UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

JULIANA OLIVEIRA DE SOUZA

Descoberta de derivados 4-quinolinonas como candidatos para
desenvolvimento de antimaláricos: Caracterização *in vitro*, *ex vivo* e mecanismo de
ação

São Carlos
2019

JULIANA OLIVEIRA DE SOUZA

Descoberta de derivados 4-quinolinonas como candidatos para desenvolvimento de antimaláricos: caracterização *in vitro*, *ex vivo* e mecanismo de ação

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Rafael Victório
Carvalho Guido
Coorientadora: Dr^a. Anna Caroline
Campos Aguiar

Versão Original

São Carlos
2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Souza, Juliana Oliveira de

Descoberta de derivados 4-quinolinonas como candidatos para desenvolvimento de antimaláricos: Caracterização *in vitro*, *ex vivo* e mecanismo de ação / Juliana Oliveira de Souza; orientador Rafael Victório Carvalho Guido; co-orientadora Anna Caroline Campos Aguiar -- São Carlos, 2019.

108 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2019.

1. Malária. 2. 4-Quinolinonas. 3. Inibidor. I. Guido, Rafael Victório Carvalho, orient. II. Aguiar, Anna Caroline Campos, co-orient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliana Oliveira de Souza

Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de Concentração: Física Aplicada - Opção: Física Biomolecular.

Aprovado(a) em: 20/11/2019

Comissão Julgadora

Dr(a). Rafael Victório Carvalho Guido

Instituição: (IFSC/USP)

Dr(a). Marcos Leoni Gazarini Dutra

Instituição: (UNIFESP/Santos)

Dr(a). Rubens Lima do Monte Neto

Instituição: (FIOCRUZ/Belo Horizonte)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Valdir Oliveira de Souza e Heloisa Helena Coelho de Souza, que sempre me apoiaram e me deram todos os instrumentos para seguir os caminhos aos quais minha mente me conduziu.

A meus companheiros de laboratório, malariologistas ou não, pelo apoio sincero dentro e fora do laboratório, e pelos momentos de descontração tão necessários que compartilhamos.

À doutoranda Suzete Maria Almeida e à Prof.^a Dr.^a Arlene Correa, do departamento de Química da UFSCar, pela boa vontade e interesse na colaboração com os compostos testados.

Ao Prof. Dr. Daniel Bargieri, do Instituto de Ciências Biomédicas – USP, pela disponibilidade para colaboração na realização dos ensaios de inibição de conversão a oocineto.

Ao Prof. Dr. Samar Hasnain, da Universidade de Liverpool, pela disponibilização do laboratório e auxílio na realização do ensaio de inibição e testes de cocristalização com o citocromo bc1 bovino.

Ao Dr. Dhélio B. Pereira, do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (Cepem) em Rondônia, pela disponibilização do laboratório e auxílio na realização do ensaio de maturação de esquizontes para avaliação da atividade inibitória contra cepas circulantes de *P. falciparum* e *P. vivax*.

À minha coorientadora, Dra. Anna Carolina Campos Aguiar, que me introduziu a esse campo da malária e me inspirou com seu amor e dedicação à pesquisa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Victorio Carvalho Guido, pela atenção e acolhimento oferecido em seu laboratório desde meu segundo ano de graduação.

Ao Instituto de Física de São Carlos, por proporcionar a infraestrutura e apoio necessários para a realização do curso de mestrado.

Às organizações financiadoras, pela concessão de apoio financeiro essencial para o desenvolvimento da pesquisa aqui apresentada. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Além disso, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (em convênio FAPESP/CAPES), processo nº 2017/26679-0.

“Eu acho que a única maneira de você crescer e evoluir é continuar ouvindo, continuar seguindo em frente, continuar entrando de cabeça e tentando experimentar.”

Dianne Reeves

RESUMO

SOUZA, J. O. de. **Descoberta de derivados 4-quinolinonas como candidatos para desenvolvimento de antimaláricos:** caracterização *in vitro*, *ex vivo* e mecanismo de ação. 2019. 108 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

A malária é uma doença tropical que causa um impacto considerável na saúde e no desenvolvimento socioeconômico das populações afetadas. O surgimento de resistência aos tratamentos atuais requer o rápido desenvolvimento de medicamentos antimaláricos eficazes. Derivados de quinolinona com diferentes substituintes foram relatados na literatura como potentes compostos com atividade antiplasmodial. Neste trabalho, nosso objetivo foi caracterizar uma série de novos derivados de 4-quinolinona, sintetizados em colaboração com a Prof.^a Arlene Correa (UFSCar) e determinar seu potencial como candidatos líderes para o desenvolvimento de novos antimaláricos. Dos 22 compostos testados, encontramos 9 compostos com atividade antiplasmodial promissora (valores de IC₅₀ entre 0,15 e 8 µM). Os compostos ativos demonstraram bom perfil de segurança *in vitro* quando testados quanto à atividade hemolítica e contra células de hepatoma humano (HepG2). Os compostos **4**, **7** e **22** foram os mais promissores, com potência na faixa submicromolar (valores de IC₅₀ de 0,47, 0,21 e 0,15 µM, respectivamente) e baixa citotoxicidade em células HepG2 (IS de >213, >476 e >333, respectivamente). Os três compostos foram testados contra cepas resistentes de *P. falciparum*, e não mostraram resistência cruzada. Em seguida, investigamos a suscetibilidade dos isolados clínicos de *P. falciparum* e *P. vivax* obtidos na Região Amazônica (Porto Velho, RO) contra os inibidores. Os compostos **4** e **7** foram ativos contra *P. falciparum* na faixa submicromolar (IC₅₀: **4**, 0,58 µM; e **7**, 0,49 µM). Os isolados de *P. vivax* apresentaram valores mais altos de IC₅₀ do que aqueles observados em isolados de *P. falciparum* (IC₅₀: **4**, 3,3 µM; e **7**, 1,5 µM). Por meio da avaliação da velocidade e estágio de ação dos compostos, demonstramos que os compostos têm modo de ação lento que afeta principalmente o estágio trofozoíto do parasito. Para avaliar o mecanismo de ação desta série, testamos a atividade inibitória de **4** e **7** contra o citocromo bc1 de *P. falciparum*. Obtivemos valores de IC₅₀ de 7,2 [5,1 - 8,0] µM e 0,5 [0,45 - 0,57 µM] para esses compostos (valores de IS respectivos de 0,92 e >120 em relação ao bc1 bovino). O composto **4** demonstrou também atividade inibitória contra estágios sexuais do parasito, em ensaio de inibição da conversão a oocineto (IC₅₀ = 0,67 [0,59 - 0,75] µM). Ensaios de combinação realizados com antimaláricos convencionais mostraram que os compostos **4** e **7** tiveram perfil de combinação antagônico quando combinados com cicloguanil, perfil aditivo em combinação com artesunato e atovaquona, e demonstraram combinação sinérgica com o proguanil. Nossos resultados indicam que o composto **7** é o derivado 4-quinolinona mais promissor da série, e possui perfil parasitológico adequado para a descoberta de novos candidatos a composto líder para a malária.

Palavras-chave: Malária. 4-Quinolinonas. Inibidor.

ABSTRACT

SOUZA, J. O. de. **Discovery of 4-quinolinone derivatives as candidates for antimalarial development:** *in vitro*, *ex vivo* and mechanism of action characterization. 2019. 108 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

Malaria is a tropical disease that causes a considerable impact on the health and socioeconomical development of affected populations. The development of resistance to current treatments necessitates the rapid development of effective antimalarial drugs. Quinolinone derivatives with different substituents have shown potent antiplasmodial activity in the past. In this work, our goal was to synthesize and characterize a series of new 4-quinolinone derivatives synthesized in collaboration with Prof. Arlene Correa (UFSCar) and determine their potential as lead candidates for the development of new antimalarials. From 22 compounds tested, we found 9 active compounds (IC_{50} values between 0,15 and 8 μM). All active compounds demonstrated good safety profile when tested for hemolytic activity and against HepG2 cells in the MTT assay. Compounds **4**, **7** and **22** were the most promising compounds encountered, with submicromolar potency (IC_{50} values of 0,47, 0,21 and 0,15 μM , respectively) and good tolerability in hepatoma cells (SI of >213, >476 and >667, respectively). The three compounds were assayed against a panel of resistant *P. falciparum* strains, and none showed any indication of cross resistance. We then investigated the susceptibility of *P. falciparum* and *P. vivax* clinical isolates obtained in the Amazon Region (Porto Velho, RO) against the inhibitors. Both compounds were active against *P. falciparum* in the submicromolar range (median IC_{50} : **4**, 0,58 μM ; and **7**, 0,49 μM). *P. vivax* isolates showed higher IC_{50} values than those observed against *P. falciparum* isolates (median IC_{50} : **4**, 3,3 μM ; and **7**, 1,5 μM). Using speed and stage of action evaluation, we demonstrated that these compounds have a slow mode of action that affects mainly the trophozoite stage of life of asexual development of the parasite. To evaluate the mechanism of action underlying this series, we tested the inhibitory activity of **4** and **7** against *P. falciparum* cytochrome bc1. We obtained IC_{50} values of 7,2 [5,1 - 8,0] μM and 0,5 [0,45 - 0,57] μM for these compounds (respective IS values of 0,92 and >120 relative to the bovine bc1). Compound **4** also demonstrated inhibitory activity against sexual parasite stages in the ookinete conversion inhibition assay (IC_{50} = 0,67 [0,59 – 0,75] μM). Combination assays performed with conventional antimalarials showed that compounds **4** and **7** had antagonistic combination profile when combined with cycloguanil, additive profile in combination with artesunate and atovaquone, and demonstrated synergistic combination with proguanil. Our results indicate that compound **7** is the most promising 4-quinolinone derivative of the series, with adequate parasitological profile for the discovery of a candidate for antiplasmodial lead compounds.

Keywords: Malaria. 4-Quinolinones. Inhibitor.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Ranking das dez causas mais frequentes de morte em economias de baixo rendimento e respectivo número de mortes em 2016.....27
- Figura 2 - Distribuição geográfica de países endêmicos para malária em 2000 e 2016. Em vermelho, países com malária endêmica em 2016. Em amarelo, países sem casos de malária em 2016. Em azul, países sem casos registrados por três ou mais anos em 2016. Em verde, países livres de malária desde 2000. Em branco, malária não-endêmica.....28
- Figura 3 - Taxas de incidência (casos por 1000 pessoas em risco) da malária (A) mundialmente e na região africana da OMS e (B) nas outras regiões avaliadas pela OMS. AFR: Região Africana; AMR: Região das Américas; EMR: Região do Leste Mediterrâneo; SEAR: Região do Sudeste Asiático e WPR: Região do Pacífico Oeste.....30
- Figura 4 - Mapa de taxa de incidência de malária por município brasileiro em 2017. Classificações de nível de risco em função do valor de Índice Parasitário Anual (IPA, casos por cada mil habitantes): baixo risco (IPA <10), médio risco (IPA entre 10 e 50) e alto risco (IPA >= 50). 31
- Figura 5 - Ciclo de vida do parasito *Plasmodium* spp. As indicações de tempo do ciclo são específicas para *P. falciparum*. A parte destacada em vermelho se refere aos eventos ocorridos dentro do hospedeiro humano: a infecção iniciada pela introdução de esporozoítos pela picada do mosquito *Anopheles* seguida pela invasão e desenvolvimento dentro de células hepáticas, a liberação de merozoítos no sangue iniciando os ciclos de desenvolvimento assexuado dentro de hemácias do hospedeiro e por fim a transformação de parasitos assexuados na forma sexuada de gametócito. A parte mostrada em azul compreende os estágios de vida sexuais ocorrendo dentro do mosquito, desde a combinação dos gametócitos ingeridos para formar o zigoto até a geração de esporozoítos no intestino do mosquito 32
- Figura 6 - Estruturas químicas de derivados quinolínicos das classes 4-aminoquinolinas (quinina, cloroquina, mefloquina e amodiaquina) e 8-aminoquinolinonas (primaquina e tafenoquina).....35
- Figura 7 - Estruturas químicas de antimaláricos. Na primeira fileira estão mostrados compostos da classe dos antifolatos (sulfadoxina e pirimetamina) e na segunda estão alguns derivados de artemisinina. 36

Figura 8 - Linha do tempo de tratamentos terapêuticos antimaláricos. As faixas amarelas sólidas indicam o tempo de introdução e uso de um antimalárico. O gradiente de amarelo ao final das faixas indica o registro de resistência e demonstra que mesmo depois desse registro, não há uma perda total de utilidade terapêutica do antimalárico. As faixas verdes sólidas indicam períodos de tempo no qual existiam alternativas terapêuticas eficazes, e o gradiente de verde e a linha tracejada vermelha ilustram, respectivamente, a perda dessas terapias com o surgimento de resistência e os períodos de tempo com risco de falha de tratamento causada pela resistência.....	37
Figura 9 - Países com taxa de falha de ACTs em pacientes do sudeste asiático. Legenda mostra a o número de combinações de ACTs falhas em cada região.....	39
Figura 10 - Modo de ação dos inibidores do complexo bc1 em <i>Plasmodium</i> . O citocromo bc1 atua oxidando o ubiquinol (QH ₂) a ubiquinona (Q), repondo o acceptor de elétrons para a ação da enzima diidroorotato desidrogenase (DHODH). O acoplamento da atividade ubiquinol-citocromo c oxidoredutase do citocromo bc1 com a via de biossíntese de pirimidinas é bloqueado pelos inibidores do Citbc1, bloqueando a única via de obtenção de pirimidinas do parasito.....	43
Figura 11 - Estruturas químicas do antimalárico atovaquona e da classe 4-quinolinona.	44
Figura 12 - Esquema de montagem do experimento SYBR Green I para avaliação da atividade antiplasmodial. (A) Esquema de preparação de diluições na placa do ensaio SYBR Green I. (B) Desenho tradicional da placa de experimento, contendo diluições seriadas de 6 compostos em duplicata (azul) e controles negativo (vermelho, hemácias parasitadas) e positivo (amarelo, hemácias não-parasitadas) de inibição.	49
Figura 13 - Esquematisação dos tempos de incubação com inibidores aplicadas no experimento de tempo de ação, no qual foi avaliada a influência do tempo de incubação (24, 48 ou 72h) nos valores de IC ₅₀ resultantes	55
Figura 14 - Esquematisação dos tempos de incubação com inibidores aplicadas no experimento de estágio de ação, no qual foram aplicados períodos de 10h de pressão a cada placa, visando determinar se houve diferença de potência quando focando a pressão de inibidor em cada estágio de vida.....	56

- Figura 15 - Ilustração das regiões de um isoblograma de acordo com o comportamento associado: em verde, sinergismo; em vermelho, antagonismo e em branco, aditividade 57
- Figura 16 - Morfologias observadas durante ensaio de tempo de ação. Os compostos testados foram testados na concentração de 10 vezes o IC_{50} , e a morfologia foi monitorada durante a incubação depois de 0, 10, 20, 30, 48 e 72 horas. Os compostos estão listados no lado esquerdo das respectivas figuras, e os tempos de ação monitorados estão indicados na parte superior da figura. CNT: controle, ATV: atovaquona; ART: artesunato, CQ: cloroquina 69
- Figura 17 - Resultados do estudo quantitativo de tempo de ação. O gráfico mostra os valores de IC_{50} dos compostos 4 e 7 e de antimaláricos controle atovaquona e cloroquina, com variação de tempo de incubação com inibidor (24, 48 e 72 horas). Os resultados mostrados estão normalizados em relação aos respectivos valores de IC_{50} com 72 horas de incubação. Análise de significância estatística foi realizada por ANOVA. Valores de $p < 0,05$ indicam diferenças significativas. Código de significância estatística: ***: $p < 0,001$. ATV: Atovaquona e CQ: cloroquina 71
- Figura 18 - Resultados do estudo de estágio de ação. O gráfico mostra os valores de IC_{50} dos compostos 4 e 7 e de antimaláricos controle atovaquona e cloroquina, com variação do estágio do parasito no qual foi induzida pressão. Os resultados foram normalizados em relação aos respectivos valores de IC_{50} da forma de trofozoíto. Análise de significância estatística foi realizada por ANOVA. Valores de $p < 0,05$ indicam diferenças significativas. Código de significância estatística: ns: não significativo, *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ e ****: $p < 0,0001$. ATV: Atovaquona e CQ: cloroquina 72
- Figura 19 - Distribuição dos valores de IC_{50} no ensaio SMT contra cepas circulantes de *P. vivax* (tempo médio de incubação ~30h) e *P. falciparum* (tempo médio de incubação ~45h). Os p-valores do teste estatístico de Mann-Whitney entre as amostras de *P. vivax* e *P. falciparum* estão indicados na parte superior do gráfico 74
- Figura 20 - Isoblogramas e isóbolos aditivas calculadas para as associações do antimalárico artesunato com os compostos 4 (esquerda) e 7 (direita). FIC_{50} : IC_{50} fracional; ART: artesunato 76
- Figura 21 - Isoblogramas e isóbolos aditivas calculadas para as associações do antimalárico atovaquona com os compostos 4 (esquerda) e 7 (direita). FIC_{50} : IC_{50} fracional; ATV: atovaquona 77

- Figura 22 - Isobologramas e isóbulas aditivas calculadas para as associações do antimalárico cicloguanil com os compostos **4** (esquerda) e **7** (direita). FIC₅₀: IC₅₀ fracional; CG: cicloguanil 77
- Figura 23 - Isobologramas e isóbulas aditivas calculadas para as associações do antimalárico proguanil com os compostos **4** (esquerda) e **7** (direita). FIC₅₀: IC₅₀ fracional; PG: proguanil..... 78
- Figura 24 - Curvas de inibição em concentração única (2 µM) no ensaio enzimático do citocromo bc1 de *P. falciparum*. A atividade enzimática foi monitorada em através da redução do citocromo c, dada pela diferença de absorbância entre 542 e 550 nm em função do tempo de monitoramento. Os controles negativo (DMSO 0,01%) e positivo (1 µM atovaquona) de inibição estão mostrados em verde e azul, respectivamente. 79
- Figura 25 - Curva de inibição de formação de oocineto do composto **7**. O eixo de concentração no gráfico está na escala log, e o valor de IC₅₀ resultante do composto está denotado no gráfico com seu respectivo intervalo de confiança de 95% entre colchetes 81
- Figura 26 - Distribuição das potências inibitórias do conjunto de 4-quinolinonas. (A) Número de compostos do conjunto em cada faixa de pIC₅₀. (B) Gráfico identidade dos valores de pIC₅₀ dos compostos, demonstrando a distribuição desigual de potências 83
- Figura 27 - Mapa de similaridade estrutural dos compostos 4-quinolinonas gerado pelo software SYBYL. As moléculas são distribuídas no espaço 2D do mapa de acordo com sua similaridade estrutural. Os valores de pIC₅₀ das moléculas são caracterizadas de acordo com gradientes de cor (pIC₅₀ crescente seguindo o gradiente de azul a vermelho) e de tamanho do círculo representado no mapa (tamanho crescente com potência do composto). As elipses vermelhas indicam os grupos (5 *clusters*) selecionado para determinação de representatividade estrutural dos conjuntos..... 84
- Figura 28 - Gráficos de representatividade do conjunto total de dados e dos subconjuntos de treinamento e teste escolhidos. A alocação dos compostos para esses dois conjuntos foi feita de modo a maximizar a representatividade estrutural e de faixas de atividade nos dois subconjuntos em relação ao conjunto total..... 85
- Figura 29 - Gráficos representando a distribuição dos valores de pIC₅₀ experimentais e preditos. Os pontos em vermelho representam os compostos do subconjunto teste, e os pontos em preto os compostos do subconjunto treinamento. Os valores de r^2_{pred} para cada modelo final obtido estão mostrados em cada um dos gráficos.... 89

Figura 30 - Gráficos representando a distribuição dos valores de pIC_{50} experimentais e preditos após remoção do composto **18** do conjunto teste. Os pontos em vermelho representam os compostos do subconjunto teste, e os pontos em preto os compostos do subconjunto treinamento. Os valores de r^2_{pred} para cada modelo estão mostrados em cada um dos gráficos 90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Avaliação da atividade antiplasmodial dos derivados 4-quinolinonas e antimaláricos controle contra <i>P. falciparum</i> , cepa 3D7	61
Tabela 2 - Valores de IC ₅₀ e índices de seletividade (IS) dos compostos mais potentes da série contra as cepas 3D7 (sensível), K1 (resistente aos antimaláricos cloroquina, cicloguanil, pirimetamina), IPC4912 (resistência parcial a artemisinina) e TM90C6B (resistência a inibidores do complexo bc1). O antimalárico artesunato foi testado contra as três cepas em todos os experimentos como controle positivo de inibição do experimento	66
Tabela 3 - Avaliação da citotoxicidade das quinolinonas em células de hepatoma humano (linhagem HepG2) e valores de índice de seletividade (IS) dos compostos da série	67
Tabela 4 - Avaliação da potência inibitória <i>ex vivo</i> dos compostos 4-quinolinonas contra isolados circulantes de <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> no ensaio de maturação de esquizontes (SMT).....	74
Tabela 5 - Valores de IC ₅₀ e índices de seletividade (IS) dos ensaios de inibição enzimática do citocromo bc1 bovino e de <i>P. falciparum</i>	80
Tabela 6 - Parâmetros de validação interna dos modelos iniciais de HQSAR gerados para os derivados de 4-quinolinonas	86
Tabela 7 - Investigação dos parâmetros de validação resultantes de modelos HQSAR gerados por variação de tamanhos de fragmentos estruturais. Os modelos selecionados para otimização adicional estão destacados em azul.	87
Tabela 8 - Variação dos parâmetros de validação durante na investigação do número de componentes do modelo. Os modelos selecionados para otimização estão destacados em azul	88
Tabela 9 - Variação dos parâmetros de validação durante na investigação do número de componentes do modelo. Os modelos selecionados para otimização estão destacados em azul.	88
Tabela 10 -Perfis alvo produto (TPPs) e perfis alvo candidato (TCPs) delineados pelo MMV para o desenvolvimento de novas terapias antimaláricas.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	Átomos
ACT	<i>Artemisinin-based combination therapy</i>
B	Ligações
C	Conectividade
Ch	Quiralidade
CI	Índice de combinação
CSP	Proteína circunsporozoíta
DA	Doadores/aceptores de ligação de hidrogênio
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
FIC ₅₀	Concentração inibitória média fracional
GTS	<i>Global Technical Strategy for Malaria 2016-2030</i>
H	Hidrogênios
HL	Comprimento do holograma
HQSAR	Relação quantitativa estrutura-atividade baseada em holograma
IC ₅₀	Concentração inibitória média
IC95%	Intervalo de confiança de 95%
IS	Índice de seletividade
IR	Índice de seletividade
ITN	<i>Insecticide-treated net</i>
m/v	Massa/volume
MMV	<i>Medicines for Malaria Venture</i>
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDP	<i>Product Development Partnership</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
pIC ₅₀	$-\log(\text{IC}_{50})$
PPP	Parceria público-privada
q ²	Coeficiente de correlação da validação cruzada

QSAR	Relação quantitativa estrutura-atividade
r^2	Coeficiente de correlação
SEE	Erro padrão de correlação
SMT	<i>Schizont maturation test</i>
TCP	<i>Target-candidate profile</i>
TPP	<i>Target-product profile</i>
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	Etiologia, história e contexto global da malária	27
1.2	Ciclo de vida de parasitos <i>Plasmodium</i> spp.	32
1.3	História e exemplos de classes de antimaláricos	34
1.4	O surgimento de resistência e o estabelecimento das ACTs	36
1.5	Desafios atuais.....	39
1.6	Parcerias público-privadas e estratégias no combate da malária	40
1.7	Inibidores do citocromo bc1 (complexo III).....	41
2	OBJETIVOS	45
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3.1	Obtenção dos compostos 4-quinolinonas e das cepas de cultivo para avaliação de atividade antiplasmodial	47
3.2	Avaliação antiplasmodial dos compostos <i>in vitro</i>	47
3.2.1	Cultivo de <i>P. falciparum</i> <i>in vitro</i>	47
3.2.2	Ensaio de inibição SYBR <i>green</i> I contra forma assexuada de <i>P. falciparum</i>	47
3.3	Avaliação da toxicidade.....	50
3.3.1	Cultivo da linhagem celular HepG2.....	50
3.3.2	Ensaio MTT de citotoxicidade e determinação do IC ₅₀ ^{HepG2}	50
3.3.3	Cálculo do índice de seletividade (IS).....	51
3.3.4	Ensaio de hemólise.....	52
3.4	Ensaio <i>ex vivo</i> de maturação de esquizonte	52
3.5	Estudo do tempo de ação de inibidores	54
3.5.1	Efeitos dos inibidores na morfologia do parasito	54
3.5.2	Quantificação do tempo de ação	54
3.6	Avaliação do estágio de ação dos inibidores	55

3.7	Ensaio de combinação com antimaláricos convencionais	56
3.8	Ensaio enzimático da atividade ubiquinol-citocromo c oxidoreductase do citocromo bc1.....	57
3.9	Ensaio de inibição da formação de oocinetos.....	58
3.10	HQSAR	59
4	RESULTADOS.....	61
4.1	Potência antiplasmodial dos compostos em ensaio fenotípico de inibição de crescimento.....	61
4.2	Caracterização do perfil citotóxico de compostos ativos	66
4.3	Estudo do tempo de ação dos inibidores 4-quinolinonas.....	68
4.4	Estudo do estágio de ação	72
4.5	Ensaio <i>ex vivo</i> de maturação de esquizontes (SMT)	73
4.6	Ensaio de combinação com antimaláricos convencionais	75
4.7	Ensaio enzimático de inibição do citocromo bc1	78
4.8	Ensaio de inibição da formação de oocinetos.....	81
4.9	HQSAR	82
5	DISCUSSÃO.....	91
6	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	97
	REFERÊNCIAS	99

1 INTRODUÇÃO

1.1 Etiologia, história e contexto global da malária

A malária é uma das doenças com maior impacto na saúde global, ocupando o primeiro lugar na lista entre doenças parasitárias e o sétimo lugar dentre as maiores causadoras de morte em países de baixo rendimento (Figura 1).¹ Em 2017, foi reportada transmissão ativa da doença em 87 países em regiões tropicais e subtropicais do mundo, incluindo a África Subsaariana, América Latina e o Sudeste Asiático. Com esse alcance, a malária foi responsável por 219 milhões de casos e 435 mil mortes no ano de 2017 (Figura 2). O continente Africano é responsável por mais de 90% dos casos e mortes pela doença registrados em 2017.² A doença possui maior taxa de mortalidade principalmente em mulheres grávidas, pacientes imunocomprometidos e crianças abaixo de 5 anos de idade.^{3, 4} Esse último grupo é particularmente vulnerável (61% das mortes por malária atingem essa fatia da população) devido ao sistema imunológico não ter sido totalmente desenvolvido.^{2, 4}

Figura 1 - Ranking das dez causas mais frequentes de morte em economias de baixo rendimento e respectivo número de mortes em 2016.

Fonte: Adaptada de WORLD HEALTH ORGANIZATION.¹

Figura 2 - Distribuição geográfica de países endêmicos para malária em 2000 e 2016. Em vermelho, países com malária endêmica em 2016. Em amarelo, países sem casos de malária em 2016. Em azul, países sem casos registrados por três ou mais anos em 2016. Em verde, países livres de malária desde 2000. Em branco, malária não-endêmica.

Fonte: Adaptada de WORLD HEALTH ORGANIZATION.⁵

A malária possui uma longa história com a humanidade. Relatos antigos sugerem que infecções maláricas estavam presentes na antiga Mesopotâmia, e métodos atuais permitiram identificar antígenos da malária em restos egípcios datados entre 3200 e 1304 AC.⁶ Sua manifestação clínica de febres cíclicas, anemia, dores musculares, entre outros sintomas, foi associada a muitas razões ao longo dos anos (tais como a personificação da malária como um demônio ou os chamados ‘maus-ares’ advindos de pântanos da Itália, que acredita-se terem dado nome a essa doença).⁷⁻⁸ Foi só a partir do século XIX, no entanto, que se iniciou a conexão da malária com suas raízes etiológicas. O parasito plasmódio foi observado e estudado em 1880 por Charles Laveran no sangue de soldados febris,⁸ e a transmissão da doença foi relacionada a mosquitos por cientistas italianos entre 1898 e 1900.⁹

Apesar de todo o conhecimento compilado desde então acerca das bases celulares e moleculares da malária, a doença ainda evade erradicação. Um fator agravador da doença é seu impacto socioeconômico em comunidades atingidas. Acredita-se que a malária cause uma perda de até 1,3% do Produto Interno Bruto (PIB) de países com altos níveis de transmissão,¹⁰ devido a perdas de produtividade e absenteísmo de trabalhadores, aumento no número de visitas a hospitais e

consequentemente aumento dos gastos na saúde.¹¹ Esse efeito dificulta o desenvolvimento e crescimento econômico de populações acometidas pela doença, além da carga de mortalidade gerada, concentrada principalmente na região africana (93% das mortes pela doença em 2017).²

A malária é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* spp. e seu vetor de transmissão é a fêmea do mosquito *Anopheles* spp. Existem cinco espécies de plasmódio causadores da malária humana: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. Nos últimos anos, algumas publicações têm estudado o *P. ovale* em suas duas subespécies: *P. ovale waliikeri* e *P. ovale curtisi*. Estas são morfologicamente iguais entre si, porém são geneticamente divergentes.¹²

O *P. falciparum* é a espécie causadora da forma mais grave da malária, responsável pela maioria das mortes da doença. Essa espécie causa 99,7% dos casos de malária na região africana, e é responsável pelo maior número de casos registrados mundialmente entre as cinco espécies.² Um agravante da malária causada por *P. falciparum* é o potencial para desenvolvimento de malária cerebral, uma manifestação clínica que envolve sintomas neurológicos como convulsões e coma.¹³ O *P. vivax*, por outro lado, possui uma maior distribuição mundial, e apesar de apresentar um quadro sintomático mais brando, também é capaz de causar malária grave.^{14, 15} Essa espécie é a mais prevalente na região das Américas.²

De 2010 a 2015, a taxa de incidência mundial da malária caiu em 21% e sua mortalidade em 29%.¹⁶ As medidas de controle da doença mais importantes para esse período de queda incluem a rapidez em diagnóstico e tratamento, bem como o uso de ITNs (redes tratadas com inseticidas) para proteção contra o vetor de transmissão e, a conscientização da população moradora de áreas de risco quanto a medidas de prevenção e tratamento contra malária.^{3,17-18}

No entanto, entre os anos de 2015 e 2017 não foi constatado progresso significativo no combate à malária, sendo que a taxa de incidência mundial tem se mantido estável em 59 casos a cada 1000 pessoas em risco durante todo esse período.² Além disso, algumas regiões demonstraram um regresso no controle da doença em 2017 quando comparado ao ano anterior, com o registro de aumento no número de casos nos 10 países com maior incidência de malária do mundo. Entre as regiões monitoradas pela OMS, somente o Sudeste Asiático demonstrou queda na taxa de incidência entre 2016 e 2017.² Em todas as outras, não houve queda significativa (como na região Africana) ou foi contabilizado um aumento no número

de casos (como ocorrido na Região das Américas) (Figura 3). Desde 2015, a região das Américas tem reportado o maior aumento na taxa de incidência entre as regiões da OMS, resultado atribuído principalmente ao Brasil, Venezuela e Nicarágua.^{2,19}

Esse quadro é preocupante, pois deixa claro que os esforços investidos até o momento precisam ser reforçados para combater essa situação de platô atingida no combate à malária. Essa situação compromete os progressos alcançados nos últimos anos; e o regresso observado em algumas regiões enfatiza a importância de investimentos consistentes e esforços de pesquisa contra a doença.²⁰ Sistemas efetivos de monitoramento de casos e mortes, implantação de programas de controle planejados de acordo com características locais, investimentos em pesquisa e métodos de proteção de populações são algumas medidas essenciais nesse quadro.²¹⁻²²

Figura 3 - Taxas de incidência (casos por 1000 pessoas em risco) da malária (A) mundialmente e na região africana da OMS e (B) nas outras regiões avaliadas pela OMS. AFR: Região Africana; AMR: Região das Américas; EMR: Região do Leste Mediterrâneo; SEAR: Região do Sudeste Asiático e WPR: Região do Pacífico Oeste.

Fonte: Adaptada de Organização Mundial da Saúde.²

No Brasil, 99,5% dos casos de malária estão concentrados na região da Bacia Amazônica (Figura 4), na qual ocorre transmissão autóctone.²³ Nosso País é responsável por 22% dos casos de malária da região das Américas, atrás somente da Venezuela (com 53% dos casos da região). De 2016 a 2018 houve um aumento de 47% no número de casos registrados, com cerca de 190 mil casos nesse último ano.^{2,24} Na região Extra-Amazônica, grande parte dos casos registrados são considerados importados de regiões com transmissão autóctone, e o diagnóstico e tratamento precoces são mais difíceis por causa da raridade de casos de malária na região e despreparo para a pronta identificação da doença.²⁵⁻²⁶ Dessa forma, um dos grandes desafios do Brasil no âmbito do combate à malária é a melhor estruturação dos sistemas locais de vigilância e tratamento, de forma a diagnosticar e disponibilizar medidas rápidas de contenção visando-se a redução da taxa de incidência.²⁷

Figura 4 - Mapa de taxa de incidência de malária por município brasileiro em 2017. Classificações de nível de risco em função do valor de Índice Parasitário Anual (IPA, casos por cada mil habitantes): baixo risco (IPA <10), médio risco (IPA entre 10 e 50) e alto risco (IPA >= 50).

Fonte: Adaptada de PAHO/OMS.²⁸

1.2 Ciclo de vida de parasitos *Plasmodium* spp.

Os parasitos do gênero *Plasmodium* spp. causadores da malária humana possuem um ciclo de vida complexo, composto por uma etapa sexuada (esporogonia, desenvolvida dentro do mosquito anofelino fêmea) e uma etapa assexuada (fase do desenvolvimento observada em seres humanos infectados) (Figura 5).

Figura 5 - Ciclo de vida do parasito *Plasmodium* spp. As indicações de tempo do ciclo são específicas para *P. falciparum*. A parte destacada em vermelho se refere aos eventos ocorridos dentro do hospedeiro humano: a infecção iniciada pela introdução de esporozoítos pela picada do mosquito Anopheles seguida pela invasão e desenvolvimento dentro de células hepáticas, a liberação de merozoítos no sangue iniciando os ciclos de desenvolvimento assexuado dentro de hemácias do hospedeiro e por fim a transformação de parasitos assexuados na forma sexuada de gametócito. A parte mostrada em azul compreende os estágios de vida sexuada ocorrendo dentro do mosquito, desde a combinação dos gametócitos ingeridos para formar o zigoto até a geração de esporozoítos no intestino do mosquito.

Fonte: Adaptada de DELVES et al.²⁹

A fase sexuada de vida do parasito se inicia quando um mosquito anofelino fêmea ingere o sangue de um ser humano infectado, o qual possui em circulação

formas sexuais denominadas gametócitos femininos e masculinos. Após ingestão pelo mosquito e chegada em seu intestino, os gametócitos se libertam das hemácias e passam pelo processo de gametogênese, no qual são formados o microgameta (gameta masculino) e o macrogameta (gameta feminino). Os microgametas fertilizam os macrogametas formando zigotos, os quais se diferenciam nas formas móveis de oocinetos. Estes penetram a parede intestinal do mosquito e formam a estrutura chamada oocisto, dentro da qual o oocineto se multiplica para formar milhares de esporozoítos.³⁰⁻³¹ Esse processo é denominado esporogonia, e após sua conclusão o oocisto se rompe liberando milhares de esporozoítos. Algumas centenas de esporozoítos conseguem migrar até as glândulas salivárias do mosquito, onde permanecem até a próxima alimentação do anofelino, a qual marca o início do ciclo de vida do parasito em um hospedeiro humano.³⁰

A infecção no ser humano começa quando ocorre a picada de uma fêmea anofelina infectada, injetando cerca de 8-10 esporozoítos sob a pele do hospedeiro.³² Estes migram dentro dos tecidos do hospedeiro em direção aos vasos sanguíneos.³³ Cerca de 15 minutos após a picada, os esporozoítos atingem a circulação sanguínea do hospedeiro, onde circulam por cerca de 30 minutos antes de atingirem o fígado.³² Estes interagem com a superfície de células hepáticas permitindo sua invasão. Dentro de hepatócitos, os esporozoítos se multiplicam assexuadamente por um período de 5 a 25 dias em média, formando esquizontes hepáticos.^{32,34} Estes podem conter de 10 mil a 40 mil parasitos, os quais são liberados quando a célula hepática se rompe.³⁵ Merozoítos livres no meio extracelular são facilmente fagocitados pelo organismo do hospedeiro.³⁶ Dessa forma, um mecanismo necessário para garantir a chegada dos merozoítos liberados até a corrente sanguínea é a formação de merossomos, membranas que envolvem conjuntos de merozoítos hepáticos e permitem sua chegada aos capilares sinusóides hepáticos. Os merossomos criados pelo parasito protegem os merozoítos pois não expõem resíduos de fosfatidilserina para o meio extracelular, o que seria uma sinalização para fagocitose.³⁷ Consequentemente, o parasito consegue se esquivar do sistema de defesa do hospedeiro humano, o que facilita a entrada dos merozoítos na corrente sanguínea.³⁸ Então, os merozoítos liberados invadem eritrócitos em circulação, dentro dos quais eles se alimentam da hemoglobina presente para obter energia para seu desenvolvimento.³⁹ Quando dentro dessas hemácias, o parasito assume a forma imatura chamada de anel (ou trofozoíto jovem),

e inicia o chamado ciclo eritrocítico, no qual ele sucessivamente se transforma em um trofozoíto maduro, seguido por um esquizonte (forma multinucleada contendo 8 a 32 novos parasitos).³⁵ Por fim, a hemácia é rompida liberando os merozoítos que podem seguir para invadir novas hemácias⁴⁰⁻⁴² ou se diferenciar em gametócitos femininos ou masculinos,⁴³⁻⁴⁴ fechando o ciclo de transmissão da doença. O ciclo eritrocítico possui uma duração que varia de acordo com a espécie do plasmódio envolvida, sendo em torno de 48 horas para o *P. falciparum*, por exemplo.^{41,45} O ciclo eritrocítico é o responsável pelos sintomas da malária, sendo que os ciclos de ruptura das hemácias com liberação dos merozoítos estão associados aos períodos de febre periódicos causadas pela doença. Dessa forma, esse ciclo é o principal alvo explorado por antimaláricos em uso atualmente.⁴⁶

Um acontecimento no ciclo de vida específico às espécies *P. vivax* e *P. ovale* é a existência de formas dormentes dentro de células hepáticas, chamadas de hipnozoítos. Essas formas podem permanecer despercebidas mesmo após eliminação do parasito circulante, e ser reativadas após meses ou até anos, iniciando uma nova infecção ativa e causando uma recaída no paciente.^{45,47}

1.3 História e exemplos de classes de antimaláricos

Como mencionado, a malária tem sido uma ameaça constante desde tempos antigos da humanidade, e a convivência com essa doença impulsionou a busca de tratamentos para os males causados desde muito cedo, com base primeiramente nos produtos naturais.^{7,48}

O mais antigo exemplo é o uso da casca da planta cinchona para tratamento das febres malarias pelos índios peruanos. A quinina, princípio ativo extraído da cinchona, foi isolado pela primeira vez em 1820 por Pelletier e Caventou, e desse composto teve origem a classe de antimaláricos dos derivados quinolínicos (Figura 6).⁴⁹⁻⁵⁰ A cloroquina é um composto dessa série que causou um enorme impacto em termos de tratamento antimalárico.⁵¹⁻⁵² Esta foi, junto com o inseticida DDT, a principal arma no esforço para a erradicação da malária após a Segunda Guerra Mundial,^{49,52} e permanece em uso até os dias de hoje, em casos de malária não-complicada por *P. vivax*.⁵³ Esse composto da classe das 4-aminoquinolinas é o

antimalárico mais popular devido à sua ação rápida e muito potente contra o parasito, além de apresentar um custo de produção bastante baixo.^{7, 54}

Figura 6 - Estruturas químicas de derivados quinolínicos das classes 4-aminoquinolinas (quinina, cloroquina, mefloquina e amodiaquina) e 8-aminoquinolinonas (primaquina e tafenoquina).
Fonte: Elaborada pela autora.

Entre outros compostos quinolínicos usados para a quimioterapia da malária estão a mefloquina, amodiaquina e primaquina.⁴⁹ Os derivados 8-aminoquinolinonas como a primaquina e pamaquina, em particular, são de especial interesse farmacológico por possuírem atividade contra os estágios de hipnozoíto e gametócito, prevenindo recaídas e bloqueando a transmissão da doença.⁵⁵⁻⁵⁶ A tafenoquina, outro derivado 8-aminoquinolina, foi aprovada em 2018 para a cura radical em casos de malária vivax, por meio da eliminação de hipnozoítos.⁵⁷⁻⁵⁸ Essa aprovação é muito promissora porque enquanto a primaquina requer um tratamento quimioterápico de 7 à 14 dias, o que reduz a adesão ao tratamento por parte do paciente e, conseqüentemente, dificulta a eliminação de recaídas, a tafenoquina é administrada como uma cura radical de dose única.⁵⁹⁻⁶¹

Além dos derivados quinolínicos, outras classes químicas também são utilizadas na quimioterapia contra a malária. Esses compostos antimaláricos possuem diversos alvos no metabolismo do parasito. A cloroquina, por exemplo, atua impedindo a biocristalização do heme da hemácia em hemozoína, o que permite o parasito sobreviver sem a ação tóxica que ele sofreria do grupo heme

livre.⁶² Já os fármacos da classe dos antifolatos, como a sulfadoxina e pirimetamina, agem bloqueando a via de biossíntese dos folatos. Os endoperóxidos, por sua vez, não possuem um mecanismo de ação completamente elucidado, mas acredita-se que seu mecanismo de ação é mediado pela liberação de espécies reativas de oxigênio gerados pela clivagem da ponte endoperóxido presente nas moléculas dessa classe química (Figura 7), causando danos no material genético e proteínas do parasito, e levando à sua morte.⁶³⁻⁶⁴ Essa última classe inclui a artemisinina e seus derivados, como o artesunato e o arteméter.⁶²

Figura 7 - Estruturas químicas de antimaláricos. Na primeira fileira estão mostrados compostos da classe dos antifolatos (sulfadoxina e pirimetamina) e na segunda estão alguns derivados de artemisinina.
 Fonte: Elaborada pela autora.

1.4 O surgimento de resistência e o estabelecimento das ACTs

A utilização de todos esses diferentes medicamentos se deu em grande parte por causa do surgimento de resistência aos tratamentos em uso ao longo dos anos, o que representa um dos maiores desafios na quimioterapia da malária. O surgimento e disseminação de parasitos resistentes a um ou mais dos antimaláricos disponíveis ameaçam a nossa capacidade de tratar de forma eficaz a doença. A região do Sudeste Asiático, particularmente, tem um histórico de abrigar os primeiros focos de resistência a antimaláricos.⁶⁵⁻⁶⁶ Essa região engloba o Cambódia, Mianmar,

Tailândia, Vietnã e o sudeste da China, e foi nela que foram os registrados os primeiros casos de resistência à cloroquina no final da década de 1950, e posteriormente casos de resistência a sulfadoxina-pirimetamina e mefloquina na década de 1990.^{65,67} A baixa taxa de transmissão de malária, existência de populações isoladas atingidas pela doença e a comercialização de medicamentos falsos com doses subterapêuticas dos princípios-ativos contribuem para esse quadro.⁶⁸⁻⁶⁹ Uma linha do tempo da utilização de antimaláricos e surgimento de resistência está ilustrada na Figura 8.

Figura 8 - Linha do tempo de tratamentos terapêuticos antimaláricos. As faixas amarelas sólidas indicam o tempo de introdução e uso de um antimalárico. O gradiente de amarelo ao final das faixas indica o registro de resistência e demonstra que mesmo depois desse registro, não há uma perda total de utilidade terapêutica do antimalárico. As faixas verdes sólidas indicam períodos de tempo no qual existiam alternativas terapêuticas eficazes, e o gradiente de verde e a linha tracejada vermelha ilustram, respectivamente, a perda dessas terapias com o surgimento de resistência e os períodos de tempo com risco de falha de tratamento causada pela resistência.

Fonte: Adaptada de MCCLURE; DAY.⁷⁰

Nesse contexto, os derivados de artemisinina constituem uma classe particularmente importante. A artemisinina foi a primeira molécula da classe a ser explorada, a partir de seu isolamento na década de 1970 da planta chinesa *Artemisia annua*,⁷¹⁻⁷² e toda a classe de antimaláricos dela advindos tem um papel central no tratamento da malária atualmente, na forma das terapias de combinação com derivados de artemisinina (*artemisinin-based combination therapy*, ou ACT). As ACTs foram recomendadas pela OMS como o tratamento padrão de malária falciparum e malária causada por *P. vivax* resistente a cloroquina.^{69,73} Esse modelo de tratamento substituiu muitas monoterapias utilizadas contra *P. falciparum* que já demonstravam falha de tratamento devido à resistência, e se baseia no uso combinado de dois compostos com atividade antimalárica com mecanismos de ação diferentes para reduzir a chance de desenvolvimento de resistência a qualquer um dos dois compostos.⁷⁴ O derivado de artemisinina possui alta potência contra o

parasito (potência inibitória na escala de baixo nanomolar), ação antimalárica muito rápida e tempo de meia-vida curto depois de administrado. As ACTs se utilizam dessa característica complementando a ação do derivado de artemisinina com um fármaco de meia-vida mais longa e mecanismo de ação diferente, de forma a eliminar a parasitemia remanescente na corrente sanguínea do paciente.⁷⁴⁻⁷⁵ Algumas ACTs aprovadas para uso incluem: arteméter com lumefantrina, artesunato com amodiaquina, mefloquina, ou sulfadoxina-pirimetamina, e diidroartemisinina com piperaquina.^{69,76}

No entanto, nos últimos anos foram registrados casos de resistência parcial a um ou mais componentes da ACT em cinco países no Sudeste Asiático: Camboja, Mianmar, República Popular de Laos, Tailândia e Vietnã (Figura 9).^{2,66} A resistência parcial se caracteriza por um atraso no período necessário para o *clearance* do parasito da corrente sanguínea.³⁴ O número de ACTs com falha de tratamento em cada um desses países está mostrado na Figura 7. O papel das ACTs como primeira linha de defesa contra o *P. falciparum* torna essa situação alarmante, pois coloca em risco o principal recurso em quimioterapia contra o parasito, especialmente considerando-se o grave quadro sintomático causado pelo *P. falciparum*.

Figura 9 - Países com taxa de falha de ACTs em pacientes do sudeste asiático. Legenda mostra o número de combinações de ACTs falhas em cada região.
 Fonte: Adaptada de WORLD HEALTH ORGANIZATION.²

Dadas essas circunstâncias, fica clara a urgência do desenvolvimento de novos candidatos a antimaláricos efetivos para oferecer alternativas terapêuticas e resguardar os avanços alcançados nas últimas décadas.

1.5 Desafios atuais

No ano de 2015, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu a Estratégia Técnica Global para Malária 2016-2030 (*Global Technical Strategy for Malaria*, ou GTS).⁷⁷ Esse documento estabeleceu uma estrutura de trabalho para países endêmicos, de forma a guiar os programas locais de controle e eliminação de malária. Nesse sentido, foram delineados os objetivos a serem atingidos até 2030 na luta contra a malária, entre eles citam-se: a redução da incidência e taxa de mortalidade de malária em pelo menos 90%, a eliminação da malária em pelo

menos 35 países e a prevenção de ressurgência de malária em países nos quais a doença foi eliminada.⁷⁷⁻⁷⁸

Tais objetivos foram considerados possíveis, apesar de ambiciosos, e necessários para a eliminação mundial da doença. No entanto, entre os anos de 2015 e 2017 foi observada uma estagnação do progresso mundial contra a malária, sem grandes reduções na incidência da doença na maioria das regiões estudadas pela OMS. Essa é uma tendência perigosa que indica a insuficiência das políticas locais e globais de combate à malária e dos investimentos destinados à causa. Estima-se que o valor de investimento precisa atingir pelo menos US\$ 6,4 bilhões por ano até 2020 para que seja possível alcançar os objetivos da GTS, sendo que em 2017 o valor estimado dos investimentos globais foi de US\$ 3,1 bilhões.⁷⁷⁻⁷⁹ Portanto, os recursos destinados à pesquisa e às medidas de combate à malária (como a distribuição de telas mosquiteiras tratadas com inseticidas para proteção em zonas endêmicas) ainda estão abaixo do ideal.^{26,80}

Além disso, o combate do surgimento e disseminação de parasitos resistentes aos fármacos atuais requer estratégias específicas de tratamento e monitoramento cuidadoso da administração de antimaláricos em zonas endêmicas. Nesse contexto, já foram reportados casos de resistências adquirida dos vetores de transmissão a inseticidas das quatro principais classes utilizadas atualmente para a sua eliminação.⁸²⁻⁸³ Essas incluem os piretróides, organoclorinas, carbamatos e organofosfatos, classes utilizadas para a confecção de ITNs e pulverização domiciliar em zonas endêmicas.⁸²⁻⁸⁴ O monitoramento da resistência a inseticidas tem se tornado uma prioridade, visto o risco que essa situação apresenta às estratégias de controle de vetor.^{41,85}

Portanto, a forma de estudar e combater a malária tem evoluído constantemente para atender as demandas necessárias para a erradicação da malária.

1.6 Parcerias público-privadas e estratégias no combate da malária

Nas últimas duas décadas o cenário de combate da malária vem se diversificando, passando a incluir de forma essencial investimentos de organizações não-governamentais e algumas parcerias público-privadas (PPP), como forma a

apoiar os governos locais e coordenar esforços de pesquisadores mundialmente.^{86, 87, 88, 89}

As PPPs são definidas como parcerias estabelecidas entre, pelo menos, uma organização pública ou organização sem fins lucrativos e uma organização com fins lucrativos.⁹⁰ Os objetivos das PPPs focadas na área da saúde devem incluir o aumento da cobertura e qualidade do tratamento de saúde dado por servidores e o controle de custos excessivos de saúde para os usuários.⁹⁰⁻⁹¹ Esse último objetivo é particularmente crucial no caso de doenças tropicais como a malária, para a qual o custo de um tratamento medicamentoso básico para um paciente deve ser, aproximadamente, US\$ 1,00 para ser viável para uso em larga escala.⁹²

As PPPs têm facilitado a aplicação de recursos e conhecimento adicionais para a pesquisa de malária.⁹⁰⁻⁹¹ Existem cada vez mais exemplos de PPPs aplicadas em níveis local ou global com resultados satisfatórios.^{89,93-94} Um dos maiores exemplos atuais no campo da malária é a parceria para desenvolvimento de produtos (PDP) *Medicines for Malaria Venture* (MMV), iniciada em 1998, e que atualmente coordena mais de 65 projetos no desenvolvimento de fármacos antimaláricos.^{88,95} A linha de desenvolvimento dessa PDP possui em 2019 nove fármacos em desenvolvimento clínico para a malária, incluindo projetos para tratamento de malária infantil, em mulheres grávidas e medicamentos anti-relapso. Esses projetos são desenvolvidos em conjunto com dezenas de parceiros, como as empresas farmacêuticas Takeda, GSK, Sanofi e Novartis;^{88,94,96} bem como parceiros na área acadêmica como o *Drug Discovery Unit* (DDU) em Dundee (Escócia), a Universidade de Sydney (Austrália), o Instituto de Química (IQ) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), em Campinas, e o Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo (USP), em São Carlos.⁸⁸

1.7 Inibidores do citocromo bc1 (complexo III)

O citocromo bc1 (também conhecido como Complexo III) é um complexo proteico localizado na membrana interna da mitocôndria, que catalisa a oxidação do ubiquinol a ubiquinona e a redução do citocromo c na cadeia respiratória do organismo.⁹⁷ Ele atua acoplando a transferência de elétrons entre carreadores com a geração de um gradiente de prótons através da membrana, o qual é usado para a

produção de ATP para a célula.⁹⁸ Esse é o chamado ciclo da Ubiquinona, ou Ciclo Q. Ele se inicia quando um ubiquinol (QH₂) e uma ubiquinona (Q) se ligam ao citocromo bc1 (Figura 10). Esse ubiquinol é oxidado a ubiquinona liberando dois elétrons no espaço intermembrana, e os elétrons são utilizados para reduzir uma ubiquinona a semiquinona e reduzir o citocromo c. Na segunda parte do ciclo, um segundo ubiquinol se liga ao citocromo bc1, novamente gerando a transferência de dois prótons para o espaço intermembrana e reduzindo a semiquinona a ubiquinol. Assim, o balanço gerado por este ciclo é a oxidação de um ubiquinol em ubiquinona e a transferência de quatro prótons para o espaço intermembrana, gerando um gradiente de prótons através da membrana mitocondrial.^{97, 98, 99}

Compostos cujo alvo de inibição é o citocromo bc1 causam o colapso do potencial de membrana mitocondrial, impedindo a obtenção de energia por essa via, e impedem a ação de enzimas metabólicas relacionadas, que necessitam da cadeia de elétrons para agir.¹⁰⁰⁻¹⁰² No caso dos protozoários *Plasmodium*, no entanto, a via bioquímica primária de obtenção de energia é a glicólise aeróbica, o que remove em grande parte a dependência da oxidação fosforilativa para obtenção de energia.^{103, 104} Nesse contexto, a inibição do parasito causada por inibidores do complexo bc1 está relacionada à inibição da reposição da ubiquinona através da atividade enzimática desse complexo. A ubiquinona é substrato para a atividade da enzima diidrorotato desidrogenase (DHODH), que atua na via de biossíntese de pirimidinas.¹⁰⁵⁻¹⁰⁶ Essa via é essencial para o parasito, dado que este não possui a maquinaria necessária para metabolizar pirimidinas exógenas e depende inteiramente de sua via de síntese *de novo*.^{105,107} A Figura 10 ilustra o acoplamento desses ciclos.

Figura 10 - Modo de ação dos inibidores do complexo bc1 em *Plasmodium*. O citocromo bc1 atua oxidando o ubiquinol (QH₂) a ubiquinona (Q), repondo o aceitador de elétrons para a ação da enzima diidroorotato desidrogenase (DHODH). O acoplamento da atividade ubiquinol-citocromo c oxidoreductase do citocromo bc1 com a via de biossíntese de pirimidinas é bloqueado pelos inibidores do Citbc1, bloqueando a única via de obtenção de pirimidinas do parasito.

Fonte: Adaptada de Raphemot et al.¹⁰⁶

A atovaquona é o mais conhecido inibidor do citocromo bc1, utilizada atualmente na forma da terapia de combinação com o antimalárico proguanil, com boa eficácia no tratamento da doença.¹⁰⁸ Recentemente, foi demonstrado que a exposição de mosquitos *Anopheles* fêmeas à atovaquona é capaz de inibir a transmissão da doença pelo vetor, aumentando o interesse por compostos com esse mecanismo de ação.⁸⁴ A classe das quinolonas é de interesse pois alguns compostos dessa classe química demonstraram atividade antiplasmodial contra esse mesmo alvo validado, explorando diferentes substituintes em algumas posições do anel quinolínico.¹⁰⁹ Dessa forma, a série de compostos 4-quinolinonas, análogo estrutural das quinolonas, sintetizada pelo grupo da Prof.^a Arlene Correa forneceu um ponto de início interessante para os estudos realizados nesse trabalho. A Figura 11 mostra as estruturas químicas da atovaquona e do grupo estrutural 4-quinolinona.

atovaquona

4-quinolinona

Figura 11 - Estruturas químicas do antimalárico atovaquona e da classe 4-quinolinona.
Fonte: Elaborada pela autora.

2 OBJETIVOS

O objetivo principal desta dissertação de mestrado foi a avaliação e caracterização da atividade antiplasmodial de uma série de derivados 4-quinolinonas como candidatos para a descoberta de novos antimaláricos. Para alcançar o objetivo principal, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliação da potência inibitória in vitro (IC_{50}) dos derivados 4-quinolinonas contra de cepa sensível de *P. falciparum*;
- Determinação de potência inibitória (IC_{50}) dos compostos contra um painel de cepas resistentes de *P. falciparum* (K1, TM90C6B e IPC4912).
- Avaliação da atividade citotóxica dos compostos in vitro (IC_{50}) contra células humanas de hepatoma (linhagem celular HepG2);
- Avaliação do perfil de combinação dos compostos mais promissores da série com antimaláricos convencionais;
- Criação de modelo estrutura-atividade quantitativo da série de compostos testados;
- Monitoramento do tempo de ação dos compostos mais potentes contra *P. falciparum*;
- Avaliação da atividade contra diferentes estágios do ciclo assexuado de *P. falciparum*;
- Confirmação da atividade antiplasmodial contra *P. falciparum* e *P. vivax* circulantes em região endêmica do Brasil;
- Avaliação da potência inibitória (IC_{50}) das 4-quinolinonas mais ativas em ensaio enzimático do citocromo bc1 de *P. falciparum*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos compostos 4-quinolinonas e das cepas de cultivo para avaliação de atividade antiplasmodial

Os compostos testados no decorrer deste projeto foram sintetizados pelo grupo da Prof.^a Arlene G. Correa (DQ-UFSCar). A cepa 3D7 foi obtida por meio de doação do grupo do Prof. Fábio Costa, da UNICAMP. As cepas K1, TM90C6B e IPC4912 de *P. falciparum* para estabelecimento de cultura contínua foram obtidas do *Malaria Research and Reference Reagent Resource Center* (MR4), parte do *BEI Resources Repository*.

3.2 Avaliação antiplasmodial dos compostos *in vitro*

3.2.1 Cultivo de *P. falciparum* *in vitro*

O parasito *P. falciparum* (cepas 3D7, K1, IPC4912 e TM90C6B) foi mantido em cultura contínua a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂ e 5% O₂. O meio de cultura utilizado foi RPMI-1640 com 25 mM HEPES (pH 7.4), 24 mM NaHCO₃, 11 mM glicose, 3.67 mM hipoxantina e 1% (v/v) penicilina-estreptomicina suplementado com 0.5% Albumax II. Foram feitos esfregaços sanguíneos diários da cultura para monitoramento da parasitemia, e foram feitas trocas diárias de meio. A parasitemia foi mantida abaixo de 10% e o hematócrito ajustado para 2.5% utilizando-se eritrócitos humanos O⁺.¹¹⁰

3.2.2 Ensaio de inibição SYBR *green* I contra forma assexuada de *P. falciparum*

Os parasitos foram sincronizados em forma de anel por meio de tratamento com solução 5% de sorbitol a 37°C por 10 minutos.¹¹¹ Em seguida, a parasitemia da cultura sincronizada foi contada por esfregaço sanguíneo. O hematócrito foi ajustado

para 2% e a parasitemia para 0,5% com adição de eritrócitos humanos O+. Em uma placa de 96 poços foram preparadas alíquotas de 20 µL de diluições seriadas dos compostos a serem testados, em duplicata e em uma concentração 10 vezes maior que a pretendida. As diluições preparadas estão esquematizadas na Figura 12A. Em seguida, 180 µL da cultura com hematócrito e parasitemia já ajustados foram adicionados por poço, e a placa foi incubada por 72h a 37°C em estufa umidificada com atmosfera de 5% de CO₂ e 5% O₂. Em cada placa foram adicionados em paralelo poços de controles negativo e positivo de inibição, com hemácias parasitadas sem adição de compostos e hemácias não parasitadas, respectivamente. O desenho final da placa está ilustrado na Figura 12B. Após incubação, o meio foi retirado e as hemácias decantadas foram ressuspensas em 100 µL de tampão PBS (116 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 3 mM KH₂PO₄). Então foram adicionados 100 µL de marcador para DNA SYBR Green I diluído 1:5000 em Tampão de Lise (20 mM Tris (pH 7,5), 5 mM EDTA, 0,008% (m/v) saponina e 0,08% (m/v) Triton X-100), e a placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente e protegida da luz antes de leitura de fluorescência em espectrômetro SpectraMax Gemini ($\lambda_{abs}=485$ nm e $\lambda_{emi}=535$ nm).¹¹² Os valores de intensidade obtidos foram normalizados para uma viabilidade percentual relativa aos controles positivo e negativo, e a concentração inibitória mínima de 50% (IC₅₀) foi obtida pela análise de curvas dose resposta sigmoidais plotadas no programa *OriginPro* versão 9.0 (OriginLab, Northampton, MA, EUA).

Figura 12 – Esquema de montagem do experimento SYBR Green I para avaliação da atividade antiplasmodial. (A) Esquema de preparação de diluições na placa do ensaio SYBR Green I. (B) Desenho tradicional da placa de experimento, contendo diluições seriadas de 6 compostos em duplicata (azul) e controles negativo (vermelho, hemácias parasitadas) e positivo (amarelo, hemácias não-parasitadas) de inibição.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3 Avaliação da toxicidade

3.3.1 Cultivo da linhagem celular HepG2

A linhagem celular HepG2 é originária de um hepatocarcinoma de um menino americano de 15 anos, cuja amostra foi isolada e imortalizada em 1975, e a linhagem é muito utilizada para estudar modelos de hepatócito, metabolismo celular e ensaios de citotoxicidade. Uma alíquota da linhagem celular foi obtida do Banco de células do Rio de Janeiro para início de cultura. As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 com 25 mM HEPES (pH 7.4), 24 mM NaHCO₃, 11 mM glicose, 3.67 mM hipoxantina e 1% (v/v) penicilina-estreptomicina, suplementado com 10% (v/v) Soro Bovino Fetal (SBF) inativado, em garrafas de 75 cm², mantidas em estufa umidificada a 37°C com atmosfera de 5% CO₂. O meio foi trocado a cada três dias, e as células foram repicadas ou utilizadas para montagem de placas de experimentos de citotoxicidade a cada quatro dias ou quando a cultura se tornasse confluenta. Para soltar as células aderidas na garrafa, foi utilizada uma solução de 0,25% Tripsina-EDTA com incubação por 10 minutos a 37°C.

3.3.2 Ensaio MTT de citotoxicidade e determinação do IC₅₀^{HepG2}

O sal de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) é utilizado em diversos ensaios para quantificar a viabilidade de uma cultura celular. Essa quantificação é feita por meio de um ensaio colorimétrico para avaliar a concentração de formazan na amostra, o qual é formado pela redução do MTT pelas mitocôndrias de células vivas.¹¹³ No ensaio de citotoxicidade aplicado, primeiramente foi feita a tripsinização de uma cultura confluenta de células HepG2 e contagem por microscopia em câmara de Neubauer, seguida pela sua distribuição na placa de 96 poços para um total de $5 \cdot 10^4$ células em 180 µL de meio por poço. A placa foi então incubada a 37 °C até o dia seguinte para adesão das células. Em uma placa separada, foram preparadas diluições seriadas dos compostos de interesse, de forma que a maior concentração do composto ao final fosse limitada a

2% (v/v) de DMSO. Dessa placa, foram transferidos 20 µL para a placa de ensaio com as células aderidas. Os ensaios foram realizados em duplicata, e em cada placa foram adicionados controles com veículo (2% de DMSO) para normalização dos resultados.

Em seguida, a placa de células foi incubada por 24h nas condições de cultura já citadas. Então, foi determinada a viabilidade em cada poço por meio do teste de MTT, adicionando 20 µL de uma solução 5 mg/mL de MTT em PBS à cada poço. Após 2-4 horas adicionais de incubação, foi feita a retirada de todo o sobrenadante e adição e homogeneização de 100 µL de DMSO em cada poço, para solubilização dos cristais de formazan. Foi lida a absorbância da placa de ensaio em um espectrofotômetro Spectramax Plus a 570 nm, e as intensidades resultantes foram normalizadas na forma de viabilidades percentuais em relação às leituras dos poços controles. Foram plotados gráficos concentração-resposta para cada composto e foi feito o ajuste não-linear de curvas sigmoidais no programa OriginPro versão 9.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA), a partir dos quais foram determinados os valores de concentração letal mínima para 50% das células (IC_{50}^{HepG2}) de cada composto.

3.3.3 Cálculo do índice de seletividade (IS)

Tendo obtido os valores de $IC_{50}^{P.falc}$ e IC_{50}^{HepG2} para um composto, o índice de seletividade é uma forma simples calcular a seletividade de um composto. Esse índice é calculado da seguinte forma:

$$IS = \frac{IC_{50}^{HepG2}}{IC_{50}^{P.falc}}$$

Ou seja, o índice de seletividade nos diz qual a diferença entre a concentração do composto com atividade antiplasmodial e a concentração tóxica para células de mamífero. Valores de IS acima de 10 são indicativos de compostos bem tolerados pelo modelo celular utilizado.

3.3.4 Ensaio de hemólise

Os compostos foram diluídos em tampão PBS e foi feita diluição seriada de fator 2 para avaliar doses de 100 a 1,56 μ M. Foi preparada uma mistura de eritrócitos humanos a 2% de hematócrito em tampão PBS, e esta foi dispensada em uma placa de 96 poços, com 180 μ L por poço. A cada poço foram adicionados 20 μ L dos compostos previamente diluídos, e a placa foi incubada a 37°C por 72h. Em paralelo, foram feitos controles negativo e positivo de hemólise, o primeiro sem adição de compostos e o último com adição de 20 μ L de uma solução de saponina 0,05% (m/v) para hemólise completa. Após incubação, o sobrenadante é retirado e transferido para nova placa de 96 poços para leitura de absorbância em espectrofotômetro SpectraMax Plus, em comprimento de onda 540 nm. A taxa de hemólise para cada poço foi calculada a partir das intensidades dos controles positivo e negativo de hemólise.

3.4 Ensaio ex vivo de maturação de esquizonte

O ensaio ex vivo de maturação de esquizonte (*schizont maturation test*, ou SMT) realizado consiste na avaliação da potência inibitória de compostos contra isolados circulantes de *P. falciparum* e *P. vivax*. Esses ensaios foram realizados no Centro de Medicina Tropical em Porto Velho (RO), em colaboração com o Dr. Dhélio Batista Pereira (estudo aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical CEPem-Rondônia, CAAE 61442416.7.0000.0011). Para esse teste, foram coletadas amostras de sangue humano de pacientes infectados com malária que consentiram em participar desse estudo. Esses pacientes foram selecionados com base em alguns critérios:

- maior de 18 anos;
- infectado com malária vivax ou falciparum confirmada por microscopia;
- não estar em situação clínica grave;
- não ter feito tratamento com antimaláricos nos 30 dias anteriores.

Atendendo esses requerimentos, as amostras sanguíneas foram coletadas em tubos heparinizados e posteriormente centrifugadas a 600 x g, 5 min. A fração de

hemácias de cada amostra foi então coletada e filtrada por uma coluna confeccionada de celulose e lã de vidro, para remoção de células brancas remanescentes. O hematócrito da suspensão foi ajustado para 2% com hemácias humanas O+ e a suspensão de hemácias infectadas preparada foi adicionada a placas de 96 poços com os compostos pré-diluídos. Nas placas de compostos foram preparadas 12 diluições de cada composto em monoplicata, além de poços controle sem tratamento. Após adição da suspensão parasitada às placas de ensaio, foi feita a incubação das placas a 37 °C e 5% CO₂, e a morfologia dos poços controle foi monitorada por meio de gotas espessas. Quando a composição morfológica do controle atingiu pelo menos 40% de esquizontes, foram feitas gotas espessas de todas as concentrações de compostos. Esse período de incubação limitou a avaliação ao primeiro ciclo de vida, sem considerar a reinvasão. As gotas espessas foram então coradas com corante Giemsa e avaliadas por microscopia. Em cada esfregaço, foi feita a contagem de no mínimo 200 formas de parasito, e foi calculada a porcentagem de esquizontes observados dentre essas formas. A porcentagem de esquizontes foi então utilizada como medida da maturação da amostra, e a inibição causada por cada concentração de inibidor testada foi calculada utilizando a fórmula:

$$M = \frac{E^{INB} / F^{INB}}{E^{CNT} / F^{CNT}}$$

Onde M é o percentual de esquizontes maduros, E^{INB} e E^{CNT} são o número de esquizontes contados no poço de inibidor e poço controle, respectivamente, e F^{INB} e F^{CNT} são o número de formas totais contadas no poço de inibidor e poço controle, respectivamente. Com as porcentagens de inibição de maturação, foram feitas curvas concentração-resposta de cada composto para cada paciente e foram calculados os respectivos valores de IC₅₀. A distribuição de valores de IC₅₀ foi avaliada, e o valor da mediana foi utilizado para representar a potência inibitória.

3.5 Estudo do tempo de ação de inibidores

3.5.1 Efeitos dos inibidores na morfologia do parasito

O efeito dos compostos na morfologia do parasito foi avaliado ao longo do tempo. Para isso, foram preparados inóculos a 2% parasitemia e 2% hematócrito, os quais foram incubados por 24 horas com uma concentração dez vezes maior que o IC_{50} do composto. A cada 8 horas, a morfologia presente foi avaliada por esfregaços sanguíneos do parasito tratado. Os antimaláricos cloroquina e atovaquona foram utilizados os como controles de modo de ação rápido e lento, respectivamente. Foi mantido um controle sem tratamento para acompanhamento do desenvolvimento normal do parasito durante o período.

3.5.2 Quantificação do tempo de ação

O tempo de ação dos compostos foi avaliado por meio da preparação de três placas (A, B e C) com as mesmas diluições seriadas dos compostos de interesse, da maneira descrita para o ensaio de SYBR *Green* I. Cada uma das placas foi então incubada com uma suspensão preparada de *P. falciparum* na forma de anel, ajustada para 2% de hematócrito e 0,5% de parasitemia. As três placas foram então incubadas sob pressão do inibidor nas condições de crescimento por períodos de 24 (placa A), 48 (placa B) ou 72 (placa C) horas. A Figura 13 ilustra o modo de realização do experimento. Após os respectivos períodos de incubação, as placas A e B foram lavadas para remoção do inibidor, e incubadas por mais 48 e 24 horas, respectivamente. Após incubação, as viabilidades e valores de IC_{50} para cada placa foram avaliados usando o ensaio de SYBR *Green* I descrito. Os valores de IC_{50} para os três tempos de incubação foram então comparados com análise estatística por ANOVA para verificar se havia diferença significativa entre a potência inibitória resultante de cada um dos tempos.

Figura 13 – Esquematização dos tempos de incubação com inibidores aplicadas no experimento de tempo de ação, no qual foi avaliada a influência do tempo de incubação (24, 48 ou 72h) nos valores de IC_{50} resultantes.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.6 Avaliação do estágio de ação dos inibidores

A potência dos compostos contra cada estágio do desenvolvimento assexuado do parasito (anel, trofozoíto e esquizonte) foi avaliada através da incubação do parasito durante cada estágio de vida como composto. Para este ensaio, foram preparadas três placas paralelas com o mesmo inóculo de parasito, inicialmente na forma de anel. A placa A foi tratada com diluições seriadas do composto estudado durante 10 horas durante o estágio de anel do parasito, enquanto as placas B e C não foram tratadas. Após esse período, a placa B, então no estágio de trofozoíto, foi tratada com as mesmas concentrações dos compostos por mais 10 horas. A placa A foi lavada para remoção do inibidor, e voltou para incubação enquanto a placa C permaneceu sem tratamento. Finalmente, o parasito na placa C foi similarmente tratado com pressão de droga por 10 horas no estágio de esquizonte, enquanto a pressão foi removida da placa B. Ao final desse último período de pressão, a placa C foi também lavada com meio fresco. As três placas foram então incubadas por um período adicional de 48 horas. Os valores de IC_{50} dos compostos nas três placas foram obtidos pelo ensaio de SYBR *Green* I, e comparados estatisticamente por ANOVA para avaliar se houve variação significativa na inibição observada contra cada uma das formas do parasito. A Figura 14 mostra uma esquematização do experimento realizado.

Figura 14 – Esquematização dos tempos de incubação com inibidores aplicadas no experimento de estágio de ação, no qual foram aplicados períodos de 10h de pressão a cada placa, visando determinar se houve diferença de potência quando focando a pressão de inibidor em cada estágio de vida.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.7 Ensaios de combinação com antimaláricos convencionais

Em ensaios de combinação o intuito é avaliar qual a resposta de um sistema biológico (neste caso, uma cultura de *P. falciparum*) à administração associada de dois ou mais compostos. Para tanto, foram realizados ensaios de combinação contra o parasito in vitro, aplicando o método de SYBR para análise dos resultados.

No ensaio, o parasito é adicionado nas condições descritas acima no ensaio de inibição (0,5% parasitemia, 2% hematócrito). Então, em placas de 96 poços são testadas várias proporções de combinação de compostos A e B em razões fixas de combinação (proporções A:B de 4:1, 3:2, 1:1, 2:3 e 1:4), bem como cada composto isoladamente para comparação. As concentrações iniciais são planejadas para que a concentração de IC_{50} do composto fique centrada nas diluições seriadas. A redução causada por em cada poço é determinada por meio do método de SYBR green I, e é determinado o IC_{50} para os compostos A e B atuando sozinhos, bem como o IC_{50} para cada composto dentro das combinações testadas ($IC_{50,A}$ e $IC_{50,B}$). Com esses valores determinados, calcula-se os valores de concentração inibitória fracional ($FIC_{50} = \frac{IC_{50,combinação}}{IC_{50}}$), uma medida normalizada da potência do composto naquela combinação em relação ao composto atuando sozinho. Os valores de IC_{50}

fracional para cada composto são usados para plotar um isoblograma, com o FIC_{50} de cada composto em um eixo do gráfico. Utilizando os dados experimentais de ensaios de associação realizados, é possível calcular as isóbatas (curvas de igual nível de atividade) aditivas, ou seja, a região dentro da qual os pontos experimentais devem cair naquele isoblograma para indicar uma combinação aditiva. Os cálculos necessários para a determinação da isóbola aditiva foram delineados por Grabovsky e Tallarida.¹¹⁴ Pontos acima dessa região são indicativos de comportamento antagônico de combinação, no qual quando combinados os compostos perdem potência biológica. Já os pontos abaixo da região de aditividade demonstram sinergismo, comportamento no qual dois compostos se potencializam se administrados em conjunto. Essas regiões do isoblograma estão ilustradas na Figura 15.

Figura 15 – Ilustração das regiões de um isoblograma de acordo com o comportamento associado: em verde, sinergismo; em vermelho, antagonismo e em branco, aditividade.
Fonte: Elaborada pela autora.

3.8 Ensaio enzimático da atividade ubiquinol-citocromo c oxidoreductase do citocromo bc1

Decilubiquinol, um análogo do ubiquinol, foi preparado via redução de decilubiquinona. Para isso, 10 μ mol de decilubiquinona foram dissolvidos em 400 μ L de etanol acidificado com 10 mM HCl. Foi adicionado uma solução de 80 mg de Borohidreto de Sódio em 400 μ L de água, e a mistura foi agitada para permitir a redução da decilubiquinona. O decilubiquinol formado pela reação foi extraído três vezes com 400 μ L de n-hexano e extração da fase orgânica, a qual foi então lavada

com 400 µL de NaCl 2M. As fases se separaram e foi extraída a fase orgânica novamente, e esta foi seca sob fluxo de gás nitrogênio em uma capela. O decilubiquinol foi então ressuspendido em 100 µL de etanol acidificado com 10 mM HCl, e em seguida aliquoteado e armazenado a -80 °C. Para a obtenção de citocromo bc₁ de *P. falciparum*, primeiramente foi isolada uma alíquota de cultura com células infectadas pelo parasito da cepa 3D7. Então, as hemácias foram lisadas por adição de uma solução 0,05% (m/v) de saponina, e a suspensão obtida foi centrifugada a 1500 g por 10 minutos. Foram feitas três lavagens com meio RPMI suplementado com 1 mM PMSF, e o parasito recuperado ao final foi lisado por cavitação de nitrogênio a 1600 psi por 25 minutos. A fração mitocondrial gerada foi recuperada por centrifugação diferencial (16000 g, 4 °C, 1h). A mistura de ensaio foi preparada com 50mM KH₂PO₄ (pH 7.4), 2 mM EDTA, 10 mM KCN, 0.03% DDM, 30 µM citocromo c e quantidade suficiente da fração mitocondrial purificada para obter uma leitura adequada no espectrofotômetro. A reação foi iniciada pela adição de 50 µM de decilubiquinol, e a atividade do citocromo c foi medida através da diferença de absorbância entre os comprimentos de onda de 550 nm e 542 nm, relativa à redução do citocromo c.¹¹⁵ A atovaquona foi utilizada como um controle de inibição do citocromo bc₁.

3.9 Ensaio de inibição da formação de oocinetos

Foram realizados ensaios de inibição da conversão de gametócitos a oocinetos em colaboração com o Prof. Dr. Danel Bargieri, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP São Paulo. Para esse ensaio, foi utilizada uma linhagem de *P. berghei* na qual foi adicionada uma sequência de expressão do sistema nanoluciferase, sob controle de promotor específico de oocineto. Foi então coletado o sangue de camundongos infectados com essa linhagem de *P. berghei*, e o sangue foi então adicionado a meio de oocineto (RPMI-1640 com HEPES 25 mM, penicilina-estreptomicina-neomicina, 50 mg/L de hipoxantina e 100 µM de ácido xanturênico, pH 8,3) em uma proporção de 1:20. Para a avaliação da atividade dos inibidores, foi feita uma diluição seriada com fator 2 de cada composto em meio de oocineto, a partir da concentração de 1 µM. O inibidor de conversão de zigoto para oocineto ácido 2-bromopalmítico foi utilizado como controle negativo. A mistura foi então

incubada por 24 horas a 21 °C em uma incubadora, seguido pela adição de 1 volume do tampão de substrato/lise (do sistema de ensaio Nano-Glo luciferase da Promega), contendo o substrato da nanoluciferase. Isso causou a emissão de luz por luminescência pelos oocinetos que se formaram, e a inibição da conversão a oocineto foi avaliada indiretamente medindo a redução da luminescência causada pela adição dos compostos. Foram criadas curvas concentração-resposta de cada composto utilizando o software GraphPad Prism 6.0, e foram determinados os respectivos valores de IC_{50} .¹¹⁶

3.10 HQSAR

O software SYBYL foi utilizado para construir um modelo de relação estrutura-atividade quantitativa baseado em hologramas (HQSAR) para o conjunto de dados de derivados de 4-quinolinona. O método HQSAR é uma técnica de QSAR 2D na qual as estruturas químicas são convertidas em uma forma específica de impressão digital 2D denominada Holograma Molecular. Neste método, todas as moléculas do conjunto de treinamento são divididas em todos os fragmentos estruturais possíveis, e um holograma é criado para cada molécula que codifica as informações estruturais sobre a molécula em uma sequência de números inteiros, “compartimentos” denominados *bins*. Esses *bins* mantêm a contagem da frequência do fragmento molecular na molécula do conjunto de treinamento. O método dos mínimos quadrados parciais (*partial least squares*, ou PLS) é então usado para correlacionar as características estruturais contidas em cada holograma com os dados de atividade da respectiva molécula.

Inicialmente, o conjunto de dados das 22 4-quinolinonas testadas foi dividido em um conjunto treinamento de 18 moléculas, que foram apresentadas ao programa, e um conjunto teste de 4 moléculas para avaliação dos modelos construídos. As configurações do programa foram então otimizadas, incluindo:

- os tamanhos de fragmentos das estruturas utilizados, varrendo as opções de 2-5, 3-6, 4-7, 5-8, 6-9, 7-10 e 8-11 átomos por fragmento;
- os conjuntos de descritores utilizados para definir as características estruturais das moléculas, entre os possíveis descritores: Átomos (A),

Ligações (B), Conexões (C), Hidrogênios (H), Quiralidade (Ch) e Doadores e aceptores de elétrons (DA);

- os comprimentos de holograma molecular definidos para alocação dos fragmentos estruturais

Em um processo iterativo de otimização, foram construídos modelos visando obter um modelo final preditivo. A avaliação da qualidade dos modelos gerados foi feita pela análise dos valores de r^2 e q^2 gerados por validação-cruzada, baseado no método de mínimos quadrados parciais.

4 RESULTADOS

4.1 Potência antiplasmodial dos compostos em ensaio fenotípico de inibição de crescimento

Foram sintetizados 22 compostos da classe das 4-quinolinonas para caracterização da atividade antiplasmodial. As estruturas desses compostos, **1-22**, estão ilustradas na Tabela 1. Inicialmente, esses compostos foram avaliados quanto a sua atividade antiplasmodial por meio do ensaio de inibição de crescimento usando SYBR *Green* I, contra a cepa 3D7 de *P. falciparum*. Nesse experimento, foram testadas as concentrações de 10 a 0,156 μM em 7 diluições seriadas de fator 2. Foi estabelecido um valor de corte para o IC_{50} de 10 μM , abaixo do qual compostos foram considerados ativos e seguiram para novos testes. Os demais compostos, que se apresentaram inativos contra o parasito, tiveram seu valor de IC_{50} determinado em novo ensaio fenotípico testando as concentrações de 100 a 1,56 μM . Os resultados dessa investigação inicial estão mostrados na Tabela 1. Os compostos com valores de IC_{50} abaixo de 10 μM estão destacados em azul. A Tabela inclui também valores de IC_{50} para alguns compostos controle, utilizados para monitoramento da qualidade de um experimento.

Tabela 1 - Avaliação da atividade antiplasmodial dos derivados 4-quinolinonas e antimaláricos controle contra *P. falciparum*, cepa 3D7.

#	Estrutura química	IC_{50} (Média $\pm$ SD) (μM)
1 (LSPN174)		8 ± 1
2 (LSPN176)		25 ± 5

(continuação)

Tabela 1 - Avaliação da atividade antiplasmodial dos derivados 4-quinolinonas e antimaláricos controle contra *P. falciparum*, cepa 3D7.

#	Estrutura química	IC ₅₀ (Média ± SD) (μM)
3 (LSPN177)		5,8 ± 0,2
4 (LSPN178)		0,47 ± 0,03
5 (LSPN179)		11,05 ± 0,05
6 (LSPN181)		73 ± 7
7 (LSPN182)		0,21 ± 0,04
8 (LSPN183)		11 ± 1
9 (LSPN 188)		>100
10 (LSPN 190)		10,3 ± 0,3

(continuação)

Tabela 1 - Avaliação da atividade antiplasmodial dos derivados 4-quinolinonas e antimaláricos controle contra *P. falciparum*, cepa 3D7.

#	Estrutura química	IC ₅₀ (Média ± SD) (μM)
11 (LSPN 192)		>100
12 (LSPN 194)		33 ± 6
13 (LSPN 195)		>100
14 (LSPN 202)		>100
15 (LSPN619)		1,7 ± 0,3
16 (LSPN 633)		26 ± 5
17 (LSPN 673)		1,5 ± 0,4
18 (LSPN 674)		7 ± 3

(continuação)

Tabela 1 - Avaliação da atividade antiplasmodial dos derivados 4-quinolinonas e antimaláricos controle contra *P. falciparum*, cepa 3D7.

#	Estrutura química	IC ₅₀ (Média ± SD) (µM)
19 (LSPN 675)		32 ± 5
20 (LSPN 676)		48 ± 3
21 (LSPN 677)		1,0 ± 0,2
22 (LSPN 678)		0,15 ± 0,05
artesanato		0,010 ± 0,002
cloroquina		0,018 ± 0,003
atovaquona		0,0013 ± 0,0001

(continuação)

Tabela 1 - Avaliação da atividade antiplasmodial dos derivados 4-quinolinonas e antimaláricos controle contra *P. falciparum*, cepa 3D7.

#	Estrutura química	IC ₅₀ (Média ± SD) (μM)
pirimetamina		0,0520 ± 0,0007
cicloguanil		0,0097 ± 0,0002

Fonte: Elaborada pela autora.

Os derivados **2**, **5**, **6**, **8 – 14**, **16**, **19** e **20** foram inativos contra o *P. falciparum*, (IC₅₀ > 10 μM). Os compostos **1**, **3**, **4**, **7**, **15**, **17**, **18**, **21** e **22** apresentaram valores de IC₅₀ entre 8 e 0,26 μM. Entre esses nove compostos, os mais potentes apresentaram valores de IC₅₀ na faixa submicromolar (**4**, IC₅₀ = 0,47 μM; **7**, IC₅₀ = 0,21 μM e **22**, IC₅₀ = 0,15 μM). A presença de um substituinte alquila na posição 2 do anel 4-quinolinona é comum entre os três derivados mais potentes, sugerindo que substituintes hidrofóbicos nessa posição são favoráveis para o aumento da potência inibitória.

Com o objetivo de investigar a possível existência de resistência cruzada a esses compostos em cepas resistentes de *P. falciparum* determinamos o valor de IC₅₀ de compostos selecionados (**4**, **7** e **22**) contra um painel de cepas resistentes do parasito (K1, IPC4912 e TM90C6B). A cepa K1 foi isolada na Tailândia e é resistente aos antimaláricos cloroquina, cicloguanil, pirimetamina. A cepa IPC4912 apresenta resistência parcial a artemisinina. Por fim, a cepa TM90C6B foi estabelecida em laboratório e apresenta resistência a inibidores do complexo bc1. Os dados obtidos para as três quinolinonas testadas (**4**, **7** e **22**) estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores de IC_{50} e índices de seletividade (IS) dos compostos mais potentes da série contra as cepas 3D7 (sensível), K1 (resistente aos antimaláricos cloroquina, cicloguanil, pirimetamina), IPC4912 (resistência parcial a artemisinina) e TM90C6B (resistência a inibidores do complexo bc1). O antimalárico artesunato foi testado contra as três cepas em todos os experimentos como controle positivo de inibição do experimento.

Composto	3D7	K1	IPC4912			TM90C6B	
	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	IR	IC ₅₀ (μM)	IR	IC ₅₀ (μM)	IR
4	0,47 ± 0,03	1,0 ± 0,2	2,1	0,48 ± 0,09	1,0	0,4 ± 0,1	0,85
7	0,21 ± 0,04	0,52 ± 0,07	2,5	0,131 ± 0,003	0,6	0,20 ± 0,08	0,95
22	0,15 ± 0,05	0,28 ± 0,08	1,9	0,055 ± 0,001	0,4	0,07 ± 0,03	0,47
artesunato	0,010 ± 0,002	0,0068 ± 0,0006	0,68	0,005 ± 0,0002	0,5	0,011 ± 0,001	1,1

Valores de IC_{50} são resultados de dois experimentos independentes. Dados de IC_{50} apresentados na forma (média) $\pm$ (desvio padrão).

IR: Índice de resistência, calculado como a razão do IC_{50} na cepa resistente pelo IC_{50}^{3D7} ; ART: Artesunato.

Fonte: Elaborada pela autora

Para uma avaliação quantitativa da existência de resistência a cada composto, calculamos o índice de resistência (IR), o qual consiste na razão entre os valores de IC_{50} determinados contra a cepa resistente e a cepa sensível (3D7). Dessa forma, o IR indica a magnitude de diferença entre a potência do composto contra a cepa resistente e a cepa sensível. Valores de IR acima de 3 foram considerados indicativos de resistência cruzada na cepa resistente testada. A análise dos dados de IR sugerem que não há resistência cruzada das 4-quinolinonas nas cepas K1 (IR < 2,5), IPC4912 (IR < 1) e TM90C6B (IR < 1,1).

4.2 Caracterização do perfil citotóxico de compostos ativos

Os nove compostos com valores de IC_{50} inferiores a 10 μ M foram testados em relação à citotoxicidade contra células HepG2 para avaliação das respectivas seletividades por meio da determinação da concentração inibitória 50% das células (IC_{50}^{HepG2}) e do índice de seletividade (IS), calculado como a razão entre os valores de IC_{50}^{HepG2} e IC_{50}^{3D7} . Valores de IS acima de 10 são indicativos de uma variação suficientemente grande entre a concentração tóxica e a concentração inibitória de crescimento do parasito. Valores de IS > 10 indicam que o composto é bem tolerado pelas células humanas na concentração necessária para eliminar o parasito.

Na Tabela 3 estão listados os compostos testados e seus respectivos valores de IC_{50}^{HepG2} e IS. As concentrações iniciais testadas para diluição dos compostos no ensaio foram ajustadas em função da solubilidade de cada composto, excluindo concentrações maiores nas quais foi observada precipitação do inibidor no meio de ensaio.

Tabela 3 - Avaliação da citotoxicidade das quinolinonas em células de hepatoma humano (linhagem HepG2) e valores de índice de seletividade (IS) dos compostos da série.

#	IC_{50}^{3D7} (Média $\pm$ SD, μ M)	IC_{50}^{HepG2} (Média $\pm$ SD, μ M)	IS
1	8 $\pm$ 1	>400	>50
3	5,8 $\pm$ 0,2	>400	>69
4	0,47 $\pm$ 0,03	>100	>213
7	0,21 $\pm$ 0,04	>100	>476
15	1,7 $\pm$ 0,3	>50	>29
17	1,5 $\pm$ 0,4	>100	>33
18	7 $\pm$ 3	>100	>14
21	1,0 $\pm$ 0,2	>100	>100
22	0,15 $\pm$ 0,05	>50	>333

Valores de IC_{50} são resultados de dois experimentos independentes.

IS: Índice de seletividade ($IC_{50}^{HepG2}/IC_{50}^{3D7}$).

Fonte: Elaborada pela autora.

A análise dos dados da Tabela 3 indica que todos os derivados 4-quinolinonas testados foram seletivos (IS > 14) frente a linhagem de hepatoma humano HepG2. Além disso, os compostos foram testados quanto à presença de atividade hemolítica usando hemácias humanas. Os nove compostos ativos testados não causaram hemólise em nenhuma das concentrações estudadas, tanto em hemácias não-infectadas como em hemácias parasitadas. Dessa forma, as os derivados 4-quinolinonas investigados demonstram um perfil de toxicidade razoável, sendo bem toleradas por modelos de células de hepatoma humano e hemácias humanas sem efeitos adversos resultantes.

4.3 Estudo do tempo de ação dos inibidores 4-quinolinonas

O tempo de ação de compostos está relacionado com seu mecanismo de ação. Os derivados de artemisinina, e a cloroquina, por exemplo, são compostos com ação antiplasmodial rápida, matando o parasito em um tempo curto (dentro das primeiras 24 horas após administração). A atovaquona e a pirimetamina, por outro lado, possuem mecanismos de ação lentos caracterizados na literatura (necessitam de mais de um ciclo de vida para eliminar o parasito efetivamente).¹¹⁷ Dessa forma, é interessante estudar o tempo de ação de compostos pela informação mecanística que pode ser derivada, bem como pela avaliação do potencial da série em investigação para combinações e para geração de resistência.

Dentre os compostos mais potentes da série, foram escolhidos os derivados **4** e **7** para a realização desses experimentos, dada a alta similaridade estrutural do composto **22** com o composto **7** e o melhor perfil de solubilidade deste último observada durante os testes. Esse estudo foi conduzido de duas formas para os derivados **4** e **7**: primeiramente estudamos a evolução da morfologia do parasito quando sob efeito de pressão do inibidor, e adicionalmente, investigamos a variação do tempo de pressão utilizada no ensaio fenotípico de inibição do parasito.

No estudo morfológico realizado, foram feitos seis tratamentos paralelos com inibidores: um poço controle sem adição de composto, dois poços com os compostos **4** e **7** e três poços com os antimaláricos controle atovaquona (ATV), artesunato (ART) e cloroquina (CQ). A morfologia de cada poço foi monitorada por 72h, com observação da morfologia nos tempos 0, 10, 20, 30, 48 e 72h. A Figura 16 ilustra as morfologias predominantes para cada composto nas marcas de tempo monitoradas.

No poço controle foi observado que o parasito evoluiu normalmente, ou seja, desde os estágios de anel, trofozoíto até esquizonte entre as 30 h iniciais do monitoramento. Essa observação está de acordo com os tempos esperados para cada estágio de vida do parasito. Já nos poços com os antimaláricos controle artesunato e cloroquina, foram observadas alterações na morfologia de desenvolvimento entre as primeiras 10 a 20 horas. Nesse período, foi observada a formação de parasitos involuídos e núcleos picnóticos, ambos indicativos de estresse e morte celular causada pelos compostos. Nos outros pontos de tempo, a

grande maioria dos parasitos observados estavam na forma de núcleos picnóticos, comportamento compatível com o modo de ação rápido reportado na literatura para ambos esses antimaláricos (Figura 16).

Figura 16 – Morfologias observadas durante ensaio de tempo de ação. Os compostos testados foram testados na concentração de 10 vezes o IC_{50} , e a morfologia foi monitorada durante a incubação depois de 0, 10, 20, 30, 48 e 72 horas. Os compostos estão listados no lado esquerdo das respectivas figuras, e os tempos de ação monitorados estão indicados na parte superior da figura. CNT: controle, ATV: atovaquona; ART: artesunato, CQ: cloroquina.

Fonte: Elaborada pela autora.

Nos poços correspondentes aos compostos **4**, **7** e atovaquona, por outro lado, foi observado um comportamento compatível com um mecanismo lento de ação. Nas primeiras 10 h de monitoramento, não houve efeito considerável na morfologia do parasito, que evoluiu até o estágio de trofozoíto como no poço controle. Entre 10 h e 30 h de incubação, foi possível observar que os três compostos causaram um retardamento na evolução morfológica do parasito, que se manteve na forma de trofozoítos pequenos, alguns se tornando vacuolizados até o final desse período. Essa vacuolização é indício de um processo de estresse celular, possivelmente indicando encaminhamento do parasito para a morte celular. A partir das 30 h de

incubação, os parasitos se tornaram cada vez menores, além disso, foram observados parasitos involuídos e a presença de núcleos picnóticos, principalmente no período final de 72 h de incubação com o composto. Outra diferença clara observada para os poços com os três compostos em relação ao controle foi que o retardo do desenvolvimento do parasito bloqueou sua multiplicação. Isso manteve o número de parasitos presentes nos poços tratados durante as primeiras horas de incubação similar ao inóculo inicial, enquanto no poço controle foi observado um claro aumento no número de parasitos ao longo das horas de incubação devido ao processo de esquizogonia.

Dessa forma, foi possível observar que os compostos **4** e **7** demonstraram um perfil de ação lento, similar ao da atovaquona, e precisaram de mais de um ciclo de vida para conseguir eliminar o parasito efetivamente.

A avaliação quantitativa do tempo de ação dos compostos foi feita através da determinação dos valores de IC_{50} pelo ensaio fenotípico com variação do tempo de pressão induzida sobre o parasito. Esse estudo nos permitiu quantificar o efeito dos diferentes tempos de ação nos valores de potência inibitória. Como descrito, três placas foram feitas com as mesmas diluições dos compostos. Em seguida, a placa A sofreu pressão dos inibidores por 24h, a placa B por 48h e a placa C por 72h. Os valores de IC_{50} para cada placa foram obtidos e comparados para determinar a variação do IC_{50} em função do tempo de incubação. A Figura 17 mostra o gráfico dos valores de IC_{50} obtidos, normalizados em relação ao IC_{50} do ensaio padrão com 72h de pressão. A normalização foi feita de forma a facilitar a comparação direta entre as potências em cada tempo de incubação.

Figura 17 – Resultados do estudo quantitativo de tempo de ação. O gráfico mostra os valores de IC_{50} dos compostos 4 e 7 e de antimaláricos controle atovaquona e cloroquina, com variação de tempo de incubação com inibidor (24, 48 e 72 horas). Os resultados mostrados estão normalizados em relação aos respectivos valores de IC_{50} com 72 horas de incubação. Análise de significância estatística foi realizada por ANOVA. Valores de $p < 0,05$ indicam diferenças significativas. Código de significância estatística: ***: $p < 0,001$. ATV: Atovaquona e CQ: cloroquina.

Fonte: Elaborada pela autora.

É possível notar na Figura 17 que para os compostos 4, 7 e o controle de atovaquona que os valores de IC_{50} obtidos aumentaram pelo menos dez vezes quando o tempo de incubação foi reduzido de 72 a 24 h. Entre 48 a 72 h de incubação, não houve variação considerável na potência inibitória. Isso indica que os três compostos não são capazes de atingir uma efetividade máxima de eliminação do parasito dentro das primeiras 24 h. Essa efetividade é observada somente após as 24 h iniciais e o efeito dos compostos é similar entre 48 e 72 h de incubação. Em contraste, o controle com cloroquina (inibidor de ação rápida) demonstrou valores de IC_{50} muito similares para os três períodos de incubação, refletindo sua velocidade de ação já descrita na literatura.

Esse ensaio sugere que o modo de ação dos derivados 4-quinolinonas testados é lento, como observado durante o monitoramento da morfologia. Consequentemente, o mecanismo de ação desses compostos é diferente daqueles exercidos pelos compostos artesunato e cloroquina.

4.4 Estudo do estágio de ação

Com o objetivo de determinar se haveria seletividade dos compostos 4-quinolinonas por um ou mais estágios de vida do ciclo assexuado de *P. falciparum*, foi realizado um estudo de estágio de ação. Para esse estudo, foi preparado um inóculo inicial igual em três placas diferentes. Foram então feitas três placas (A, B e C) com diluições seriadas iguais dos derivados (**4** e **7**) e dos compostos controle (atovaquona – ATV e cloroquina – CQ). Cada uma das placas foi incubada por um período de 10 h com os compostos, enquanto as outras duas estavam sem pressão de inibidor. As placas A, B e C receberam compostos nos estágios de anel, trofozoíto e esquizonte, respectivamente. As três placas ficaram incubadas em condições de crescimento por um tempo total de 72 h, incluindo o período de incubação nessas respectivas morfologias. As placas foram então reveladas e os valores de IC_{50} foram determinados para cada composto em cada placa, e comparadas. A Figura 18 mostra os valores de IC_{50} dos compostos **4** e **7** no ensaio, bem como os controles. Para maior facilidade de comparação direta entre a potência inibitória conta cada estágio, os valores de IC_{50} foram normalizados em relação aos respectivos valores de IC_{50} do estágio de trofozoíto.

Figura 18 – Resultados do estudo de estágio de ação. O gráfico mostra os valores de IC_{50} dos compostos **4** e **7** e de antimaláricos controle atovaquona e cloroquina, com variação do estágio do parasito no qual foi induzida pressão. Os resultados foram normalizados em relação aos respectivos valores de IC_{50} da forma de trofozoíto. Análise de significância estatística foi realizada por ANOVA. Valores de $p < 0,05$ indicam diferenças significativas. Código de significância estatística: ns: não significativo, *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ e ****: $p < 0,0001$. ATV: Atovaquona e CQ: cloroquina.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para os compostos **4** e **7** foi possível observar que o estágio de trofozoíto foi a morfologia mais sensível ao tratamento com inibidor. Os estágios de anel e esquizonte, por sua vez, foram menos sensíveis aos inibidores. Em ambos os compostos, esses dois estágios demonstraram valores de IC₅₀ entre 10 e 100 vezes maiores que os valores observados contra o estágio de trofozoíto.

Esse padrão de seletividade de estágio se repetiu no caso dos antimaláricos controle atovaquona e cloroquina, nos quais foi observada menor sensibilidade dos estágios de anel e esquizonte, em contraste, o estágio de trofozoíto foi mais sensível aos inibidores. A diferença foi de, pelo menos, 40 vezes entre valores de IC₅₀ para a atovaquona, e cerca de 2 vezes para a cloroquina. Essa observação está de acordo com dados da literatura de caracterização da atovaquona¹¹⁸ e cloroquina.¹¹⁹⁻¹²¹

4.5 Ensaio *ex vivo* de maturação de esquizontes (SMT)

As cepas de cultivo de *P. falciparum* estabelecidas em laboratório são cepas padronizadas obtidas da organização MR4. Essas cepas são extremamente úteis para a avaliação da atividade inibitória de compostos em geral fora de zonas endêmicas, bem como por sua padronização e o conhecimento já coletado sobre elas.

No entanto, tais cepas muitas vezes foram geradas a partir de um único clone do parasito, fornecendo uma população bastante geneticamente homogênea (como é o caso da 3D7).¹²² Além disso, a maioria dessas cepas foram isoladas há vários anos e assim retratam a situação de um isolado clínico obtido em outra época. Esse contexto pode não refletir as condições às quais as linhagens circulantes de *Plasmodium* estão submetidas, tais como a recombinação gênica que podem ocorrer durante o estágio sexuado do parasito no mosquito e as pressões de drogas aplicadas sobre populações locais atuais, as quais adicionam pressões seletivas sobre as populações de parasitos.¹²³⁻¹²⁴

Consequentemente, ensaios *ex vivo* contra as linhagens circulantes de zonas endêmicas se apresentam como uma alternativa muito interessante para avaliação da atividade inibitória de compostos em investigação contra isolados de parasitos relevantes atualmente. Além disso, esse tipo de ensaio permite a avaliação da atividade de inibidores não só em *P. falciparum* como também em *P. vivax*, parasito

de particular interesse no Brasil, cuja cultura contínua em laboratório ainda não foi estabelecida.

Os compostos foram testados por meio do teste de maturação de esquizontes (SMT) em isolados de 5 pacientes infectados com *P. falciparum* e 6 pacientes com *P. vivax*. As distribuições de valores de IC_{50} calculados a partir das contagens de gotas espessas estão mostrados na Figura 19 e a Tabela 4 indica os valores de mediana e o intervalo de confiança de 95% (IC95%) das distribuições.

Figura 19 – Distribuição dos valores de IC_{50} no ensaio SMT contra cepas circulantes de *P. vivax* (tempo médio de incubação ~30h) e *P. falciparum* (tempo médio de incubação ~45h). Os p-valores do teste estatístico de Mann-Whitney entre as amostras de *P. vivax* e *P. falciparum* estão indicados na parte superior do gráfico.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 4 - Avaliação da potência inibitória *ex vivo* dos compostos 4-quinolinonas contra isolados circulantes de *P. vivax* e *P. falciparum* no ensaio de maturação de esquizontes (SMT).

#	IC ₅₀ no Ensaio SMT <i>ex vivo</i> (mediana [intervalo], µM)	
	<i>P. falciparum</i> (N = 5)	<i>P. vivax</i> (N = 6)
4	0,58 [0,13 - 2,98]	3,3 [1,5 – 5,6]
7	0,49 [0,13 - 0,95]	1,5 [1,3 - 1,6]

Fonte: Elaborada pela autora.

Os valores de IC_{50} obtidos contra *P. falciparum* para os dois compostos (**4**: $IC_{50} = 0,58 \mu M$, **7**: $IC_{50} = 0,49 \mu M$) foram coerentes com os valores obtidos nos ensaios *in vitro* contra as cepas de cultura de laboratório (**4**: $IC_{50} = 0,47 \mu M$, **7**: $IC_{50} = 0,21 \mu M$) (Tabelas 2 e 4). Já no caso dos pacientes com *P. vivax*, os valores de IC_{50} encontrados foram significativamente maiores que aqueles encontrados em *P. falciparum*. Essa divergência pode ser causada por variações entre as espécies, que tornam o parasito *P. vivax* menos suscetível a esses compostos. No entanto, uma explicação mais provável é o caráter mais misto da população morfológica dos isolados de *P. vivax* coletados em relação aos isolados de *P. falciparum*, os quais estavam mais sincronizados na forma de anel. Isso gerou uma redução nos tempos de incubação das amostras de *P. vivax*, para prevenir a perda dos esquizontes que atingissem maturação completa e liberassem seus merozoítos. Dessa forma, foi observado um tempo de incubação médio consideravelmente menor nas amostras de *P. vivax* do que nas de *P. falciparum* (diferença de 30 h de incubação para cerca de 45 h, respectivamente). Esse fator, associado ao modo de ação lento que foi observado nos compostos, foi provavelmente o causador dos valores de IC_{50} aumentados. Essa é uma limitação do ensaio já relatada na literatura, em relação à avaliação da potência de compostos de atividade lenta.¹²⁵ Uma repetição dos ensaios *ex vivo*, otimizando o tempo de incubação será necessária para confirmar os valores de IC_{50} obtidos.

4.6 Ensaios de combinação com antimaláricos convencionais

Com o objetivo de buscar candidatos potenciais para uso em conjunto com as 4-quinolinonas em uma possível terapia de combinação, foram realizados ensaios de associação de inibidores contra o parasito *P. falciparum* (cepa 3D7). Esses ensaios foram conduzidos visando-se a avaliação do comportamento dos compostos mais promissores da série em combinação com antimaláricos convencionais. Os compostos **4** e **7** foram combinados com quatro antimaláricos convencionais: artesunato, cicloguanil, atovaquona e proguanil. Foram conduzidos dois experimentos independentes para cada combinação e os perfis de combinação resultantes estão apresentados nas Figuras 20-23. Neles, os pontos em vermelho indicam os dados experimentais obtidos de cada combinação e a curva preta e

regiões em cinza representam a isóbola aditiva calculada a partir dos experimentos realizados e o desvio padrão da mesma, respectivamente.

Os isobogramas de combinação dos derivados 4-quinolinonas com os antimaláricos artesunato (ART) e atovaquona (ATV) estão ilustrados nas Figuras 20 e 21, respectivamente. Em ambos os casos, a maioria dos pontos de combinação estão distribuídos dentro ou muito próximos da região de aditividade para ambos os derivados 4-quinolinonas, sugerindo um perfil de combinação aditiva. Já no caso do antimalárico cicloguanil (CG), cujos isobogramas estão exibidos na Figura 22, a distribuição dos pontos se localiza em valores de FIC_{50} acima da região de aditividade, indicando que a combinação dos derivados 4-quinolonas com esse antimalárico é antagônica, ou seja, a combinação dos derivados 4-quinolonas com o cicloguanil reduz a potência inibitória dos mesmos.

Figura 20 – Isobogramas e isóbulas aditivas calculadas para as associações do antimalárico artesunato com os compostos **4** (esquerda) e **7** (direita). FIC_{50} : IC_{50} fracional; ART: artesunato.

Fonte: Elaborada pela autora

Figura 21 – Isobogramas e isóbulas aditivas calculadas para as associações do antimalárico atovaquona com os compostos **4** (esquerda) e **7** (direita). FIC_{50} : IC_{50} fracional; ATV: atovaquona.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 22 – Isobogramas e isóbulas aditivas calculadas para as associações do antimalárico cicloguanil com os compostos **4** (esquerda) e **7** (direita). FIC_{50} : IC_{50} fracional; CG: cicloguanil.

Fonte: Elaborada pela autora.

Finalmente, os isobogramas de combinação com o antimalárico proguanil (PG) estão mostrados na Figura 23. Neles, a distribuição dos pontos experimentais possui um claro caráter sinérgico. Neste caso, observamos uma potencialização do efeito inibitório de cada um dos componentes quando utilizados em combinação.

Figura 23 – Isobogramas e isóbulas aditivas calculadas para as associações do antimalárico proguanil com os compostos **4** (esquerda) e **7** (direita).

FIC₅₀: IC₅₀ fracional; PG: proguanil.

Fonte: Elaborada pela autora.

Dessa forma, foi possível identificar o proguanil como um parceiro promissor em termos de uma possível terapia de combinação, devido ao sinergismo observado na associação entre ele e os derivados 4-quinolinonas. Foi interessante a constatação desse perfil, devido ao sinergismo também observado na combinação entre o proguanil e a atovaquona, cujo alvo molecular é o citocromo bc1 do parasito. Embora não seja possível confirmar o mecanismo de ação de qualquer composto somente baseado em seu perfil de combinação, os dados obtidos nestes experimentos sugerem que o citocromo bc1 do plasmódio é um potencial alvo dos compostos **4** e **7**, representativos da série 4-quinolinonas.¹⁰⁰

Os resultados do ensaio de combinação indicam que os antimaláricos artesunato e atovaquona também seriam adequados para utilização em combinação com as 4-quinolinonas, pois não foram observados efeitos deletérios na potência dos derivados 4-quinolinonas e dos fármacos. Por outro lado, a combinação com o cicloguanil se mostrou muito desfavorável.

4.7 Ensaio enzimático de inibição do citocromo bc1

No decorrer dos ensaios de tempo e estágio de ação, os compostos **4** e **7** demonstraram resultados bastante similares àqueles da atovaquona, utilizada como controle. Dado esse comportamento similar, a existência de sinergismo na

combinação desses compostos com o proguanil e a relativa similaridade estrutural dos compostos 4-quinolinonas com a ubiquinona (substrato do complexo bc1), foi realizado o ensaio de atividade enzimática ubiquinol-citocromo c oxidoreductase com o citocromo bc1 de *P. falciparum*. Esse ensaio foi conduzido utilizando a fração mitocondrial extraída do parasito da cepa 3D7 mantido em cultivo no laboratório, de forma a poder comparar os valores de IC₅₀ obtidos no ensaio de inibição enzimática com aqueles obtidos no ensaio fenotípico contra o parasito.

Inicialmente, a capacidade inibitória dos compostos **4**, **7** e **22** contra o citocromo bc1 foi avaliada em concentração única de 2 µM. As curvas obtidas para cada composto estão mostradas na Figura 24, e a atovaquona foi utilizada a 1 µM como controle positivo de inibição.

Figura 24 – Curvas de inibição em concentração única (2 µM) no ensaio enzimático do citocromo bc1 de *P. falciparum*. A atividade enzimática foi monitorada em através da redução do citocromo c, dada pela diferença de absorvância entre 542 e 550 nm em função do tempo de monitoramento. Os controles negativo (DMSO 0,01%) e positivo (1 µM atovaquona) de inibição estão mostrados em verde e azul, respectivamente.

ATV: atovaquona.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os compostos **4**, **7** e **22** foram todos capazes de inibir a atividade enzimática do complexo bc1 em relação ao controle com DMSO, apesar de em um nível mais baixo que a atovaquona. Tendo em vista esse resultado, os três compostos foram então titulados no ensaio de inibição, com o objetivo de obter curvas concentração-resposta e determinar os respectivos valores de IC₅₀. Em paralelo, a titulação desses

compostos foi realizada também no ensaio enzimático contra o citocromo bc1 extraído de coração bovino. A avaliação contra o complexo bovino foi realizada no laboratório do Prof. Samar Hasnain, na Universidade de Liverpool (Reino Unido). Esse resultado foi utilizado como um modelo para a avaliação da seletividade dos compostos pelo citocromo bc1 de *P. falciparum* em relação ao complexo mamífero. Os valores de IC₅₀ obtidos contra o complexo bc1 de ambos os organismos, bem como os valores de índice de seletividade (IS) resultantes estão mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores de IC₅₀ e índices de seletividade (IS) dos ensaios de inibição enzimática do citocromo bc1 bovino e de *P. falciparum*.

#ID	IC ₅₀ Citocromo bc1 (média [IC95%], µM)		IS
	<i>P. falciparum</i>	Bovino	
4	7,2 [5,1 - 8,0]	6,6 [3,9 – 12,5]	0,92
7	0,50 [0,42 - 0,57]	>60	>120
22	0,88 [0,71 – 1,06]	5,8 [5,3 – 6,2]	6,6

Valores de IC₅₀ são dados na forma de média [IC95%], na unidade de µM.

IC95%: intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaborada pela autora

Como é possível observar, houve uma grande variação entre os valores de IC₅₀ obtidos para os três compostos. O derivado **7** foi o composto mais potente (IC₅₀^{bc1} = 0,50 µM), demonstrando valor de IC₅₀ contra o citocromo bc1 de *P. falciparum* muito similar aos valores obtidos contra o parasito no ensaio fenotípico (IC₅₀^{3D7} = 0,21 µM). Além disso, o composto demonstrou ótimo perfil de seletividade, com valor de IS >120 em relação ao complexo bc1 bovino. Já o composto **22**, apesar de possuir alta similaridade estrutural com o composto **7**, demonstrou valor mais alto de IC₅₀ contra o complexo bc1 do parasito e moderada seletividade (IS = 6,6). Esse fator pode ser devido à maior lipofilicidade do composto **22**, que pode ter causado interação deletéria com a fração mitocondrial do coração bovino. Finalmente, o composto **4** demonstrou um perfil de inibição do citocromo bc1 diferente dos outros dois compostos. O valor de IC₅₀ desse derivado contra o complexo bc1 foi significativamente maior do que o obtido no ensaio fenotípico contra o parasito (7,2 versus 0,47 µM, respectivamente). Além disso, o composto **4**

apresentou valor de IC_{50} igual a 6,6 μM contra o complexo bc1 bovino, indicando ausência de seletividade ($IS = 0,92$). Portanto, nossos dados indicam que os derivados 4-quinolinonas são inibidores do complexo bc1, sendo o composto **7** o derivado mais potente e seletivo para a enzima do parasito.

4.8 Ensaio de inibição da formação de oocinetos

Para determinar o potencial dos compostos da série como bloqueadores de transmissão, o composto **7** foi selecionado como representativo da série das 4-quinolinonas para a realização do ensaio de inibição da formação de oocineto, em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Daniel Bargieri do ICB-USP. Para essa avaliação, o compostos foi titulado a partir de 1 μM . O composto **7** demonstrou inibição da conversão a oocinetos com um valor de IC_{50} de 0,67 μM ($IC_{95\%}$ 0,59 – 0,75 μM). A Figura 25 mostra a curva de inibição obtida para esse composto, e o valor de IC_{50} dela obtido. Esse resultado demonstrou a atividade desse composto como potencial bloqueador de transmissão em concentrações similares às aquelas observadas contra as formas assexuadas sanguíneas ($IC_{50}^{3D7} = 0,21 \mu M$), explicitando a sua atividade contra mais de um estágio do ciclo de vida do parasito.

Figura 25 – Curva de inibição de formação de oocineto do composto **7**. O eixo de concentração no gráfico está na escala log, e o valor de IC_{50} resultante do composto está denotado no gráfico com seu respectivo intervalo de confiança de 95% entre colchetes.

Fonte: Elaborada pela autora

4.9 HQSAR

As 4-quinolinonas avaliadas nesta dissertação compuseram um conjunto de dados com 22 compostos com valores de IC_{50} determinados. Foi decidido construir um modelo HQSAR da série das 4-quinolinonas com o objetivo de obter um modelo preditivo da estrutura atividade desses compostos. Modelos desse tipo podem ajudar a guiar a síntese de novos compostos da série com boa potência inibitória, para posterior avaliação antiplasmodial.

Idealmente, um conjunto de dados para a construção de um modelo quantitativo da relação estrutura atividade deve conter integrantes com valores de IC_{50} homogeneamente distribuídos entre uma faixa aceitável de valores de IC_{50} . A série das 4-quinolinonas apresentou uma distribuição contínua no intervalo de valores de pIC_{50} ($-\log IC_{50}$) entre 4 e 7 (Figura 26). Desse modo, os dados foram utilizados para a construção de modelos QSAR.

Figura 26 – Distribuição das potências inibitórias do conjunto de 4-quinolinonas. (A) Número de compostos do conjunto em cada faixa de pIC₅₀. (B) Gráfico identidade dos valores de pIC₅₀ dos compostos, demonstrando a distribuição desigual de potências.

Fonte: Elaborada pela autora.

Inicialmente, o conjunto de compostos foi analisado usando o mapa de similaridade estrutural gerado pelo *software* SYBYL. O mapa indica o quão similares compostos são baseados em sua posição em um mapa 2D. A partir desse mapa, então, foi possível dividir os 22 compostos do conjunto de dados em 5 conjuntos, ou grupos estruturais, ilustrados na Figura 27. Levando-se em conta esse mapa de similaridade e a distribuição de valores de pIC₅₀ dos compostos, os 22 compostos foram alocados em um subconjunto teste de 4 compostos (compostos **8**, **13**, **18** e **19**) e um subconjunto treinamento com 18 compostos (compostos **1-7**, **9** a **12**, **14** a

17 e 20-22). A representatividade do conjunto treinamento foi priorizada, dado que este seria o conjunto usado para construir o modelo QSAR (Figura 28).

Figura 27 – Mapa de similaridade estrutural dos compostos 4-quinolinonas gerado pelo software SYBYL. As moléculas são distribuídas no espaço 2D do mapa de acordo com sua similaridade estrutural. Os valores de pIC_{50} das moléculas são caracterizadas de acordo com gradientes de cor (pIC_{50} crescente seguindo o gradiente de azul a vermelho) e de tamanho do círculo representado no mapa (tamanho crescente com potência do composto). As elipses vermelhas indicam os grupos (5 *clusters*) selecionado para determinação de representatividade estrutural dos conjuntos.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 28 – Gráficos de representatividade do conjunto total de dados e dos subconjuntos de treinamento e teste escolhidos. A alocação dos compostos para esses dois conjuntos foi feita de modo a maximizar a representatividade estrutural e de faixas de atividade nos dois subconjuntos em relação ao conjunto total.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para a geração dos modelos iniciais usando o método de HQSAR foram adotados os valores padrão de tamanho de fragmento estrutural de 4-7 átomos e varrendo possíveis comprimentos de hologramas moleculares de 53, 59, 61, 71, 83, 97, 151, 199, 257, 307, 353, 401, 449, 503, 547, 601 e 647 compartimentos. Foram testadas dez combinações de descritores para a criação de modelos iniciais, as quais estão detalhadas na Tabela 6. Os modelos foram avaliados de acordo com os

valores de validação q^2 e r^2 , e o erro padrão de correlação (SEE). Idealmente, bons modelos possuem $q^2 < 0,5$, $r^2 < 0,6$ e $SEE < 0,3$.¹²⁶

Tabela 6 - Parâmetros de validação interna dos modelos iniciais de HQSAR gerados para os derivados de 4-quinolinonas.

Modelo	Distinção de Fragmento	q^2	r^2	SEE	HL	N
1	A/B	0,532	0,918	0,306	97	5
2	A/B/C	0,562	0,95	0,239	83	5
3	A/B/C/H	0,588	0,964	0,212	53	6
4	A/B/C/H/Ch	0,588	0,964	0,212	53	6
5	A/B/C/H/DA	0,519	0,955	0,226	97	5
6	A/B/C/H/Ch/DA	0,551	0,824	0,414	97	3
7	A/B/C/DA	0,388	0,928	0,287	151	5
8	A/B/Ch/DA	0,404	0,954	0,239	97	6
9	A/B/H/DA	0,484	0,595	0,588	199	1
10	A/C/H/Ch/DA	0,535	0,972	0,185	59	6

Distinção de fragmento: A – átomo, B – ligação, C – conectividade, H – hidrogênio, Ch – quiralidade, DA – doadores e aceptores de ligação de hidrogênio; q^2 - coeficiente de correlação da validação cruzada; r^2 - coeficiente de correlação; SEE – erro padrão da correlação; HL – comprimento do holograma; N – número de componentes principais.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os modelos iniciais 2 e 3 (destacados em azul na Tabela 6) foram escolhidos para otimização. Os modelos 2 e 3 demonstraram parâmetros estatísticos satisfatórios. No entanto, este último apresentou baixo número de componentes (N), e dessa forma também foi selecionado para otimização.

Esses três modelos foram investigados variando o parâmetro tamanho de fragmento. Foram avaliados os fragmentos de 2-5, 3-6, 5-8, 6-9, 7-10 e 8-11 átomos, além do padrão de 4-7 átomos utilizado na busca inicial. A Tabela 7 demonstra os melhores modelos obtidos a partir da otimização desse parâmetro para os conjuntos de descritores A/B/C e A/B/C/H.

Tabela 7 – Investigação dos parâmetros de validação resultantes de modelos HQSAR gerados por variação de tamanhos de fragmentos estruturais. Os modelos selecionados para otimização adicional estão destacados em azul.

Distinção de Fragmento	Tamanho do fragmento	q^2	r^2	SEE	HL	N
A/B/C	2 – 5	0,563	0,944	0,253	307	5
	3 – 6	0,559	0,943	0,254	307	5
	4 – 7	0,562	0,95	0,239	83	5
	5 – 8	0,461	0,924	0,295	151	5
	6 – 9	0,497	0,897	0,343	83	5
A/B/C/H	2 – 5	0,581	0,734	0,493	449	2
	3 – 6	0,552	0,737	0,489	1449	2
	4 – 7	0,588	0,964	0,212	53	6
	5 – 8	0,685	0,977	0,169	53	6
	6 – 9	0,651	0,927	0,278	59	4

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir de cada um dos modelos iniciais, foram então selecionados os dois modelos destacados em azul na Tabela 7 para otimização adicional. O próximo passo de otimização realizado foi a avaliação da redução do número de componentes e seu efeito sobre os parâmetros de validação. Esse estudo foi realizado com o objetivo de reduzir a probabilidade de sobreajuste do modelo. Durante essa etapa, a redução no número de componentes de um modelo foi aceita quando não causasse uma redução maior que 10% no valor de q^2 do modelo resultante. A Tabela 8 abaixo detalha a influência do número de componentes nos parâmetros de validação. Os parâmetros dos modelos escolhidos para otimização adicional estão destacados em azul.

Tabela 8 – Variação dos parâmetros de validação durante na investigação do número de componentes do modelo. Os modelos selecionados para otimização estão destacados em azul.

Distinção de Fragmento	N	q^2	r^2	SEE	HL
A/B/C 4 – 7	5	0,562	0,95	0,239	83
	4	0,53	0,918	0,294	307
	2	0,514	0,78	0,448	307
A/B/C/H 6 – 9	4	0,651	0,927	0,278	59
	3	0,592	0,893	0,323	59

Fonte: Elaborada pela autora.

Após a escolha desses dois modelos, foi feita a busca de *outliers* no modelo, ou seja, compostos que, quando removidos do conjunto treinamento, aumentaram o valor do q^2 em pelo menos 10%. A Tabela 9 detalha os modelos obtidos a partir desse estudo, os quais avançaram para a avaliação de poder preditivo.

O composto **16** foi detectado como *outlier* e removido de ambos os modelos. Seu efeito sobre os parâmetros de validação interna pode ter sido causado por sua grande similaridade estrutural com o composto **15** (em relação ao qual se diferencia somente por um átomo de C) e a grande alteração resultante em seu IC₅₀ (de 1,7 µM no composto **15** para 26 µM no composto **16**). Esse tipo de situação é de difícil modelagem por QSAR, pois indica uma descontinuidade na relação estrutura atividade. Dessa forma, é provável que os modelos criados não fossem capazes de conciliar bem essa variação abrupta de IC₅₀ causada por uma alteração estrutural mínima, reduzindo a capacidade do modelo de correlacionar os dados estruturais com os valores de IC₅₀ dentro do conjunto treinamento.¹²⁷

Tabela 9 – Variação dos parâmetros de validação durante na investigação do número de componentes do modelo. Os modelos selecionados para otimização estão destacados em azul.

Modelo	Distinção de Fragmento	N	q^2	r^2	HL	N	Outlier removido
1	A/B/C 4 – 7	4	0,666	0,937	307	4	16
2	A/B/C/H 6 – 9	3	0,687	0,916	59	3	16

Fonte: Elaborada pela autora.

Para a seleção do melhor modelo, determinamos o poder preditivo dos dois modelos selecionados. Nesse sentido, cada modelo foi usado para prever os valores de pIC_{50} dos compostos do subconjunto teste. A determinação do poder preditivo foi feita pelo cálculo do parâmetro r^2_{pred} . Esse parâmetro leva em conta o desvio dos valores preditos de pIC_{50} em relação aos valores experimentais, bem como a diferença entre os valores experimentais e a média de todos os valores de pIC_{50} do conjunto de dados. Valores de r^2_{pred} acima de 0,5 são indicativos de um modelo final preditivo.

Como demonstrado na Figura 29, no entanto, nenhum dos modelos criados derivou um modelo final preditivo, dados os valores de r^2_{pred} abaixo de 0,5 (-0,36 e -0,42, respectivamente). A Figura 29 ilustra os gráficos de pIC_{50} experimental ($\text{pIC}_{50}^{\text{exp}}$) por pIC_{50} predito ($\text{pIC}_{50}^{\text{pred}}$) dos três modelos. O grande espalhamento dos compostos do conjunto teste em relação à diagonal de identidade (na qual $\text{pIC}_{50}^{\text{pred}} = \text{pIC}_{50}^{\text{exp}}$) evidencia a baixa preditividade dos modelos obtidos.

Figura 29 – Gráficos representando a distribuição dos valores de pIC_{50} experimentais e preditos. Os pontos em vermelho representam os compostos do subconjunto teste, e os pontos em preto os compostos do subconjunto treinamento. Os valores de r^2_{pred} para cada modelo final obtido estão mostrados em cada um dos gráficos.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em ambos os gráficos na Figura 29, é possível observar que um dos pontos do conjunto teste (ponto referente ao composto **18**, que possui o maior pIC_{50} experimental do conjunto) apresentou um desvio muito maior que os outros em relação à diagonal de identidade. Para avaliação de seu efeito sobre o parâmetro de preditividade, esse ponto foi excluído do conjunto teste e foi recalculado o r^2_{pred} para os dois modelos. Isso resultou em um aumento considerável no valor desse

parâmetro, de -0,36 para 0,59 para o Modelo 1 e de -0,42 para 0,89 para o Modelo 2 (Figura 30).

Figura 30 – Gráficos representando a distribuição dos valores de pIC₅₀ experimentais e preditos após remoção do composto **18** do conjunto teste. Os pontos em vermelho representam os compostos do subconjunto teste, e os pontos em preto os compostos do subconjunto treinamento. Os valores de r^2_{pred} para cada modelo estão mostrados em cada um dos gráficos.

Fonte: Elaborada pela autora.

Isso indica que ambos os modelos não foram capazes de prever precisamente o valor de pIC₅₀ do composto **18**, cujo pIC₅₀ experimental (5,15) é o mais alto do conjunto teste escolhido. Ambos atribuíram um valor de pIC₅₀^{pred} mais de 1,2 unidades logarítmicas maior que o valor experimental. No entanto, ambos os modelos foram preditivos quando foram avaliados os compostos com os menores valores de pIC₅₀ experimental no conjunto teste (compostos **8**, **13** e **19**, com valores de pIC₅₀ de 4,95, 4 e 4,50). Esses compostos se distribuem em uma faixa de valores de pIC₅₀ mais baixos para a qual existe maior cobertura no conjunto treinamento.

Dessa forma, os modelos criados demonstraram boa qualidade estatística e predição interna, no entanto eles foram preditivos somente para compostos com valores de pIC₅₀ mais baixos. Dessa forma, foi concluído que o conjunto inicial de dados é demasiadamente desbalanceado na distribuição dos valores de potência inibitória e o número de compostos disponíveis para a criação dos modelos ainda é relativamente pequeno. Dada essa observação, a síntese e avaliação antiplasmodial de novos derivados 4-quinolinonas seria muito importante para a construção de um modelo QSAR mais robusto e com poder preditivo para valores mais altos de pIC₅₀.

5 DISCUSSÃO

A malária tem um impacto significativo em termos de saúde e desenvolvimento socioeconômico, e sua longa história com a humanidade testemunha quanto à dificuldade de sua erradicação. Entre dezenas de antimaláricos, inseticidas, programas de controle e crescentes investimentos públicos e privados, sua eliminação ainda nos elude. Com esse cenário, os esforços contra a doença estão cada vez mais coordenados mundialmente, para o desenvolvimento em conjunto de novas barreiras contra a doença.

Neste trabalho, o ponto de início para a busca de novos antimaláricos foi uma série de derivados da 4-quinolinona. Inicialmente, avaliamos a atividade antiplasmodial desses compostos em ensaios fenotípicos contra cepas de laboratório de *P. falciparum*. No contexto de pesquisa de malária, a busca de inibidores do parasito por meio de triagens fenotípicas é vantajosa pois inclui intrinsecamente a avaliação da capacidade do composto de penetrar as hemácias e ser internalizado pelo parasito. Além disso, a avaliação dos compostos contra o parasito como um todo não impõe a limitação de um alvo molecular específico, permitindo uma avaliação mais abrangente do perfil antiplasmodial de compostos.¹²⁸

Durante este período do estudo, foram testados 22 derivados 4-quinolinonas, dos quais 9 (41%) foram ativos ($IC_{50} < 10 \mu M$) e 3 deles (14%) com valores de IC_{50} abaixo de $1 \mu M$. Os derivados com atividade antiplasmodial foram então submetidos a avaliação da atividade hemolítica e do perfil de citotoxicidade contra células de hepatoma humano. Esses estudos de toxicidade revelaram que todos os derivados 4-quinolinonas ativos foram também seletivos, uma característica necessária para a consideração de um composto para desenvolvimento.

Os compostos mais potentes da série (**4**, **7** e **22**) foram também testados contra três cepas de *P. falciparum* resistentes a antimaláricos, para avaliar a existência de resistência cruzada. A cepa K1 é multirresistente, apresentando resistência a cloroquina, pirimetamina e cicloguanil, enquanto a cepa IPC4912 demonstra resistência parcial à artemisinina. Por sua vez, a cepa TM90C6B é uma cepa advinda de um isolado clínico resistente à atovaquona, e possui a mutação Y268S no citocromo b, que atribui esse perfil de resistência.¹²⁹ Os valores de potência inibitória nas cepas resistentes foram similares àqueles observados na

cepa sensível 3D7 (IR <3), dessa forma não foi demonstrada resistência cruzada aos compostos. Esse resultado é promissor pois sugere que as 4-quinolinonas seriam ativas mesmo em regiões onde isolados circulantes de *Plasmodium* já foram expostos a esses antimaláricos.

Foi possível também confirmar a potência antiplasmodial dos compostos contra linhagens circulantes de *P. falciparum* e *P. vivax* da região de Porto Velho, Rondônia. Isso foi feito através de um ensaio *ex vivo* com amostras de sangue de pacientes infectados, e nos mostrou que os compostos são de fato ativos contra linhagens atuais do parasito. Essas linhagens são relevantes para a avaliação inibitória principalmente em termos dos perfis de resistência presentes, devido à exposição anterior a tratamentos antimaláricos.

A fim de caracterizar melhor os compostos da série, foi conduzida uma investigação para determinar a forma como as 4-quinolinonas sintetizadas agiam sobre o parasito. Isso incluiu uma avaliação do tempo de ação dos compostos bem como um estudo do efeito deles sobre cada estágio de vida do parasito (anel, trofozoíto e esquizonte). Durante os ensaios, foram mantidos controles de antimaláricos de ação lenta (atovaquona) e rápida (cloroquina) para efeito de comparação. Observamos modo de ação lento para os derivados 4-quinolinonas, os quais necessitaram de um tempo de incubação de pelo menos 48 h para atingirem sua atividade máxima.

Compostos de modo de ação lento requerem atenção redobrada quando associados a um tempo mais longo de eliminação do organismo, devido à maior “janela” de oportunidade para seleção e disseminação de parasitos resistentes. Dentro dessa janela, o parasito está exposto ao composto no organismo em concentrações com efeito antiplasmodial reduzido, o que pode acarretar a seleção mais rápida de parasitos resistentes conforme a concentração do composto no organismo decai.¹³⁰ Além disso, a existência de um tempo inicial antes de ser atingida a taxa máxima de morte do parasito significa uma demora no alívio dos sintomas da doença.¹¹⁷ No entanto, existem exemplos atuais de antimaláricos efetivos cujo modo de ação é lento, incluindo a atovaquona e pirimetamina. Ademais, no paradigma atual que prioriza o uso de terapias de combinação, a associação de um composto com modo de ação lento com um antimalárico de ação rápida minimizaria as desvantagens citadas.

Durante a caracterização do modo de ação dos compostos, ficou clara uma grande similaridade entre as propriedades biológicas dos inibidores 4-quinolinonas com o antimalárico atovaquona, incluindo seu tempo de ação (efeito morfológico e inibição quantitativa ao longo do tempo)¹¹⁷ e estágio de ação (o estágio de trofozoíto foi o mais sensível ao tratamento tanto nas 4-quinolinonas como na atovaquona).¹¹⁸ Com base na similaridade do modo de ação das 4-quinolinonas com a atovaquona, e sabendo da literatura que algumas quinolinonas demonstraram atividade contra o complexo bc1,¹³¹⁻¹³² avaliamos a inibição da atividade enzimática do citocromo bc1 de *P. falciparum* pelos compostos 4-quinolinonas. Isso resultou na confirmação do citocromo bc1 como o alvo da série de 4-quinolinonas. Foi possível observar através da avaliação de inibição contra o citocromo bc1 bovino que o composto **7** possui não só a maior potência inibitória entre os três compostos testados ($IC_{50}^{bc1} = 0,5 \mu M$), como a maior seletividade ($IS > 120$), tornando este o composto mais promissor da série. Os compostos **4** e **22** demonstraram menor potência e, apesar da similaridade estrutural ao composto **7**, não foram muito seletivos ($IS < 10$).

A fim de investigar a razão estrutural para as grandes diferenças de seletividade observadas para os três compostos, foi realizada uma tentativa de cocristalização do complexo citocromo bc1 bovino com os compostos **4**, **7** e **22**. Mesmo com a variação de concentração dos compostos até altas concentrações, não foi possível obter um conjunto de dados do complexo bc1 cocristalizado com esses inibidores.

O citocromo bc1 é um alvo validado de *Plasmodium*. Como mencionado, ele é o alvo molecular da atovaquona, antimalárico em uso atualmente. A resistência à atovaquona já foi constatada em algumas regiões do mundo,¹³³⁻¹³⁴ o que torna interessante a busca de compostos com esse alvo terapêutico aos quais o parasito não seja resistente. Nesse sentido, foi importante determinar se cepas resistentes à atovaquona seriam resistentes às 4-quinolinonas da série. No entanto, como foi observado durante a caracterização inicial da potência inibitória dos compostos, não foi constatada resistência cruzada frente a cepa TM90C6B resistente a atovaquona. Essa é uma indicação de que a mutação observada nessa cepa não inviabilizou a atividade das 4-quinolinonas testadas. Isso sugere que esses compostos seriam efetivos mesmo em populações previamente expostas à atovaquona, agindo contra o citocromo bc1 do parasito.

Outro aspecto interessante da avaliação de inibidores do complexo bc1 é que, como foi demonstrado recentemente, a exposição de mosquitos infectados com *Plasmodium* à atovaquona inibe a transição do parasito de zigoto a oocineto dentro do mosquito, bloqueando a transmissão do parasito.⁸⁴ Com objetivo de avaliar a existência de atividade similar nos compostos 4-quinolinonas, foi avaliada a atividade bloqueadora de transmissão do composto **7** através de ensaio *in vitro* de inibição de conversão a oocineto. De fato, foi observada atividade inibitória do composto **7** contra as formas sexuadas do parasito, com potência similar àquela observada contra os estágios assexuados. Essa constatação acrescenta muito valor à série de compostos, dado que uma das prioridades atuais na busca de novos antimaláricos é a obtenção de compostos que ajam em mais de uma parte do ciclo de vida do parasito.

Isso fica claro em um artigo publicado em 2017 pelo MMV, delineando as novas prioridades na busca de tratamentos antimaláricos. Essas prioridades foram formuladas na forma de perfis de alvo-candidato (*target-candidate profiles*, ou TCPs) e perfis de alvo-produto (*target-product profiles*, ou TPPs).¹³⁵ Esses perfis indicam o que é necessário em termos de moléculas (TCPs) e terapias (TPPs) a serem desenvolvidos para a malária. A Tabela 10 delineia os dois TPPs estabelecidos pelo MMV, bem como os 5 TCPs que são prioridades para o estabelecimento desses TPPs. Os resultados obtidos com os compostos 4-quinolinonas demonstram que essas moléculas atendem os requisitos para os TCPs 1 (eliminam a parasitemia sanguínea de estados assexuados) e 5 (atuam como bloqueadores de transmissão afetando os estágios sexuados do parasito). Dessa forma, esses compostos são candidatos promissores para a formulação de um tratamento de acordo com o TPP-1, enfatizando seu potencial para a descoberta de compostos líderes para a malária. Sua combinação com outra molécula ativa contra as formas sanguíneas do parasito seria ideal para evitar resistência, e o uso adicional de um composto hipnozonticida no caso de infecções por *P. vivax* e *P. ovale* apoiariam a eficácia do tratamento desenvolvido.

Tabela 10 – Perfis alvo produto (TPPs) e perfis alvo candidato (TCPs) delineados pelo MMV para o desenvolvimento de novas terapias antimaláricas.

Perfil	Plano de aplicação
TPP-1	Gestão de casos; tratamento da malária aguda não complicada. Utilização de de duas ou mais moléculas em combinação, com atividade TCP-1, além de TCP-5 para reduzir a transmissão e TCP-3 para prevenção de relapso.
TPP-2	Quimioproteção: tratamento administrado a pacientes migrando para áreas de alta endemicidade ou em situação epidêmica. Utilização de candidato com atividade TCP-4, potencialmente com atividade TCP-1 para o caso de infecções em estágios iniciais.
TCP-1	Moléculas que eliminam a parasitemia de estágios sanguíneos assexuados
TCP-3	Moléculas com atividades contra hipnozoítos (principalmente de <i>P. vivax</i>)
TCP-4	Moléculas com atividade contra esquizontes hepáticos
TCP-5	Moléculas que bloqueiam transmissão (tendo como alvo gametócitos do parasito)
TCP-6	Moléculas que bloqueiam a transmissão visando o vetor de inseto (endectocidas)

Fonte: Adaptada de BURROWS et al.¹³⁵

Tendo isso em mente, foi realizada uma avaliação do perfil de associação dos compostos **4** e **7**, a fim de estudar o comportamento da atividade antiplasmodial desses compostos em associação com possíveis parceiros de combinação. Esse estudo indicou um perfil aditivo de combinação com os antimaláricos artesunato e atovaquona e um perfil antagônico de associação com o cicloguanil. O resultado mais interessante observado foi a combinação com o antimalárico proguanil, que demonstrou um perfil claramente sinérgico. Dessa forma, o artesunato, atovaquona e especialmente o proguanil se mostraram antimaláricos promissores para uma terapia de combinação.

Atualmente, as terapias de combinação com derivados de artemisinina (ACTs) constituem a mais interessante e efetiva alternativa terapêutica antimalárica. Nesse contexto, poderia ser relevante a avaliação de um perfil de associação triplo: uma 4-quinolinona com proguanil em associação com um derivado de artemisinina como o artesunato, para determinar o perfil combinatório resultante e sua viabilidade.

Finalmente, para auxiliar o planejamento de novas moléculas da série, construímos modelos HQSAR a partir dos resultados fenotípicos obtidos. Foi feita uma divisão dos compostos em conjuntos com representatividade maximizada

estruturalmente e em termos de potência inibitória, e foram otimizados ao máximo os modelos construídos, permitindo a criação de dois modelos finais. Os modelos apresentaram consistência interna e relevância estatística, contudo, o poder de predição para novos derivados ainda é baixo. Isso provavelmente se deu pelo número relativamente limitado de compostos disponíveis para a construção do modelo, e a distribuição tendenciosa de valores de IC_{50} do conjunto. A síntese de novos compostos estruturalmente diversos para inclusão no conjunto de dados seria vantajosa para guiar o planejamento de novos compostos 4-quinolinonas.

Dessa forma, os compostos estudados no presente trabalho demonstram perfil de atividade antiplasmodial interessante para o desenvolvimento como compostos líderes, porém é necessária uma maior otimização da série e sua avaliação *in vivo* para confirmação de seu potencial.

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A série de compostos caracterizada nesse trabalho foi constituída de 22 4-quinolinonas, entre as quais 9 demonstraram atividade antiplasmodial no ensaio fenotípico de inibição. Os valores de IC_{50} resultantes ficaram entre 0,15 e 8 μ M. Entre eles, os compostos mais promissores foram o **4**, **7** e **22**. Estes tiveram a maior potência inibitória, com valores de IC_{50} submicromolares, e foram bem tolerados por células de hepatoma humanas. Nenhuma das 4-quinolinonas demonstrou atividade hemolítica. Foi possível também confirmar a atividade inibitória dos compostos contra *P. falciparum* e *P. vivax* no ensaio *ex vivo* de inibição com amostras de sangue de pacientes infectados.

Os resultados de potência inibitória da série contra a cepa 3D7 foram usados na construção de modelos HQSAR para auxiliar o desenho de novos compostos para síntese. O número limitado de compostos e a distribuição desigual de seus valores de IC_{50} não permitiu a criação de modelos QSAR que fossem preditivos para compostos mais potentes. Seria de interesse a realização da síntese e determinação do IC_{50} de mais compostos 4-quinolinonas, para tornar a distribuição de potências mais abrangente, possibilitando a criação de modelos mais preditivos.

Pensando no possível uso desses compostos como tratamentos antimaláricos de combinação, foram realizados ensaios de associação com os antimaláricos artesunato, atovaquona, cicloguanil e proguanil. O proguanil se mostrou um parceiro de combinação promissor, devido ao perfil sinérgico resultante da combinação. Os antimaláricos artesunato e cloroquina também se mostraram parceiros viáveis, devido aos perfis aditivos de combinação observados das 4-quinolinonas com esses antimaláricos.

Durante uma caracterização do modo de ação desses compostos, foi observado seu modo de ação lento e seletivo para a forma de trofozoíto. Essas características, muito similares às da atovaquona, nos levaram a avaliar a inibição desses compostos contra a atividade enzimática do citocromo bc1 de *P. falciparum*. Foi possível então confirmar que o alvo molecular dos compostos foi o citocromo bc1, e o ensaio de inibição contra o citocromo bc1 bovino foi utilizado como modelo para avaliar a seletividade desses compostos contra o alvo molecular. Nesse ensaio foi demonstrada a seletividade do composto **7**, cujo índice de seletividade (IS >120) foi

muito superior aos dos compostos **4** e **22** (IS <10). O composto **7** demonstrou também atividade contra os estágios assexuados do parasito *P. berghei*, no ensaio de formação de oocineto.

Em conclusão, a caracterização da série de derivados 4-quinolinonas realizada no presente trabalho teve como foco a busca de novos candidatos para desenvolvimento como possíveis antimaláricos, e esse trabalho contribui para o conhecimento já reunido sobre a classe por outros grupos de pesquisa. Biagini et al,¹³¹ por exemplo, utilizou técnicas de quimioinformática como para buscar quinolinonas com características químicas otimizadas e atividade antiplasmodial. Winter et al.¹³² por outro lado, buscaram novas quinolinonas ativas por meio da otimização do esqueleto endoquina, descoberto em 1948 e previamente abandonado por sua instabilidade metabólica. Nesse contexto, com o presente trabalho pudemos contribuir para a área da descoberta de compostos antiplasmodiais com conhecimento sobre a atividade dessa série de derivados 4-quinolinonas, por meio de uma caracterização abrangente da série com ênfase em ensaios biológicos.

Como perspectivas para esse trabalho, mais estudos e otimização da série são necessários para melhorar a potência dos derivados e determinar a viabilidade desses compostos para a descoberta de candidatos a antimaláricos, no entanto até o momento a série se mostrou uma fonte promissora de compostos com atividade antiplasmodial. A otimização da solubilidade da série compostos é uma das prioridades na síntese de novos compostos, para melhorar seu potencial para a entrega de um composto líder promissor. Uma avaliação *in vivo* de sua atividade antiplasmodial também é essencial como prova de conceito da atividade antiplasmodial série, incluindo os três compostos mais promissores.

REFERÊNCIAS

- 1 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The top 10 causes of death**. 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>>. Acesso em: 28 set. 2019.
- 2 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2018**. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/275867/9789241565653-eng.pdf>>. Acesso em: 30 abr. 2019.
- 3 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the treatment of Malaria**. 3rd ed. Genebra: WHO, 2015.
- 4 TALAPKO et al. Malaria: The past and the present. **Microorganisms**, v. 7, n. 6, p. 179, 2019.
- 5 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2017**. 2017. Disponível em: <https://www.who.int/docs/default-source/documents/world-malaria-report-2017.pdf?sfvrsn=8b7b573a_0>. Acesso em: 23 jan. 2019.
- 6 SALLARES, R.; BOUWMAN, A.; ANDERUNG, C. The spread of malaria to Southern Europe in antiquity: new approaches to old problems. **Medical History**, v. 48, n. 3, p. 311–328, 2004.
- 7 ARROW, K. J.; PANOSIAN, C.; GELBAND, H. A brief history of malaria. In: _____. (Ed.). **Saving lives, buying time: economics of malaria drugs in an age of resistance**. Washington: National Academies Press, 2004. p. 125–135.
- 8 HEMPELMANN, E.; KRAFTS, K. Bad air, amulets and mosquitoes: 2,000 years of changing perspectives on malaria. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 232, 2013.
- 9 COX, F. E. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p. 5, 2010.
- 10 ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE (PAHO/OMS). **Malaria: general information**. Disponível em: <https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=2573:2010-general-information-malaria&Itemid=2060&lang=en>. Acesso em: 9 jul. 2019.
- 11 SACHS, J.; MALANEY, P. The economic and social burden of malaria. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 680–685, 2002.
- 12 MILLER, R. H. et al. Characterization of *plasmodium ovale curtisi* and *P. ovale wallikeri* in Western Kenya utilizing a novel species-specific real-time PCR assay. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 1, p. e0003469, 2015.
- 13 NEWTON, C. R. J. C. Neurological aspects of tropical disease: cerebral malaria. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 69, n. 4, p. 433–441, 2000.

14 LACERDA, M. V. et al. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. **Malaria Journal**, v. 11, n. 1, p. 12, 2012.

15 SIQUEIRA, A. M. et al. Characterization of *plasmodium vivax*-associated admissions to reference hospitals in Brazil and India. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 57, 2015.

16 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World malaria report 2016**. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/252038/9789241511711-eng.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 23 jan. 2018.

17 MALARIA CONSORTIUM. **Malaria prevention**. Disponível em: <https://www.malariaconsortium.org/malaria/malaria_control.htm>. Acesso em: 10 set. 2019.

18 PRYCE, J.; RICHARDSON, M.; LENGELER, C. Insecticide-treated nets for preventing malaria. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2, n. 11, p. 1–67, 2018.

19 ESPINOZA, J. Malaria resurgence in the americas: an underestimated threat. **Pathogens**, v. 8, n. 1, p. 11, 2019.

20 WORLD HEALTH ORGANIZATION; ROLL BACK MALARIA (RBM). **High burden to high impact: a targeted malaria response**. [2018. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/275868/WHO-CDS-GMP-2018.25-eng.pdf?ua=1>>. Acesso em: 27 set. 2019.

21 LOURENÇO, C. et al. Strengthening surveillance systems for malaria elimination: a global landscaping of system performance, 2015–2017. **Malaria Journal**, v. 18, n. 1, p. 315, 2019.

22 DHIMAN, S. Are malaria elimination efforts on right track? an analysis of gains achieved and challenges ahead. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 8, n. 1, p. 14, 2019.

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

24 BRASIL. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Malária - Brasil (2016-2018)**. Disponível em: <https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/MiniSivep1518_2019_01_16/casos_notificados_2018_regio_Amaznica>. Acesso em: 9 set. 2019.

25 LORENZ, C. et al. Spatial and temporal epidemiology of malaria in extra-Amazonian regions of Brazil. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 408, 2015.

26 BHATT, S. et al. Coverage and system efficiencies of insecticide-treated nets in Africa from 2000 to 2017. **eLife**, v. 4, n. 1, p. 1–37, 2015.

27 TIZIFA, T. A. et al. Prevention efforts for malaria. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 5, n. 1, p. 41–50, 2018.

- 28 ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS/OMS). **Interactive malaria statistics**. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=2632:2010-interactive-malaria-statistics&Itemid=2130&lang=en>. Acesso em: 9 set. 2019.
- 29 DELVES, M. et al. The activities of current antimalarial drugs on the life cycle stages of *plasmodium*: a comparative study with human and rodent parasites. **PLoS Medicine**, v. 9, n. 2, p. e1001169, 2012.
- 30 SIMONETTI, A. B. The biology of malarial parasite in the mosquito: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 5, p. 519–541, 1996.
- 31 BENNINK, S.; KIESOW, M. J.; PRADEL, G. The development of malaria parasites in the mosquito midgut. **Cellular Microbiology**, v. 18, n. 7, p. 905–918, 2016.
- 32 ARROW, K. J.; PANOSIAN, C.; GELBAND, H. The parasite, the mosquito, and the disease. In: _____. **Saving lives, buying time: economics of malaria drugs in an age of resistance**. Washington: National Academies Press, 2004. p. 136–167.
- 33 MATSUOKA, H. et al. A rodent malaria, *plasmodium berghei*, is experimentally transmitted to mice by merely probing of infective mosquito, *Anopheles stephensi*. **Parasitology International**, v. 51, n. 1, p. 17–23, 2002.
- 34 DONDORP, A. M. et al. Artemisinin resistance in *plasmodium falciparum* malaria. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 5, p. 455–467, 2009.
- 35 GOMES, A. P. et al. Malária grave por *plasmodium falciparum*. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 3, p. 358–369, 2011.
- 36 TERZAKIS, J. A. et al. Exoerythrocytic merozoites of *plasmodium berghei* in rat hepatic Kupffer cells. **Journal of Protozoology**, v. 26, n. 3, p. 385–389, 1979.
- 37 BAER, K. et al. Release of hepatic *plasmodium yoelii* merozoites into the pulmonary microvasculature. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 11, p. e171, 2007.
- 38 STURM, A. et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, v. 313, n. 5791, p. 1287–1290, 2006.
- 39 GOLDBERG, D. E. et al. Hemoglobin degradation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: an ordered process in a unique organelle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 8, p. 2931–2935, 1990.
- 40 WHITE, N. J. et al. Malaria. **Lancet**, v. 383, n. 9918, p. 723–735, 2014.
- 41 PHILLIPS, M. A. et al. Malaria. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 17050, 2017.
- 42 COWMAN, A. F. et al. Malaria: biology and disease. **Cell**, v. 167, n. 3, p. 610–624, 2016.

43 RICHARD CARTER, L. H. M. Recent developments in production and purification of malaria antigens: Evidence for environmental modulation of gametocytogenesis in *plasmodium falciparum* in continuous culture. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 57, n. S1, p. 37–52, 1979.

44 BRUCE, M. C. et al. Commitment of the malaria parasite *plasmodium falciparum* to sexual and asexual development. **Parasitology**, v. 100, n. 2, p. 191–200, 1990.

45 CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **About malaria** - biology. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>>. Acesso em: 9 set. 2019.

46 FIDOCK, D. A. Priming the antimalarial pipeline. **Nature**, v. 465, n. 7296, p. 297–298, 2010.

47 MEDICINES FOR MALARIA VENTURE (MMV). **Parasite lifecycle**. Disponível em: <<https://www.mmv.org/malaria-medicines/parasite-lifecycle>>. Acesso em: 28 jan. 2019.

48 WELLS, T. N. Natural products as starting points for future anti-malarial therapies: going back to our roots? **Malaria Journal**, v. 10, n. S1, p. S3, 2011.

49 BUTLER, A.; KHAN, S.; FERGUSON, E. A brief history of malaria chemotherapy. **Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh**, v. 40, n. 2, p. 172–177, 2010.

50 OLIVEIRA, A. B. et al. Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phythomedicines. part I. alkaloids. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 4, p. 715–740, 2009.

51 D'ALESSANDRO, U.; BUTTIENS, H. History and importance of antimalarial drug resistance. **Tropical Medicine and International Health**, v. 6, n. 11, p. 845–848, 2001.

52 CUETO, M. **Cold war, deadly fevers** : malaria eradication in Mexico, 1955-1975. Baltimore: Woodrow Wilson Center Press, 2007.

53 BAIRD, J. K. et al. Diagnosis and treatment of *plasmodium vivax* malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 6 Suppl, p. 35–51, 2016.

54 MESHNICK, S. R.; DOBSON, M. J. The history of antimalarial drugs. In: ROSENTHAL, P. J. (Ed.). **Antimalarial chemotherapy: mechanisms of action, resistance and new directions in drug discovery**. Totowa: Humana Press, 2001. p. 15–25.

55 CAMPO, B. et al. Killing the hypnozoite – drug discovery approaches to prevent relapse in *plasmodium vivax*. **Pathogens and Global Health**, v. 109, n. 3, p. 107–122, 2015.

- 56 WARHURST, D. C. Why are primaquine and other 8-aminoquinolines particularly effective against the mature gametocytes and the hypnozoites of malaria? **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 78, n. 2, p. 165–165, 1984.
- 57 FRAMPTON, J. E. Tafenoquine: first global approval. **Drugs**, v. 78, n. 14, p. 1517–1523, 2018.
- 58 TAN, K. R.; HWANG, J. Tafenoquine receives regulatory approval in USA for prophylaxis of malaria and radical cure of *plasmodium vivax*. **Journal of Travel Medicine**, v. 25, n. 1, p. 1–2, 2018.
- 59 LLANOS-CUENTAS, A. et al. Tafenoquine versus primaquine to prevent relapse of *Plasmodium vivax* malaria. **New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 3, p. 229–241, 2019.
- 60 LACERDA, M. V. G. et al. Single-dose tafenoquine to prevent relapse of *plasmodium vivax* malaria. **New England Journal of Medicine**, v. 380, n. 3, p. 215–228, 2019.
- 61 BAIRD, J. K. Tafenoquine for travelers' malaria: evidence, rationale and recommendations. **Journal of Travel Medicine**, v. 25, n. 1, p. 1–13, 2018.
- 62 MÜLLER, I. B.; HYDE, J. E. Antimalarial drugs: modes of action and mechanisms of parasite resistance. **Future Microbiology**, v. 5, n. 12, p. 1857–1873, 2010.
- 63 GOPALAKRISHNAN, A. M.; KUMAR, N. Antimalarial action of artesunate involves DNA damage mediated by reactive oxygen species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 1, p. 317–325, 2015.
- 64 MESHNICK, S. R. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 13, p. 1655–1660, 2002.
- 65 MENARD, D.; DONDORP, A. Antimalarial drug resistance: a threat to malaria elimination. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 7, p. a025619, 2017.
- 66 HAMILTON, W. L. et al. Evolution and expansion of multidrug-resistant malaria in southeast Asia: a genomic epidemiology study. **Lancet Infectious Diseases**, v. 19, n. 9, p. 943–951, set. 2019.
- 67 BHARATI, K.; GANGULY, N. K. Tackling the malaria problem in the South-East Asia Region: need for a change in policy? **Indian Journal of Medical Research**, v. 137, n. 1, p. 36–47, jan. 2013.
- 68 WORLDWIDE ANTIMALARIAL RESISTANCE NETWORK (WWARN). ***Plasmodium falciparum* and artemisinin combination therapies**. Disponível em: <<http://www.wwarn.org/about-us/malaria-drug-resistance/plasmodium-falciparum-and-artemisinin-combination-therapies>>. Acesso em: 9 set. 2019.
- 69 LIN, J. T.; JULIANO, J. J.; WONGSRICHANALAI, C. Drug-resistant malaria: the era of ACT. **Current Infectious Disease Reports**, v. 12, n. 3, p. 165–173, 2010.

70 MCCLURE, N. S.; DAY, T. A theoretical examination of the relative importance of evolution management and drug development for managing resistance. **Proceedings of the Royal Society B: biological sciences**, v. 281, n. 1797, p. 20141861, 2014.

71 WHITE, N. J.; HIEN, T. T.; NOSTEN, F. H. A brief history of qinghaosu. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 607–610, 2015.

72 FAURANT, C. From bark to weed: The history of artemisinin. **Parasite**, v. 18, n. 3, p. 215–218, 2011.

73 EASTMAN, R. T.; FIDOCK, D. A. Artemisinin-based combination therapies: a vital tool in efforts to eliminate malaria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 12, p. 864–874, 2009.

74 NOSTEN, F.; BRASSEUR, P. Combination therapy for malaria. **Drugs**, v. 62, n. 9, p. 1315–1329, 2002.

75 WHITE, N. Antimalarial drug resistance and combination chemotherapy. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: biological sciences**, v. 354, n. 1384, p. 739–749, 1999.

76 PINHEIRO, L. C. S. et al. Current antimalarial therapies and advances in the development of semi-synthetic artemisinin derivatives. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 1 suppl 2, p. 1251–1271, 2018.

77 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global technical strategy for malaria 2016-2030**. Geneva: WHO, 2015.

78 PATOUIILLARD, E. et al. Global investment targets for malaria control and elimination between 2016 and 2030. **BMJ Global Health**, v. 2, n. 2, p. e000176, 2017.

79 REN, M. Greater political commitment needed to eliminate malaria. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 8, n. 1, p. 28, 2019.

80 ANDRADA, A.; HERRERA, S.; YÉ, Y. Are new national malaria strategic plans informed by the previous ones? a comprehensive assessment of sub-Saharan African countries from 2001 to present. **Malaria Journal**, v. 18, n. 1, p. 253, 2019.

81 MATIYA, D. J. et al. Dynamics and monitoring of insecticide resistance in malaria vectors across mainland Tanzania from 1997 to 2017: a systematic review. **Malaria Journal**, v. 18, n. 1, p. 102, 2019.

82 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global report on insecticide resistance in malaria vectors: 2010 - 2016**. 2018. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272533/9789241514057-eng.pdf>>. Acesso em: 18 set. 2019.

83 TOÉ, K. H. et al. Increased pyrethroid resistance in malaria vectors and decreased bed net effectiveness, Burkina Faso. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 10, p. 1691–1696, 2014.

- 84 PATON, D. G. et al. Exposing *Anopheles* mosquitoes to antimalarials blocks *Plasmodium* parasite transmission. **Nature**, v. 567, n. 7747, p. 239–243, 2019.
- 85 SUMARNROTE, A. et al. Status of insecticide resistance in *Anopheles* mosquitoes in Ubon Ratchathani province, Northeastern Thailand. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 299, 2017.
- 86 PATH. **PATH's malaria vaccine initiative**. Disponível em: <<https://www.malariavaccine.org/about-us>>. Acesso em: 18 set. 2019.
- 87 BILL AND MELINDA GATES FOUNDATION. **What we do** - Malaria. Disponível em: <<https://www.gatesfoundation.org/what-we-do/global-health/malaria>>. Acesso em: 18 set. 2019.
- 88 MEDICINES FOR MALARIA VENTURE (MMV). **MMV-supported projects**. Disponível em: <<https://www.mmv.org/research-development/mmv-supported-projects>>. Acesso em: 18 set. 2019.
- 89 ATTA, H.; ZAMANI, G. The progress of roll back Malaria in the Eastern Mediterranean Region over the past decade. **Eastern Mediterranean Health Journal**, v. 14, n. S1, p. S82-S89, 2008.
- 90 WOODSON, T. S. Public private partnerships and emerging technologies: a look at nanomedicine for diseases of poverty. **Research Policy**, v. 45, n. 7, p. 1410–1418, 2016.
- 91 FRASER, N. et al. **Partnerships for malaria control**: engaging the formal and informal private sectors. Geneva: World Health Organization Press, 2006.
- 92 WELLS, T. N. C.; GUTTERIDGE, W. E. Malaria: new medicines for its control and eradication. In: PALMER, M. J.; WELLS, T. N. C (Ed.). **Neglected diseases and drug discovery**. Geneva: Royal Society of Chemistry, 2011. p. 1–32.
- 93 FERNANDO, D. et al. Use of a public-private partnership in malaria elimination efforts in Sri Lanka; a case study. **BMC Health Services Research**, v. 18, n. 1, p. 202, 2018.
- 94 UBBEN, D.; POLL, E. M. MMV in partnership: the Eurartesim® experience. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 211, 2013.
- 95 PIERRE HUGO. (MMV Access & Product Management Team). **Update on drug pipeline and market introduction**. Disponível em: <[https://endmalaria.org/sites/default/files/2_Pierre Hugo.pdf](https://endmalaria.org/sites/default/files/2_Pierre%20Hugo.pdf)>. Acesso em: 17 set. 2019.
- 96 MULLARD, A. Malaria medicine box expands. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, n. 10, p. 693–695, 2018.
- 97 ZHOU, F. et al. Oxygen dependent electron transfer in the cytochrome bc1 complex. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)** - bioenergetics, v. 1817, n. 12, p. 2103–2109, 2012.

98 BRANDT, U.; TRUMPOWER, B. The protonmotive Q cycle in mitochondria and bacteria. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, n. 3, p. 165–197, 1994.

99 BERRY, E. A. et al. Structure and function of cytochrome bc complexes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 1005–1075, 2000.

100 BARTON, V. et al. Inhibiting *plasmodium* cytochrome bc1: a complex issue. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, n. 4, p. 440–446, 2010.

101 BIAGINI, G. A. et al. Acridinediones: selective and potent inhibitors of the malaria parasite mitochondrial bc1 complex. **Molecular Pharmacology**, v. 73, n. 5, p. 1347–1355, 2008.

102 ESSER, L.; YU, C-A.; XIA, D. Structural basis of resistance to anti-cytochrome bc1 complex inhibitors: implication for drug improvement. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 5, p. 704–724, 2014.

103 MACRAE, J. I. et al. Mitochondrial metabolism of sexual and asexual blood stages of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **BMC Biology**, v. 11, n. 1, p. 67, 2013.

104 LANG-UNNASCH, N.; MURPHY, A. D. Metabolic changes of the malaria parasite during the transition from the human to the mosquito host. **Annual Review of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 561–590, 1998.

105 PAINTER, H. J. et al. Specific role of mitochondrial electron transport in blood-stage *plasmodium falciparum*. **Nature**, v. 446, n. 7131, p. 88–91, 2007.

106 RAPHEMOT, R. et al. Discovery of dual-stage malaria inhibitors with new targets. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 3, p. 1430–1437, 2016.

107 DOWNIE, M. J.; KIRK, K.; MAMOUN, C. BEN. Purine salvage pathways in the intraerythrocytic malaria parasite *plasmodium falciparum*. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 8, p. 1231–1237, 2008.

108 LOOAREESUWAN, S. et al. Malarone (atovaquone and proguanil hydrochloride): a review of its clinical development for treatment of malaria. malarone clinical trials study group. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 4, p. 533–541, 1999.

109 WINTER, R. W. et al. Antimalarial quinolones: synthesis, potency, and mechanistic studies. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 4, p. 487–497, 2008.

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

111 LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. P. Synchronization of *plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. **Journal of Parasitology**, v. 65, n. 3, p. 418–20, 1979.

- 112 SMILKSTEIN, M. et al. Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 5, p. 1803–1806, 2004.
- 113 MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- 114 GRABOVSKY, Y.; TALLARIDA, R. J. Isobolographic analysis for combinations of a full and partial agonist: curved isoboles. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 310, n. 3, p. 981–986, 2004.
- 115 FISHER, N. et al. Human disease-related mutations in cytochrome b studied in yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 13, p. 12951–12958, 2004.
- 116 CALIT, J. et al. Screening the pathogen box for molecules active against *Plasmodium* sexual stages using a new nanoluciferase-based transgenic line of *P. berghei* identifies transmission-blocking compounds. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 11, p. e01053-18, 2018.
- 117 SANZ, L. M. et al. *P. falciparum* in vitro killing rates allow to discriminate between different antimalarial mode-of-action. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e30949, 2012.
- 118 PAINTER, H. J.; MORRISEY, J. M.; VAIDYA, A. B. Mitochondrial electron transport inhibition and viability of intraerythrocytic *Plasmodium falciparum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5281–5287, 2010.
- 119 CONTRERAS, C. E. et al. Stage-specific activity of potential antimalarial compounds measured in vitro by flow cytometry in comparison to optical microscopy and hypoxanthine uptake. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 179–184, 2004.
- 120 CAMBIE, G. et al. Chronotherapy of malaria: identification of drug-sensitive stage of parasite and timing of drug delivery for improved therapy. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 66, n. 1, p. 14–21, 1991.
- 121 YAYON, A. et al. Stage-dependent effects of chloroquine on *Plasmodium falciparum* in vitro. **Journal of Protozoology**, v. 30, n. 4, p. 642–647, 1983.
- 122 WALLIKER, D. et al. Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Science**, v. 236, n. 4809, p. 1661–1666, 1987.
- 123 TARR, S. J. et al. Schizont transcriptome variation among clinical isolates and laboratory-adapted clones of the malaria parasite *plasmodium falciparum*. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, p. 894, 2018.
- 124 RUSSELL, B. et al. Human ex vivo studies on asexual *plasmodium vivax*: the best way forward. **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 12, p. 1063–1070, 2012.
- 125 RUSSELL, B. M. et al. Simple *in vitro* assay for determining the sensitivity of *plasmodium vivax* isolates from fresh human blood to antimalarials in areas where *P.*

vivax is endemic. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 170–173, 2003.

126 TROPSHA, A. Best practices for QSAR model development, validation, and exploitation. **Molecular Informatics**, v. 29, n. 6–7, p. 476–488, 2010.

127 MAGGIORA, G. M. On outliers and activity cliffs - why QSAR often disappoints. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 46, n. 4, p. 1535–1535, 2006.

128 HOVLID, M. L.; WINZELER, E. A. Phenotypic screens in antimalarial drug discovery. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 9, p. 697–707, 2016.

129 KORSINCZKY, M. et al. Mutations in *plasmodium falciparum* cytochrome b that are associated with atovaquone resistance are located at a putative drug-binding site. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 8, p. 2100–2108, 2000.

130 OLLIARO, P. Drug resistance hampers our capacity to roll back malaria. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. s4, p. S247–S257, 2005.

131 BIAGINI, G. A. et al. Generation of quinolone antimalarials targeting the *plasmodium falciparum* mitochondrial respiratory chain for the treatment and prophylaxis of malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 21, p. 8298–8303, 2012.

132 WINTER, R. et al. Optimization of endochin-like quinolones for antimalarial activity. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 2, p. 545–551, 2011.

133 P. DAVID, K. et al. Atovaquone/proguanil resistance in Africa: a case report. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 35, n. 11–12, p. 898–899, 2003.

134 LEGRAND, E. et al. First case of emergence of atovaquone resistance in *plasmodium falciparum* during second-line atovaquone-proguanil treatment in South America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 6, p. 2280–2281, 2007.

135 BURROWS, J. N. et al. New developments in anti-malarial target candidate and product profiles. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 26, 2017.