmea anofelina do gênero *Anopheles* infectada pelo *Plasmodium spp*, que se alimenta de sangue humano para obter os nutrientes necessários para sua sobrevivência (DEITSCH; DZIKOWSKI, 2017; MALA *et al.*, 2016).

O ciclo de vida do *Plasmodium* é heteroxênico, ou seja, ocorre em dois hospedeiros: no mosquito *Anopheles* (hospedeiro definitivo), onde ocorre a reprodução sexuada (esporogônia), e no hospedeiro humano, onde ocorre a fase assexuada (esquizogonia) (BASU; SAHI, 2017; DEITSCH; DZIKOWSKI, 2017).

O mosquito fêmea alimentado de sangue infectado, injeta esporozoítos na derme do hospedeiro humano, que ao chegar a corrente sanguínea, são transportados para o fígado, onde através das células de Kupffer penetram nos hepatócitos e formam uma Membrana de Vacúolo Parasitóforo (MVP). Então, ocorre esquizogonia nas células hepáticas, e são formados dezenas de milhares de merozoítas que são liberadas na corrente sanguínea através de merossomos. Os merozoítas então penetram nos eritrócitos, e iniciam um ciclo crônico de esquizogonia (assexuada), que vai variar de acordo com a espécie. Parte dos merozoitos durante a esquizogonia, são reprogramados para sofrer gametocitogênese. Em um período de 15 dias, os gametócitos se desenvolvem na

medula óssea, e quando maduros vão para corrente sanguínea. Ao se alimentar de sangue, um mosquito *Anopheles* ingere os gametócitos femininos e masculinos. O acasalamento ocorre pela fusão do micro e macrogameta no estômago do mosquito, e assim forma um zigoto que evolui para oocinetes. Estes invadem a parede do intestino do mosquito onde desenvolvem-se em oocistos e ocorre replicação esporogênica. Por fim os oocistos crescem, rompem-se e liberam esporozoítos, estes se deslocam para as glândulas salivares do mosquito onde podem ser inoculados no próximo hospedeiro humano (Figura 3) (COWMAN *et al.*, 2016; COWMAN *et al.*, 2017).

Figura 3 – Ciclo de vida do *P. falciparum*



Fonte: COWMAN *et al.*, 2017.

2.1.3 Patogenia

Os sintomas da malária nos seres humanos ocorrem no estágio sanguíneo durante a esquizogonia. Essa fase leva cerca de 48 horas e produz de 16 a 24 merozoítos por célula quando o parasita infectante é o *P. falciparum* (STANOJCIC *et al.*, 2017). De maneira geral, durante essa fase os sintomas da malária são inespecíficos, podendo apresentar dor de cabeça, fadiga, artralgia, mialgia, dor no peito e febre, que pode chegar a 40°C. Esta ocorre em intervalos periódicos de 48h quando o infectante é o *P. vivax* e *P. ovale*, e de 72 horas para o *P. malariae*, sendo essa periodicidade menos comum para o *P. falciparum* (BASU; SAHI, 2017; MILNER, 2018).

As diferenças biológicas entre *P. falciparum* comparado com o *P. vivax*, é que este apresenta uma baixa parasitemia, devido à infecção restrita de apenas reticulócitos; em estágio sexual têm uma forma redonda semelhante aos estágios assexuais e todos os estágios de desenvolvimento do *P. vivax* no sangue podem ser observados no sangue periférico (ADAMS; MUELLER, 2017).

Dentre as espécies de *Plasmodium*, o *P.falciparum* é o que causa maior letalidade. Em partes isso deve-se por sua capacidade de modificar a superfície dos eritrócitos, de modo a conferir propriedades citoadesivas às hemácias, que acabam sequestrando e obstruindo pequenos vasos sanguíneos, podendo levar a danos nos rins e pulmões. Como também pode atingir o cérebro causando a síndrome da malária cerebral (DEITSCH; DZIKOWSKI, 2017; MOXON *et al.*, 2019). Esta síndrome apresenta vários mecanismos patogênicos, como disfunção endotelial com consequente edema cerebral, obstrução microvascular mecânica por eritrócitos infectados (IEs) sequestrados, ativação de células imunes e liberação de citocinas pró-inflamatórias, desregulação das vias de coagulação e permeabilidade da barreira cerebral (BBB) (WASSMER; GRAU, 2017).

A anemia grave também é uma das complicações ocasionadas pela malária, que pode levar à morte. Esta anemia tem sido remetida à diseritropoiese na medula óssea e à perda de eritrócitos não infectados na circulação por lise dos eritrócitos. Um dos mecanismos propostos para tal fato, é ativação do complemento. No estágio do sangue, quando os parasitas maduros se rompem são liberadas proteínas que juntamente com anticorpos formas complexo imunes e ativam o sistema

complemento que resulta na remoção de proteínas e leva à anemia (OYONG *et al.*, 2018; RIVERA-CORREA; RODRIGUEZ, 2019)

A virulência do *P. falciparum*, é ocasionada por diferentes fatores, sendo um dos principais a Proteína 1 da membrana eritrocitária de *P. falciparum* (PfEMP1), que permite a ligação em vários receptores no endotélio de outras células infectadas como também não infectadas. Dessa forma vai causando o sequestro de outros eritrócitos, como obstrução dos vasos (SHABANI *et al.*, 2017; WASSMER; GRAU, 2017). Mas existem anticorpos que reconhecem formas específicas de PfEMP1, e assim interrompe o processo de adesão e acaba levando à destruição dos parasitas. Entretanto, para evitar esse mecanismo de defesa, os parasitas desenvolveram mecanismos únicos de expressão alternada de variantes de proteínas da superfície adesiva. (DUFFY, 2019; DURAISINGH; HORN, 2016; TESSEMA *et al.*, 2019).

2.1.4 Antimaláricos e Resistência

Para o tratamento da malária existem antimaláricos disponíveis que atingem pontos chaves do ciclo evolutivo do parasito, como: interrupção da esquizogonia sanguínea, destruição de hipnozoítos, interrupção de gametócitos. Alguns fatores influenciam no tipo de tratamento da malária, como: idade, peso, gestante, tipo de malária (branda, grave, mista). Por isso que o Ministério da Saúde disponibiliza um “Guia de Tratamento da Malária no Brasil”, no qual contém esquemas de tratamentos para cada caso específico, o que ajuda na eficácia terapêutica (Ministério da Saúde c, 2019).

Apesar de se ter medicamentos recomendados para o tratamento da malária: Artemisininas, Cloroquina, Mefloquina, Atovaquona, Proguanil, Pirimetamina, Sulfadoxina, Primaquina, Piperaquina, Quinina (MENARD; DONDORP, 2017). A resistência a estes tem sido o grande obstáculo no combate a esta doença (HANBOONKUNUPAKARN; WHITE, 2016; NSANZABANA *et al.*, 2018).

A resistência do *Plasmodium* aos antimaláricos tem crescido. E estudos tem sido realizados para identificação da causa da resistência aos medicamentos. Programas como *Malaria Genomic Epidemiology Network* (MalariaGEN; <https://www.malariagen.net>) isolou e sequenciou 3500 parasitas de *P.*

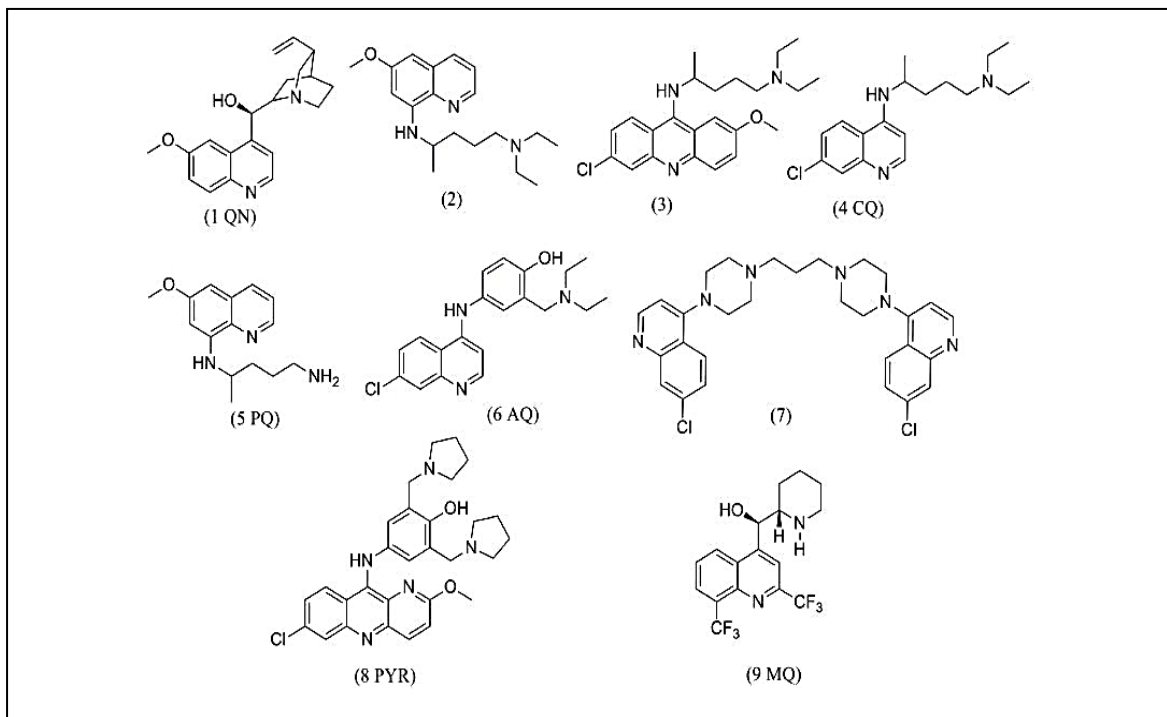
falciparum de 23 países, e 228 de *P. vivax* de 13 países. Esses dados foram usados para investigar não só a resistência dos medicamentos bem como a estrutura populacional dos parasitas, diversidade, transmissão e epidemiologia (SU *et al.*, 2019).

Os parasitas sofrem modificações genéticas de forma a adquirir resistência a determinado fármaco. Como foi investigado em um estudo recente, onde foram isolados 1.492 amostras de *P. falciparum* de 11 locais no sudeste da Ásia, e foi identificado mutações na sequência de aminoácidos dos genes, associando assim à resistência à piperquina e dihidroartemisinina e consequentemente falha no tratamento (AMATO *et al.*, 2018).

É comum que em países com alta ou baixa incidência de malária, ocorra reinfecção pelo mesmo parasita. Em um estudo na Tailândia, 80% dos pacientes tiveram episódios recorrentes de malária dentro de um ano após a infecção inicial. E 25% dos pacientes com recidivas, infectados por *P. falciparum* em 35 dias tiveram um novo episódio com o mesmo parasita, provavelmente por resistência à medicamentos (LAWPOOLSRI *et al.*, 2019).

Tendo em vista a ampla disseminação da resistência parasitária, os medicamentos antimaláricos encontram-se bem limitados. Atualmente as classes que se encontram em uso são: derivados de quinina (Figura 4), os antifolatos (Figura 5) e as artemisininas (Figura 6) (BULE *et al.*, 2017; PINHEIRO *et al.*, 2018).

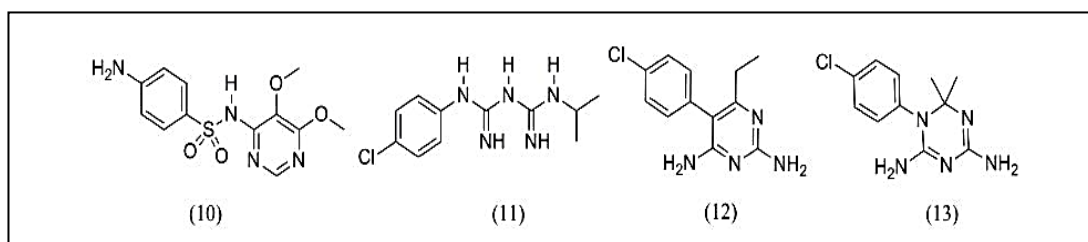
Figura 4- Derivados da Quinolina usados no tratamento da malária



Fonte: PINHEIRO *et al.*, 2018.

Legenda: Quinina (1QN), Pamaquina (2), Quinaquina (3), Cloroquina (4 CQ), Primaquina (5 PQ), Amodiaquina (6 AQ), Piperaquina (7), Pironaridina (8 PYR), Mefloquina (9 MQ).

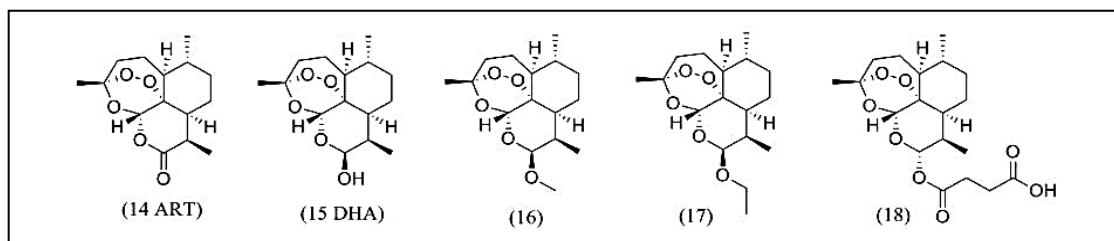
Figura 5 - Principais antifolatos usados no tratamento da malária



Fonte: PINHEIRO *et al.*, 2018.

Legenda: Sulfadoxina (10), Proguanil (11), Pirimetamina (12), Cicloguanil (13).

Figura 6- Principais derivados de Artemisinina usados no tratamento da malária



Fonte: PINHEIRO *et al.*, 2018

Legenda: Artemisinina (14 ART), Dihidroartemisinina (15 DHA), Arteméter (16), Arteéter (17), Artesunato (18)

2.1.4.1 Derivados de Quinina

A quinina é derivada de um extrato alcalino da casca de cinchona das florestas Andinas. Foi o primeiro medicamento caracterizado como específico para a malária. Caracteriza-se por ser potente, mas os seus efeitos adversos como zumbido, vertigem, dor de cabeça, disforia, náusea e vômitos, faz com que seja dada preferência ao uso de outros medicamentos (SHANKS, 2016; ADENIYI *et al.*, 2017). Além disso são registrados vários casos em diferentes regiões de resistência a este medicamento (RODRÍGUEZ-VALERO *et al.*, 2018). A quinina apresenta o anel quinolínico em sua estrutura, assim outros derivados foram sintetizados como a: cloroquina, mefloquina, primaquina, piperaquina e amodiaquina (GUNSARU *et al.*, 2017; MULLER; HYDE, 2010).

Alguns compostos quinolínicos como a Cloroquina age interferindo na síntese de hemozoína, e forma um complexo tóxico ao protozoário. Pois os *Plasmodium* ingerem e catabolizam a hemoglobina, e é liberado o heme, que é tóxica pra o parasita. Entretanto eles sequestram o heme em um biocristal relativamente inerte, formando assim a hemozoína. (LISEWSKI *et al.*, 2018; PISCIOTTA *et al.*, 2017; YEO *et al.*, 2017).

A cloroquina é um dos medicamentos antimaláricos mais antigos, porém os parasitas tem apresentado resistência, sendo substituído pelas artemisininas. Mas ainda sim a cloroquina é utilizada como terapia de combinação em esquemas terapêuticos (NAB; EFFERTH, 2019; OCAN *et al.*, 2018). O *P. falciparum* resistente

à cloroquina foi identificado pela primeira vez no início dos anos 60 (MOORE; LANIER, 1961), e hoje é encontrado na maioria das áreas endêmicas. No Brasil, cerca de 90% dos pacientes infectados pelo *P. falciparum* não respondem ao tratamento com cloroquina (GOMES *et al.*, 2018). Acredita-se que a resistência à cloroquina esteja relacionada com mutações no transportador de resistência à proteína da membrana *P. falciparum* cloroquina (PfCRT), localizado no vacúolo digestivo do parasita (GUNSARU *et al.*, 2017).

Um outro antimalárico com anel quinolínico é a mefloquina, que vem sendo usado no tratamento e quimioprevenção da malária há muitos anos (RAMHARTER *et al.*, 2019). Esta atualmente é mais utilizada em associação com outros fármacos como artesunato-mefloquina, devido a resistência dos *Plasmodium* quando usada como monoterapia (HOGLUND *et al.*, 2018).

2.1.4.2 Antifolatos

Os antifolatos são medicamentos utilizados em combinação entre inibidores da dihidrofolato redutase, (proguanil, pirimetamina, clorproguanil e trimetoprim) com drogas sulfa (sulfadoxina, sulfametoxazol, dapsona) (BULE *et al.*, 2017).

Uma das principais associações é a sulfadoxina-pirimetamina que é utilizado como profilaxia em grávidas e crianças (JUMA *et al.*, 2019; KAJUBI *et al.*, 2019). Como o folato é um elemento importante durante a gravidez para evitar anemia, o uso de ácido fólico exógeno durante um tratamento com antifolato, interfere na eficácia deste contra a malária, antagonizando seu efeito. Portanto, em casos de gravidez em áreas endêmicas, deve-se analisar o risco-benefício do tratamento (VERHOEF *et al.*, 2017). Em algumas regiões como no sudeste asiático essa profilaxia com as grávidas não tem sido mais usada devido a resistência dos parasitos (NOISANG *et al.*, 2019). Estando essa terapia também ameaçada em outras regiões como na África (KAJUBI *et al.*, 2019; MADANITSA *et al.*, 2016).

O mecanismo de ação dos antifolatos atuam através da inibição da formação do folato. A sulfadoxina compete com o Para Amino Ácido Benzoico (PABA) inibindo sua ligação na Dihidropteroato-sintase (DHPS), assim não ocorre a síntese de ácido fólico que é essencial para replicação do parasito. Já a pirimetamina interfere na

formação das bases purina e pirimidina através da inibição da Dihidrofolato redutase (DHFR), impedindo a divisão nuclear do parasito. Logo, a resistência aos medicamentos antifolatos tem sido associada às mutações nos genes da DHPS (Pfdhps) e DHFR (Pfdhfr) (BANSAL *et al.*, 2017; SARMAH *et al.*, 2017).

Diante das múltiplas mutações nos genes Pfdhfr e Pfdhps, tem sido registrado a resistência a diferentes drogas antifolatos. Por isso atualmente uma opção para um melhor tratamento da malária é a associação de um antifolato com um derivado de artemisinina (BANSAL *et al.*, 2019; RICOTTA; KWAN.; 2019).

2.1.4.3 Artemisininas

As artemisininas (ou derivados de Artemisinina) foram desenvolvidas na década de 1970 por um projeto secreto realizado por cientistas do governo chinês (DONDORP *et al.*, 2011). A artemisinina e seus derivados (dihidroartemisinina artemeter, artemotil e artesunato) são muito potentes e tem ação rápida. Sendo altamente ativos contra as espécies de *Plasmodium*, pois agem contra os parasitas em quase todas as fases sanguíneas (anéis, trofozoítos, esquizontes) (FAIRHURST; DONDORP, 2016), e até mesmo na fase de gametócitos imaturos, de forma a interromper a maturação destes, impedindo a transmissão da malária do sangue periférico humano aos mosquitos. (NOSTEN; WHITE, 2007; WGS *et al.*, 2016).

Apesar do mecanismo de ação das artemisininas não está bem claro, sabe-se que são pró fármacos e que sua ponte óxido endoperoxídeo é clivada, formando radicais livres, que reagem com vários alvos celulares, incluindo proteínas como enzimas e fosfolípidos (CUI; SU, 2009). Um outro mecanismo proposto da artemisinina e seus derivados, é que estes se ligam covalentemente à 124 proteínas dos parasitas e interrompem funções biológicas essenciais, de forma a causar a morte do parasita (WANG *et al.*, 2015).

Antigamente o tratamento contra a malária era introduzido como monoterapias e em doses muito baixas, e isso influenciou no surgimento de resistência à medicamentos. Diante disso, a terapia combinada foi uma alternativa para combater a malária (WHITE, 2016). Para o tratamento da malária por *P. falciparum*, a medicação de primeira linha é a terapia combinada de artemisinina

(TCA), pois são altamente eficazes (AMATO *et al.*, 2018; MENEHIN *et al.*, 2017; WITKOWSKI *et al.*, 2017). A TCA une a ação antimalárica rápida e curta da artemisinina ou um derivado, com um medicamento de ação mais prolongada. Entretanto sabe-se que em algumas regiões esse parasita já é resistente à artemisinina (KAVISHE *et al.*, 2017).

Atualmente a Organização Mundial da Saúde (OMS), recomenda 5 tipos de TCAs para o tratamento de malária não complicada por *P. falciparum*: arteméter-lumefantrina (ALu), artesunato-amodiaquina (ASAQ), artesunato-mefloquina (ASMQ), di-hidroartemisinina-piperaquina (DHAPQP) e artesunato-sulphadoxina-pirimetamina (WHO ^b, 2015). Relatórios apontam que a diminuição da eficácia da TCA, estavam relacionados à resistências aos medicamentos combinados e não às artemisininas (KAVISHE *et al.*, 2017).

2.2 Substâncias Sintéticas

2.2.1 Síntese Orgânica e seu Desenvolvimento ao Longo dos Anos

Durante muitos anos, a principal fonte para produção de medicamentos eram os produtos naturais (LARAIA; WALDMANN, 2017). As drogas que eram desenvolvidas no século XX não possuíam base científica suficiente da sua eficácia e segurança toxicológica, a maioria eram derivadas de plantas, e apenas algumas eram de origem sintética (ANDRADE *et al.*, 2016). Mas com o passar do tempo, a química farmacêutica foi se desenvolvendo e as substâncias sintéticas passaram a ter importante papel no desenvolvimento de novos medicamentos. Desta forma, houve uma maior síntese de fármacos inéditos, através de reações químicas e modificações moleculares. Proporcionando maior estabilidade, eficácia e especificidade ao seu alvo celular (CAMPOS *et al.*, 2019; SANGI 2016).

Atualmente, a síntese orgânica é a forma mais promissora para a obtenção de novos medicamentos. Através da produção de substâncias que apresentem grupos farmacofóricos e assim sejam biologicamente ativos, direcionando para o seu alvo farmacológico (BREL *et al.*, 2015).

A relação entre a síntese orgânica e a química medicinal tem ganhado força na busca do desenvolvimento de novos medicamentos, com propriedades terapêuticas mais favoráveis e sua conversão em derivados que mostrem atividade medicinal ideal. Buscando novas moléculas com vias sintéticas menos demoradas, mais econômicas, seguras, e com melhor ação contra doenças graves como a malária, tuberculose e o câncer (BÉRUBÉ, 2016; PRAJAPAT *et al.*, 2017).

A síntese orgânica trouxe maior rapidez na produção de novos medicamentos. E juntamente com outras metodologias como programas *in silico*, permite aumentar a eficiência e reduzir o custo no preparo de novas moléculas. Além do que, os químicos tem buscado inovar nas metodologias sintéticas, o que estimula a indústria farmacêutica a criar e explorar estruturas que antes eram inacessíveis, além de buscar formas de sintetizar que sejam mais ecológicas (BLAKEMORE *et al.*, 2018; SOMANI *et al.*, 2017). Também, através de modificações estruturais, estereoquímica, remoção de grupos, oxigenação, hidrogenação, entre outros, são mudanças que podem alterar a atividade farmacológica de uma molécula, podendo levar ao seu aperfeiçoamento (PRAJAPAT *et al.*, 2017).

2.2.2 Isatina e seus Derivados

Os compostos heterocíclicos destacam-se na química, por apresentarem a possibilidade de formar novas substâncias através da substituição de um ou mais átomos de carbono por heteroátomos. Compostos heterocíclicos têm ampla gama de propriedades medicinais, o que inspiraram os químicos a sintetizar novos híbridos e a explorar suas propriedades farmacológicas (SANTOS; GONSALVES; ARAÚJO, 2018).

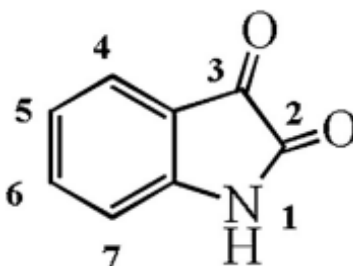
A isatina (FIGURA 7) é um composto natural endógeno encontrado em muitos organismos. Esta possui um núcleo estável, o núcleo indol, que é um composto heterocíclico e é bastante utilizado por químicos para introdução de grupos farmacofóricos, para desenvolvimento de moléculas com potencial terapêutico (MELIS *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2017).

O núcleo indol é uma molécula heterocíclica de natureza aromática e bicíclica plana, no qual o anel benzeno liga-se por meio de 2 e 3 posições ao anel pirrol

contendo nitrogênio. Este composto sofre facilmente reações de substituição eletrofílica, sendo, portanto, usado como um núcleo versátil no desenvolvimento de novas drogas. O núcleo indol é encontrado em variados compostos biologicamente ativos. Portanto, os derivados do indol tem chamado atenção dos químicos para produção de novas drogas ativas (SRAVANTHI; MANJU, 2016).

A partir da isatina, diversas moléculas tem sido sintetizadas. Estudos mostram que esta e seus derivados, tem apresentado diferentes atividades biológicas como: anticonvulsivante, antipsicótico, sedativo, antiviral, anti-inflamatório, analgésico, antioxidante (OZGUN *et al.*, 2016), antibacteriana (GUO *et al.*, 2019), antimalárica (THAKUR *et al.*, 2018), anti-HIV (LI *et al.*, 2018). Como também tem sido promissores no tratamento de doenças neurodegenerativas (OZGUN *et al.*, 2016), como também atividades contra o câncer (DESAI *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2018) e tuberculose (JIANG, *et al.*, 2018).

Figura 7- Estrutura da isatina



Fonte: XU *et al.*, 2017

Moléculas derivadas de isatina com o grupo 3-hidroxi-oxindole-2-onas 3-substituídos tem se mostrado importantes compostos sintéticos, e por isso tem sido explorada por pesquisadores no intuito de descobrir novos potenciais biológicos (BRITO *et al.*, 2019; TIWARI *et al.*, 2018). Sendo usados como antioxidantes (YASUDA *et al.*, 2016), antivirais, antibacteriana, anticâncer, anti-HIV (KUMAR *et al.*, 2016), antidiabéticos, anti-reumatismo (MOGHADDAM; JALAL; ZERAATKAR, 2017).

2.2.3 Adutos de Morita – Baylis – Hillman (AMBH)- CH₃ISACN

A reação de Morita- Baylis- Hilman, teve sua origem em 1968 com Morita que descreveu a reação de aldeídos com acrilatos (MORITA; SUZUKI; HIROSE, 1968). Em 1972 Baylis e Hillman complementaram a reação com acoplamentos catalisados entre vários alcenos ativados e aldeídos. Por muitos anos esta reação foi ignorada pelos químicos. Mas atualmente, constitui uma das mais úteis e populares reações de ligação carbono-carbono. Por meio desta, cria-se um centro quiral, no qual permite as sínteses de moléculas multifuncionais (PELLISSIER, 2017). Com isso, teve-se um aumento na síntese e desenvolvimento de novos métodos de reação catalítica enantiosseletiva à MBH (WENSLEY; MCDOUGAL; SCHAUS, 2016).

Os AMBH e seus derivados são compostos valiosos na síntese orgânica devido às suas abundantes funcionalidades (WANG *et al.*, 2017; ZHAN *et al.*, 2016). Estudos mostraram que os Adutos de Morita – Baylis – Hillman (AMBH) apresentaram bom potencial citotóxico, como antiparasitário ou antitumoral (BRITO *et al.*, 2019).

Facheina-Martins (2017) relatou em seu estudo a ação de 3 AMBH com potencial anti-inflamatório e anticâncer, sendo capazes de diminuir a quase zero a produção de IL-1 β e IL-6. Os adutos de MBH tem apresentado forte atividade contra diferentes parasitas, como: *Leishmania* (ROCHA *et al.*, 2019), *Plasmodium* e *Trypanosoma* (FACHEINA-MARTINS *et al.*, 2017). Além de apresentar atividade antioxidante, podendo ser útil na indústria agro-alimentar, farmacêutica e cosméticos (ELLEUCH *et al.*, 2018).

LIMA-JUNIOR (2016) descreve a atividade citotóxica de trinta e quatro adutos de MBH. Dentre estas, destaca o composto 2- (3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila (FIGURA 1), também chamada por CH₃ISACN. Este aduto possui um rendimento de 99% e é obtido em um curto tempo de reação (20-45 minutos) e se mostra como sólido marrom.

Testes *in vitro* com a CH₃ISACN em uma linhagem de células humanas leucêmicas (HL-60), mostraram que essa molécula apresentou uma Concentração Inibitória 50% (CI₅₀) de 7.8 μ M em HL-60 e com índice de seletividade de 14.4, sendo também indutora de apoptose (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2016). Portanto é uma

molécula promissora, e que é importante que sejam realizados outros estudos farmacológicos bem como toxicológico.

2.3- Avaliação Toxicológica

2.3.1 Ensaios *in silico*

Através de programas computacionais que abrangem diferentes áreas científicas, dentre elas a toxicologia, é possível prever variadas características de substâncias químicas. Os métodos de toxicologia *in silico* (TIS), são abordagens que permitem uma análise prévia da toxicidade de determinada substância, a partir de propriedades de compostos semelhantes. O estudo *in silico* é uma alternativa que apresenta vantagens como: menor tempo para sua realização, menor custo e não tem limitações quanto às questões éticas, como nos estudos *in vitro* e *in vivo* (RAIES, BAJIC 2016; IDAKWO *et al.*, 2018, MYAT *et al.*, 2018; PARTHASARATHI, DHAWAN., 2018).

Com a detecção precoce da toxicidade de uma substância por modelos *in silico*, as indústrias farmacêuticas tem investido em tais métodos para auxiliar no desenvolvimento de medicamentos. Tendo em vista que com essas abordagens computacionais previne-se os possíveis efeitos adversos, e minimiza as falhas tardias na produção de medicamentos (IDAKWO *et al.*, 2018; LOIODICE; COSTA; ATIENZAR., 2019). Ainda assim, o estudo *in silico* associado a outros estudos farmacológicos corrobora ainda mais para a descoberta de novos medicamentos, até mesmo em doenças agressivas como o câncer (CHINNASAMY; ARUMUGAM 2018).

Além da avaliação toxicológica, tais métodos ajudam no estudo farmacocinético, que é um dos principais fatores que ocasionam dificuldades no desenvolvimento de produtos farmacêuticos. Aproximadamente 50% dos candidatos à medicamentos apresentam problemas quanto a sua biodisponibilidade. Mas, por meio dos estudos *in silico*, essa adversidade tem sido amenizada, facilitando a produção de medicamentos de forma mais segura, eficaz e com maior redução de gastos (YANG *et al.*, 2018, GHALEB *et al.*, 2019).

Esses estudos também permitem o melhoramento de formulações que já estão em uso. Avaliando os parâmetros ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) a eficácia do medicamento pode ser otimizada (MODI; KULKARNI, 2018; VULOVIC *et al.*, 2018).

Para avaliação das propriedades farmacocinéticas de uma substância, pode-se usar a ferramenta *online* de previsão AdmetSAR. Esta calcula as propriedades físico-químicas e as relaciona com a farmacocinética do composto. Desta forma elucida quanto à absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade da substância em estudo no organismo humano. Eliminando os candidatos fracos à medicamento e facilitando assim o direcionamento do estudo (OGIDIGO *et al.*, 2018, GHALEB *et al.*, 2019; NAZ *et al.*, 2019).

Por meio deste programa é possível investigar se a molécula em estudo apresenta uma boa absorção no trato gastrointestinal quando administrada por via oral, e se esta tem a possibilidade de atravessar a barreira hematoencefálica, que é responsável por restringir a passagem da maioria dos compostos do sangue para o cérebro. Também é possível avaliar a distribuição da substância, se esta tem alto poder de ligação às proteínas plasmáticas, determinando assim sua biodisponibilidade, tendo em vista que quanto mais forte a ligação menor é a ação da droga, parâmetro este importante na determinação da dosagem da substância. O metabolismo da substância pode ser avaliado através de estudos da interação com enzimas microssomais conhecidas como citocromo P450 (CYP450), avaliando se esta é inibidora ou indutora enzimática. E o processo de depuração renal, excreção e avaliação toxicológica, que podem ser previstos computacionalmente (DHANALAKSHMI, MANIMEKALAI, MANAVALAN, 2018; NISHA *et al.*, 2016).

Também, durante a pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos, tem-se usado a “regra dos cinco” de Lipinski como parâmetro de avaliação no processo de triagem das substâncias promissoras. Por meio desta regra, programas computacionais como *Molinspiration*, consegue prever as características de absorção e permeabilidade do fármaco. Na qual acredita-se que uma substância provavelmente terá melhor biodisponibilidade se apresentar: peso molecular (MM) inferior ou igual a 500Da, número de doador de ligações de hidrogênio (nDLH) inferiores ou igual a 5, número de aceitador de ligações de hidrogênio (nALH)

inferiores ou igual a 10 e miLogP inferior ou igual a 5 (LIPINSKI *et al.*, 2001; MCKERROW; LIPINSKI, 2017).

2.3.2- Ensaios *in vivo*

Apesar das metodologias alternativas como os estudos *in vitro* estarem sendo cada vez mais reproduzidas, os métodos *in vivo* ainda são os mais utilizados. Pois apresentam a grande vantagem de fornecer informações sobre o organismo de uma forma geral, o que já não é possível com os outros métodos (LIMA *et al.*, 2014).

O uso de animais na pesquisa científica vem de longos séculos, há registros de que Hipócrates (450 a.C.) já fazia uso de animais como forma de ensino (SARAIVA *et al.*, 2016). Nas experimentações *in vivo*, os roedores são os principais animais de escolha por possuírem características fisiológicas, anatômicas e genéticas muito próximas às dos seres humanos (CARVALHO *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2014).

Tendo em vista que toda substância é potencialmente tóxica a depender de sua dose, são realizados testes toxicológicos para garantir a concentração segura do produto que pode ser consumido (FENALTI *et al.*, 2016). Por isso, é imprescindível que para o desenvolvimento de um medicamento sejam realizados estudos toxicológicos. E antes de passar para estudos clínicos, um candidato a medicamento tem que passar por estudos não clínicos, para avaliações da relação dose-exposição-toxicidade. Afim de garantir a segurança e a avaliação do risco/benefício da substância ao corpo humano (PRIOR *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2012).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é a responsável no Brasil pela regulamentação dos testes toxicológicos, que estão descritos no “Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos” (ANVISA, 2013). Além disso, tem-se a *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD), no qual apresenta diferentes diretrizes de testes toxicológicos, e é reconhecido mundialmente (BURGDORF *et al.*, 2019).

Existem diferentes tipos de testes toxicológicos não clínicos, como exemplo temos o teste de toxicidade oral aguda, que é uma etapa preliminar para avaliação da droga estudada (OECD 423/2001). É uma etapa posterior, é o teste de doses repetidas. Que permite a avaliação dos efeitos da substância estudada, em uma diversidade de alvos potenciais de toxicidade. Assim como permite o estudo dos prováveis riscos que aquela substância poderá causar, devido à exposição repetida por um período e tempo. Este estudo de toxicidade oral de doses repetidas, com duração de 28 dias em roedores é regulamentada pela OECD 407 (2008).

Os testes de toxicidade aguda permitem avaliar o potencial de toxicidade e letalidade de uma substância (SILVA *et al.*, 2019). De acordo com Anvisa (2013), os testes de toxicidade aguda: “são aqueles utilizados para avaliar a toxicidade produzida por uma substância teste quando esta é administrada em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas, seguido de observação dos animais por 14 dias após a administração”.

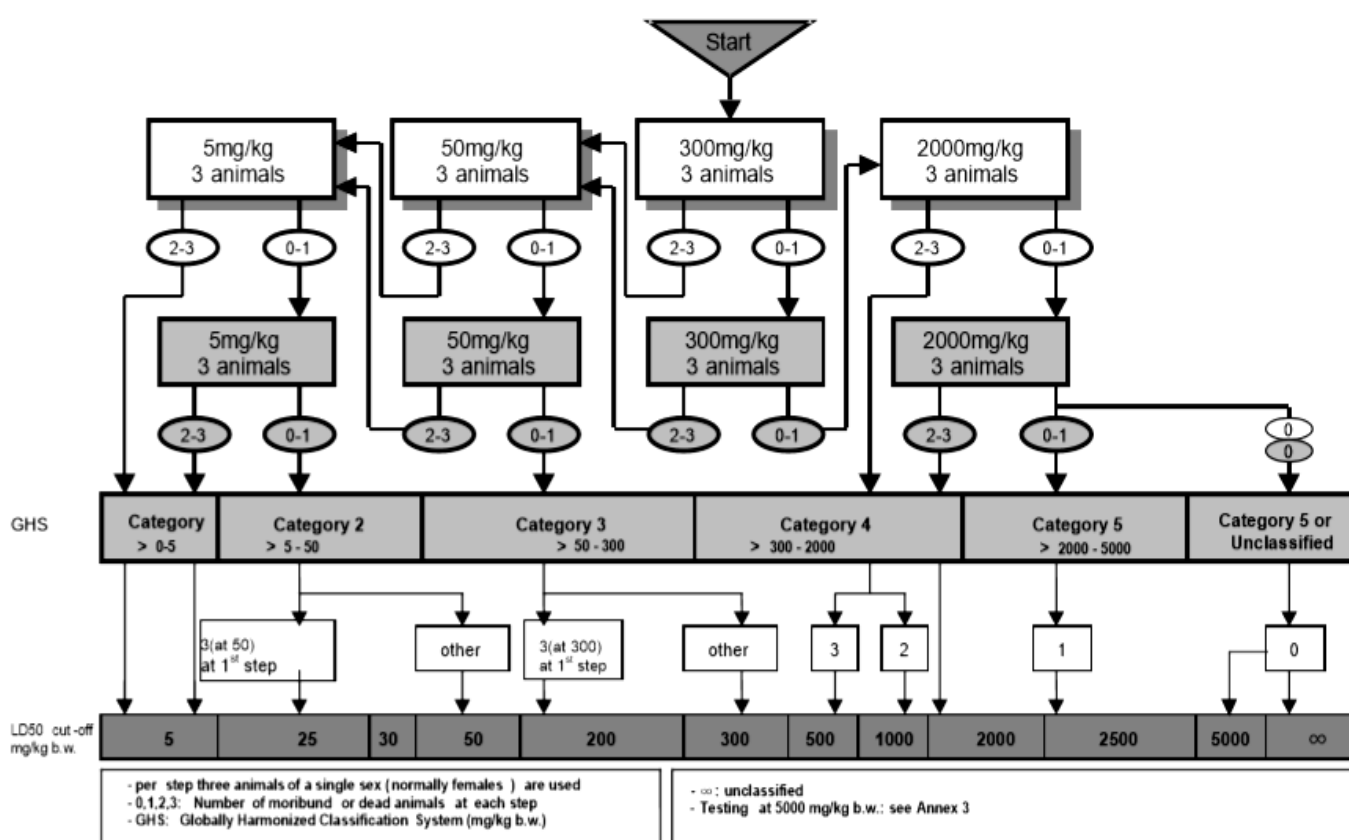
Em 1927 foi introduzido o teste da DL₅₀, que é para identificação da dose letal de uma substância que mata 50 % dos animais em um teste. Sendo usado como pré-requisito por várias agências reguladoras de medicamentos por muitos anos. Entretanto, devido a necessidade de se usar uma grande quantidade de animais para realização deste teste, este deixou de ser obrigatório (VALADARES, 2006). O guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos informa que o teste de DL₅₀ não é necessário, e oferece a utilização de métodos alternativos preconizados pela OECD para realizar uma estimativa da DL₅₀ (ANVISA, 2013).

Por meio do protocolo da OECD 423 (2001) é possível determinar faixas de exposição à substância nas quais a letalidade é esperada. O principal objetivo deste teste é a identificação ou não de mortes (KALAIMANI; MUSTAFA 2017). Além disso, a OECD 423 (2001) fornece uma tabela para classificação da GHS (*Globally Harmonised Classification System*) da substância teste.

A Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento (UNCED) desenvolveu vários critérios para um sistema globalmente harmonizado de classificação e rotulagem de produtos químicos (GHS). Neste manual estabelece categorias que vão de 1-5 indicando o grau de toxicidade de uma substância, a partir da estimativa de sua DL₅₀ em um teste de toxicidade aguda (UNCED, 2011).

A OECD 423 (2001) disponibiliza um fluxograma (Figura 8) no qual orienta o delineamento do teste. Sobre quantos animais usar, e se a dose estudada deve ser reduzida ou aumentada caso ocorra mortes ou não dos animais, e assim estima a DL_{50} e consequentemente a classificação GSH. Esta ainda relata que, para substâncias que não se teve nenhum estudo toxicológico recomenda-se iniciar o teste pela dose de 300mg/Kg.

Figura 8 – Procedimento de ensaio de toxicidade aguda com dose inicial de 300 mg/Kg.



Fonte: OECD 423 (2001).

Legenda: separa-se 3 ratas e administra-se a substância na dose de 300 mg/Kg. Se ocorrer 2 ou 3 mortes, administra-se uma menor dose (50 mg/Kg) em outros 3 animais. Já se não ocorrer nenhuma ou 1 morte, a dose (300 mg/Kg) é repetida em outros 3 animais. Se houver 1 ou 0 morte, administra-se a substância na dose 2000 mg/Kg em outros 3 animais. Havendo 2 ou 3 mortes, classifica-se a substância na categoria 4. Já, se houver 1 ou 0 morte, repete-se a dose em outros 3 animais e havendo 1 ou 0, a substância é classificada na categoria 5 da GSH, e provável DL_{50} de 2500 mg/Kg. Caso não ocorra nenhuma morte durante todo experimento, estima-se uma DL_{50} de 5000 mg/Kg.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antiplasmodial *in vitro* do composto CH₃ISACN, bem como sua toxicidade *in silico* e *in vivo*.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a capacidade de inibição do crescimento do *Plasmodium falciparum* (W2) *in vitro*.
- Estimar a CI₅₀ do composto CH₃ISACN, frente a cepa de *P. falciparum* *in vitro*.
- Avaliar a atividade hemolítica em eritrócitos humanos, induzida pela CH₃ISACN.
- Analisar as características farmacocinéticas e toxicológicas teóricas por meio de ensaios *in silico*.
- Realizar estudo toxicológico agudo em ratas *Wistar*, estimar a DL₅₀, e classificação na GSH.
- Executar uma triagem farmacológica comportamental, em ratas, além de mensurar o consumo de água, ração e evolução ponderal.
- Avaliar o efeito da amostra sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue de ratas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da Pesquisa

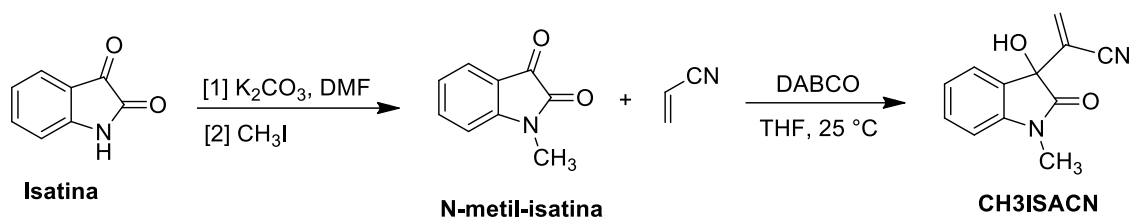
As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Ensaio Toxicológicos (LABETOX), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), coordenado pela Prof^a Dr^a Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz e pela Prof^a Dr^a Caliandra Maria Bezerra Luna Lima. Ainda, foram realizados experimentos no Laboratório de Biologia da Malária e Toxoplasmoses (LABMAT), da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), coordenado pelo Prof Dr. Valter Ferreira de Andrade Neto.

4.2 Materiais

4.2.1 Substância Teste

Foi utilizado o composto 2- (3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila (CH_3ISACN), que foi sintetizado e cedida pelo Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Paraíba (LASOM-PB), coordenada pelos professores Dr. Claudio Gabriel Lima Junior e Dr. Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos, do Departamento de Química da Universidade Federal da Paraíba.

Para a preparação de CH_3ISACN , duas etapas sintéticas foram realizadas (Figura 9). A primeira envolveu a metilação da isatina através de uma reação do tipo $\text{S}_{\text{N}}2$ usando K_2CO_3 como base e iodeto de metila como agente alquilante. Este produto foi obtido como sólido vermelho em rendimento de 98%. Posteriormente o intermediário N-metil-isatina foi submetido a reação de Morita-Baylis-Hillman usando acrilonitrila como aceptor de Michael e DABCO como catalisador, formando o aduto CH_3ISACN em rendimento de 95% após 90 minutos de reação (LIMA-JÚNIO *et al.*, 2016).

Figura 9 – Reação para preparação de CH₃ISACN

Fonte: Lima-JUNIOR *et al.*, 2016

4.2.2 Eritrócitos Humanos

Todos os eritrócitos humanos usados no presente estudo, foram provenientes de bolsas de descarte, obtidos na Unidade Transfusional do Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB. Na qual continham concentrado de hemácias dos tipos sanguíneos A+. A manipulação e o descarte dos eritrócitos seguiram as normas de segurança padronizadas pela referida unidade.

Para realização deste trabalho, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley, da Universidade Federal da Paraíba, com o referido número de aprovação n° 3.029.388 (ANEXO A).

4.2.3 Animais

Para o teste de toxicidade aguda foram utilizadas ratas *Wistar* (*Ratus norvegicus*), albinas, fêmeas (nulíparas e não grávidas), com idade entre 7-8 semanas, pesando entre 180 e 220 g, fornecidos pela Unidade de Produção Animal (UPA) do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), UFPB, Brasil.

Todos os animais foram agrupados em gaiolas de polietileno medindo 49X34X16cm contendo até 3 animais. Foram mantidos sob condições controladas de temperatura de 22 ± 3 °C, em ciclos de claro e escuro de 12 horas (6h00 as 18h00 claro e de 18h00 as 6h00 escuro) com livre acesso à água e a uma dieta controlada, a base de ração do tipo *pellets* durante todo o período de

experimentação, e sem uso de qualquer medicamento. Os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) da UFPB protocolo N° 1170270418 (Anexo B).

A eutanásia dos animais foi realizada por sobredose de solução anestésica contendo 300 mg/Kg de Cetamina e 30 mg/Kg de Xilasina, sendo administrado por via intraperitoneal (IP).

4.3 Métodos

4.3.1 Avaliação Antiplasmodial *in vitro*

4.3.1.1 Cultura de *Plasmodium falciparum*

Para os experimentos *in vitro* de atividade antimalárica, foi utilizado a cepa W2 (cepa cloroquina-resistente; mefloquina-sensível). Foi aplicado o método de Trager e Jensen (1976) para a cultura dos parasitas, com modificações descritas por Andrade-Neto *et al* (2007). Para o cultivo do *P. falciparum* manteve-se uma atmosfera com baixo nível de oxigênio (5% de oxigênio, 5% de dióxido de carbono e 90% de nitrogênio), temperatura a 37 °C, em eritrócitos do tipo A+, hematócrito de 3-5% e meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 0,5 % de Albumax I (Gibco). A cultura em fase de anel foi obtida por meio de dois tratamentos consecutivos, em intervalos de 48 horas, com uma solução de D-sorbitol a 5% (m/v) (Sigma-Aldrich), como foi descrito por Lambros and Vandenberg (1979). O seguinte método fundamenta-se no fato dos eritrócitos infectados com parasitos com mais de 20 horas de desenvolvimento intra-eritrocitário, apontam uma maior fragilidade osmótica, sendo lisados pelo D-sorbitol. A cultura é centrifugada a 1800 rpm/ 5 minutos e 5 mL de D-sorbitol a 5% são adicionados ao precipitado. Em seguida a cultura é incubada em banho maria a 37 °C por 5 minutos, e então esta é centrifugada e lavada com RPMI sem Albumax I. Sendo então levados em garrafas de cultura para estufa, e mantidos por 48 horas.

4.3.1.2 Atividade Antiplasmódica *in vitro*

Para este ensaio, foi preparada uma solução mãe da substância CH₃ISACN, dissolvida em DMSO a 1% (concentração final), obtendo uma concentração de 10mg/mL. A partir desta solução, seguiu-se uma diluição seriada de 1:2 (sete concentrações), variando de 50 µg/mL a 0,78 µg/mL em meio de cultura RPMI completo com Albumax I. Foi utilizado placa de 96 poços, na qual a cultura de *P. falciparum* com predominância de trofozoíto, com 4% de parasitemia e 1,5 % em formato de anel, foram tratados com o composto diluído previamente em diluição seriada como explicado acima. Posteriormente a microplaca foi incubada a 37°C, durante 48 horas, sob atmosfera com baixo nível de oxigênio. Como controle positivo foi usado a Cloroquina em concentração padrão de 2500µg/mL. Após as 48 horas de incubação foi realizado esfregaços sanguíneos foram corados com Panótico e lidos em microscópio óptico para determinação da CI₅₀. Os valores obtidos de CI₅₀ foram calculados usando o software Microcal Origin. A substância foi classificada de acordo com sua atividade sendo: alta atividade (CI₅₀ ≤ 10µg/ml); atividade moderada (10 <CI₅₀ <100µg/ml); e baixa atividade (CI₅₀> 100µg/ml) (MENEGUETTI, *et al* 2014). Os testes foram realizados em triplicata e repetidos em três experimentos independentes.

4.3.1.3 Ensaio de Hemólise

Para o estudo de hemólise foi aplicado o método de Rabelo *et al* (2012). No qual utilizado eritrócitos humanos em uma suspensão de 1% (v/v) de solução fisiológica a 0,9%. Foram incubados 100 µL desta suspensão adicionados à 100 µL da substância teste (CH₃ISACN). O composto foi testado em concentrações 10 e 50 vezes maior que seu CI₅₀ (triplicata), sendo 100 e 500 µM. Como controle positivo com 100% de hemólise, foi utilizado Triton X-100 1% (v/v), e para controle negativo foi utilizado solução salina 0,9%, garantindo 0% de hemólise. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 2 minutos, uma alíquota do sobrenadante foi transferida para a placa de 96 poços. Posteriormente a liberação de hemoglobina foi monitorada a partir da leitura da placa em espectrofotômetro

medindo a absorvância a 405 nm. O ensaio foi realizado em triplicata e a taxa de hemólise das amostras foi calculada como abaixo:

$$\% \text{ hemólise} = \frac{\text{Abs. amostra} - \text{Abs. controle negativo}}{\text{Abs. controle positivo} - \text{Abs. controle negativo}} \times 100$$

Onde: Abs.= Absorbância

4.3.2 Ensaio Toxicológicos *in silico*

4.3.2.1 Molinspiration

As propriedades moleculares foram calculadas, com base em descritores moleculares utilizando a regra dos cinco de Lipinski, no software *Molinspiration Online Property Calculation Toolkit* (www.molinspiration.com/). A investigação de Lipinski e colaboradores deu origem a chamada “regra dos 5”, que traçou um perfil para moléculas de fármacos dentro de limites de massa molar, lipofilia que é representada pelo coeficiente de partição, log P, e hidrofília, representada pelo número de doadores e receptores de ligação de hidrogênio. A regra dos cinco estabelece alguns parâmetros estruturais relevantes para a predição teórica do perfil de biodisponibilidade oral. Esta biodisponibilidade está associada à absorção e a permeabilidade de possíveis fármacos e depende de cinco parâmetros: (a) número de grupos aceptores de ligação hidrogênio (nALH) menor ou igual a 10; (b) número de grupos doadores de ligação hidrogênio (nDLH) menor ou igual a 5; (c) massa molecular (MM) menor ou igual a 500 g/mol; (d) coeficiente de partição octanol-água (milog P) menor ou igual a 5; (e) área de superfície polar (PSA) menor ou igual a 140 Å. Moléculas que não atendem mais do que um destes parâmetros podem ter problemas com a biodisponibilidade (SILVA, 2015).

4.3.2.2 AdmetSAR

Os parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos teóricos (ADMET – Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade) foram calculados com o objetivo de analisar se a substância possui as características essenciais para que possa ser considerada como possível fármaco. Alguns parâmetros relacionados à absorção, toxicidade e metabolização foram avaliados pela ferramenta admetSAR (<http://lmmd.ecust.edu.cn:8000/>) (SOUZA, 2015). Esses parâmetros são permeabilidade na barreira hematoencefálica, permeabilidade Caco-2, absorção no intestino, se são substratos e inibidores das enzimas do complexo citocromo e se são inibidores de transporte renal de cátions. Através desta ferramenta foi avaliada a metabolização utilizando algumas enzimas do complexo citocromo P450, comparando se os compostos são substratos para os citocromos CYP450 2D6, CYP450 3A4, CYP450 2C9, se são inibidores dos citocromos CYP450 1A2, CYP450 2C9, CYP450 2D6, CYP450 2C19, CYP450 3A4 assim como a promiscuidade de inibição dos citocromos.

4.3.3 Ensaio Toxicológico *In vivo*

4.3.3.1 Toxicidade Aguda

O teste de toxicidade oral aguda foi realizado segundo o Guia para a condução de Estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos (ANVISA, 2013) e segundo a OECD 423 (2001) com modificações. Os animais foram divididos em dois grupos: controle e tratado. O grupo controle recebeu por via oral apenas o veículo de diluição (DMSO a 10%). Já para o grupo tratado, foi administrado o derivado de isatina CH₃ISACN, sendo a dose de partida de 300 mg/kg com posterior repetição da dose. A não ocorrência de morte direcionou o experimento a prosseguir utilizando a dose de 2000 mg/kg, finalizando com uma nova repetição, seguindo assim o

fluxograma disponibilizado pela OECD (2001) (Figura 8). Para o grupo controle foram utilizados 6 animais e 3 ratas por grupo tratado.

Ao final dos 14 dias de avaliação, os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésicos (Cetamina: 300 mg/kg e Xilazina: 30 mg/kg), na intenção de amenizar o sofrimento dos mesmos. Logo após a eutanásia, o sangue dos animais foi coletado para a realização dos exames bioquímicos.

4.3.3.2 Avaliação Comportamental

A triagem farmacológica comportamental é uma metodologia preliminar que avalia o possível efeito de uma droga no SNC e SNA, na qual foram observados parâmetros comportamentais nos animais que possibilitam caracterizar o efeito central da substância (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006). Após a administração da CH₃ISACN, foi realizada a observação de parâmetros comportamentais através da triagem farmacológica nos intervalos: 30, 60, 120, 180 e 240 minutos, seguindo protocolo experimental elaborado pelo Setor de Psicofarmacologia do IPeFarM /UFPB.

4.3.3.3 Consumo de Água e Alimento

Neste experimento foi avaliado o consumo de água e de ração na forma de pellets pelos animais, durante todo experimento. Foram colocadas as mamadeiras graduadas com água e, no dia seguinte, registrou-se o volume de água ingerido pelos animais. Quanto ao consumo de alimentos, a ração foi colocada diariamente, nas gaiolas, no dia posterior, foi contabilizado o peso consumido de ração. Já a pesagem dos animais foi realizada no 1º dia (basal), no 7º e no 14º dia.

4.3.3.4 Avaliação Laboratorial do Sangue

Após jejum de 12 horas, as amostras de sangue foram recolhidas a partir do plexo braquial, sendo coletadas em tubos contendo ácido etilenodiamino tetracético

(EDTA) para determinação dos parâmetros hematológicos, e foram utilizados tubos com gel separador – Microtainer Becton Dickson® – posteriormente centrifugados por 10 minutos a 3500 rpm, para obtenção do soro para a determinação dos parâmetros bioquímicos.

4.3.3.4.1 Avaliação dos Parâmetros Hematológicos

Nas análises hematológicas foram realizados estudos da série vermelha (eritrograma), branca (leucograma) e contagem de plaquetas. No eritrograma houve a contagem de hemácias, determinação do hematócrito, da hemoglobina, do volume corpuscular médio (VCM), da concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), e da hemoglobina corpuscular média (HCM). No leucograma foi realizado a contagem global dos leucócitos e contagem da diferenciação celular. Para a realização do hemograma e contagem de plaquetas, foi utilizado o Analisador Hematológico celular automático de uso veterinário.

4.3.3.4.2 Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos

Através das amostras de soro foram realizadas as análises bioquímicas, que consistiram nas dosagens de: glicose, colesterol total, ureia, triglicerídeos, ácido úrico (pelo método enzimático), creatinina, transaminases Aspartato Amino Transferase (AST) e Alanina Amino Transferase (ALT), Gama Glutil Transferase (GGT), fosfatase alcalina (pelo método cinético) e proteínas totais (pelo método do biureto). Utilizando o analisador bioquímico automatizado CHEMWELL-T. O sódio, potássio, cálcio, magnésio e cloreto foram determinados pelo analisador de íons seletivos Electrolyte Analyzer AVLAB®.

4.4 Análise Estatística

Para análise estatística dos resultados, *in vitro* da atividade antiplasmódica, foi utilizado interpolação linear com análises probabilísticas qui quadrado (χ^2), através do programa Microcal Origin® versão 5.0. Para os demais estudos *in vitro* e *in vivo*, a análise estatística dos dados foi realizada através do programa GraphPad Prism, versão 6.0. Inicialmente foi avaliado a distribuição dos dados, através do Teste de Kolmogorov-Smirnov, afim de definir a adequação do uso de testes paramétricos ou não-paramétricos.

Os dados que obedeceram ao critério de distribuição de normalidade foram analisados por Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo teste post-hoc de Dunnett. Já os dados que não atenderam ao critério de normalidade foram analisados pelo Teste Não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido também pelo teste post-hoc de Dunnett. Foi considerado como significativo os testes que apresentaram nível de significância menor que 5% ($p\text{-valor} < 0,05$). Ressalta-se ainda que os resultados foram expressos em média e erro padrão (e.p.m.) ou desvio padrão da média.

5. RESULTADOS

5.1 Estudo Antiparasitário *in vitro*

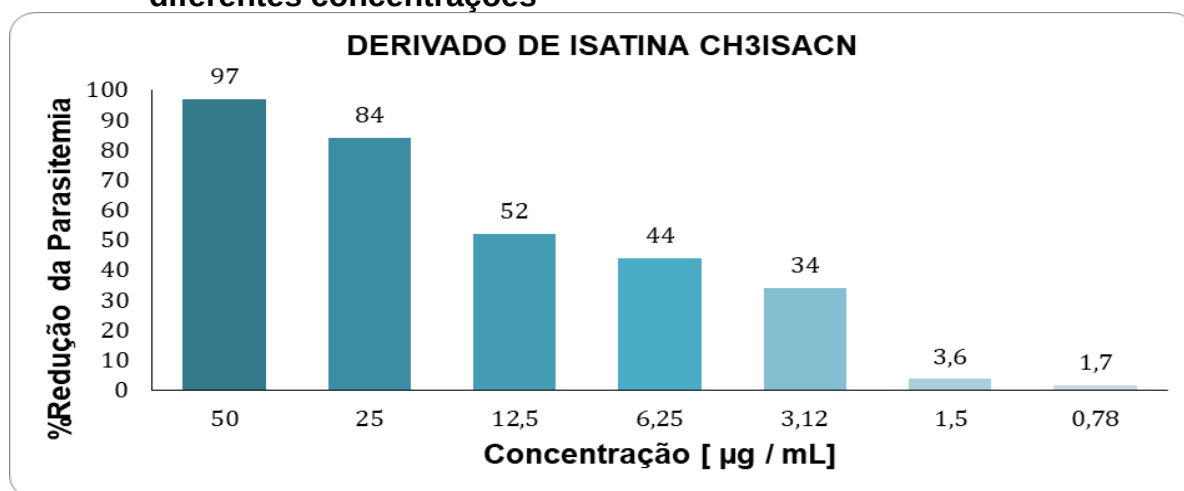
5.1.2 Atividade Antiplasmódica *in vitro*

A cepa de *Plasmodium falciparum* utilizada nos testes foi a W2 (cepa cloroquina-resistente; mefloquina-sensível). A cloroquina foi testada em paralelo como antimalárico de referência. Os valores obtidos são média de triplicatas.

Foi realizado a leitura das lâminas e quantificado a porcentagem de parasitemia inibida pela substância. Desta forma identificou-se que quanto maior a concentração da substância CH₃ISACN, maior é a sua capacidade em inibir a replicação do *Plasmodium falciparum* (W2) nos eritrócitos humanos (Gráfico 1).

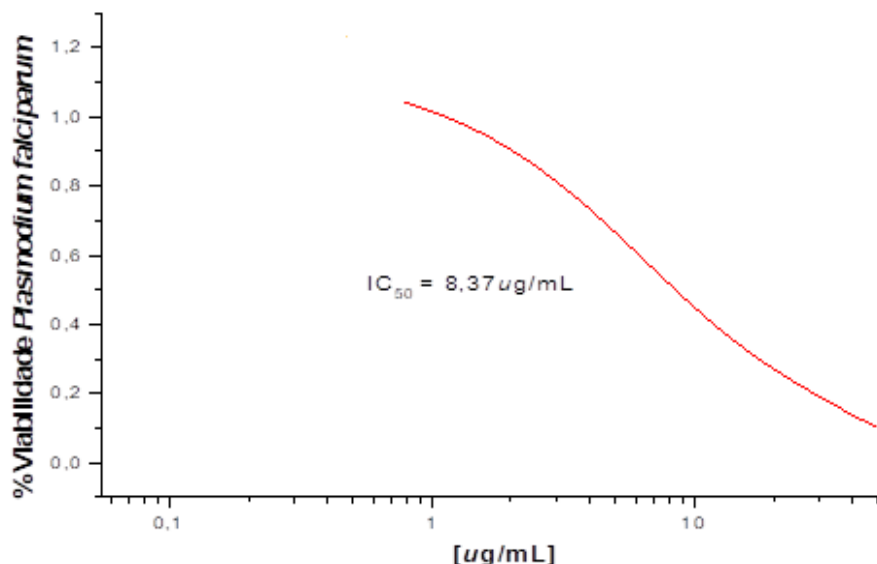
Além disto, estimou-se que o derivado de isatina testado, é ativo contra o parasito, com uma CI₅₀ = 8,37 µg/mL (Gráfico 2)

Gráfico 1 - Avaliação da inibição do crescimento do *Plasmodium falciparum* (W2) *in vitro* após 48h de incubação com o composto CH₃ISACN em diferentes concentrações



Fonte: Dados da autora, 2020.

Gráfico 2 - Determinação da CI_{50} do composto CH_3ISACN frente a cepa de *Plasmodium falciparum* *in vitro*, após 48 h de incubação. Cloroquina usada em paralelo como controle



Fonte: Dados da autora, 2020

Foi usado interpolação linear com análises probabilísticas qui quadrado (χ^2), através do programa Microcal Origin® versão 5.0.

5.1.3 Avaliação Hemolítica

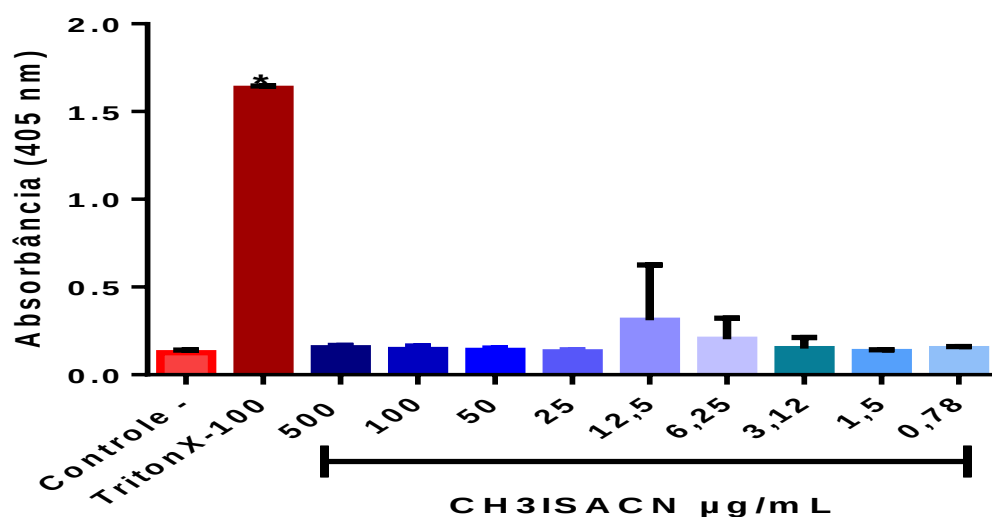
Para avaliação da citotoxicidade, a substância CH_3ISACN foi exposta em concentrações 10 e 50 vezes maiores que sua CI_{50} aos eritrócitos humanos. Assim como também foi avaliado nas mesmas concentrações da atividade antiplasmodial (50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,5 e 0,78 $\mu g/mL$). Todas as diluições apresentaram baixa ação hemolítica (Tabela 1). Quando comparados com o grupo controle negativo, observou-se que a substância testada não causou hemólise significativa (Gráfico 3). Indicando assim uma baixa citotoxicidade e boa viabilidade celular.

Tabela 1 - Porcentagem de hemólise ocasionada pela substância CH₃ISACN (µg/ml) em eritrócitos humanos

Concentração µg/mL	Hemólise (%)
500	1,99 %
100	1,25 %
50	0,93 %
25	0,46 %
12,5	0,27 %
6,25	5,12 %
3,12	1,59 %
1,5	0,53 %
0,78	1,66 %

Fonte: Dados da autora, 2020.

Gráfico 3 - Avaliação hemolítica em eritrócitos humanos, induzida pela CH₃ISACN



Fonte: Dados da Autora, 2020

Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. Análise por ANOVA seguido por pós-teste de Dunnett, $p < 0,05$. (Legenda: * $p < 0,05$).

5.2 Estudos Toxicológicos

5.2.1 Ensaio *in vitro*

5.2.1.1 *Molinspiration*

As propriedades moleculares da substância CH₃ISACN, calculadas no software *Molinspiration*, estão representadas na Tabela 2.

A substância CH₃ISACN apresenta uma boa biodisponibilidade teórica oral, já que atende aos requisitos preconizados pela — Regra dos cinco de Lipinski. Na qual afirma que a substância ao atender 3 dos 4 parâmetros (miLogP, MM, nALH e nDLH) provavelmente terá uma boa biodisponibilidade quando administrado por via oral.

Tabela 2: Propriedades moleculares da substância CH₃ISACN calculadas no software *Molinspiration*.

SUBSTÂNCIA	miLogP	MM	nALH	nDLH	TPSA	nrotb
CH ₃ ISACN	0,94	214,22	4	1	64,33	1

Fonte: Dados da autora, 2020.

Legenda: miLogP – coeficiente de partição octanol/água; MM- peso molecular nALH – número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio; nDLH – número de grupos doadores de ligação de hidrogênio; TPSA – área superficial polar topológica; nrotb – número de bandas rotáveis.

5.2.1.2 AdmetSAR

O estudo farmacocinético da substância CH₃ISACN realizado no programa AdmetSAR, forneceu informações sobre seus possíveis locais de absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade (ADMET). Diante dos resultados apresentados na Tabela 3, a substância CH₃ISACN provavelmente é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, bem como pode sofrer absorção intestinal, e é permeável ao Caco-2. O composto CH₃ISACN também mostrou não ser substrato

da glicoproteína P e nem ser inibidor da mesma, bem como não interfere no transporte renal de cátions orgânicos.

A CH₃ISACN apresentou ter distribuição subcelular mitocondrial e quanto ao metabolismo, mostrou ser substrato apenas da enzima CYP450 3A4. Possivelmente é inibidor apenas da CYP450 1A2, não inibindo mais nenhuma enzima deste complexo, além disso apresenta baixa promiscuidade inibitória CYP.

No estudo de excreção e toxicidade, a CH₃ISACN mostrou ser inibidor fraco de HERG, não apresentou toxicidade pelo teste de AMES, não foi classificada como carcinogênica, não é biodegradável e foi classificada na categoria III de toxicidade oral aguda, com uma estimativa de DL₅₀ de 2.9260mol/Kg.

Tabela 3 - Propriedades de classificação ADMET, calculadas no software admetSAR, para a substância CH₃ISACN

Modelo	Resultado
Absorção	
Barreira Hematoencefálica	BH+
Absorção Intestinal Humana	AIH+
Permeabilidade ao Caco2	Caco2+
Substrato da glicoproteína P	NS
Inibidor da Glicoproteína P	NI
Transporte Renal de Cátions Orgânicos	NI
Distribuição	
Localização Subcelular	Mitocôndria
Metabolismo	
Substrato CYP450 2C9	NS
Substrato CYP450 2D6	NS
Substrato CYP450 3A4	S
Inibidor CYP450 1A2	I
Inibidor CYP450 2C9	NI
Inibidor CYP450 2D6	NI
Inibidor CYP450 2C19	NI
Inibidor CYP450 3A4	NI
Promiscuidade Inibitória do CYP	Baixa
Excreção e Toxicidade	
HERG	Inibidor fraco
Toxicidade no teste de AMES	NT
Carcinogênico	NC
Biodegradação	NB
Toxicidade Oral Aguda	III
Perfil ADMET previsto-regressão	
Solubilidade Aquosa	-2,7579 LogS
Toxicidade Aguda em Ratos	2.9260 DL ₅₀ , mol/Kg

Fonte: Dados da autora, 2020.

Legenda: NI – não inibe; NS – não substrato; S – substrato; I – inibe; NT – não tóxico; NC – não carcinogênico; HERG- gene relacionado a éter-a-go-go humano

5.2.2 Ensaio Toxicológico *in vivo* Não-Clínico Agudo

5.2.2.1 Avaliação Comportamental

Após a administração da substância CH₃ISACN por via oral na dose de 300mg/Kg, bem como na dose de 2000mg/Kg, foi realizada uma avaliação comportamental dos animais a cada 30, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos. Em ambos os grupos não foi notado nenhum tipo de alteração no comportamento dos animais em estudo. Não sendo evidenciados sinais depressores ou estimulantes do Sistema Nervoso Central (SNC), bem como não foi demonstrado nenhum sinal relacionado à alteração no Sistema Nervoso Autônomo (SNA). Além disto, não houveram mortes, sendo a substância classificada com uma DL₅₀ de 5000 mg/Kg de acordo com a OECD 423 (2001) (Figura 8).

5.2.2.2 Controle de Água, Ração e Evolução ponderal

Durante o período de experimentação, os animais tratados com CH₃ISACN não tiveram nenhuma alteração estatisticamente significativa no consumo de água (Tabela 4). Já quanto ao consumo de ração, foi demonstrado que o grupo tratado 1 (300 mg/Kg), apresentou um aumento estatisticamente significativo do consumo de ração quando comparado ao do grupo controle (Gráfico 4). Já o grupo tratado 2 (2000 mg/Kg), teve uma diminuição estatisticamente significativa quando comparado ao consumo de ração do grupo 1, mas não teve alteração significativa quando comparada ao grupo controle (Gráfico 4).

No estudo da evolução ponderal, foi observado que não houve alteração desta na primeira semana do estudo (Tabela 5). Já na segunda semana de estudo, as ratas tratadas do grupo 1 apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa no peso corporal quando comparado ao do grupo controle (Gráfico 5). Já o grupo 2, também na segunda semana, apresentou um aumento significativo do peso corporal quando comparado ao grupo 1, mas não mostrou alteração significativa da evolução ponderal quando comparado ao grupo controle (Gráfico 5).

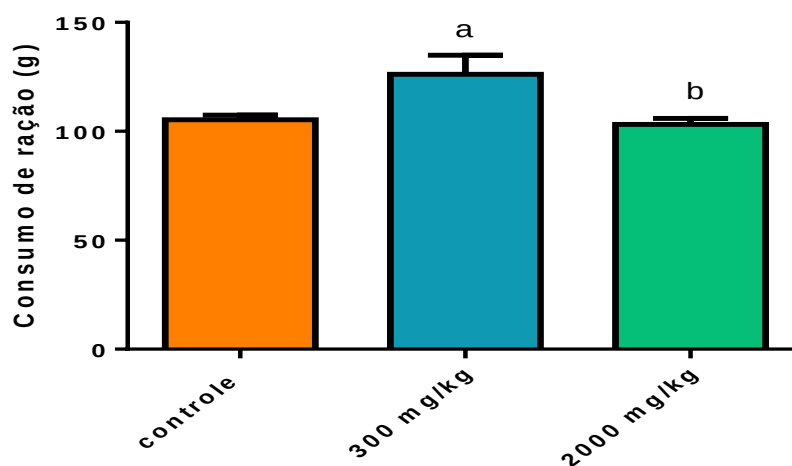
Tabela 4- Avaliação do consumo de água e ração de ratas *Wistar* tratadas com CH₃ISACN nas doses de 300 mg/Kg e 2000 mg/Kg.

		Controle	300mg/dL (Grupo 1)	2000 mg/dL (Grupo 2)
Consumo de	Água (mL)	200,0 ± 9,5	195,5 ± 7,6	199,4 ± 11,8
Consumo de	Ração (g)	105,3 ± 2,1	126,2 ± 8,7 ^a	103,2 ± 2,76 ^b

Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média. Análise por Kruskal-Wallis, seguido também pelo teste post-hoc de Dunnett.

Legenda: ^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle; ^b $p < 0,05$ comparado com grupo G1-300 mg/kg

Gráfico 4- Consumo de ração de ratas *Wistar* tratadas com a substância CH₃ISACN.



Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. Análise por Kruskal-Wallis, seguido também pelo teste post-hoc de Dunnett.

Legenda: ^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle; ^b $p < 0,05$ comparado com grupo G1-300 mg/kg

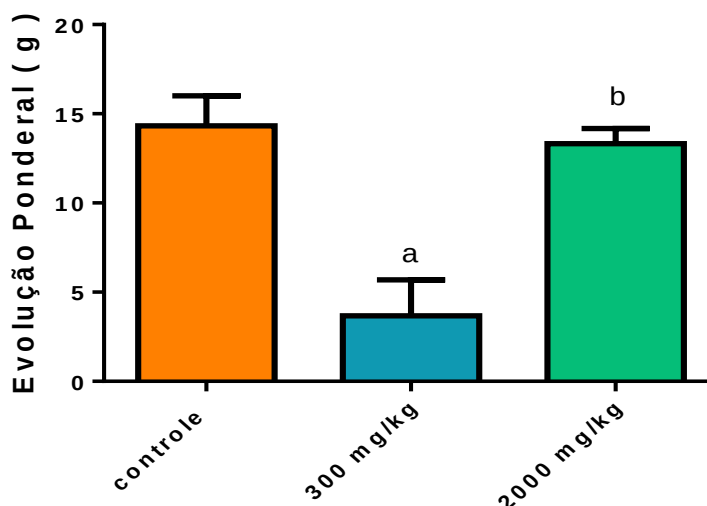
Tabela 5- Avaliação da evolução ponderal de ratas *Wistar* tratadas com CH₃ISACN nas doses de 300 mg/Kg e 2000 mg/Kg.

	Controle	300 mg/Kg (Grupo 1)	2000 mg/Kg (Grupo 2)
Evolução ponderal (1º semana)	15,3 ± 1,3	11,7 ± 2,9	14,3 ± 1,5
Evolução ponderal (2º semana)	14,3 ± 1,7	3,7 ± 2,0 ^a	13,3 ± 0,8 ^b

Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média. Análise por Kruskal-Wallis, seguido também pelo teste post-hoc de Dunnett.

Legenda: ^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle; ^b $p < 0,05$ comparado com grupo G1-300 mg/kg

Gráfico 5- Avaliação ponderal das ratas *Wistar* na segunda semana após a administração da substância CH₃ISACN.



Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. Análise por Kruskal-Wallis, seguido também pelo teste post-hoc de Dunnett.

Legenda: ^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle; ^b $p < 0,05$ comparado com grupo G1-300 mg/kg)

5.2.2.3- Avaliação Bioquímica

Ao fim do experimento, o sangue periférico das ratas *Wistar* foi coletado, e realizada sua avaliação bioquímica, estando os resultados expressos na Tabela 6. De todos os parâmetros investigados, apenas a concentração de ureia do grupo tratado 2, apresentou uma diminuição estatisticamente significativa quando comparada ao do grupo controle (Tabela 6) e (Gráfico 6).

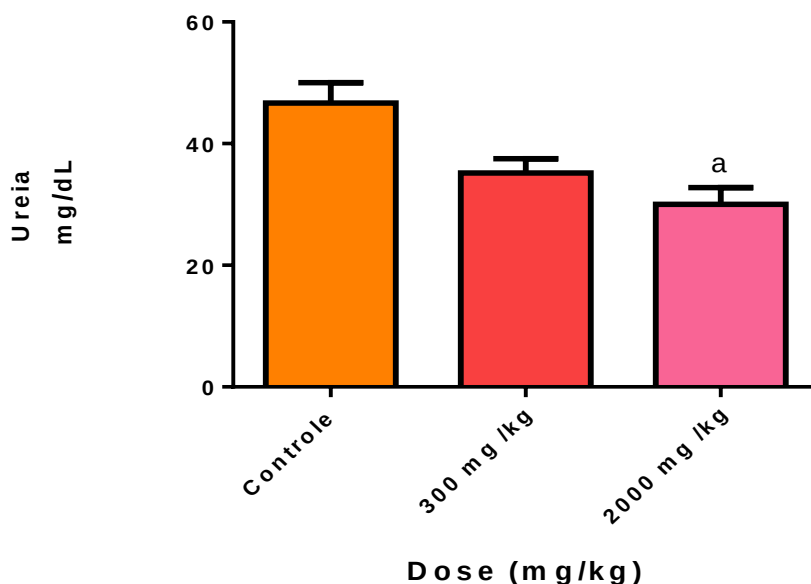
Tabela 6- Avaliação bioquímica do sangue periférico das ratas *Wistar* tratadas com CH₃ISACN, nas doses de 300 mg/Kg e 2000 mg/Kg.

	Controle	300 mg/Kg (Grupo 1)	2000 mg/Kg (Grupo 2)
Glicemia (mg/dL)	219,3 ± 12,2	201,2 ± 19,2	216,2 ± 36,0
Ureia (mg/dL)	46,7 ± 3,3	35,2 ± 2,36	30,00 ± 2,8 ^a
Creatinina (mg/dL)	0,6 ± 0,01	0,6 ± 0,01	0,6 ± 0,0
Triglicerídeos (mg/dL)	36,3 ± 6,9	65,2 ± 11,2	36,8 ± 7,4
Colesterol (mg/dL)	77,5 ± 3,7	66,3 ± 5,4	80,3 ± 7,8
Magnésio (mg/dL)	3,4 ± 0,1	3,9 ± 0,2	4,2 ± 0,4
Albumina (mg/dL)	2,8 ± 0,1	3,2 ± 0,2	2,7 ± 0,1
Proteínas mg/dL	6,2 ± 0,04	6,43 ± 0,1	6,00 ± 0,1
Fosfatase Alcalina (mg/dL)	147,0 ± 13,5	201,0 ± 23,5	188,2 ± 14,1
ALT U/L	42,8 ± 2,9	56,8 ± 5,2	45,0 ± 5,3
AST U/L	119,8 ± 8,4	125,5 ± 8,9	100,3 ± 8,2
Ácido Úrico (mg/dL)	2,6 ± 0,1	3,5 ± 0,6	3,3 ± 0,7
Cálcio (mg/dL)	11,6 ± 0,2	12,5 ± 0,4	12,6 ± 0,9
Fósforo (mg/dL)	8,8 ± 0,3	10,6 ± 0,4	9,7 ± 0,9
LDH (mg/dL)	1665 ± 84,8	2261 ± 207,5	2276 ± 355,6

Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média. Análise por Kruskal-Wallis, seguido também pelo teste post-hoc de Dunnett.

Legenda: ^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle

Gráfico 6- Concentração de ureia no sangue periférico das ratas *Wistar* tratadas com a substância CH₃ISACN.



Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Análise por Kruskal-Wallis, seguido também pelo teste post-hoc de Dunnett.

Legenda: ^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle

5.2.2.4- Avaliação Hematológica

Além da avaliação bioquímica, também foram analisados parâmetros hematológicos do sangue periférico das ratas *Wistar*. Sendo estudado as séries: vermelha, branca e plaquetária, estando os resultados expressos na Tabela 7. Não foi encontrado nenhuma alteração estatisticamente significativa nos parâmetros da série vermelha. Já na análise da série branca, foi identificado apenas um aumento estatisticamente significativo na concentração dos leucócitos totais do grupo tratado 1, quando comparado ao grupo controle (Tabela 7) e (Gráfico 7), bem como um aumento no percentual de monócitos (Tabela 7) e (Gráfico 8).

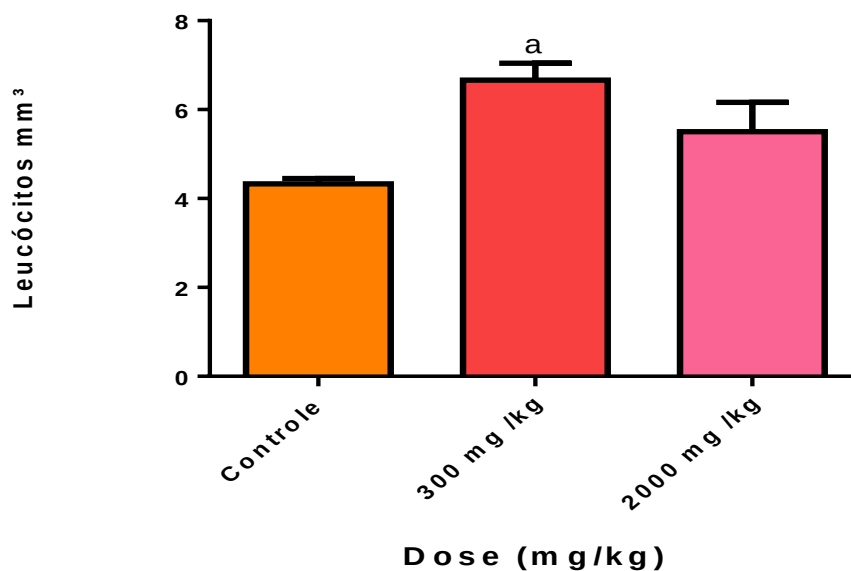
Tabela 7- Avaliação hematológica das ratas *Wistar* tratadas com CH₃ISACN, nas doses de 300 mg/Kg e 2000 mg/Kg.

	Controle	300 mg/Kg	2000 mg/Kg
Hemácias (10 ⁶ /mm ³)	7,6 ± 0,1	7,5 ± 0,3	7,5 ± 0,2
Hemoglobina (g/dL)	14,5 ± 0,1	14,6 ± 0,4	14,2 ± 0,5
Hematócrito (%)	39,1 ± 0,1	39,4 ± 1,4	39,2 ± 1,3
VCM (mm ³)	52,0 ± 0,8	51,6 ± 1,6	52,1 ± 0,4
HCM (pg)	19,3 ± 0,4	19,4 ± 0,5	18,6 ± 0,2
CHCM (%)	37,1 ± 0,3	36,9 ± 0,5	36,1 ± 0,3
RDW	12,9 ± 0,1	13,7 ± 0,3	12,7 ± 0,3
Leucócitos Totais (mm ³)	4,3 ± 0,1	6,7 ± 0,4 ^a	5,5 ± 0,7
Neutrófilos (%)	17,0 ± 0,6	18,8 ± 1,8	20,8 ± 4,1
Eosinófilos (%)	0,8 ± 0,2	0,4 ± 0,24	0,3 ± 0,21
Linfócitos (%)	74,7 ± 2,4	66,8 ± 1,9	68,5 ± 5,10
Monócitos (%)	8,3 ± 1,8	14,3 ± 1,3 ^a	10,3 ± 1,52
PLA (mm ³)	1190 ± 75,7	1095 ± 81,6	1150 ± 148,4

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média. Análise por Kruskal-Wallis, seguido também pelo teste post-hoc de Dunnett.

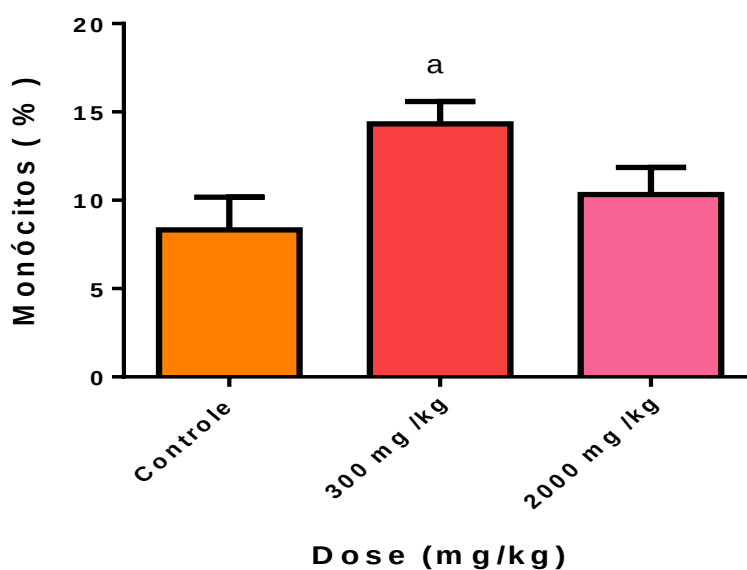
Legenda: ^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle.

Gráfico 7- Concentração dos leucócitos totais no sangue periférico das ratas *Wistar* tratadas com a substância CH₃ISACN.



Nota: Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Análise por Kruskal-Wallis, seguido também pelo teste post-hoc de Dunnett.
 Legenda: ^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle).

Gráfico 8- Concentração dos monócitos no sangue periférico das ratas *Wistar* tratadas com a substância CH₃ISACN.



Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Análise por Kruskal-Wallis, seguido também pelo teste post-hoc de Dunnett.
 Legenda: ^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle.

6. DISCUSSÃO

A substância do presente estudo CH₃ISACN, na qual apresenta o núcleo indol, por meio do estudo *in vitro* mostrou ser capaz de reduzir a parasitemia do *Plasmodium falciparum* (W2) nos eritrócitos humanos. Além disso apresentou uma $CI_{50} = 8,37 \text{ ug/mL}$, sendo classificada com alta atividade antiplasmódica (MENEGUETTI, *et al* 2014). É possível que o mecanismo pelo qual a substância CH₃ISACN atue como antimalárica, esteja relacionado com o seu núcleo indol. Tendo em vista a diversidade de derivados indol atuarem na redução da parasitemia.

Comparando com outros estudos, diversas substâncias com o núcleo indol apresentam potencial antimalárico (SANTOS *et al.*, 2015). O autor Lunga *et al* (2018), destaca dois compostos com núcleo indol que apresentaram uma $CI_{50} < 1 \text{ }\mu\text{M}$: 1- (5-cloro-1H-indol-3-il) -2 - [(4-cya -nofenil) tio] etanona e 1- (5-cloro-1H-indol-3-il) -2 - [(4-nitrofenil) tio] etanona. Estes exibiram atividade potente contra a cepa 3D7, semelhante à da cloroquina, e com ausência de citotoxicidade e hemólise. Schuck *et al* (2014) avaliou uma série de compostos com núcleo indol, e identificou 3 que foram capazes de inibir o crescimento de *P. falciparum* com CI_{50} na ordem de grandeza de micromolar, sendo estes: N- (2- (5-metoxi-1H-indol-3-il) etil) butanamida ($IC_{50} = 19,17 \text{ }\mu\text{M}$), N- [2- (5-metoxi-1H-indol-3-il) etil] hexanamida ($CI_{50} = 19,10 \text{ }\mu\text{M}$) e N- [2- (5-metoxi-1H-indol-3-il) etil] benzamida ($IC_{50} = 2,93 \text{ }\mu\text{M}$), valores bastante promissores.

Os parasitas usam cascatas de sinalização para controlar diversas funções celulares. Então qualquer alteração nas vias de sinalização, podem ocasionar disfunções no parasita e até mesmo levá-lo a morte. Sendo assim, foi visto que a melatonina que também é um derivado indol possui papel fundamental no controle da replicação do *Plasmodium falciparum*, e assim, o estabelecimento da parasitemia (MPHAHLELE *et al.*, 2017). Ela é responsável por desencadear a formação de inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) (PECENIN *et al.*, 2018), ativação de protease e ativar genes do sistema de ubiquitina proteassoma (UPS). Além de modular o fator de transcrição do *P. falciparum*, o Pf NF-YB (SCHUCK., *et al* 2014; DARYANI *et al.*, 2018). Desta forma, é interessante que seja investigado se a CH₃ISACN é capaz de

interferir no mecanismo de ação da melatonina no *P. falciparum*, já que ambas as substâncias são derivadas do mesmo núcleo.

Tendo em vista que a substância CH₃ISACN apresentou uma boa atividade antimalárica, reduzindo a parasitemia do *P. falciparum* (W2) nos eritrócitos, necessitou-se averiguar se isto ocorria por ação ao parasita ou por causar destruição das hemácias (já que o parasita vive intracelularmente). Sendo assim, foi realizado o ensaio de hemólise para verificar se o composto era capaz de causar citotoxicidade. Por meio deste teste, foi possível avaliar a capacidade da substância em causar ruptura dos eritrócitos e assim liberar hemoglobina. Esta que é a mais abundante e a principal proteína dos eritrócitos, desempenhando suas principais funções fisiológicas (ZHAO *et al.*, 2017).

A hemoglobina ao ser liberada no plasma leva a sérios danos em órgãos vitais como rins, coração e fígado. Logo, o teste de hemólise é um método de grande importância por avaliar se a substância ao ser administrada não vai ocasionar outros problemas como, anemia hemolítica (DINESH *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2016). Como também é importante para identificar se esta causa viabilidade celular.

Desta forma, a substância CH₃ISACN quando incubada com eritrócitos humanos em concentrações 10 e 50 vezes maiores que seu CI₅₀, não causou hemólise significativa, bem como em nenhuma das outras concentrações testadas para a atividade antiplasmodica. Indicando assim que o derivado de isatina (CH₃ISACN), é um composto que apresenta baixa atividade hemolítica. Já que em suas diferentes concentrações causou hemólise baixa/moderada aos eritrócitos, não provocando nem 10% de hemólise nas maiores concentrações testadas. Quando comparada com o grupo controle negativo, CH₃ISACN não causou hemólise significativa. Indicando assim uma baixa citotoxicidade e boa viabilidade celular. O fato da substância em estudo não causar citotoxicidade, é de extrema relevância, pois os eritrócitos desempenham vital importância no transporte de oxigênio no corpo, atendendo assim as necessidades metabólicas para manutenção da vida (HOSSAIN *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2017). Portanto, sugere-se que sua atividade antimalárica tenha como alvo o parasita *P. falciparum* e não a lise dos eritrócitos como causa da redução da parasitemia eritrocitária.

Apesar dos testes *in vitro* estarem ganhando aceitação como método alternativo (LORET *et al.*, 2018; NAVEGANTES *et al.*, 2016), é necessário que sejam realizados testes *in vivo* para maior garantia do uso de uma substância. Já que esta pode sofrer diversos processos biológicos em um corpo vivo. Como passar pelo processo de metabolismo de primeira passagem no fígado (principal local de metabolização), assim como também no intestino (JONES *et al.*, 2016; RAJE *et al.*, 2018). E a substância assim sofrer modificações estruturais por enzimas, que podem ativar a substância ou causar sua depuração (SOO *et al.*, 2018). Processos como a biodisponibilidade, a toxicidade e a eficácia de um fármaco, são alterados devido reações enzimáticas (YU *et al.*, 2018). Além disso, outros tipos de interferências podem acontecer com a substância, como sofrer ação das bombas de efluxo, envolvida em processos de modulação da absorção e distribuição, provocando diminuição do nível plasmático da substância, e consequentemente diminuindo sua atividade (CALADO *et al.*, 2014; REIS *et al.*, 2015).

Portanto, para maior garantia da CH₃ISACN como antimalárica, sugere-se que seja realizada uma avaliação desta atividade *in vivo*, como o teste supressor de Peters (PETERS, 1965). No qual poderá ser avaliado em roedores infectados pelo *Plasmodium*, se quando tratados pela CH₃ISACN ocorrerá uma diminuição da parasitemia e se os resultados irão corroborar com os estudos *in vitro*.

Antes que um medicamento em potencial seja administrado ao ser humano, é exigido que este seja testado em animais. Tal procedimento é uma exigência regulatória global, afim de garantir a segurança e a avaliação do risco/benefício da substância ao corpo humano (PRIOR *et al.*, 2018). Desta forma, estudos não clínicos usando espécies roedoras ou não roedoras são realizados antes de ir para fase clínica.

Por meio de ferramentas computacionais, denominadas *in silico*, é possível estimar as prováveis atividades biológicas de uma determinada substância, bem como suas características moleculares. Desta forma, o estudo *in silico* é uma maneira de otimizar a pesquisa de novos fármacos, servindo para direcionar os estudos seguintes (MOHAMED *et al.*, 2016; YOUSEF *et al.*, 2018).

A avaliação da relação dos fatores farmacocinéticos e físico-químicos são importantes, pois apontam que uma molécula terá alto potencial farmacológico, se esta assemelhar-se aos fármacos existentes, fenômeno conhecido como

semelhança medicamentosa (SOUZA *et al.*, 2019). Assim, essas avaliações podem ser comparadas com padrões determinados pela “Regra dos cinco” de Lipinski, que preconiza peso molecular (MM) inferior ou igual a 500Da, número de doador de ligações de hidrogênio (nDLH) inferiores ou igual a 5, número de aceitador de ligações de hidrogênio (nALH) inferiores ou igual a 10 e miLogP inferior ou igual a 5 (LIPINSKI *et al.*, 2001; DIRAR *et al.*, 2016; ARYA *et al.*, 2019). Utilizando o programa *Molinspiration*, observou-se que a substância CH₃ISACN, apresenta uma boa biodisponibilidade teórica quando administrado por via oral, já que esta não violou nenhum parâmetro da “Regra dos cinco” de Lipinski.

Os parâmetros avaliados estão relacionados com a hidrofobicidade, tamanho, flexibilidade, distribuição eletrônica e características de ligação de hidrogênio da molécula. Que influenciam seu comportamento em um organismo vivo, bem como sua biodisponibilidade, toxicidade, propriedades de transporte, afinidade para proteínas, reatividade, estabilidade metabólica, entre outros (TARIQ *et al.*, 2016).

O miLogP é o logaritmo do seu coeficiente de partição entre octanol e água, que avalia a hidrofobicidade de uma molécula, no qual sendo <5 indica uma probabilidade de ser bem absorvido (ESCOBEDO-GONZÁLEZ *et al.*, 2017). Na tabela 2 observa-se que CH₃ISACN tem um Log P <5, mostrando que esta substância apresenta uma boa taxa de permeabilidade pelas membranas celulares, sendo assim, bem absorvido e conseqüentemente com uma boa biodisponibilidade. Além disso, possivelmente é uma molécula com baixa toxicidade, tendo em vista que substâncias com alto Log P geralmente são considerados de natureza tóxica (MISHRA *et al.*, 2018).

Um dos fatores para avaliação quanto à permeabilidade de uma substância, é o seu peso molecular (MM) e tamanho, que quanto maior, menor é a capacidade de atravessar as membranas plasmáticas, e conseqüentemente menor sua biodisponibilidade (POONGAVANAM; DOAK; KIHLEBERG, 2019). A substância CH₃ISACN, tem MM igual a 214,22 enquadrando-se à “regra dos cinco” de Lipinski.

Um outro parâmetro que avalia a biodisponibilidade de um fármaco, é a área de superfície polar topológica (TPSA). Esta corresponde a um descritor que está correlacionado com o transporte molecular passivo entre as membranas celulares. Ao se ter um valor menor ou igual a 140 Å² indica que a molécula apresenta uma boa absorção intestinal e penetração pela barreira hematoencefálica. Quanto mais

lipofílica a substância, maior vai ser sua capacidade de atravessar as membranas celulares, tendo em vista a composição fosfolipídica destas (BARBOSA JÚNIOR; BAPTISTA; BARBOSA, 2015; CHIEN *et al.*, 2017). A substância CH₃ISACN, apresentou um TPSA < 140 Å, reafirmando sua boa biodisponibilidade oral, já indicada pelos resultados dos parâmetros anteriores.

Outros critérios analisados correspondem a flexibilidade do composto CH₃ISACN, que apresentou nALH igual a 4 e o nDLH igual a 1, se enquadrando a regra de Lipinski. Esses fatores também indicam sobre a adaptabilidade do ligante ao seu alvo. Assim, tendo uma boa interação com seu alvo, a substância pode de fato exercer sua ação (JAMUNA *et al.*, 2018).

Ainda quanto a flexibilidade de uma molécula, esta pode ser avaliada quanto ao número de bandas rotáveis (nrotb) ou seja, quanto maior o número de ligações simples, mais flexível é a molécula (MISHRA *et al.*, 2018). Uma boa biodisponibilidade é mais provável para compostos com ≤10 ligações rotativas e TPSA de ≤ 140 Å (PARAMASHIVAM *et al.*, 2015). Sendo assim, a molécula em estudo apresentou TPSA igual 64,33 Å, e nrotb igual a 1, indicando alta probabilidade de ter uma boa biodisponibilidade oral.

Ao se estudar um composto como possível fármaco, não é suficiente que sejam identificados apenas sua alta atividade biológica e baixa toxicidade. Pois também é necessário que a substância atenda aos parâmetros farmacocinéticos da ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção). Sendo importantes na determinação do acesso e da concentração do composto no alvo terapêutico seguido de sua eliminação pelo organismo (SOUZA *et al.*, 2019).

Com a ajuda do programa AdmetSAR, foi possível prever as características farmacocinéticas da molécula CH₃ISACN, como mostrado na tabela 3. Na qual pode ser visto que o derivado de N-metil-isatina, tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica. Sendo característica de moléculas lipofílicas e de baixo peso molecular (DE FALCO *et al.*, 2016; YOUSEF *et al.*, 2018).

A parede intestinal é revertida por uma camada celular epitelial, na qual forma uma barreira limitante da taxa de absorção de drogas. Dessa forma, utilizando modelos *in vitro* para reconstituição dessa camada epitelial, é possível prever a permeabilidade dos fármacos através de membranas do trato gastrointestinal (TGI) quando administrado por via oral (SILVA, 2018).

A linhagem celular epitelial de adenocarcinoma humano Caco-2, quando cultivadas em condições especiais, tem a capacidade de se diferenciar em enterócitos absorptivos com camada de borda em escova semelhante as do intestino delgado. Além de formar junções intercelulares e apresentar enzimas metabólicas presentes no epitélio intestinal. Assim, Caco-2 é uma das linhagens celulares epiteliais intestinais humanas mais bem estabelecidas, sendo considerada padrão ouro como modelo intestinal *in vitro* para estudos de novos fármacos (TAN *et al.*, 2018; YANG^b *et al.*, 2018). Através do programa AdmetSAR, previu-se que a molécula CH₃ISACN, é permeável às células Caco-2, indicando uma boa absorção intestinal quando administrada por via oral.

O derivado de N-metil-isatina, mostrou que provavelmente não é substrato da glicoproteína-P e sim seu inibidor. Esta característica é importante tendo em vista que a glicoproteína P são bombas de efluxos presentes na membrana celular responsáveis pela exportação de diferentes medicamentos, sendo responsável pela resistência a múltiplos fármacos. Ela é a principal proteína de resistência em muitas células cancerígenas (DYSON *et al.*, 2019). Assim, a substância sendo um inibidor dessa bomba de efluxo, maior é a perspectiva para que se tenha melhor efetividade na cura de doenças como câncer, doenças causadas por bactérias, vírus, parasitas, entre outros (TAIMOOR *et al.*, 2019).

Os transportadores renais de cátions orgânicos tem maior expressão na membrana basolateral de células epiteliais tubulares. Estes transportam cátions orgânicos presentes no sangue para as células epiteliais tubulares renais. Estando assim envolvidos na excreção de fármacos orgânicos e de seus metabólitos. Quando se tem alterações nesses transportadores, o balanço renal de cátions fica comprometido, podendo induzir toxicidade renal (ALBERTONI; SCHOR, 2015; SHI *et al.*, 2017). Para o modelo estudado observou-se que a molécula CH₃ISACN provavelmente não inibe os transportadores renais de cátion.

O sistema citocromo P450 (CYP450) é um conjunto de monooxigenases presente na membrana do retículo endoplasmático liso do fígado e em outros tecidos extra-hepáticos (GOLAN *et al.*, 2014). Da superfamília do sistema CYP450, as isoformas CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1 e CYP3A4 são responsáveis por cerca de 80% do metabolismo de fármacos (PANDIT *et al.*, 2017).

Um fármaco com biotransformação oxidativa mediada por CYP, tem maior capacidade de causar interações medicamentosas (YOUSEF *et al.*, 2018). Tendo em vista que, se administrado com outra substância que iniba esse conjunto de enzimas, o metabolismo do fármaco é interrompido, elevando seus níveis plasmáticos e alcançando concentrações tóxicas. Já, se estas enzimas sofrerem indução, há o aumento do metabolismo do fármaco, e este fica menos tempo no organismo, reduzindo suas concentrações abaixo de seus níveis terapêuticos ou aumentando a incidência de toxicidade através da produção de metabólitos reativos (AHMMED *et al.*, 2016; CLARIVET *et al.*, 2016; NELSON *et al.*, 2016).

A molécula em estudo mostrou não ser substrato da CYP450 2C9 e CYP450 2D6, mas é da CYP450 3A4. Sendo esta última responsável por metabolizar cerca de 50% de todos os fármacos utilizados atualmente (AHMMED *et al.*, 2016). Ainda, dentre as isoenzimas avaliadas, a molécula CH₃ISACN é capaz de inibir apenas a CYP450 1A2, e ainda foi classificada como tendo baixa promiscuidade inibitória do CYP.

Vários fármacos executam seus efeitos arritmogênicos através dos canais de potássio dependente de voltagem Kv11.1, que são codificados pelo gene relacionado com éter-a-go-go- humano (hERG). Essa proteína representa a subunidade α do canal iônico responsável pela corrente de potássio retificadora de retardo rápido (IKr). A corrente IKr é importante na fase 3 de repolarização do potencial de ação (ORVOS *et al.*, 2018). Assim, ao inibir o canal hERG, a repolarização do potencial de ação cardíaco é retardada, o que aumenta a duração do potencial de ação (DPA), induzindo portanto taquicardia (LAMOTHE *et al.*, 2016). Como visto na tabela 3, a substância em estudo mostrou ser um inibidor fraco desses genes, possivelmente não cause sérias interferências ao potencial de ação cardíaco.

A capacidade mutagênica de um composto, é um importante parâmetro a ser investigado, a fim de avaliar a segurança de seu uso. Para isto, o teste de AMES é um ensaio que identifica se determinada substância é capaz de causar substituição de pares de bases (CARNEIRO *et al.*, 2018). Sendo assim, o programa AdmetSAR, previu que a molécula em estudo, possivelmente ao passar pelo teste de AMES não terá potencial mutagênico. O programa também mostra que possivelmente o composto CH₃ISACN não tem capacidade de causar carcinogenicidade.

Testes que preveem a capacidade de biodegradação de um fármaco, é de grande importância nos estudos toxicológicos (TRIFUNOVIĆ *et al.*, 2016). Tendo em vista que compostos farmacológicos não biodegradáveis podem atingir negativamente estações de tratamento de água, causando toxicidade ao meio ambiente. (RIBEIRO *et al.*, 2016; MAIA *et al.*, 2017). De acordo com o programa AdmetSAR, provavelmente a substância CH₃ISACN não é biodegradável.

A solubilidade de um composto pode ser indicado por LogS. Estudos mostram que aproximadamente 85% dos fármacos possuem valores de LogS entre -1 e -5, configurando à molécula uma polaridade adequada para ser solubilizada em água, assim como um caráter lipofílico para passagem através das membranas celulares (CALDEIRA *et al.*, 2017). O derivado de N-metil-isatina apresentou um LogS igual a -2,7579, indicando assim uma possível boa absorção.

Quanto a toxicidade aguda oral teórica, esta foi baseada de acordo com a classificação da “*Environmental Protection Agency*” (EPA) dos Estados Unidos. No qual, estabelece que os compostos com $DL_{50} \leq 50$ mg/Kg são classificados na categoria I (altamente tóxico), aqueles com $DL_{50} > 50$ mg/Kg e ≤ 500 mg/Kg estão na categoria II (moderadamente tóxico), os que apresentam $DL_{50} > 500$ mg/Kg e ≤ 5000 mg/Kg são classificados da na categoria III (baixa toxicidade), e os que apresentam $DL_{50} > 5000$ mg/Kg se enquadram na categoria IV (praticamente atóxico) (LI *et al.*, 2014). Sendo assim, de acordo com o AdmetSAR, o composto CH₃ISACN tem uma toxicidade aguda oral teórica classificada na categoria III, pois apresentou uma DL_{50} de 2.9260 mol/Kg, indicando assim uma baixa toxicidade.

No teste de toxicidade aguda *in vivo* do composto CH₃ISACN, a dose inicial testada foi a de 300 mg/kg, já que na ausência de informações acerca da substância em estudo esta é a dose inicial preconizada pela OECD 423 (2001), a fim de garantir uma proteção aos animais. Ao ser administrada a substância CH₃ISACN, não foi observado efeitos de toxicidade nas primeiras 4 horas após administração, bem como, a substância não ocasionou morte aos animais, em nenhuma das doses tanto na de 300mg/Kg e 2000 mg/Kg. Portanto, a OECD 423 sugere que a CH₃ISACN apresenta uma DL_{50} de 5000 mg/Kg. Sendo classificada na categoria 5, de acordo com o “*Globally Harmonized Classification System*” (GHS) (OECD, 2001), indicando assim uma baixa toxicidade da CH₃ISACN. O estudo *in vivo* corroborou com o

estudo *in silico*, no qual previa uma DL_{50} entre 500-5000 mg/Kg pela classificação da “*Enviromental Protection Agency*” (EPA).

Alterações comportamentais do animal, bem como diminuição do seu consumo de água, ração, e redução do seu peso corporal, são parâmetros que indicam toxicidade de uma substância no animal (LEMOS *et al.*, 2015). Entretanto, estudos mostram que alterações no peso corporal também pode estar relacionado a adaptação fisiológica normal do animal à substância administrada (WISMANDANU *et al.*, 2016).

Na avaliação do consumo de ração dos animais, foi observado um maior consumo de ração pelo grupo de 300 mg/Kg, possivelmente ocorreu por fatores externos. Já que os animais do grupo de 2000 mg/Kg não apresentaram alterações significativas no consumo de ração quando comparados com o grupo controle. Toda espécie animal apresenta mecanismos de controle para manutenção do estado fisiológico. Entretanto, fatores intrínsecos e extrínsecos podem alterar a manutenção do estado fisiológico (LIMA *et al.*, 2014).

Ainda, encontramos uma diminuição do peso dos animais do grupo tratado com a menor dose testada. Mas, os animais tratados com uma dose superior (2000 mg/Kg) não tiveram nenhuma alteração significativa no seu peso. Diante disso, não podemos dizer que a substância CH_3ISACN foi a responsável por causar as alterações no consumo de ração e peso dos animais que receberam a dose de 300 mg/Kg. Tendo em vista que ao avaliarmos o grupo que recebeu a maior dose (2000 mg/K), não houve nenhuma alteração quando comparado com o grupo controle.

A análise de parâmetros bioquímicos permite uma melhor explicação quanto à investigação da toxicidade de uma substância teste (BEDI; KRISHAN 2019). Neste estudo não houve nenhuma alteração significativa dos parâmetros bioquímicos do grupo tratado 1 (300 mg/Kg). Já para o grupo tratado 2 (2000 mg/Kg), houve uma redução dos níveis de ureia comparado com o grupo controle.

A ureia é o produto final do catabolismo proteico, e é o principal veículo para remoção de amônia tóxica do corpo. É produzido principalmente no fígado e é excretado pelos rins. Logo, seu aumento sérico pode estar relacionado a distúrbios metabólicos hepáticos. Bem como também o seu aumento pode ser considerado um marcador de disfunção renal, estando associado à nefrite, isquemia renal ou indicar que o animal encontra-se desidratado (EL-DEMERDASH; NASR 2014; GOTEP *et*

al., 2018; OLATOYE; ARUEYA, 2017). Em casos de diminuição dos níveis séricos de ureia, pode estar relacionado com insuficiência hepática aguda ou superidratação (UGWAH-OGUEJIOFOR *et al.*, 2019). Diante da avaliação bioquímica, a substância em estudo não causou danos renais, já que também não provocou nenhuma alteração significativa nos níveis de creatina, que é um indicador do índice de filtração glomerular, importante na avaliação da função renal (OLATOYE; ARUEYA, 2017). Também podemos inferir que a CH₃ISACN não ocasionou danos hepáticos significativos, tendo em vista que não houve alteração em nenhum outro parâmetro bioquímico. Como ALT (Alanino Aminotransferase), AST (Aspartato aminotransferase) e FAL (Fosfatase alcalina) que são marcadores de disfunção hepática, logo quando os seus níveis séricos estão aumentados indicam hepatotoxicidade (AMER *et al.*, 2018; EL-DESOKY *et al.*, 2017; MEHRZADI *et al.*, 2018).

Tendo em vista que o sistema hematopoiético é um dos sistemas mais sensíveis à toxicidade em humanos e animais, estes são importantes aliados do estudo de toxicidade. Logo, a avaliação de parâmetros hematológicos permite uma melhor investigação quanto a extensão da toxicidade de uma substância ao organismo. Desajustes nos parâmetros hematológicos em estudos realizados em animais, podem indicar toxicidade humana (SILVA *et al.*, 2019; UGWAH-OGUEJIOFOR *et al.*, 2019). No presente trabalho, a administração da CH₃ISACN nas ratas *Wistar*, não provocou alterações significativas nos parâmetros hematológicos, exceto um aumento nos leucócitos totais do grupo 1 (300 mg/Kg) quando comparado com o controle. Bem como um aumento dos monócitos. Entretanto o grupo que foi tratado com a maior dose, não apresentou nenhuma alteração nos leucócitos e monócitos.

Os leucócitos são responsáveis por defender o organismo de corpos estranhos, sendo os leucócitos diferenciais como os monócitos, as principais células para avaliação da imunidade do corpo (BABAIY *et al.*, 2018). O aumento sérico de leucócitos totais indica processo inflamatório, devido a presença de materiais estranhos tóxicos (MURTA *et al.*, 2016; YAO *et al.*, 2019), assim como também o aumento sérico de monócitos (MURTA *et al.*, 2016). Entretanto não podemos afirmar que os animais do grupo passaram por um processo inflamatório, já que são necessários avaliações histopatológicas para sua devida comprovação. Ainda, as

alterações ocorridas dos parâmetros hematológicos, se deram com os animais que receberam a dose de 300 mg/Kg, portanto podemos inferir que a substância teste CH₃ISACN não foi a responsável por ocasionar as alterações, já que os animais que receberam uma dose superior (2000 mg/Kg), não apresentaram nenhuma alteração.

7. CONCLUSÕES

Levando em consideração os resultados obtidos, podemos concluir que o derivado de isatina CH₃ISACN é um potencial candidato a antimalárico, tendo em vista que reduziu a parasitemia *in vitro* do *P. falciparum*. Além do que, mostrou causar baixa hemólise em eritrócitos humanos, indicando assim uma baixa citotoxicidade e boa viabilidade celular.

Na avaliação *in silico* o derivado de isatina CH₃ISACN apresentou uma boa biodisponibilidade oral teórica, já que atendeu aos requisitos preconizados pela “Regra dos cinco” de Lipinski. Também, apresentou uma baixa toxicidade teórica.

Os resultados do estudo de toxicidade aguda *in vivo* corroboraram com os resultados do estudo *in silico*, demonstrando baixa toxicidade do composto CH₃ISACN.

Desta forma, o composto CH₃ISACN, apresenta-se como uma substância promissora para o desenvolvimento de um futuro medicamento antimalárico. Sendo assim, de grande valia a continuação de seu estudo, até alcançar testes de fase clínica, e assim ser incluído no arsenal terapêutico contra a malária.

8. REFERÊNCIAS

- ADAMS, J.H.; MUELLER, I. The biology of *Plasmodium vivax*. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 7, p. 1-13, 2017.
- ADENIYI, O.S.; *et al.* Effects of quinine on gastric ulcer healing in Wistar rats. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 14, n. 4, 2017.
- AHMED, S.M.; *et al.* CYP450 mediated inhibition potential of *Swertia chirata*: An herb from Indian traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 178, p. 34–39, 2016
- ALBERTONI, G.; SCHOR, N. Resveratrol plays important role in protective mechanisms in renal disease-mini-review. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 37, n.1, 106-114, 2015.
- ALBUQUERQUE, H.G *et al.* Imported malaria in Rio de Janeiro state between 2007 and 2015: an epidemiologic approach. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, 2019.
- ALMEIDA, R.N.; OLIVEIRA, T.M.L. Triagem farmacológica comportamental. **ALMEIDA, RN Psicofarmacologia: fundamentos práticos**, 1ª Ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, cap. 11, p. 131-137, 2006.
- AMATO, R.; *et al.* Origins of the current outbreak of multidrug-resistant malaria in southeast Asia: a retrospective genetic study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 337-345, 2018.
- AMER, A.M.; FARID, A.S.; FARARAH, K.M. Hepatoprotective Effect of Allopurinol and Garlic Extract against Experimentally-Induced Hepatotoxicity. **Benha Veterinary Medical Journal**, v. 34, n. 2, p. 66-76, 2018.
- ANDRADE EL.; *et al.* Non clinical studies required for new drug development- Part I: early *in silico* and *in vitro* studies, new target discovery and validation, proof of principles and robustness of animal studies. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 49, n. 11, p.1-9, 2016.
- ANDRADE NETO, V.F.; *et al.* *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n.3, p.359-365, 2007.
- ANGELO, K.M.; *et al.* Malaria after international travel: a GeoSentinel analysis, 2003–2016. **Malaria journal**, v. 16, n. 1, p. 293, 2017.
- ANVISA. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos Brasília: Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF, 2013.
- ARYA, M.; *et al.* *In vitro* and *in silico* molecular interaction of multiphase nanoparticles containing inositol hexaphosphate and jacalin: Therapeutic potential against colon cancer cells (HCT-15). **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 9, p. 15527-15536, 2019.
- ASHLEY, E.A.; PHYO, A.P. Drugs in development for malaria. **Drugs**, v. 78, n. 9, p. 861-879, 2018.

BABAYI, H.; *et al.* Evaluation of the effects of Leech Salivary Extract (LSE) on Haematological parameters in Rats, p. 6-14, 2018.

BASU, S; SAHI, P.K. Malaria: An Update. **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 84, n. 7, p. 521-528, 2017.

BANSAL, D.; *et al.* Distribution of mutations associated with antifolate and chloroquine resistance among imported *Plasmodium vivax* in the state of Qatar. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 97, n. 6, p. 1797-1803, 2017.

BANSAL, D.; *et al.* Molecular surveillance of putative drug resistance markers of antifolate and artemisinin among imported *Plasmodium falciparum* in Qatar. **Pathogens and Global Health**, v. 113, n. 4, p. 158-166, 2019.

BARBOSA JÚNIOR, S.A; BAPTISTA R.I.A.A; BARBOSA, C.N. Fisiologia comparada do fluído oral e suas principais aplicações clínicas. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR.**; v. 18, n. 4, p. 259-268, 2015

BEDI, O.; KRISHAN, P. Investigations on acute oral toxicity studies of purpurin by application of OECD guideline 423 in rodents. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, p. 1-7, 2019.

BÉRUBÉ, G. An overview of molecular hybrids in drug discovery. **Expert opinion on drug discovery**, v. 11, n. 3, p. 281-305, 2016.

BLAKEMORE, D.C.; *et al.* Organic synthesis provides opportunities to transform drug discovery. **Nature chemistry**, v. 10, n. 4, p. 383-394, 2018.

BREL, A.K.; *et al.* Derivatives of hydroxybenzoic acids and their salts: Synthesis and pharmacological activity. **Russian Journal Of General Chemistry**, v. 85, n. 2, p.387-391, 2015.

BRITO, V.B.M.; *et al.* Synthesis, anti-proliferative activity, theoretical and ¹H NMR experimental studies of Morita–Baylis–Hillman adducts from isatin derivatives. **Molecular diversity**, p. 1-17, 2019.

BULE, M.H.; *et al.* Quinazolinone Derivatives as a Potential Class of Compounds in Malaria Drug Discovery. **International Journal of Pharmacology**, v. 13, n. 7, p. 818-831, 2017.

BURGDORF, T.; *et al.* Workshop on the validation and regulatory acceptance of innovative 3R approaches in regulatory toxicology–Evolution versus revolution. **Toxicology in Vitro**, v. 59, p. 1-11, 2019.

CALADO A.M.C.; *et al.* P-glycoprotein and MRP1 expression in tissues from dogs with visceral leishmaniasis. **ARS Veterinaria**, v. 30, n. 2, p. 71-76, 2014.

CALDEIRA, T.G.; *et al.* In silico and in vitro prediction of gastrointestinal absorption from potential drug eremantholide C. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 11, p, 1468-1476, 2017.

CAMPOS, K.R.; *et al.* The importance of synthetic chemistry in the pharmaceutical industry. **Science**, v. 363, n. 6424, p. eaat0805, 2019.

CARLOS, B.C.; RONA, L.D.P.; CHRISTOPHIDES, G.K.; SOUZA-NETO, J.A. A comprehensive analysis of malaria transmission in Brazil. **Pathogens and global health**, v. 113, n. 1, p. 1-13, 2019.

CARNEIRO, C.C.; *et al.* Mutagenicity and antimutagenicity of *Salacia crassifolia* (mart. Ex. Schult.) G. Don. evaluated by Ames test. *Brazilian Journal of Biology*, v. 78, n. 2, p. 345-350, 2018.

CARVALHO, G.D.; *et al.* . **Ceres**, v. 56, n. 1, p. 51-57, 2009.

CHIEN, C.T.H.; *et al.* An Adaptable Phospholipid Membrane Mimetic System for Solution NMR Studies of Membrane Proteins. **Journal of the American Chemical Society**.; v. 139, n. 42, p. 14829–14832, 2017

CHINNASAMY, P; ARUMUGAM, R. *In silico* prediction of anticarcinogenic bioactivities of traditional anti-inflammatory plants used by tribal healers in Sathyamangalam wildlife Sanctuary, India. **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n. 4, p. 265-279, 2018.

CLARIVET B.; *et al.* Tocilizumab and mesenteric arterial thrombosis: drug-drug interaction with anticoagulants metabolized by CYP 450 and/or by P-glycoprotein. **European Journal of Clinical pharmacology**. v. 72, n. 11, p.1413-1414, 2016

COWMAN, AF.; HEALER J.; MARAPANA, D.; MARSH, K. Malaria: biology and disease. **Cell**, v. 167, n. 3, p. 610-624, 2016.

COWMAN, AF.; HEALER J.; MARAPANA, D.; MARSH, K. The molecular basis of erythrocyte invasion by malaria parasites. **Cell host & microbe**, v. 22, n. 2, p. 232-245, 2017.

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

DARYANI, A.; *et al.* The potential use of melatonin to treat protozoan parasitic infections: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 948-957, 2018.

DE FALCO A, CUKIERMAN DS, HAUSER-DAVIES RA, REY NA. Doença de alzheimer: hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. **Química Nova**, v. 39, n. 1, p. 63-80, 2016

DEITSCH, K.W.; DZIKOWSKI, R. Variant gene expression and antigenic variation by malaria parasites. **Annual review of microbiology**, v. 71, p. 625-641, 2017.

DESAI, D.H. *et al.* Inhibition of melanoma development by Isatin analogs. **American Association for Cancer Research**, v. 78, p, 2806, 2018.

DHANALAKSHMI, R.; MANIMEKALAI, P.; MANAVALAN, R. *In-silico* molecular docking studies on the phytoconstituents of *corchorus trilocularis* (linn.) For its antiatherosclerotic activity and admet prediction. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 9, n. 9, p. 3839-3844, 2018.

DINESH, M.; *et al.* Evaluation of Octyl- β -D-Glucopyranoside (OGP) for cytotoxic, hemolytic, thrombolytic, and antibacterial activity. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 185, n. 2, p. 450-463, 2018.

DIRAR AI.; *et al.* *In silico* pharmacokinetics and molecular docking of three leads isolated from *Tarconanthus camphoratus* l. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 5, p. 71-77, 2016.

DONDORP, A.M.; *et al.* The threat of artemisinin-resistant malaria. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 12, p. 1073-1075, 2011.

DUFFY, P.E. Immunity to Severe Malaria: PfEMP1 Tags Tell a Tale. **Cell host & microbe**, v. 26, n. 5, p. 571-573, 2019.

DURASINGH, M.T.; HORN, D. Epigenetic regulation of virulence gene expression in parasitic protozoa. **Cell host & microbe**, v. 19, n. 5, p. 629-640, 2016.

DYSON, J.; *et al.* Direct and indirect P-glycoprotein transfers in MCF7 breast cancer cells. **Journal of Theoretical Biology**, v. 461, p. 239-253, 2019.

ECDC. New map shows the presence of *Anopheles maculipennis* s.l. mosquitoes in Europe. 12 Sep 2018. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/new-map-shows-presence-anopheles-maculipennis-sl-mosquitoes-europe>. Acesso em: 9. jan.2020.

EL-DEMERDASH, F. M.; NASR, H.M. Antioxidant effect of selenium on lipid peroxidation, hyperlipidemia and biochemical parameters in rats exposed to diazinon. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 28, n. 1, p. 89-93, 2014.

EL-DESOKY, G.E.; *et al.* Curcumin protects against tartrazine-mediated oxidative stress and hepatotoxicity in male rats. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 21, n. 3, p. 635-645, 2017.

ELLEUCH, H.; *et al.* Potential antioxidant activity of Morita-Baylis-Hillman adducts. **Bioorganic chemistry**, v. 78, p. 24-28, 2018.

ESCOBEDO-GONZÁLEZ R.; *et al.* *In silico* study of the pharmacologic properties and cytotoxicity pathways in cancer cells of various indolylquinone analogues of perezone. **Molecules**, v. 22, n. 7, 1060, 2017.

FAHEINA-MARTINS, Glaucia V. *et al.* Morita-Baylis-Hillman Adducts Display Anti-Inflammatory Effects by Modulating Inflammatory Mediator Expression in RAW264. 7 Cells. **Mediators of inflammation**, v. 2017, 2017.

FAIRHURST, R.M.; DONDORP, A.M. Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 3, 2016.

FENALTI, J.M.; *et al.* Diversidade das plantas brasileiras com potencial anti-helmíntico. **Revista de Ciências da Saúde**, v. 28, n. 1, p.39-48, 2016.

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

GHALEB, A.; *et al.* *In Silico* Exploration of Aryl Halides Analogues as Checkpoint Kinase 1 Inhibitors by Using 3D QSAR, Molecular Docking Study, and ADMET Screening. **Advanced pharmaceutical bulletin**, v. 9, n. 1, p. 84, 2019.

GOLAN, D.E; TASHJIAN JÚNIOR, A.H; ARMSTRONG, E.J; ARMSTRONG, A.W. Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacologia. 3ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2014.

GOMES, A.P.; *et al.* *Plasmodium* infection: epidemiology, prophylaxis and control in Brazil. **VITTALLE-Health Sciences Journal**, v. 30, n. 2, p. 47-58, 2018.

GOTEP, J.G.; *et al.* Toxicological Evaluation of Euphorbia hirta on Baby Hamster Kidney (BHK-21) Cells and in Albino Rats. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 25, n. 2, p. 1-12, 2018.

GUNSARU, B.; *et al.* Simplified reversed chloroquines to overcome malaria resistance to quinoline-based drugs. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 5, p. e01913-16, 2017.

GUO, H. Isatin derivatives and their anti-bacterial activities. **European journal of medicinal chemistry**, v. 164, p. 678-688, 2019.

HANBOONKUNUPAKARN, B.; WHITE, N.J. The threat of antimalarial drug resistance. **Tropical diseases, travel medicine and vaccines**, v. 2, n. 1, p. 10, 2016.

HOGLUND, R.M.; RUENGWEERAYUT, R; NA-BANGCHANG, K. Population pharmacokinetics of mefloquine given as a 3-day artesunate–mefloquine in patients with acute uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in a multidrug-resistant area along the Thai–Myanmar border. **Malaria journal**, v. 17, n. 1, p. 322, 2018.

HOSSAIN, S.; *et al.* Oral administration of ganoderma lucidum to lead-exposed rats protects erythrocytes against hemolysis: implicates to anti-anemia. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

IDAKWO, G.; *et al.* A review on machine learning methods for in silico toxicity prediction. **Journal of Environmental Science and Health**. v. 36, n. 4, p. 169-191, 2018

JAMUNA, S; RATHINAVEL, A; SADULLAH, S. S. M; DEVARAJ, S. N. *In silico* approach to study the metabolism and biological activities of oligomeric proanthocyanidin complexes. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 50, n. 5, p. 242, 2018.

JIANG, D.; *et al.* Isatin derivatives with potential antitubercular activities. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 55, n. 6, p. 1263-1279, 2018.

JONES, C.R., *et al.* Gut wall metabolism. Application of pre-clinical models for the prediction of human drug absorption and first-pass elimination. **The AAPS journal**, v. 18, n. 3, p. 589-604, 2016.

JUMA, D.W.; *et al.* The prevalence and antifolate drug resistance profiles of *Plasmodium falciparum* in study participants randomized to discontinue or continue cotrimoxazole prophylaxis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 3, p. e0007223, 2019.

KAJUBI, R.; *et al.* Monthly sulfadoxine–pyrimethamine versus dihydroartemisinin–piperaquine for intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy: a double-blind, randomised, controlled, superiority trial. **The Lancet**, v. 393, n. 10179, p. 1428-1439, 2019.

KALAIMANI, R.; MUSTAFA, M.M. Acute and subacute oral toxicity study of Rasa chenduram. **Int. J. Adv. Res. Biol. Sci**, v. 4, n. 11, p. 22-31, 2017.

KAVISHE, R.A.; KOENDERINK, J.B.; ALIFRANGIS, M. Oxidative stress in malaria and artemisinin combination therapy: pros and cons. **The FEBS journal**, v. 284, n. 16, p. 2579-2591, 2017.

KHANAL, P.; MAGADUM, P.; PATIL, B.M.; HULLATTI, K.K.. In silico Docking Study of Limonoids from *Azadirachta indica* with pfpr5: A Novel Target for *Plasmodium falciparum*. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 81, n. 2, p. 326-332, 2019.

KUNDU, M.K.; *et al.* Antimalarial activity of 3-hydroxyalkyl-2-methylene-propionic acid derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 9, n. 5, p. 731-736, 1999.

KUMAR A.; *et al.* Catalyst-Free Synthesis of 3-Aryl-3-hydroxy-2-oxindole Derivatives by Using Water as the Solvent: Experimental and DFT studies. **Asian Journal of Organic Chemistry**, v. 5, p.1334-1344, 2016.

LAMOTHE, S.M; LI, J.G.W; YANG, T; ZHANG, S. The Human Ether-a-go-go-related Gene (hERG) Potassium Channel Represents an Unusual Target for Protease-mediated Damage. **Journal of Biological Chemistry**. v. 291, n. 39, p. 20387-20401, 2016

LARAIA, L; WALDMANN, H. Natural product inspired compound collections: evolutionary principle, chemical synthesis, phenotypic screening, and target identification. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 23, p. 75-82, 2017.

LAWPOOLSRI, S.; *et al.* Epidemiological profiles of recurrent malaria episodes in an endemic area along the Thailand-Myanmar border: a prospective cohort study. **Malaria journal**, v. 18, n. 1, p. 124, 2019.

LE MOS, D.C.S.; *et al.* Toxicidade aguda em camundongos BALB/c expostos a efluentes de curume. **Multi-Science Journal**, v. 1, n. 3, p. 56-63, 2018.

LI, X.; *et al.* In silico prediction of chemical acute oral toxicity using multi-classification methods. **Journal of chemical information and modeling**, v. 54, n. 4, p. 1061-1069, 2014.

LI, W *et al.* Synthesis and In Vitro Anti-Tumor, Anti-Mycobacterial and Anti-HIV Activities of Diethylene-Glycol-Tethered Bis-Isatin Derivatives. **ChemistrySelect**, v. 3, n. 36, p. 10250-10254, 2018.

LI, X.H.; *et al.* A historical review of WHO certification of malaria elimination. **Trends in parasitology**, v. 35, n. 2, p. 163-171, 2019.

LIMA, C.M.; *et al.* Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem *Wistar*) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v. 10, n. 3, p. 1-9, 2014.

LIMA-JUNIOR C.G, *et al.* Synthesis, Cytotoxic Activity on Leukemia Cell Lines and Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) Studies of Morita-Baylis-Hillman Adducts. **Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 7, p.602-612, 2016.

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. 46, n.1-3, p. 3-26, 2001.

LISEWSKI, A.M.; *et al.* Potential role of *Plasmodium falciparum* exported protein 1 in the chloroquine mode of action. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 1, p. 31-35, 2018.

LOIODICE, S.; COSTA, A.N; ATIENZAR, F. Current trends in in silico, in vitro toxicology, and safety biomarkers in early drug development. **Drug and chemical toxicology**, v. 42, n. 2, p. 113-121, 2019.

LORET, T.; *et al.* Predicting the in vivo pulmonary toxicity induced by acute exposure to poorly soluble nanomaterials by using advanced in vitro methods. **Particle and fibre toxicology**, v. 15, n. 1, p. 25, 2018.

LOY, D.E. *et al.* Out of Africa: origins and evolution of the human malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. **International journal for parasitology**, v. 47, n. 2-3, p. 87-97, 2017.

LUNGA, M.J.; *et al.* Expanding the SAR of Nontoxic Antiplasmodial Indolyl-3-ethanone Ethers and Thioethers **ChemMedChem**, v.13, n.13, p. 1353-1362, 2018.

MADANITSA, M.; *et al.* Scheduled intermittent screening with rapid diagnostic tests and treatment with dihydroartemisinin-piperaquine versus intermittent preventive therapy with sulfadoxine-pyrimethamine for malaria in pregnancy in Malawi: an open-label randomized controlled trial. **PLoS medicine**, v. 13, n. 9, 2016.

MAIA, A.S.; RIBEIRO, A.R.; CASTRO, P.M.; TIRITAN, M.E. Chiral analysis of pesticides and drugs of environmental concern: Biodegradation and enantiomeric fraction. **Symmetry**, v. 9, n. 9, p. 196, 2017.

MALA, M.; IMAM, M.; HASSAN, K. Interaction between parasite and vector for Malaria disease transmission-a review on Malaria. **Progressive Agriculture**, v. 27, n. 2, p. 168-174, 2016.

MARINHO-E-SILVA, M.; *et al.* Anophelines species and the receptivity and vulnerability to malaria transmission in the Pantanal wetlands, Central Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 2, p. 87-95, 2018.

MCKERROW, J.H.; LIPINSKI, C.A. The rule of five should not impede anti-parasitic drug development. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**. v. 7, n. 2, p. 248-249, 2017.

MEHRZADI, S.; *et al.* Hepatoprotective effect of berberine against methotrexate induced liver toxicity in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 233-239, 2018.

MELIS, C.; *et al.* Isatin: a privileged scaffold for the design of carbonic anhydrase inhibitors. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 32, n. 1, p. 68-73, 2017.

MENARD, D; DONDORP, A. Antimalarial drug resistance: a threat to malaria elimination. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 7, n. 7, p. a025619, 2017.

MENEGHIN, R.A.; *et al.* World patent overview on the use of artemisinin in the fight against malaria. **Revista Brasileira de Gestão e Inovação (Brazilian Journal of Management & Innovation)**, v. 4, n. 3, p. 107-132, 2017.

MENEGUETTI D.U.O.; *et al.* Antimalarial ethnopharmacology in the Brazilian Amazon. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 4, 2014.

MILNER, D.A. Malaria pathogenesis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). Malária: Monitoramento dos casos no Brasil em 2014. Boletim Epidemiológico, 2015. Disponível: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/agosto/18/2015-009---Mal-ria-para-publica----o.pdf>. Acesso: 9. jan. 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL) (a). Boletins e Mapas interativos. Região Extra Amazônica. Casos confirmados de malaria na Região Extra Amazônica por UF de Notificação-janeiro a setembro de 2019. Disponível: https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/Boletim_regiaoExtra-Amazonica_2019_30_09_2019/SrieHistorica. Acesso em: 15. fev. 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL) (b). Brasil reduz em 38% casos de malária em relação a 2018. Agência de Saúde, 2019. Disponível: <http://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45391-brasil-reduz-em-38-casos-de-malaria-em-relacao-a-2018>. Acesso: 9.jan.2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL) (c). Guia de Tratamento da Malária no Brasil. Secretaria da Vigilância em Saúde, 2019. Disponível: <http://saude.gov.br/saude-de-a-z/malaria#tratamento>. Acesso: 19. jan. 2020.

MODI, S.J.; KULKARNI, V. M. Quinazoline Derivatives as Anticancer Agents: QSAR, Molecular Docking and in silico Pharmacokinetic Prediction. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 52, n. 4, p. S309-S325. 2018

MOGHADDAM, M.N; JALAL, R; ZERAATKAR, Z. Synthesis and antiproliferative and apoptosis-inducing activity of novel 3-substituted-3-hydroxy-2-oxindole compounds. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 54, n. 1, p. 61-70, 2018.

MOHAMED M.A, DIRAR AI, HAMDOUN S. Discovery of two diacetylene glycosides as human uridine-cytidine kinase 2 inhibitors: an *in silico* approach. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 6, n. 11, p.34-39, 2016

MOORE, D.V.; LANIER, J.E. Observations on two *Plasmodium falciparum* infections with an abnormal response to chloroquine. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 10, n. 1, p. 5-9, 1961.

MORITA, K; SUZUKI, Z; HIROSE, H. A tertiary phosphine-catalyzed reaction of acrylic compounds with aldehydes. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 41, n. 11, p. 2815-2815, 1968.

MISHRA, A.; *et al.* Identification and in silico screening of biologically active secondary metabolites isolated from *Trichoderma harzianum*. **Annals of Phytomedicine-an International Journal**, v. 7, n. 1, p. 78-86, 2018.

MOXON, Christopher A. et al. New insights into malaria pathogenesis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 15, n. 1, p. 315-343, 2019.

MPHAHLELE, M.; MMONWA, M.; CHOONG, Y. Synthesis and evaluation of N-(3-trifluoroacetyl-indol-7-yl) acetamides for potential in vitro antiplasmodial properties. **Molecules**, v. 22, n. 7, p. 1099, 2017.

MURTA, G.L.; *et al.* Oxidative effects on lung inflammatory response in rats exposed to different concentrations of formaldehyde. **Environmental pollution**, v. 211, p. 206-213, 2016.

MULTINI, L.C. *et al.* Increasing Complexity Threatens the Elimination of Extra-Amazonian Malaria in Brazil. **Trends in parasitology**, v. 35, n. 6, p. 383-387, 2019.

MULLER, I.B.; HYDE, J.E. Antimalarial drugs: modes of action and mechanisms of parasite resistance. v. 5, n. 12, p. 1857-1873, 2010.

MYATT, G.J.; *et al.* In silico toxicology protocols. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 96, p. 1-17, 2018.

NAß, J; EFFERTH, T. Development of artemisinin resistance in malaria therapy. **Pharmacological research**, v.146, p. 104275, 2019.

NAVEGANTES, E.C.A, *et al.* Alternative methods to the use of animals for the detection of pyrogen: opportunities and challenges in the quality control of biological products. **Archives of Veterinary Science**, v. 20, n. 4, p.71-78, 2016.

NAZ, A.; IQTADAR, R.; SIDDIQUI, F.A.; QASMI, Z.U.H. Degradation kinetics of fluvoxamine in buffer solutions: In silico ADMET profiling and Identification of degradation products by LC-MS/ESI. **Arabian Journal of Chemistry**, p. 1-13, 2019.

NELSON, L.J.; *et al.* Human Hepatic HepaRG Cells Maintain an Organotypic Phenotype with High Intrinsic CYP450 Activity/Metabolism and Significantly Outperform Standard HepG2/C3A Cells for Pharmaceutical and Therapeutic Applications. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. v. 120, n. 1, p. 30-37, 2017

NISHA, C. M.; *et al.* Docking and ADMET prediction of few GSK-3 inhibitors divulges 6-bromoindirubin-3-oxime as a potential inhibitor. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 65, p. 100-107, 2016.

NKUMAMA, I.N.; O'MEARA, W.P.; OSIER, F.H.A. Changes in malaria epidemiology in Africa and new challenges for elimination. **Trends in parasitology**, v. 33, n. 2, p. 128-140, 2017.

NOISANG, C.; *et al.* Molecular detection of drug resistant malaria in Southern Thailand. **Malaria journal**, v. 18, n. 1, p. 1-11, 2019.

NOSTEN, F; WHITE, N.J. Artemisinin-based combination treatment of falciparum malaria. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 77, n. 6, p. 181-192, 2007.

NSANZABANA, C.; *et al.* Tools for surveillance of anti-malarial drug resistance: an assessment of the current landscape. **Malaria journal**, v. 17, n. 1, p. 75, 2018.

OCAN, M.; *et al.* Prevalence of chloroquine resistance alleles among *Plasmodium falciparum* parasites in countries affected by malaria disease since change of treatment policy: a systematic review protocol. **Systematic reviews**, v. 7, n. 1, p. 108, 2018.

OECD (2001), Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

OECD (2008), Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

OGIDIGO, J. O.; *et al.* *In-silico* molecular docking and pharmacokinetic studies of some selected phyto-constituents of bryophyllum pinnatum as a potential selective inhibitor of Monoamine Oxidase-B (MAO-B). **Pharmacology Online**, v. 3, p. 272-285, 2018.

OLATOYE, K.K.; ARUEYA, G.L. Toxicological parameters of albino rats fed with extruded snacks from Aerial yam (*Dioscoria bulbifera*) and African breadfruit seed (*Treculia africana*). **Food science & nutrition**, v. 6, n. 1, p. 94-100, 2018.

ORVOS, P.; *et al.* Evaluation of Possible Proarrhythmic Potency: Comparison of the Effect of Dofetilide, Cisapride, Sotalol, Terfenadine, and Verapamil on hERG and Native I Kr Currents and on Cardiac Action Potential. **Toxicological Sciences**, v. 168, n. 2, p. 365-380, 2019.

OYONG, D.A. *et al.* Loss of complement regulatory proteins on uninfected erythrocytes in vivax and falciparum malaria anemia. **JCI insight**, v. 3, n. 22, 2018.

OZGUN, D.O.; *et al.* Inhibitory effects of isatin Mannich bases on carbonic anhydrases, acetylcholinesterase, and butyrylcholinesterase. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 31, n. 6, p. 1498-1501, 2016.

PANDIT, S.; *et al.* Evaluation of herb-drug interaction of a polyherbal Ayurvedic formulation through high throughput cytochrome P450 enzyme inhibition assay. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 197, p. 165-172, 2017.

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

PARTHASARATHI, R.; DHAWAN, A. In silico approaches for predictive toxicology. In: In Vitro Toxicology. **Academic Press**, p. 91-109, 2018.

PECENIN, M.F.; *et al.* Blocking IP3 signal transduction pathways inhibits melatonin-induced Ca²⁺ signals and impairs *P. falciparum* development and proliferation in erythrocytes. **Cell calcium**, v. 72, p. 81-90, 2018.

PELLISSIER, H. Recent developments in the asymmetric organocatalytic Morita– Baylis– Hillman reaction. **Tetrahedron**, v. 73, n. 20, p. 2831-2861, 2017.

PEREIRA V.S.S.; *et al.* Cytotoxicity, hemolysis and in vivo acute toxicity of 2-hydroxy-3-anilino-1,4-naphthoquinone derivatives. **Toxicology Reports**, v. 3, p. 756-762, 2016.

PETERS, W. Drug resistance in *Plasmodium berghei* Vincke and Lips, 1948. III. Multiple drug resistance. **Experimental parasitology**, v. 17, n. 1, p. 97-102, 1965.

PINHEIRO, L.; Feitosa, L.M; SILVEIRA, F.F.; Boechat, N. Current antimalarial therapies and advances in the development of semi-synthetic artemisinin derivatives. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 1, p. 1251-1271, 2018.

PISCIOTTA, J.M. *et al.* Quantitative characterization of hemozoin in *Plasmodium berghei* and vivax. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 7, n. 1, p. 110-119, 2017.

POONGAVANAM, V.; DOAK, B.C.; KIHLEBERG, J. Opportunities and guidelines for discovery of orally absorbed drugs in beyond rule of 5 space. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 44, p. 23-29, 2018.

PRAJAPAT, P.; *et al.* Synthetic and medicinal chemistry in drug discovery: needs for today. **Ann Med Chem Res**, v. 3, n. 1, p. 1021, 2017.

PRIOR, H.; *et al.* Reviewing the utility of two species in general toxicology related to drug development. **International journal of toxicology**, v. 37, n. 2, p. 121-124, 2018.

RABELO, L.; *et al.* A lactose-Binding Lectin from the marine Sponge *Cinachyrella Apion* (Cal) Induces Cell Death in Human Cervical Adenocarcinoma Cells. **Marine Drugs**, v. 10, n. 4, p. 727-743, 2012.

RAIES A.B, BAJIC VB. In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. **WIREs Comput Mol Sci**. v. 6, n. 2, p. 147–172, 2016

RAJE, A. A.; *et al.* Evaluation of separate role of intestine and liver in first pass metabolism of budesonide in rat. **Xenobiotica**, v. 48, n. 12, p. 1206-1214, 2018.

RAMHARTER, M.; *et al.* Population Pharmacokinetics of Mefloquine Intermittent Preventive Treatment for Malaria in Pregnancy in Gabon. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 2, p. e01113-18, 2019.

REIS, A.M.M.; PEDROSO, L.A.; Costa, SC, FIGUEIREDO, T.P. Medicines used by elderly people at home that act as substrates or modulators of P-Glycoprotein. **Brazilian Journal of Hospital Pharmacy and Health Services**, v. 6, n.1, p. 30-36, 2015.

RIBEIRO, R.S; AFONSO, C; CASTRO, P.M.L; TIRITAN, M.E. Fármacos quirais em diferentes matrizes ambientais: ocorrência, remoção e toxicidade. **Química Nova**, v. 39, n. 5, p. 598-607, 2016.

RICOTTA, E.; KWAN, J. Artemisinin-Resistant Malaria as a Global Catastrophic Biological Threat. **Global Catastrophic Biological Risks**, p. 33-57, 2019.

RIVERA-CORREA, J; RODRIGUEZ, A. Autoimmune Anemia in Malaria. **Trends in Parasitology**, 2019.

ROCAMORA, F.; *et al.* Oxidative stress and protein damage responses mediate artemisinin resistance in malaria parasites. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 3, p. e1006930, 2018.

ROCHA, J.C *et al.* Biological activity of Morita-Baylis-Hillman adduct homodimers in *L. infantum* and *L. amazonensis*: anti-Leishmania activity and cytotoxicity. **Parasitology Research**, v. 118, n. 10, p. 3067-3076, 2019.

RODRÍGUEZ-VALERO, N.; *et al.* Suspected quinine resistant *P. falciparum* Severe Malaria Possibly Acquired in Ivory Coast. **Parasitology International**. 2018.

SANGI, D.P. Estratégias de síntese na descoberta de fármacos: o emprego da síntese orientada pela diversidade estrutural. **Química Nova**, v. 39, n. 8, p. 995-1006, 2016.

SANTOS, S. A.; *et al.* Exploring the 3-piperidin-4-yl-1H-indole scaffold as a novel antimalarial chemotype. **European journal of medicinal chemistry**, v. 102, p. 320-333, 2015.

SANTOS, V.L.A.; GONSALVES, A.A.; ARAÚJO, C.R.M. Dididactic approach for the development of bioactive molecules: lipinski's five-rule and preparation of 1, 3, 4-oxadiazol heterocyclic in domestic microwave oven. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p. 110-115, 2018.

SARAIVA, T.V, *et al.* Atendimento à Lei Arouca no Ensino de Farmacologia no Curso de Medicina, UFC, Sobral. **Revista Brasileira de Educação Médica**, v. 40, n. 1, p.138-143, 2016.

SARMAH, N. P. *et al.* Antifolate drug resistance: Novel mutations and haplotype distribution in dhps and dhfr from Northeast India. **Journal of biosciences**, v. 42, n. 4, p. 531-535, 2017.

SCHUCK, D. C.; *et al.* Synthetic indole and melatonin derivatives exhibit antimalarial activity on the cell cycle of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **European journal of medicinal chemistry**, v. 78, p. 375-382, 2014

SHABANI, E.; *et al.* *Plasmodium falciparum* EPCR-binding PfEMP1 Expression Increases with Malaria Disease Severity and is Elevated in Retinopathy negative Cerebral Malaria. **Bio Med Central**. v. 15, n. 183, p. 1-15, 2017.

SHANKS, G. Dennis. Historical review: problematic malaria prophylaxis with quinine. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 95, n. 2, p. 269-272, 2016.

SHI, R.; *et al.* Renal vectorial transport of berberine mediated by organic cation transporter 2 (OCT2) and multidrug and toxin extrusion proteins 1 (MATE1) in rats. **Biopharmaceutics & drug disposition**, v. 39, n. 1, p. 47-58, 2018.

SILVA D.A. Screening of natural products with the potential to treat diseases caused by *Helicobacter pylori*: an in vitro and in silico study. [Completion of Course Work]. Campo Mourão: Federal Technological University of Paraná. 2015. 108p

SILVA, C.P.D. Bioacessibilidade dos polifenóis do jatobá-do-cerrado (*Hymenaea Stigonocarpa* Mart.) e seus efeitos em genes relacionados à absorção de glicose em células Caco-2 [Tese de Doutorado], Universidade de São Paulo, 2018.

SILVA, J.C. *et al.* Acute and Subacute Toxicological Studies of *Annona Vepretorum* in Experimental Animals. **Planta Medica International Open**, v. 6, n. 1, p. e15-e22, 2019.

SOMANI, R.R. *et al.* Optimization and study of variables in microwave assisted organic synthesis of some biologically active chalcones. **Indian Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 4, n. 3, p. 153-160, 2017.

SOO, J.Y.; *et al.* Intrauterine growth restriction may reduce hepatic drug metabolism in the early neonatal period. **Pharmacological research**, 2018, 134: 68-78.

Souza J.P.A. Síntese e estudo de *docking* molecular e Qsar de derivados do ácido cinâmico como potenciais inibidores de HIV-1 protease. [Trabalho de Conclusão de Curso]. Campo Mourão: Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2015. 90p

SOUZA, H.D., *et al.* Synthesis, in silico study and antimicrobial evaluation of new selenoglycolicamides. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 1, p. 188-197, 2019

SRAVANTHI, T.V.; MANJU, S. L. Indoles—a promising scaffold for drug development. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, p. 1-10, 2016.

STANOJCIC, S. *et al.* Single-molecule analysis reveals that DNA replication dynamics vary across the course of schizogony in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 4003, 2017.

SU, X.; *et al.* *Plasmodium* genomics and genetics: new insights into malaria pathogenesis, drug resistance, epidemiology, and evolution. **Clinical microbiology reviews**, v. 32, n. 4, p. 1-29, 2019.

SURESH, N.; HALDAR, K. Mechanisms of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. **Current opinion in pharmacology**, v. 42, p. 46-54, 2018.

TAIMOOR F. Reversal of P-Glycoprotein Mediated Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* by Various agents. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 38, n. 1, p. 18-23, 2019.

TAN, H.Y.; *et al.* A multi-chamber microfluidic intestinal barrier model using Caco-2 cells for drug transport studies. **PloS One**, v. 13, n. 5, p. 1-41, 2018.

TARIQ M.; *et al.* Pharmacological investigations and Petra/Osiris/Molinspiration (POM) analyses of newly synthesized potentially bioactive organotin (IV) carboxylates. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 158, p. 174–183, 2016

TATEM, A.J.; *et al.* The geography of imported malaria to non-endemic countries: a meta-analysis of nationally reported statistics. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 98-107, 2017.

TESSEMA, S.K. *et al.* Protective immunity against severe malaria in children is associated with a limited repertoire of antibodies to conserved PfEMP1 variants. **Cell host & microbe**, v. 26, n. 5, p. 579-590, 2019.

THAKUR, R.K.; *et al.* Synthesis and antiplasmodial activity of glyco-conjugate hybrids of phenylhydrazono-indolinones and glycosylated 1, 2, 3-triazolyl-methyl-indoline-2, 3-diones. **European journal of medicinal chemistry**, v. 155, p. 764-771, 2018.

TIWARI, K.N.; *et al.* Catalyst-free synthesis of 3-substituted-3-hydroxy-2-oxindoles by reaction of isatin and cyclic enaminone in water. **Synthetic Communications**, v. 48, n. 23, p. 2965-2972, 2018.

TRAGER, W.; JENSEN, J.B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, n 193, n. 4254 p. 673-675, 1976.

TRIFUNOVIĆ, J.; *et al.* Bile acids and their oxo derivatives: environmentally safe materials for drug design and delivery. **Drug and chemical toxicology**, v. 40, n. 4, p. 397-405, 2017.

UGWAH-OGUEJIOFOR C.J.; *et al.* Acute and sub-acute toxicity of aqueous extract of aerial parts of *Caralluma dalzielii* N. E. Brown in mice and rats. **Heliyon**, v. 5, n. 1, p. e01179, 2019

UNCED. Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). **United Nations**, 2011.

VALADARES, M.C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “Era do teste DL50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

VALE, V.V.; *et al.* Malaria parasite resistance vicious cycle. **Electronic Magazine Health Collection**, v. 11, n. 18, p. e1708-e1708, 2019.

VERHOEF, H.; VEENEMANS, J.; MWANGI, M.N.; PRENTICE, A.M. Safety and benefits of interventions to increase folate status in malaria-endemic areas. **British journal of haematology**, v. 177, n. 6, p. 905-918, 2017.

Vulović, A.; *et al.* Coupled in silico platform: Computational fluid dynamics (CFD) and physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) modelling. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.113, p. 171-184, 2018.

WANG, J.; *et al.* Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in *Plasmodium falciparum*. **Nature communications**, v. 6, p. 10111, 2015.

WANG, X.; *et al.* Palladium-Catalyzed Asymmetric Allylic Allylation of Racemic Morita–Baylis–Hillman Adducts. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 56, n. 4, p. 1116-1119, 2017.

WANG, Jiabing *et al.* Design, synthesis and QSAR study of novel isatin analogues inspired Michael acceptor as potential anticancer compounds. **European journal of medicinal chemistry**, v. 144, p. 493-503, 2018.

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

WENSLEY, A.M.; MCDUGAL, N.T.; SCHAUS, S.E. Morita–Baylis–Hillman, Vinylogous Morita–Baylis–Hillman, and Rauhut–Currier Reactions. **Lewis Base Catalysis in Organic Synthesis**, p. 655-714, 2016.

WGS GROUP *et al.* Gametocyte carriage in uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria following treatment with artemisinin combination therapy: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. **BMC medicine**, v. 14, n. 1, p. 79, 2016.

WHITE, N.J. Can new treatment developments combat resistance in malaria? **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 17, n. 10, p. 1303-1307, 2016.

WHO (a). Global Technical Strategy for Malaria 2016-2030. 2015. Disponível: <https://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241564991/en/> Acesso em: 9.jan.2020.

WHO (b). Guidelines for the treatment of malaria. 2015. Disponível: <https://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241549127/en/>. Acesso em: 14. jan.2020.

WHO. World malária report 2019. 2019. Disponível: <https://www.who.int/publications-detail/world-malaria-report-2019> Acesso em 9. Jan.2020.

WISMANDANU, O.; *et al.* Acute toxicity of red fruits (*Pandanus conoideus* Lamk) oil and the hepatic enzyme level in rat. **J Phytopharmacology**, v. 5, n. 5, p. 176-178, 2016.

WITKOWSKI, B.; *et al.* A surrogate marker of piperazine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria: a phenotype–genotype association study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 174-183, 2017.

XU, Z.; *et al.* Isatin hybrids and their anti-tuberculosis activity. **Chinese Chemical Letters**, v. 28, n. 2, p. 159-167, 2017.

YANG, H.; *et al.* admetSAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. **Bioinformatics**, v. 35, n. 6, p. 1067-1069, 2018.

YANG (b), H.; *et al.* Intestinal absorption mechanisms of araloside A in situ single-pass intestinal perfusion and in vitro Caco-2 cell model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 1563-1569, 2018.

YAO, W.; *et al.* Toxicological evaluation of a flavonoid, chrysin: morphological, behavioral, biochemical and histopathological assessments in rats. **Drug and chemical toxicology**, p. 1-12, 2019.

YASUDA, D.; *et al.* Preparation and antioxidant/pro-oxidant activities of 3-monosubstituted 5-hydroxyoxindole derivatives. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 59, n. 3, p. 165-173, 2016.

YEO, S.J.; Liu, D.X., Kim, H.S.; Park, H.I. Anti-malarial effect of novel chloroquine derivatives as agents for the treatment of malaria. **Malaria journal**, v. 16, n. 1, p. 80, 2017.

YOUSEF, B.A.; *et al.* Potential Deoxycytidine Kinase Inhibitory Activity of Amaryllidaceae Alkaloids: An *In Silico* Approach. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**, v. 10, n. 3, p. 137-143, 2018.

YU, M.S.; *et al.* In silico prediction of potential chemical reactions mediated by human enzymes. **BMC bioinformatics**, v. 19, n. 8, p. 207, 2018.

ZHAN, G.; *et al.* Catalyst-Controlled Switch in Chemo-and Diastereoselectivities: Annulations of Morita–Baylis–Hillman Carbonates from Isatins. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 55, n. 6, p. 2147-2151, 2016.

ZHANG, S.; *et al.* Subchronic toxicity study of the total flavonoids from *Rosa laevigata* Michx fruit in rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 62, n. 2, p. 221-230, 2012.

ZHANG, Q.; *et al.* Synthesis and cytotoxic studies of novel 5-phenylisatin derivatives and their anti-migration and anti-angiogenic evaluation. **European journal of medicinal chemistry**, v. 156, p. 800-814, 2018.

ZHAO, X.; *et al.* Hematological effects of gold nanorods on erythrocytes: hemolysis and hemoglobin conformational and functional changes. **Advanced Science**, v. 4, n. 12, p. 1700296, 2017.

9. ANEXOS

Anexo A- Certidão do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

	UFPB - HOSPITAL UNIVERSITÁRIO LAURO WANDERLEY DA																																				
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP																																					
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA																																					
Título da Pesquisa: Avaliação da toxicidade in silico, in vitro e in vivo de um Aduto de Morita-Baylis-Hillman derivado da N-metil-isatina																																					
Pesquisador: CINTHIA RODRIGUES MELO																																					
Área Temática:																																					
Versão: 1																																					
CAAE: 02283018.5.0000.5183																																					
Instituição Proponente: Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB																																					
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio																																					
DADOS DO PARECER																																					
Número do Parecer: 3.029.388																																					
Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados: <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Tipo Documento</th> <th>Arquivo</th> <th>Postagem</th> <th>Autor</th> <th>Situação</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Informações Básicas do Projeto</td> <td>PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1244454.pdf</td> <td>05/11/2018 11:23:58</td> <td></td> <td>Aceito</td> </tr> <tr> <td>Outros</td> <td>Ficha_de_Cadastro.pdf</td> <td>05/11/2018 11:21:13</td> <td>CINTHIA RODRIGUES MELO</td> <td>Aceito</td> </tr> <tr> <td>Declaração de Instituição e Infraestrutura</td> <td>declaracao_pos.pdf</td> <td>05/11/2018 11:20:08</td> <td>CINTHIA RODRIGUES MELO</td> <td>Aceito</td> </tr> <tr> <td>TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência</td> <td>Termo_de_Dispenza_do_TCLE.pdf</td> <td>05/11/2018 10:28:21</td> <td>CINTHIA RODRIGUES MELO</td> <td>Aceito</td> </tr> <tr> <td>Projeto Detalhado / Brochura Investigador</td> <td>PROJETO_MESTRADO_CINTHIA.pdf</td> <td>05/11/2018 10:28:01</td> <td>CINTHIA RODRIGUES MELO</td> <td>Aceito</td> </tr> <tr> <td>Folha de Rosto</td> <td>folha_de_rosto.pdf</td> <td>05/11/2018 10:19:55</td> <td>CINTHIA RODRIGUES MELO</td> <td>Aceito</td> </tr> </tbody> </table>			Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação	Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1244454.pdf	05/11/2018 11:23:58		Aceito	Outros	Ficha_de_Cadastro.pdf	05/11/2018 11:21:13	CINTHIA RODRIGUES MELO	Aceito	Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_pos.pdf	05/11/2018 11:20:08	CINTHIA RODRIGUES MELO	Aceito	TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Dispenza_do_TCLE.pdf	05/11/2018 10:28:21	CINTHIA RODRIGUES MELO	Aceito	Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_MESTRADO_CINTHIA.pdf	05/11/2018 10:28:01	CINTHIA RODRIGUES MELO	Aceito	Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	05/11/2018 10:19:55	CINTHIA RODRIGUES MELO	Aceito
Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação																																	
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1244454.pdf	05/11/2018 11:23:58		Aceito																																	
Outros	Ficha_de_Cadastro.pdf	05/11/2018 11:21:13	CINTHIA RODRIGUES MELO	Aceito																																	
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_pos.pdf	05/11/2018 11:20:08	CINTHIA RODRIGUES MELO	Aceito																																	
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Dispenza_do_TCLE.pdf	05/11/2018 10:28:21	CINTHIA RODRIGUES MELO	Aceito																																	
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_MESTRADO_CINTHIA.pdf	05/11/2018 10:28:01	CINTHIA RODRIGUES MELO	Aceito																																	
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	05/11/2018 10:19:55	CINTHIA RODRIGUES MELO	Aceito																																	
Situação do Parecer: Aprovado																																					
Necessita Apreciação da CONEP: Não																																					
JOAO PESSOA, 21 de Novembro de 2018																																					
Assinado por: MARIA ELIANE MOREIRA FREIRE (Coordenador(a))																																					
Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB. Bairro: Cidade Universitária CEP: 58.059-900 UF: PB Município: JOAO PESSOA Telefone: (83)3216-7964 Fax: (83)3216-7522 E-mail: comitedeetica.hulw2018@gmail.com																																					

Anexo B- Certidão do Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA)



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

Reitoria



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE NÃO-CLÍNICA DE DERIVADOS 3-hidroxi-2-oxindol-3-substituídos EM ROEDORES ", protocolada sob o CEUA nº 1170270418 (ID 000312), sob a responsabilidade de **Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz e equipe; Igor Gabriel da Silva Ramalho; Myrelle Ferreira Dias** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 17/07/2018.

We certify that the proposal "EVALUATION OF NON-CLINICAL TOXICITY OF DERIVATIVES 3-hydroxy-2-oxindole-3-substituted in RODENTS", utilizing 18 Heterogenics rats (18 females), protocol number CEUA 1170270418 (ID 000312), under the responsibility of **Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz and team; Igor Gabriel da Silva Ramalho; Myrelle Ferreira Dias** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 07/17/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **10/2018** a **10/2019**

Área: **Ciências Farmacêuticas**

Origem: **Unidade de Produção Animal - IPeFarM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **2 a 4 semanas**

N: **18**

Linhagem: **Rattus Norvegicus - Wistar**

Peso: **180 a 220 g**

Local do experimento: Laboratório de Ensaios Toxicológicos e Biotério Prof. Dr. Thomas George-IPeFarM-UFPB

João Pessoa, 17 de julho de 2018

Profa. Dra. Islania Gisela Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Anexo C- Produção Científica durante o Mestrado

“Non-clinical acute and chronic toxicity evaluations of *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae) hydroalcoholic leaf extract” de autoria de Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz, Hilzeth de Luna Freire Pessôa, Camila Bomfim de Sá, Andressa Brito Lira, Luciana da Silva Nunes Ramalho, Kardilândia Mendes de Oliveira, Gabriela Tafaela Dias, **Cinthia Rodrigues Melo**, Josué do Amaral Ramalho, Caliandra Maria Bezerra Luna Lima. Submetido à Toxicology Reports, DOI: [10.1016/j.toxrep.2018.07.001](https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.07.001). v. 5, p. 890-896, 2018.



Non-clinical acute and chronic toxicity evaluations of *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae) hydroalcoholic leaf extract



Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz^{a,c,d,e,g,*}, Hilzeth de Luna Freire Pessôa^{a,c}, Camila Bomfim de Sá^{a,c}, Andressa Brito Lira^{a,c}, Luciana da Silva Nunes Ramalho^{a,c}, Kardilândia Mendes de Oliveira^{a,d,e}, Gabriela Tafaela Dias^a, Cinthia Rodrigues Melo^a, Josué do Amaral Ramalho^a, Caliandra Maria Bezerra Luna Lima^{a,b,f}

^a Laboratório de Ensaios Toxicológicos do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 58051-970, Brazil

^b Departamento de Fisiologia e Patologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 58051-970, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 58051-970, Brazil

^d Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 58051-970, Brazil

^e Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 58051-970, Brazil

^f Programa de Pós-Graduação em Modelos de Decisão e Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 58051-900, Brazil

^g Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos da Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 05508-000, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Cissus sicyoides
Hydroalcoholic extract
Toxicity

ABSTRACT

Cissus sicyoides (Cs) has been traditionally used to treat diabetes and belongs to the family Vitaceae, and is known as “vegetable insulin”. This study aimed to evaluate the acute and chronic non-clinical toxicity of hydroalcoholic extract from the leaves of *Cissus sicyoides* (EHA-Cs). The acute test was performed in Wistar rats, administering a single dose of 40.5 mg/kg. Behavioral parameters for pharmacological screening were observed to detect signs of Central Nervous System activity; consumption of daily food and water, and weight evaluation. After day 14, the animals were euthanized and blood samples were collected for laboratory analyses of hematological and biochemical parameters. The chronic tests were administered in doses of 4.5, 13.5 and 40.5 mg/kg. The same parameters were observed together with body temperature, glucose, exploration activity (test on the open field), and motor activity (diagnostic tests on the Rota-rod). For the group given the highest dosage during the study, histopathological examinations of vital organs were performed. For acute toxicity, there were no CNS level effects, changes in water and food consumption, or hematologic parameters. However, there was a significant decrease in weight gain for the treated females. Biochemical analyses of the treated animals presented increased levels of AST (aspartate aminotransferase) in females, uric acid levels in females and males, and ammonia in

LIRA, A. B. ; DIAS, M. F. ; DIAS, G. T. ; **MELO, C. R.** ; MONTENEGRO, C. A. ; OLIVEIRA, K. M. ; SA, C. B. ; ARAUJO, M. O. ; SOUSA, D. P. ; PAULA, A. F. R. ; PAZ, A. R. ; LIMA, C. M. B. L. . Evaluation of the Oxidant and Antioxidant Potential of Isopropyl caffeate, a Caffeic Acid Derivative. In: World Toxicologic Pathology Congress, São PAULO, **2018**.



RAMALHO, J. A. ; RAMALHO, L. S. N. ; DINIZ, M. F. F. M. ; PIRES, W. ; RAMALHO, M. E. ; DIAS, M. F. ; LIRA, A. B. ; **MELO, C. R.** ; MONTENEGRO, C. A. ; OLIVEIRA, K. M. ; DIAS, G. T. ; ARAUJO, M. O. ; SOUSA, D. P. ; LIMA, C. M. B. L. . Isopropyl caffeate, a caffeic acid derivative: acute oral toxicity non clinical. In: World Toxicologic Pathology Congress, São Paulo, **2018**.

