



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA – UFPB
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – CCS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E
INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS
UFPB/UFRN/UFC/UFPE**

CINTHIA RODRIGUES MELO

**INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE E DO MECANISMO DE AÇÃO DO
ADUTO DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN (CH_3ISACN) COMO UM
ANTIMALÁRICO**

João Pessoa – PB

2024

Cinthia Rodrigues Melo

**INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE E DO MECANISMO DE AÇÃO
DO ADUTO DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN (CH₃ISACN) COMO
UM ANTIMALÁRICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

Coorientador: Prof. Dr. Valter Ferreira de Andrade Neto

João Pessoa – PB

Fevereiro de 2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M528i Melo, Cinthia Rodrigues.

Investigação da toxicidade e do mecanismo de ação do aduto de morita-baylis-hillman (CH3ISACN) como um antimalárico / Cinthia Rodrigues Melo. - João Pessoa, 2024.

145 f. : il.

Orientação: Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz.
Coorientação: Valter Ferreira de Andrade Neto.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Toxicologia. 2. Berghepaínas. 3. Falcipainas. 4. Malária. 5. Plasmodium berghei. I. Diniz, Margareth de Fátima Formiga Melo. II. Neto, Valter Ferreira de Andrade. III. Título.

UFPB/BC

CDU 615.9(043)

	UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS (UFRN/UFPB/UFRPE/UFC)	
--	---	--

Ata da trigésima oitava defesa de tese de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos **CINTHIA RODRIGUES MELO**, candidata ao Título de “**Doutora**” em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos/UFPB.

1 Às nove horas (09:00) do dia vinte de fevereiro do ano de dois mil e vinte quatro
2 (20/02/2024), na sala virtual, reuniram-se em caráter de Solenidade pública os membros
3 da Comissão designada para examinar a **CINTHIA RODRIGUES MELO**, candidata ao
4 Título de “**Doutora**” em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos.
5 Foram componentes da Banca Examinadora os Professores Doutores: Margareth de
6 Fátima Formiga Melo Diniz (orientadora), Valter Ferreira de Andrade Neto (co-orientador)
7 Hilzeth de Luna Freire Pessôa (examinadora interna), Abrahao Alves de Oliveira Filho
8 (examinador externo), Valeska Santana de Sena Pereira (examinadora externa) e Clarice
9 Abramo (examinadora externa). Dando início aos trabalhos a presidente da banca, Prof^a
10 Dr^a. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz, após declarar os objetivos da reunião,
11 apresentou a candidata, **CINTHIA RODRIGUES MELO**, a quem concedeu a palavra para
12 que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado
13 “**INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE E DO MECANISMO DE AÇÃO DO ADUTO DE**
14 **MORITA-BAYLISHILLMAN (CH₃ISACN) COMO UM ANTIMALÁRICO**”. Após discorrer
15 sobre o referido tema durante cerca de 50 minutos, a candidata foi arguida pelos
16 examinadores na forma Regimental. Em seguida passou a comissão, em caráter secreto,
17 a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito
18 APROVADA. Em face da aprovação declarou a presidente achar-se a examinada,
19 **CINTHIA RODRIGUES MELO**, legalmente habilitado a receber o Título de “Doutora” em
20 Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, área Farmácia, cabendo a
21 Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma
22 que a mesma faz jus. Os trabalhos foram encerrados determinando a leitura para fins de
23 aprovação e a lavratura da presente ata devidamente assinada por todos os membros da
24 Banca Examinadora.

9
10

11

	UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS (UFRN/UFPB/UFRPE/UFC)	
--	--	--

João Pessoa, em 20 de fevereiro de 2024.

Documento assinado digitalmente
 **MARGARETH DE FATIMA FORMIGA MELO DINIZ**
Data: 20/02/2024 11:43:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz (orientadora)

Documento assinado digitalmente
 **VALTER FERREIRA DE ANDRADE NETO**
Data: 20/02/2024 13:27:42-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Valter Ferreira de Andrade Neto (co-orientador)

Documento assinado digitalmente
 **HILZETH DE LUNA FREIRE PESSOA**
Data: 29/02/2024 10:08:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Hilzeth de Luna Freire Pessôa (Examinador interno)

Documento assinado digitalmente
 **ABRAHAO ALVES DE OLIVEIRA FILHO**
Data: 23/02/2024 10:43:14-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Abrahao Alves de Oliveira Filho (Examinador interno)

Documento assinado digitalmente
 **VALESKA SANTANA DE SENA PEREIRA**
Data: 20/02/2024 13:49:53-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Valeska Santana de Sena Pereira (Examinadora Externa)

Documento assinado digitalmente
 **CLARICE ABRAMO**
Data: 21/02/2024 13:44:35-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Clarice Abramo (Examinadora Externa)

12
13
14
15
16

“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.

Ao meu esposo *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.

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.

À minha irmã de coração, *Ana Beatriz Vieira Soares* que há tantos anos me acompanha. 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.

Aos meus amigos e padrinhos *Alanna Carolina* e *Neto*, por me incentivarem e se fazerem presentes em todos os momentos.

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

A todos os integrantes do *LABETOX*, pelo apoio e manifestação de carinho:
Kardilândia, Tafacla Dias, Igor, Thyfanne

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. Muito obrigada por ter se empenhado tanto nesta pesquisa.

Aos alunos do *LABMAT*, em especial *Jecy, José e Bía* agradeço pela parceria e aprendizados.

Aos integrantes do laboratório de biofísica, coordenado pelo *prof Dr. Umberto Fulco*, agradeço pela colaboração, ensinamentos e paciência, em especial às alunas *Gabi* e *Katy*.

Aos funcionários da *UPA*, em especial à veterinária *Roberta* que sempre demonstrou afeto e prontidão em ajudar.

Aos avaliadores deste trabalho, *Profª. Drª. Hilzeth de Luna Freire Pessoa*, *Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho*, *Drª Valeska Santana de Sena Pereira* e *Drª Clarice Abramo* 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 Capes

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

Muito Obrigada

RESUMO

A malária é uma doença causada pela picada do mosquito fêmea *Anopheles*, que está infectado por espécies do gênero *Plasmodium*. Apesar de existirem diferentes antimaláricos, a resistência que os parasitos tem apresentado a estes é uma problemática, o que torna urgente o desenvolvimento de novos fármacos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade de doses repetidas do aduto 2- (3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila (CH₃ISACN), e sua capacidade de reduzir a parasitemia utilizando o modelo murinho *Plasmodium berghei*, bem como investigar seu mecanismo de ação como um antimalárico. O estudo toxicológico subagudo foi baseado na OECD 407 (2008). A CH₃ISACN foi administrada nos camundongos *Swiss* por via oral, durante 28 dias em diferentes doses. Os animais foram distribuídos em um grupo controle e três grupos tratados (75 mg/Kg, 150 mg/Kg, 300 mg/Kg). Cada grupo continha 5 machos e 5 fêmeas. Foram analisados o consumo de água, ração, peso corporal, sinais clínicos e mortalidade. Após 28 dias, os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésico, e seu sangue coletado para avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos, e seus órgãos coletados para análise histopatológica. Foi realizado estudo de genotoxicidade seguindo a OECD 474 (2014). Cada grupo continha três animais, sendo: grupo controle positivo (50 mg/Kg de ciclofosfamida), grupo controle negativo (veículo), grupo tratado 1 e 2 com 300 mg/Kg e 600 mg/Kg de CH₃ISACN respectivamente. A administração foi em dose única por gavagem, em 24 horas. Para avaliação farmacológica, foram separados 5 camundongos por grupo. Grupo 1: teste (250 mg/Kg do aduto); Grupo 2: controle negativo (veículo); Grupo 3: controle positivo (15 mg de cloroquina); Grupo 4: controle de órgãos. Inicialmente os animais foram inoculados via intraperitoneal com eritrócitos infectados com *P. berghei* ANKA, exceto o grupo 4. Receberam tratamento durante 4 dias consecutivos, e no 5º/7º dia após a infecção, esfregaços sanguíneos foram examinados para determinação da parasitemia. A mortalidade cumulativa foi observada até a morte de um dos animais do grupo 2. E os órgãos dos animais foram submetidos à análise histopatológica. O mecanismo de ação da CH₃ISACN como antiplasmodial, foi investigado a partir de sua capacidade de inibir falcipainas e/ou berghepains. Para isso foram realizadas abordagem de modelagem molecular e cálculos quânticos sendo aplicado análise de *docking*, dinâmica molecular, cálculos QM/MM, e MFCC. Os resultados toxicológicos mostraram que a CH₃ISACN não provocou alterações comportamentais, fisiológicas e histopatológicas. Também, não promoveu genotoxicidade nas doses testadas. Assim, os resultados obtidos não mostraram intoxicação significativa, garantindo maior segurança para seu uso. A CH₃ISACN foi ativa contra o *P.berghei*, reduzindo a parasitemia dos animais infectados em 49,7% e em sua análise histopatológica os animais tratados por CH₃ISACN apresentaram poucas alterações. Seu mecanismo de ação envolve a inibição das FP-2, FP-3, BP-1 e BP-2. A partir dos resultados já obtidos, a CH₃ISACN é promissora como protótipo para novo antimalárico. Sendo importante a continuação de seu estudo, para alcançar a fase clínica, e assim fazer parte do arsenal terapêutico contra a malária.

Palavras-chaves: Berghepains, Falcipains; Farmacologia; Malária; *Plasmodium berghei*; Toxicologia

ABSTRACT

Malaria is a disease caused by the bite of the female *Anopheles* mosquito, which is infected by species of the genus *Plasmodium*. Although there are different antimalarials, the resistance that parasites have shown to them is a problem, which makes the development of new medicines urgent. Thus, the present work aimed to evaluate the toxicity of repeated doses of the 2-(3-hydroxy-1-methyl-2-oxoindolin-3-yl) acrylonitrile adduct (CH₃ISACN), and its ability to reduce parasitemia using the model murine *Plasmodium berghei*, as well as investigating its mechanism of action as an antimalarial. The subacute toxicological study was based on OECD 407 (2008). CH₃ISACN was administered orally to Swiss mice for 28 days at different doses. The animals were distributed into a control group and three treated groups (75 mg/Kg, 150 mg/Kg, 300 mg/Kg). Each group contained 5 males and 5 females. Water consumption, feed, body weight, clinical signs and mortality were analyzed. After 28 days, the animals were euthanized by an overdose of anesthetic, and their blood was collected to evaluate biochemical and hematological parameters, and their organs were collected for histopathological analysis. A genotoxicity study was carried out following OECD 474 (2014). Each group contained three animals: positive control group (50 mg/kg of cyclophosphamide), negative control group (vehicle), group treated 1 and 2 with 300 mg/kg and 600 mg/kg of CH₃ISACN respectively. Administration was a single dose by gavage, over 24 hours. For pharmacological evaluation, 5 mice were separated per group. Group 1: test (250 mg/kg of the adduct); Group 2: negative control (vehicle); Group 3: positive control (15 mg of chloroquine); Group 4: organ control. Initially, the animals were inoculated intraperitoneally with erythrocytes infected with *P. berghei* ANKA, except group 4. They received treatment for 4 consecutive days, and on the 5th/7th day after infection, blood smears were examined to determine parasitemia. Cumulative mortality was observed until the death of one of the animals in group 2. And the animals' organs were subjected to histopathological analysis. The mechanism of action of CH₃ISACN as an antiplasmodial agent was investigated based on its ability to inhibit falcipains and/or berghepains. For this, a molecular modeling approach and quantum calculations were carried out, applying docking analysis, molecular dynamics, QM/MM calculations, and MFCC. The toxicological results showed that CH₃ISACN did not cause behavioral, physiological or histopathological changes. Also, it did not promote genotoxicity at the doses tested. Thus, the results obtained did not show significant intoxication, ensuring greater safety for its use. CH₃ISACN was active against *P.berghei*, reducing the parasitemia of infected animals by 49.7% and in its histopathological analysis, animals treated by CH₃ISACN showed few changes. Its mechanism of action involves the inhibition of FP-2, FP-3, BP-1 and BP-2. Based on the results already obtained, CH₃ISACN is promising as a prototype for a new antimalarial. It is important to continue its study, to reach the clinical phase, and thus be part of the therapeutic arsenal against malaria.

Keywords: Berghepains; Falcipains; Pharmacology; Malaria; *Plasmodium berghei*; Toxicology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura da 2- (3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila	24
Figura 2 - Casos de malária notificados segundo espécie parasitária, Brasil, 2019-2021	27
Figura 3 - Ciclo do <i>Plasmodium sp</i> no ser humano	29
Figura 4 - Compostos antimaláricos	35
Figura 5 - Representação Geral da Reação Morita-Baylis-Hillman	38
Figura 6 - Mecanismo de inibição de cisteína-protease através de aceptores de Michael	39
Figura 7 – Reação para preparação de CH ₃ ISACN	49
Figura 8 - Parede atrial do coração de ratas Wistar nos grupos experimentais agudo	75
Figura 9 - Estômago de ratas <i>Wistar</i> nos grupos experimentais agudo.	75
Figura 10 - Fígado das ratas <i>Wistar</i> dos grupos experimentais agudo.	76
Figura 11 – Região medular dos rins de ratas <i>Wistar</i> dos grupos experimentais agudo	76
Figura 12 - Análise da parede do coração (endocárdio e miocárdio) dos camundongos fêmeas.	78
Figura 13 - Análise da parede do coração (endocárdio e miocárdio) dos camundongos machos.	79
Figura 14 – Análise do estômago das fêmeas tratadas por CH ₃ ISACN no ensaio de doses repetidas.	80
Figura 15 - Análise do estômago dos machos tratados por CH ₃ ISACN no ensaio de doses repetidas.	81

Figura 16 - Análise do fígado das fêmeas tratados por CH ₃ ISACN no ensaio de doses repetidas.....	82
Figura 17 - Análise do fígado dos machos tratados por CH ₃ ISACN no ensaio de doses repetidas.....	83
Figura 18 - Análise dos rins dos camundongos fêmeas tratadas por CH ₃ ISACN no ensaio de doses repetidas.....	84
Figura 19 - Análise dos rins dos camundongos machos tratados por CH ₃ ISACN no ensaio de doses repetidas.....	85
Figura 20- Análise histopatológica do baço dos camundongos usados no teste de supressão.....	89
Figura 21 - Análise histopatológica do fígado dos camundongos usados no teste de supressão.....	91
Figura 22 - Comparação do sítio de ancoragem do ligante CH ₃ ISACN / E64 na FP-2 e CH ₃ ISACN / Leupeptina na FP-3.	93
Figura 23 - Representação esquemática da estrutura química do ligante, subdividido em duas regiões (i, ii).	98
Figura 24 - Representação da energia total de interação do complexo falcipaina-2 (a) e falcipaina-3 (b) com o ligante CH ₃ ISACN com o esquema MFCC usando duas constantes dielétricas ($\epsilon = 10$, $\epsilon = 40$).	99
Figura 25 - Representação das principais interações entre os dois complexos: (a) CH ₃ ISACN-FP2 (verde); (b) CH ₃ ISACN-FP3 (azul).	101
Figura 26 - Sítio de ancoragem do ligante CH ₃ ISACN na BP-1 e BP-2	102
Figura 27 - Energia total de interação do complexo berghepaína-1 (a) e berghepaína-2 (b) com o ligante CH ₃ ISACN com o esquema MFCC usando duas constantes dielétricas ($\epsilon = 10$, $\epsilon = 40$).	108
Figura 28 - Representação das principais interações entre os dois complexos: (a) CH ₃ ISACN-BP1 (rosa); (b) CH ₃ ISACN-BP2 (azul).	110

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 - Protocolo experimental de triagem farmacológica comportamental-----	52
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Avaliação do consumo de água e ração dos camundongos fêmeas tratadas com CH ₃ ISACN nas doses de 300 mg/Kg, 150 mg/Kg e 75 mg/Kg.	65
Tabela 2- Avaliação do consumo de água e ração dos camundongos machos tratados com CH ₃ ISACN nas doses de 300 mg/Kg, 150 mg/Kg e 75 mg/Kg.	65
Tabela 3 - Avaliação da evolução ponderal dos camundongos fêmeas tratadas com CH ₃ ISACN nas doses de 300 mg/Kg e 150 mg/Kg e 75 mg/Kg.....	67
Tabela 4 - Avaliação da evolução ponderal de camundongos machos tratados com CH ₃ ISACN nas doses de 300 mg/Kg e 150 mg/Kg e 75 mg/Kg.....	67
Tabela 5 - Avaliação bioquímica do sangue periférico dos camundongos fêmeas tratadas com CH ₃ ISACN, nas doses de 300 mg/Kg 150 mg/Kg e 75 mg/Kg.	68
Tabela 6 - Avaliação hematológica dos camundongos machos tratados com CH ₃ ISACN, nas doses de 300 mg/Kg, 150 mg/Kg e 75 mg/Kg.....	70
Tabela 7 - Avaliação hematológica dos camundongos fêmeas tratadas com CH ₃ ISACN, nas doses de 300 mg/Kg, 150 mg/Kg e 75 mg/Kg.....	71
Tabela 8 - Peso dos órgãos de camundongos Swiss fêmeas e machos (n= 40) tratados com CH ₃ ISACN nas doses de 300, 150 e 75 mg/kg.	74
Tabela 9 - Atividade quimiossupressora do composto CH ₃ ISACN avaliada no 5º dia contra infecção por <i>Plasmodium berghei</i> em camundongos.....	87
Tabela 10 - Energias de interação do ligante CH ₃ ISACN com as proteases falcipaina-2 e falcipaina-3.	93
Tabela 11 - Energias de interação do ligante CH ₃ ISACN com as proteases berghepaína-1 e berghepaína-2.....	103

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Gráfico 1 - Consumo de ração de camundongos fêmeas tratadas com a substância CH ₃ ISACN-----	65
Gráfico 2 - Consumo de água de camundongos machos tratados com a substância CH ₃ ISACN. -----	66
Gráfico 3 - Consumo de ração de camundongos machos tratados com a substância CH ₃ ISACN. -----	66
Gráfico 4 - Concentração de glicose no sangue periférico dos camundongos fêmeas tratadas com a substância CH ₃ ISACN. -----	69
Gráfico 5 - Concentração de proteínas totais no sangue periférico dos camundongos fêmeas tratadas com a substância CH ₃ ISACN. -----	69
Gráfico 6 - Avaliação da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) no sangue periférico dos camundongos tratados com a substância CH ₃ ISACN. ----	71
Gráfico 7 - Avaliação do hematócrito no sangue periférico das fêmeas tratadas com a substância CH ₃ ISACN.-----	72
Gráfico 8 - Avaliação da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) no sangue periférico das fêmeas tratadas com a substância CH ₃ ISACN. -----	72
Gráfico 9 - Avaliação do RDW no sangue periférico das fêmeas tratadas com a substância CH ₃ ISACN. -----	73
Gráfico 10 - Avaliação da frequência de micronúcleo em camundongos fêmeas tratadas com a substância CH ₃ ISACN. -----	86
Gráfico 11 - Relação entre a atividade antimalarial do composto CH ₃ ISACN comparado a cloroquina.-----	87
Gráfico 12 - Energias de interação do ligante CH ₃ ISACN com as proteases falcipaina-2 e falcipaina-3. -----	92

Gráfico 13 - RMSD das réplicas da proteína falcipáína-2 e CH ₃ ISACN.-----	94
Gráfico 14 - RMSD das réplicas da proteína falcipáína-3 e CH ₃ ISACN.-----	94
Gráfico 15 - RMSF das réplicas da proteína falcipáína-2 complexada com CH ₃ ISACN. -----	95
Gráfico 16 - RMSF das réplicas da proteína falcipáína-3 complexada com CH ₃ ISACN. -----	95
Gráfico 17 - Análise da Interação falcipáína-2 com a CH ₃ ISACN através do QM/MM. -----	96
Gráfico 18 - Análise da interação falcipáína-3 com a CH ₃ ISACN através do QM/MM. -----	97
Gráfico 19 - Energias de interação do ligante CH ₃ ISACN com as proteases berghepaína-1 e berghepaína-2. -----	103
Gráfico 20 - RMSD das réplicas da proteína berghepaína-1 e CH ₃ ISACN.-----	104
Gráfico 21 - RMSD das réplicas da proteína berghepaína-2 e CH ₃ ISACN.-----	104
Gráfico 22 - RMSF das réplicas da proteína berghepaína-1 complexada com CH ₃ ISACN. -----	105
Gráfico 23 - RMSF das réplicas da proteína berghepaína-2 complexada com CH ₃ ISACN. -----	105
Gráfico 24 - Análise da Interação berghepaína-1 com a CH ₃ ISACN através do QM/MM. -----	106
Gráfico 25 - Análise da interação berghepaína-2 com a CH ₃ ISACN através do QM/MM. -----	106

LISTA DE ABREVIATURAS

AST - Aspartato Amino Transferase
ALT - Alanina Amino Transferase
AMBH - Aduto de Morita-Baylis-Hillman
Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA - Análise de Variância
BP-1 - Berghepaína-1
BP-2 - Berghepaína-2
CA - Ensaio do Cometa
Cl₅₀ – Concentração inibitória média
CHCM - Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média
CH₃ISACN - 2 - (3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila
CHRAMM - *Chemistry at Harvard Molecular Mechanics*
CPCM - *Continuous Polarizable Continuum Model*
DFT - *Density Functional Theory*
DHFR - Dihidrofolato Redutase
DHPS - Dihidropteroato Sintetase
DL₅₀ – Dose Letal 50%
DM – Dinâmica Molecular
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetracético
FAL – Fosfatase Alcalina
FP-1 - Falcipaína-1
FP-2 - Falcipaína-2
FP-3 - Falcipaína-3
Fs - Femtossegundos
GGT - Gama Glutil Transferase
HCM - Hemoglobina Corpuscular Média
IP - Intraperitoneal
IPeFarM - Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
LABETOX - Laboratório de Ensaio Toxicológicos
LABMAT - Laboratório de Biologia da Malária e Toxoplasmoses
LASOM-PB - Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Paraíba
MFCC - Método de Fragmentação Molecular com Capas Conjugadas

MNA - Ensaio do Micronúcleo
OECD - *Organization for Economic Cooperation and Development*
PDB - *Protein Data Bank*
PfCRT - Transportador de Resistência à Cloroquina
PfMDR1 - *Plasmodium falciparum Multidrug Resistance 1*
QM/MM - Mecânica Quântica e Mecânica Molecular
RDW - *Red cell Distribution Width*
RCSB - *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics*
RMSD - *Root Mean Square Deviation*
RMSF - *Root Mean Square Fluctuation*
SNA – Sistema Nervoso Autônomo
SNC - Sistema Nervoso Central
TCA - Terapia Combinada de Artemisinina
UFPB - Universidade Federal da Paraíba
UFRN – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
UPA - Unidade de Produção Animal
VCM - Volume Corpuscular Médio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REFERENCIAL TEÓRICO	26
2.1 MALÁRIA	26
2.1.1 Epidemiologia.....	26
2.1.2 Infecção e ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> e manifestações clínicas da malária	28
2.1.3 Cisteína-Proteases: falcipainas	30
2.1.4 Cisteína-Proteases: berghepaínas.....	33
2.1.5 Antimaláricos e resistência parasitária.....	34
2.2 SUBSTÂNCIAS SÍNTÉTICAS	37
2.2.1 Síntese orgânica.....	37
2.2.2 Aceptor de Michael e adutos de Morita-Baylis-Hillman	38
2.3 ESTUDOS TOXICOLÓGICOS.....	40
2.3.1 Ensaio <i>in vivo</i>	40
2.3.1.1 Toxicidade de doses repetidas	41
2.3.1.2 Teste de micronúcleo	43
2.4- AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA.....	43
2.4.1 Estudo antiplasmodial <i>in vivo</i>	43
2.4.2 Estudos computacionais <i>in silico</i>	45
3. OBJETIVOS.....	47
3.1 OBJETIVO GERAL	47
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4. MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 LOCAL DA PESQUISA.....	48
4.2 MATERIAIS	48
4.2.1 Substância Teste.....	48

4.2.2 Animais	49
4.3 MÉTODOS.....	50
4.3.1 Ensaio toxicológico in vivo.....	50
4.3.1.1 Toxicidade oral aguda	50
4.3.1.2 Toxicidade oral de doses repetidas.....	50
4.3.1.3 Avaliação comportamental.....	51
4.3.1.4 Consumo de água, alimento e avaliação ponderal	53
4.3.1.5 Avaliação laboratorial do sangue	53
4.3.1.5.1 Avaliação dos parâmetros bioquímicos.....	53
4.3.1.5.2 Avaliação dos parâmetros hematológicos	54
4.3.1.6 Avaliação anatomopatológica e histopatológica	54
4.3.1.7 Genotoxicidade	54
4.3.2 Estudo farmacológico	55
4.3.2.1 Infecção.....	55
4.3.2.2 Ensaio antiplasmodial <i>in vivo</i>	56
4.3.2.3 Avaliação do mecanismo de ação - estudos in silico.....	57
4.3.2.3.1 Obtenção da estrutura do cristal da falciparina e do ligante.....	57
4.3.2.3.2 Ancoragem molecular (<i>Docking</i>)	57
4.3.2.3.3 Dinâmica molecular (DM) do complexo proteína-ligante.....	58
4.3.2.3.4 Análise de interação proteína-ligante usando QM/MM GBSA.....	59
4.3.2.3.5 Determinação do estado de protonação e otimização da estrutura	60
4.3.2.3.6 Determinação das energias de interação e simulação computacional.....	60
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	62
5. RESULTADOS	64
5.1 ENSAIOS TOXICOLÓGICOS	64
5.1.1 Estudo <i>in vivo</i> não-clínico de doses repetidas em roedores	64

5.1.1.1 Avaliação comportamental.....	64
5.1.1.2 Avaliação do consumo de água e ração	64
5.1.1.3 Avaliação da evolução ponderal.....	67
5.1.1.4 Avaliação bioquímica dos animais tratados com CH ₃ ISACN	68
5.1.1.5 Avaliação hematológica	70
5.1.1.6 Peso dos órgãos dos animais.....	73
5.1.1.7 Avaliação histopatológica	74
5.1.1.7.1 Avaliação histopatológica do estudo agudo com ratas <i>Wistar</i>	74
5.1.1.7.2 Avaliação histopatológica do estudo de doses repetidas com camundongos tratados pela CH ₃ ISACN	77
5.1.2 Estudo de genotoxicidade – teste do micronúcleo	85
5.2 AVALIAÇÃO ANTIPLASMODIAL <i>IN VIVO</i>	86
5.2.1 Análise histopatológica dos animais infectados por <i>Plasmodium berghei</i>	87
5.3 DETERMINAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DA CH ₃ ISACN COMO INIBIDOR DAS FALCIPAÍNAS - <i>IN SILICO</i>	91
5.3.1 Docking molecular das proteínas FP2/ FP3 com a CH ₃ ISACN.....	91
5.3.2 Análise de dinâmica molecular da CH ₃ ISACN com as proteases falcipaina-2 e falcipaina-3	93
5.3.3 Avaliação da interação entre CH ₃ ISACN usando o MFCC - Método de Fragmentação Molecular com Capas Conjugadas	97
5.3.3.1 Energia de interação dos principais aminoácidos envolvidos na formação do complexo.....	100
5.4 DETERMINAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DA CH ₃ ISACN COMO INIBIDOR DAS BERGHEPAÍNAS - <i>IN SILICO</i>	102
5.4.1 Docking molecular das proteínas BP1/BP2 com a CH ₃ ISACN.....	102
5.4.2 Análise de dinâmica molecular da CH ₃ ISACN com as proteases berghepaína-1 e berghepaína-2.....	103

5.4.3 Avaliação da interação entre CH ₃ ISACN usando o MFCC - Método de Fragmentação Molecular com Capas Conjugadas	107
5.4.3.1 Avaliação da energia de interação dos principais aminoácidos envolvidos na formação do complexo.....	109
6. DISCUSSÃO	111
7. CONCLUSÃO	124
8. REFERÊNCIAS.....	125
9. ANEXOS	139
Anexo A- Certidão do Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA)-UFPB	139
Anexo B- Certidão do Comitê de Ética em uso Animal (CEUA)-UFRN	141
Anexo C- Artigo científico publicado resultante da presente tese.....	142
Anexo D- Submissão de artigo científico relacionado a tese	143

1. INTRODUÇÃO

Cerca de 249 milhões de pessoas foram acometidas pela malária em 2022 (WHO, 2023), um aumento de 2 milhões quando comparado ao ano de 2021 (WHO, 2022). Esta doença é transmitida ao homem através da picada do mosquito fêmea *Anopheles*, quando infectado por espécies do gênero *Plasmodium* que causam a malária humana (Talapko *et al.*, 2019). Os sinais e sintomas iniciais podem simular uma gripe mais forte e/ou doenças virais hemorrágicas, e isso gerar um diagnóstico tardio, prejudicando o tratamento. O paciente infectado pode apresentar sinais e sintomas como: dores de cabeça, dores nas articulações, febre, calafrios, vômitos e outros. Porém, os sintomas podem agravar, levando a anemia grave, dificuldade respiratória, acidose metabólica, edema pulmonar, e se não tratada pode levar a morte (Cock; Selesho; Van vuuren, 2019).

Em algumas regiões, como no continente africano, as infecções provocadas pela espécie *Plasmodium falciparum* são as mais comuns e de maior gravidade em humanos, quando comparado com as outras espécies (Singh *et al.*, 2007; Cock; Selesho; Van, 2019). O *P. falciparum* tem alta taxa de replicação e pode provocar anemia grave, levando o paciente a óbito. Isto se deve pela capacidade do parasito em invadir os eritrócitos e degradar a hemoglobina. Estas ações são provocadas por diferentes enzimas, entre elas as falcipainas que são muito importantes para a sobrevivência do *P. falciparum* (Rosenthal, 2020). As falcipainas são cisteínas proteases, classificadas em: falcipaina-1 (FP-1), falcipaina-2', falcipaina-2 (FP-2) e falcipaina-3 (FP-3), sendo as duas últimas alvos potenciais para candidatos a antimaláricos contra o *Plasmodium falciparum* (Singh *et al.*, 2007).

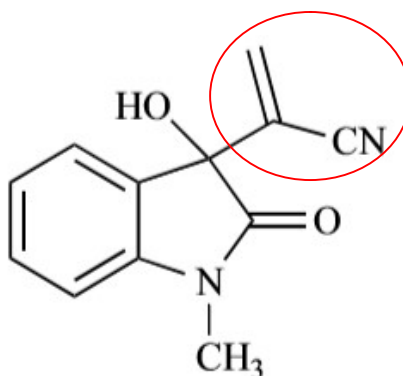
Para roedores, uma das espécies capaz de infectá-los é o *Plasmodium berghei*, que é a principal espécie utilizada quando se quer estudar novos antimaláricos *in vivo* e/ou aspectos da interação parasito-hospedeiro. Esta espécie também apresenta cisteínas proteases, sendo estas chamadas de berghepaina-1 (BP-1) e berghepaina - 2 (BP-2), com importante função na invasão eritrocitária e degradação de hemoglobina respectivamente (Lin *et al.*, 2015, Hopp *et al.*, 2017).

Tendo em vista a resistência dos mosquitos aos inseticidas, a escassez de vacinas eficientes disponíveis e o aumento de genótipos de parasitos multi-resistentes aos antimaláricos disponíveis, existe uma necessidade urgente no

desenvolvimento de novos medicamentos para combater a malária (Hopp *et al.*, 2017).

Assim, um potencial candidato a antimalárico que vem sendo estudado por este grupo de pesquisa, é a substância 2- (3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila, também chamada por CH₃ISACN (Figura 1). No estudo de Melo (2020), o ensaio *in vitro* mostrou que a CH₃ISACN nas concentrações de 25 e 50 µg/mL reduziram o crescimento da parasitemia em 84-97%, respectivamente. O valor de Cl₅₀ obtido foi de 8,4 µg/mL. Além do mais, o estudo toxicológico agudo *in vivo*, demonstrou uma alta DL₅₀ >5000 mg/Kg, indicando assim ser uma substância com uma boa taxa de segurança (Melo, 2020). Assim, é pertinente que mais estudos toxicológicos e farmacológicos sejam realizados com a CH₃ISACN.

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



Legenda: circulo vermelho indicando a porção acrilonitrila

Fonte: Adaptada de Lima-Junior *et al.*, 2016

Após o estudo toxicológico agudo, é importante que seja realizado o ensaio subagudo, tendo em vista que este último visa avaliar possíveis efeitos adversos, após a administração da substância em doses repetidas por um período de tempo maior (Al-afifi *et al.*, 2018; Negi; Pasam; Dandekar, 2022). Para realizar este ensaio, um dos protocolos é a OECD 407 (2008). Além deste, ensaios de genotoxicidade também são importantes para investigar a segurança de uma substância, e um dos protocolos utilizados é a OECD 474 (2014), no qual investiga danos induzidos pela substância teste nos cromossomos ou no aparelho mitótico dos eritroblastos.

É sabido que a eficácia de vários antimaláricos está comprometida devido a resistência das espécies de *Plasmodium* (Patel *et al.*, 2017). E por isso, é urgente a necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos, sendo os estudos *in vivo* importantes para tal descoberta. Um ensaio comumente utilizado no meio científico é o teste de supressão, que infecta animais com *P. berghei*, e trata-os com a substância teste durante 4 dias, sendo ao final observado a porcentagem de parasitemia e a sua supressão (Alebachew *et al.*, 2021).

Sabendo que a CH₃ISACN possui em sua constituição uma porção acrilonitrila, que se comporta como um aceptor de Michael (destaque em vermelho Figura 1) (Lima-Junior, *et al.*, 2016), e que moléculas que apresentam tal estrutura tem se apresentado como potenciais inibidores de cisteína-proteases (Santos, Moreira, 2007), é pertinente ser investigado a sua capacidade de inibição das falcipaínas e berghepaínas. Para isso, o uso de ferramentas computacionais se faz oportuno, pois associado aos estudos toxicológicos e farmacológicos, uma maneira de otimizar o desenvolvimento de medicamentos, é através de ensaios *in silico*. O *Docking* molecular, Dinâmica de simulação molecular e o Método de Fragmentação Molecular com Capas Conjugadas (MFCC), são exemplos de ferramentas *in silico* bem consolidadas e que tem sido utilizadas para prever como a substância teste é capaz de se ligar ao seu alvo, facilitando assim a compreensão sobre o seu mecanismo de ação (Shaker *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2022).

Diante da necessidade de se encontrar novas terapias farmacológicas para o tratamento da malária, e tendo em vista os bons resultados obtidos anteriormente da CH₃ISACN como um antimalárico promissor, o seguinte trabalho se propôs realizar estudos toxicológico de doses repetidas e farmacológicos *in silico* e *in vivo*, além de investigar o possível mecanismo de ação da substância como antagonista das cisteína-proteases de *Plasmodium* spp.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 MALÁRIA

2.1.1 Epidemiologia

A malária é um sério problema de saúde global. Em 2022 ela acometeu cerca de 249 milhões de pessoas no mundo, provocando 608.000 mortes (WHO 2023). Entre 2019 e 2021 devido a pandemia de COVID-19, ocorreram interrupções nos serviços essenciais de malária, o que favoreceu ao não tratamento da doença de forma adequada, e consequentemente acarretou em uma grande quantidade de mortes (WHO, 2022). Além deste fator, devido à semelhança dos sinais e sintomas da malária com a COVID-19 (febre, dificuldades respiratórias, cansaço e dor de cabeça aguda), acredita-se que alguns diagnósticos tenham sido incorretos, ou pode ter ocorrido casos de co-infecção (Hussein *et al.*, 2020).

Os países onde essa doença é endêmica têm a característica de um clima tropical, que é propício à reprodução do mosquito e, consequentemente, a transmissão do parasito para o humano (Mbanefo, Kumar 2020). A África é o principal continente acometido pela malária, e esta é uma das principais causas de morte no continente africano. Entre 2019 e 2021 os casos de malária aumentaram de 218 milhões para 234 milhões no continente (WHO, 2022).

As espécies capazes de infectar o homem são seis: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale wallickeri*, *Plasmodium ovale curtisi*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlesi*. Estas espécies passam por diferentes estados morfológicos, e são capazes de se replicarem em até mais que 10.000 células (Milner 2018). A duração de cada ciclo eritrocítico é de aproximadamente 48 h para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*, 24 h para *P. knowlesi* e 72 h para *P. malariae* (Su *et al.*, 2019).

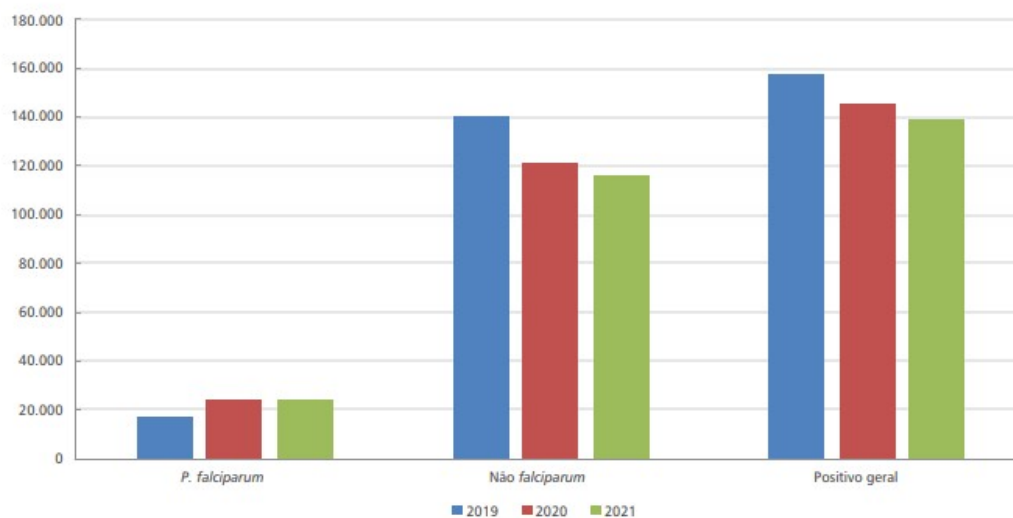
Um fator que tem provocado o aumento da prevalência da malária na África, é a disseminação local de *P. falciparum* clinicamente resistente aos derivados de artemisinina, devido a mutações gênicas (Balikagala *et al.*, 2021).

Além do *P.falciparum*, o *P. vivax* também começa a apresentar uma incidência preocupante nos países africanos. Desde 2010, o número de estudos que

identificam o *P. vivax* endêmico na África aumentou consideravelmente, o que torna ainda mais complicada a formulação de estratégias de eliminação desta doença. Sendo um desafio para os órgãos governamentais, a montagem de estratégias de políticas e práticas de erradicação voltadas para todas as espécies de plasmódios que causam a malária humana (Twohig *et al.*, 2019).

Nas Américas tem sido observado uma boa redução de casos, porém os números ainda são elevados, cerca de 597.000 infectados por malária. A Venezuela, Brasil e Colômbia representaram mais de 79% de todos os casos nesta região (WHO, 2022). No Brasil foram registrados 139.211 casos de malária. Destes, 99% tiveram transmissão relatada dentro do Brasil, sendo 17% por *P. falciparum* e malária mista, e 83% por *P. vivax* e outras espécies (Figura 2) (Ministério da saúde, 2022).

Figura 2 - Casos de malária notificados segundo espécie parasitária, Brasil, 2019-2021



Fonte: Ministério da Saúde, 2022.

A região amazônica é onde se concentram 99,9% dos casos de malária no Brasil, principalmente na região rural e indígena. Porém, em 2021 foram registrados surtos em regiões extra-amazônica. A maior parte dos casos de malária nestas regiões é dita “malária importada”. Isto se refere à doença que foi diagnosticada fora da área de infecção, sendo adquirida por migração para região endêmica

(Albuquerque *et al.*, 2019). Em 2021 foram registrados 1350 casos de malária importados de outros países, sendo os principais: Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Nicarágua, Peru, Porto Rico, Suriname e Venezuela. Com a redução dos deslocamentos devido à pandemia, observou-se que em 2021 houve uma redução de 26,3% do número de casos de malária importada em relação a 2020 (Ministério da saúde, 2022).

A fim de monitorar a doença, a Organização Mundial da Saúde tem desenvolvido medidas de controle da malária por todo mundo, através de ações que visem o fortalecimento da atenção primária, objetivando o diagnóstico da doença de forma precoce e do seu devido tratamento (Talapko *et al.*, 2019).

No Brasil, o estudo da malária vem de longos anos, e importantes pesquisadores contribuíram para a investigação desta doença. Maria Deane e Leônidas Deane foram grandes pesquisadores da transmissibilidade da malária e formas de erradicação (Deane; Deane; Neto, 1966). Vitor e Ruth Nussenzweig desenvolveram importante trabalho para que fosse despertado a pesquisa por vacinas antimaláricas (Nussenzweig *et al.*, 1967). Dentre outros pesquisadores importantes para pesquisa de fármacos antimaláricos, como Antoniana Krettli (Krettli, 2009) e Alejandro Katzin (Crispim *et al.*, 2022).

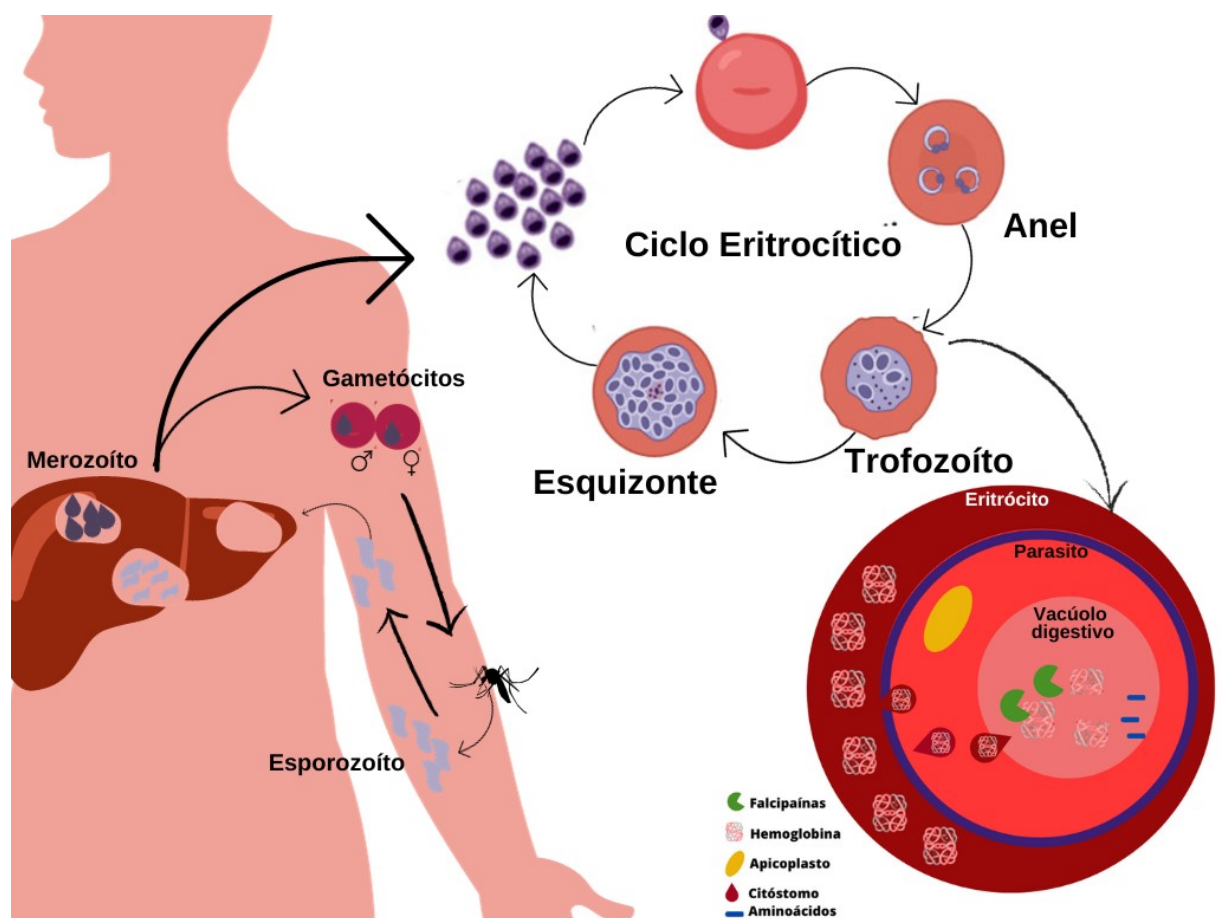
2.1.2 Infecção e ciclo biológico do *Plasmodium* e manifestações clínicas da malária

Para desenvolver novas possibilidades de terapia para o tratamento da malária, é importante entender a biologia do parasito, e como este se manifesta dentro do hospedeiro (Meibalan; Marti, 2017). A transmissão da malária se dá através da picada da fêmea do mosquito *Anopheles*. Este é um ótimo vetor, pois além de permanecer ileso com a presença do parasito, as suas características biológicas e adaptabilidade ecológica garantem a transmissibilidade da doença (Mbanefo, Kumar 2020).

Ao picar o ser humano, o mosquito injeta o *Plasmodium* na forma de esporozoítos. Estes atingem a circulação sanguínea e migram para o fígado, onde se alojam nos hepatócitos e replicam-se na forma de merozoítos, sendo posteriormente liberados na corrente sanguínea. Os merozoítos invadem os

eritrócitos (ciclo eritrocítico), e se desenvolvem no estágio de anel, seguindo na forma de trofozoítos e esquizontes, quando novos merozoítos reinvasam novos eritrócitos. Parte dos parasitos em estágio sanguíneo se desenvolvem em estágios sexuais chamados gametócitos, que acabam sendo capturados por outro mosquito quando estes realizam o repasto sanguíneo. No intestino do mosquito ocorre a fertilização e o desenvolvimento esporogônico, originando novos esporozoítos que migram para as glândulas salivares do mosquito, e assim recomeça todo ciclo (Meibalan; Marti, 2017). Na fase em que os parasitos estão sob a forma de trofozoítos, é formado um vacúolo digestivo que é um lisossomo especializado. Este é visível, e é nesta fase que a hemoglobina é captada pelo parasito através de um citóstomo e entregue no vacúolo digestivo, onde sofre digestão por várias enzimas, entre elas as falcipainas (Edgar *et al.*, 2022).

Figura 3 - Ciclo do *Plasmodium sp* no ser humano



Fonte: adaptada de Edgar *et al.*, 2022.

Após a captura da hemoglobina para o vacúolo, ocorre uma sucessão de eventos dirigidos por proteases. Começando pelas plasmepsinas, que iniciam o processo de degradação da hemoglobina (Liu *et al.*, 2005), seguido pelas cisteínas proteases falcipáinas. Todo esse processo leva a liberação de aminoácidos que serão utilizados tanto para nutrição do parasito, como para síntese proteica (Patra *et al.*, 2023).

As manifestações clínicas da malária estão associadas aos estágios eritrocíticos assexuados, no qual a forma de anel se desenvolve em forma de esquizontes que por sua vez liberam merozoítos (Meibalan; Marti, 2017). Os sinais e sintomas clínicos nos seres humanos podem se manifestar de diferentes formas, que vão desde sintomas como febre, anemia, coma e até mesmo morte. O quadro clínico no hospedeiro pode variar de acordo com o seu sistema imune e o grau de parasitemia induzida pelo *Plasmodium* (Su *et al.*, 2019). Na malária não complicada, a febre é o sintoma mais observado, mas sem sinais clínicos ou laboratoriais que indiquem gravidade ou disfunção de órgãos vitais. Nesse caso, a doença é facilmente tratada através de antimaláricos. O paciente tendo uma boa adesão ao tratamento, consegue uma boa recuperação (Milner 2018). É considerada uma malária grave, quando há o comprometimento de órgãos vitais, além de provocar choque, edema pulmonar, sangramento significativo, convulsões, consciência prejudicada e anormalidades laboratoriais, como insuficiência renal e acidose (Daily, Minuti, Khan 2022).

Um dos maiores problemas ocasionados pela malária, é a anemia. Esta pode ocorrer em qualquer idade, mas são as crianças e as mulheres grávidas que apresentam as situações mais graves. Além de ocasionar a hemólise dos eritrócitos, a malária ainda provoca diseritropoiese na medula óssea, o que prejudica a produção de novos glóbulos vermelhos, e conseqüentemente retarda a recuperação da anemia. A anemia provocada pela malária pode se agravar, tendo muitas vezes o paciente que fazer transfusão de sangue (White, 2018).

2.1.3 Cisteína-Proteases: falcipáinas

As proteases consistem em uma grande família de enzimas, que podem ser divididas em grupos de acordo com o seu mecanismo catalítico usado durante uma

hidrólise. Os principais tipos catalíticos são: serina, treonina, aspartato, metalo e cisteína proteases. As cisteínas-proteases apresentam algumas semelhanças com as proteases de serina, mas devido à camada extra de elétrons presentes no enxofre do grupo tiol, são melhores nucleófilos. É observado um grande interesse no estudo pelas cisteínas-proteases, devido sua importância para o ciclo de vida e patogenicidade de muitos parasitos. Isto se deve por sua nucleofilicidade e adaptabilidade a diferentes substratos e estabilidade em diferentes ambientes biológicos (Sajid, Mckerrow 2002).

A função de cisteínas-proteases e dos efeitos de seus inibidores no *P. falciparum* vem sendo estudada desde 1987 (Rosenthal, 1987). Posteriormente foram codificados genes de cisteínas-proteases referentes à família das papaínas (Rosenthal, Nelson 1992), sendo conhecidos como: falcipaína-1 (FP-1), falcipaína-2 (FP-2) (Shenai *et al.*, 2000), falcipaína-3 (FP-3) (Sijwali *et al.*, 2001) e falcipaína-2' (Singh *et al.*, 2006).

As falcipaínas são de grande importância para manutenção do ciclo de vida do *P. falciparum*. Estas enzimas atuam na invasão aos eritrócitos, degradação da hemoglobina, e no seu desenvolvimento proteolítico de forma geral. Sendo assim um ótimo alvo terapêutico, e por isso diversos estudos têm sido realizados para buscar inibidores dessas enzimas (Rojas, Cabrera-Muñoz, Valonso-del-Rivero 2019; Rosenthal, 2020). A inibição enzimática bloqueia a hidrólise da hemoglobina de forma a impedir o fornecimento de aminoácidos para a síntese de proteínas no parasito (Sijwali *et al.*, 2001; Ettari *et al.*, 2021). As falcipaínas se localizam dentro do vacúolo alimentar, e tem um bom funcionamento em um pH ácido (Sijwali *et al.*, 2004).

Estudos mostram que a falcipaína-1 (FP-1) apesar de ser expressa em parasitos em seu ciclo eritrocítico, parece não ser imprescindível para o seu desenvolvimento intraeritrocítico, ou para a invasão em novos eritrócitos (Rosenthal, 2020; SIJWALI *et al.*, 2004). Já as falcipaínas 2 e 3 tem grande importância durante o ciclo do parasito, no qual a inibição destas enzimas leva ao bloqueio da hidrólise da hemoglobina, assim como também interrompe o ciclo de vida do parasito (Rosenthal, 2020).

A FP-2 e FP-3 são bioquimicamente semelhantes, e parecem ser as principais papaínas nos parasitos eritrocíticos. Ambas são expressas por trofozoítos,

sendo a FP-2 expressa principalmente nos trofozoítos iniciais e a FP-3 nos trofozoítos maduros e esquizontes. Parecem estar localizadas no vacúolo alimentar, local de hidrólise da hemoglobina (Rosenthal, 2020; Sijwali *et al.*, 2001). Pelo fato da similaridade, compartilhando cerca de 68% de homologia, algumas substâncias acabam inibindo duplamente essas enzimas (Rana *et al.*, 2020).

A porção catalítica da FP-2 e FP-3 consiste em um terminal amino que contém um “nose-like” composto por dezesseis aminoácidos e medeia o dobramento destas falcipainas no seu estado ativo. Essa região catalítica, denominada como “nose-like” não está presente em outras proteases da família da papaína. Já próximo ao terminal carboxi (que não é catalítico) encontra-se uma sequência de 14 aminoácidos (chamado de “arm-like”) que medeiam a interação com a hemoglobina (Wang *et al.*, 2006).

As regiões de interação entre a FP-2 e a hemoglobina são os aminoácidos: glutamina-185 e valina-187 na região C-terminal. Já na falcipaina-3 o resíduo asparagina-194 é necessário para a hidrólise da hemoglobina. Estas regiões são importantes alvos de inibição mediada por drogas (Pasupureddy *et al.*, 2019).

Ambas se apresentam como bons alvos para antimaláricos, porém a inibição da FP-3 se mostra melhor, já que os estudos revelam que ao bloquear o gene da FP-2, o parasito tende a se recuperar, possivelmente por expressar a FP-3. Logo, o bloqueio da FP-3 se torna mais efetivo, sendo esta uma enzima essencial para o parasito (Rosenthal, 2020). Porém, não há uma maior elucidação sobre o porquê do parasito não conseguir se recuperar pelo bloqueio à FP-3.

A FP-2 é sintetizada na forma de zimogênio, e sua região pró-domínio é capaz de inibir a atividade da enzima madura (Pandey *et al.*, 2009). Estas enzimas apresentam domínios “pró” e “maduros” que se ligam através de interações conhecidas como “hot-spot”, importantes para a integridade estrutural da enzima no estado de zimogênio. Ao romper tais ligações a enzima fica então ativa. Assim, esta região tem sido investigada como local para inibição alostérica, bloqueando o auto processamento da enzima (Pant *et al.*, 2018). A região de domínio e pró-domínio maduro da FP-2 e da FP-3 interagem por meio de pontes salinas e interações hidrofóbicas (Sundararaj *et al.*, 2012).

O estudo das falcipainas como alvos terapêuticos é válido por elas terem um papel essencial na patogênese da malária. O fato de terem estruturas cristalinas

disponíveis, e por conter bolsos catalíticos facilita o desenvolvimento de novas drogas (Patra *et al.*, 2023).

2.1.4 Cisteína-Proteases: berghepaínas

O *Plasmodium berghei*, é a espécie mais utilizada em estudos *in vivo* para antimaláricos (Stoye *et al.*, 2019; Udu, Oyweri, Gathirwa, 2021; Walter *et al.*, 2021; Uddin *et al.*, 2022). É importante investigar os parasitos de roedores, tendo em vista que os modelos murinos são essenciais para descoberta de novos antimaláricos. Se para o *Plasmodium falciparum* as cisteínas proteases presentes são as falcipaínas; para o *Plasmodium berghei*, são as berghepaínas. Porém, o *P. berghei* apresenta um repertório de proteases menor, sendo a berghepaína-1 (BP-1) um órtologo da FP-1 e a berghepaína-2 (BP-2) um órtologo da FP-2/3 (Rosenthal *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2015).

Hopp *et al.*, (2017), mostra que ao interromper a BP-1 no *P.berghei*, provocou um atraso da infecção no estágio sanguíneo após a inoculação do esporozoítio. Foi visto que esse mutante apresenta uma restrição de invasão a reticulócitos. Assim a BP-1 tem função importante em ampliar as possibilidades do parasito de infecção eritrocitária, podendo infectar normócitos. Além disso, foi visto que a BP-1 tem papel importante para infectividade hepática e eritrocitária por merozoítos, principalmente nos merozoítos derivados de hepatócitos, que embora estruturalmente semelhantes aos merozoítos eritrocíticos, não são idênticos. Viu-se também uma função desta protease na infecção de glóbulos vermelhos maduros.

Com arquitetura semelhante ao de falcipaínas, a BP-2 é o único homólogo da FP-2 e FP-3, com 53% e 49% de semelhança respectivamente. Também apresenta uma semelhança de 78% com a vinckepaina-2, protease relacionada ao parasito *P. vinckei* (Singh *et al.*, 2007).

Apesar da BP-2 ser um ortólogo da FP-2, ambas apresentam diferentes atividades bioquímicas. Estudos mostram que a BP-2 apresenta atividade ótima em pH de 5,5–6,0, e estudos de mutagênese mostram substituição de aminoácidos Val63 e Arg230 da BP-2, o que pode explicar essas diferenças bioquímicas e consequentemente levar a diferentes sensibilidades aos inibidores durante a triagem dos medicamentos (Cheryl, Lih-Ling; Tiow-Suan, 2005). A BP-2, diferentemente da

FP-2, parece não ter participação na clivagem de proteínas no citoesqueleto, consequentemente não ocasionando ruptura eritrocitária. Devido às diferenças bioquímicas, existe uma preocupação quanto ao uso de *P.berghei* em modelo animal para triagem de inibidores FP-2 (Cheryl, Liuh-Ling; Tiow-Suan, 2005).

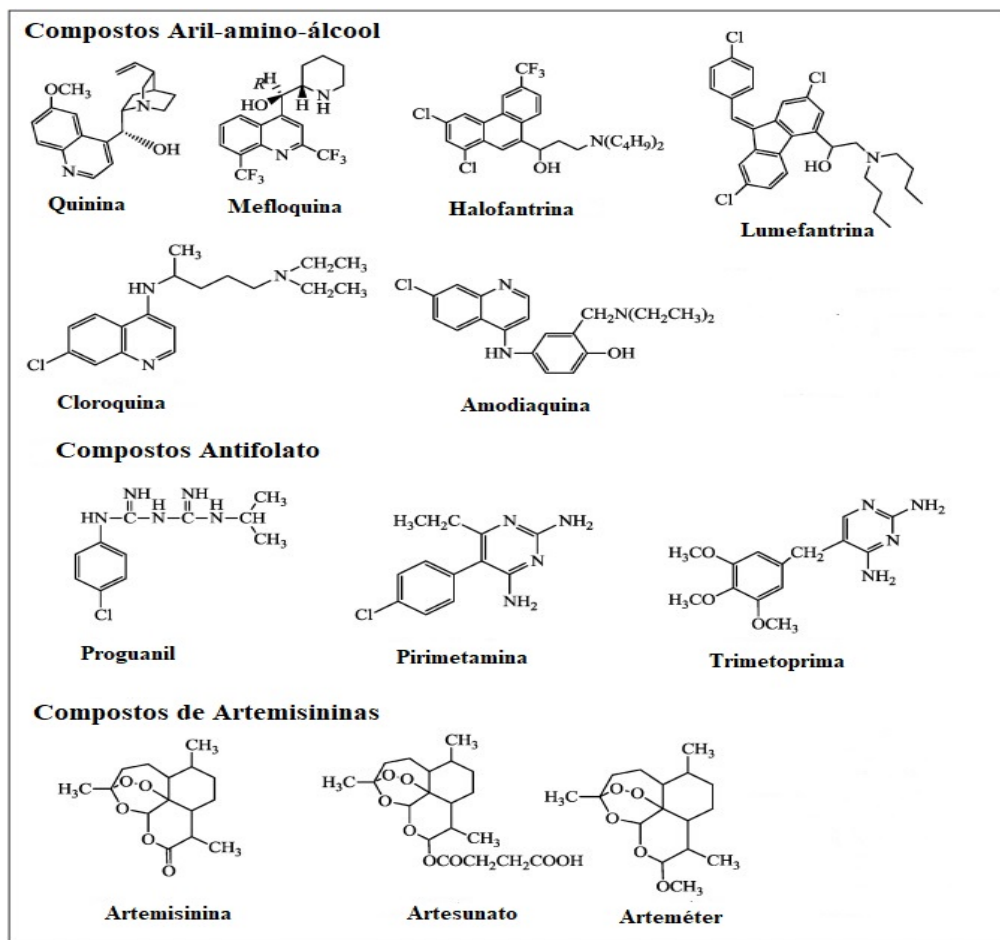
Assim como às falciparinas, a BP-2, está envolvida na digestão de hemoglobina. Um estudo com mutantes de *P. berghei*, ausentes de BP-2, demonstrou uma diminuição da presença de hemozoína (pigmento proveniente da degradação de hemoglobina), e consequentemente um aumento da concentração da hemoglobina no citoplasma de reticulócitos. Foi visto que o nocaute de BP-2 exibiu uma replicação reduzida em comparação com os parasitos controle. Mas apresentaram resistência à cloroquina, podendo implicar em um mecanismo de resistência a drogas (Lin *et al.*, 2015).

2.1.5 Antimaláricos e resistência parasitária

A quimioprofilaxia e o tratamento para o combate a malária são determinados de acordo com a espécie do *Plasmodium*, e o estágio do ciclo em que as substâncias irão atuar, podendo ser: esquizonticidas sanguíneos (agindo no estágio eritrocítico assexuado do parasito), esquizonticidas teciduais (o alvo são os hipnozoítos), gametocitocidas (ação no estágio eritrocítico sexual do parasito) e esporontocidas (inibem a formação de oocistos). Os esquizonticidas sanguíneos são o primeiro o principal alvo da maioria dos antimaláricos (Shibeshi *et al.*, 2020).

Atualmente os medicamentos antimaláricos são categorizados em três tipos: compostos aril-amino-álcool (quinina, quinidina, halofantrina, lumafantrina, cloroquina, amodiaquina, mefloquina, etc); antifolatos (proguanil, pirimetamina, trimetoprim, etc) e lactonas sesquiterpênicas (artemisinina, dihidroartemisinina, artesunato, arteméter, etc) (Kumar, *et al.*, 2018) (Figura 4). Para a malária grave, o artesunato intravenoso é a terapia de primeira linha (Daily, Minuti, Khan 2022).

Figura 4 - Compostos antimaláricos



Fonte: adaptado de Kumar *et. al.*, 2018

Os compostos quinolínicos como a cloroquina, afetam a polimerização da hemozoína, formando assim um complexo tóxico ao protozoário. A cloroquina é um dos medicamentos mais antigos utilizados, porém tem apresentado resistência principalmente pela espécie *Plasmodium falciparum*, e vem sendo substituída pelos derivados de artemisinina. O mecanismo de resistência se dá por mutações nos transportadores PfCRT (*Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter) resultando em um aumento do efluxo de cloroquina do vacúolo digestivo. Assim como também para a mefloquina, cujo mecanismo de resistência também se dá por mutações no transportador PfMDR1 (*Plasmodium falciparum* Multidrug Resistance 1), ocorre um aumento da expressão das hemoglobinas plasmepsina 2 e 3 (PM2/PM3, no vacúolo digestivo) (Kumar *et. al.*, 2018; Shibeshi *et al.*, 2020).

Os antifolatos agem bloqueando as enzimas dihidrofolato redutase (DHFR) e Dihidropteroato Sintetase (DHPS) do parasito, interferindo na formação das bases purina e pirimidina e síntese do ácido fólico respectivamente, o que impede a replicação do parasito. O mecanismo de resistência se dá por mutações nos genes de tais enzimas (Bansal *et al.*, 2017 Shibeshi *et al.*, 2020).

Os compostos como artemisinina e seus derivados, são antimaláricos muito potentes e com rápida ação. Seu mecanismo de ação é diverso, podendo alquilar proteínas e lipídios, interrompendo funções biológicas essenciais, levando o parasito à morte (Wang *et al.*, 2015). Apesar da sua alta eficiência, os parasitos apresentam mecanismos de resistência aos derivados de artemisinina. Polimorfismos no domínio hélice do gene kelch-13 (k13) de *P. falciparum*, podem ser usados como marcadores moleculares para o monitoramento do surgimento e propagação da resistência nesses antimaláricos (Paloque *et al.*, 2022). Assim, hoje a Terapia Combinada de Artemisinina (TCA) é o tratamento de primeira linha, pois une a ação rápida e curta das artemisininas (ou derivados), com a ação mais prolongada de um outro antimalárico (Kavishe *et al.*, 2017). Portanto as TCAs atualmente recomendadas são: arteméter + lumefantrina, artesunato + amodiaquina, artesunato + mefloquina, artesunato + sulfadoxina-pirimetamina e dihidroartemisinina + piperaquina, artesunato + pironaridina (WHO, 2018).

O uso de medicamentos antimaláricos e de inseticidas para os vetores são formas de controlar a propagação da doença. Porém a resistência do parasito a estes medicamentos requer que mais produtos sejam desenvolvidos, sendo uma das limitações para o controle da malária (Mbanefo, Kumar, 2020). A resistência aos antimaláricos consiste na capacidade que os parasitos apresentam de sobreviver e/ou multiplicar-se mesmo diante da administração de medicamentos com potencial para eliminá-los. Os fatores que facilitam a resistência aos antimaláricos, podem ser diversas, desde a baixa adesão do paciente ao tratamento como também a baixa eficiência do produto, o que promove mutações genéticas do parasito (Shibeshi *et al.*, 2020).

A resistência dos parasitos aos antimaláricos é uma complicação não só da região africana, mas também de outras regiões do mundo. O *P. falciparum* desenvolveu resistência à cloroquina em vários lugares do planeta, inclusive na África (Daily, Minuti, Khan 2022). A prevalência de mutações gênicas presentes nos

parasitos aumentou significativamente, o que provocou até mesmo resistência a terapias de primeira linha, como as artemisininas. Este fato representa uma forte ameaça ao controle da malária em todo mundo, e é por isso que terapias combinadas têm sido necessárias para se obter respostas mais efetivas (Balikagala *et al.*, 2021). O estudo genômico dos parasitos é de suma importância para entender as características de cada espécie e os mecanismos de resistência que estes tem desenvolvido aos antimaláricos. Assim como também para o desenvolvimento de vacinas de combate a esta doença (Su *et al.*, 2019).

Há muitos anos investigações vem sendo realizadas para a descoberta de vacinas eficazes contra a malária. Os pesquisadores Ruth e Vitor Nussenzweig (1967) descobriram que os camundongos poderiam ser protegidos da malária através da imunização com esporozoítos de *P. berghei* irradiados. Esta pesquisa serviu como base para demais pesquisas voltadas ao desenvolvimento de vacinas inclusive a vacina Mosquirix (RTS,S/AS01) (Nadeem *et al.*, 2022). Muitos pesquisadores têm investigado sobre o desenvolvimento de vacinas para o tratamento da malária, porém identificar o antígeno alvo ideal do parasito tem sido um desafio. Vários antígenos contra diferentes estágios (esporozoítas, merozoíta e fase sexual) tem sido testado, mas devido à complexa antigenicidade e aos mecanismos de ataque imunológico do *P. falciparum*, ainda não temos uma vacina altamente eficaz contra a malária. O que também justifica a busca por novas substâncias com potencial antimalárico (Bonam *et al.*, 2021).

2.2 SUBSTÂNCIAS SÍNTÉTICAS

2.2.1 Síntese orgânica

A síntese orgânica possibilita maior rapidez na produção de novos medicamentos. E, ao utilizar metodologias *in silico*, tem-se tido um aumento da eficiência e diminuição de custos para produção de novas moléculas (Somani *et al.*, 2017).

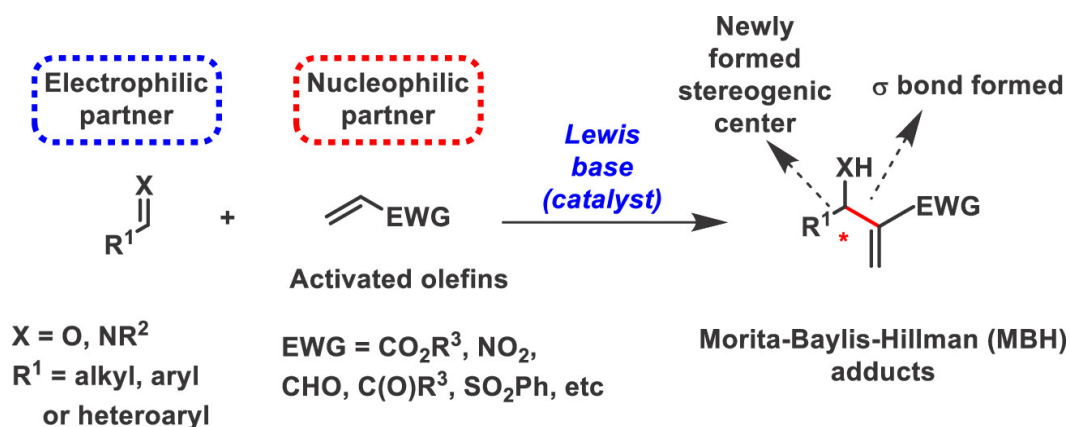
Uma dificuldade quanto à síntese orgânica, é o uso de grandes quantidades de solventes. Porém cada vez mais tem sido utilizado solventes mais ecológicos e ambientalmente sustentáveis (Sheldon, 2019).

As universidades desempenham importante papel no desenvolvimento de novas moléculas para produção de medicamentos em laboratórios industriais. A aliança entre indústria e Academia possibilita a inovação tecnológica e medicamentosa. Há um bom retorno científico e financeiro sobre os investimentos realizados na pesquisa de síntese orgânica. Mas, apesar das vantagens de inovação que a síntese orgânica oferece, esta também apresenta limitações, sendo, portanto, necessário haver um investimento continuado na pesquisa (Blakemore, *et al.*, 2018).

2.2.2 Aceptor de Michael e adutos de Morita-Baylis-Hillman

A reação de Morita-Baylis-Hillman consiste em uma condensação entre olefinas, que atuam como nucleófilos, e compostos carbonílicos (aldeídos, cetonas e iminas), que atuam como eletrófilos. Em geral esta reação é catalisada por bases de Lewis, que levam à formação de uma nova ligação σ carbono-carbono e de um centro estereogênico, fornecendo assim compostos polifuncionalizados (Figura 5). Os produtos desta reação são utilizados para diversas transformações sintéticas, podendo ser aplicadas para o desenvolvimento de substâncias bioativas relevantes (Santos *et al.*, 2023).

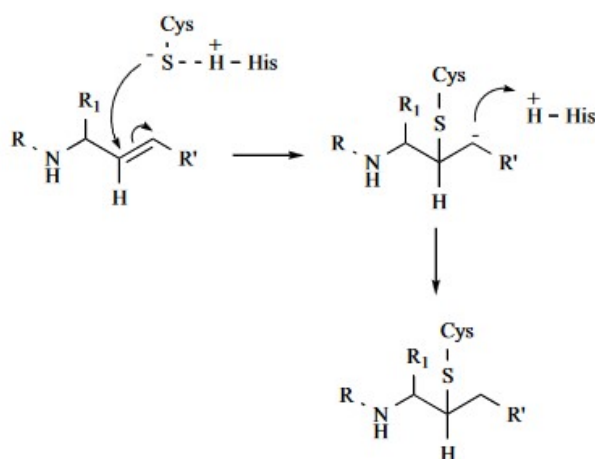
Figura 5 - Representação Geral da Reação Morita-Baylis-Hillman



Fonte: Santos *et al.*, 2023

Moléculas que apresentam aceptores de Michael têm-se mostrado potenciais inibidores de cisteína proteases. Tais estruturas alquilam irreversivelmente o resíduo de cisteína do sítio ativo das proteases por meio da adição de um conjugado. Esta classe de inibidores inclui sulfonas vinílicas, derivados de carbonila α,β -insaturados e derivados diversos. O mecanismo geral de inibição acontece através da adição do acceptor seguido de um ataque ao carbono β pelo resíduo de cisteína do sítio ativo, e posteriormente de protonação do carbono α para formar o derivado tio éter (Figura 6) (Santos, Moreira 2007; Kunakbaeva; Carrasco; Rosas, 2003).

Figura 6 - Mecanismo de inibição de cisteína-protease através de aceptores de Michael



Fonte: Santos, Moreira 2007

Na literatura há diversos estudos de inibidores que realizam ligações covalentes irreversíveis, e formam hemitiocetais e tiocetais com o tiol do resíduo de cisteína no sítio ativo (Kunakbaeva; Carrasco; Rosas, 2003). Aceptores de Michael como vinil sulfonas são inibidores covalentes de FP-2 que inibem irreversivelmente a protease, se comportando como um eletrófilo. A inibição irreversível de uma protease parasitária é o ideal, enquanto uma reação reversível com ligação flexível é ideal no caso de alvos humanos (Ettari *et al.*, 2021; Patra *et al.*, 2023).

O mecanismo reacional de complexos com acrilonitrila (apresentam aceptores de Michael) como inibidores de cisteínas proteases, revelou a formação de um arranjo de reagentes que diminui a energia do sistema de forma a facilitar a formação de um intermediário tetraédrico reativo, que é a etapa determinante da

velocidade da reação. É formado um complexo inicial, no qual a acrilonitrila funciona com um eletrófilo, que reduz a energia total do sistema. Nos complexos com acrilonitrila é formado uma ligação de hidrogênio (*H-Bond*) entre o derivado de tiol e o aceptor de Michael. No estado de transição foi visto que a dupla ligação $C_{\alpha}=C_{\beta}$ do aceptor de Michael aumenta enquanto o $C_{\alpha}-C_1$ diminui. Simultaneamente, o próton envolvido no *H-Bond* com o átomo de enxofre, migra de volta para o C_{β} . Finalmente, quando o intermediário tetraédrico é formado, a ligação $C_{\beta}-C_{\alpha}$ torna-se uma ligação simples, enquanto o $C_{\alpha}-C_1$ atinge um caráter de ligação dupla (Kunakbaeva; Carrasco; Rosas, 2003).

O composto 2-(3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila, também chamado de CH₃ISACN (Figura 1), é um aduto (produto da reação) de Morita-Baylis-Hillman (AMBH) e possui um aceptor de Michael (porção acrilonitrila) (Lima-Junior, *et al.*, 2016). Esta molécula em estudos *in vitro* foi ativa contra a cepa W2 (cepa cloroquina-resistente; mefloquina-sensível) de *P. falciparum*, apresentando uma CI_{50} = 8,37 ug/mL (Melo, 2020). Ainda, em estudos *in vitro* de hemólise, apresentou uma baixa citotoxicidade e boa viabilidade celular. A CH₃ISACN tem se mostrado uma molécula bastante promissora para o desenvolvimento de um protótipo de medicamento para utilizar no combate à malária. O estudo toxicológico agudo *in vivo* realizado com a CH₃ISACN, seguindo a OECD 423 (2001), não provocou morte aos animais, sendo a substância classificada com uma DL_{50} de 5000 mg/Kg (Melo, 2020). Assim, sabendo que a CH₃ISACN possui um aceptor de Michael, e que tem apresentado atividade inibitória contra *P. falciparum*, esta molécula é um potencial antimalárico e que pressupõe uma possível ação como um inibidor das falcipainas, devendo, portanto, ser investigada nesse aspecto.

2.3 ESTUDOS TOXICOLÓGICOS

2.3.1 Ensaios *in vivo*

Modelos animais são amplamente utilizados em estudos científicos para investigação de novos tratamentos terapêuticos (Santos *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2020). Isso se justifica pois através destes ensaios, é possível aprofundar os

conhecimentos sobre uma determinada doença e obter formas de tratá-la. Além de também saber como a droga é biodistribuída, e se o que é ativo é a droga ou seu metabólito. Porém, o uso de animais é desafiador, e requer que o modelo a ser escolhido seja devidamente avaliado, para que se consiga reproduzir um resultado o mais próximo possível para os seres humanos (Savoji *et al.*, 2019).

A utilização de animais em estudos científicos, devem seguir princípios éticos, sendo a estrutura dos três R (*Replacement, Refinement, Reduction*) bastante difundida, e que visa o bem-estar do animal. Mas isto só tem significado se a pesquisa apresentar valor científico significativo, portanto, para além destes princípios, outros também são importantes: robustez, registro e relatório (Strech, Dirnagl, 2019). Sendo assim, pesquisas utilizando animais devem ser autorizadas e devidamente supervisionadas por Comitês de Ética de Animais, para averiguação do cumprimento da lei (Macarthur, Sun 2020).

2.3.1.1 Toxicidade de doses repetidas

É primordial para o desenvolvimento de novos medicamentos, que sejam realizados estudos toxicológicos *in vivo*, em abordagem não-clínica, para que se tenha uma maior segurança sobre seu uso e diminua a probabilidade de riscos a saúde do indivíduo, em testes clínicos posteriores (Da Silva *et al.*, 2021).

No Brasil, a Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), é a responsável pela regulamentação dos testes toxicológicos através do “Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos” (ANVISA, 2013). Entretanto, outros protocolos são amplamente utilizados, e reconhecidos mundialmente, que são regulamentados pela *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) (Burgdorf *et al.*, 2019).

Existem diferentes tipos de ensaios toxicológicos, e com diferentes finalidades. Os toxicologistas costumam dividir a exposição de uma substância ao animal em quatro tipos: aguda (exposição dentro de 24 horas, com uma única administração ou repetidas administrações dentro deste período), subaguda (exposição repetida durante um mês ou menos), subcrônica (exposição repetida

durante 1 a 3 meses) e crônica (exposição repetida por mais de 3 meses) (Klaassen, Watkins 2009).

Respostas toxicológicas diferentes podem ser obtidas após a exposição de uma substância uma única vez, comparando com a exposição da mesma de forma repetida (Mohammadpour *et al.*, 2019). Nos estudos toxicológicos não-clínicos *in vivo*, o ensaio agudo antecede as demais etapas. Um dos protocolos agudos bastante utilizado é o da OECD 423 (2001), no qual pode ser estimada a DL₅₀ e determinado faixas de exposição à substância nas quais a letalidade é esperada, sendo seu principal objetivo a identificação ou não de mortes (Kalaimani, Mustafa 2017).

Após a realização do ensaio agudo, a depender dos resultados, é comum que o estudo prossiga com a realização do ensaio subagudo. Encontramos na literatura várias pesquisas que realizam inicialmente a OECD 423 e seguem para a avaliação de toxicidade de doses repetidas, como a OECD 407 (Abraham, Ahmad, 2021; GOH Bi *et al.*, 2021).

Seguindo a OECD 407 (2008), o teste de toxicidade de doses repetidas, consiste na administração da substância repetidamente por 28 dias em ratos ou camundongos. Através deste método, é possível avaliar parâmetros importantes: aspectos clínicos, perfil hematológico, bioquímico e histológico. As alterações nesses parâmetros, podem sinalizar efeitos tóxicos. Os órgãos reguladores exigem que tais testes sejam realizados para caracterizar o potencial toxicológico de uma substância (OECD, 2008).

A exposição repetida a uma substância durante um período de tempo permite avaliar as possibilidades de efeitos cumulativos no organismo (Al-Afifi *et al.*, 2018), ajudando assim a compreender prováveis efeitos adversos. Além de ser considerado um estudo base para realização posteriormente de ensaios subcrônicos e crônicos (Klaassen, Watkins 2009). Os testes toxicológicos de doses repetidas em animais são considerados obrigatórios, antes que se avance para os demais estudos, até chegar no estágio clínico e posterior comercialização do medicamento (Mirza, Panchal 2020).

2.3.1.2 Teste de micronúcleo

Para melhor garantia da segurança da substância estudada, além destes testes toxicológicos, também é importante a realização de ensaios de genotoxicidade (Hayashi, 2016). Sabendo que substâncias químicas podem ocasionar mutações no DNA, resultando em câncer, testes de genotoxicidade são exigidos pelas agências reguladoras, sendo o ensaio do cometa (CA) e o ensaio do micronúcleo (MNA) como os mais utilizados (Araldi *et al.*, 2015).

O teste de micronúcleo é um bioindicador para previsibilidade de potencial citogenotoxicidade, devido seu baixo custo e boa sensibilidade. O teste foi desenvolvido por Howell em 1891 e se caracteriza pela presença de eritrócitos hipercromáticos com micronúcleos visíveis ao microscópio (Do Carmo; Leal; Ribeiro, 2020; Uchôa, Magalhães 2020). Os micronúcleos são fragmentos de cromossomos que não são incorporados no núcleo da célula-filha em uma divisão celular. A maior frequência de micronúcleos presentes em um organismo, maior é o indicativo para realização de métodos citogenéticos em indivíduos que foram expostos de forma crônica a uma determinada substância (Agostini 1993; Uchôa, Magalhães 2020).

A OECD 474 (2014) traz o protocolo para realização do teste do micronúcleo *in vivo* em mamíferos, geralmente em ratos ou camundongos. A substância estudada é administrada ao animal (pela via apropriada, geralmente é gavagem), e 24 horas após a exposição, é coletado o sangue (medular ou periférico) do animal. O objetivo é a identificação de danos induzidos pela substância teste nos cromossomos ou no aparelho mitótico dos eritroblastos. Como controle positivo de referência utiliza-se, costumeiramente, a ciclofosfamida, um agente quimioterápico utilizado no tratamento de várias doenças, de uso limitado que ocasiona toxicidade genética (Shokrzadeh *et al.*, 2021).

2.4- AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA

2.4.1 Estudo antiplasmodial in vivo

O uso de animais na pesquisa científica ajuda a compreender a fisiopatologia das doenças, e é por isso que são utilizados para obtenção de maior conhecimento

médico, ajudando a aliviar o sofrimento humano. É inegável a contribuição dos modelos animais para a saúde humana, sendo importante também que sua utilização seja devidamente regulamentada (Robinson *et al.*, 2019).

O uso de modelos animais em pesquisas farmacológicas para o tratamento da malária faz parte de muitos protocolos, seja para descoberta de vacinas ou medicamentos (Holz *et al.*, 2020)

Tendo em vista que os parasitos são espécie-específico, é comum que sejam realizados inicialmente estudos *in vitro* com cepas de *P. falciparum* e para a mesma substância, nos estudos *in vivo* utilize cepas de *P. berghei* (Stoye *et al.*, 2019; Walter *et al.*, 2021; Uddin *et al.*, 2022). Assim, mesmo a substância apresentando um resultado com alta atividade antiplasmodial *in vitro*, e moderada atividade antiplasmodial *in vivo*, a substância pode ser considerada como um potente agente antimalárico (Waiganjo *et al.*, 2020).

O parasito realiza ciclos repetidos de invasão e replicação nos eritrócitos humanos, e é por isso que muitos medicamentos antimaláricos visam este ciclo no intuito de reduzir a parasitemia e consequentemente suprimir os sintomas. Portanto, para além dos estudos *in vitro* os ensaios *in vivo* são realizados para melhor investigação, e um dos ensaios vastamente utilizado é o teste de supressão (Peters, 1965).

O teste de supressão de quatro dias é um protocolo que permite avaliar se a substância estudada é capaz de reduzir a parasitemia do animal infectado por *P. berguei*, comparando com o grupo controle. Os animais são infectados no dia zero, e posteriormente tratados por quatro dias. No último dia de tratamento o sangue caudal é coletado e realizado o esfregaço. A porcentagem de parasitemia é determinada pela contagem de hemácias parasitadas. Além disso, pode ser avaliado se a substância foi capaz de aumentar a sobrevida do camundongo infectado (Fang *et al.*, 2019). A infecção por cepas ANKA de *P.berghei* é comumente utilizada em estudos *in vivo*, e o teste de supressão expressamente aceito na comunidade acadêmica (Peters, 1965; Stoye *et al.*, 2019; Udu *et al.*, 2021).

2.4.2 Estudos computacionais *in silico*

Para que um novo medicamento seja lançado no mercado, são necessários muitos estudos e experimentos, e, para acelerar este processo, várias estratégias computacionais vêm sendo utilizadas. O uso de metodologias *in silico* tem otimizado a busca por medicamentos, reduzindo o tempo de pesquisa, mão de obra e custos. *Docking* molecular, dinâmica de simulação molecular (Shaker *et al.*, 2021), e método de fragmentação molecular com capas conjugadas (MFCC) são alguns dos estudos *in silico* que permitem prever o nível de afinidade e modo de interação do ligante com seu alvo (Zhang, Zhang, 2003).

Alguns estudos indicam resultados promissores de design de drogas e triagens *in silico*, baseado em estrutura, ou seja, *docking* molecular (Walter *et al.*, 2021). Esta ferramenta é uma estratégia significativa para o designer de medicamentos, uma vez que possibilita a avaliação do acoplamento de um candidato a fármaco ao seu alvo específico (Rauf; Zubair, Azhar, 2015). A interação do ligante com o receptor deve ter complementariedade geométrica e energética, para que se obtenha a estrutura mais estável e de forma a minimizar a energia livre (Fan, Fu, Zhang, 2019). Para realização da ancoragem molecular, a proteína pode ser obtida do *Protein Data Bank* (PDB), que é o mais popular banco de dados público (Berman *et al.*, 2000). Uma vez que a proteína alvo foi selecionada, existem diferentes *softwares* para realização do *docking* molecular. Um deles é o AutoDock Vina, que apresenta uma rápida velocidade de processamento, e melhor precisão das previsões sobre o modo de ligação comparando com outros programas (Trott, Olson, 2009).

As proteínas são flexíveis, e isso implica na sua interação com o ligante. Por isso, é importante que o candidato a fármaco seja submetido a procedimentos de dinâmica molecular, para que por meio desta simulação consiga prever o quão estável é aquele complexo proteína-ligante (Shaker *et al.*, 2021). A dinâmica molecular (DM) consegue reproduzir com sucesso os resultados experimentais, e melhoram os resultados obtidos no *docking* (Rastelli *et al.*, 2010). As simulações de dinâmica molecular permitem prever como cada átomo de uma proteína e outras biomoléculas, irão se comportar ao longo do tempo especificado, baseado em um modelo geral da física. No decorrer desse tempo, produz um arquivo de trajetória

com os diferentes arranjos espaciais, movimentos e energias dos átomos (Hollingsworth, Dror, 2018; Kanapp *et al.*, 2010). Essas trajetórias podem ser avaliadas pelos Métodos de Desvio Quadrático Médio (RMSD), e Flutuação Quadrática Média Raiz (RMSF) (Kanap *et al.*, 2010).

O RMSD é uma medida obtida nas simulações de dinâmica molecular, que permite avaliar o período de equilíbrio do complexo e agrupar conformações semelhantes (Sargsyan; Grauffel; Lim 2017). Ele permite avaliar o quanto as conformações do complexo (proteína-ligante) se desviam da estrutura do cristal. Sendo possível avaliar a semelhança das conformações ou se houve alguma alteração conformacional, assim como se os complexos se estabilizaram. Já o RMSF calcula o deslocamento de um átomo ou de um grupo de átomos, comparado à estrutura de referência, fazendo uma média sobre o número de átomos, mostrando como a proteína muda ao longo do tempo. Assim, o RMSF permite avaliar quais regiões tem maior flexibilidade. Geralmente os resíduos terminais têm maior flexibilidade. Quanto maior o valor do RMSF mais flexível está a proteína (Bhardwaj *et al.*, 2022).

Uma maneira de aprimorar as simulações de DM e simular os movimentos dos átomos nas proteínas e ligantes alvo, é utilizando uma abordagem híbrida de mecânica quântica e mecânica molecular (QM/MM). Permitindo assim entender o comportamento dinâmico de reações químicas a nível molecular, sendo o GROMACS um dos programas para realização de tais testes (Shaker *et al.*, 2021).

O uso de métodos de mecânica quântica (MQ) supera as limitações da mecânica molecular (MM), permitindo uma maior precisão na estimativa de afinidade de ligação entre um ligante e a proteína. O cálculo mecânico quântico completo (*ab initio*) das energias de interação intermolecular de proteínas, pode ser realizado através do método de fracionamento molecular com capas conjugadas (MFCC). Este ensaio *in silico* consiste em fragmentar a proteína nos seus aminoácidos, e calcular a soma das energias de interação entre a molécula em estudo e cada resíduo fragmentado (Zhang, Zhang 2003). Essa é uma metodologia que vem sendo bastante utilizada no desenvolvimento de novos fármacos, através da investigação sobre os seus sítios de ligação (Santos *et al.*, 2022; Vianna *et al.*, 2019).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a toxicidade de doses repetidas *in vivo*, e a eficácia antimalária do aduto CH₃ISACN, abordando a sua capacidade na redução da parasitemia, e elucidar provável mecanismo de ação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a toxicidade de doses repetidas da CH₃ISACN *in vivo*
- Realizar triagem farmacológica comportamental e observação da presença de morte ou não dos animais;
- Avaliar o consumo de água, ração e evolução ponderal;
- Avaliar o efeito da substância sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue dos camundongos;
- Investigar os efeitos anatomopatológicos e histopatológico da substância em órgãos vitais dos camundongos;
- Pesquisar o potencial genotóxico da CH₃ISACN utilizando-se do teste de micronúcleo em eritrócitos de camundongos;
- Avaliar a atividade antiplasmodial da substância através do teste de supressão *in vivo*;
- Investigar o mecanismo de ação do CH₃ISACN como um antimalário, através de sua inibição às cisteínas-proteases por meio de ferramentas computacionais: Docking, Dinâmica molecular e MFCC.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DA PESQUISA

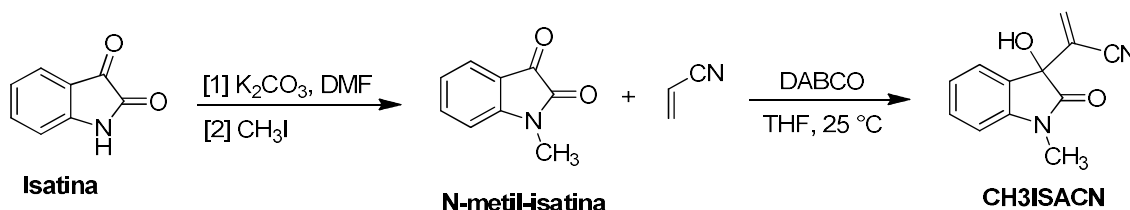
As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Ensaios Toxicológicos (LABETOX), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), coordenado pela Prof^a. Dr^a. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz. Os experimentos antiplasmodiais foram realizados no Laboratório de Biologia da Malária e Toxoplasmose (LABMAT), da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), coordenado pelo Prof. Dr. Valter Ferreira de Andrade Neto. Os estudos *in silico* foram desenvolvidos no Laboratório coordenado pelo Prof. Dr. Umberto Fulco, do Departamento de Biofísica e Farmacologia da UFRN.

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), coordenado pelos professores Dr. Claudio Gabriel Lima Junior e Dr. Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos, do Departamento de Química da UFPB.

Para a preparação de CH_3ISACN , duas etapas sintéticas foram realizadas (Figura 7). A primeira envolveu a metilação da isatina através de uma reação do tipo SN_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-Júnior *et al.*, 2016).

Figura 7 – Reação para preparação de CH₃ISACNFonte: Lima-Junior *et al.*, 2016

4.2.2 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. Para o teste de doses repetidas foram utilizados camundongos *Swiss* (*Mus musculus*) albinos, machos e fêmeas (nulíparas e não grávidas), com idade entre 8-10 semanas, pesando entre 25 e 30 g, fornecidos pela Unidade de Produção Animal (UPA) do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), UFPB, e pela UPA da UFRN.

Todos os animais foram agrupados em gaiolas de polietileno medindo 49X34X16cm contendo até 5 animais. Foram mantidos sob condições controladas de temperatura de 22 ± 3 °C, em ciclos de claro e escuro de 12 horas (6h00 às 18h00 claro e de 18h00 às 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. Os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) da UFPB protocolo N° 1170270418 e 1572071218 (Anexo A) e da UFRN protocolo N° 278.005/2022 (Anexo B).

A eutanásia dos animais foi realizada por sobredose de solução anestésica contendo 220 mg/Kg de cetamina e 21 mg/Kg de xilasina, sendo administrado por via intraperitoneal (IP).

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Ensaio toxicológico *in vivo*

4.3.1.1 Toxicidade oral 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). 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 e hematológicos, e então os órgãos coletados para análise anatomopatológica e histopatológica. Os resultados desta última análise serão apresentados no seguinte trabalho, entretanto os demais, já foram divulgados na dissertação de mestrado (Melo, 2020).

4.3.1.2 Toxicidade oral de doses repetidas

O teste de toxicidade oral de doses repetidas foi realizado segundo a OECD 407 (2008). A substância (CH₃ISACN) foi administrada nos animais diariamente, por via oral, durante 28 dias em diferentes doses (75 mg/Kg, 150 mg/Kg, 300 mg/Kg). Os animais foram distribuídos em um grupo controle e três grupos tratados. Cada grupo continha 10 animais, que foram separados por sexo (5 machos e 5 fêmeas). O grupo controle recebeu apenas o veículo de diluição (DMSO a 1%), já os grupos

tratados receberam o derivado de isatina CH₃ISACN em diferentes doses (75 mg/Kg, 150 mg/Kg, 300 mg/Kg). Ao final dos 28 dias de avaliação, os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésicos (cetamina: 220 mg/kg e xilazina: 21 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.

4.3.1.3 Avaliação comportamental

A triagem farmacológica comportamental é uma metodologia preliminar que avalia parâmetros comportamentais nos animais que possibilitam caracterizar o possível efeito de uma droga no Sistema Nervoso Central (SNC) e Sistema Nervoso Autônomo (SNA) (Almeida; Oliveira, 2006). Após a administração da CH₃ISACN, foi realizada a observação de parâmetros comportamentais nos intervalos: 30, 60, 120, 180 e 240 minutos, seguindo protocolo experimental elaborado pelo setor de psicofarmacologia do IPeFarM /UFPB (Quadro 1).

Quadro 1 - Protocolo experimental de triagem farmacológica comportamental

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	até 30 min	1h	2h	3h	4h
1 – SNC					
a – Estimulante					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das Vibrissas					
Outras					
b – Depressora					
Hipnose					
Ptose					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
c – Outros comportamentos					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotípia					
2 - SN AUTÔNOMO					
Diarréia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tono muscular					
Força para agarrar					
3 – MORTE					

Fonte: Almeida; Oliveira, 2006

4.3.1.4 Consumo de água, alimento e avaliação ponderal

Neste experimento foi avaliado o consumo de água e ração (na forma de *pellets*) pelos animais durante todo experimento. Foram colocadas as mamadeiras graduadas com água e, no dia seguinte, era registrado o volume ingerido pelos animais. Quanto ao consumo de alimentos, a ração era colocada diariamente nas gaiolas, e no dia seguinte, era contabilizado o peso consumido de ração. Já a pesagem dos animais foi realizada semanalmente.

4.3.1.5 Avaliação laboratorial do sangue

Ao final dos 28 dias, os animais foram submetidos a um jejum de 12 horas. Foram então administrados os anestésicos, e as amostras de sangue foram colhidas a partir do plexo braquial, sendo coletadas em tubos contendo ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) para determinação dos parâmetros hematológicos. 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.

4.3.1.5.1 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). Foi utilizado o analisador bioquímico automatizado CHEMWELL-T. O potássio, cálcio, magnésio e cloreto foram determinados pelo analisador de íons seletivos *Electrolyte Analyzer AVLAB®*.

4.3.1.5.2 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), da hemoglobina corpuscular média (HCM) e *Red cell distribution width* (RDW). No leucograma foi realizado a contagem global dos leucócitos. Para a realização do hemograma e contagem de plaquetas, foi utilizado o analisador hematológico automático (URIT-2900/3000 VETPLUS) com *Software* de gerenciamento de dados.

4.3.1.6 Avaliação anatomopatológica e histopatológica

Após a eutanásia, os órgãos foram examinados macroscopicamente. Em seguida foi realizada a fixação em solução de formaldeído a 10% dos órgãos: coração, pulmões fígado e rins. Após 72 horas, os órgãos coletados foram desidratados por imersões sucessivas de 1 hora numa série crescente de álcool etílico a 70, 80, 90 e 100%. Em sequência foi realizada a diafanização, com a impregnação do material em parafina. O material foi emblocado, e então realizado os cortes histológicos e preparação das lâminas para leitura.

4.3.1.7 Genotoxicidade

Para a avaliação do teste de micronúcleo, foi seguido a OECD 474 (2014) com modificações. Utilizamos doze camundongos fêmeas, *Swiss*, com idade de 10 semanas. Estas foram divididas aleatoriamente em quatro grupos com três animais cada, sendo: grupo controle positivo (50 mg/Kg de ciclofosfamida), grupo controle negativo (veículo DMSO 1%), grupo tratado 1 (300 mg/Kg de CH₃ISACN), grupo tratado 2 (600 mg/Kg de CH₃ISACN). A administração das substâncias foi em dose única por gavagem, e 24 horas após foi realizada a coleta do sangue medular dos animais via caudal. Os animais foram então eutanasiados por sobredose de

anestésico, 220 mg/Kg de cetamina e 21 mg/Kg de xilasina, sendo administrado por via intraperitoneal (IP). A cada coleta foi sendo realizado o esfregaço em lâminas de microscópio, secados ao ar, corados com panótico, para a leitura das lâminas via microscópio com objetiva de 100x. Para avaliar o efeito mutagênico foi feito a contagem de 1000 células por animal. A contagem foi realizada às cegas por um único avaliador.

4.3.2 Estudo farmacológico

4.3.2.1 Infecção

A infecção experimental foi realizada de acordo com a metodologia adaptada de Andrade-Neto *et al.*, (2012). Nesta instância, foi escolhido um animal infectado com *Plasmodium berghei* ANKA, espécie *Mus musculus*, linhagem Swiss, com uma parasitemia de 20%, analisada a partir do esfregaço sanguíneo, por meio do sangue coletado da veia caudal do animal doador, no 12º dia após a infecção. A lâmina foi fixada com metanol e corada com Giemsa (na diluição de 65 µL de Giemsa em 1.000 µL de água tamponada) e analisada em microscópio óptico com uma ampliação de 1000x.

O animal doador foi submetido à anestesia com uma dose combinada de cetamina: 220 mg/kg e xilazina: 21 mg/kg, de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Este foi colocado na posição de decúbito dorsal e realizou-se uma incisão na região final do esterno, próximo ao processo xifóide, em seguida o coração foi exposto para realização da punção intracardíaca, inserindo uma agulha (26 G) no átrio esquerdo, formando uma angulação de 30º em relação ao corpo do animal, utilizando uma seringa estéril de 1 mL de volume. Deste modo, o sangue colhido foi acondicionado em um tubo do tipo *eppendorf* com 20 µL de heparina para 1.000 µL de sangue total.

Foi diluído 100 µL de sangue total em 1.000 µL de PBS estéril para formulação do concentrado de eritrócitos a ser utilizado na infecção. Em seguida foi retirado 10 µL desta solução para contagem global de eritrócitos por mm³ no hemocítômetro da câmara de Neubauer, utilizando como cálculo a multiplicação de 4

fatores: o número de eritrócitos contatos, o inverso da diluição do concentrado de eritrócitos, o inverso da profundidade da câmara e o inverso da área contada.

Em seguida, calculou-se a quantidade de eritrócitos infectados do animal doador, por meio da proporção entre o número global de eritrócitos e a porcentagem de eritrócitos infectados (20%). Por conseguinte, através da proporção de concentrações específicas, foi encontrado o volume necessário para que cada animal recebesse intraperitonealmente 10^5 eritrócitos infectados com *P. berghei* ANKA, partindo do princípio de que a concentração inicial é o número total de eritrócitos infectados, a concentração final refere-se ao inóculo parasitário e o volume final compreende a quantidade de PBS para eluir os eritrócitos necessários para o inóculo parasitário, de modo que cada animal recebesse um volume de 200 μ L da solução, contendo 10^5 eritrócitos infectados com *P. berghei* ANKA.

4.3.2.2 Ensaio antiplasmodial *in vivo*

Os testes antimaláricos *in vivo* foram realizados segundo o método supressivo de Peters (1965) e modificado por Carvalho e colaboradores (1991). Foram utilizados camundongos com aproximadamente 6 semanas e peso de $25 \text{ g} \pm 2 \text{ g}$, estes foram separados em 4 grupos com 5 animais cada. Grupo 1: teste com 250 mg/Kg do aduto com 1% de DMSO; Grupo 2: controle negativo com água com 1% de DMSO; Grupo 3: controle positivo com 15 mg de cloroquina; Grupo 4: controle de órgãos. Todos os animais foram inoculados intraperitonealmente com 1×10^5 eritrócitos infectados com *P. berghei* ANKA, exceto o grupo 4. Após período de infecção, os animais receberam o tratamento que foi continuado por 4 dias consecutivos por via oral (gavagem) de acordo com a especificação de cada grupo, em volume final de 200 μ L por animal. No 5º e/ou 7º dia após a infecção por *P. berghei* ANKA, esfregaços sanguíneos corados com giemsa foram examinados em microscópio óptico contando de 1.000-5.000 hemácias, de acordo com a densidade parasitária, para determinação da parasitemia. A supressão de crescimento do parasito nos grupos teste foi calculada em relação aos grupos controle sem tratamento antimalárico como na fórmula abaixo:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{(\text{Parasitemia controle negativo} - \text{Parasitemia grupo teste})}{\text{Parasitemia controle negativo}} \times 100$$

A mortalidade cumulativa dos animais foi observada até a 1ª morte dos animais do grupo controle negativo (tratados apenas com água e 1% de DMSO).

4.3.2.3 Avaliação do mecanismo de ação - estudos *in silico*

4.3.2.3.1 Obtenção da estrutura do cristal da falcipaina e do ligante

Para realização dos cálculos do estudo *in silico*, foram utilizadas estruturas cristalográficas das falcipainas, obtidas do banco de dados *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics - Protein Data Bank* (RCSB/PDB). Tais estruturas são identificadas por códigos (resoluções), sendo selecionados: PDB ID 3BPF e PDB ID 3BPM (KERR *et al.*, 2009). Estes possuem um inibidor ligado a eles, mas não ligado covalentemente. A escolha do cristal a se trabalhar foi baseada naquele que tivesse menor resolução. A estrutura do ligante (CH₃ISACN) foi obtida a partir do programa *molinspiration* (<https://www.molinspiration.com/cgi-bin/galaxy>).

Quanto ao estudo da interação com as berghepaínas, por essas proteínas não ter a estrutura cristalográfica no RCSB/PDB, foi então pesquisado o proteoma das berghepaínas da cepa ANKA (a mesma utilizada no estudo *in vivo*), através do site Uniprot (<https://www.uniprot.org/>), sendo para BP-1 (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A509APV9/entry>) E BP-2 (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A509AMD7/entry>). Após seleção do proteoma foi feito o modelo usando o *AlphaFold Protein Structure Database*.

4.3.2.3.2 Ancoragem molecular (*Docking*)

Inicialmente (apenas para as falcipainas) foi removido o inibidor do cristal 3BPM através do *UCSF Chimera* (Pettersen *et al.*, 2004). A partir disso, para todas as proteínas, criamos uma caixa para delimitação da região do *docking*. A criação da

caixa foi baseada na região acoplada pelos inibidores dos cristais avaliados. A conversão da proteína e novo ligante em PDB para PDBQT foi realizada pela ferramenta *AutoDockTools* (Morris *et al.*, 2009). Feito isso, foi realizado um docking exaustivo (1000 *dockings*) usando o programa *AutoDock Vina*, sendo selecionado o complexo de menor energia (melhor afinidade). Posteriormente, os arquivos da proteína e ligante separados foram convertidos de PDBQT para PDB usando o UCSF Chimera.

4.3.2.3.3 Dinâmica molecular (DM) do complexo proteína-ligante

Antes de proceder para a DM, a protonação da proteína em pH 7.4 foi avaliada pelo servidor H++. O servidor <https://www.bio2byte.be/acpype/> foi usado para gerar os parâmetros do ligante para ser usado no GROMACS. Três simulações de 500 ns do complexo proteína-ligante foram submetidas à DM. Para tanto, o programa GROMACS na versão 2022 foi usado. O campo de força escolhido foi o Amber ff99SB-ILDN para proteína e GAFF2 para ligante.

Para preparar o sistema, uma caixa cúbica foi construída ao redor da proteína de forma que a distância mínima entre a caixa e qualquer átomo da proteína fosse 12 Å. A caixa foi então preenchida com água do tipo TIP3P, a mais recomendada para esse campo de força. O sistema foi neutralizado com 11 íons de sódio (Na⁺). Dessa forma, o sistema ficou pronto para ir para etapa de minimização de energia.

A etapa de minimização de energia é necessária para garantir que o sistema não tenha nenhum choque estérico ou geometria imprópria depois da adição da água. O procedimento é feito em duas etapas de minimização de energia. O primeiro consistiu em no máximo 500 passos ou quando força máxima atuando em qualquer átomo alcançasse o valor menor que 50 kJ/mol/nm usando o algoritmo '*steepest descent*'. Nesse caso, a proteína e ligante estavam com a posição restringida de forma que o foco ficasse no relaxamento do solvente que circunda o complexo. O segundo passo da minimização de energia foi realizado sem a restrição da posição. Nesse caso o número máximo de passos foi de 10.000 ou quando a força aplicada em todos os átomos fosse menor que 250 KJ/mol/nm.

Depois de garantir uma geometria adequada e orientação do solvente para a estrutura inicial, o próximo passo foi equilibrar o solvente e os íons ao redor da

proteína. Para atingir esse objetivo, foram definidas a pressão e temperatura corretas para o sistema simulado, para 1 atm e 310 K em duas etapas separadas de 100 picossegundos (ps), referidas como o conjunto NVT (ajuste da temperatura) e o conjunto NPT (ajuste da pressão). Para tanto, os algoritmos modificados de Berendsen *et al* (1984) e Hutter (2012) foram aplicados para ajustar a temperatura e a pressão do sistema, respectivamente. Em ambas as etapas, as ligações com o hidrogênio foram restringidas pelo algoritmo LINCS (Hess, 2008) e as restrições posicionais foram aplicadas na proteína e ligante para equilibrar o solvente ao redor do soluto.

O método de soma *Particle Mesh Ewald* foi usado para calcular as interações eletrostáticas de longo alcance, e um corte de 1 nm foi definido para interações não ligadas. Por fim, o algoritmo de salto-sapo (Hockney *et al.*, 1974) foi utilizado para integrar as equações de movimento, com um passo de tempo de 0,2 femtossegundos (fs). Antes da execução de DM, um pequeno conjunto NPT de 1 ns foi realizado sem restrição na posição da proteína e ligante, e a execução de produção de cada sistema idêntico foi realizada em 500 ns sem restrição na conformação do complexo. Um total de 5000 conformações do complexo proteína-ligante foram produzidas a partir de cada execução de DM. Cada execução é referida aqui como uma réplica.

Após finalizar a simulação das três réplicas, foram gerados os gráficos de *root mean square deviation* (RMSD) e *fluctuation* (RMSF) usando os comandos “gmx” do pacote do GROMACS. Para visualização das trajetórias obtidas nas DMs, o programa UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) foi usado.

4.3.2.3.4 Análise de interação proteína-ligante usando QM/MM GBSA

Com intuito de analisar o melhor complexo obtido nas três réplicas de dinâmica molecular, foi usado o programa 'gmx_MMPBSA' (Valdés-Tresanco *et al.*, 2021), o qual permite usar os arquivos gerados na DM para cálculo da energia de interação. Para cada réplica, os últimos 100 ns (correspondente aos últimos 1000 frames) foram analisados usando *Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area* (QM/MM GBSA). O funcional semi-empírico usado foi o PM6-DH+, restringindo apenas aos resíduos com até 5 Å de distância do

ligante. Todos os outros resíduos são descritos por um campo de força da mecânica molecular, nesse caso o mesmo usado na dinâmica molecular (Amber ff99SB-ILDN). Após finalizar os cálculos da energia de interação do complexo na DM, o complexo de menor energia procedeu para MFCC.

4.3.2.3.5 Determinação do estado de protonação e otimização da estrutura

Para avaliação dos estados de protonação dos ligantes, assim como os aminoácidos da proteína no pH fisiológico, foram verificados usando o código MarvinSketch versão 17.24 (*Marvin Beans Suite* - ChemAxon) e o pacote Propka 3.1 (Olsson, 2011), respectivamente. Átomos de hidrogênio e cadeias laterais de aminoácidos, não resolvidos por difração de raios-X e, portanto, inexistentes nos arquivos cristalográficos, foram inseridos nas estruturas e submetidos à otimização clássica da geometria durante a fixação dos outros átomos. Os átomos de hidrogênio apresentam densidade eletrônica mínima sendo, portanto, não identificados, ou ainda, identificados incorretamente nos arquivos de coordenadas cristalográficas. Apenas cristais com resolução menores que 1.2 Å oferecem estrutura para a visualização dos átomos de hidrogênio. Essa otimização foi realizada usando o campo de força clássico CHRAMM (*Chemistry at Harvard Molecular Mechanics*), o qual é configurado especificamente para moléculas orgânicas, resultando em uma maior precisão dos cálculos (Momany, Rone 1992). Os critérios utilizados para a tolerância de convergência foram 10⁻⁵ kcal/ mol (variação total de energia), 10⁻³ kcal/mol (raiz quadrada média do gradiente RMS) e 10⁻⁵ Å (deslocamento atômico máximo).

4.3.2.3.6 Determinação das energias de interação e simulação computacional

Foi utilizado uma metodologia da mecânica quântica *ab initio*, com base no DFT para realização dos cálculos energéticos. Assim como também se utilizou um método de fragmentação denominado MFCC - método de fragmentação molecular com capas conjugadas. Este método permite cálculos envolvendo macromoléculas biológicas, que tem como objetivo apresentar informações precisas a respeito das energias de interação moleculares. A ideia central do MFCC é a partição da energia

de interação entre moléculas de proteína em quantias individuais de interação que podem ser facilmente calculadas. Assim, a proteína é decomposta em fragmentos de aminoácidos cujas extremidades recebem porções de seções vizinhas. Então, a energia de interação entre uma proteína e uma molécula pode ser obtida por instrumento de combinações de energias de interação entre fragmentos individuais do sistema analisado, permitindo ainda, uma representação do ambiente local durante a fragmentação individual. O MFCC possibilita uma maior eficiência computacional e tem importância significativa no estudo de sistemas biológicos complexos (Zhang; Zhang, 2003; Gordon *et al.*, 2011).

Baseando-se no fato de que a identificação das interações entre os resíduos das proteínas FP-2, FP-3, BP-1, BP-2 e ligantes foi realizada utilizando-se um determinado raio a partir do ligante de interesse (L), englobando aminoácidos (Ri) das falcipaínas e berghepaínas, o fracionamento do sistema cumprindo o método MFCC pôde ser iniciado. Para cada Ri foram integrados quatro fragmentos. O primeiro, L - Ci-1RiCi+1, é formado pelo ligante (L) e, Ri (FP2/FP3) (BP1/BP2), juntamente com seus aminoácidos vizinhos (Ci-1/Ci+1). Em outro momento, o resíduo da proteína foi retirado Ri, obtendo-se L - Ci-1Ci+1 (segundo fragmento). Posteriormente, o ligante L também retirado apresentando o terceiro fragmento Ci-1RiCi+1. Por fim, excluiu-se o ligante L e o resíduo Ri, logrando o quarto e último fragmento que é composto apenas pelos aminoácidos vizinhos ao resíduo, Ci-1Ci+1. Estes resíduos vizinhos são as denominadas “capas” constituintes do MFCC. Estas “capas” são anexadas no intuito de preservar a valência das ligações, bem como, imitar o ambiente local das moléculas.

A partir do exposto, as energias de interação entre os resíduos da FP2/FP3, BP1/BP2 e inibidores foram calculadas utilizando-se a seguinte equação: $E_i(L - R_i) = E(L + C_{i-1}R_iC_{i+1}) - E(L + C_{i-1}C_{i+1}) - E(C_{i-1}R_iC_{i+1}) + E(C_{i-1}C_{i+1})$ (Eq.1) Ou seja, $E(L - C_{i-1}R_iC_{i+1})$ refere-se a energia total do conjunto constituído pelo ligante L e o resíduo Ri, que interagem de forma recíproca e os aminoácidos vizinhos ao resíduo, já o termo $E(L - C_{i-1}C_{i+1})$ refere-se à energia do ligante L simultaneamente com a energia das “capas” de Ri, Ci-1Ci+1. Enquanto isso, $E(C_{i-1}R_iC_{i+1})$, é a energia do conjunto constituído por Ri e vizinhos, e finalmente, o último termo $E(C_{i-1}C_{i+1})$ representa a energia da porção formada pelas “capas” de Ri. Os cálculos energéticos para cada resíduo no local de ligação foram realizados

usando o código Gaussian G09 (Frisch *et al.*, 2009), dentro do formalismo da DFT utilizando o funcional B97D (Grimme, 2006) que inclui termos de dispersão para melhorar a descrição de interações não-covalentes. Este funcional foi utilizado também em conjunto com a correção de dispersão D3 sob vácuo e o modelo de solvatação COSMO para calcular as energias de ligação de alguns complexos proteína-ligante dentro do esquema MFCC (Antony; Grimme, 2012).

Sabe-se que a maioria das interações biomoleculares ocorre em um ambiente eletrostático e, portanto, é importante considerar os efeitos das moléculas circundantes em muitos casos. Portanto, foi utilizado o modelo de *Continuous Polarizable Continuum Model* (CPCM) (Cossi *et al.*, 2003) com a constante dielétrica ϵ igual a 10, 20 e 40, para representar o ambiente em torno de cada fragmento obtido pelo esquema MFCC. Para representar a expansão dos orbitais de KohnSham para todos os elétrons, foi utilizado o 6-311+G (d, p), uma pequena base de valência tripla-zeta definida junto com uma função difusa adicional (+) e funções de polarização (d, p). Para evitar a ausência de interações importantes, uma avaliação completa da convergência para a energia de ligação foi produzida de acordo com o raio da bolsa de ligação ao ligante, estabelecendo um limite para o número de resíduos de aminoácidos a serem investigados. Para isso, foi adicionado a energia de interação individual desses resíduos de aminoácidos, esferas imaginárias, com um raio de bolso r centrado no ligante e considerado igual a $R/2$, com $R=1, 2, 3, 4, \dots, n$, sendo n o próximo número natural na sequência. Assim, o raio da bolsa de ligação r alcança convergência sempre que a variação de energia no raio consecutivo for menor que 10%.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os estudos *in vivo*, a análise estatística dos dados foi realizada através do programa GraphPad Prism, versão 6.0. Inicialmente foi realizado o teste de normalidade com o teste de Shapiro-Wilk. Os dados que obedeceram ao critério de distribuição de normalidade foram analisados por Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo pós-teste de Tukey. 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. Para análise *in vivo* antiplasmodial foi utilizado o teste T- student. 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 ENSAIOS TOXICOLÓGICOS

5.1.1 Estudo *in vivo* não-clínico de doses repetidas em roedores

5.1.1.1 Avaliação comportamental

Após a administração da substância CH₃ISACN por via oral na dose de 300 mg/Kg, 150 mg/Kg, e 75 mg/Kg, foi realizada uma avaliação comportamental dos animais, a cada 30 minutos por quatro horas no primeiro dia de administração, e depois diariamente durante os 28 dias. Em todos os grupos não foi notado nenhum tipo de alteração comportamental dos animais em estudo. Não sendo evidenciados sinais depressores ou estimulantes do SNC, bem como não foi demonstrado nenhum sinal relacionado à alteração no SNA. Porém, na primeira semana de experimentação, ocorreram duas mortes de camundongos, um do grupo que recebeu a dose de 300 mg/Kg e um do grupo que recebeu a dose de 150 mg/Kg. Todos os outros animais mantiveram-se estáveis durante todo experimento, não podendo considerar que estas mortes ocorreram pela administração da CH₃ISACN.

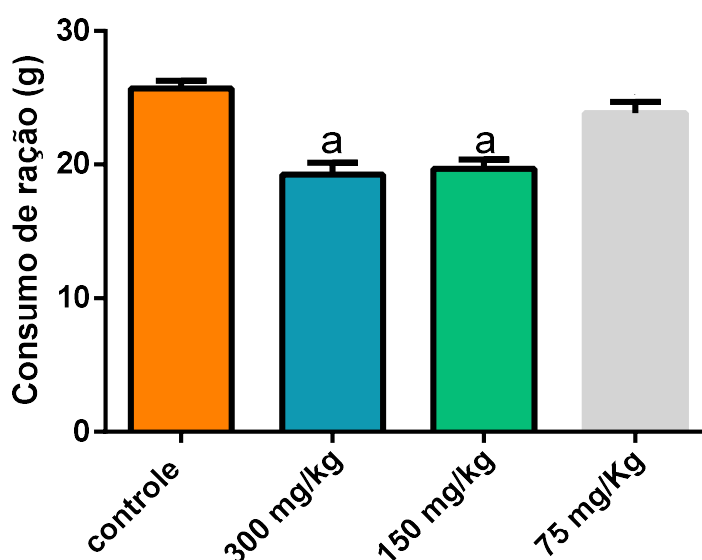
5.1.1.2 Avaliação do consumo de água e ração

O consumo de água e ração dos animais foi monitorado durante todo período de experimentação. Na tabela 1 podemos observar que não houve nenhuma alteração estatisticamente significativa no consumo de água das fêmeas. Quanto ao consumo de ração, as fêmeas tratadas com a dose de 300 mg/Kg e 150 mg/Kg consumiram menos ração em comparação com os animais do grupo controle (Gráfico 1).

Tabela 1- Avaliação do consumo de água e ração dos camundongos fêmeas tratadas com CH₃ISACN nas doses de 300 mg/Kg, 150 mg/Kg e 75 mg/Kg.

	Controle	300mg/Kg	150 mg/Kg	75 mg/Kg
Consumo de Água (mL) Fêmeas	28,54 ± 1,01	25,00 ± 1,65	26,32 ± 1,04	27,11 ± 1,82
Consumo de Ração (g) Fêmeas	25,71 ± 0,57	19,25 ± 0,90 ^a	19,68 ± 0,71 ^a	23,86 ± 0,84

Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média. Análise por Anova, seguido também pelo pós teste de Tukey. Legenda: ^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle

Gráfico 1- Gráfico 1 - Consumo de ração de camundongos fêmeas tratadas com a substância CH₃ISACN

Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média. Análise por Anova, seguido também pelo pós teste de Tukey. Legenda: ^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle.

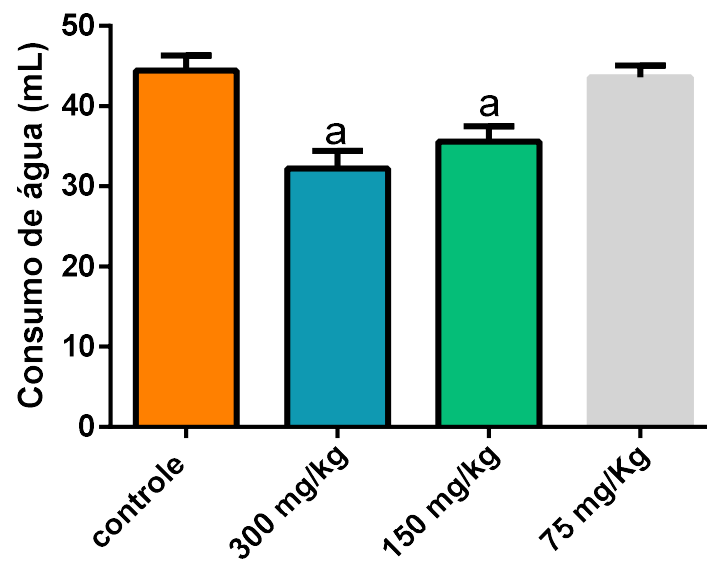
Quanto aos machos, na tabela 2, observa-se que o grupo tratado com a dose de 300 mg/Kg e 150 mg/Kg diminuiu o consumo de água e ração em relação ao grupo controle (Gráficos 2 e 3).

Tabela 2- Avaliação do consumo de água e ração dos camundongos machos tratados com CH₃ISACN nas doses de 300 mg/Kg, 150 mg/Kg e 75 mg/Kg.

	Controle	300mg/Kg	150 mg/Kg	75 mg/Kg
Consumo de Água (mL) Machos	44,43 ± 1,89	32,21 ± 2,24 ^a	35,61 ± 1,90 ^a	43,61 ± 1,48
Consumo de Ração (g) Machos	34,89 ± 1,18	22,14 ± 1,70 ^a	20,04 ± 1,06 ^a	30,46 ± 1,23

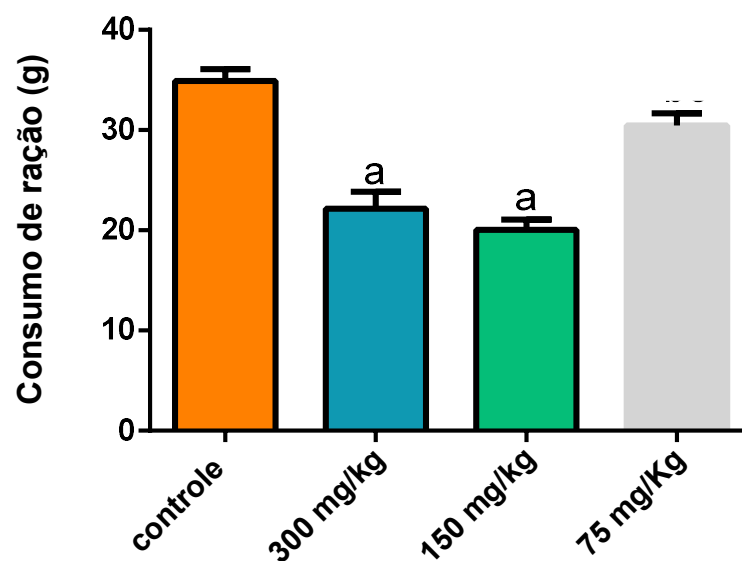
Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média. Análise por Anova, seguido também pelo pós teste de Tukey. Legenda: ^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle

Gráfico 2 - Consumo de água de camundongos machos tratados com a substância CH₃ISACN.



Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Análise por Anova, seguido também pelo pós teste de Tukey. Legenda: ^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle

Gráfico 3 - Consumo de ração de camundongos machos tratados com a substância CH₃ISACN.



Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Análise por Anova, seguido também pelo pós-teste de Tukey. Legenda: ^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle.

5.1.1.3 Avaliação da evolução ponderal

No estudo da evolução ponderal dos animais, foi observado que as fêmeas tratadas não tiveram alteração significativa em seu peso ao comparar com o grupo controle (Tabela 3).

Tabela 3 - Avaliação da evolução ponderal dos camundongos fêmeas tratadas com CH₃ISACN nas doses de 300 mg/Kg e 150 mg/Kg e 75 mg/Kg.

		Controle	300 mg/Kg	150 mg/Kg	75 mg/Kg
Semana	de	26,00 ± 1,6	28,40 ± 0,6	29,20 ± 0,8	30,40 ± 1,01
	ambientação				
1º semana		29,80 ± 1,07	30,40 ± 1,63	31,00 ± 0,84	34,40 ± 1,54
2º semana		31,00 ± 1,41	26,40 ± 0,93	28,00 ± 1,23	32,00 ± 1,64
3º semana		32,20 ± 0,97	29,20 ± 1,02	29,60 ± 1,21	33,40 ± 2,86
4º semana		33,60 ± 0,68	31,60 ± 1,12	29,60 ± 1,44	34,00 ± 1,61

Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média. Análise por Kruskal-Wallis, seguido também pelo pós-teste de Dunnett. Legenda: ^a $p < 0,05$ comparado com grupo 300 mg/kg.

Na tabela 4 pode-se observar a evolução do peso dos machos, e a única alteração significativa foi uma diminuição no peso dos animais que receberam a dose de 150 mg/Kg na segunda semana, quando comparado ao grupo controle.

Tabela 4 - Avaliação da evolução ponderal de camundongos machos tratados com CH₃ISACN nas doses de 300 mg/Kg e 150 mg/Kg e 75 mg/Kg.

		Controle	300 mg/Kg	150 mg/Kg	75 mg/Kg
Semana	de	29,40 ± 1,3	29,40 ± 0,68	30,80 ± 0,73	29,40 ± 0,51
	ambientação				
1º semana		38,60 ± 0,93	38,60 ± 1,03	35,20 ± 1,83	38,80 ± 0,66
2º semana		41,40 ± 1,08	34,00 ± 1,61	33,00 ± 1,05 ^a	37,60 ± 2,58
3º semana		43,60 ± 1,03	36,20 ± 2,06	35,00 ± 1,14	38,80 ± 2,48
4º semana		45,00 ± 1,14	37,80 ± 1,07	37,80 ± 0,49	40,60 ± 2,46

Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média. Análise por Kruskal-Wallis, seguido também pelo pós-teste de Dunnett. Legenda: ^a $p < 0,05$ comparado com grupo 300 mg/kg.

5.1.1.4 Avaliação bioquímica dos animais tratados com CH₃ISACN

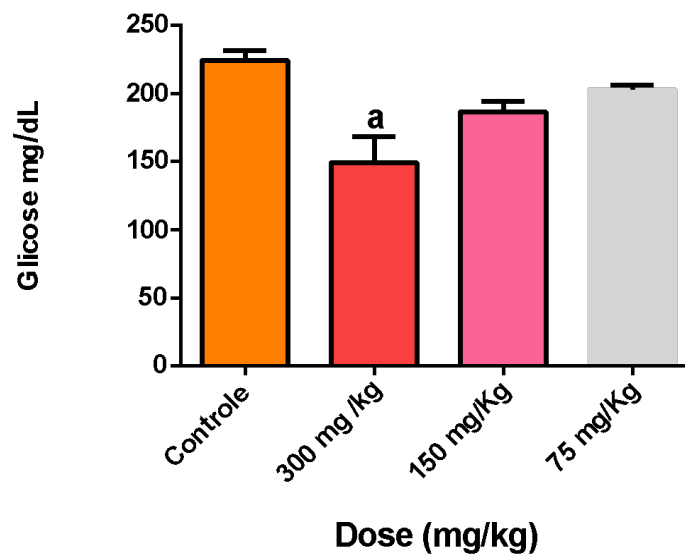
Ao fim do experimento, o sangue periférico dos camundongos fêmeas foi coletado, e foi realizada a avaliação bioquímica, estando os resultados expressos na Tabela 5. Dos 15 parâmetros avaliados nos três grupos tratados, houve alteração em apenas 2 parâmetros. Foi observado que a glicemia do grupo tratado com a dose de 300 mg/Kg teve redução quando comparado com o grupo controle (Gráfico 4). Uma outra alteração foi com relação às proteínas totais dos animais tratados com a dose de 75 mg/Kg que tiveram um aumento comparando com o grupo controle (Gráfico 5). Os demais parâmetros não tiveram nenhum tipo de alteração significativa.

Tabela 5 - Avaliação bioquímica do sangue periférico dos camundongos fêmeas tratadas com CH₃ISACN, nas doses de 300 mg/Kg 150 mg/Kg e 75 mg/Kg.

		Controle	300 mg/Kg	150 mg/Kg	75 mg/Kg
Glicemia (mg/dL)		224,30 ± 7,31	149,00 ± 19,29 ^a	186,7 ± 7,67	202,30 ± 2,33
Ureia (mg/dL)		45,33 ± 0,88	32,00 ± 5,00	49,33 ± 10,40	53,00 ± 6,93
Creatinina (mg/dL)		0,22 ± 0,03	0,29 ± 0,06	0,32 ± 0,03	0,29 ± 0,01
Triglicerídeos (mg/dL)		102,30 ± 10,40	117,70 ± 9,21	98,67 ± 44,18	155,7 ± 31,16
Colesterol (mg/dL)		94,00 ± 2,52	88,00 ± 10,00	105,30 ± 10,48	117,30 ± 18,66
Magnésio (mg/dL)		3,07 ± 0,19	3,25 ± 0,14	3,00 ± 0,04	3,22 ± 0,01
Albumina (mg/dL)		1,99 ± 0,32	1,47 ± 0,15	2,04 ± 0,08	2,38 ± 0,29
Proteínas Totais (mg/dL)		5,37 ± 0,02	5,49 ± 0,10	5,58 ± 0,09	5,89 ± 0,06 ^a
Fosfatase Alcalina (mg/dL)		308,30 ± 34,07	273,70 ± 10,11	254,70 ± 56,38	275,00 ± 58,53
ALT U/L		50,67 ± 10,27	56,33 ± 7,86	54,00 ± 3,22	53,33 ± 0,88
AST U/L		168,00 ± 8,5	146,00 ± 30,55	154,70 ± 25,37	128,00 ± 12,70
Ácido Úrico (mg/dL)		1,06 ± 0,09	0,70 ± 0,32	2,11 ± 0,30	1,11 ± 0,50
Cálcio (mg/dL)		8,75 ± 0,0	9,47 ± 0,54	9,20 ± 0,22	9,66 ± 0,34
Fósforo (mg/dL)		9,09 ± 0,36	10,14 ± 0,87	8,64 ± 0,50	10,59 ± 2,14
LDH (mg/dL)		658,70 ± 160,70	862,90 ± 109,40	841,00 ± 18,52	778,50 ± 31,47

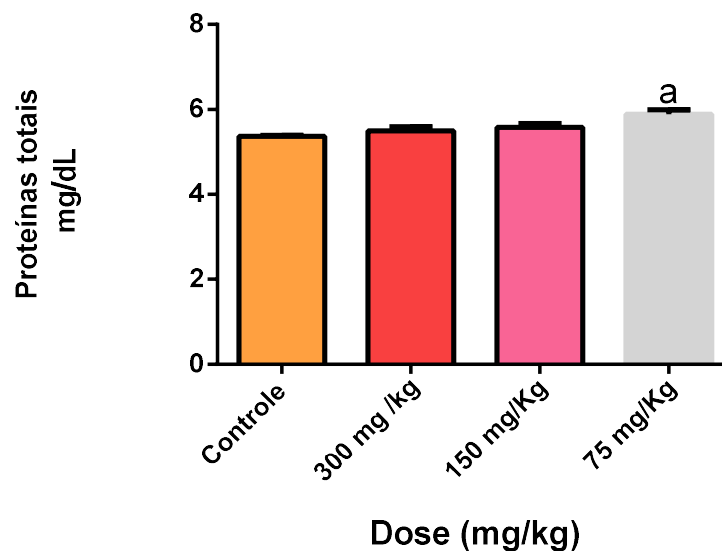
Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média. Análise por Kruskal-Wallis, seguido também pelo teste post-hoc de Dunnett. Legenda: ^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle.

Gráfico 4 - Concentração de glicose no sangue periférico dos camundongos fêmeas 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

Gráfico 5 - Concentração de proteínas totais no sangue periférico dos camundongos fêmeas 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

5.1.1.5 Avaliação hematológica

Foram analisados parâmetros hematológicos do sangue periférico dos camundongos machos e fêmeas, sendo estudadas as séries: vermelha, branca e plaquetária. Como observado na Tabela 6, ao avaliar a série vermelha dos machos, a única alteração foi um aumento na concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) dos animais machos que receberam a dose de 300 mg/Kg, quando comparado ao grupo controle (Gráfico 6). Os demais parâmetros da série vermelha não apresentaram nenhuma alteração significativa. Quanto à série branca, não houve alteração nos leucócitos totais, assim como também na avaliação plaquetária não se observou nenhuma alteração comparando com o grupo controle.

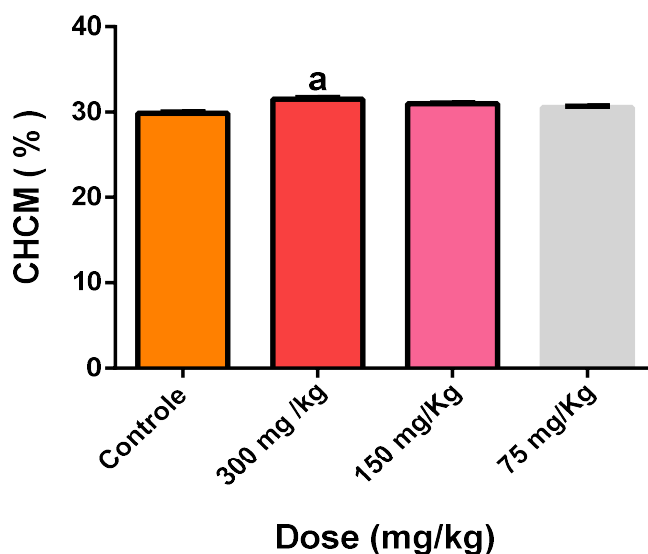
Na avaliação hematológica das fêmeas (Tabela 7), o hematócrito dos animais tratados com dose de 300 mg/Kg apresentou-se diminuído ao comparar com o grupo controle (Gráfico 7). O CHCM das fêmeas tratadas com a dose de 300 mg/Kg, assim como dos machos, também teve um aumento significativo quando comparado ao grupo controle (Gráfico 8). O RDW das fêmeas tratadas com a dose de 150 mg/Kg teve um aumento significativo comparado com o grupo controle (Gráfico 9). Assim como os machos, a série branca e plaquetária das fêmeas não apresentaram nenhuma alteração significativa.

Tabela 6 - Avaliação hematológica dos camundongos machos tratados com CH₃ISACN, nas doses de 300 mg/Kg, 150 mg/Kg e 75 mg/Kg.

	Controle	300 mg/Kg	150 mg/Kg	75 mg/Kg
Hemácias (10 ⁶ /mm ³)	9,91 ± 0,22	9,16 ± 0,32	9,64 ± 0,25	9,08 ± 0,28
Hemoglobina (g/dL)	15,40 ± 0,50	14,40 ± 0,25	14,47 ± 0,48	15,27 ± 0,66
Hematócrito (%)	51,57 ± 1,97	45,6 ± 0,50	46,67 ± 1,63	50,00 ± 2,27
VCM (mm ³)	52,07 ± 0,86	48,10 ± 0,46	48,47 ± 0,61	55,07 ± 1,05
HCM (pg)	15,50 ± 0,18	15,13 ± 0,23	14,93 ± 0,15	16,77 ± 0,30
CHCM (%)	29,83 ± 0,18	31,50 ± 0,21 ^a	30,97 ± 0,09	30,50 ± 0,10
RDW	16,00 ± 0,50	16,63 ± 0,45	16,87 ± 0,23	15,73 ± 0,61
Leucócitos Totais (mm ³)	12,97 ± 1,33	6,07 ± 1,29	6,03 ± 1,15	12,93 ± 1,31
PLA (mm ³)	1218 ± 25,70	1527 ± 140	1523 ± 143	1285 ± 72,63

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 - Avaliação da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) no sangue periférico dos camundongos tratados com a substância CH₃ISACN.



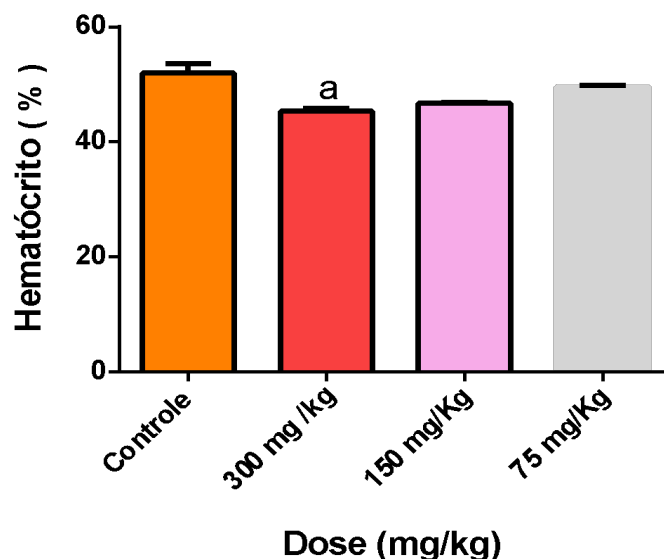
Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Análise por Kruskal-Wallis, seguido também pelo teste post-hoc de Dunnett. Legenda: ^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle.

Tabela 7 - Avaliação hematológica dos camundongos fêmeas tratadas com CH₃ISACN, nas doses de 300 mg/Kg, 150 mg/Kg e 75 mg/Kg.

	Controle	300 mg/Kg	150 mg/Kg	75 mg/Kg
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	9,23 $\pm$ 0,11	9,31 $\pm$ 0,05	9,73 $\pm$ 0,16	8,98 $\pm$ 0,07
Hemoglobina (g/dL)	15,60 $\pm$ 0,35	14,57 $\pm$ 0,17	14,90 $\pm$ 0,06	15,60 $\pm$ 0,06
Hematócrito (%)	51,90 $\pm$ 1,62	45,35 $\pm$ 0,43 ^a	46,70 $\pm$ 0,06	49,60 $\pm$ 0,12
VCM (mm^3)	56,27 $\pm$ 1,07	48,80 $\pm$ 0,23	48,70 $\pm$ 0,46	55,40 $\pm$ 0,29
HCM (pg)	16,87 $\pm$ 0,14	15,80 $\pm$ 0,12	15,50 $\pm$ 0,06	17,37 $\pm$ 0,09
CHCM (%)	30,07 $\pm$ 0,26	32,20 $\pm$ 0,06 ^a	31,87 $\pm$ 0,14	31,40 $\pm$ 0,06
RDW	13,97 $\pm$ 0,32	14,60 $\pm$ 0,23	16,17 $\pm$ 0,14 ^a	15,47 $\pm$ 0,14
Leucócitos Totais (mm^3)	8,87 $\pm$ 1,27	5,87 $\pm$ 0,53	8,70 $\pm$ 1,65	5,87 $\pm$ 1,16
PLA (mm^3)	1368 $\pm$ 40,13	1339 $\pm$ 126,4	1355 $\pm$ 74,77	1284 $\pm$ 16,17

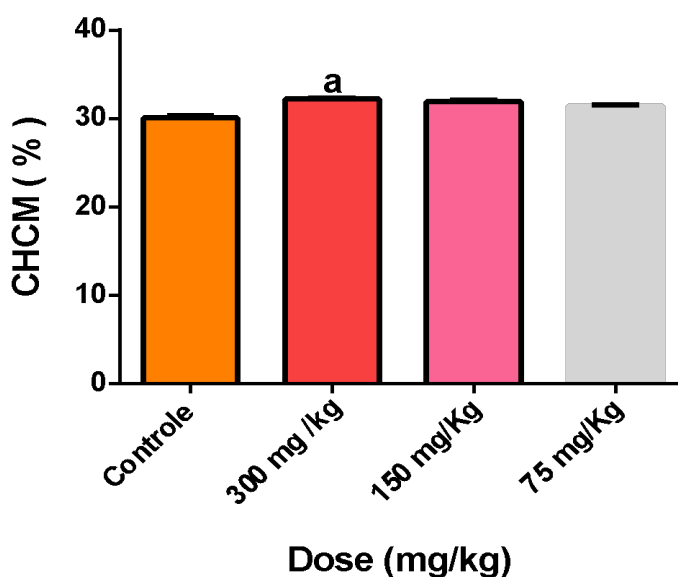
Dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Análise por Kruskal-Wallis, seguido também pelo teste post-hoc de Dunnett. Legenda: ^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle; ^c $p < 0,05$ comparado com grupo tratado com dose de 150 mg/Kg.

Gráfico 7 - Avaliação do hematócrito no sangue periférico das fêmeas tratadas com a substância CH₃ISACN.



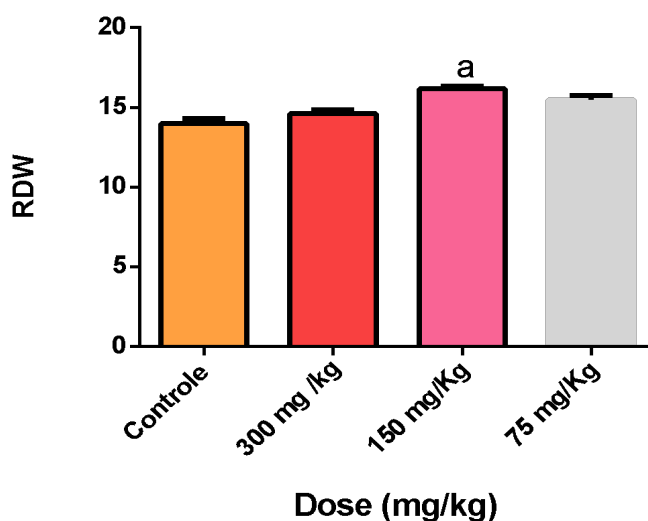
Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Análise por Kruskal-Wallis, seguido também pelo teste post-hoc de Dunnett. Legenda: ^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle.

Gráfico 8 - Avaliação da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) no sangue periférico das fêmeas 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.

Gráfico 9 - Avaliação do RDW no sangue periférico das fêmeas 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.

5.1.1.6 Peso dos órgãos dos animais

Após a eutanásia dos animais foi realizada a necrópsia, e analisado macroscopicamente os seguintes órgãos: coração, pulmão, fígado, estômago, baço e rins (direito e esquerdo). Nenhuma anormalidade foi encontrada na análise macroscópica. Além disso, os órgãos foram pesados, e não houve nenhuma alteração significativa dos grupos tratados com o grupo controle (Tabela 8).

Tabela 8 - Peso dos órgãos de camundongos Swiss fêmeas e machos (n= 40) tratados com CH₃ISACN nas doses de 300, 150 e 75 mg/kg.

Fêmeas	Controle	300 mg/Kg	150 mg/Kg	75 mg/Kg
Coração	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,14 ± 0,01
Pulmão	0,47 ± 0,02	0,57 ± 0,07	0,56 ± 0,03	0,34 ± 0,04
Fígado	1,80 ± 0,06	1,78 ± 0,12	1,90 ± 0,05	2,06 ± 0,13
Estômago	0,41 ± 0,01	0,49 ± 0,02	0,53 ± 0,04	0,49 ± 0,05
Baço	0,22 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,17 ± 0,02
Rim direito	0,19 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,20 ± 0,03
Rim esquerdo	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,18 ± 0,02
Machos	Controle	300 mg/Kg	150 mg/Kg	75 mg/Kg
Coração	0,19 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,17 ± 0,01
Pulmão	0,50 ± 0,07	0,65 ± 0,05	0,61 ± 0,05	0,42 ± 0,06
Fígado	2,48 ± 0,06	2,17 ± 0,06	2,2 ± 0,03	2,35 ± 0,10
Estômago	0,45 ± 0,04	0,51 ± 0,02	0,53 ± 0,01	0,47 ± 0,04
Baço	0,21 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,23 ± 0,03
Rim direito	0,27 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,21 ± 0,04	0,29 ± 0,03
Rim esquerdo	0,28 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,43 ± 0,16	0,24 ± 0,01

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

5.1.1.7 Avaliação histopatológica

Os cortes histológicos de coração, fígado, estômago e rins dos grupos experimentais foram analisados pela coloração H&E em microscópio óptico nos aumentos de x40 e x100. Todas as lâminas foram analisadas e para captura da imagem digital foi escolhida a melhor lâmina para representação de cada grupo.

5.1.1.7.1 Avaliação histopatológica do estudo agudo com ratas *Wistar*

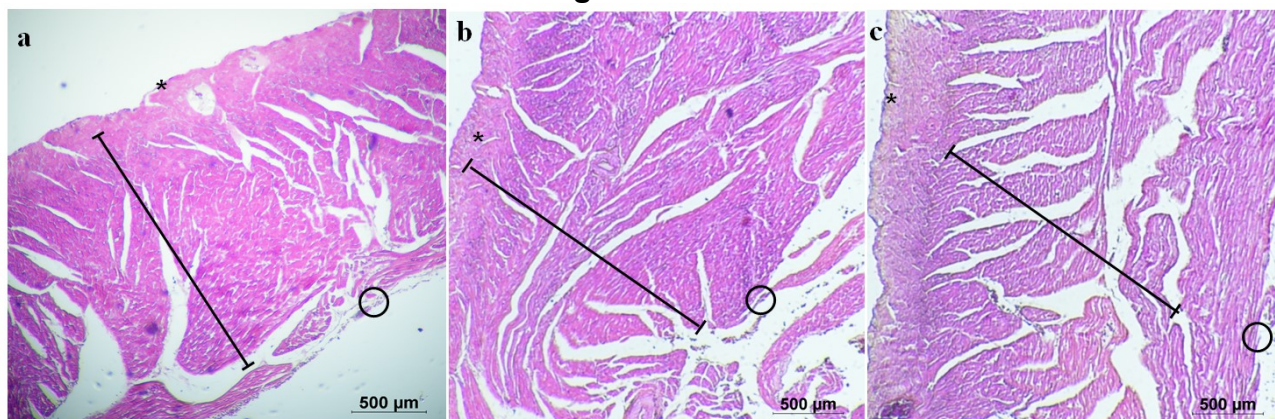
Foi realizado uma avaliação toxicológica aguda seguindo a OECD 423 (2001) com a CH₃ISACN (Melo, 2020), sendo os resultados da análise histopatológica apresentados neste trabalho.

No ensaio agudo, realizado em ratas, a análise do tecido cardíaco dos grupos tratados nas doses de 300 mg/kg e 2.000 mg/Kg mostrou estruturas com

características morfológicas preservadas para endocárdio, miocárdio e epicárdio quando comparado ao grupo controle (Figura 8).

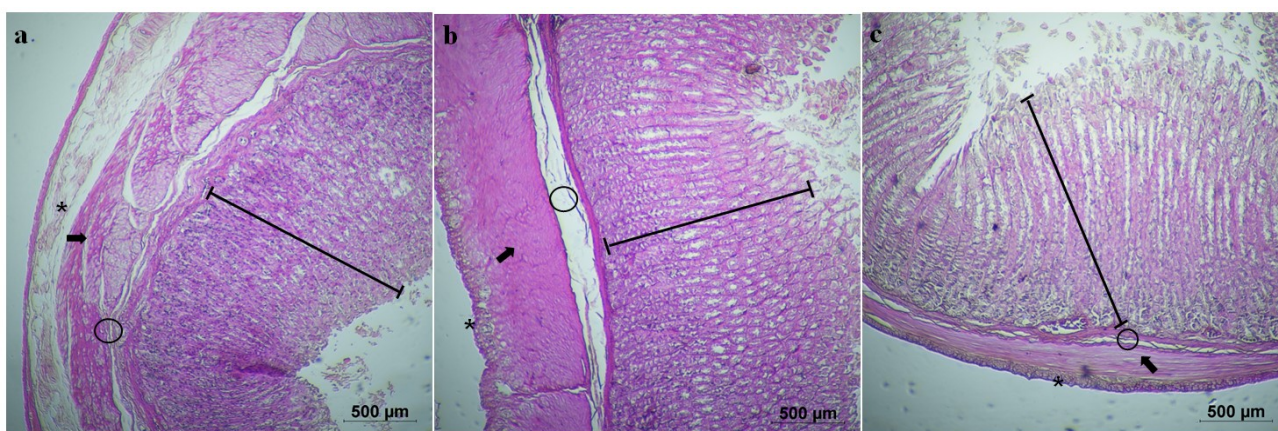
Para o estômago, os grupos tratados apresentaram glândulas gástricas normais, lâmina própria e muscular da mucosa preservadas, semelhante ao grupo controle. Não foram observadas alterações morfológicas sugestivas de toxicidade (Figura 9).

Figura 8 - Parede atrial do coração de ratos Wistar nos grupos experimentais agudo



Grupo controle (a), grupo tratado com 300 mg/Kg (b), grupo tratado com 2.000 mg/Kg (c). Não houve sinais de toxicidade no coração. Epicárdio (asterisco), miocárdio (barra), endocárdio (círculo). a, b, c – H&E, ampliação 400x.

Figura 9 - Estômago de ratos Wistar nos grupos experimentais agudo.

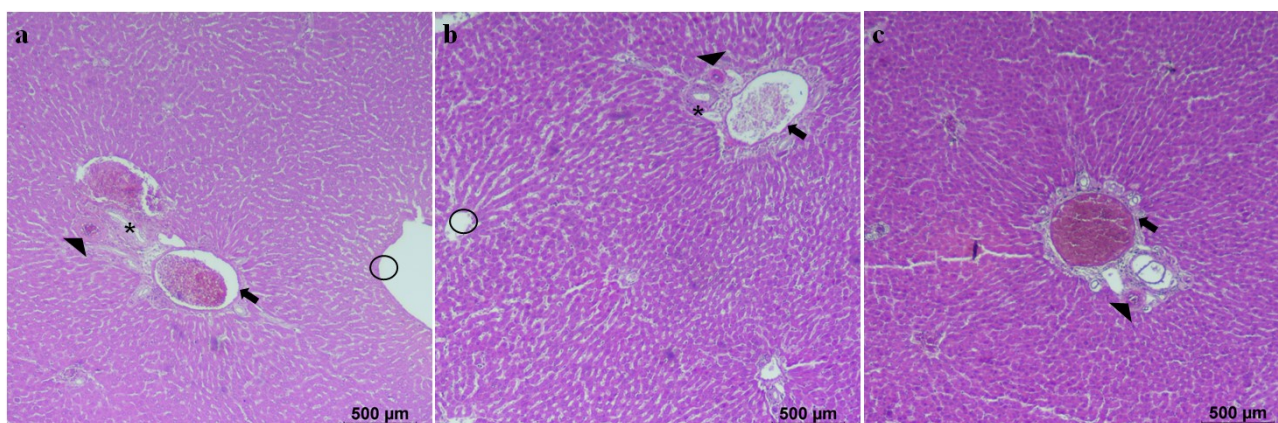


Grupo controle (a), grupo tratado com 300 mg/Kg (b), grupo tratado com 2.000 mg/Kg (c). Ausência de anormalidades indicativas de toxicidade. Camada mucosa (barra), camada submucosa (círculo), camada muscular externa (seta) e camada serosa (asterisco). a, b, c – H&E, ampliação 400x.

A análise hepática mostrou que os grupos tratados apresentavam características microscópicas semelhantes ao grupo controle, com arquitetura lobular preservada, veias com paredes finas equidistantes, espaços portais regularmente distribuídos, compatíveis com a normalidade (Figura 10).

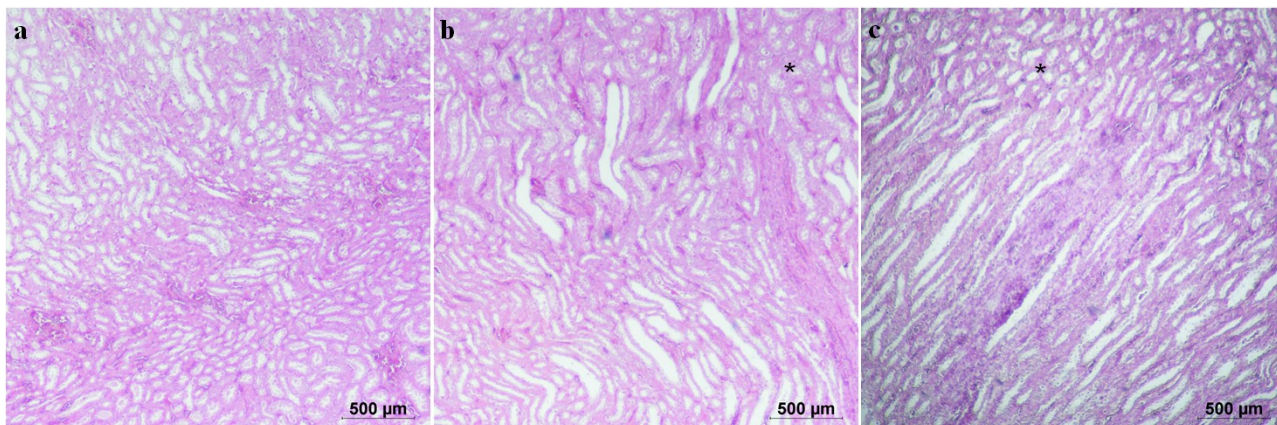
Para os rins, os grupos tratados (Figuras 11b e c) apresentaram características morfológicas normais semelhantes ao grupo controle, com presença de células mesangiais, artérias e veias intralobulares regularmente distribuídas.

Figura 10 - Fígado das ratas *Wistar* dos grupos experimentais agudo.



Grupo controle (a), grupo tratado com 300 mg/Kg (b), grupo tratado com 2.000 mg/Kg (c). Ramo da artéria hepática (ponta da seta), ramo da veia porta (seta), via biliar (asterisco) e veia centrolobular (cíclico). a, b, c – H&E, ampliação 400x.

Figura 11 – Região medular dos rins de ratas *Wistar* dos grupos experimentais agudo

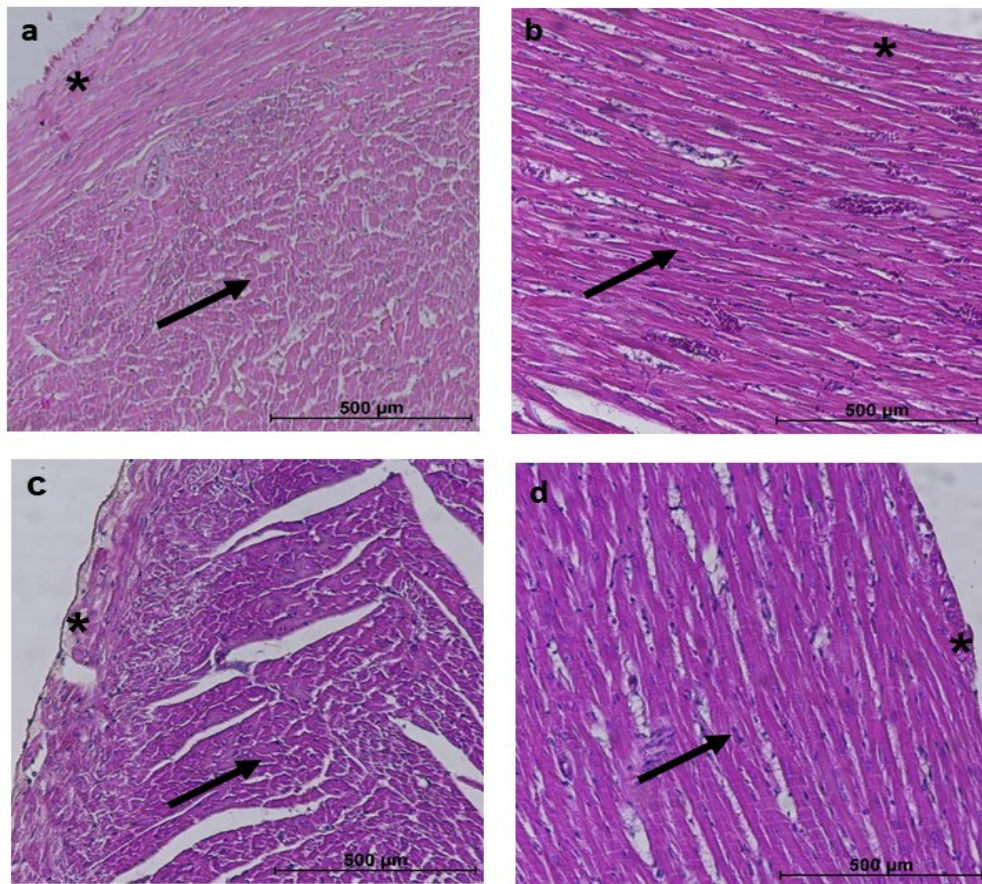


Grupo controle (a), grupo tratado com 300 mg/Kg (b), grupo tratado com 2.000 mg/Kg (c). a, b, c – H&E, ampliação 400x.

5.1.1.7.2 Avaliação histopatológica do estudo de doses repetidas com camundongos tratados pela CH₃ISACN

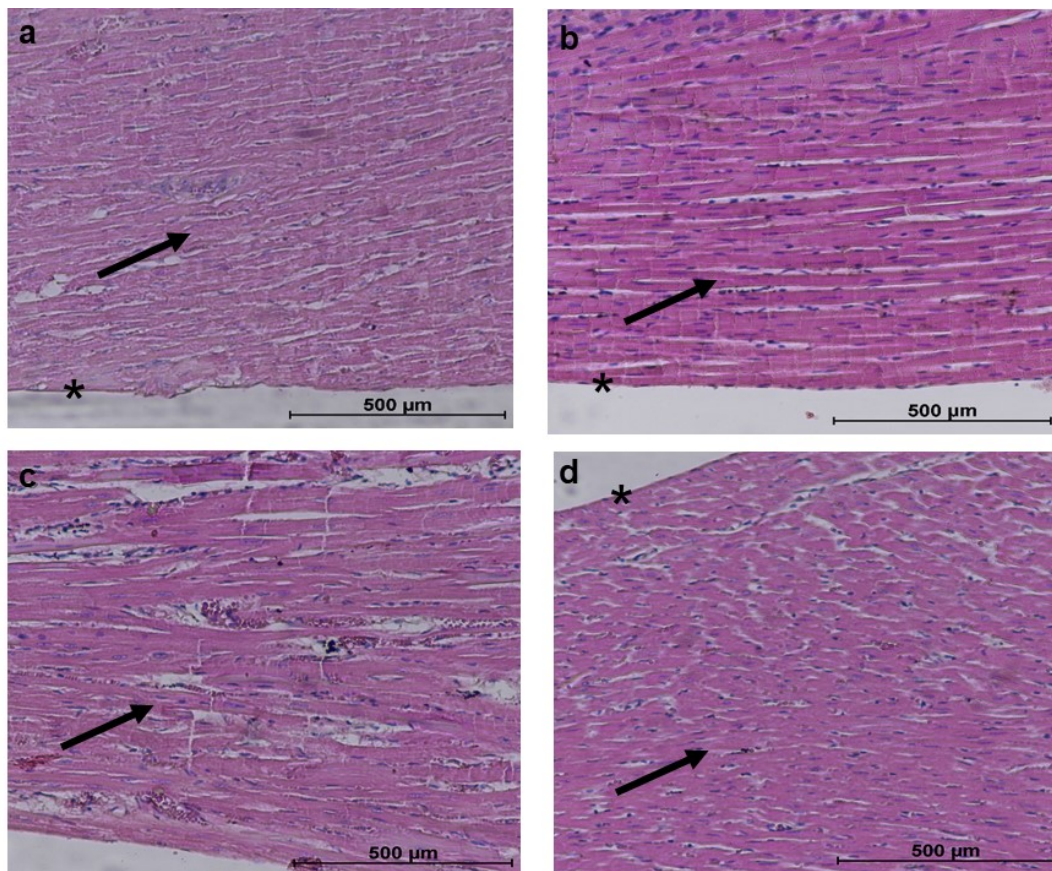
Os camundongos fêmeas e machos tratados com a CH₃ISACN nas doses de 300 mg/kg, 150 mg/Kg e 75 mg/Kg, assim como no ensaio agudo, apresentaram achados histológicos com preservação das três camadas do coração: endocárdio, miocárdio e epicárdio (Figura 12 e Figura 13). O endocárdio apresentando endotélio íntegro, presença de tecido conjuntivo frouxo e células de purkinje na camada subendocárdica. O miocárdio apresentou células musculares cardíacas preservadas em tamanho, forma e número, com discos intercalares típicos. Valvas cardíacas e septo interventricular preservados. Epicárdio íntegro e aderido ao miocárdio, com vasos sanguíneos e nervos bem preservados. A parede ventricular apresenta arquitetura preservada. As características de normalidade do endocárdio, miocárdio e epicárdio foram encontradas nos grupos tratados quando comparados entre si bem como com os controles.

Figura 12 - Análise da parede do coração (endocárdio e miocárdio) dos camundongos fêmeas.



Legenda: grupo tratado 300 mg/Kg (a), grupo tratado com 150 mg/Kg (b), grupo tratado com 75 mg/Kg (c) e grupo controle (d). Miocárdio (seta), endocárdio (asterisco). a, b, c, d– H&E, objetiva 10x, A.T. x100.

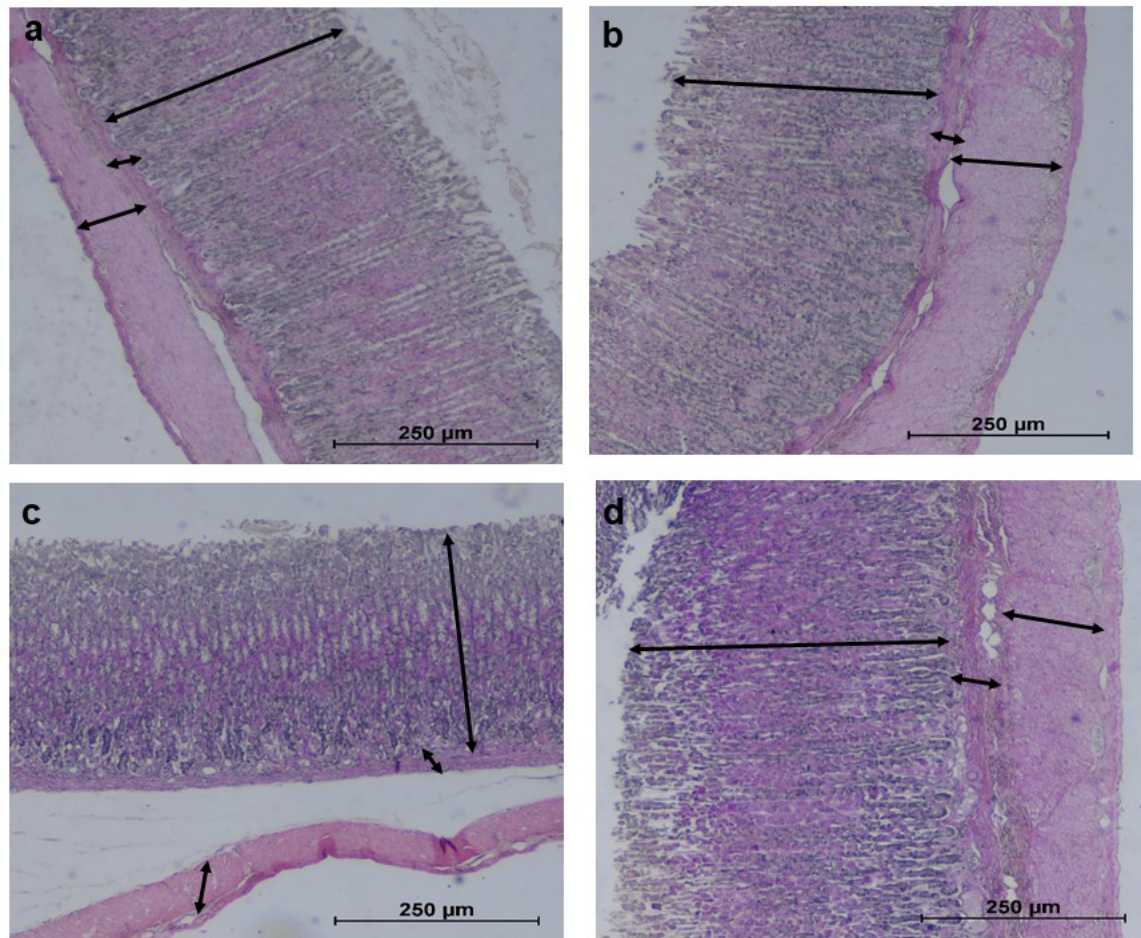
Figura 13 - Análise da parede do coração (endocárdio e miocárdio) dos camundongos machos.



Legenda: grupo tratado 300 mg/Kg (**a**), grupo tratado com 150 mg/Kg (**b**), grupo tratado com 75 mg/Kg (**c**) e grupo controle (**d**). Miocárdio (seta), endocárdio (asterisco). **a, b, c, d**– H&E, objetiva 10x, A.T. x100.

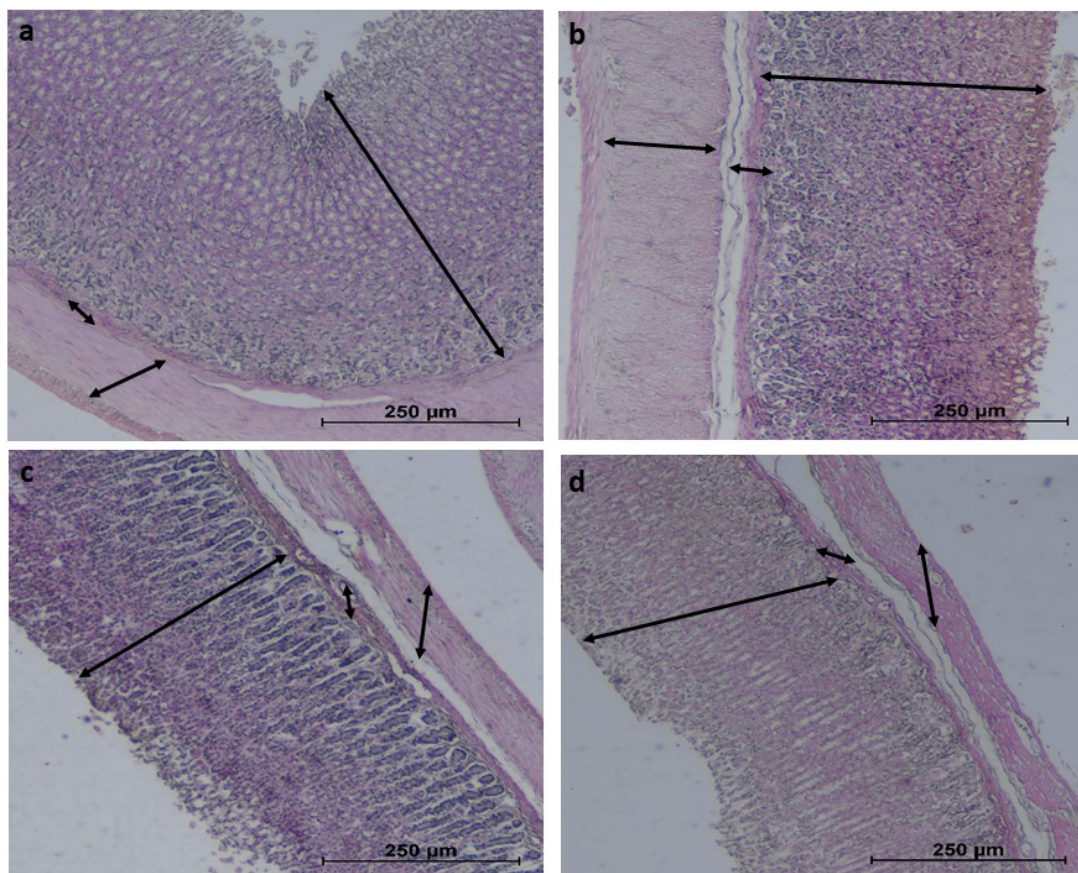
Com relação à análise do estômago, os camundongos fêmeas apresentaram, na camada mucosa, presença de glândulas gástricas, lâmina própria e muscular da mucosa preservados. A camada submucosa bem característica com presença de vasos sanguíneos; a muscular externa com presença das camadas circular interna e longitudinal externa e a camada serosa íntegra. Esse perfil é característico de normalidade (Figura 14). Os machos apresentaram camada mucosa preservada, camada submucosa e camada muscular externa e camada serosa com arquitetura características preservadas (Figura 15).

Figura 14 – Análise do estômago das fêmeas tratadas por CH₃ISACN no ensaio de doses repetidas.



Legenda: grupo tratado 300 mg/Kg (**a**), grupo tratado com 150 mg/Kg (**b**), grupo tratado com 75 mg/Kg (**c**) e grupo controle (**d**). Camada mucosa (seta maior), camada submucosa (seta menor), camada muscular externa (seta média) e serosa (revestimento externo). **A, B, C e D** – H&E, objetiva 4x, A.T. x40.

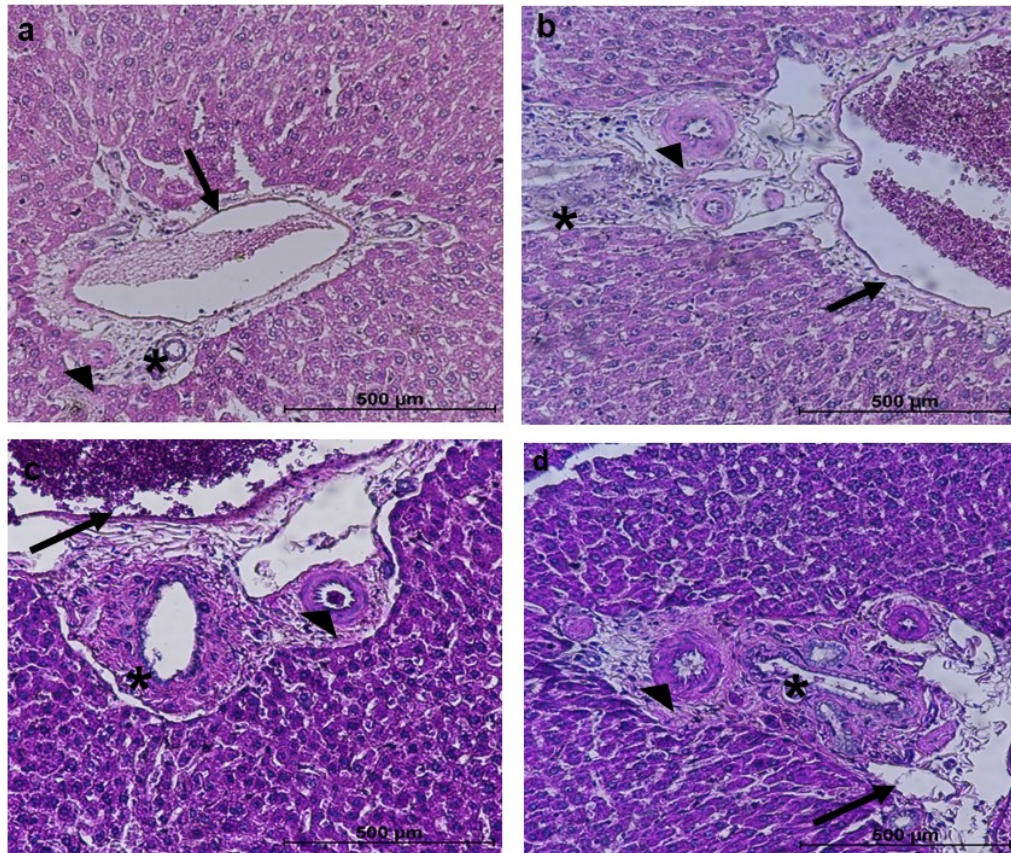
Figura 15 - Análise do estômago dos machos tratados por CH₃ISACN no ensaio de doses repetidas.



Legenda: grupo tratado 300 mg/Kg (**a**), grupo tratado com 150 mg/Kg (**b**), grupo tratado com 75 mg/Kg (**c**) e grupo controle (**d**). Camada mucosa (seta maior), camada submucosa (seta menor), camada muscular externa (seta média) e serosa (revestimento externo). **A, B, C e D** – H&E, objetiva 4x, A.T. x40.

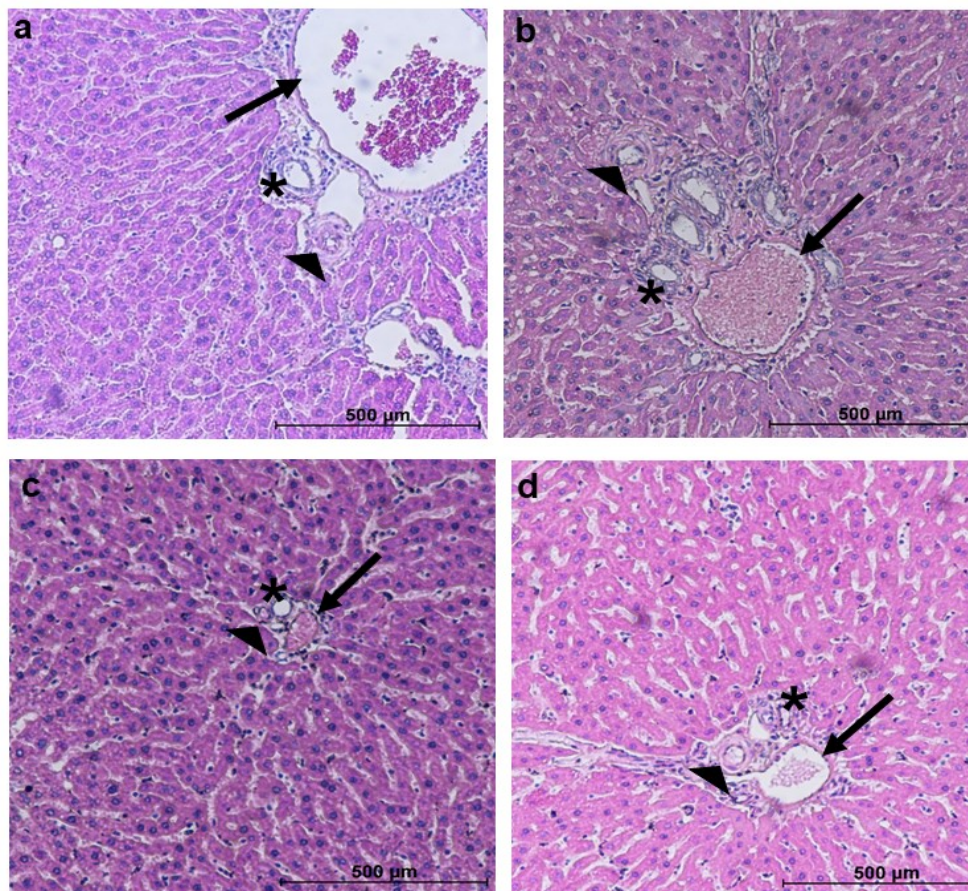
O fígado dos camundongos fêmeas apresentou ao exame microscópico arquitetura do tipo lobular preservada com congestão venosa portal, veias de paredes finas equidistantes, espaços portais regularmente distribuídos, comportando tríades hepáticas (ducto biliar, ramo da veia porta e ramo da artéria hepática). Os hepatócitos apresentaram organização em placas direcionadas para as veias centrolobulares de paredes finas, com diferença no tamanho dos núcleos, alteração na afinidade ao corante, promovendo alteração na coloração do citoplasma e do núcleo, caracterizando proliferação celular (Figura 16). As características encontradas são compatíveis com normalidade. A análise das lâminas de fígado de todos os grupos dos camundongos machos demonstrou preservação das características morfológicas de normalidade à análise por microscopia óptica (Figura 17).

Figura 16 - Análise do fígado das fêmeas tratadas por CH₃ISACN no ensaio de doses repetidas.



Legenda: grupo tratado 300 mg/Kg (**a**), grupo tratado com 150 mg/Kg (**b**), grupo tratado com 75 mg/Kg (**c**) e grupo controle (**d**). Ducto biliar (asterisco), ramo da artéria hepática (ponta de seta) e ramo da veia porta (seta preta). **A, B, C e D** – H&E, objetiva 10x, A.T. x100.

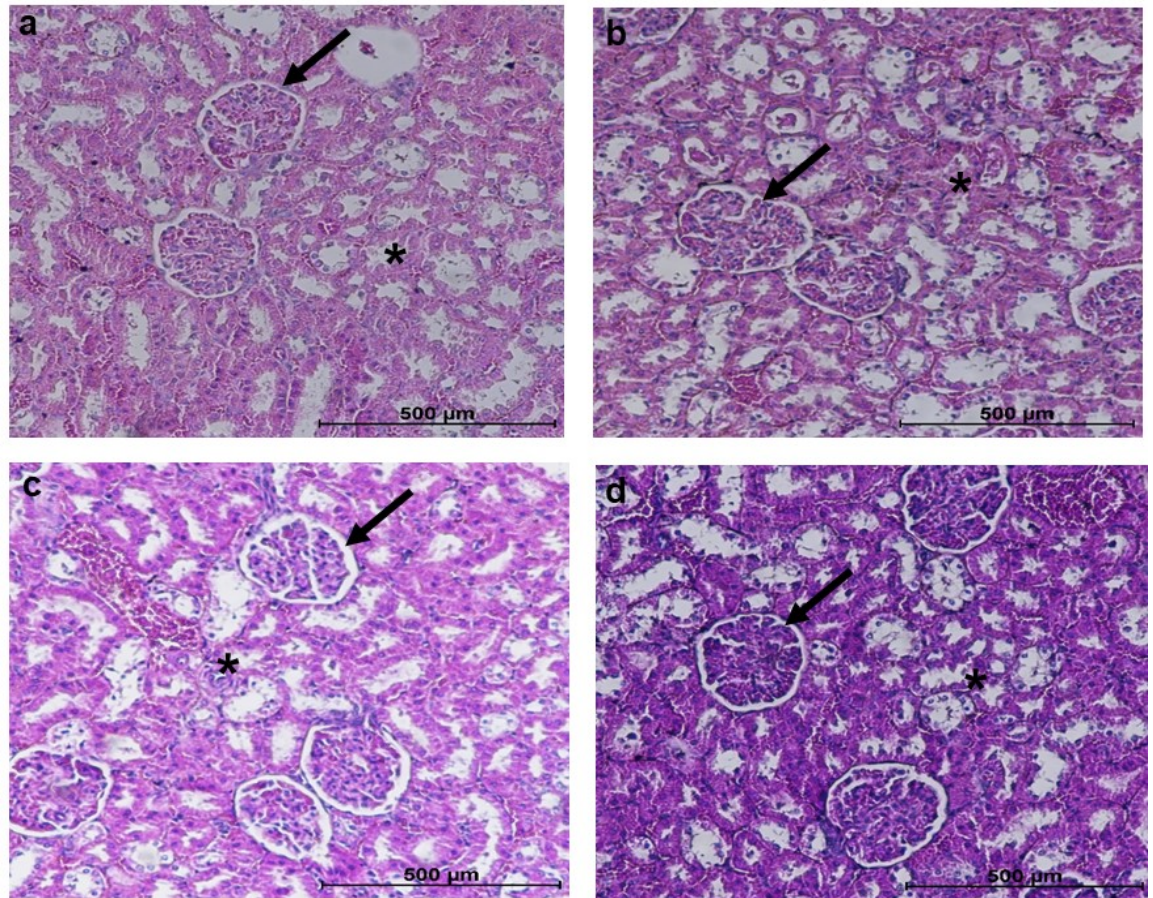
Figura 17 - Análise do fígado dos machos tratados por CH₃ISACN no ensaio de doses repetidas.



Legenda: grupo tratado 300 mg/Kg (**a**), grupo tratado com 150 mg/Kg (**b**), grupo tratado com 75 mg/Kg (**c**) e grupo controle (**d**). Ducto biliar (asterisco), ramo da artéria hepática (ponta de seta) e ramo da veia porta (seta preta). **A, B, C e D** – H&E, objetiva 10x, A.T. x100.

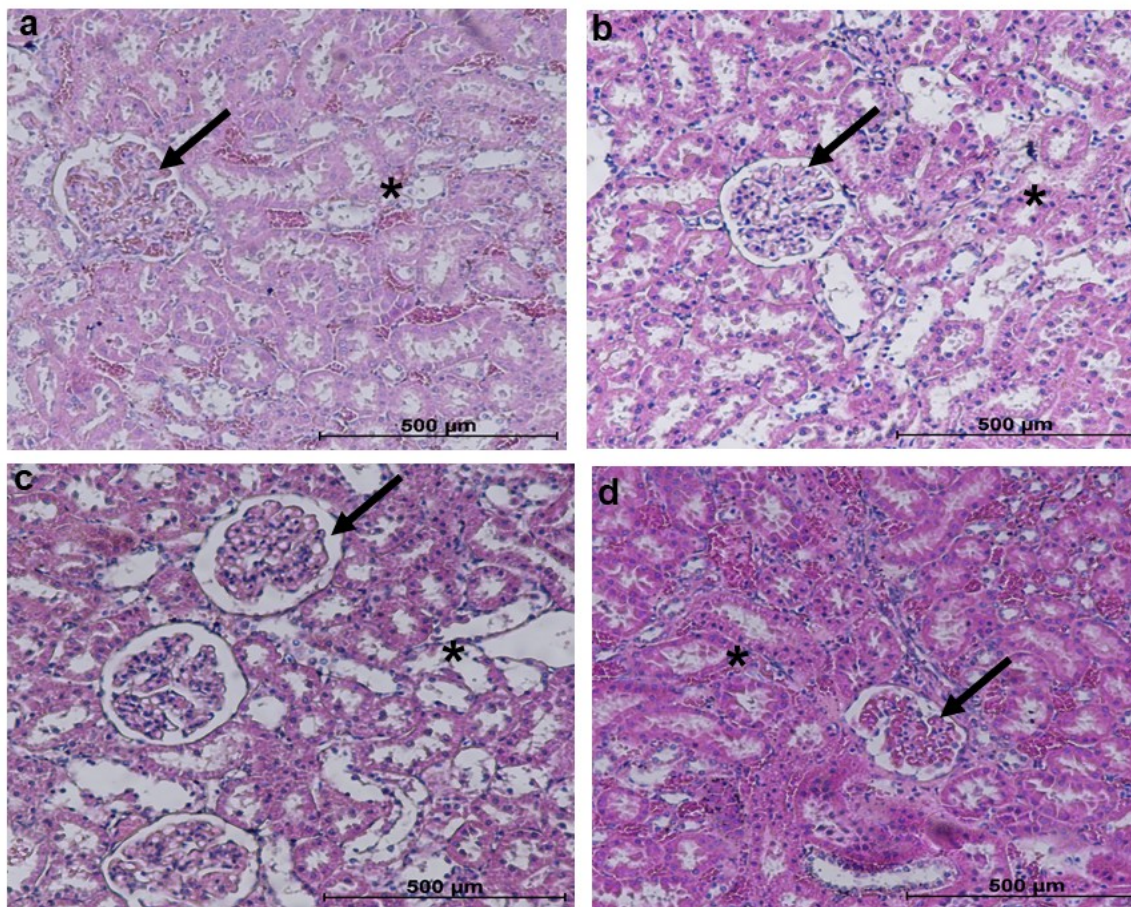
Quanto aos rins, os machos e fêmeas apresentaram, na análise histológica, características de normalidade. Na região cortical, os lóbulos estavam conservados com corpúsculos renais preservados, glomérulos envolvidos por fina cápsula de Bowmann (folheto visceral e folheto parietal). Os túbulos contorcidos proximais e distais, alça de Henle, túbulos e ductos coletores apresentando epitélio variável, de colunar a pavimentoso, típico do epitélio de revestimento. Presença de células mesangiais, artérias e veias intralobulares regularmente distribuídas. Na região medular, a estrutura das alças de Henle, túbulos coletores, ductos, e vasos retos estavam conservados. As artérias e veias interlobares apresentavam-se regularmente distribuídas. Os grupos apresentaram características morfológicas de normalidade semelhantes (Figura 18 e 19).

Figura 18 - Análise dos rins dos camundongos fêmeas tratadas por CH₃ISACN no ensaio de doses repetidas.



Legenda: grupo tratado 300 mg/Kg (**a**), grupo tratado com 150 mg/Kg (**b**), grupo tratado com 75 mg/Kg (**c**) e grupo controle (**d**). Corpúsculo renal (seta), labirinto cortical (asterisco); **a, b, c, d** -H&E, objetiva 10x, A.T. x100.

Figura 19 - Análise dos rins dos camundongos machos tratados por CH₃ISACN no ensaio de doses repetidas.

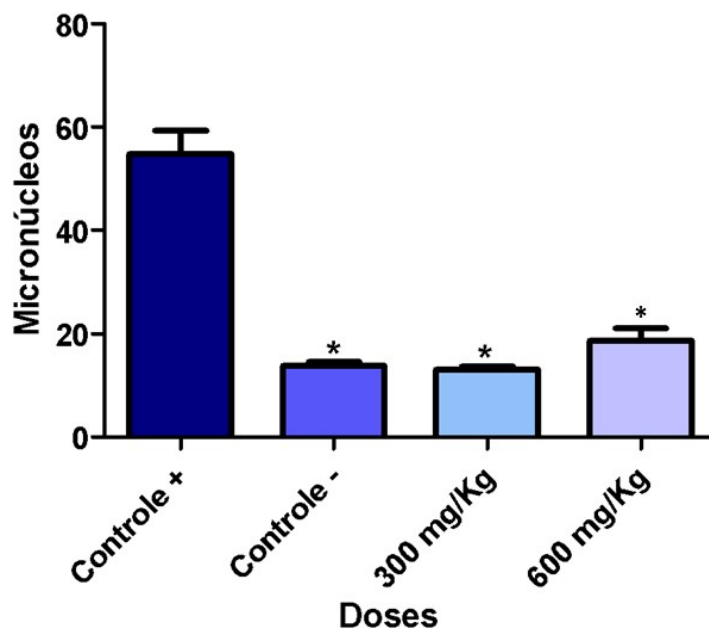


Legenda: grupo tratado 300 mg/Kg (a), grupo tratado com 150 mg/Kg (b), grupo tratado com 75 mg/Kg (c) e grupo controle (d). Corpúsculo renal (seta), labirinto cortical (asterisco); a, b, c, d - H&E, objetiva 10x, A.T. x100.

5.1.2 Estudo de genotoxicidade – teste do micronúcleo

Foi observado uma diferença significativa na quantidade de micronúcleos de camundongos fêmeas tratadas com a dose de 300 mg/Kg ($13,00 \pm 0,58$) em comparação com o grupo controle positivo (ciclofosfamida 50 mg/Kg) com uma média de $54,67 \pm 4,63$. Também se observa que a frequência de micronúcleos deste grupo chegou a ser menor até mesmo que o grupo controle negativo com uma média de $13,67 \pm 0,88$ de micronúcleos. Os animais tratados com a dose de 600 mg/Kg apresentaram uma média de $18,67 \pm 2,33$, e também tiveram diferença significativa com o controle positivo (Gráfico 10).

Gráfico 10 - Avaliação da frequência de micronúcleo em camundongos fêmeas tratadas com a substância CH₃ISACN.



Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. Análise dos grupos tratados com o controle positivo por Kruskal-Wallis, seguido também pelo teste post-hoc de Dunnett. Análises entre os grupos controles por Mann-Whitney. Legenda: * $p < 0,05$ comparado com grupo controle positivo.

5.2 AVALIAÇÃO ANTIPLASMODIAL *IN VIVO*

O teste quimiossupressor foi realizado usando o teste supressivo padrão de 4 dias (atividade na infecção precoce) contra infecção por *Plasmodium berghei* em camundongos inoculados com 1×10^5 glóbulos vermelhos parasitados (RBCs). No quinto dia, foram preparados esfregaços de sangue finos da veia caudal de cada camundongo em lâminas microscópicas. A porcentagem de supressão de parasitemia foi calculada para cada concentração de teste comparando a parasitemia em controles infectados com aqueles grupos que receberam diferentes concentrações de compostos (CH₃ISACN e Cloroquina). Os compostos que reduziram a parasitemia em $\geq 30\%$ foram considerados ativos (Carvalho *et al.*, 1991).

A Tabela 9 abaixo apresenta um resumo dos resultados. A relação entre o composto CH₃ISACN e a cloroquina (medicamento antimalárico de referência) é mostrada na Gráfico 11, com CH₃ISACN sendo parcialmente ativo quando comparado à cloroquina.

No 14º dia após a infecção, houve a morte de 1 animal controle negativo (grupo 2), e os demais animais deste grupo se encontravam fracos, trêmulos, magros, com piloereção e parestesia. Enquanto que os animais do grupo 1 (tratados por CH₃ISACN) e os demais, não apresentavam nenhum sinal clínico aparente.

Tabela 9 - Atividade quimiossupressora do composto CH₃ISACN avaliada no 5º dia contra infecção por *Plasmodium berghei* em camundongos.

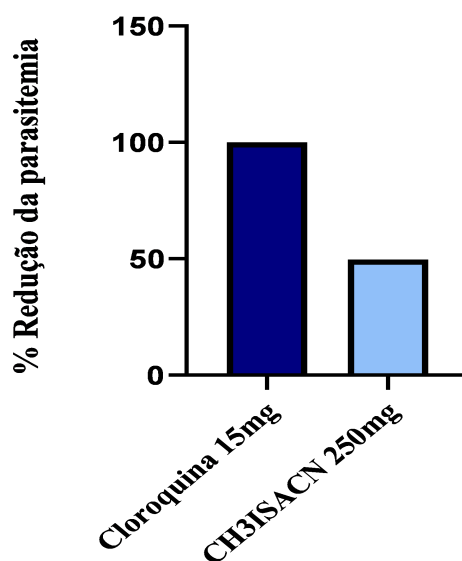
Dose teste (oral)	% Parasitemia Média*	% Supressão Média†
Veículo**	4.97 ± 0.01	
CH ₃ ISACN 250 mg/Kg	2.50 ± 0,02	49.7
CQ** 15 mg/Kg	0.01± 0.001	99.7

Legenda: *Os valores são expressos como porcentagem e média ± SD (n = 5).

** Veículo: água destilada mais DMSO (1%); CQ: cloroquina (droga de referência antimalárica)

†A supressão da parasitemia foi calculada para cada concentração comparando a parasitemia em controles infectados com aqueles grupos que receberam tratamentos diferentes.

Gráfico 11 - Relação entre a atividade antimalarial do composto CH₃ISACN comparado a cloroquina.



Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. Análise dos grupos utilizando o teste t-student.

5.2.1 Análise histopatológica dos animais infectados por *Plasmodium berghei*

Após a eutanásia dos animais que participaram do teste de supressão, o seu baço foi coletado, e então realizado a análise histopatológica. Na figura 20 apresentamos uma análise geral do baço dos quatro grupos. Os cortes histológicos

corados em hematoxilina-eosina do grupo 1, que recebeu o tratamento com a CH₃ISACN 250 mg/Kg (Figura 20a), revelam fragmentos de baço apresentando polpa branca bem definidas exibindo áreas focais de necrose. Na polpa vermelha verifica-se áreas de congestão em seios esplênicos e em vasos sanguíneos trabeculares que por sua vez exibem no seu lúmen hemácias e grande quantidade de células mononucleares. Presença de melanomacrófagos, tanto nos seios quanto nos cordões esplênicos. Constata-se células gigantes multinucleares do tipo corpo estranho tanto na polpa branca quanto na polpa vermelha.

Quando comparamos tal resultado com o grupo 2, que foi tratado com água e DMSO (Figura 20b), notamos uma maior desorganização quanto ao arranjo estrutural na polpa branca e polpa vermelha. Verifica-se na polpa branca, maior presença de áreas de necrose, por vezes preenchida por macrófagos espumosos. Constata-se a presença de intensa congestão nos seios esplênicos. No que tange a presença de células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho, é possível constatar maior concentração nas porções mais periféricas do baço em relação as porções mais profundas tanto na polpa branca quanto na polpa vermelha.

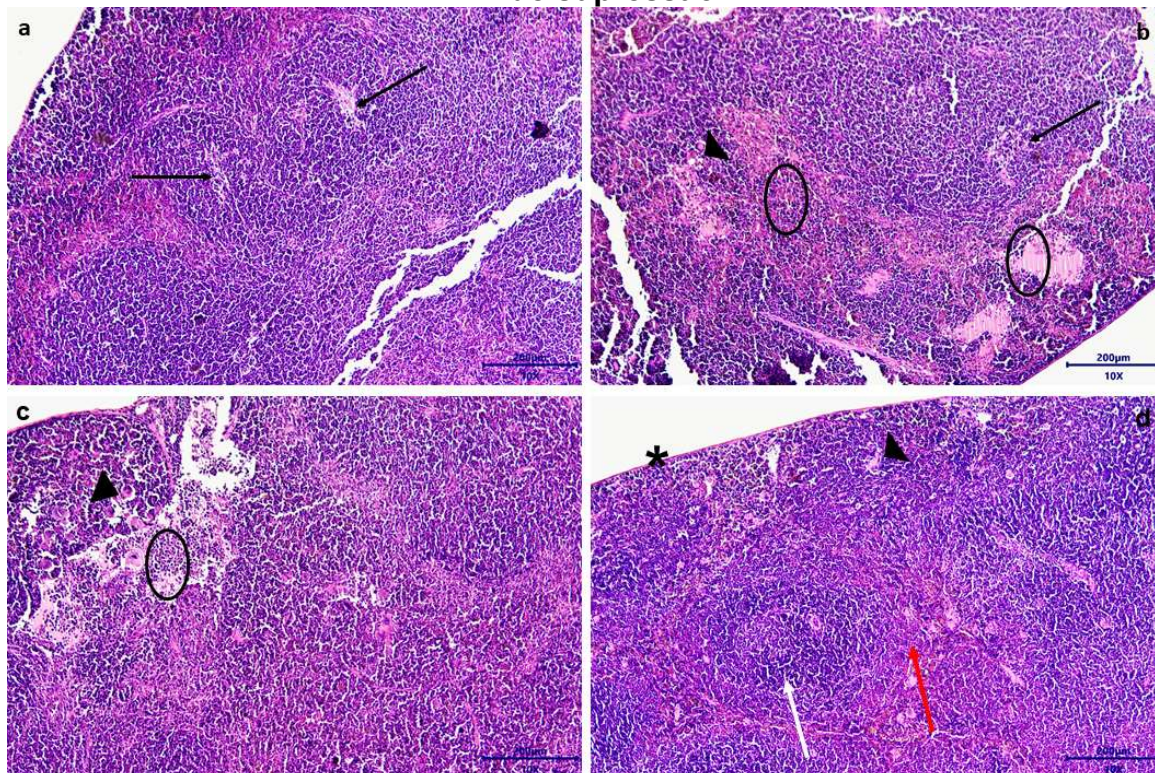
O grupo 3, que foi tratado com 15 mg/Kg de cloroquina (Figura 20c) exibiu áreas com organização na polpa branca, mas em outras áreas se observa uma desorganização desta região. Na polpa vermelha se verifica um menor grau de congestão nos seios esplênicos, assim como em vasos sanguíneos trabeculares. Não se observa área de necrose, contudo verifica-se maior concentração de células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho tanto na polpa branca quanto na polpa vermelha.

Ainda, quando comparamos o grupo 1 com o grupo 4, que não foi infectado (Figura 20d), verificamos que este último apresentou uma morfologia preservada com polpa branca e polpa vermelha bem definidas. Contudo se verifica congestão vascular e de seios esplênicos, além da presença de alguns melanomacrófagos, tanto nos seios quanto nos cordões esplênicos. Observa-se também a presença de algumas células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho difusamente distribuídas tanto na polpa branca quanto na polpa vermelha, assim como foi encontrado no grupo 1.

Portanto, a partir desses resultados, observamos que o grupo 1 (250 mg/Kg de CH₃ISACN +1% DMSO) apresentou menos alterações patológicas do que o

grupo 2 (DMSO 1%+H₂O), porém as alterações foram maiores quando comparadas com o o grupo 3 (15 mg/Kg de cloroquina).

Figura 20- Análise histopatológica do baço dos camundongos usados no teste de supressão



Legenda: a) grupo 1 tratado com 250 mg/Kg CH₃ISACN + 1% DMSO; b) grupo 2 controle negativo 1%DMSO+H₂O; c) grupo 3 tratado com 15 mg/Kg cloroquina; d) grupo 4 controle de órgãos.

Seta preta: áreas de necrose na polpa branca; Ponta de seta: células gigantes multinucleadas; Círculo: áreas de congestão em seios esplênicos; Asterisco: cápsula do baço; Seta branca: polpa branca; Seta vermelha: polpa vermelha (Hematoxilina-Eosina (HE); Objetiva de 10; Ampliação de 100x).

Semelhantemente ao baço, o fígado também foi avaliado, no qual o grupo 1 (Figura 21a) apresentou áreas de intensa degeneração balonizante dos hepatócitos, numerosos focos de infiltrado inflamatório mononuclear tanto na periferia de veias centro lobulares quanto em vasos localizadas no espaço porta hepático. Evidencia-se escassa quantidade de célula gigante multinucleada do tipo corpo estranho. Ao compararmos com o grupo 2 (Figura 21b), identificamos extensas áreas de degeneração balonizante, maior quantidade de focos de infiltrado inflamatório mononuclear na periferia de veias centro lobulares quanto em vasos do sistema porta hepático. Evidencia-se ainda áreas focais de necrose com a presença de

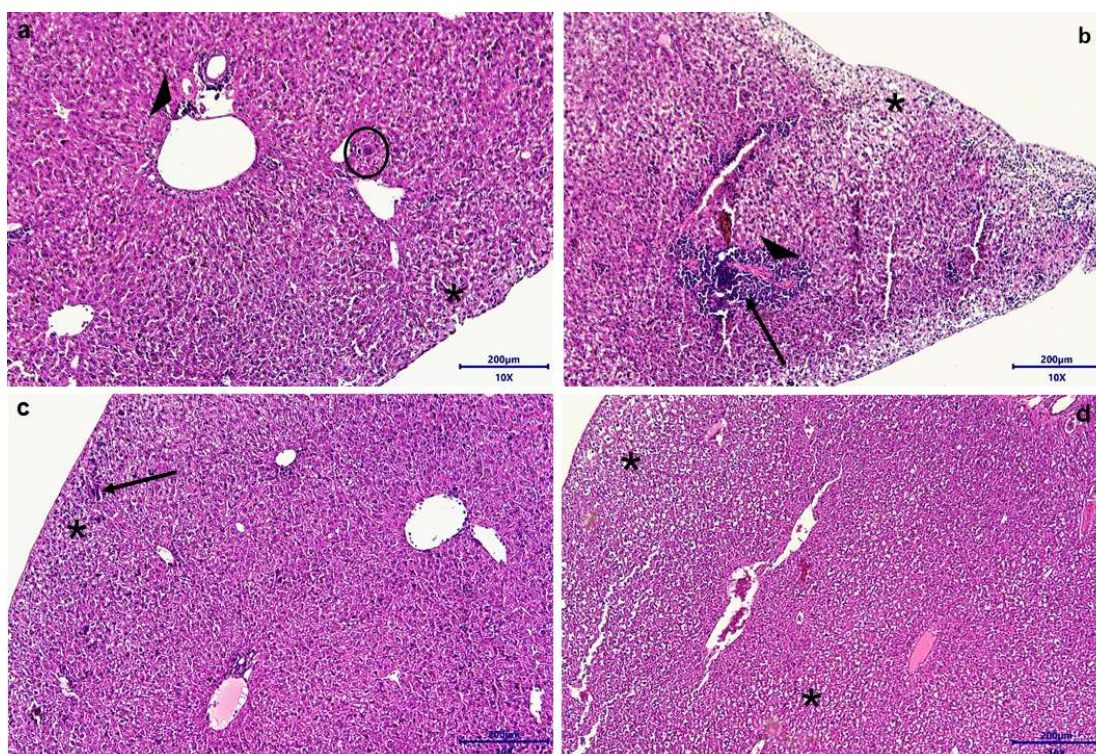
agregados linfocíticos nessas regiões e de células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho.

O grupo 3 (Figura 21c), que recebeu a cloroquina como tratamento, também exibiu áreas de degeneração balonizante principalmente localizadas nas porções periféricas do parênquima hepático e maior preservação das porções centrais do órgão. Ainda, este grupo apresentou menor quantidade de focos de infiltrado inflamatório mononuclear e menor quantidade de linfócitos em cada área de inflamação. Entretanto, mostrou escassa área de necrose (o que não foi evidenciado no grupo 1) com presença de linfócitos e menor evidência de células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho.

A degeneração balonizante encontrada no grupo 1, também foi vista no grupo 4, além da evidência de focos de infiltrado inflamatório mononuclear no espaço porta hepático e áreas de congestão nos capilares sinusóides e nos demais vasos hepáticos.

Assim como no baço, no fígado o grupo 1 teve menos alterações patológicas comparadas ao grupo 2, e maiores comparadas aos demais grupos.

Figura 21 - Análise histopatológica do fígado dos camundongos usados no teste de supressão



Legenda: a) grupo 1 tratado com 250 mg/Kg CH₃ISACN + 1% DMSO; b) grupo 2 controle negativo 1%DMSO+H₂O; c) grupo 3 tratado com 15 mg/Kg cloroquina; d) grupo 4 controle de órgãos. Seta preta: Áreas de necrose contendo linfócitos; Ponta de seta: áreas de infiltrado inflamatório mononuclear; Asterisco: áreas de degeneração balonizante dos hepatócitos; Círculo: célula gigante multinucleada (Hematoxilina-Eosina (HE); Objetiva de 10; Ampliação de 100x).

5.3 DETERMINAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DA CH₃ISACN COMO INIBIDOR DAS FALCIPAÍNAS - *IN SILICO*

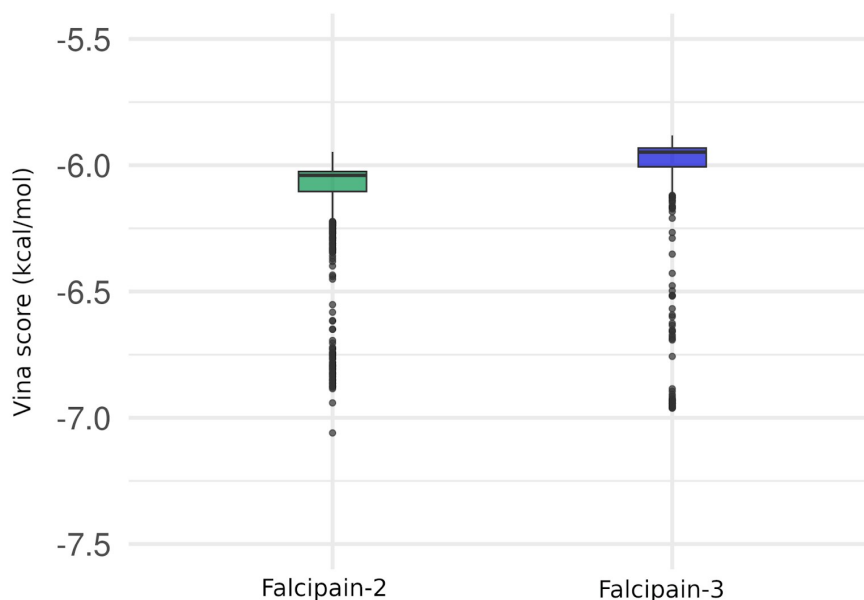
5.3.1 *Docking* molecular das proteínas FP2/ FP3 com a CH₃ISACN

As estruturas cristalográficas utilizadas para realização do docking molecular foram obtidas através do banco de dados de estruturas proteicas, *Protein Data Bank* (PDB). Os códigos de acesso das estruturas da falcipaína-2 e falcipaína-3 são 3BPF e 3BPM, respectivamente. Já a estrutura tridimensional do ligante CH₃ISACN foi obtida a partir da submissão do formato SMILES (CN1C(=O)C(O)(C(=C)C#N)C2=C1C=CC=C2) no servidor Molinspiration Galaxy 3D Generation (<https://www.molinspiration.com/cgi-bin/galaxy>). Ambos cristais tinham complexado em suas estruturas um inibidor cada, o inibidor E64 na FP-2 e

Leupeptina na FP-3. Os locais de ancoragem dos inibidores, que foram removidos do complexo, serviram como base para delimitar a região de ancoragem do ligante CH₃ISACN.

Após o docking exaustivo, avaliou-se os scores das 1000 melhores conformações do ligante geradas para cada proteína. Os complexos da FP-2 e FP-3 de melhores scores foram obtidos nas 172^o e 698^o ancoragens, respectivamente. Sendo, portanto, escolhidos os complexos de energia -7.06 kcal/mol e -6.962 kcal/mol para FP-2 e FP-3, respectivamente para proceder para as próximas etapas do estudo. Nota-se que a distribuição dos scores Vina nas duas moléculas foi distinto, com a FP-2 apresentando menores valores no geral (Gráfico 12). Na Tabela 10 é possível ver uma descrição dos valores obtidos na ancoragem em cada uma das proteínas. Ao comparar com o cristal, percebe-se que a região de ligação da CH₃ISACN na proteína é muito semelhante ao local de ligação dos inibidores E64 e leupeptina (Figura 22).

Gráfico 12 - Energias de interação do ligante CH₃ISACN com as proteases falcipaina-2 e falcipaina-3.



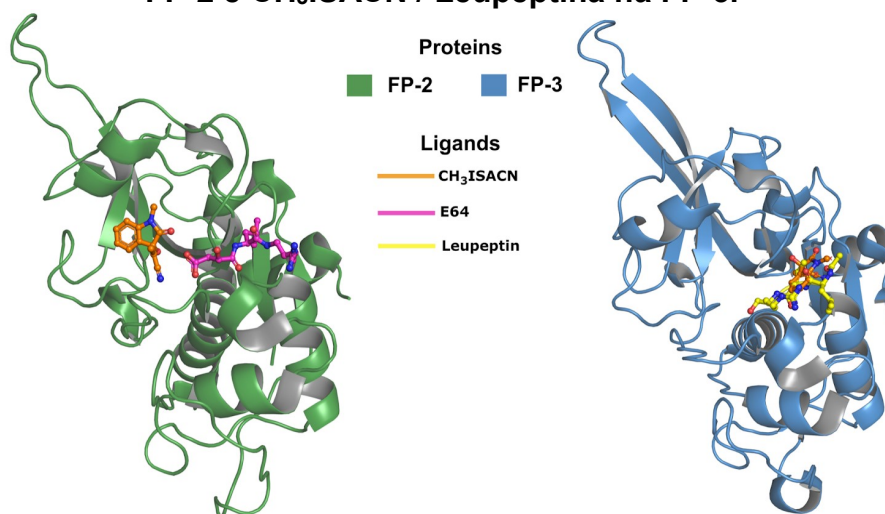
Fonte: autoria própria

Tabela 10 - Energias de interação do ligante CH₃ISACN com as proteases falcipaina-2 e falcipaina-3.

Proteína	Min	1º Quartil	Média	3º Quartil	DP
FP-2	-7.060	-6.104	-6.108	-6.025	0,1786
FP-3	-6.962	-6.006	-6.020	-5.932	0.2130

Legenda: DP (desvio padrão).

Figura 22 - Comparação do sítio de ancoragem do ligante CH₃ISACN / E64 na FP-2 e CH₃ISACN / Leupeptina na FP-3.



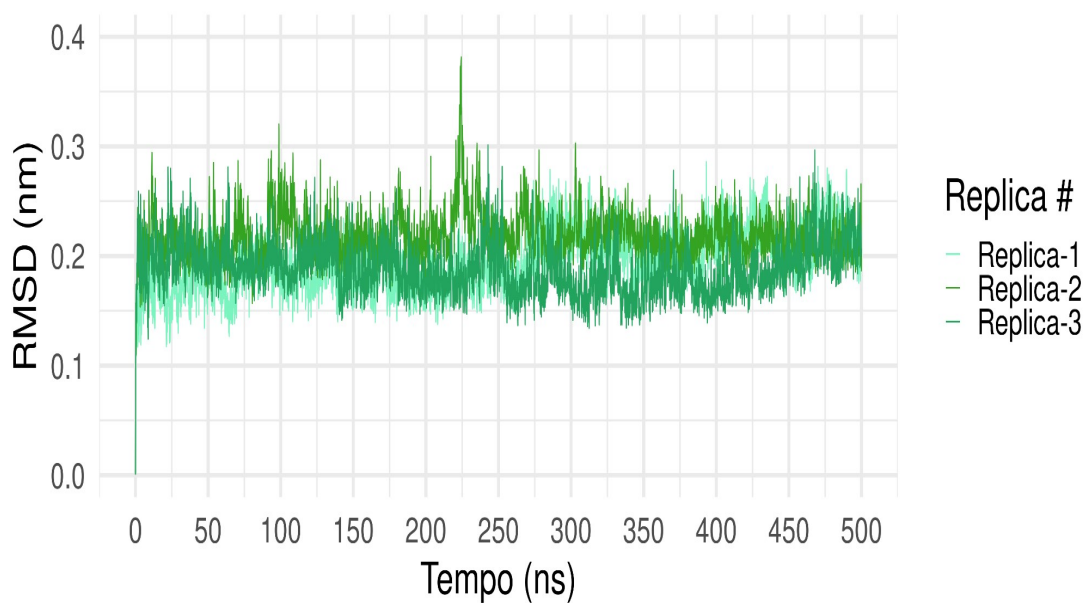
Fonte: Autoria própria

5.3.2 Análise de dinâmica molecular da CH₃ISACN com as proteases falcipaina-2 e falcipaina-3

Com a finalidade de avaliar a estabilidade da proteína em solução, foi calculado a raiz do desvio quadrático médio (RMSD). Essa métrica visa comparar a diferença estrutural média entre duas conformações diferentes com base nas distâncias dos seus carbonos alphas (C-alpha). A estrutura de referência utilizada foi o primeiro *frame* da dinâmica molecular. Observou-se que FP-2 as três réplicas variaram na faixa 0.13 nm e 0.38 nm, e após os 300 ns estiveram majoritariamente entre 0.15 nm e 0.3 nm (Gráfico 13). Já a FP-3 as três réplicas variaram na faixa entre 0.1 nm e 0.25 nm, o que sugere que a proteína se manteve estável por todo

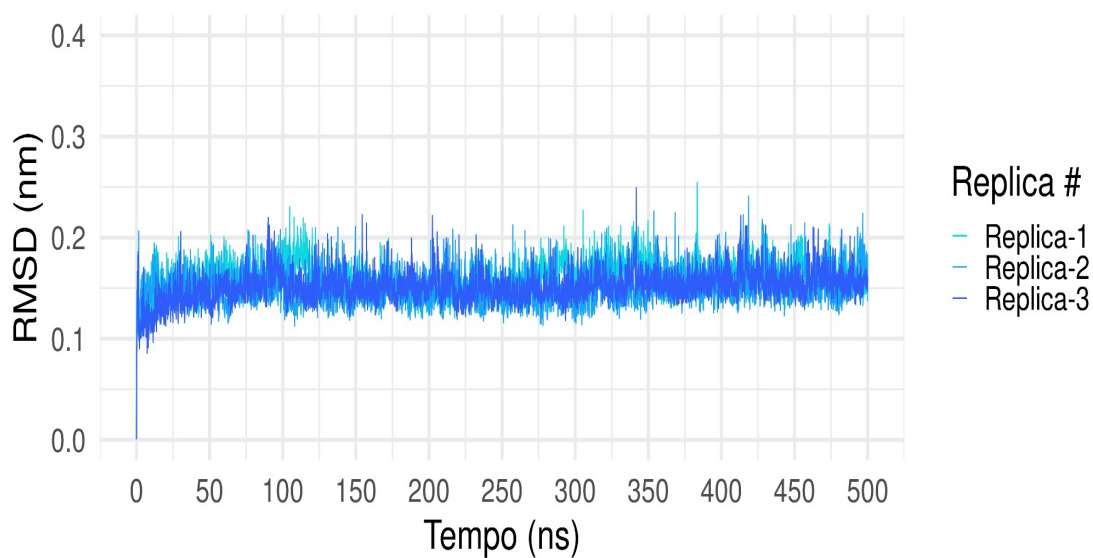
tempo analisado (Gráfico 14). Ao comparar as duas proteínas, nota-se uma maior estabilidade para a FP3.

Gráfico 13 - RMSD das réplicas da proteína falcipaina-2 e CH₃ISACN.



Fonte: autoria própria

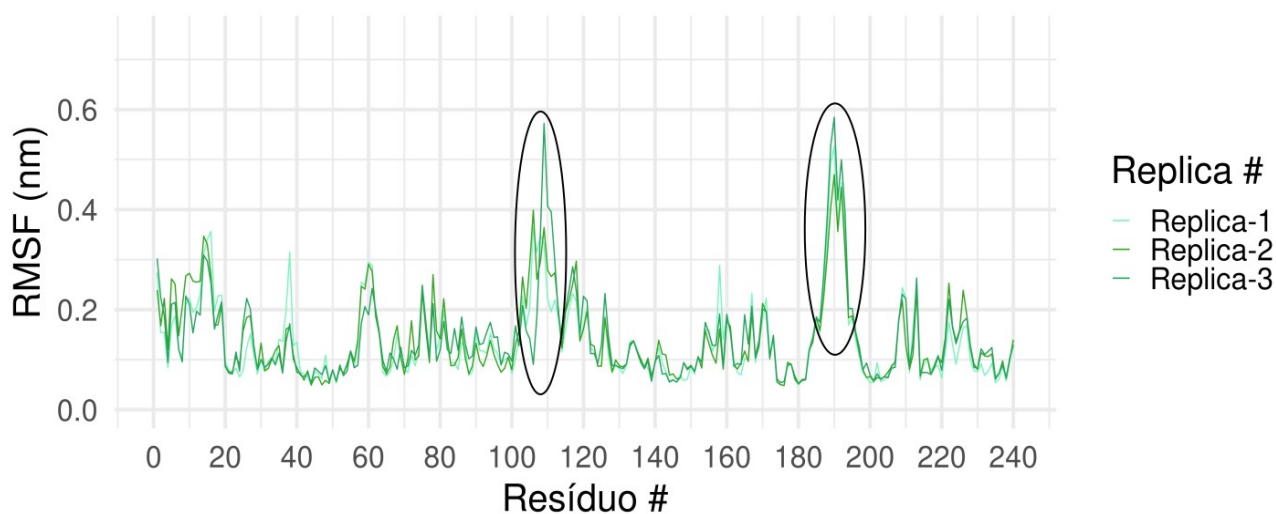
Gráfico 14 - RMSD das réplicas da proteína falcipaina-3 e CH₃ISACN.



Fonte: autoria própria

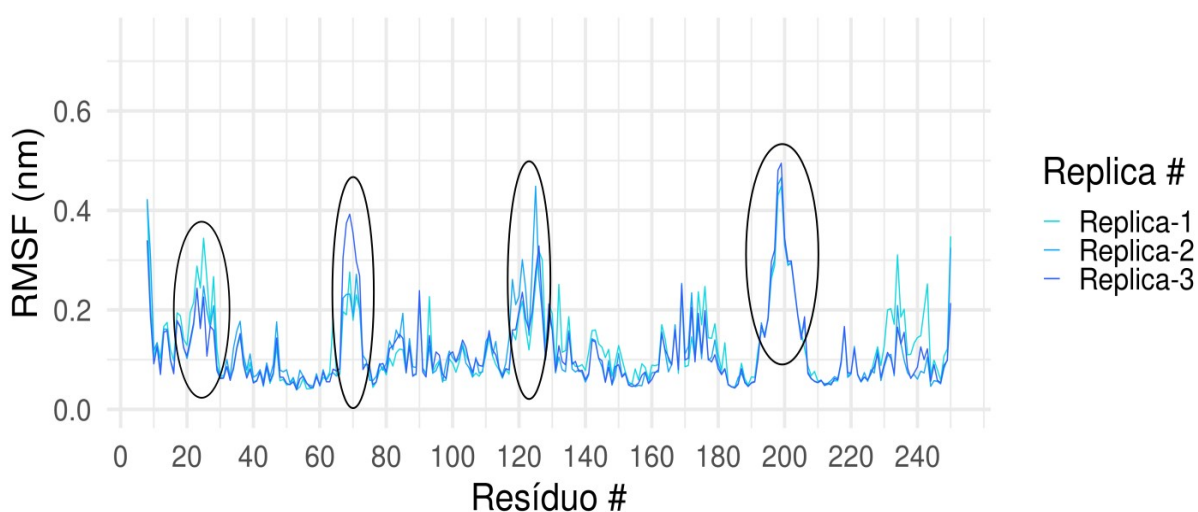
A flexibilidade de cada resíduo das proteínas foi medida através da raiz da flutuação quadrática média (RMSF) no qual observou-se que para a FP-2 houveram apenas dois pontos de flutuações entre os resíduos (110-115; 188-195) (Gráfico 15). Já para FP-3 foram identificados apenas quatro pontos de maiores flutuações entre os resíduos (22-28; 68-72; 123-127; 198-202). Sendo a maior instabilidade identificada aproximadamente entre os resíduos 198-202 (Gráfico 16).

Gráfico 15 - RMSF das réplicas da proteína falcipaina-2 complexada com CH₃ISACN.



Fonte: autoria própria

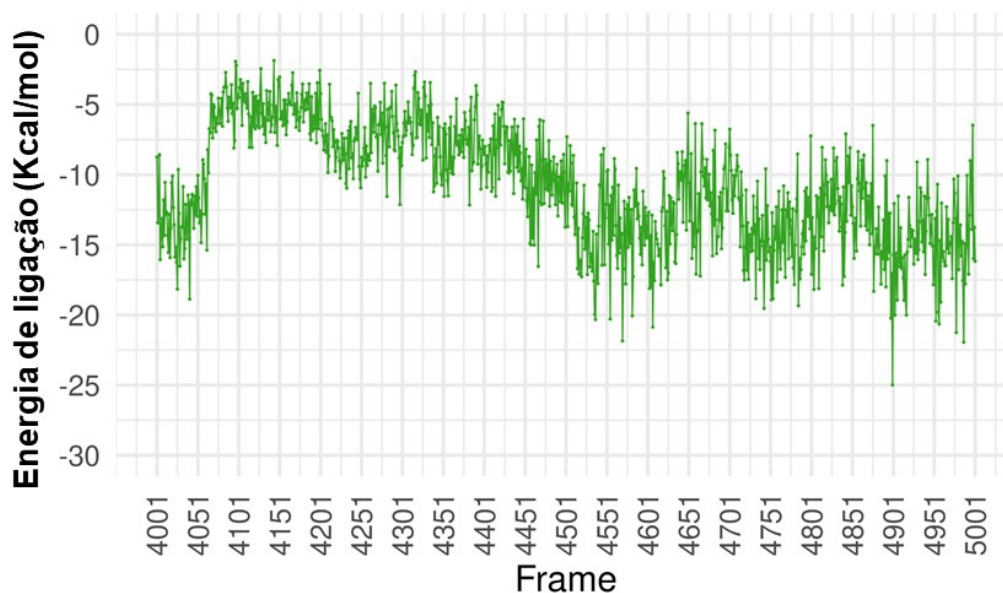
Gráfico 16 - RMSF das réplicas da proteína falcipaina-3 complexada com CH₃ISACN.



Fonte: autoria própria

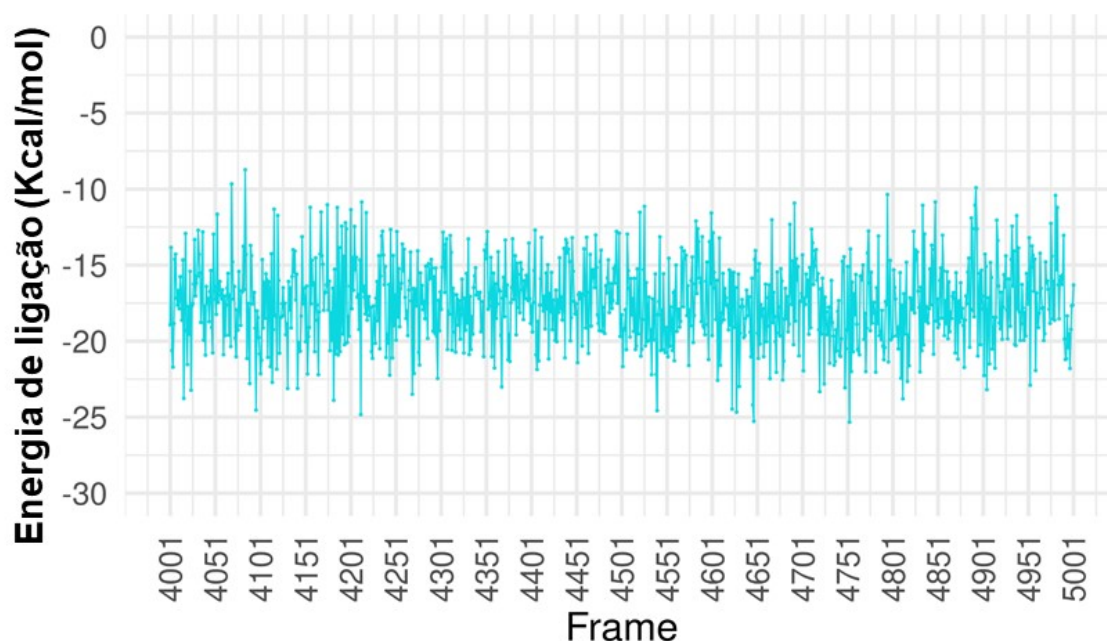
Após a realização da DM, foi avaliado o melhor complexo obtido das três réplicas usando QM/MM. Para a FP-2, de todas as réplicas, o frame 4900 obtido da réplica 2, foi o que teve menor energia -24.98 Kcal/mol (Gráfico 17). Para FP-3, o melhor frame foi o 4753 obtida na réplica 1, pois obteve a menor energia -25.33 kcal/mol. Sendo este o melhor complexo de interação entre a FP-3 e CH₃ISACN (Gráfico 18). De ambos os complexos, as energias ao longo da trajetória apresentaram resultados negativos indicando que é uma interação espontânea e favorável. Os melhores complexos foram então enviados para realização do MFCC.

Gráfico 17 - Análise da Interação falcipaína-2 com a CH₃ISACN através do QM/MM.



Fonte: Autoria própria

Gráfico 18 - Análise da interação falcipaína-3 com a CH₃ISACN através do QM/MM.



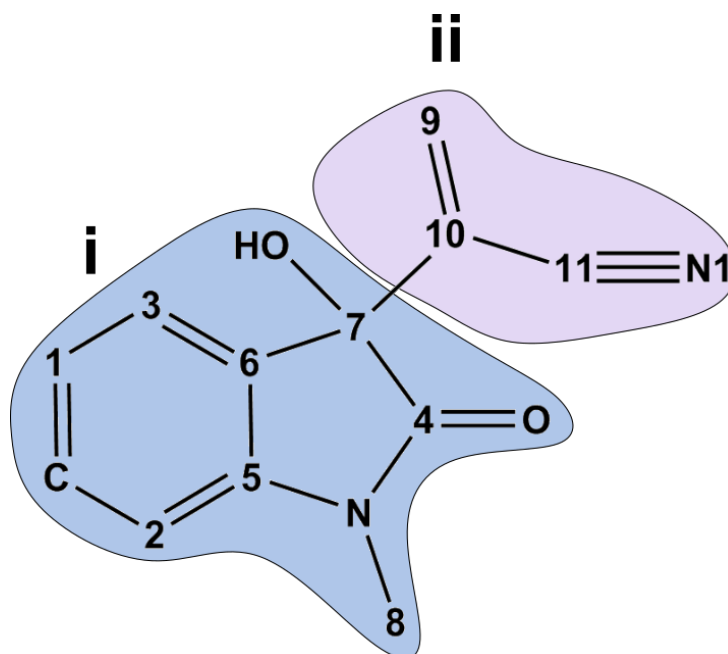
Fonte: autoria própria

5.3.3 Avaliação da interação entre CH₃ISACN usando o MFCC - Método de Fragmentação Molecular com Capas Conjugadas

Para melhor descrever as interações que ocorrem entre o ligante e as proteínas FP2 e FP3 dividimos o ligante em duas regiões (i e ii) (Figura 23).

Para cada complexo foram analisadas as energias de interação assim como os critérios de convergência, no qual definimos seus raios no bolso de ligação r (Å) e por sua energia de ligação (kcal/mol). Para a avaliação das interações entre os complexos observamos os resíduos de aminoácidos atrativos e repulsivos importantes. Levando em consideração que a interação atrativa é uma energia negativa e a repulsiva é uma energia positiva.

Figura 23 - Representação esquemática da estrutura química do ligante, subdividido em duas regiões (i, ii).



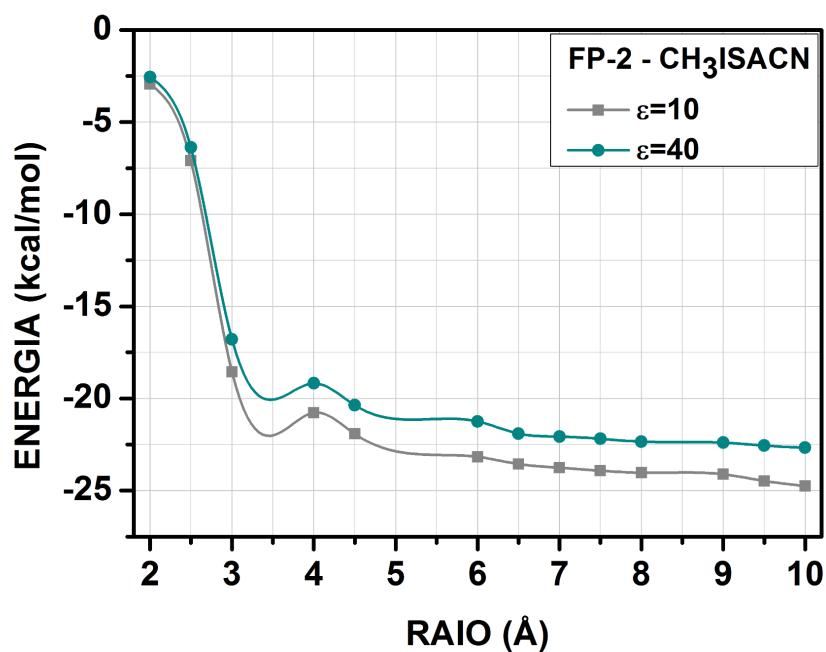
Fonte: Autoria própria

A figura 24 representa a energia total calculada das interações entre os complexos do ligante CH₃ISACN com as proteínas FP2 (Figura 24a) e FP3 (Figura 24b). Foi realizada a soma das energias individuais de cada aminoácido avaliando sua convergência. Ao realizar sua análise, verificamos que a convergência de ambos os complexos na constante 40 teve início a partir do raio 4.5 Å, tendo em vista que não foi observado uma variação maior que 10% nos raios posteriores.

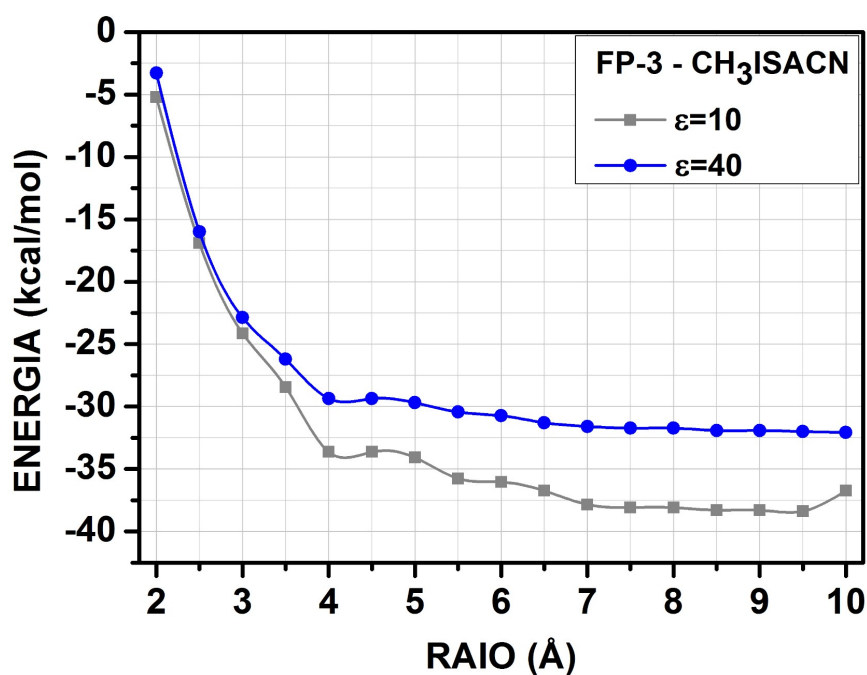
Ao avaliar o complexo FP2-CH₃ISACN, no raio de 10 Å houve um total de 51 interações, tendo uma energia total de -24.75 Kcal/mol, já a constante de 40 houve um total de -22.67 Kcal/mol. Para o complexo FP3-CH₃ISACN, as análises em um raio de até 10 Å compreenderam um total de 57 interações. Foi verificado que a energia total de interação demonstrou valores $\epsilon = 10 > \epsilon = 40$, no qual a energia para a constante 10 apresentou um total de -36.74 kcal/mol, já a constante de 40 foi um total de -32.07 kcal/mol. Assim, nota-se que a CH₃ISACN apresenta uma maior energia de interação com a FP3, pois foi mais negativa em ambas as constantes comparando com as da FP2.

Figura 24 - Representação da energia total de interação do complexo falcipaina-2 (a) e falcipaina-3 (b) com o ligante CH_3ISACN com o esquema MFCC usando duas constantes dielétricas ($\epsilon = 10$, $\epsilon = 40$).

a)



b)



Fonte: Autoria própria

5.3.3.1 Energia de interação dos principais aminoácidos envolvidos na formação do complexo

Para avaliar as energias de interação envolvendo a CH₃ISACN como possível inibidor da FP2 e/ou da FP3, foram usados métodos de química quântica baseados na Teoria do Funcional da Densidade (DFT) na abordagem de Fragmentação Molecular com Capas Conjugados (MFCC).

O estudo das forças intermoleculares que estão envolvidas na interação do fármaco com o seu receptor é importante para melhor elucidação do seu possível mecanismo de ação. Portanto, foi investigado de forma específica a interação aminoácido-ligante dentro de um raio de 10 Å.

A figura 25 mostra as energias de interação entre o ligante (CH₃ISACN) e os principais aminoácidos da FP2 (Figura 25a) e FP3 (Figura 25b). No lado esquerdo dos gráficos estão os principais resíduos para a ligação entre o complexo. E também apresenta as regiões e átomos mais próximos de cada resíduo. No lado direito estão as energias de interação (Kcal/mol) do resíduo com o ligante, representado pelas barras horizontais, que apontam os valores quantitativos para a constante $\epsilon = 40$. Ainda no lado direito, está a representação dos raios correspondentes a cada resíduo.

Para interações do complexo CH₃ISACN-FP2 (Figura 25a), os resíduos mais importantes na ordem decrescente (em Kcal/mol) foram: His174 (-5.49) > Asn38 (-2.99) > Trp206 (-2.53) > Gly40 (-2.28) > Asn173 (-1.94) > Ser41 (-1.23) > Val152 (-1.38) > Cys39 (-1.17).

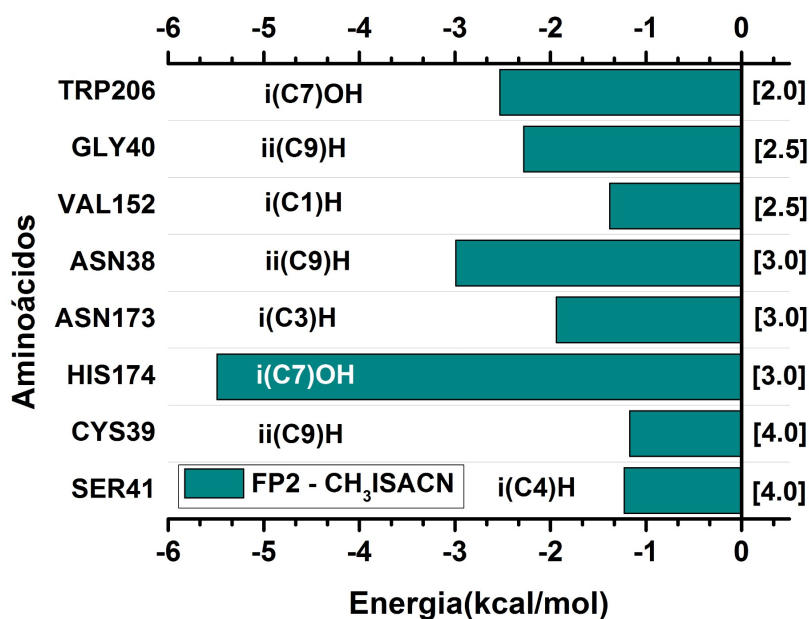
O complexo CH₃ISACN-FP3 (Figura 25b), as principais energias de interação, em ordem decrescente (em Kcal/mol) foram: His183 (-5.49) > Cys51 (-4.14) > Trp215 (-3.28) > Asn182 (-2.77) > Gly49 (-1.97) > Gln45 (-1.71) > Cys48 (-1.63) > Ala161 (-1.47) > Ser50 (-1.19).

Tendo em vista os resultados obtidos da CH₃ISACN no teste de supressão *in vivo*, foi analisado se assim como para as falcipaínas, a CH₃ISACN também seria capaz de interagir com as berghepaínas, já que estas são as proteíνας cisteases do

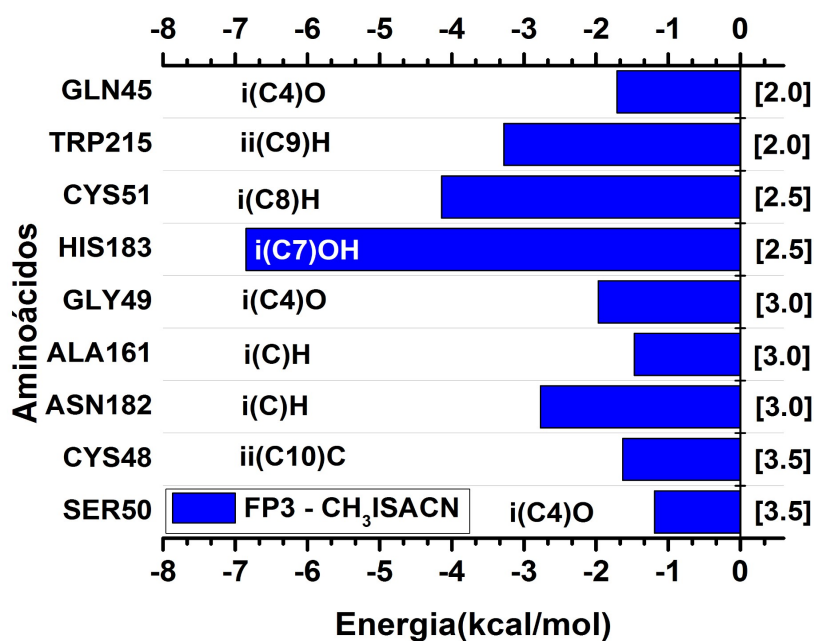
Plasmodium berghei. Portanto, foram repetidas todas as análises *in silico*, tendo agora como proteínas a berghepaína-1 e berghepaína-2.

Figura 25 - Representação das principais interações entre os dois complexos:
(a) CH₃ISACN-FP2 (verde); (b) CH₃ISACN-FP3 (azul).

a)



b)



Fonte: Autoria própria

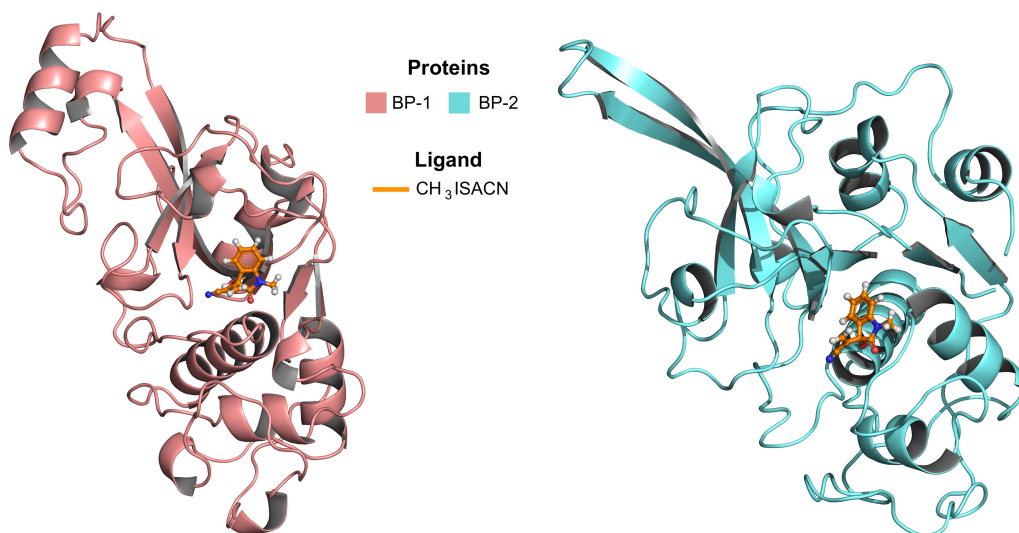
5.4 DETERMINAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DA CH₃ISACN COMO INIBIDOR DAS BERGHEPAÍNAS - *IN SILICO*

5.4.1 Docking molecular das proteínas BP1/BP2 com a CH₃ISACN

Após obtenção da estrutura das berghepaínas, foi realizado o docking exaustivo, no qual avaliou-se os scores das 1000 melhores conformações do ligante geradas para cada proteína. Foi escolhido os complexos de energia -6.17 kcal/mol e -5.896 kcal/mol para BP-1 e BP-2, obtidas nas rodadas 423 e 322 respectivamente, para dar continuidades com as próximas etapas do estudo. No Gráfico 19 observamos, que a BP-1 apresentou melhor energia de interação, como também está descrito na tabela 11.

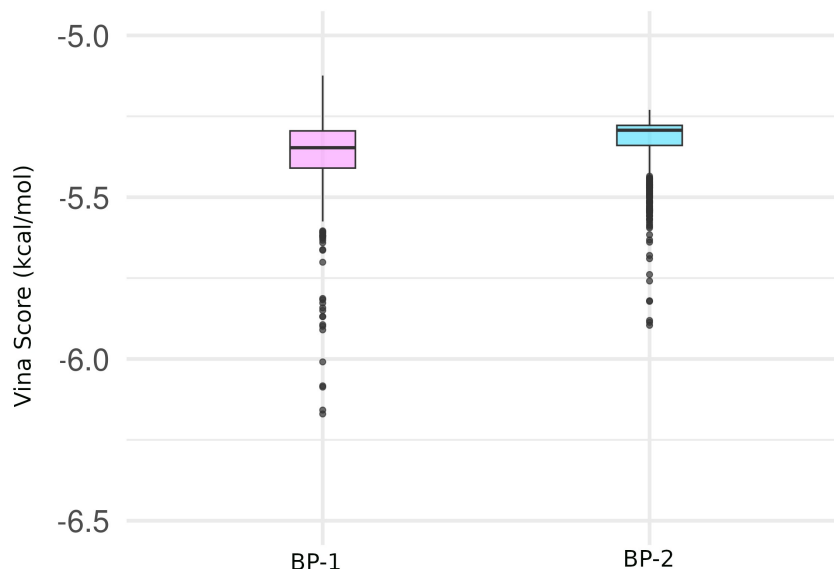
Apesar da semelhança estrutural entre as berghepaínas, o sítio de ligação da CH₃ISACN na BP-1 e BP-2 é notavelmente diferente, porém em ambas houve uma forte interação (Figura 26).

Figura 26 - Sítio de ancoragem do ligante CH₃ISACN na BP-1 e BP-2



Fonte: Autoria própria

Gráfico 19 - Energias de interação do ligante CH₃ISACN com as proteases berghepaína-1 e berghepaína-2.



Fonte: Autoria própria

Tabela 11 - Energias de interação do ligante CH₃ISACN com as proteases berghepaína-1 e berghepaína-2.

Proteína	Min	1º Quartil	Média	3º Quartil	DP
BP-1	-6.17	-5.41	-5.36	-5.29	0.108
BP-2	-5.90	-5.34	-5.32	-5.28	0.085

Legenda: DP= desvio padrão

5.4.2 Análise de dinâmica molecular da CH₃ISACN com as proteases berghepaína-1 e berghepaína-2

Para avaliação da estabilidade das proteínas BP-1 e BP-2 em solução, foi calculado a raiz do desvio quadrático médio (RMSD). Cujo objetivo é comparar a diferença estrutural média entre duas conformações diferentes com base nas distâncias dos seus carbonos alphas (C-alpha). Como estrutura de referência, foi utilizado o primeiro *frame* da dinâmica molecular. Observou-se que a réplica 1 da BP-1 se manteve estável durante todo o tempo de análise, variando entre 0,1 nm-0,24 nm. A réplica 2 apresentou estabilidade semelhante à réplica 1 até aos 175 ns, após esse tempo variou de 0,25 nm -0,60 nm. Quanto a réplica 3 houve variação

principalmente após os 325 ns entre 0,40-0,80 nm (Gráfico 20). Já a BP-2 as três réplicas variaram na faixa entre 0.1 nm e 0.35 nm, o que sugere que a proteína se manteve estável por todo tempo analisado (Gráfico 21). Ao comparar as duas proteínas, nota-se uma maior estabilidade para a BP-2.

Gráfico 20 - RMSD das réplicas da proteína berghepaína-1 e CH₃ISACN.

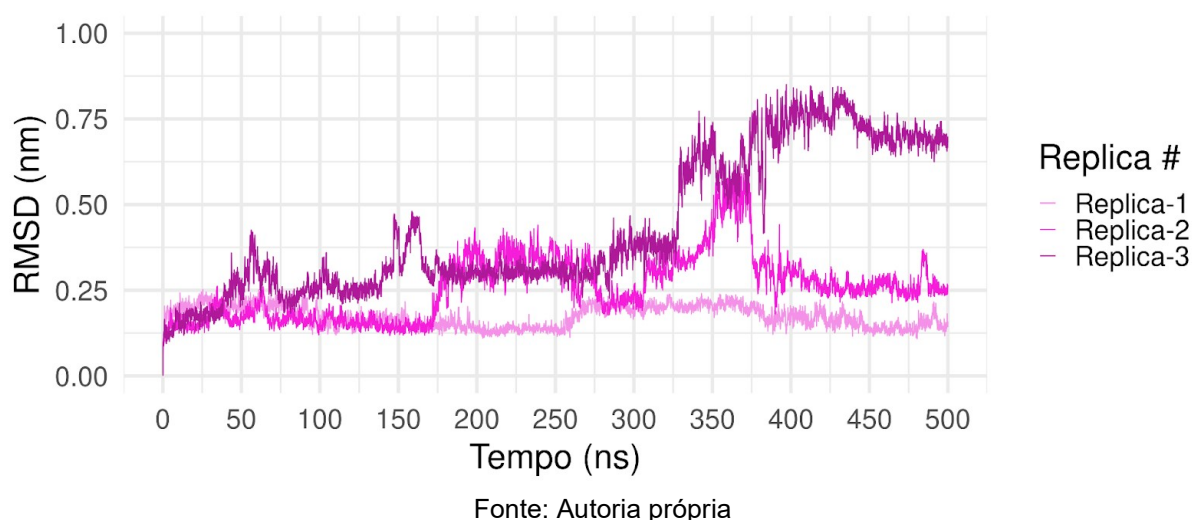
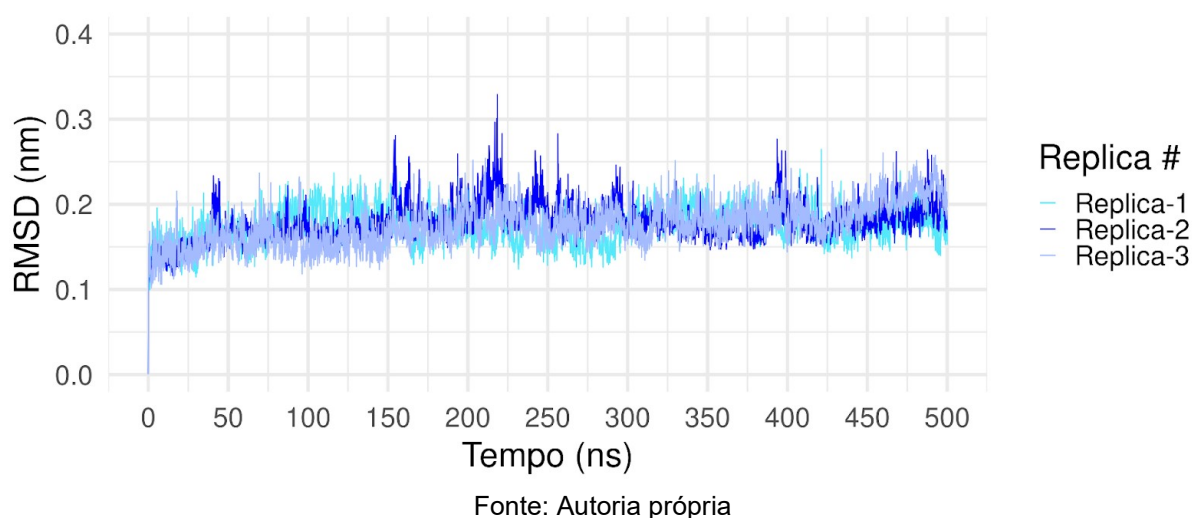


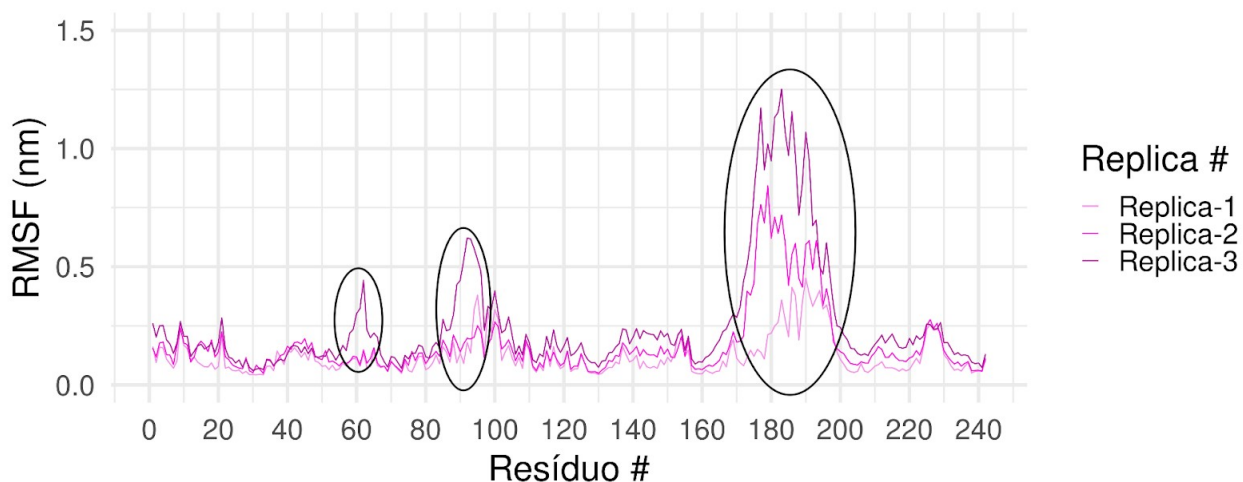
Gráfico 21 - RMSD das réplicas da proteína berghepaína-2 e CH₃ISACN.



Quanto a avaliação da flexibilidade de cada resíduo das proteínas, utilizamos a raiz da flutuação quadrática média (RMSF) no qual observou-se que para a BP-1

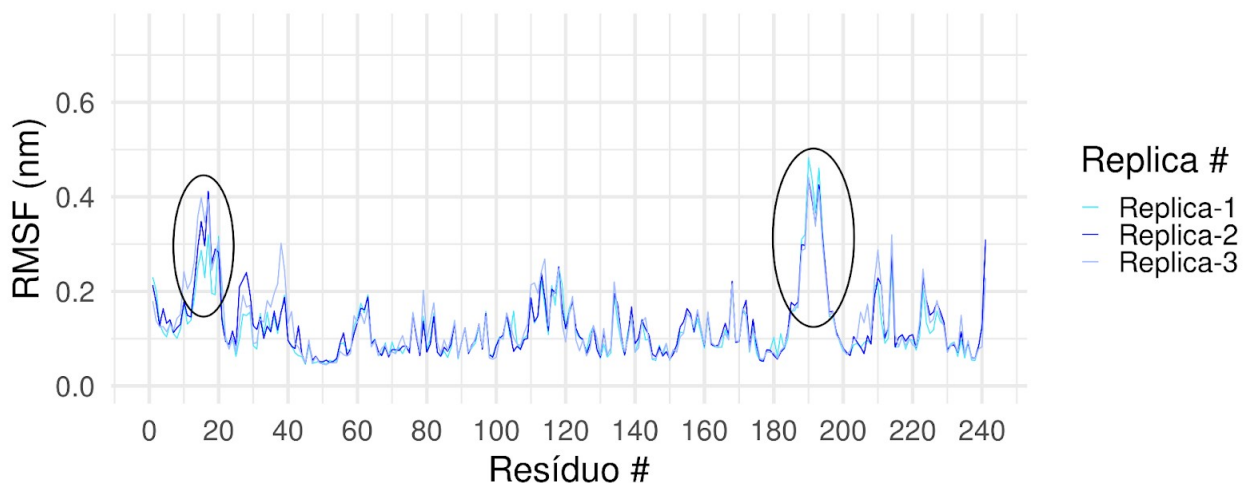
houve uma flutuação entre os resíduos 170-188, e além deste, a réplica 3 também flutuou entre os resíduos 58-62 e 90-98 (Gráfico 22). Para BP-2 foram identificados apenas dois pontos de maiores flutuações entre os resíduos 15-20 e 190-198, sendo a maior instabilidade identificada aproximadamente nestes últimos (Gráfico 23).

Gráfico 22 - RMSF das réplicas da proteína berghepaína-1 complexada com CH₃ISACN.



Fonte: Autoria própria

Gráfico 23 - RMSF das réplicas da proteína berghepaína-2 complexada com CH₃ISACN.

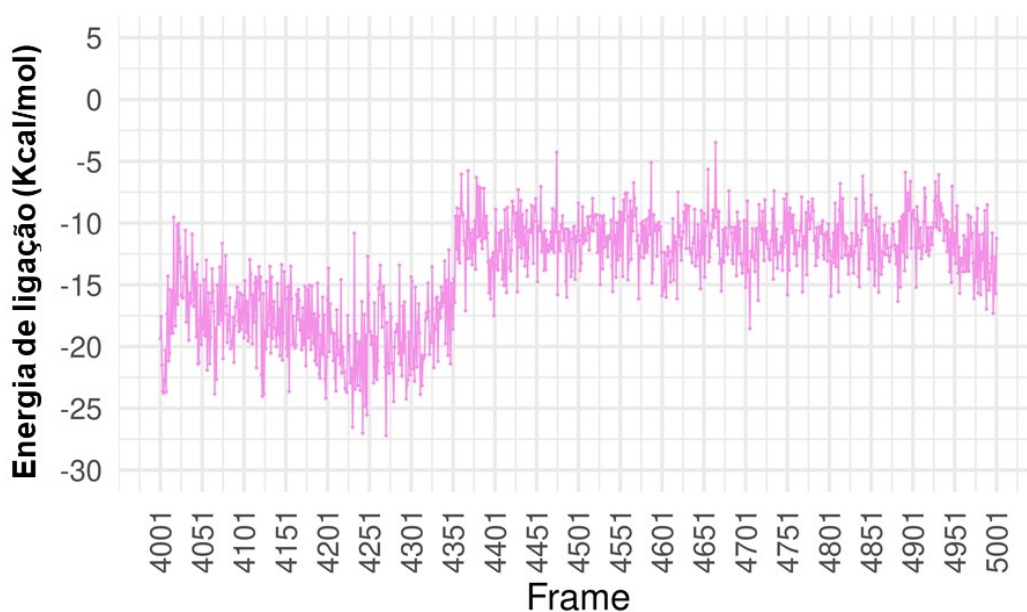


Fonte: Autoria própria

Após análise da dinâmica molecular, foi realizado o QM/MM, para se ter o melhor complexo das réplicas utilizadas. Para a berghepaína-1, foi selecionado o

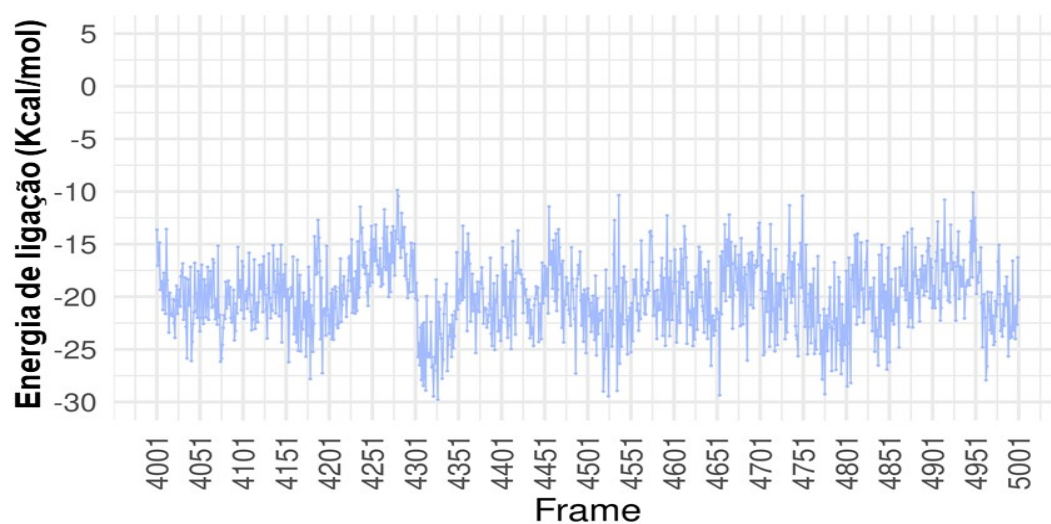
frame 4271 da réplica 1 com a energia de -27.21 kcal/mol. Já para a berghepaína-2, o frame 4327 da réplica 3 com a menor energia de -29.77 kcal/mol. Estas informações estão descritas no gráfico 24 e 25 referentes à BP-1 e BP-2 respectivamente. Após análise, os melhores complexos foram enviados para realização do MFCC.

Gráfico 24 - Análise da Interação berghepaína-1 com a CH₃ISACN através do QM/MM.



Fonte: Autoria própria

Gráfico 25 - Análise da interação berghepaína-2 com a CH₃ISACN através do QM/MM.



Fonte: Autoria própria.

5.4.3 Avaliação da interação entre CH₃ISACN usando o MFCC - Método de Fragmentação Molecular com Capas Conjugadas

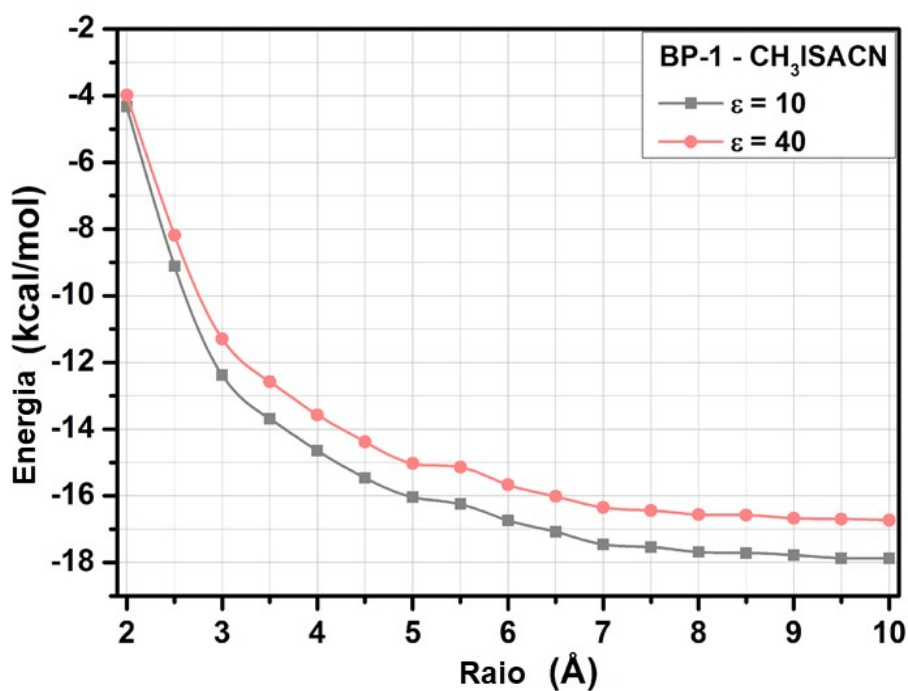
Foram observadas as energias de interação dos complexos formados entre o ligante (CH₃ISACN) e cada proteína BP-1 e BP-2. Também foram analisados as energias de interação e os critérios de convergência, sendo determinado seus raios no bolso de ligação r (Å) e a energia de ligação (kcal/mol). Ainda, ao avaliar as interações entre os complexos, foram analisados os resíduos atrativos (energia negativa) e repulsivos (energia positiva) (Figura 27).

Foi avaliado a convergência e realizado a soma individual de cada resíduo. No qual, verificamos que a convergência do complexo BP1-CH₃ISACN na constante de 40 teve início a partir do raio 5 Å, já o complexo BP2-CH₃ISACN a convergência teve início a partir do raio 6 Å tendo em vista que não foi observado uma variação maior que 10% nos raios posteriores.

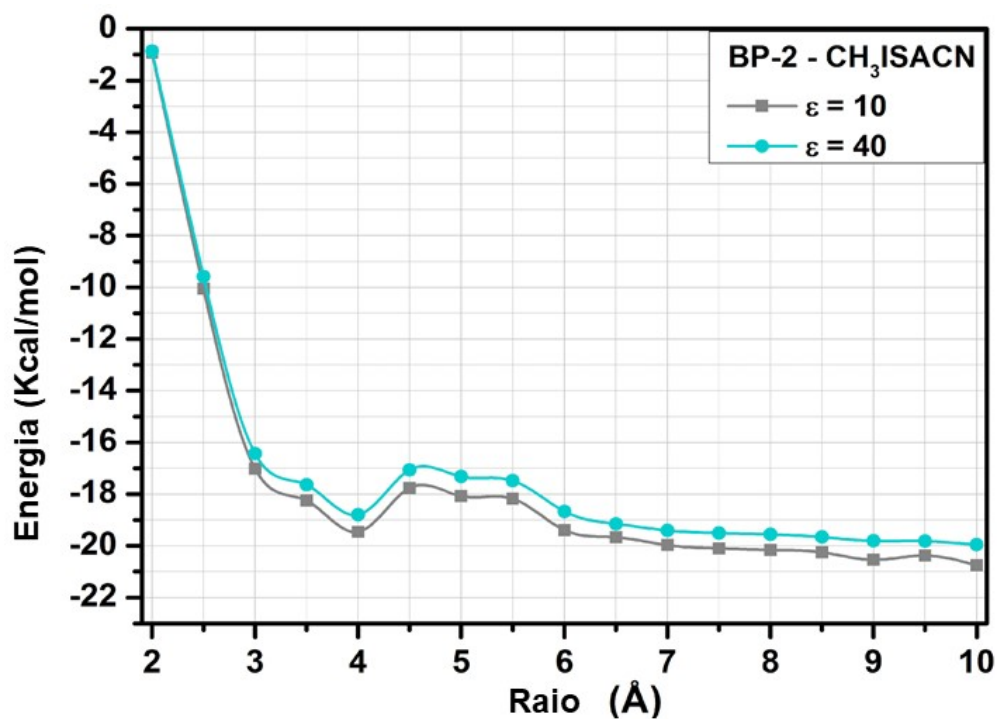
Analisando o complexo BP1-CH₃ISACN, no raio de 10 Å foi observado que houve um total de 52 interações, tendo uma energia total de -17.87 Kcal/mol, para a constante de 40 houve um total de -16.73 Kcal/mol. Para o complexo BP2-CH₃ISACN, as análises em um raio de até 10 Å compreenderam um total de 55 interações. No qual, a constante de 10 apresentou um total de -20,75 Kcal/mol, já a constante de 40 apresentou um total de -19,96 Kcal/mol. Portanto, nota-se que a CH₃ISACN apresenta maior energia de interação com a BP-2, já que esta apresentou uma energia de interação mais negativa em ambas as constantes comparando com a BP-1.

Figura 27 - Energia total de interação do complexo berghepaína-1 (a) e berghepaína-2 (b) com o ligante CH_3ISACN com o esquema MFCC usando duas constantes dielétricas ($\epsilon = 10$, $\epsilon = 40$).

a)



b)



Fonte: Autoria própria.

5.4.3.1 Avaliação da energia de interação dos principais aminoácidos envolvidos na formação do complexo

Foram usados métodos de química quântica baseados na DFT na abordagem de MFCC, para avaliar as energias de interação envolvendo a CH₃ISACN como possível inibidor da BP1 e/ou da BP2.

Para melhor elucidar o possível mecanismo de ação da molécula, é importante o estudo das forças intermoleculares envolvidas na interação do candidato à fármaco com o seu possível receptor. Desta maneira, analisamos a interação aminoácido-ligante dentro de um raio de 10 Å.

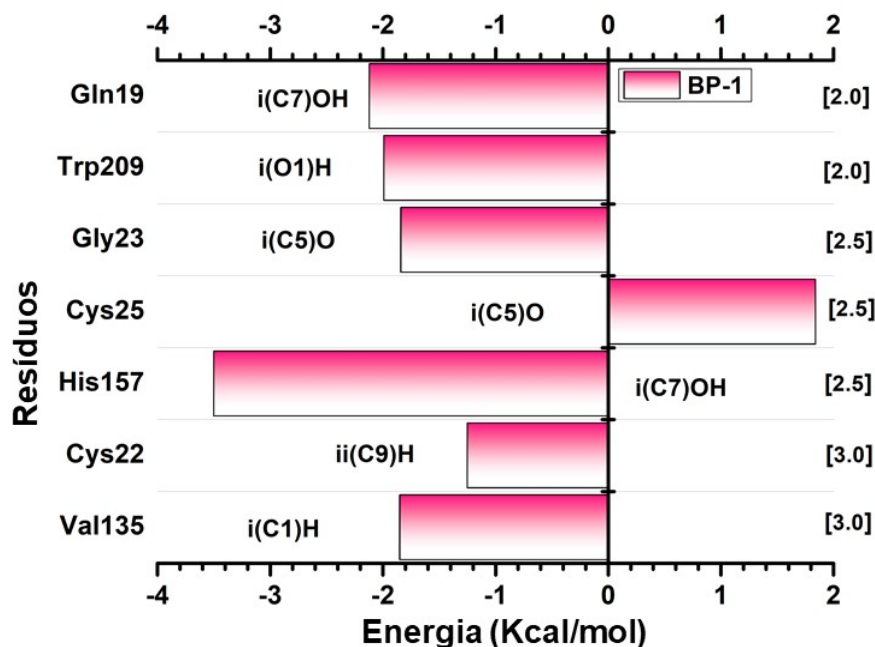
As principais energias de interação entre o ligante (CH₃ISACN) e os principais aminoácidos da BP-1 (Figura 28a) e BP-2 (Figura 28b) foram analisadas. À esquerda dos gráficos observa-se os principais resíduos para a ligação entre o complexo. Apresenta também as regiões e átomos mais próximos de cada resíduo. À direita, estão as energias de interação (Kcal/mol) do resíduo com o ligante, representado pelas barras horizontais, que apontam os valores quantitativos para a constante $\epsilon = 40$. Ainda no lado direito, está a representação dos raios correspondentes a cada resíduo.

Para o complexo CH₃ISACN-BP1 (Figura 28a), foram selecionados 7 resíduos principais, em ordem decrescente (em Kcal/mol) sendo eles: His157 (-3,50) > Gln19 (-2,12) > Trp209 (-1,99) > Val135 (-1,85) > Gly23 (-1,84) > Cys22 (-1,25) > Cys25 (1,84).

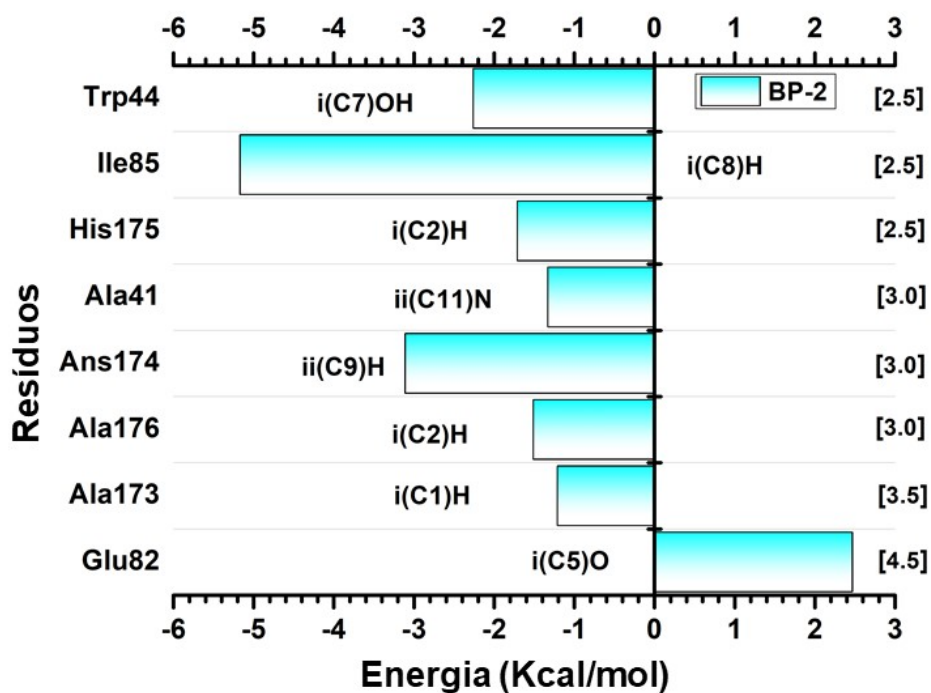
Para o complexo CH₃ISACN-BP2 (Figura 28b), foram selecionados 8 resíduos principais, em ordem decrescente (em Kcal/mol) sendo eles: Ile85 (-5,17) > Asn174 (-3,11) > Trp44 (-2,26) > His175 (-1,71) > Ala176 (-1,51) > Ala41 (-1,33) > Ala173 (-1,21) > Glu82 (2,47).

Figura 28 - Representação das principais interações entre os dois complexos:
(a) CH₃ISACN-BP1 (rosa); (b) CH₃ISACN-BP2 (azul).

a)



b)



Fonte: Autoria própria

6. DISCUSSÃO

As substâncias derivadas da isatina tem sido estudada com o objetivo de melhorar o arsenal terapêutico. E para garantir a melhor segurança de seu uso, foi realizado teste de toxicidade destes derivados (Fonseca, 2019). Uma destas substâncias é a CH₃ISACN, que já vem sendo estudada por este grupo de pesquisa, e vem apresentando resultados promissores, como o ensaio de toxicidade aguda que apresentou uma baixa toxicidade (Melo, 2020). Baseado neste resultado, foi realizado o teste de toxicidade de doses repetidas, no qual é possível avaliar a segurança da substância quando administrada diariamente por 28 dias (OECD 407, 2008).

Assim como em outros estudos, a dose utilizada no ensaio de doses repetidas é determinada de acordo com o ensaio toxicológico agudo *in vivo*, sendo muitas vezes a mesma dose (Kumar, *et al.*, 2022; Srisrimal, *et al.*, 2022; Yadav *et al.*, 2019). A via oral foi escolhida como via de administração por ser a mais comumente utilizada nos estudos de toxicidade, ter maior praticidade e não causar dor aos animais (Al-Afifi, *et al.*, 2018).

Durante vinte e oito dias o comportamento dos animais foi analisado, a fim de avaliar se estes apresentavam algum sinal clínico relevante, visto que alterações comportamentais são uma das principais indicações de intoxicação ao se fazer uso de uma substância (Sireeratawong *et al.*, 2013). Os ensaios realizados com a CH₃ISACN se mostraram muito promissores. Durante toda avaliação nenhuma mudança comportamental foi identificada nos animais em teste.

Entretanto, ocorreram duas mortes de camundongos machos que receberam a dose de 300 mg/Kg e 150 mg/Kg na primeira semana do ensaio. Possivelmente estas mortes isoladas se deram por algum fator externo, uma variação individual, ou mesmo, alguma intercorrência durante a administração das doses, já que nenhum outro animal veio a morrer nos demais dias, e nenhum sinal clínico foi apresentado por estes. Após a administração de uma substância, o tempo que esta leva para causar a intoxicação, é um dado relevante para avaliação do risco que ela pode apresentar. Além do que, a forma de administrar a substância e o estado do animal também influenciam na sua morte (Addy-Orduna; Brodeur; Mateo, 2019).

Além do comportamento, outros parâmetros também foram avaliados durante o tempo de experimentação, como: o consumo de água, ração e alteração do peso corporal. Estes são quesitos básicos e importantes a serem analisados por fazerem parte da manutenção corporal e fisiológica do animal, e é por isso que sempre estão presentes nas análises toxicológicas de doses repetidas (Yadav *et al.*, 2019; Fonseca, 2019).

No presente trabalho, o consumo de água das fêmeas não apresentou nenhum tipo de alteração significativa em relação ao grupo controle. Quanto a ração, as fêmeas que receberam as duas maiores doses da substância tiveram uma diminuição do seu consumo. Apesar destas alterações no consumo da ração, o peso corporal das fêmeas não apresentou diferença significativa em comparação com o controle, estando dentro da normalidade. Como discutido por Qu (2022), a diminuição do consumo da ração não pode ser avaliada isoladamente, não tendo significado de intoxicação relevante.

Os machos que receberam as doses de 300 mg/Kg e 150 mg/Kg, diminuíram tanto o consumo de água como o de ração. Esses resultados são corroborados pelo estudo de Dias (2020), que avaliou um outro derivado de isatina (ISACN) nas mesmas doses, e também obteve redução no consumo de água e ração. Entretanto, o peso corporal dos machos não apresentou alterações significativas quando comparado com o grupo controle. Com exceção para o grupo que recebeu a dose de 150 mg/Kg, que teve uma diminuição em relação ao grupo controle. Mas esta alteração não chegou a 20%, estando, portanto, dentro da variação aceitável pelas diretrizes, não indicando toxicidade (OECD 420, 2002).

Quanto a análise bioquímica dos animais, dos 15 parâmetros avaliados, apenas dois tiveram alterações: glicose e proteínas totais. A glicose é o monossacarídeo predominante na circulação sanguínea, sendo de suma importância para o fornecimento de energia para o corpo (Inada 2021). A concentração da glicose sérica pode sofrer desregulação por diferentes fatores, dentre eles: alterações no ciclo circadiano, inflamação, estresse oxidativo e outros (Poggiogalle; Jamshed; Peterson, 2018). Sua alta concentração pode levar a um estado de hiperglicemia e ocasionar doenças como diabetes *mellitus* (Galicia-Garcia, *et al.*, 2020). No presente estudo, as fêmeas que receberam a dose de 300 mg/Kg tiveram

uma redução da glicose sérica comparada com o grupo controle. Essa mesma redução foi encontrada em outros derivados de Isatina (Dias, 2020; Fonseca, 2019).

A concentração de proteínas totais séricas reflete as condições hepáticas e renais (Kapoor *et al.*, 2021). Os animais que receberam a dose de 75 mg/Kg de CH₃ISACN apresentaram um aumento das proteínas totais. Porém este dado não tem nenhum significado clínico tendo em vista que não foram observadas anormalidades em outros parâmetros relacionados ao fígado e rins. Além do que, este aumento, não pode ser correlacionado com algum efeito causado pela substância, já que nas maiores doses não apresentaram alterações significativas.

O fígado é um órgão que dentre outras funções é responsável pelo processo de metabolização das substâncias do organismo. Através da análise de parâmetros bioquímicos, como AST, ALT e FAL, é possível avaliar a função hepática, e por isso estudos de toxicidade comumente avaliam estes parâmetros (Bencheikh *et al.*, 2019; Kharchoufa *et al.*, 2020; Kumari, Singh, 2021). Não foi identificada nenhuma alteração significativa em tais parâmetros, o que demonstra que a CH₃ISACN não interfere na função hepática. Além disso, a análise histopatológica não identificou nenhuma anormalidade no tecido hepático dos animais tratados pela CH₃ISACN (Figuras 16 e 17)

Por meio de exames bioquímicos também é possível avaliar a função renal, através de parâmetros como ureia e creatina (Bencheikh *et al.*, 2019). Ao contrário do estudo agudo da CH₃ISACN em que a ureia nos animais que receberam a dose de 2000 mg/Kg esteve alterada (Melo, 2020), no teste de toxicidade de doses repetidas não houve nenhum tipo de alteração bioquímica que pudesse relacionar com tal disfunção renal. A análise histopatológica renal dos animais tratados por CH₃ISACN, não identificou nenhuma anormalidade, demonstrando assim maior segurança do seu uso (Figura 18 e 19).

A avaliação hematológica em animais de experimentação é importante, pois alterações nestes parâmetros podem apontar sinais de intoxicação, tendo este um bom valor preditivo para intoxicações humanas (Sarma *et al.*, 2022; Togbossi *et al.*, 2022). No presente estudo, o CHCM dos camundongos machos foi o único parâmetro da série vermelha que apresentou alteração significativa, estando maior que o do grupo controle. O CHCM é um índice hematimétrico relevante para avaliação da concentração de hemoglobina presente no eritrócito, sendo importante

na classificação das anemias juntamente com outros índices, como VCM e HCM (Moreira *et al.*, 2020). Estes últimos não apresentaram diferença significativa com o controle, assim como também os demais índices da série vermelha. Assim, as alterações encontradas apenas nestes resultados da série vermelha dos camundongos foram consideradas como sem relevância clínica, como também é demonstrado no estudo de Vasconcelos (2020). Além do que, esses valores permaneceram dentro do intervalo normal apresentado po camundongos *Swiss* (Santos, *et al.*, 2016).

Assim como ocorreu com os machos, as fêmeas que receberam a dose de 300 mg/Kg tiveram um aumento do CHCM, mas além disto tiveram uma diminuição do hematócrito quando comparado ao grupo controle. O hematócrito indica a porcentagem de hemácias no volume total de sangue, sendo um índice também muito importante para definir o quadro de anemia (De Santis, 2019). Entretanto tais alterações não apresentam significado clínico, dado que outros parâmetros relevantes para classificação de anemia, como a concentração de hemoglobina, se encontravam dentro da normalidade.

O RDW é um índice hematimétrico que permite avaliar a variação do tamanho dos eritrócitos, quanto maior for seu valor, maior é heterogeneidade das hemácias, podendo caracterizar a presença de anisocitose (Rincon; Moreira; Castro, 2019). As fêmeas que receberam a dose de 150 mg/Kg tiveram um aumento significativo do seu RDW em comparação com o grupo controle, porém nenhum outro parâmetro deste grupo apresentou alteração significativa. Apesar das diferenças em relação ao grupo controle, comparando os resultados das fêmeas com o estudo de Silva-Santana (2019), em que os animais não receberam tratamento, notamos que estes se enquadram dentro da normalidade.

Além da série vermelha, também foi avaliada a série branca e plaquetária dos animais. No estudo agudo, as ratas *Wistar* que receberam a dose de 300 mg/Kg tiveram um aumento no número de leucócitos totais (Melo, 2020). Entretanto, no ensaio de doses repetidas não houve alteração significativa comparando ao grupo controle em nenhuma das doses testadas, sendo este mais um indício da baixa toxicidade da CH₃ISACN. Pois, estudos mostram que a presença de substâncias tóxicas pode levar a processos inflamatórios que são sinalizados pelo aumento sérico de leucócitos totais (Yao *et al.*, 2019; De Sousa *et al.*, 2020).

A avaliação plaquetária é importante, pois pode sinalizar a presença de doenças como a trombocitopenia (Kharchoufa *et al.*, 2020). No presente estudo nenhuma alteração plaquetária foi identificada em ambos os sexos.

A análise do peso dos órgãos dos animais é frequentemente utilizada em estudos toxicológicos, pois sua alteração pode indicar toxicidade causada pela substância estudada (Diez-Quijada *et al.*, 2021; Sarma *et al.*, 2022). Não foi observada nenhuma alteração macroscópica e nem no peso dos órgãos analisados.

Visto que este trabalho é uma continuidade dos estudos de Melo (2020), que realizou a avaliação toxicológica aguda com a CH₃ISACN, neste estudo foi incluído a análise histopatológica do ensaio agudo. Em todos os órgãos analisados, não foi identificado nenhum tipo de alteração significativa que mostrasse uma intoxicação pelo uso da CH₃ISACN, sendo assim considerada uma substância segura nas doses estudadas. O presente resultado serviu como embasamento para a continuidade dos estudos, e avanço para a investigação toxicológica de doses repetidas seguindo a OECD 407. O resultado do histopatológico do ensaio de toxicidade de doses repetidas assim como no agudo, nas três doses avaliadas (300 mg/Kg, 150 mg/Kg e 75 mg/Kg), não foi observada nenhuma alteração, estando os órgãos avaliados dentro do padrão de normalidade, ratificando assim a segurança da CH₃ISACN nas doses testadas.

Ainda dentro do presente trabalho, foi realizado ensaio de genotoxicidade. O teste de micronúcleo é comumente utilizado no meio científico para determinação de doses de substâncias que podem ocasionar citogenotoxicidade (Do Carmo *et al.*, 2020; Shokrzadeh *et al.*, 2020). Ensaio *in silico* da CH₃ISACN mostraram que a substância não apresenta potencial genotóxico (Melo, 2020). Porém, para assegurar o resultado *in silico* é necessária a realização de estudos *in vivo* (Medrano-Padial *et al.*, 2021). A realização do teste de micronúcleo, mostrou que os animais que foram tratados pela CH₃ISACN tiveram uma quantidade de micronúcleos significativamente inferior ao do grupo controle positivo. Desta maneira foi possível inferir que a CH₃ISACN nas doses testadas não apresenta potencial mutagênico, reforçando a segurança sobre seu uso.

A investigação da atividade antimalarial através do teste de supressão, permite uma avaliação precoce, já que a malária promove uma infecção aguda, podendo assim delimitar os dias de avaliação. Este padrão de teste é comumente

utilizado por grupos de pesquisa, e permite estudar o quão biologicamente ativa é a molécula contra a malária (Lopes *et al.*, 2021; Peters, 1965; Souza *et al.*, 2023).

O potencial antimalárico da CH₃ISACN vem sendo estudado desde 2018. Melo (2020) mostrou que em estudos *in vitro*, a molécula foi ativa contra a cepa W2 (cepa cloroquina-resistente; mefloquina-sensível) de *Plasmodium falciparum*, apresentando uma CI₅₀ = 8.37 ug/mL. Tal atividade também foi vista no ensaio *in vivo* (teste de supressão) realizado, no qual a CH₃ISACN apresentou-se ativa, reduzindo 49,7% da parasitemia em animais infectados por *Plasmodium berghei*. Assim, este resultado indica que mesmo sendo administrada por via oral, a molécula esteve biodisponível para exercer seu efeito.

A via de administração de um medicamento influencia diretamente na biodisponibilidade do composto, sendo menor a biodisponibilidade da via oral comparativamente à administração intramuscular (Chu; Dorlo, 2023). Porém, a administração de medicamentos antimaláricos por via oral é uma das principais escolhas em estudos experimentais (Kouakou *et al.*, 2019), e faz parte dos esquemas terapêuticos da malária no Brasil (Ministério da Saúde, 2021). Além disso, essa via foi a escolha para o teste de supressão, pois a CH₃ISACN no ensaio *in silico* ter demonstrou uma boa biodisponibilidade teórica oral (Melo, 2020).

A estrutura química da CH₃ISACN influencia na sua boa biodisponibilidade, e consequentemente na sua capacidade em reduzir a parasitemia. Ela se apresenta como uma molécula anfipática, na qual o anel aromático confere caráter lipofílico, enquanto que os grupos amina, hidroxila e carbonila permitem um caráter mais hidrofílico (Figura 1). Deve haver um equilíbrio destas características, lipofilicidade e hidrofiliicidade, na molécula para que esta seja bem absorvida. Pois, aquelas que são muito hidrofílicas tem baixa permeabilidade pela membrana celular, prejudicando a biodisponibilidade do fármaco. Da mesma forma, moléculas muito apolares, tem baixa dissolução no ambiente biológico (Lopes *et al.*, 2021).

Ainda no teste de supressão, foi observado que houve uma atividade parcial da CH₃ISACN quando comparada com a atividade da cloroquina (Gráfico 11). Porém deve-se levar em consideração que a cloroquina é um medicamento com a farmacocinética já bem estabelecida e descrita na literatura há muitos anos (Titus, 1989), enquanto que a CH₃ISACN se trata de um protótipo, sem forma farmacêutica e doses definidas, e mesmo assim teve um resultado promissor.

Estes últimos (forma farmacêutica e dose), são parâmetros importantes e que interferem na biodisponibilidade do composto, e por isso, estudos farmacocinéticos são realizados para maior investigação sobre como o organismo se comporta frente à substância (Kouakou *et al.*, 2019; Chu; Dorlo, 2023). Além disso, é notório que o esquema terapêutico atual para o tratamento da malária conta com a associação de substâncias, como é o exemplo do Artemeter 20 mg + Lumefantrina 120 mg (Ministério da Saúde, 2021). É relevante que futuramente seja realizada uma investigação da atividade da CH₃ISACN associada a outro fármaco, possibilitando assim uma maior eficácia terapêutica.

A análise histopatológica do baço dos animais que participaram do teste de supressão, nos revelou que o grupo 1 (tratado com CH₃ISACN) apesar de ter apresentado pontos de necrose, estes foram focais, e quando comparado com o grupo 2 que não recebeu tratamento, identificamos uma maior desorganização na polpa branca e vermelha, além de muita congestão. O baço é um órgão de grande importância para o ser humano, atuando no sistema imune, destruindo seletivamente glóbulos vermelhos senescentes e no caso da malária, hemácias parasitadas por *Plasmodium* (Dell Portillo *et al.*, 2012). Os resultados do grupo 1 mostram uma preservação tecidual próxima ao do grupo controle, porém com maiores alterações que a do grupo 2 (tratado com cloroquina 15 mg/Kg).

Assim como o baço, o fígado também foi avaliado, este que é um órgão importante para o ciclo de vida do *Plasmodium*, onde os parasitos migram inicialmente, se alojam e ocorre intensa replicação, trazendo como consequência danos ao órgão (Meibalan; Marti, 2017). O grupo tratado com a CH₃ISACN apresentou menos alterações patológicas do que o grupo 2, e ao contrário deste, não apresentou focos de necrose, como foi identificado no grupo 2 e 3. Também, é importante salientar que nos estudos toxicológicos de doses repetidas, o resultado histopatológico dos animais saudáveis que receberam a CH₃ISACN em diferentes doses, mostrou que não houve nenhuma alteração hepática significativa. Porém é importante que estudos sejam conduzidos de modo a proporcionar um melhoramento da molécula.

A fim de compreender a relação estrutura-atividade da CH₃ISACN como possível inibidor da FP-2, FP-3, BP-1 e/ou BP-2, foi realizado um conjunto de estudos *in silico* para melhor elucidar tal ação. Ensaio como *docking* e dinâmica

molecular foram aplicados para simular os prováveis modos de ligação do inibidor no bolso de ligação das proteases. As falcipainas 2 e 3 são as mais estudadas, devido a sua participação na hidrólise de hemoglobinas (Pasupureddy *et al.*, 2019). Apesar de ambas falcipainas terem grande importância no ciclo de vida do parasito, a FP-3, tem se mostrado essencial (Rosenthal, 2020), sendo apontada assim como a principal cisteína hemoglobinaase do *P.falciparum*, importante para o seu desenvolvimento, e, portanto, é considerada um ótimo alvo quimioterapêutico (Wang *et al.*, 2013).

O *docking* da FP-2 e FP-3 com a CH₃ISACN mostrou que a região de interação era muito próxima a do inibidor Leupeptina (PDB ID 3BPM), apresentando muitos resíduos semelhantes. Ao comparar com os resíduos de um outro inibidor, o K11017 (PDB ID 3BWK), percebemos que também apresentou interação com resíduos em comum (Rana *et al.*, 2020). Sinalizando assim que a CH₃ISACN tem como alvo as cisteínas-proteases, FP-2 e FP-3.

Tendo em vista que o meio biológico é dinâmico, o grupo de pesquisa realizou simulações computacionais a fim de entender como o complexo proteína-ligante, se comportaria, avaliando, portanto, sua estabilidade, e por isso foi realizado o estudo do desvio quadrático médio (Sargsyan, Grauffel, Lim 2017). Os complexos com as falcipainas se mantiveram estáveis e em equilíbrio durante o tempo de simulação (Gráfico 13 e 14). Estes resultados corroboram com outros estudos em que para as proteases analisadas (FP-2 e FP-3) e seus ligantes, os valores de RMSD foram 0.18 ± 0.35 nm (Musyoka *et al.*, 2016, Rajguru *et al.*, 2022). Até mesmo o estudo com a artemisinina e seus derivados sobre sua ação como antagonista da FP-2, foi identificado um RMSD que variou entre ~0.2nm e ~0.31nm (Nema *et al.*, 2022).

Para determinar as regiões proteicas com maior flexibilidade, foi calculado o RMSF (Gráfico 15 e 16). Estudos mostram que nas falcipainas as regiões de flutuações mais altas ocorrem nas regiões de *loop* (Musyoka *et al.*, 2016). O complexo FP2-CH₃ISACN apresentou apenas dois pontos de flutuações, entre os resíduos 110-115; 188-195. Em outros estudos observamos que as flutuações nestas regiões são comuns (Danazumi, Balogun 2022; Nema *et al.*, 2022; Rajguru *et al.*, 2022).

Ao compararmos os complexos, observamos que o FP3-CH₃ISACN apresentou quatro flutuações, sendo a maior entre os resíduos 198-202. Este resultado corrobora com o RMSF do cristal 3BPM, que demonstrou que os resíduos 195-203 exibiam um maior grau de flexibilidade quando comparados à estrutura circundante (Kerr *et al.*, 2009). Também, o RMSF do complexo 3BPM-8E apresentou flutuações significativas na região entre 189-199 (Ezugwu *et al.*, 2022).

As áreas que apresentaram alteração na flexibilidade das proteínas, não correspondem às regiões de maior interação com o ligante conforme visto pelos estudos de MFCC, estando assim a molécula (CH₃ISACN) fortemente ligada a ambas as proteínas.

Através do MFCC, foram descritos os principais aminoácidos envolvidos na interação com a molécula estudada (Figura 25a). O aminoácido His174 apresentou o maior valor energético dentre as interações observadas para o complexo CH₃ISACN-FP2, foram observadas interações do tipo H-bond e ligação de hidrogênio não convencional [i(C8)OH]. O E64 é um conhecido inibidor da falcipaina-2, e por isso é muito utilizado como parâmetro para avaliação da capacidade de interação de outras substâncias com a FP-2. Um dos principais aminoácidos que interagem com o E64 é o resíduo His174. Este faz parte do sítio catalítico da FP-2, por isso está presente na maioria das interações que o inibem (Nema *et al.*, 2022).

O segundo resíduo de maior interação da CH₃ISACN com a FP-2 foi o resíduo Asn38. Foi observada uma ligação de hidrogênio com a região ii de CH₃ISACN [ii(C11)N] e duas ligações de hidrogênio não convencionais com a mesma região [ii(C9)H]. De acordo com um trabalho *in silico* de inibidores da falcipaina-2, foi visto que o resíduo Asn38 foi crucial na estabilização do complexo FP2-STFAWT, fazendo uma ligação de hidrogênio com Asn52, levando a uma maior afinidade e contribuindo para aumentar a especificidade do inibidor para a protease alvo (Chakraborty, Biswas 2023). Também, o Asn38 é importante para forte ligação do E64 na FP-2, assim como os resíduos Cys39, Asn173 e Ser41, que auxiliam no processo de bloqueio da FP-2. A literatura também ressalta a importância dos resíduos Trp206 e Val152, que estão presentes no revestimento do bolso de ligação conhecido (Nema *et al.*, 2022). Já o aminoácido Trp206 denota duas H-bonds com o

ligante em ambas as regiões [i(C7)OH, ii(C11)N]. Acredita-se que o resíduo Trp206, que também está presente da FP-3, seja crucial para a correta orientação do ligante no sítio catalítico (Grazioso *et al.*, 2012). Em um estudo de interação foi observado que a artemisinina forma interações hidrofóbicas com o aminoácido Trp206 da FP-2 (Nema *et al.*, 2022).

O resíduo Gly40 também é importante para as interações entre a FP-2 e CH₃ISACN, apresentando uma energia de interação de -2.28 kcal/mol, ligações de hidrogênio não convencionais foram observadas com a região i do ligante [i(C4)O]. É reconhecido que o resíduo Gly40 é um dos aminoácidos que contribuem para a interação favorável de ligantes antagonistas ao FP-2, como é o caso da Deflazacort, Cefalotina e Cefoxitina (Nema *et al.*, 2022).

Na mesma linha, Asn173 denotou interações do tipo alquil-pi [i(C5)C] e ligação de hidrogênio não convencional [i(N)C] com o ligante. Asn173 pode ter um papel muito importante para polarização da His174, como foi visto em um estudo de dinâmica molecular, em que a FP-2 ligado à hemoglobina, demonstrou que a distância mínima entre seus átomos (Asn173 e His174) de amida e os átomos de imidazol de His174 era inferior a 3,5 Å. Além do que, a Asn173 juntamente com a His174 e Cys42, fazem parte da tríade catalítica de FP-2 (Omotuyi, Hamada 2014).

Já o aminoácido Ser41 demonstrou interações de hidrogênio não convencionais [i(C4)O, ii(C10)C] com CH₃ISACN. Assim como o His174, o resíduo Ser41 está envolvido na ligação de hidrogênio entre o antagonista E-64 e FP-2 (Kerr *et al.*, 2009). O resíduo Ser41 parece fazer parte do complexo da Cloroquina ao FP-2 através de ligações de van der Waals, assim como um composto extraído das folhas de *Artocarpus altilis*, que é um forte candidato a antimalárico (Hidayati *et al.*, 2020).

O resíduo Val152, demonstrou interações do tipo alquil-pi [i(C2)C] com o ligante. O resíduo Val152, fica localizado na região S1' (bolsão catalítico) da FP-2, região esta muito hidrofóbica com interações de van der Waals e forças hidrofóbicas (Li *et al.*, 2009). Já para o resíduo Cys39, que apresentou energia de interação no valor de -1.17kcal/mol, foram vistas ligações do tipo dipolo induzido [i(C4)O]. A falcipaina-2 apresenta em sua estrutura nove resíduos de cisteína: Cys 39, 42, 73,

80, 99, 114, 119, 168 e 229. O aminoácido Cys39 está próximo ao Cys80, e fazem uma ligação dissulfeto, que juntamente com os resíduos Asp 234, Tyr 78 e Trp 206, revestem os bolsos catalíticos (S1,S1',S2 e S3) (Sabnis *et al.*, 2002).

A estrutura cristalina da falcipaína-2 com seu inibidor, E64 (PDB 3BPF) e da falcipaína-3, com seu inibidor leupeptina, mostrou que os resíduos catalíticos de FP-2 e FP-3 compreendem os aminoácidos: Gln36/45, Cys42/51, His174/183, Asn204/213, respectivamente (Keer *et al.*, 2009).

Ao comparar os resíduos de maior interação da FP-2 com a CH₃ISACN, percebe-se que o único semelhante foi a His174. Já para o complexo CH₃ISACN-FP-3, observa-se que os resíduos de maior interação energética coincidem com a região catalítica do cristal FP3-leupeptina, com exceção do resíduo Asn213. Podemos dizer que a CH₃ISACN tem maior interação com a FP-3 se comportando como um antagonista, quando comparado com a FP-2, onde teve uma menor energia de interação, e houve pouca similaridade de ligação com a região catalítica do inibidor E64.

Na figura 25(b) é descrito os principais aminoácidos que interagem com a CH₃ISACN. O resíduo His183 é o que apresenta maior energia de interação com a CH₃ISACN, pois faz uma ligação de hidrogênio [i(C7)OH], na mesma região também apresenta ligação de hidrogênio não convencional. A segunda maior interação que a CH₃ISACN faz na FP-3, é com o resíduo Cys51, que faz três ligações de hidrogênio, estando uma na região [i(C7)OH], e duas na região [i(C4)O]. Também apresenta uma ligação alquil-sulfur [i(N)C8].

A falcipaína-3 se caracteriza por apresentar cinco hélices, seis fitas e seis voltas. O resíduo que constitui a região catalítica da FP-3, envolvem Cys51, localizado no N-terminal da hélice-2 (Sabnis *et al.*, 2003). A cisteína funciona como um nucleófilo, e isto se deve ao grupo –SH (tiol), ionizado pela histidina (His174 e His183 para FP-2 e FP-3 respectivamente) (Patra *et al.*, 2023). Na FP-3 próximo a Cys51, temos a His183, podendo estar envolvido na formação do par de íons tiolato/imidazólio (Sabnis *et al.*, 2003).

O resíduo Asn182 faz cinco ligações não convencionais na região $i(C)H$, $i(C8)H$ com a CH_3ISACN . Esta ligação é importante para estabilizar o anel de histidina. Posteriormente, ocorre um ataque tiolato ao substrato, que leva a formação de um intermediário tetraédrico oxianion (Sajid, Mckerrow 2002, Sabnis *et al.*, 2003).

A glutamina (Gln45) e o triptofano (Trp215) formam o “buraco oxyanion” que consiste em um elemento crucial na formação de um centro eletrofílico para estabilizar o intermediário tetraédrico durante a hidrólise (Sajid, Mckerrow 2002, Sabnis *et al.*, 2003). No complexo CH_3ISACN -FP3, o resíduo Gln45 faz duas ligações de hidrogênio na região $i(C4)O$, apresenta ligações de dipolo-induzido na região $ii(C10)C9$, e ligações de hidrogênio não convencional $ii(C11)C10$. Já o resíduo Trp215 faz uma ligação de hidrogênio na região $i(C7)OH$. Também apresenta ligações dipolo-induzido na região $ii(C9)H$.

O intermediário formado é então estabilizado por ligações de hidrogênio com os resíduos glutamina (Gln36 e Gln45, para FP-2 e FP-3 respectivamente) e cisteína (Cys42 e Cys51, para FP-2 e FP-3 respectivamente). Por fim, ocorre a protonação do grupo amina de saída, e formação de um segundo oxianion. E para regeneração do tiolato de cisteína, ocorre a desacilação e liberação do ácido carboxílico (Patra *et al.*, 2023). Além destes, observou-se que Gly92, Trp215 também estão envolvidos no processo de ancoragem com os substratos formando ligações de hidrogênio (Sabnis *et al.*, 2003).

O resíduo Gly49 faz ligações de hidrogênio não convencionais nas duas regiões, $ii(C11)N$, $i(C4)O$ com a CH_3ISACN . Este resíduo assim como outros (His183, Trp215, Asn182, Gln45) também é relatado como um dos principais aminoácidos envolvidos na interação entre inibidores (leupepitina e K11017) com a FP-3 (Rana *et al.*, 2020). Os três últimos principais resíduos da FP-3 que interagem com a CH_3ISACN , são: Cys48 que faz ligações de hidrogênio não convencionais na região $iii(C11)N$, $(C9)H$, Ala161 apresenta forças de London, todos na região $i(H)C1$, $(H)C2$, e Ser50 que faz ligações de hidrogênio não convencional $i(C8)H$ e $iii(C9)H$.

Os principais resíduos que interagem com o complexo CH_3ISACN -FP3, coincidem com os resíduos que participam do sítio ativo do complexo 7-

aminocumarina-FP3. Esta nova molécula corresponde a uma substituição na posição 7-amino do núcleo da cumarina na inibição da falcipaina-3, que é um alvo antimalárico bem aceito (Chintakrindi, Shaikh, Coutinho, 2011).

Com o intuito de investigar se a CH₃ISACN também seria capaz de inibir as proteases específicas do *P.berghei*, foi realizado as mesmas metodologias *in silico* aplicadas às falcipainas. Ao realizar o docking da CH₃ISACN com a BP-1 e BP-2 observou-se uma boa ancoragem, principalmente à BP-1, com uma energia de interação de -6,17 Kcal/mol (Tabela 11). Porém, a força de interação com as falcipainas foi maior (Tabela 10). Quanto a estabilidade das proteínas em solução, vemos que a BP-2 se manteve mais estável (Gráfico 21), e com variação próxima à da que foi observada nas falcipainas. Assim como também na análise do RMSF, no qual apresentou alguns pontos de flutuações em comum com as falcipainas, e como estas, não se mostrou com grandes instabilidades.

Ao partirmos para a análise comparativa da energia de interação entre os complexos nas constantes dielétricas de 10 e 40, nota-se que a BP-2 apresentou maior energia de interação com CH₃ISACN (Figura 27), porém menor comparando com as falcipainas (Figura 24). Quanto a análise dos principais resíduos envolvidos na interação com os complexos, não foram encontradas semelhanças entre as FP2/FP3 e BP1/BP2. Tendo em vista essa busca ser inédita, na literatura não temos descrito outros trabalhos relacionado ao MFCC de berghepaínas.

Tomados em conjunto os bioensaios e avaliações *in silico*, sugere-se que o aduto pode se comportar como antagonista das cisteínas proteases analisadas, tendo maior afinidade pelas falcipainas, especificamente à FP-3. Sendo pertinente a continuidade da sua investigação, direcionado para avaliações farmacocinéticas *in vivo* bem como estudos envolvendo o melhoramento da molécula, otimizando seu efeito farmacológico.

7. CONCLUSÃO

- Os estudos toxicológicos de doses repetidas, revelou que a substância nas doses administradas aos animais, não provocou alterações significativas nos parâmetros analisados, bem como não apresentou alterações patológicas, o que mostra a segurança do seu uso. Corroborando com o ensaio agudo também realizado por nosso grupo de pesquisa;
- A CH₃ISACN apresentou baixa genotoxicidade, no qual mostrou redução significativa do número de micronúcleos em comparação com o grupo controle positivo;
- O derivado de isatina CH₃ISACN tem se apresentado como um potencial antimalárico. Pois, apresentou atividade quimiossupressora no 5º dia contra infecção por *Plasmodium berghei* em camundongos; além de minimizar os sinais clínicos nos animais infectados, assim como retardou sua mortalidade. Ainda, nos ensaios histopatológicos, foi observado menos alterações patológicas nos animais tratados com CH₃ISACN do que no grupo controle negativo;
- Ao realizar os estudos *in silico*, a CH₃ISACN revelou uma boa interação com as proteases, se ligando em região muito próxima ao de inibidores já descritos na literatura. Assim, o seu mecanismo de ação como antiplasmodial está envolvido em bloquear a ação das proteases: FP2, FP-3, BP-1 e BP-2. Tendo maior interação com às falcipainas (estas que são as proteases encontradas no *P. falciparum* que infecta o ser humano), principalmente a FP-3.
- Pode-se concluir que a CH₃ISACN é promissora para o desenvolvimento de um futuro medicamento antimalárico. Sendo de grande valia a continuidade de seu estudo, até alcançar testes de fase clínica, e assim ser incluído no arsenal terapêutico contra a malária.

8. REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, I.G; AHMAD, M.H. Preliminary sub-acute toxicological assessment of methanol leaves extract of *Culcasia angolensis* (Araceae) in Wistar rats. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 45, p. 1-10, 2021.
- ADDY-ORDUNA, L. M.; BRODEUR, J. C.; MATEO, R. Oral acutetoxicityofimidacloprid, thiamethoxam and clothianidin in eared doves: a contributionfor theriskassessment of neonicotinoids in birds. **Science of The Total Environment**, v. 650, p.1216-1223, 2019.
- AGOSTINI, J.M.S. O teste do micronúcleo: seu uso no Homem. **Biotemas**, v. 6, n. 2, p. 1-19, 1993.
- 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.
- ALEBACHEW, Y., *et al.* In vivo anti-malarial activity of the hydroalcoholic extract of rhizomes of *Kniphofia foliosa* and its constituents. **Malaria Journal**, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2021.
- AL-AFIFI, N.A., *et al.* Acute and sub-acute oral toxicity of *Dracaena cinnabari* resin methanol extract in rats. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 18, p. 1-14, 2018.
- 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.
- ANTONY, J; GRIMME, S. Fully ab initio protein-ligand interaction energies with dispersion corrected density functional theory. **Journal of computational chemistry**, v. 33, n. 21, p. 1730-1739, 2012.
- ARALDI RP., *et al.* Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomed Pharmacother**, v. 72, p. 74-82, 2015.
- ANDRADE-NETO, V.F. Antimalarial activity of phenazines from lapachol, beta-lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* em vitro and *Plasmodium berghei* in vivo. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2012.
- 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.
- BALIKAGALA, B., *et al.* Evidence of artemisinin-resistant malaria in Africa. **New England Journal of Medicine**, v. 385, n. 13, p. 1163-1171, 2021.

- 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.
- BHARDWAJ, P.; et al. Exploration of binding mechanism of triclosan towards cancer markers using molecular docking and molecular dynamics. **Chemosphere**, v. 293, p. 133550, 2022.
- BENCHEIKH, N. et al. Protective effect of Zizyphus lotus L.(Desf.) fruit against CCl 4-induced acute liver injury in rat. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019.
- BERENDSEN, H.J.C.; et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of Chemical Physics**, v. 81, n. 8, p. 3684–3690, 1984.
- BERMAN, H.M.; et al. The Protein Data Bank. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000.
- BLAKEMORE, D.C., et al. Organic synthesis provides opportunities to transform drug discovery. **Nature chemistry**, v. 10, n. 4, p. 383-394, 2018.
- BONAM S.R, Rénia L, Tadepalli G, Bayry J, Kumar H.M.S. *Plasmodium falciparum* Malaria Vaccines and Vaccine Adjuvants. **Vaccines**, v. 9, n. 10. p. 1072, 2021.
- 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.
- CARVALHO L.H., et al. Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied in vivo in *Plasmodium berghei*-infected mice and in vitro against *Plasmodium falciparum* in culture. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 24, n. 11, p. 1113-1123, 1991.
- CHAKRABORTY, S; BISWAS, S. Structure-Based Optimization of Protease–Inhibitor Interactions to Enhance Specificity of Human Stefin-A against Falcipain-2 from the *Plasmodium falciparum* 3D7 Strain. **Biochemistry**, v. 62, n. 5, p. 1053-1069, 2023.
- CHERYL, C; LIUH LING, G; TIOW-SUAN, S. Differences in biochemical properties of the Plasmodial falcipain-2 and berghepain-2 orthologues: implications for in vivo screens of inhibitors. **FEMS microbiology letters**, v. 249, n. 2, p. 315-321, 2005.
- CHINTAKRINDI, A. S.; SHAIKH, M.S.; COUTINHO, E.C. De novo design of 7-aminocoumarin derivatives as novel falcipain-3 inhibitors. **Journal of molecular modeling**, v. 18, p. 1481-1493, 2012.
- CHU, W. Y; DORLO, T. P. C. Pyronaridine: a review of its clinical pharmacology in the treatment of malaria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 78, n. 10, p. 2406-2418, 2023.

COCK, I. E.; SELESHO, M. I.; VAN VUUREN, S. F. A review of the traditional use of southern African medicinal plants for the treatment of malaria. **Journal of ethnopharmacology**, v. 245, p. 112176, 2019.

COSSI, M. *et al.* Energies, structures, and electronic properties of molecules in solution with the C-PCM solvation model. **J. Comput. Chem**, v. 24, p. 669-681, 2003.

CRISPIM, M. *et al.* Suitability of methods for *Plasmodium falciparum* cultivation in atmospheric air. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, 2022.

DANAZUMI, A.U; BALOGUN, E. O. Microsecond-long simulation reveals the molecular mechanism for the dual inhibition of falcipain-2 and falcipain-3 by antimalarial lead compounds. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 9, p. 1070080, 2022.

DA SILVA, M.G., *et al.* A importância dos ensaios de toxicidade para o desenvolvimento e o registro de fitoterápicos no Brasil. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, p. 10, 2021.

DAILY, J.P; MINUTI, A; KHAN, N. Diagnosis, treatment, and prevention of malaria in the US: a review. **JAMA**, v. 328, n. 5, p. 460-471, 2022.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P; NETO, J. Ferreira. Studies on transmission of simian malaria and on a natural infection of man with *Plasmodium simium* in Brazil. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 35, n. 5, p. 805, 1966.

DE SANTIS, G. C. Anemia: definição, epidemiologia, fisiopatologia, classificação e tratamento. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 52, n. 3, p. 239-251, 2019.

DEL PORTILLO; A. *et al.* The role of the spleen in malaria. **Cellular microbiology**, v. 14, n. 3, p. 343-355, 2012.

DIAS, G. T. **Avaliação da atividade antibacteriana, antiproliferativa e toxicológica in silico, in vitro, in vivo, ex vivo de um derivado da N-metil isatina**. 2020, 107 p. Dissertação. Universidade Federal da Paraíba, Natal 2020.

DÍEZ-QUIJADA, L. *et al.* Evaluation of toxic effects induced by repeated exposure to Cylindrospermopsin in rats using a 28-day feeding study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 151, p. 112108, 2021.

DO CARMO, L.R; LEAL, L.S; RIBEIRO, L.R. Allium cepa e teste do Micronúcleo como bioindicadores de citogenotoxicidade em extratos aquosos de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 82419-82430, 2020.

EDGAR, R., *et al.* Methods used to investigate the *Plasmodium falciparum* digestive vacuole. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 1434, 2022.

ETTARI, R., *et al.* Falcipain-2 and Falcipain-3 inhibitors as promising antimalarial agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 15, p. 3010-3031, 2021.

EZUGWU, J.A. *et al.* Design, Synthesis, Molecular Docking, Molecular Dynamics and In Vivo Antimalarial Activity of New Dipeptide-Sulfonamides. **ChemistrySelect**, v. 7, n. 5, p. e202103908, 2022.

FAN, J; FU, Ai; ZHANG, L. Progress in molecular docking. **Quantitative Biology**, v. 7, p. 83-89, 2019.

FANG, Y., *et al.* In vitro and in vivo antimalarial activity of LZ1, a peptide derived from snake cathelicidin. **Toxins**, v. 11, n. 7, p. 379, 2019.

FONSECA, A. G. Avaliação da toxicidade e investigação dos efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos in vivo de derivados isatinas-tiosemicarbazonas. 2019. 121 p. Tese – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2019.

FRISCH M. J. *et al.* Gaussian 09, Gaussian Inc., Wallingford CT, 2009.

GALICIA-GARCIA, U. *et al.* Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 17, p. 6275, 2020.

GOH BI, L. A. *et al.* Acute and subacute toxicity assessment of an aqueous extract of *Crotalaria retusa* (Fabaceae) in Swiss mice and Wistar rats. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 11, n. 6, p. 94-100, 2021

GORDON, M. S. *et al.* Fragmentation methods: A route to accurate calculations on large systems. **Chemical reviews**, v. 112, n. 1, p. 632-672, 2012.

GRAZIOSO, G. *et al.* Mechanism of falcipain-2 inhibition by α , β -unsaturated benzo [1, 4] diazepin-2-one methyl ester. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 26, p. 1035-1043, 2012.

GRIMME, S. Semiempirical GGA-type density functional constructed with a long-range dispersion correction. *J. Comput. Chem.* 27, 1787-1799, 2006.

HIDAYATI, A. R. *et al.* Antimalarial activity of flavonoid compound isolated from leaves of *artocarpus altilis*. **Pharmacognosy Journal**, v. 12, n. 4, 2020.

HOPP, C. S. *et al.* Deletion of the rodent malaria ortholog for falcipain-1 highlights differences between hepatic and blood stage merozoites. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 9, p. e1006586, 2017.

HUSSEIN, Mogahed Ismail Hassan *et al.* Malaria and COVID-19: unmasking their ties. **Malaria journal**, v. 19, n. 1, p. 1-10, 2020.

INADA, A. C. Avaliação do extrato aquoso dos frutos de *Morinda citrifolia* linn.(noni) nas alterações metabólicas em camundongos swiss alimentados com dieta rica em

lipídios e frutose, 2021. 132 p. Tese – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2021

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.

KAPOOR, M. P. *et al.* 13-Weeks subchronic toxicity of isoquercitrin- γ -cyclodextrin (IQC- γ CD) molecular inclusion complex in Sprague-Dawley rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 152, p. 112217, 2021.

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

KHARCHOUFA, L. *et al.* Acute and subacute toxicity studies of the aqueous extract from Haloxylon scoparium Pomel (Hammada scoparia (Pomel)) by oral administration in rodents. **BioMed Research International**, v. 2020, 2020.

KERR, I.D.; *et al.* Structures of falcipain-2 and falcipain-3 bound to small molecule inhibitors: implications for substrate specificity. **Journal of medicinal chemistry**, v. 52, n. 3, p. 852-857, 2009.

KHARCHOUFA, L. *et al.* Acute and subacute toxicity studies of the aqueous extract from Haloxylon scoparium Pomel (Hammada scoparia (Pomel)) by oral administration in rodents. **BioMed Research International**, v. 2020, 2020.

KNAPP, B. *et al.* vmdICE: A plug-in for rapid evaluation of molecular dynamics simulations using VMD. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 16, p. 2868-2873, 2010.

KLAASSEN, C. D.; WATKINS, J.B. **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull (Lange)**. AMGH Editora, 2009.

KOUAKOU, Y. I. *et al.* Systematic review of artesunate pharmacokinetics: Implication for treatment of resistant malaria. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 89, p. 30-44, 2019.

KRETTLI, A. U. Antimalarial drug discovery: screening of Brazilian medicinal plants and purified compounds. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 4, n. 2, p. 95-108, 2009.

KUMAR, S. *et al.* Drug targets for resistant malaria: historic to future perspectives. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 104, p. 8-27, 2018.

KUMAR, A. *et al.* Acute and subacute toxicity study of ethanolic extract of Calotropis procera (Aiton) Dryand flower in Swiss albino mice. **Phytomedicine plus**, v. 2, n. 2, p. 100224, 2022.

KUMARI, A; SINGH, K. Evaluation of prophylactic efficacy of cinnamaldehyde in murine model against *Paradendryphiella arenariae* mycotoxin tenuazonic acid-induced oxidative stress and organ toxicity. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2021.

KUNAKBAEVA, Z.; CARRASCO, R.; ROZAS, I. An approximation to the mechanism of inhibition of cystein proteases: nucleophilic sulphur addition to Michael acceptors type compounds. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 626, n. 1-3, p. 209-216, 2003.

HAYASHI, M. The micronucleus test—most widely used in vivo genotoxicity test—. **Genes and Environment**, v. 38, n. 1, p. 18, 2016.

HESS, B. P-LINCS: A Parallel Linear Constraint Solver for Molecular Simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 1, p. 116–122, jan. 2008.

HOCKNEY, R. W.; GOEL, S. P.; EASTWOOD, J. W. Quiet high-resolution computer models of a plasma. **Journal of Computational Physics**, v. 14, n. 2, p. 148–158, fev. 1974.

HOLLINGSWORTH, S.A.; DROR, R.O. Molecular dynamics simulation for all. **Neuron**, v. 99, n. 6, p. 1129-1143, 2018.

HOLZ, L. E., *et al.* Glycolipid-peptide vaccination induces liver-resident memory CD8+ T cells that protect against rodent malaria. **Science immunology**, v. 5, n. 48, p. 8035, 2020.

HUTTER, J. Car–Parrinello molecular dynamics. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 2, n. 4, p. 604–612, 2012.

LI, H. *et al.* Identification of novel falcipain-2 inhibitors as potential antimalarial agents through structure-based virtual screening. **Journal of medicinal chemistry**, v. 52, n. 15, p. 4936-4940, 2009.

LIN, J., *et al.* Replication of *Plasmodium* in reticulocytes can occur without hemozoin formation, resulting in chloroquine resistance. **Journal of Experimental Medicine**, v. 212, n. 6, p. 893-903, 2015.

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.

LIU, J., *et al.* The role of *Plasmodium falciparum* food vacuole plasmepsins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 2, p. 1432-1437, 2005.

LOPES, F.V., *et al.* 1, 2, 3-Triazole derivatives: Synthesis, docking, cytotoxicity analysis and in vivo antimalarial activity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 350, p. 109688, 2021.

MACARTHUR C.J.A.; SUN, D. Guidelines for the ethical review of laboratory animal welfare People's Republic of China National Standard GB/T 35892-2018. **Animal models and experimental medicine**, v. 3, n. 1, p. 103-113, 2020.

MBANEFO, A; KUMAR, N. Evaluation of malaria diagnostic methods as a key for successful control and elimination programs. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 5, n. 2, p. 102, 2020.

MEDRANO-PADIAL C. *et al.* In Vivo Genotoxicity Evaluation of a Stilbene Extract Prior to Its Use as a Natural Additive: A Combination of the Micronucleus Test and the Comet Assay. **Foods**, v. 10, n. 2, p. 439, 2021

MEIBALAN, E; MARTI, M. Biology of malaria transmission. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 3, p. a025452, 2017.

MELO, CR. **Atividade antiplasmodial in vitro de um derivado da N-metil-isatina (CH₃ISACN), e sua toxicidade in silico e in vivo**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, p. 97. 2020.

MILNER, D.A. Malaria pathogenesis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 8, n. 1, p. a025569, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de tratamento da malária no Brasil. Secretaria de vigilância em saúde. Brasília, 2021. 96 p. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/malaria/tratamento/guia_tratamento_malaria_2nov21_isbn_site.pdf/@download/file. Acesso em: 3 jan.2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico. **Panorama epidemiológico da malária em 2021: buscando o caminho para a eliminação da malária no Brasil**. Secretaria de Vigilância em Saúde, 53: 1-29, 2022.

MIRZA, A.C; PANCHAL, S.S. Safety assessment of Vanillic acid: Subacute Oral toxicity studies in Wistar rats. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 17, n. 4, p. 432, 2020.

MOHAMMADPOUR, R., *et al.* Subchronic and chronic toxicity evaluation of inorganic nanoparticles for delivery applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 144, p. 112-132, 2019.

MOMANY, F. A.; RONE, R. Validation of the general purpose QUANTA®3.2/CHARMm® force field. *J. Comput. Chem.* 13, 888-900, 1992.

MOREIRA, C. L. G., *et al.* A importância da realização do hemograma para triagem de anemias em pessoas da terceira idade: uma revisão bibliográfica. **TEMAS EM SAÚDE**, v.20, n.6, 2020.

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

MUSYOKA, T. M. *et al.* Structure based docking and molecular dynamic studies of plasmodial cysteine proteases against a South African natural compound and its analogs. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 23690, 2016.

NADEEM, A. Y. *et al.* Mosquirix™ RTS, S/AS01 vaccine development, immunogenicity, and efficacy. **Vaccines**, v. 10, n. 5, p. 713, 2022.

NEGI, A; PASAM, T; DANDEKAR, M.P. Acute and Subacute Administration of Bacillus Subtilis UBBS-14 Probiotic Shows No Toxicity in Male and Female Sprague-Dawley rats. **Research Square**, 2022.

NEMA, S. *et al.* Identification of Potential Antimalarial Drug Candidates Targeting Falcipain-2 Protein of Malaria Parasite—A Computational Strategy. **BioTech**, v. 11, n. 4, p. 54, 2022.

NUSSENZWEIG R. S. *et al.* Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of plasmodium berghei. **Nature**, v. 216, n. 5111, p.160-162, 1967.

OECD (2001), Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. Available in: https://www.oecd-ilibrary.org/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method_5lmqcr2k7mzp.pdf?itemId=%2Fcontent%2Fpublication%2F9789264071001-en&mimeType=pdf Accessed: 10. Jan. 2022

OECD (2002), Test No. 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, Available in: https://www.oecd-ilibrary.org/test-no-420-acute-oral-toxicity-fixed-dose-procedure_5lmqcr2k7n7h.pdf?itemId=%2Fcontent%2Fpublication%2F9789264070943-en&mimeType=pdf Accessed: 20.Mai.2020

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. Available in: https://www.oecd-ilibrary.org/test-no-407-repeated-dose-28-day-oral-toxicity-study-in-rodents_5lmqcr2k7pd2.pdf?itemId=%2Fcontent%2Fpublication%2F9789264070684-en&mimeType=pdf Accessed: 10.Jan.2022

OECD (2014), Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Publishing, Paris. Available in: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/draft_tg474_second_commenting_round.pdf Accessed: 10. Jan. 2022.

OLSSON, M. H. M. *et al.* PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical p K a Predictions. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 7, n. 2, p. 525–537, 8 fev. 2011.

OMOTUYI, I. O.; HAMADA, T. Dynamical footprint of falcipain-2 catalytic triad in hemoglobin- β -bound state. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 33, n. 5, p. 1027-1036, 2014.

PALOQUE, L.*et al.* Mutation in the *Plasmodium falciparum* BTB/POZ domain of K13 protein confers artemisinin resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 66, n. 1, p. e01320-21, 2022.

PANDEY, K.C. *et al.* Regulatory elements within the prodomain of Falcipain-2, a cysteine protease of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **PloS one**, v. 4, n. 5, p. e5694, 2009.

PANT, A. *et al.* Allosteric site inhibitor disrupting auto-processing of malarial cysteine proteases. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 16193, 2018.

PASUPUREDDY, R., *et al.* Crucial residues in falcipains that mediate hemoglobin hydrolysis. **Experimental parasitology**, v. 197, p. 43-50, 2019.

PATEL, P., *et al.* Prevalence of mutations linked to antimalarial resistance in *Plasmodium falciparum* from Chhattisgarh, Central India: a malaria elimination point of view. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 16690, 2017.

PATRA, J.; *et al.* Falcipains: Biochemistry, target validation and structure-activity relationship studies of inhibitors as antimalarials. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 252, p. 115299, 2023.

PETERS, W. Drug resistance in *Plasmodium berghei*. I. Chloroquine resistance. **Experimental parasitology**, v. 17, n. 1, p. 80-89, 1965.

PETTERSEN, E. F. *et al.* UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, out. 2004.

POGGIOGALLE, E; JAMSHED, H; PETERSON, C. M. Circadian regulation of glucose, lipid, and energy metabolism in humans. **Metabolism**, v. 84, p. 11-27, 2018.

QU, J., *et al.* Acute and subchronic oral toxicity of anthraquinone in sprague dawley rats. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 16, p. 10413, 2022.

RAJGURU, T., *et al.* Identification of promising inhibitors for *Plasmodium* haemoglobinase Falcipain-2, using virtual screening, molecular docking, and MD simulation. **Journal of Molecular Structure**, v. 1248, p. 131427, 2022.

RANA, D. *et al.* Identification of antimalarial leads with dual falcipain-2 and falcipain-3 inhibitory activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 115155, 2020.

RASTELLI, G.; *et al.* Fast and accurate predictions of binding free energies using MM-PBSA and MM-GBSA. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 4, p. 797-810, 2010.

RAUF, M.A; ZUBAIR, S; AZHAR, A. Ligand docking and binding site analysis with pymol and autodock/vina. **International Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 4, n. 2, p. 168, 2015.

RINCON, C. R. C. S. B.; MOREIRA, V. F.; CASTRO, F. S. Prevalência de anemia microcítica e hipocrômica em pacientes atendidos pelo lac-puc goiás do período de agosto a outubro de 2018. **REVISTA BRASILEIRA MILITAR DE CIÊNCIAS**, v. 5, n. 13, 2019.

ROBINSON, N.B., *et al.* The current state of animal models in research: A review. **International Journal of Surgery**, v. 72, p. 9-13, 2019.

ROJAS, L; CABRERA-MUÑOZ, A; ALONSO-DEL-RIVERO, M. Proteasas: enzimas claves en la fase esquizogónica del ciclo de vida de *Plasmodium falciparum*. **Cuban Journal of Biological Sciences/Revista Cubana de Ciencias Biológicas**, v. 7, n. 2, 2019.

ROSENTHAL, P.J., *et al.* Identification of three stage-specific proteinases of *Plasmodium falciparum*. **The Journal of experimental medicine**, v. 166, n. 3, p. 816-821, 1987.

ROSENTHAL, P.J.; NELSON, R.G. Isolation and characterization of a cysteine proteinase gene of *Plasmodium falciparum*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 51, n. 1, p. 143-152, 1992.

ROSENTHAL, P.J., *et al.* Cysteine proteases of malaria parasites: targets for chemotherapy. **Current pharmaceutical design**, v. 8, n. 18, p. 1659-1672, 2002.

ROSENTHAL, P.J. Falcipain cysteine proteases of malaria parasites: An update. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1868, n. 3, p. 140362, 2020.

SABNIS, Y. *et al.* Homology modeling of falcipain-2: validation, de novo ligand design and synthesis of novel inhibitors. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 19, n. 5, p. 765-774, 2002.

SABNIS, Y.A. *et al.* Probing the structure of falcipain-3, a cysteine protease from *Plasmodium falciparum*: Comparative protein modeling and docking studies. **Protein Science**, v. 12, n. 3, p. 501-509, 2003.

SAJID, M; MCKERROW, J.H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 120, n. 1, p. 1-21, 2002.

SANTOS, M.M.; MOREIRA, R. Michael acceptors as cysteine protease inhibitors. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 7, n. 10, p. 1040-1050, 2007.

SANTOS, E.W., *et al.* Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 53 n. 2, p. 138-145, 2016

SANTOS, J.L.S., *et al.* In silico analysis of energy interactions between nociceptin/orfanin FQ receptor and two antagonists with potential antidepressive action. **New Journal of Chemistry**, v. 46, n. 17, p. 7950-7959, 2022.

SANTOS, Hugo *et al.* Recent Advances in Catalytic Systems for the Mechanistically Complex Morita–Baylis–Hillman Reaction. **ACS Catalysis**, v. 13, n. 6, p. 3864-3895, 2023.

SARGSYAN, K; GRAUFFEL, C; LIM, C. How molecular size impacts RMSD applications in molecular dynamics simulations. **Journal of chemical theory and computation**, v. 13, n. 4, p. 1518-1524, 2017.

SARMA, R. *et al.* Subchronic toxicity study of the characterized hydroalcoholic extract of *Paederia foetida* (L.) leaves in swiss albino mice. **South African Journal of Botany**, v. 151, p. 544-554, 2022.

SAVOJI, H., *et al.* Cardiovascular disease models: a game changing paradigm in drug discovery and screening. **Biomaterials**, v. 198, p. 3-26, 2019.

SHAKER, B., *et al.* In silico methods and tools for drug discovery. **Computers in biology and medicine**, v. 137, p. 104851, 2021.

SHELDON, R.A. The greening of solvents: Towards sustainable organic synthesis. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 18, p. 13-19, 2019.

SHENAI, B.R.*et al.* Characterization of Native and Recombinant Falcipain-2, a Principal Trophozoite Cysteine Protease and Essential Hemoglobinase of *Plasmodium falciparum*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 37, p. 29000-29010, 2000.

SHIBESHI, M.A; KIFLE, Z.D; ATNAFIE, S.A. Antimalarial drug resistance and novel targets for antimalarial drug discovery. **Infection and Drug Resistance**, p. 4047-4060, 2020.

SHOKRZADEH, M., *et al.* The protective effects of *Origanum vulgare* L. extract on genetic damage of cyclophosphamide in mice blood lymphocytes using micronucleus test. **Pharmaceutical and Biomedical Research**, v. 6, n. 4, p. 297-302, 2020.

SIJWALI, P.S. *et al.* Expression and characterization of the *Plasmodium falciparum* haemoglobinase falcipain-3. **Biochemical Journal**, v. 360, n. 2, p. 481-489, 2001.

SIJWALI, P.S. *et al.* *Plasmodium falciparum* cysteine protease falcipain-1 is not essential in erythrocytic stage malaria parasites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 23, p. 8721-8726, 2004.

SILVA-SANTANA, G. *et al.* Clinical hematological and biochemical parameters in Swiss, BALB/c, C57BL/6 and B6D2F1 Mus musculus. **Animal models and experimental medicine**, v. 3, n. 4, p. 304-315, 2020.

SINGH, N. *et al.* *Plasmodium falciparum*: biochemical characterization of the cysteine protease falcipain-2'. **Experimental parasitology**, v. 112, n. 3, p. 187-192, 2006.

SINGH, A. *et al.* A chimeric cysteine protease of *Plasmodium berghei* engineered to resemble the *Plasmodium falciparum* protease falcipain-2. **Protein Engineering, Design & Selection**, v. 20, n. 4, p. 171-177, 2007.

SIREERATAWONG, S. *et al.* Acute and chronic toxicity studies of the water extract from dried fruits of Terminalia bellerica (Gaertn.) Roxb. In Spargue-Dawley rats. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 10, n. 2, p. 223-231, 2013.

SRISRIMAL, D. A. *et al.* Silver Nanoparticles: Evaluation of In Vivo Toxicity in Rats. **BioNanoScience**, v. 13, n. 1, p. 176-185, 2023.

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

SOUZA, R.M.C *et al.* Biological activity of 1, 2, 3-triazole-2-amino-1, 4-naphthoquinone derivatives and their evaluation as therapeutic strategy for malaria control. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 255, p. 115400, 2023.

STOYE, A. *et al.* Falcipain inhibitors based on the natural product gallinamide A are potent in vitro and in vivo antimalarials. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 11, p. 5562-5578, 2019.

STRECH, D.; DIRNAGL, U. 3Rs missing: animal research without scientific value is unethical. **BMJ Open Science**, v. 3, n. 1, 2019.

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. 29, 2019.

SUNDARARAJ, S., *et al.* The ionic and hydrophobic interactions are required for the auto activation of cysteine proteases of *Plasmodium falciparum*, v. 7, n. 10, p. 1-9, 2012.

TALAPKO, J *et al.* Malaria: the past and the present. **Microorganisms**, v. 7, n. 6, p. 179, 2019.

TOGBOSSI, L.A. *et al.* In vivo assessment of acute and subchronic toxicity of hydroethanolic extract of *Ximenia americana* L.(Olacaceae) stem bark. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 12, n. 4, p. 81-86, 2022.

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

TWOHIG, K.A., *et al.* Growing evidence of *Plasmodium vivax* across malaria-endemic Africa. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 1, p. e0007140, 2019.

UCHÔA, I.S; MAGALHÃES, M.A.V. Teste de Micronúcleo um importante Biomarcador Celular/Micronucleus test an important Cellular Biomarker. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 4, p. 22018-22023, 2020.

UDDIN, A., *et al.* Target-based virtual screening of natural compounds identifies a potent antimalarial with selective falcipain-2 inhibitory activity. **Frontiers in pharmacology**, v. 13, p. 850176, 2022.

UDU, R; OYWERI, J; GATHIRWA, J. Antimalarial activity of *Nigella sativa* L. Seed extracts and selection of resistance in *Plasmodium berghei* ANKA in a mouse model. **Journal of Pathogens**, v. 2021, p. 1-10, 2021.

VALDÉS-TRESANCO, M.S. *et al.* gmx_MMPBSA: a new tool to perform end-state free energy calculations with GROMACS. **Journal of chemical theory and computation**, v. 17, n. 10, p. 6281-6291, 2021.

VASCONCELOS, C. F. B. D., *et al.* Estudo toxicológico crônico do extrato aquoso da casca do caule de *Libidibia ferrea* Mart. ex Tul. . **Biomed Biopharm Res**, v. 17, n. 2, p. 277-293, 2020.

VIANNA, J.F.; *et al.* Binding energies of the drugs capreomycin and streptomycin in complex with tuberculosis bacterial ribosome subunits. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 21, n. 35, p. 19192-19200, 2019.

WAIGANJO, B., *et al.* Antiplasmodial and cytotoxic activities of extracts of selected medicinal plants used to treat malaria in Embu county, Kenya. **Journal of Parasitology Research**, v. 2020, p. 1-15, 2020.

WALTER, N.S., *et al.* Sinigrin in combination with artesunate provides protection against lethal murine malaria via falcipain-3 inhibition and immune modulation. **International Immunopharmacology**, v. 101, p. 108320, 2021.
WANG, S.X., *et al.* Structural basis for unique mechanisms of folding and hemoglobin binding by a malarial protease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 31, p. 11503-11508, 2006.

WANG, J. *et al.* Structural features of falcipain-3 inhibitors: an in silico study. **Molecular BioSystems**, v. 9, n. 9, p. 2296-2310, 2013.

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

WHITE, N.J. Anaemia and malaria. **Malaria journal**, v. 17, n. 1, p. 1-17, 2018.

WHO, World Health Organization. Artemisinin resistance and artemisinin-based combination therapy efficacy. Global Malaria Programme, 2018. Disponível em: <https://www.who.int/docs/default-source/documents/publications/gmp/who-cds-gmp-2018-26-eng.pdf> Acesso em: 27 mai.2023.

WHO, World Health Organization (2022) **World malaria report 2022**. Geneva: World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1484818/retrieve>. Acesso em: 01 mai.2023.

WHO, World Health Organization (2023). **Malária**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>. Acesso em: 28 dez. 2023.

YADAV, M. *et al.* Comparative acute and sub-acute toxicity study of hydro-alcoholic extracts of centella asiatica and evolvulus alsinoides in swiss albino mice. **Intern. J. Pharm. Sci. Res**, v. 10, p. 4694-4699, 2019.

YAO, W. *et al.* Toxicological evaluation of a flavonoid, chrysin: morphological, behavioral, biochemical nad histopathological assessments in rats. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 6, p. 601-612, 2021.

ZHANG, W.; ZHANG, J.Z.H. Molecular fractionation with conjugate caps for full quantum mechanical calculation of protein–molecule interaction energy. **The Journal of chemical physics**, v. 119, n. 7, p. 3599-3605, 2003.

9. ANEXOS

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



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da toxicidade in silico, in vitro e in vivo de um Aduto de Morita-Baylis-Hillman derivado da N-metil-isatina", protocolada sob o CEUA nº 1572071218 (ID 000497), sob a responsabilidade de **Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz e equipe; Cinthia Rodrigues Melo; Caliandra Maria Bezerra Luna Lima** - 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 22/02/2019.

We certify that the proposal "Evaluation of in silico, in vitro and in vivo toxicity of a Morita-Baylis-Hillman Adduct derived from N-methyl isatin", utilizing 50 Heterogenics rats (males and females), 24 Heterogenics mice (males and females), protocol number CEUA 1572071218 (ID 000497), under the responsibility of **Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz and team; Cinthia Rodrigues Melo; Caliandra Maria Bezerra Luna Lima** - 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 02/22/2019.

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

Vigência da Proposta: de **04/2019** a **01/2020**

Área: **Ciências Farmacêuticas**

Origem: **Unidade de Produção Animal IPeFarM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **2 a 4 semanas**

N: **50**

Linhagem: **Rattus Norvegicus - Wistar**

Peso: **180 a 220 g**

Origem: **Unidade de Produção Animal IPeFarM**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **8 a 10 semanas**

N: **24**

Linhagem: **Mus musculus - Swiss**

Peso: **25 a 30 g**

Local do experimento: Laboratório de Ensaios Toxicológicas (LABETOX) e no Biotério do Centro Universitário de João Pessoa (Unipê).

João Pessoa, 30 de abril de 2020

Prof. Dra. Jailane de Souza Aquino
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Carlos Augusto Alanis Clemente
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba



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-oxindo-a-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 B- Certidão do Comitê de Ética em uso Animal (CEUA)-UFRN



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA
Av. Salgado Filho, S/N – CEP: 59072-970 – Natal / RN
Fone: (84) 99229-6491 / e-mail: ceua@reitoria.ufrn.br

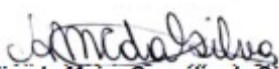
**CERTIFICADO**

Natal (RN), 13 de abril de 2022.

Certificamos que a proposta intitulada **"Análise de novos compostos 2-amino-1,4-naftoquinona contendo 1,2,3-triazol testados contra o *Plasmodium falciparum* in vitro e *P. berghei* em modelo murino como estratégia terapêutica no controle da malária"**, sob a responsabilidade de **Valter Ferreira de Andrade Neto** - e que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n.º 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi APROVADA, após ajustes, pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – CEUA/UFRN na reunião do dia 07/04/2022.

Protocolo Nº 005/2022			CERTIFICADO Nº 278.005/2022			
Finalidade	Pesquisa					
Vigência do Projeto	MARÇO 2025					
RELATÓRIO	Abril 2025					
Espécie	Linhagem	Idade	Peso aprox.	Quantidade:		
				M	F	Total
Mus musculus	Swiss	adultos	20-24 gramas	0	327	327
Origem/	Biotério Central - Centro de Biociências - UFRN					
Manutenção	Biotério de Experimentação Unidade Labmat - DMP - CB - UFRN					

Informamos ainda que, segundo o Cap. 2, Art. 13, do Regimento Interno desta CEUA, é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a elaboração de relatório de acompanhamento que deverá ser entregue tão logo a pesquisa seja concluída. O descumprimento desta norma poderá inviabilizar a submissão de projetos futuros.


Alianda Maira Cornélio da Silva
Coordenadora da CEUA-UFRN
Gestão 2021-2022

www.ceua.propesq.ufrn.br

Anexo C- Artigo científico publicado resultante da presente tese

Revista Brasileira de Educação e Saúde-REBES
Grupo Verde de Agroecologia e Abelhas-GVAA
ISSN: 2358-2391
DOI 10.18378/rebes.v13i4.10259



Artigo de Revisão

Inibição das cisteínas proteases como alvos de candidatos a antimaláricos: Uma revisão narrativa

Inhibition of cysteine proteases as targets of antimalarial candidates: A narrative review

Cinthia Rodrigues Melo¹, Claudio Gabriel Lima-Júnior², Abrahão Alves de Oliveira Filho¹, Valter Ferreira de Andrade-Neto⁴, Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz¹

¹Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil. E-mail: cinthia.rmmelo@gmail.com

²Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil. E-mail: claudio@quimica.ufpb.br

³Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB, Brasil. E-mail: abrahao.farm@gmail.com

⁴ Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. E-mail: vfan.aneto@gmail.com

⁵Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil. E-mail: margarethdiniz.ufpb@gmail.com

Resumo - A malária é uma doença parasitária com grande prevalência no mundo. Em 2021 acometeu 247 milhões de pessoas e provocou 619.000 mortes. Sua transmissão ocorre através da picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* infectada pelo *Plasmodium*. Das espécies que infectam o ser humano, o *Plasmodium falciparum* é o mais letal. 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 ação em alvos que interfiram apenas no parasito. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo, discorrer sobre uma nova perspectiva de abordagem terapêutica para o tratamento da malária, com alvo específico no *P.falciparum*. Dessa forma, foram analisados trabalhos científicos publicados em bases de dados como: PubMed, Scielo e Google acadêmico. Após análise dos dados encontrados na literatura, observou-se que as falcipainas (cisteínas proteases) são de grande importância para manutenção do ciclo de vida do *P. falciparum*, principalmente as falcipainas 2 e 3. Estas enzimas atuam na invasão aos eritrócitos, degradação da hemoglobina, e no desenvolvimento proteolítico do parasito. Portanto a inibição destas enzimas são um bom alvo terapêutico. Também, identificamos que substâncias que apresentam aceptores de Michael em sua estrutura (como é o caso de alguns adutos de Morita Baylis Hillman), são capazes de inibir as cisteínas proteases, sendo assim bons candidatos a antimaláricos.

Palavras-chaves: Malária. *P. falciparum*. resistência. falcipainas. aceptores de Michael

Abstract - Malaria is a parasitic disease that is highly prevalent throughout the world. In 2021, it affected 247 million people and caused 619,000 deaths. Its transmission occurs through the bite of a female *Anopheles* mosquito infected by *Plasmodium*. Of the species that infect humans, *Plasmodium falciparum* is the most lethal. One of the main factors that has hampered the control of malaria is the large number of parasites that are resistant to the usual antimalarials, including artemisinin and derivatives. Therefore, it is necessary to discover new drugs that are more effective, and that act on targets that only interfere with the parasite. Given this, the present work aimed to discuss a new perspective of therapeutic approach to the treatment of malaria, with a specific target on *P.falciparum*. In this way, scientific works published in databases such as: PubMed, Scielo and Google Scholar were analyzed. After analyzing the data found in the literature, it was observed that falcipains (cysteine proteases) are of great importance for maintaining the life cycle of *P. falciparum*, especially falcipains 2 and 3. These enzymes act in the invasion of erythrocytes, degradation of hemoglobin, and in the proteolytic development of the parasite. Therefore, the inhibition of these enzymes is a good therapeutic target. We also identified that substances that have Michael acceptors in their structure (as is the case of some Morita Baylis Hillman adducts) are capable of inhibiting cysteine proteases, thus being good candidates for antimalarials.

Keywords: Malaria. *P. falciparum*. resistance. falcipains. Michael acceptors

1 INTRODUÇÃO

Em 2021, aproximadamente 247 milhões de pessoas foram acometidas pela malária, e 619.000 foram a óbito (World Health Organization, 2022). Esta doença é transmitida ao homem através da picada do mosquito fêmea *Anopheles*, quando infectado por espécies do gênero *Plasmodium* que causam a malária humana

tratamento da doença de forma adequada, e consequentemente acarretou uma grande quantidade de mortes (World Health Organization, 2022).

Os sintomas da malária são diversificados, podendo o paciente apresentar: febre, dores de cabeça, dores nas articulações, vômitos, calafrios, e outros. Inicialmente o paciente infectado pode apresentar sintomas que simulem

Anexo D- Submissão de artigo científico relacionado a tese



Cinthia Melo <cinthia.rmmelo@gmail.com>

Confirm co-authorship of submission to Parasitology International

1 mensagem

Parasitology International <em@editorialmanager.com>
Responder a: Parasitology International <support@elsevier.com>
Para: Cinthia Rodrigues Melo <cinthia.rmmelo@gmail.com>

8 de janeiro de 2024 às 16:14

This is an automated message.

Journal: Parasitology International
Title: Study of the Antiplasmodial Activity, Toxicity, and Pharmacokinetic Profiles of N-Methyl-Isatin (CH3ISACN) Derivatives
Corresponding Author: Prof. Valter Ferreira de Andrade Neto
Co-Authors: Cinthia Rodrigues Melo; Caliandra Maria Bezerra Luna Lima; Brenna Marceliane Melo Marcelino; Claudio Gabriel Lima-Júnior; Abrahão Alves Oliveira Filho; Igor Gabriel Silva Ramalho; Kardilândia Mendes Oliveira; Gabriela Tafacla Dias; Giciane Carvalho Vieira; Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
Manuscript Number: **PARINT-D-24-00010**

Dear Cinthia Rodrigues Melo,

The corresponding author Prof. Valter Ferreira de Andrade Neto has listed you as a contributing author of the following submission via Elsevier's online submission system for Parasitology International.

Submission Title: Study of the Antiplasmodial Activity, Toxicity, and Pharmacokinetic Profiles of N-Methyl-Isatin (CH3ISACN) Derivatives

Elsevier asks all authors to verify their co-authorship by confirming agreement to publish this article if it is accepted for publication.

Please read the following statement and confirm your agreement by clicking on this link: [Yes, I am affiliated.](#)

I irrevocably authorize and grant my full consent to the corresponding author of the manuscript to: (1) enter into an exclusive publishing agreement with Elsevier on my behalf (or, if the article is to be published under a CC BY license, a non-exclusive publishing agreement), in the relevant form set out at www.elsevier.com/copyright; and (2) unless I am a US government employee, to transfer my copyright or grant an exclusive license of rights (or for CC BY articles a non-exclusive license of rights) to Elsevier as part of that publishing agreement, effective on acceptance of the article for publication. If the article is a work made for hire, I am authorized to confirm this on behalf of my employer. I agree that the copyright status selected by the corresponding author for the article if it is accepted for publication shall apply and that this agreement is subject to the governing law of the country in which the journal owner is located.

If you did not co-author this submission, please contact the corresponding author directly at vfan.aneto@gmail.com.

Thank you,
Parasitology International