

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Farmaco e Medicamentos  
Área de Insumos

Planejamento, síntese e avaliação biológica de inibidores de  
falcipaina 2 como candidatos a antimaláricos

Thuane Duarte Oliveira

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Gustavo H. G. Trossini

São Paulo

2019

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Farmaco e Medicamentos  
Área de Insumos

Planejamento, síntese e avaliação biológica de inibidores de  
falcipaina 2 como candidatos a antimaláricos

Thuane Duarte Oliveira

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

Dissertação para obtenção do Título de Mestre  
Orientador: Prof. Dr. Gustavo H. G. Trossini

São Paulo  
2019

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Oliveira, Thuane Duarte  
048p Planejamento, síntese e avaliação biológica de inibidores de falcipaina 2 como candidatos a antimaláricos / Thuane Duarte Oliveira. - São Paulo, 2019.  
105 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.  
Orientador: Trossini, Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart

1. Malária. 2. Plasmodium falciparum. 3. Planejamento de fármacos . 4. Falcipaina 2 . 5. Modelagem molecular. I. T. II. Trossini, Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart , orientador.

Thuane Duarte Oliveira

Planejamento, síntese e avaliação biológica de inibidores de  
falcipaina 2 como candidatos a antimaláricos

Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr.  
orientador/presidente

---

1o. examinador

---

2o. examinador

---

3o. examinador

---

4o. examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2019.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ter me dado forças e sabedoria para conseguir concluir meu sonho de realizar um mestrado.

Aos meus pais Gislene e Antônio, que em tudo me apoiaram, sempre me aconselhando e me orientando quando necessário.

Ao meu marido Fellipe, que esteve ao meu lado nos bons e maus momentos, me ajudando a prosseguir e a não desistir.

Ao professor Gustavo pela paciência, orientação e amizade, além de ter me concedido essa oportunidade de poder fazer parte do seu trabalho.

Aos meus amigos Evelin, Raisal, Karine, Mariana, Renan, Gláucio, Drielle, Vitor, Fernando e Elys, pela troca de conhecimento e pela amizade. Sem vocês essa dissertação não aconteceria.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela oportunidade concedida.

À agência de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Código de financiamento 001) pelo apoio financeiro.

A todos amigos e professores que contribuíram com minha formação acadêmica.

‘Pois Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.

A Ele seja a glória para sempre! Amém.’

(Romanos 11:36)

## RESUMO

OLIVEIRA, T. D. **Planejamento, síntese e avaliação biológica de inibidores de falcipaina 2 como candidatos a antimaláricos.** 2019. 61p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2019.

A malária, doença causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium*, está entre as doenças que mais causam mortes os países subdesenvolvidos. O hospedeiro é infectado por meio da picada do mosquito do gênero *Anopheles*, que introduz o parasita durante a hematofagia. As formas mais graves são causadas pelo *Plasmodium vivax* e o *Plasmodium falciparum*. As regiões mais afetadas por estas formas são África Subsaariana, Ásia, América Central e Sul. Desde o começo do século XXI, a Organização Mundial de Saúde (OMS) busca erradicar a doença, porém o *P.falciparum* se mostrou resistente aos fármacos antimaláricos existentes, dificultando a eficácia do tratamento. Isto, entre outros fatores, como mortalidade e alto índice de infecção, tornam necessárias novas pesquisas para a descoberta de novos fármacos mais seguros e eficazes contra a malária. Estudos têm mostrado como um alvo promissor para a criação de novos antimaláricos, a cisteína protease falcipaina, a qual se apresenta em três isoformas no parasita, sendo elas, falcipaina 1, 2 e 3. A falcipaina 2 está ligada com a hidrólise da hemoglobina, e seus inibidores vem sendo estudados como alternativas na busca de agentes antimaláricos. Derivados de semicarbazona, tais como o nitrofuril e o hidroximetilnitrofuril demonstraram atividade inibitória de cisteína proteases parasitárias. Utilizando estratégias modernas de planejamento de fármacos e por meio da integração entre técnicas computacionais e experimentais, realizou-se o planejamento, síntese e avaliação biológica de compostos derivados dos ditiocarbazatos e tiossemicarbazonas, bioisómeros de semicarbazona, como inibidores da cisteína protease falcipaina 2, no intuito de obter novos antimaláricos. Aplicaram-se técnicas de modelagem molecular em três séries de compostos (A, B e C), sendo a A e B derivados dos ditiocarbazatos e a C das tiossemicarbazonas. Estes estudos sugerem, três compostos da série A, quatro na série B e três na C com maior potencial para inibição da falcipaina 2. Isso devido aos resultados teóricos indicarem condições favoráveis ao ataque nucleofílico da cisteína 42 catalítica da falcipaina 2 às tiocarbonilas presentes nos compostos planejados. Estes derivados foram sintetizados, analisados por espectroscopia de ressonância magnética de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , espectroscopia de IV, ponto de fusão e pureza caracterizando sua formação. Após a obtenção, os compostos foram enviados para ensaios biológicos frente ao parasita *P. falciparum*. Os compostos testados não apresentaram inibição, porém é sabido que muitos inibidores enzimáticos não são ativos contra o parasita mesmo tendo alta potência contra a enzima, isto devido às barreiras a serem ultrapassadas até chegar ao alvo bioquímico, deste modo faz-se necessário ensaios contra a enzima para validar nossa hipótese.

**Palavras-chave:** malária, *Plasmodium falciparum*, planejamento de fármacos, falcipaina, modelagem molecular.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, T. D. **Design, synthesis and biological evaluation of falcipain 2 inhibitors as candidates for antimalarials.** 2019. 61p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2019.

Malaria, a disease caused by the protozoan of the genus *Plasmodium*, is among the most deadly diseases in poor countries. The host is infected through the bite of the mosquito of the genus *Anopheles*, which introduces the parasite during hematophagy. The most severe forms are caused by *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. The regions most affected by these forms are Sub-Saharan Africa, Asia, Central and South America. Since the beginning of the 21st century, the World Health Organization (WHO) has sought to eradicate the disease, but *P. falciparum* has been resistant to antimalarial drugs treatment. Among other factors, such as mortality and high infection rates, new research is needed to find new, safer and more effective drugs against malaria. Studies have shown as a promising target for the creation of new antimalarial drugs, the cysteine protease falcipain, which is present in three isoforms in the parasite: falcipain 1, 2 and 3. Falcipain 2 is linked to the hydrolysis of hemoglobin, and its inhibitors have been studied as alternatives in the search for antimalarial agents. Derivatives of semicarbazone such as nitrofuril and hydroxymethylnitrofuril demonstrated inhibitory activity of parasitic cysteine proteases. Using modern strategies for drug design and the integration of computational and experimental techniques, the design, synthesis and biological evaluation of compounds derived from dithiocarbazates and thiosemicarbazones, semicarbazone biosynthesis as inhibitors of cysteine protease falcipain 2 were carried out in order to new antimalarials. Molecular modeling studies were performed in three series of compounds (A, B and C), with A and B being derived from dithiocarbazates and C from thiosemicarbazones. These studies suggest three compounds in the A series, four in the B series, and three in the C group with the greatest potential for inhibition of falcipain 2. This is due to the theoretical results indicating favorable conditions for the nucleophilic attack of the catalytic cysteine of falcipain 2 on thionyls present in the compounds planned. These derivatives were synthesized, analyzed by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  magnetic resonance spectroscopy, IR spectroscopy and melting point, characterizing their formation. After being obtained, the compounds were sent for biological assays against the *P. falciparum* parasite. The compounds tested did not show inhibition, but it is known that many enzyme inhibitors are not active against the parasite even though they have high potency against the enzyme, this is due to the barriers to be overcome until reaching the biochemical target, thus enzyme to validate our hypothesis.

**Keywords:** malaria, *Plasmodium falciparum*, drug design, falcipain, molecular modeling.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Ciclo biológico da malária.....	22
<b>Figura 2.</b>	Estruturas dos alcaloides da quina.....	25
<b>Figura 3.</b>	Estrutura das aminoquinolinas.....	26
<b>Figura 4.</b>	Estrutura dos derivados da artemisinina.....	27
<b>Figura 5.</b>	Estruturas dos fármacos antifolatos usados contra a malária.....	28
<b>Figura 6.</b>	Representação do vacúolo digestivo do <i>Plasmodium</i> e as proteínas que atuam na digestão da hemoglobina.....	30
<b>Figura 7.</b>	Estrutura cristalográfica da falcipaina 2 retirada do PDB (código 3BPF). Domínio maduro. ....	31
<b>Figura 8.</b>	Mecanismo de inibição das tiossemicarbazonas frente a cruzaina proposto por Du e colaboradores.....	32
<b>Figura 9.</b>	Esqueleto geral das tiossemicarbazonas/ditiocarbazatos com a base de Schiff destacada.....	34
<b>Figura 10.</b>	Estruturas gerais dos compostos de cada série e seus substituintes usados em cada série.....	42
<b>Figura 11.</b>	Imagens do MEP e LUMO de todos os compostos escolhidos da série A – A) 8A, B) 10A e C) 31A.....	50
<b>Figura 12.</b>	Imagens do MEP e LUMO de todos os compostos escolhidos da série B – A) 4B, B) 15B, C)42B e D) 66B.....	53
<b>Figura 13.</b>	Imagens do MEP e LUMO de todos os compostos escolhidos da série B – A) 3C, B) 18C e C) 22C.....	55
<b>Figura 14.</b>	Gráficos de Ramachandran (feitos no servidor da web Rampage plot) e representação dos outliers em vermelho na proteína (gerada no programa Pymol) obtidos para o cristal 3BPF (a) e para o modelo gerado com os cristais 3BPF e 2OUL (b).....	57
<b>Figura 15.</b>	Estrutura do E64 cristalizado (em verde) em comparação com o redocado (em amarelo) (cores dos átomos: nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho e carbonos em verde ou amarelo).....	58
<b>Figura 16.</b>	Modelo gerado da falcipaina 2 com o inibidor E64 e os subsítios (laranja: S1', verde: S1, vermelho: S3 e azul:S2). Resíduo cisteína (Cis) apresentado em <i>stick</i> (carbonos em verde, enxofre em amarelo e oxigênio em vermelho).....	59

<b>Figura 17.</b>	Interação dos compostos da série A com a C42 e seus bolsos. (a) 8A, (b) 10A e (c) 31A. ....	60
<b>Figura 18.</b>	Interação dos compostos da série B com a Cys 42 e seus bolsos. (a) 4B, (b) 15B, (c) 42B e (d) 66B. ....	61
<b>Figura 19.</b>	Interação dos compostos da série A com a C42 e seus bolsos. (a) 3C, (b) 18C e (c) 22C. ....	62
<b>Figura 20.</b>	Espectro de $^1\text{H}$ RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ , $\delta$ ppm) do intermediário da série A, nomeado como IA.....	64
<b>Figura 21.</b>	Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ , $\delta$ ppm) do intermediário IA.....	65
<b>Figura 22.</b>	Espectro de $^1\text{H}$ RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ , $\delta$ ppm) do intermediário IIIB.....	67
<b>Figura 23.</b>	Espectros de $^{13}\text{C}$ RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ , $\delta$ ppm) do intermediário IIIB.....	67
<b>Figura 24.</b>	Espectros de $^1\text{H}$ RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ , $\delta$ ppm) do intermediário IC.....	69
<b>Figura 25.</b>	Espectros de $^{13}\text{C}$ RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ , $\delta$ ppm) do intermediário IC.....	70
<b>Figura 26.</b>	Espectros de $^1\text{H}$ RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ , $\delta$ ppm) do produto 10A.	72
<b>Figura 27.</b>	Espectros de $^{13}\text{C}$ RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ , $\delta$ ppm) do produto 10A.....	72
<b>Figura 28.</b>	Espectroscopia de infravermelho do produto 10A.....	73
<b>Figura 29.</b>	Espectros de $^1\text{H}$ RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ , $\delta$ ppm) do produto 42B.	74
<b>Figura 30.</b>	Espectros de $^{13}\text{C}$ RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ , $\delta$ ppm) do produto 42B. ....	74
<b>Figura 31.</b>	Espectroscopia de infravermelho do produto 42B.....	75
<b>Figura 32.</b>	Espectros de $^1\text{H}$ RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ , $\delta$ ppm) do produto 3C...	77
<b>Figura 33.</b>	Espectroscopia de infravermelho do produto 3C.....	77

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Valores das cargas atômicas (ESP) dos compostos destacados da série A.....	50
<b>Tabela 2.</b>	Valores de energia do HOMO, LUMO e momento dipolo dos compostos escolhidos da série A. ....	51
<b>Tabela 3.</b>	Valores de HOMO, LUMO, momento dipolo e energia total dos compostos escolhidos – série B. ....	52
<b>Tabela 4.</b>	Valores das cargas atômicas (ESP) dos compostos escolhidos- série B.	52
<b>Tabela 5.</b>	Valores de HOMO, LUMO, momento de dipolo e energia total dos compostos destacados da série C. ....	54
<b>Tabela 6.</b>	Cargas atômicas dos compostos escolhidos da série C (ESP).....	55
<b>Tabela 7.</b>	Características dos intermediários da série B. ....	66
<b>Tabela 8.</b>	Características dos intermediários da série C.....	68
<b>Tabela 9.</b>	Características dos produtos finais. ....	71
<b>Tabela 10.</b>	Características dos produtos da série C. ....	76
<b>Tabela 11.</b>	Resultado da contração inibitória de 50% (IC <sub>50</sub> - μM) de <i>P. falciparum</i> .....	78

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b>	Estudo de REA frente a falcipaina 2 e ao parasita <i>P. falciparum</i> .....	33
<b>Esquema 2.</b>	Esquema geral de síntese das séries planejadas.....	45
<b>Esquema 3.</b>	Mecanismo de adição da hidrazina ao dissulfeto para a formação do intermediário inicial.....	63
<b>Esquema 4.</b>	Mecanismo de reação de formação dos intermediários das séries A por reação de SN <sub>2</sub> .....	68
<b>Esquema 5.</b>	Mecanismo de formação dos intermediários da série C e dos produtos finais das séries A e B.....	75
<b>Esquema 6.</b>	Mecanismo de formação dos compostos da série C por reação de substituição acíclica.....	78

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Doenças Negligenciadas</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Malaria</b>	<b>19</b>
2.2.1 Transmissão	20
2.2.2 Ciclo biológico	20
2.2.3 Patologia e Diagnóstico do <i>P. falciparum</i>	22
2.2.4 Quimioterapia	23
<b>2.3 Alvos Bioquímicos</b>	<b>28</b>
2.3.1 Falcipaina	29
2.3.2 Tiossemicarbazonas e ditiocarbazatos	32
<b>2.4 Modificação Molecular</b>	<b>34</b>
2.4.1 Bioisosterismo	34
2.4.2 Planejamento racional de fármacos	35
2.4.3 <i>Docking</i> molecular	36
<b>3. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA</b>	<b>39</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>40</b>
<b>4.1 Material</b>	<b>40</b>
4.1.1. Reagentes e solventes	40
4.1.2 Equipamentos	40
4.1.3 Computadores e estações de trabalho	40
4.1.4 Softwares	<b>41</b>
<b>4.2 Métodos</b>	<b>41</b>
4.2.1 Planejamento das séries	41
4.2.2 Métodos computacionais	42
4.2.2.1 Otimização da geometria molecular	42
4.2.2.2 Mapas de potencial eletrostático (MEP)	43
4.2.2.3 Orbitais moleculares menos ocupados ( <i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i> – LUMO) e orbitais moleculares mais ocupados ( <i>Highest Occupied Molecular Orbital</i> – HOMO)	43

4. 2. 2. 4 Estudos de Docking	43
4.2.3 Síntese geral do projeto	44
4.2.3.1 Síntese do intermediário inicial	45
4.2.3.2 Síntese dos compostos da série A - derivados dos ditiocarbazatos	46
4.2.3.3 Síntese dos compostos da série B - derivados dos ditiocarbazatos	46
4.2.3.4 Síntese dos compostos da série C - derivados das tiosemicarbazonas	47
4.2.4 Ensaios biológicos frente ao parasita <i>P. falciparum</i>	47
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>49</b>
<b>5.1 Estudos de características estereoelétrônicas</b>	<b>49</b>
<b>5.2. Estudos de <i>docking</i></b>	<b>55</b>
5.2.1. Preparo da proteína	56
5.2.3. Validação do método de <i>docking</i>	57
5.2.4. Análises dos resultados	58
<b>5.3. Síntese dos compostos</b>	<b>63</b>
5.3.1. Síntese dos intermediários	63
5.3.2. Síntese dos compostos finais	70
<b>5.4. Ensaios biológicos de inibição frente o parasita <i>P. falciparum</i></b>	<b>78</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>81</b>
<b>ANEXOS</b>	
ANEXO A: Espectros de RMN 1H e 13C dos intermediários das séries B e C	92
ANEXO B: Espectros de RMN 1H e 13C dos produtos da série A	96
ANEXO C: Espectros de RMN 1H e 13C dos produtos da série B	98
ANEXO D: Espectros de RMN 1H e 13C dos produtos da série C	102
ANEXO E: Espectros de infravermelho dos produtos finais das séries A e B	103

## 1. INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, transmitida principalmente pela fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*. Em 2017 foram reportados cerca de 219 milhões de casos de malária, os quais provocaram 435 mil óbitos em todo o mundo, devido a complicações oriundas desta doença. A região africana é a mais afetada, apresentando a maior porcentagem de casos (aproximadamente 90%) e mortes (cerca de 92%). Este panorama é mais grave quando se trata de crianças abaixo de cinco anos, pois apesar da malária não ser mais a principal causa de morte ainda leva uma criança a óbito a cada dois minutos, na mesma região africana. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2017 o número de crianças nessa faixa etária que foram a óbito foi de 266 mil (WHO, 2017; SIQUEIRA-BATISTA, 2012).

Além das complicações de saúde para os infectados, a malária também traz prejuízos financeiros aos países endêmicos, diminuindo o crescimento econômico em 1,3% por ano nas áreas endêmicas; só na África, são 1,2 bilhões de dólares por ano devido ao fornecimento de medicamentos, suprimentos e intervenções em saúde pública (CDC, 2019; DNDi, 2017).

Cinco espécies de protozoários causam malária em seres humanos, sendo eles o *Plasmodium malariae*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovalae*, *Plasmodium vivax* e o *Plasmodium knowlesi*. As formas mais graves e mortais da doença são causadas pelo *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*. O *P. vivax* tem maior incidência no continente asiático e nas Américas Central e do Sul. Este fato se dá devido ao parasita ter a capacidade de sobreviver em climas com temperaturas mais amenas, em altas altitudes e também devido à ausência do gene *Duffy* em africanos (esse gene produz uma proteína necessária para a invasão do *P. vivax* nas hemácias) e é considerada uma forma grave de malária por ter uma fase latente no fígado, podendo se manifestar meses depois da infecção inicial, o que leva a uma reincidência dos sintomas. Já o *P. falciparum* concentra-se na África subsaariana e tem a possibilidade de evoluir para malária grave causando distúrbios em múltiplos órgãos (SIQUEIRA-BATISTA *et al*, 2012). Além disso, o *P. falciparum* tem demonstrado resistência aos antimaláricos existentes, gerando um problema para os infectados e um desafio aos pesquisadores da área (WHO, 2016; SANTOS, 2013; FERNANDES, 2011).

Em 2017, no Brasil, foram notificados 217.928 mil casos, sendo considerada uma doença de notificação obrigatória. Os estados com maior incidência são Rondônia, Amazonas, Pará, Amapá, Tocantins, Acre, Roraima, Maranhão e Mato Grosso. As condições ambientais

como clima quente, úmido, chuvoso e com porções de águas superficiais, a desigualdade social e até a defasagem de saúde pública contribuem para que a doença se espalhe nessas regiões do país (PINHEIRO, 2018; PENIDO, 2016; DUARTE *et al*, 2014; GOMES *et al*, 2011).

Pensando em erradicar a doença, a comunidade internacional traçou estratégias desde começo do século XXI, da qual teve resultados positivos, diminuindo a mortalidade da malária em 45%, livrando 3,3 milhões de pessoas da morte, e dentre elas 90% eram crianças com menos de cinco anos da África subsaariana. Esses resultados foram obtidos graças ao aumento da disponibilidade de medicamentos mais seguros, como os derivados da artemisinina distribuídos ao setor público e privado em 2012. Eles atuam nos parasitas quando estão na forma de merozoítos e esquizontes, reduzindo o desenvolvimento destes para gametócitos, porém, não conseguem eliminar os gametócitos já maduros (GRAVES, GELBAND e GARNER, 2015). Mas esses derivados têm se mostrado ineficientes para o tratamento, visto que em 2008 o *P. falciparum* se mostrou menos sensível ao artesunato (derivado semi-sintético da artemisinina). Essa resistência foi detectada em cinco países: Camboja, República Democrática Popular Lau, Myanmar, Vietnã e Tailândia. Além disso, há falhas no tratamento com artesunato-mefloquina (uma combinação de um derivado da artemisinina com um alcalóide da quina) e isso demonstra grande problema, visto que há falta de alternativas para o tratamento e ausência de uma vacina eficaz. Já a cloroquina e a sulfadoxina-primetamina tiveram que ser abandonadas, pois houve mutações no gene do parasita conferindo a ele resistência a esses medicamentos e o uso prolongado da cloroquina causou o aumento da mortalidade da malária em três vezes mais. Então, tem se observado uma resistência do parasita aos fármacos atuais e aos fármacos anteriormente utilizados, dificultando o tratamento (WHO, 2015; CHUGHHA *et al*, 2014; CONRAD *et al*, 2014; OLIVEIRA *et al*, 2013; FERNANDES, CRAVO e ROSÁRIO, 2007).

Em 24 de julho de 2015, a *GlaxoSmithKline* (GSK) publicou sua página oficial que anunciou para o Comitê dos Medicamentos para Uso Humano (CHMP) da Agência Europeia de Medicamentos (EMA) uma possível vacina de prevenção contra a malária para crianças de 6 semanas a 17 meses, a Mosquirix (RTS,S), e que teve um parecer positivo desses órgãos. Em 2017 a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomendou a introdução da vacina em três países africanos: no Quênia, Gana e no Malawi, para ser avaliada no uso do controle da malária com início em 2019. Mesmo sendo uma inovação importante e tendo diminuído o risco do desenvolvimento da malária em 39% e da malária grave em 29% das 15.000 mil crianças que receberam as quatro doses da vacina entre os anos de 2009 e 2014, ela será

utilizada como prevenção não excluindo os tratamentos atuais (WHO, 2019; GALACTIONOVA *et al*, 2015; GSK, 2015; PARRA *et al*; 2015).

Em linhas gerais, o RTS,S é uma vacina de proteína recombinante monovalente, cujo alvo é um antígeno proteico circunsporozoíto do parasita, que é expresso em sua superfície na fase de esporozoíto e consiste em não permitir que o parasita infecte, se multiplique e amadureça no fígado, da qual sua proteção está correlacionada com a indução do anticorpo anti-CPS e linfócitos T CD4 (GSK, 2015; PARRA *et al*; 2015).

Nas últimas décadas, as pesquisas direcionadas à descoberta de novos fármacos passaram a buscar alvos macromoleculares específicos para doenças. Neste contexto, as enzimas são alvos de grande interesse, pois desempenham papel fundamental em muitas doenças. Portanto, entender as vias metabólicas que são essenciais à sobrevivência do parasita são importantes para a descoberta e planejamento de novos fármacos (ALVES *et al*, 2016; COPELAND, 2013; FERREIRA e ANDRICOPULO, 2013).

As cisteíno proteases são importantes para o ciclo de vida de parasitas como o *Plasmodium*, sendo responsáveis pela invasão na célula hospedeira e digestão da hemoglobina (BONILLA *et al*, 2007). Tais cisteíno-preteases de *Plasmodium falciparum* foram isoladas e caracterizadas como membros da *Papaína-like*, por também apresentarem alta semelhança com esse grupo de enzimas. Chamada de falcipaína, devido ao parasita do qual foi isolada, é encontrada em três isoformas, falcipaína, 1, 2 e 3, as quais além de alta identidade estrutural apresentam também parâmetros cinéticos semelhantes (ROSENTHAL, 2002; ROSENTHAL, 2004). Visto a sequência nucleotídica ser bem conservada nos genes do *Plasmodium*, a falcipaína parece ser um alvo interessante para a busca de fármacos contra todas as espécies que causam malária em seres humanos (GLENN *et al*, 2006).

A falcipaína 1 está ligada à invasão eritrocitária, presente no protozoário em forma de anel e merozoíto. As falcipaínas 2 e 3 atuam na hidrólise da hemoglobina (PRASAD *et al*, 2013; CRUZ, 2010).

Diversas classes químicas são estudadas como inibidores de proteases parasitárias, dentre estas destacamos os derivados da classe das semicarbazonas e tiosemicarbazonas, que além de apresentarem bons níveis de inibição frente estas proteases, tendo valores de IC<sub>50</sub> entre nano e o micro molar, já são estudados há um bom tempo pelo nosso grupo de pesquisa (VITAL, 2013; TROSSINI *et al*, 2013; DUSCHAK, COUTO, 2007; TROSSINI *et al*, 2010; DU *et al*, 2002).

Frente a essa problemática de resistência do *Plasmodium falciparum* aos medicamentos recomendados e ao número de pessoas que ainda são infectadas e morrem

devido à ineficácia do tratamento, são necessárias mais pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos, observando que a literatura já descreve alguns alvos promissores para possíveis novos fármacos facilitando a descoberta.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Doenças negligenciadas

As doenças tropicais negligenciadas são causadas por parasitas ou agentes infecciosos e que possuem uma incidência significativa em populações de baixa renda. São consideradas negligenciadas devido ao pouco investimento em pesquisas, em seu controle, na prevenção, no tratamento e despertam pouco interesse econômico das indústrias farmacêuticas, justamente por sua baixa prevalência ou porque acometem principalmente regiões de baixo nível de desenvolvimento, mas mesmo assim, elas ainda levam a óbito milhares de pessoas no mundo ou causam prejuízos físicos, cognitivos (no caso das crianças) e até socioeconômicos. (VALVERDE, 2013, SANTOS *et al*, 2017).

Tais doenças são: a malária, doença de Chagas, doença do sono, esquistossomose, leishmaniose, dengue, Chikungunya, teníase, helmintos transmitidos pelo solo, oncocercose, dracunculíase, lepra, tracoma, sífilise e filariose. Estão presentes em 149 países e tem maior concentração nos continentes africano, americano e asiático nas regiões tropicais (DNDi, 2017; WHO, 2017; VALVERDE, 2013, SANTOS *et al*, 2017).

### 2.2 Malária

Um dos primeiros registros da malária se encontra em relatos médicos muito antigos e pensava-se que era vinculada a castigos divinos. No século V a.C. Hipócrates foi o primeiro a descartar esta hipótese, ao descrever a doença e relacionando-a com os locais onde os doentes frequentavam e com a sazonalidade. Provavelmente teve origem na pré-história no continente africano, se espalhando pelo globo com as navegações (FMUSP, 2013).

O nome malária vem do italiano '*mal aire*' no século XVIII, pois acreditavam que ela era causada pelo ar insalubre. Hoje é conhecida como paludismo, febre terçã maligna, febre palustre, febre intermitente e, também, popularmente como tremedeira, batedeira ou febre (FMUSP, 2013; PORTAL DA SAÚDE, 2014).

Ela é conhecida pelas febres intermitentes dependendo do protozoário que a pessoa foi infectada, e seus sintomas podem até ser confundidos com gripe. Se tratada a tempo, as chances de cura são maiores, porém, há casos que podem ocasionar complicações mais sérias,

podendo até levar o indivíduo à morte ou causar sequelas (FIOCRUZ, 2017; SIQUEIRA-BATISTA *et al*, 2012; GOMES *et al*, 2011).

É incidente em mais de 95 países e aproximadamente 3,2 bilhões de pessoas se encontram em áreas de risco de infecção (WHO, 2016; DNDi, 2017).

### 2.2.1 Transmissão

Cinco espécies de protozoários causam malária em humanos: *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium ovalae*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*. Destes, o *P. falciparum* é a mais grave, pois pode causar complicações sérias ao infectado (PORTAL DA SAÚDE, 2014; DNDi, 2017).

A transmissão natural da malária ocorre por meio da picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles*, que irá inocular durante a hematofagia (se infectado) o protozoário *Plasmodium spp* em forma de esporozoítos que se encontrava armazenado em suas glândulas salivares. Pode ocorrer também de forma induzida, que seria de forma congênita ou por meio de transfusão sanguínea (seringas/agulhas infectadas, acidente de trabalho, etc). O período de incubação é geralmente de 15 dias, podendo variar para mais ou menos dependendo do protozoário (DNDi, 2017; PORTAL DA SAÚDE, 2014; FERNANDES, 2011; SANTOS, 2013; FMUSP, 2013).

As condições climáticas também afetam as transmissões, pois determinados ambientes podem favorecer a sobrevivência do mosquito, como regiões mais chuvosas e úmidas (SCIENTISTS AGAINST MALARIA, 2017).

Como uma forma de controlar a mortalidade e morbidade, a OMS em parceria com *Roll Back Malaria* (uma iniciativa que atua em parceria com órgãos e empresas para levantar recursos e ações para lutar contra a malária) com a ajuda dos governos dos países endêmicos, organizações doadoras, as agências das Nações Unidas e indústrias criaram um programa que facilita o acesso ao tratamento, a propagação de mosquiteiros com inseticidas e a prevenção da malária em gestantes (FMUSP, 2013).

### 2.2.2 Ciclo biológico

O *Plasmodium spp* é um protozoário do filo *Apicomplexa* e é um parasita celular obrigatório. A maioria dos protozoários desse filo tem afinidade por células nucleadas, mas o

*Plasmodium* evoluiu, conseguindo infectar células anucleadas, no caso dos mamíferos, as hemácias (KONING-WARD *et al*, 2016).

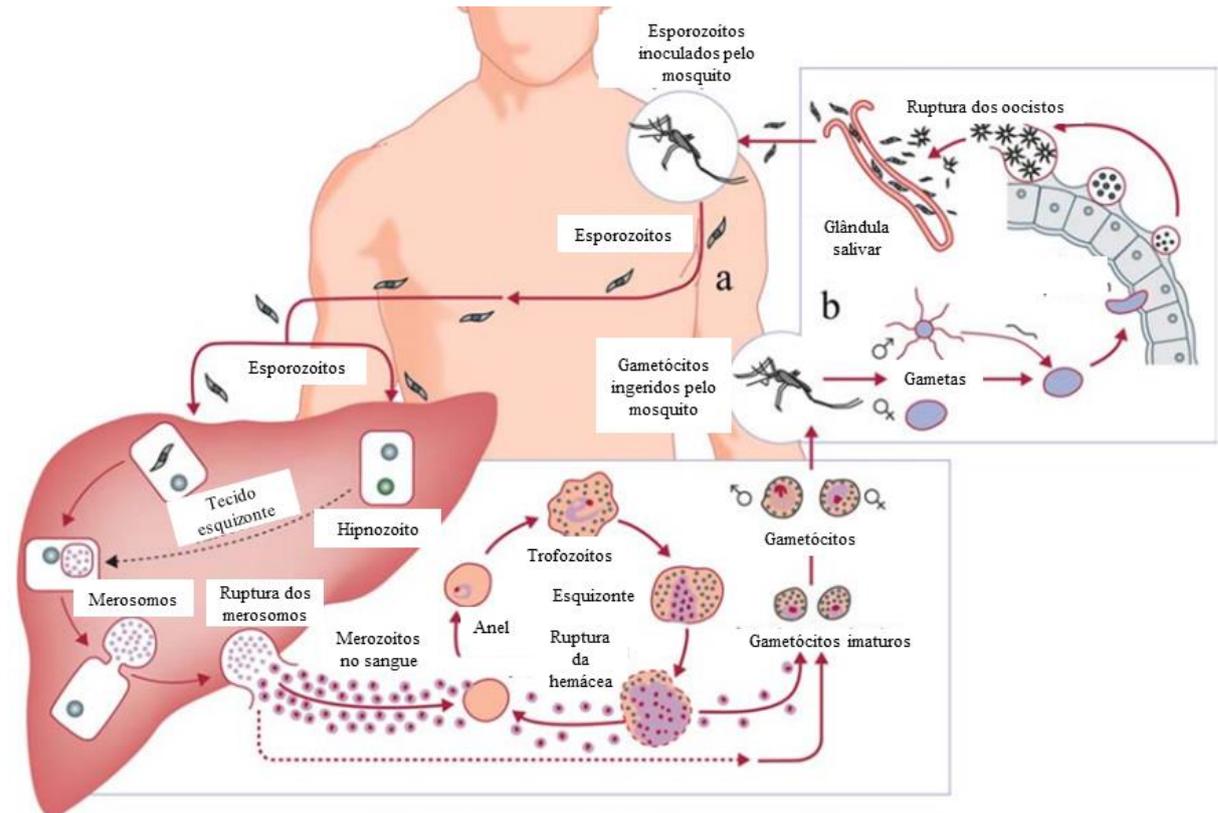
Seu ciclo de vida inicia após a picada do mosquito, ou seja, o hospedeiro intermediário (infectado com um dos tipos dos parasitas) injeta no hospedeiro definitivo saliva e protozoários em forma de esporozoíto. O parasita alcança a corrente sanguínea e, dentro de mais ou menos uma hora, invade os hepatócitos através do sistema linfático, onde se inicia a reprodução assexuada. Nos hepatócitos, ele sofre uma transformação de formato chamada de *transversing* amadurecendo para merozoíto. Após essa fase hepática que dura cerca de uma semana, os merozoítos vão para a corrente sanguínea invadir eritrócitos, onde se inicia o ciclo intraeritrocítico e, assim, ocorre a evolução do parasita para anel, trofozoíto e esquizonte (GRAVES, GELBAND e GARNER, 2015; SANTOS, 2013; FERNANDES, 2011; GOMES *et al*, 2011). Para não ser detectado pelo sistema imune, o *P. falciparum* utiliza diversas proteínas que estão fora da célula, então ele as traz para dentro modificando a membrana da hemácia para promover a citoadesão (KONING-WARD *et al*, 2016).

Ao invadir os eritrócitos, o parasita liga-se reversivelmente à membrana da célula, e forma um vacúolo parasitóforo com o auxílio das organelas próprias, micronemas e grânulos densos. Durante a degradação da hemoglobina, a heme é convertida em hemozoína (pigmento) que não é tóxico para ele nem para o hospedeiro (BARROS *et al*, 2012).

Posteriormente, os parasitas que estavam dentro do eritrócito o estouram, invadindo outros eritrócitos recomeçando o ciclo. Alguns evoluem para gametócitos femininos e masculinos, não invadindo os eritrócitos, mas quando sugados pelo *Anopheles* durante a hematofagia se reproduzem sexualmente no mosquito, dando origem a um oocineto que migra até o intestino do inseto e sofre divisões formando esporozoítos. Estes vão para as glândulas salivares, sendo injetados durante a hematofagia, infectando outro ser vivo (Figura 1) (SANTOS, 2013; FERNANDES, 2011; GOMES *et al*, 2011).

O rompimento dos eritrócitos leva aos estados febris (terça no caso no *P. falciparum*), característico da doença, mas com certas particularidades para cada espécie de parasita (FERNANDES, 2011).

**Figura 1** – Ciclo biológico da malária



Fonte: TEIXEIRA, GOMES e GOMES, 2011 – Adaptado pelo autor

### 2.2.3 Patologia e diagnóstico do *P. falciparum*

O *P. falciparum* é o protozoário causador do tipo mais grave de malária, pois, se não for tratado o mais rápido possível, pode causar morte devido às suas complicações. Ele tem um período de incubação de 10 dias aproximadamente e é responsável por causar as febres de 48 em 48 horas, como também acontece nas espécies *P. ovalae* e *P. vivax*, e é conhecida como febre terçã maligna. Além da febre que é causada pelo rompimento dos eritrócitos, o infectado também apresenta sintomas de calafrios e fraqueza principalmente (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, 2017; FRANÇA, SANTOS e FIGUEROA-VILLAR, 2008).

A patogenicidade causada pelo *P. falciparum* apresenta sérias complicações ao hospedeiro como acidose metabólica, distúrbio hepático, insuficiência renal, choque, anemia grave, hipoglicemia, coagulação intravascular, disfunção pulmonar e, ainda, acomete o sistema nervoso central. Todas as complicações se parecem com uma sepse bacteriana, necessitando de cuidados em unidade de tratamento intensiva (UTI) para evitar a morte. Esses sintomas se devem aos problemas na microcirculação devido à citoaderência (porque há a presença de *knobs* – adesinas do *Plasmodium*) e a formação de rosetas. Na citoaderência, o

parasita consegue modificar a membrana da hemácia, a exposição de antígenos, o transporte de substâncias e a inserção de proteínas devido a sua necessidade de obter nutrientes que estão no plasma sanguíneo para sua reprodução dentro do eritrócito. Essa modificação da membrana faz com que ela fique com protusões eletrodensas aderindo mais as células endoteliais das vênulas pós-capilares e capilares de órgãos como cérebro, rins e pulmões causando problemas no sistema nervoso, disfunções renais e pulmonares. E as rosetas são formadas, pois as células infectadas se juntam as não infectadas, formando agregados rígidos que podem interferir na microcirculação, impedindo o fluxo sanguíneo. Supõe-se que isso acontece para distanciar as células com o parasita do sistema imune e para proteger os merozoítos que saem das hemácias infectadas, podendo infectar outras que estão nas rosetas sem ser detectado pelo sistema imune (YAM *et al*, 2017; KONING-WARD *et al*, 2016; SIQUEIRA-BATISTA *et al*, 2012; GOMES *et al*, 2011).

A gravidade da doença vai depender do organismo do hospedeiro, sendo que a infecção é mais grave em crianças, gestantes e primoinfectados (GOMES *et al*, 2011).

Para diagnosticar a doença, a OMS recomenda testes específicos para o parasita, mas os testes variam de acordo com a região; em países desenvolvidos há muitas opções ao contrário de países subdesenvolvidos, que além das poucas opções os resultados podem ser prejudicados devido à falta de qualidade dos materiais e treinamento do pessoal (MATHISON e PRITT, 2017).

Para a análise sanguínea podem ser feitos exames como: gota espessa, que é considerada padrão pela OMS e nele os parasitas são contados para verificar o nível de parasitemia ou observar a eficácia do tratamento, identificação de qual ou quais das morfologias estão presentes no sangue para direcionar o tratamento adequado por meio de métodos que usam fluorescência ou coleção de sangue, por exemplo, detecção do antígeno para investigar o nível de *Plasmodium* spp ou a espécie, detecção de ácido nucleico e detecção de anticorpos (MATHISON e PRITT, 2017; GOMES *et al*, 2011).

#### 2.2.4 Quimioterapia

De forma geral, o tratamento da malária é complexo e pode até ser ineficaz, pois pode haver recidivas e não há um fácil acesso ao tratamento nos países endêmicos (FRANÇA, SANTOS e FIGUEROA-VILLAR, 2008).

Os fármacos normalmente são específicos para a forma da qual o parasita se encontra, mas existem alguns que são capazes de inibir mais de uma forma do protozoário. Dos

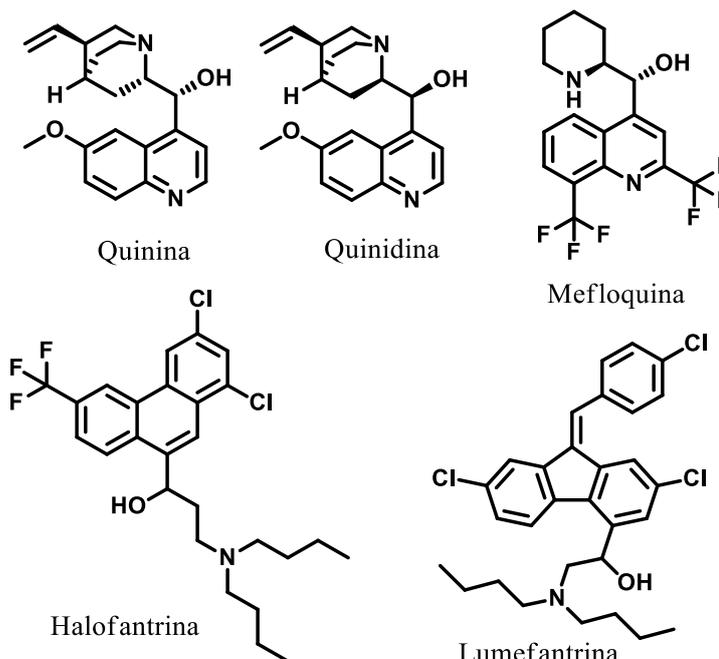
específicos, eles podem ser esporonticidas (que são as formas injetadas pela picada do mosquito ou as que são liberadas nos hepatócitos ou pelas hemácias), gametocíticos (matando as formas gametocíticas e impedindo que durante a hematofagia neste indivíduo infectado o mosquito adquira tais gametócitos, e conseqüentemente, impede a transmissão para outra pessoa), e fármacos eritrocíticos ( que são específicos para formas que estão nas hemácias) (FRANÇA, SANTOS e FIGUEROA-VILLAR, 2008)

Os principais antimaláricos podem ser divididos em três grandes grupos: os amino-álcoois, os derivados artemisinínicos e os antifolatos (VALE, MOREIRA e GOMES, 2005; FRANÇA, SANTOS e FIGUEROA-VILLAR, 2008; ANTONY e PARIJA, 2016).

No grupo dos amino-álcoois estão os alcaloides da quina e as aminoquinolinas sintéticas. Dos alcaloides da quina estão (Figura 2):

- a) Quinina: devido à sua toxicidade e o crescimento da resistência do *P. falciparum*, é utilizado em combinação com outros fármacos. Atua nas formas eritrocíticas do *P. falciparum* e do *P. vivax* (VALE, MOREIRA e GOMES, 2005; VENANZI e LÓPEZ-VÉLEZ, 2016).
- b) Quinidina: diastereoisômero da quinina, seus efeitos adversos no sistema cardiovascular deixa seu uso limitado (VALE, MOREIRA e GOMES, 2005).
- c) Halofantrina: usada contra as cepas resistentes aos fármacos clássicos. Seu mecanismo se dá pela formação de complexos tóxicos, modificando a membrana do parasita. Porém, já existem cepas resistentes a ele (VALE, MOREIRA e GOMES, 2005; FRANÇA, SANTOS e FIGUEROA-VILLAR, 2008).
- d) Mefloquina: usada contra as cepas resistentes de *P.falciparum* a cloroquina, mas seu uso foi associado a efeitos neurológicos principalmente em pacientes epiléticos ou com problemas psiquiátricos. Além disso, o que também dificulta seu uso é que já existem cepas resistentes a ele, mas ainda é utilizado junto com o Artesunato. Atua na fase sanguínea do parasita (VALE, MOREIRA e GOMES, 2005; FRANÇA, SANTOS e FIGUEROA-VILLAR, 2008; PARHIZGAR e TAHGHIGHI, 2017).
- e) Lumefantrina: é usado em combinação com o artemeter, um derivado da artemisinina, e em lugares onde as cepas tenham resistência a cloroquina (VALE, MOREIRA e GOMES, 2005; ANTONY e PARIJA, 2016).

**Figura 2** – Estruturas dos alcaloides da quina



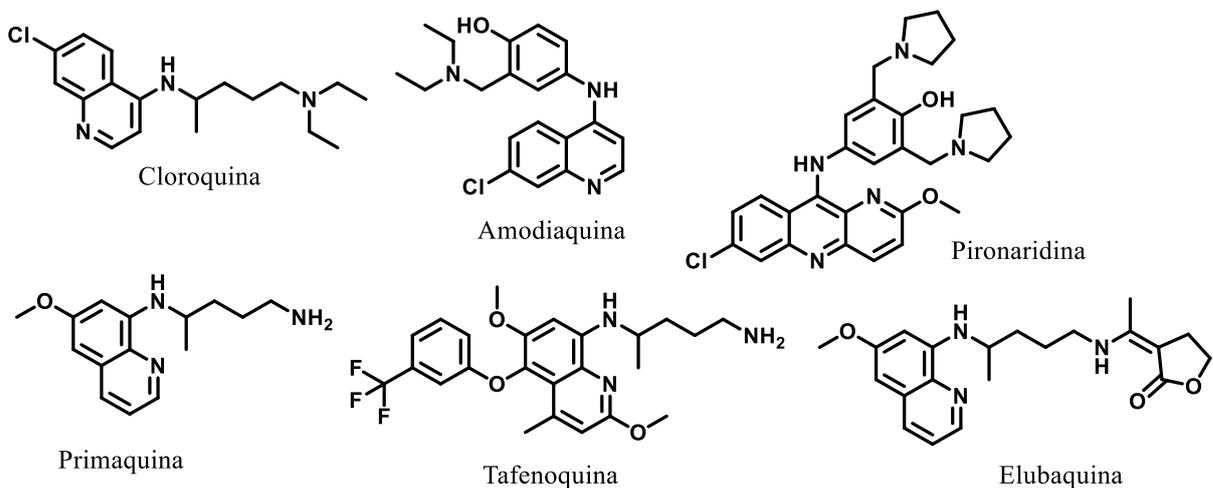
Fonte: elaborado pelo autor

Quanto às aminoquinolinas, seu mecanismo de ação é interferir na detoxificação da heme, impedindo a formação da hemozoína (produto não tóxico), acumulando compostos tóxicos no vacúolo digestivo, matando o parasita. Neste grupo estão (Figura 3) (VALE, MOREIRA e GOMES, 2005; FRANÇA, SANTOS e FIGUEROA-VILLAR, 2008; PARHIZGAR e TAHGHIGHI, 2017):

- Cloroquina: foi muito usado devido seu poder esquizonticida sanguíneo contra todas as espécies de *Plasmodium* e pelos raros efeitos colaterais graves. Hoje se for usado, é em combinação com outros antimaláricos por causa da resistência (VALE, MOREIRA e GOMES, 2005; FRANÇA, SANTOS e FIGUEROA-VILLAR, 2008; PARHIZGAR e TAHGHIGHI, 2017).
- Amodiaquina: é um pro-fármaco potente esquizonticida sanguíneo, eficaz contra algumas cepas resistentes a cloroquina, porém menos potente. Seu uso foi associado com hepatotoxicidade e agranulocitose (VALE, MOREIRA e GOMES, 2005; FRANÇA, SANTOS e FIGUEROA-VILLAR, 2008; PARHIZGAR e TAHGHIGHI, 2017).
- Pironaridina: usada em combinação com a artemisinina contra cepas resistentes a cloroquina. É um esquizonticida e gametocida (VALE, MOREIRA e GOMES, 2005, KASPER *et al*, 2017).

- d) Primaquina: esquizonticida tecidual e gametocitocida. Tóxica para pacientes que apresentaram deficiência em glucose-6-fosfato eritrocitária (uma deficiência enzimática hereditária que um dos sintomas é a hemólise causada por fármacos) e também por causar a metemoglobinemia (hemoglobina oxidada que não consegue se ligar ao oxigênio). A utilização dela é em conjunto com outro fármaco que seja esquizonticida sanguíneo (VALE, MOREIRA e GOMES, 2005; FRANÇA, SANTOS e FIGUEROA-VILLAR, 2008).
- e) Tafenoquina: desenvolvida para melhorar a primaquina e, assim como ele, também causa problemas nos pacientes com deficiência em glucose-6-fosfato eritrocitária. É ativa contra as formas hepáticas e sanguíneas e é usada na profilaxia (VALE, MOREIRA e GOMES, 2005; KASPER *et al*, 2017).
- f) Elubaquina: é um gametocida derivado da primaquina, é menos hepatotóxico e não induz a metemoglobinemia (VALE, MOREIRA e GOMES, 2005).

**Figura 3 – Estrutura das aminoquinolinas**



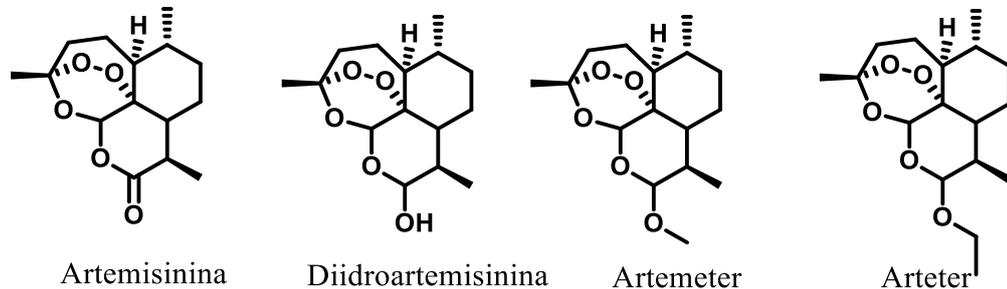
Fonte: elaborado pelo autor

Os derivados da artemisinina agem mais rápido do que os outros fármacos, eliminando os protozoários mais rapidamente que os clássicos. São esquizonticidas sanguíneos e seu mecanismo de ação provável consiste na formação de radicais livres devido à clivagem dos seus peróxidos e da interação com heme Fe (II), modificando as proteínas do parasita. Dentre eles, são conhecidos: (Figura 4) (VALE, MOREIRA e GOMES, 2005; FRANÇA, SANTOS e FIGUEROA-VILLAR, 2008)

- a) Artemisinina

- b) Diidroartemisinina
- c) Artemeter
- d) Arteter

**Figura 4** – Estrutura dos derivados da artemisinina



Fonte: elaborado pelo autor

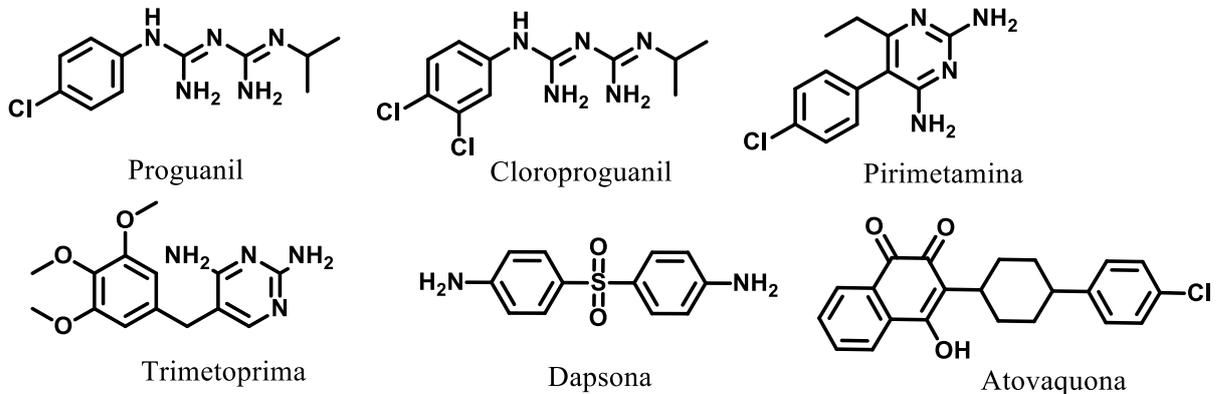
Os antifolatos são esquizontocidas, e têm como mecanismo de ação inibir as enzimas di-hidropteroato sintetase e di-hidrofolato redutase, ambas participam da síntese de ácidos nucleicos, importante para o desenvolvimento do parasita. Por causa da resistência dos parasitas, esse grupo de medicamentos não tem sido tão usado, ou se utilizado, é em conjunto com outros antimaláricos (Figura 5) (VALE, MOREIRA e GOMES, 2005; FRANÇA, SANTOS e FIGUEROA-VILLAR, 2008).

Dentro desse grupo, estão:

- a) Proguanil e cloroproguanil: são pouco tóxicos e usados em conjunto com a cloroquina ou com a atovaquona na profilaxia. Matam os parasitas antes de entrarem nos eritrócitos (VALE, MOREIRA e GOMES, 2005; FRANÇA, SANTOS e FIGUEROA-VILLAR, 2008).
- b) Pirimetamina e trimetoprima: normalmente são administrados com sulfonamidas. São de ação lenta, portanto, são administradas com fármacos que atuam de forma mais rápida (VALE, MOREIRA e GOMES, 2005; FRANÇA, SANTOS e FIGUEROA-VILLAR, 2008).
- c) Dapsona: não é tão eficaz quando administrado sozinho, seu uso é mais comum em administrações conjuntas com o proguanil, pirimetamina ou artesunato. Seu uso é limitado por ter alta toxicidade (VALE, MOREIRA e GOMES, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2014).
- d) Sulfonamidas (geral): não são eficazes na monoterapia e sim em conjunto com outros antimaláricos (VALE, MOREIRA e GOMES, 2005).

e) Atovaquona: utilizado com o proguanil, porque seu mecanismo de ação, da qual interfere na respiração celular, faz com que o genoma mitocondrial seja mutado, podendo aumentar a resistência do parasita (VALE, MOREIRA e GOMES, 2005; ANTONY e PARIJA, 2016).

**Figura 5** – Estruturas dos fármacos antifolatos usados contra a malária



Fonte: elaborada pelo autor

É importante ressaltar que em todas as classes o *P. falciparum*, principalmente, tem resistência, e uma grande contribuição para isto é o uso indiscriminado de tais fármacos, medicamentos falsificados, administrações erradas, além da rápida reprodução do parasita no hospedeiro definitivo e as mutações que podem ocorrer (FRANÇA, SANTOS e FIGUEROA-VILLAR, 2008). Uma estratégia para diminuir as chances de resistência é a terapia combinada de dois tipos de antimaláricos, o tratamento é mais eficaz, porém, mais caro (ANTONY e PARIJA, 2016; CUNICO *et al*, 2008).

### 2.3 Alvos bioquímicos

Com a evolução nas áreas de biologia e genética, o sequenciamento genômico se tornou possível e a descoberta de diversos alvos bioquímicos em sistemas biológicos também. Com isso, foi possível determinar a importância da classe das cisteíno-proteases para o ciclo de vida e patogenicidade de alguns parasitas, se destacando como um alvo bioquímico em potencial. Essas enzimas parasitárias possuem diversas funções, entre elas: imunoevasão, virulência, invasão celular e de tecidos (SAJID e McKERROW, 2002). Essas cisteíno-proteases se assemelham com a primeira enzima obtida a partir da *Carica papaya*, o mamão,

sendo chamada de papaína, e nomeando o grupo das enzimas como Papaína-like (SAJID, 2002).

Elas são divididas em clãs, das quais são subdivididas em famílias. Essas famílias são organizadas de acordo com sua a identidade de sequência (PANDEY, 2011).

Um avanço importante para o entendimento das cisteíno proteases é o sequenciamento do genoma do *Plasmodium*, que está disponível no site <http://plasmodb.org>, contribuindo para os avanços ao combate ao parasita (PANDEY, 2011).

### 2.3.1 Falcipaína

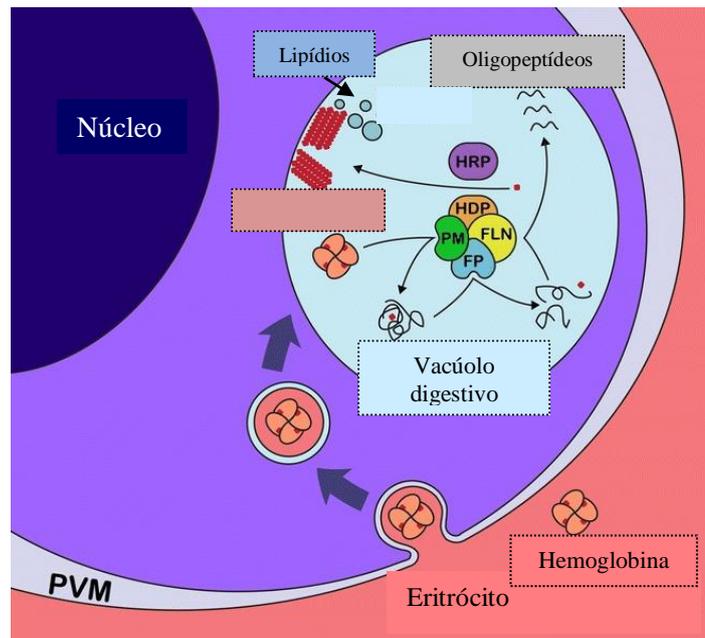
Os parasitas do gênero *Plasmodium* expressam altas concentrações de cisteíno-proteases (PONSUWANNA *et al*, 2016; PANDEY, 2011; BONILLA *et al*, 2007).

Chamada de falcipaína (FP), devido ao parasita do qual foi isolada, é encontrada em três isoformas: falcipaína 1, 2 e 3, as quais além de alta identidade estrutural apresentam também parâmetros cinéticos semelhantes (ROSENTHAL, 2002; ROSENTHAL, 2004). Visto a sequência nucleotídica ser bem conservada nos genes do *Plasmodium*, a falcipaína parece ser um alvo interessante para a busca de fármacos contra todas as espécies que causam malária em seres humanos (PANDEY, 2011; GLENN *et al*, 2006).

A falcipaína 1 está ligada a invasão eritrocitária, presente no protozoário em forma de anel e merozoíto. As falcipaínas 2 e 3, que tem identidade estrutural de 66,7%, atuam na hidrólise da hemoglobina, porém, a falcipaína 2 se encontra em maior concentração, 1,8 vezes mais do que a falcipaína 3, e é expressa 12 horas antes da FP-3 (PRASAD *et al*, 2013; PANDEY, 2011; CRUZ, 2010; YOGESH *et al*, 2002).

A falcipaína 2 é uma das principais na digestão da hemoglobina previamente desnaturada por outra protease dentro do vacúolo digestivo, a plasmepsina (PM), produzindo globina e heme. Por meio da protease da família da falcilisina (FLN), a globina é clivada em aminoácidos ou peptídeos curtos para produzir proteínas e manter o equilíbrio osmótico e, a heme é convertida em hemozoína pela proteína que faz a desintoxicação da heme (HDP), pela proteína rica em histidina (HRP). E ainda é sugerido que lipídios da membrana do vacúolo digestivo auxiliem na síntese da hemozoína (Figura 6) (PONSUWANNA *et al*, 2016).

**Figura 6** – Representação do vacúolo digestivo do *Plasmodium* e as proteínas que atuam na digestão da hemoglobina



Fonte: PONSUWANNA *et al*, 2016 – adaptada pelo autor

Estudos com parasitas nocautes para esse gene mostraram uma lenta hidrólise da hemoglobina em trofozoítos, o que diminuiu a ação da artemisinina e, ainda, a inibição desta protease curou a malária murina (VIJAYARAGHAVAN e MAHAJAN, 2017). Ela possui uma cópia, a falcipaina 2' ou 2B, que possui 97,5% de identidade na sequência de aminoácidos. Espera-se que os inibidores da falcipaina 2 inibam também sua cópia. Esta é uma das proteases que tem sido alvo de pesquisa para novos antimaláricos (CONRAD *et al*, 2014). Inclusive, muitos inibidores de cisteínas proteases, incluindo a leupeptina, mostraram atividade de bloqueio da doença, inibindo as falcipainas 2 e 3. E ainda há outras moléculas sendo estudadas recentemente que parecem inibir a falcipaina 2, como moléculas sintetizadas com base na pirrolidina, tiazolidinedionas, tiossemicarbazonas, análogos da gallinamide A (que é um produto natural de cianobactérias marinhas panamenhas e inibiu as falcipainas 2 e 3), flavonóides, como chalconas e auronas, e compostos nitrilos pirimidina peptidomiméticos (CHAKKA *et al*, 2015; SHARMA *et al*, 2015; BERTOLDO *et al*, 2014; CONROY *et al*, 2014; OLIVEIRA *et al*, 2014; OLIVEIRA *et al*, 2013;).

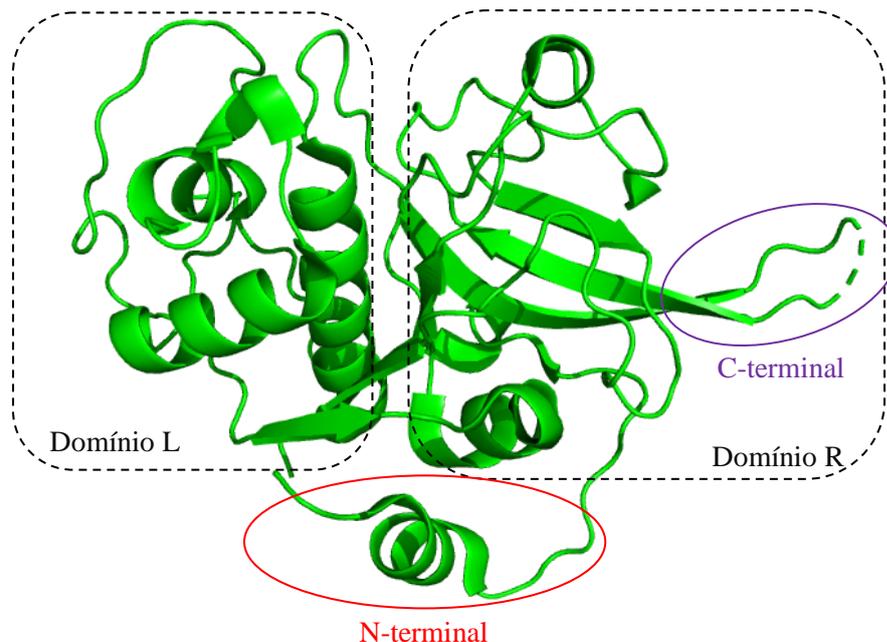
Por fazer parte da classe das cisteíno-proteases, seu sítio catalítico é semelhante às outras cisteínas da família *papaína like*, sendo composto por três resíduos: a cisteína, a histidina e a asparagina (PONSUWANNA *et al*, 2016; PANDEY e DIXIT, 2011). É produzida como proenzima contendo 484 aminoácidos, perdendo 243 resíduos do N-terminal quando

esta sendo transportada pelo complexo de Golgi/ retículo endoplasmático, isso durante a forma de trofozoíto.

Estruturalmente, a protease é um polipeptídico de cadeia única com 241 aminoácidos, sua forma madura é composta por cinco alfas-hélices e nove cadeias beta, possui dois domínios, o R e o L, e o sítio ativo se encontra entre esses domínios. É produzida como um zimogênio inativo (a estrutura inicial necessita de clivagens em determinados peptídeos para ficar ativa) e possui dois domínios principais: o prodomínio e o domínio maduro. O prodomínio ainda é dividido em dois domínios menores, o N-terminal ('nose') que faz a movimentação da protease dentro do vacúolo digestivo e o C-terminal ('arm') que inibe a protease madura. Já no domínio maduro, esses domínios N e C-terminais têm funções diferentes, o N-terminal faz ponte entre os domínios R e L, sendo um domínio de dobramento para ativação da proteína madura, e o C-terminal provavelmente liga-se a hemoglobina a partir do seu motivo (Figura 7). Tais domínios são incomuns se comparados com as outras cisteíno-proteases (PONSUWANNA *et al*, 2016; SRINIVASAN *et al*, 2012; PANDEY, 2011; PANDEY e DIXIT, 2011; ETTARI *et al*, 2009).

**Figura 7** – Estrutura cristalográfica da falcipaina 2 retirada do PDB (código 3BPF).

Domínio maduro



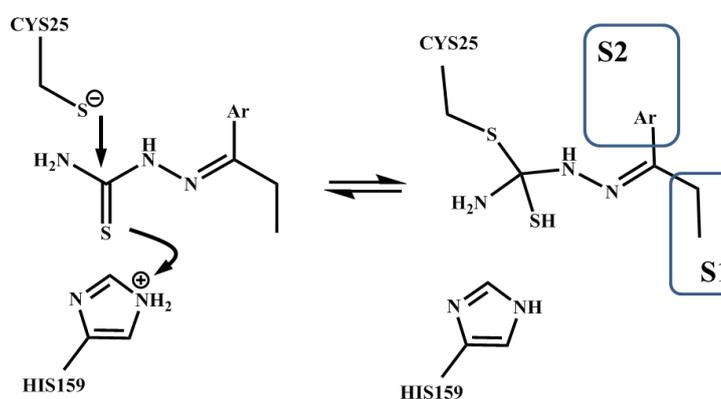
Fonte: PDB 3BPF – adaptada pelo autor

### 2.3.2 Tiossemicarbazonas e ditiocarbazatos

As tiossemicarbazonas (Figura 7) têm importantes propriedades biológicas, como por exemplo, antiprotozoária, antibacteriana, antitumoral, antitripanossomal e antiviral, e em termos de síntese, são consideradas relativamente baratas e versáteis. São consideradas com muita deslocalização eletrônica e, se tiver um anel aromático ligado ao carbono da imina, essa deslocalização fica acentuada. As ligações do nitrogênio ao redor da tiocarbonila são muito próximas, contribuindo para o deslocalização dos elétrons (TENÓRIO *et al*, 2005).

Para a inibição protozoária, Klayman e colaboradores publicaram um trabalho na *European journal of medicinal chemistry* em 1984 no qual notaram que é necessária a presença da base de Schiff e a tiocarbonila para que haja a inibição (TENÓRIO *et al*, 2005). Du e colaboradores em 2002 testaram uma série de tiossemicarbazonas em cruzaina (cisteíno-protease de *Trypanosoma cruzi*) e obtiveram sucesso na inibição desta protease, com valores de IC<sub>50</sub> abaixo de 200 nano molar. Eles também propuseram que essa inibição se dá pelo ataque da cisteína (CYS 25) da cruzaina ao carbono tiocarbonílico, fazendo uma ligação covalente reversível com o composto (Figura 8).

**Figura 8-** Mecanismo de inibição das tiossemicarbazonas frente a cruzaina proposto por Du e colaboradores



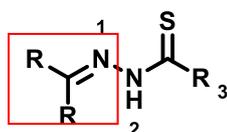
Fonte: DU *et al*, 2002 – adaptada pelo autor

Diante disso, outros trabalhos demonstraram estudos de Relação Estrutura-atividade (REA ou SAR, do inglês), estudos biológicos e síntese de derivados das tiossemicarbazonas testados frente à cruzaina que mostram uma inibição da protease ou do parasita. De maneira similar, relatos da literatura indicam a inibição da falcipaina 2 ou contra o parasita causador da malária. Como exemplo disso, o Esquema 1 demonstra um estudo de

REA feito com as tiossemicarbazonas frente a falcipaina, realizado por Greenbaum e colaboradores (2004) (SILES *et al*, 2006; GREENBAUM *et al*, 2004; CHIPELEME *et al*, 2007; ESPÍNDOLA *et al*, 2015; LIU *et al*, 2012).

Os ditiocarbazatos (Figura 9) são compostos que possuem atividade anticancerígena, antimicrobiana, antitripanossomal e inseticida (CARNEIRO *et al*, 2014; SHRIVASTAVA *et al*, 2011). É um bioisómero clássico das tiossemicarbazonas e em seu esqueleto também tem uma base de Schiff, uma estrutura muito utilizada em sínteses orgânicas que tem mostrado atividades biológicas contra câncer, malária, fungos, bactérias, anti-inflamatória e antipirética (SILVA *et al*, 2011; MURTAZA *et al*, 2014).

**Figura 9** – Esqueleto geral das tiossemicarbazonas/ditiocarbazatos com a base de Schiff destacada.

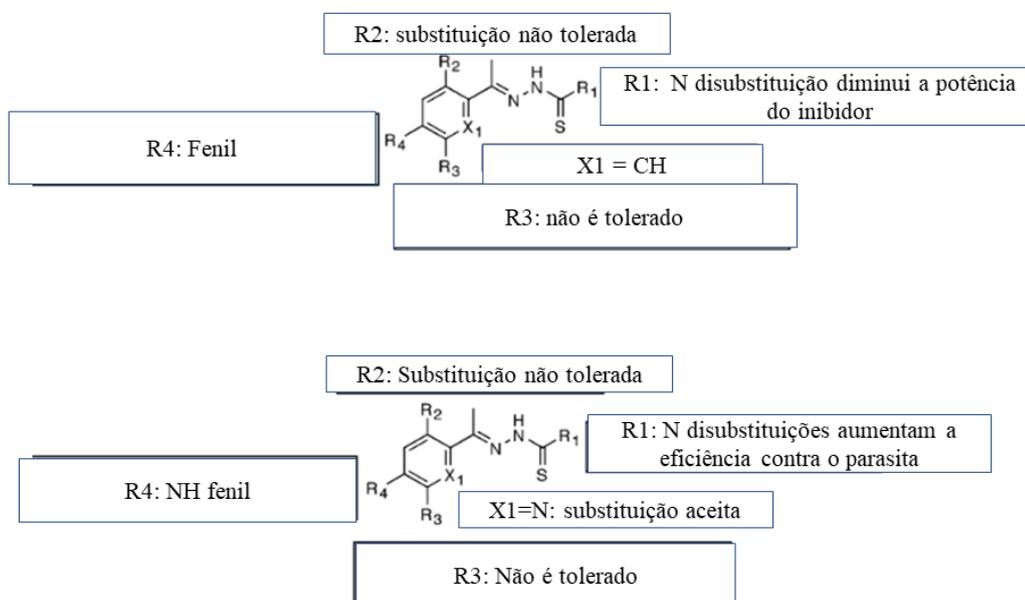


R= H, aril e alquil

R<sub>3</sub>= NH - tiossemicarbazona R<sub>3</sub>= S - ditiocarbazato

Fonte: SILVA *et al*, 2011 – adaptada pelo autor

**Esquema 1** – Estudo de REA frente a falcipaina 2 e ao parasita *P. falciparum*.



Fonte: Greenbaum *et al*, 2004 - adaptada pelo autor.

## 2.4 Modificação Molecular

### 2.4.1 Bioisosterismo

Modificação molecular é uma abordagem na química medicinal com intuito de resolver problemas referentes à farmacocinéticas e/ou farmacodinâmicas de um protótipo já conhecido. Isso é feito a partir da identificação de grupamentos específicos na molécula que podem ser retirados ou adicionados, feitos por meio do biososterismo, por exemplo, ou por outras estratégias. Tais modificações são úteis, tendo em vista que durante os ensaios biológicos podem haver problemas na farmacocinética, sendo necessário fazer modificações, mesmo obtendo o efeito esperado farmacologicamente (LIMA, 2007; BARREIRO e FRAGA, 2002).

O conceito de biososterismo surgiu do isosterismo porque modificações levando em conta apenas as propriedades físico-químicas de átomos, grupos ou moléculas poderiam ter respostas biológicas em sistemas diferentes. Então, para realizar estas modificações, as características da estrutura precisam estar bem definidas e o mecanismo de ação elucidado e, se possível, conhecer a interação dele com o receptor e seu grupo farmacofórico. Com essas informações podem-se fazer modificações pontuais na estrutura da molécula, para obter efeitos similares aos conhecidos (BARREIRO e FRAGA, 2002; FOYE's, 2008).

Pensando nessas modificações, os bioisósteros se dividem em clássicos e não clássicos. Os clássicos são baseados nas regras de Grimm e Langmuir, da qual estabeleceu que a adição de um hidreto a um átomo o deixaria com propriedades físicas parecidas com o átomo da coluna seguinte da tabela periódica em relação ao átomo que recebeu o hidreto, obtendo também o mesmo número de valência e formando um pseudoátomo em relação ao átomo que foi usado como referência para esses parâmetros. Para alguns átomos essa regra funciona, para outros as propriedades ficam diferentes, então Hinsenberg desenvolveu o conceito de 'anel equivalente', o qual permitia trocar os substituintes em um sistema de anéis aromáticos sem afetar suas propriedades físico-químicas (BARREIRO e FRAGA, 2002; KNITTEL e ZAVOD, 2008).

Já o biososterismo não clássico envolve substituições de grupos que apresentam respostas semelhantes (agonistas ou antagonistas) e que não seguem as regras de Grimm, Langmuir e Heinsenber. Para aplicá-los adequadamente, os parâmetros químicos, físico-químicos e eletrônicos dos substituintes devem ser bem conhecidos e analisados. Fatores que devem ser considerados na escolha dos substituintes são, por exemplo: volume, tamanho,

distribuição eletrônica, lipofilicidade, hidrofobicidade, fatores conformacionais, entre outros (BARREIRO e FRAGA, 2002; KNITTEL e ZAVOD, 2008).

Como exemplo de aplicação de sucesso dessa estratégia, os fármacos antagonistas de H<sub>2</sub> (usados como antiúlcetosos) como a cimetidina, foi melhorada, aplicando o bioisosterismo clássico de anéis, gerando a ranitidina, que é 5 vezes mais potente que a cimetidina, por exemplo.

#### 2.4.2 Planejamento Racional de Fármacos

O planejamento racional de fármacos é uma das estratégias da química medicinal que consiste na utilização dos conhecimentos sobre a fisiopatologia e das bases moleculares da terapêutica. Assim, utiliza-se um alvo o qual se quer alcançar (enzimas ou receptor) para poder planejar um ligante que atue de forma agonista ou antagonista a ele. Essa estratégia pode envolver a integração das técnicas experimentais e computacionais para melhor chegar a compostos que podem ser candidatos a fármacos. Para isso, pode-se planejar um fármaco utilizando a estrutura topológica do alvo ou a estrutura de algum ligante conhecido (BARREIRO e FRAGA, 2002; GUIDO, ANDRICOPULO E OLIVA, 2010).

Desta forma, métodos que utilizam a estrutura do alvo molecular (SBDD: *structure-based drug design*) ou a estrutura de um ligante (LBDD: *ligand-based drug design*) são abordagens utilizadas como ferramentas para o descobrimento ou otimização de fármacos. Na SBDD, a estrutura de um alvo, que pode ser uma enzima ou uma proteína, é conhecida, então é possível planejar um protótipo ou buscar compostos que interajam com ela. O captopril, a donepezila e o zanamivir entre outros, são exemplos de fármacos que foram descobertos por essa estratégia. Mas, quando não é possível ter os conhecimentos a respeito do receptor, pode ser utilizado o LBDD, onde o ligante que irá ser planejado pode ser baseado em moléculas já conhecidas, seja ela um fármaco ou uma molécula endógena (um substrato do alvo em questão) (ALVES *et al*, 2017; LEE, HUANG e JUAN, 2011).

Em ambas estratégias de planejamento, a modelagem molecular pode ser muito útil para auxiliar. Ela é uma ferramenta usada para construir e manipular estruturas, descobrir novos fármacos, aperfeiçoar moléculas já conhecidas ou planejadas, visualizar estruturas em terceira dimensão e realizar cálculos de características específicas. Assim, pode-se observar como as características eletrônicas influenciam na interação com o alvo terapêutico, fazer comparações de confôrmeros e observar como uma determinada molécula interage com o alvo, por exemplo. Tais predições e observações só são possíveis devido a *softwares* que

utilizam cálculos matemáticos baseados na mecânica molecular e na mecânica quântica (ALVES *et al*, 2017; PATRICK, 2013; RODRIGUES, 2001).

Como exemplo de uso dessas estratégias, no LBDD podem ser feitos estudos de similaridade (busca de moléculas parecidas em bases de dados) para poder sintetizá-las ou comprá-las e utilizar em estudos de inibição, otimização ou até em estudos de relação quantitativa de estrutura-atividade (QSAR: *quantitative structure-activity relationship*), que consiste em relacionar a atividade química ou biológica da estrutura usando modelos matemáticos. Na SBDD pode-se encontrar um farmacóforo na estrutura alvo e buscar ligantes que se complemente a ele, avaliar a interação de um ligante com o alvo por meio da *docking* (ancoragem) molecular, simular movimentos da proteína em estudos de dinâmica e ainda, construir um alvo por modelagem comparativa ou por homologia, quando não é possível ter o alvo obtido experimentalmente, utilizando modelos da mesma família de proteínas/enzimas (ALVES *et al*, 2017; FERREIRA *et al*, 2015; LEE, HUANG e JUAN, 2011).

A integração de métodos computacionais com experimentais aceleraram os processos nas mais diversas áreas, inclusive no descobrimento e planejamento de fármacos. Uma das vantagens dessa técnica é a facilidade de visualização de resultados complexos, além de ter um custo mais baixo que outros métodos (SANT'ANNA, 2002; NATURE, 2017; ACS, 2017). Esses compostos planejados inicialmente são conhecidos como ligantes (*hits*), e após serem otimizados para melhorar suas características farmacodinâmicas e farmacocinéticas, são conhecidos como compostos líderes (*leads*) e, posteriormente, serão desenvolvidos em candidatos a fármacos (BARREIRO e FRAGA, 2002; GUIDO, ANDRICOPULO E OLIVA, 2010).

#### 2.4.3. *Docking* molecular

O *docking* (ancoragem) molecular é uma ferramenta usada na modelagem molecular na qual por meio de *softwares* é possível avaliar a interação entre ligantes e uma macromolécula (como proteínas, DNA ou RNA). A partir disso, verificar a conformação dos ligantes no sítio de ligação estudado (*pose*) e prever as energias de ligação (que são demonstradas em forma de *score*) entre essas duas moléculas (PRIETO-MARTÍNEZ *et al*, 2018; AGARWAL e MEHROTRA, 2016; KITCHEN *et al*, 2004).

Os estudos de *docking* é realizado a partir do conhecimento da estrutura 3D do alvo que pode ser obtida em base de dados, como o PDB (*Protein Data Bank*) e de ligantes avaliando, assim, sua complementariedade. As estruturas das macromoléculas podem ser

oriundas de cristalografia de raio X, ressonância magnética ou por modelagem comparativa/homologia (no caso das proteínas). No caso dos ligantes, a estrutura pode ser construída por algum *software* ou também obtida em alguma base de dados que possuem as características tridimensionais da molécula de interesse. Ambas devem ser tratadas em programas específicos antes do estudo, pois isso interfere nos resultados (PRIETO-MARTÍNEZ et al, 2018; AGARWAL e MEHROTRA, 2016).

O processo de *docking* se inicia com as mudanças conformacionais geradas por algoritmos que encaixam o ligante (macro ou micromolécula) no sítio de ligação, gerando o que é chamado de pose. Já para realizar as previsões de energia, os *softwares* dispõem de campos de forças cuja maioria tem como base a física clássica (mecânica molecular) que consideram basicamente as torções moleculares, o potencial de energia, a geometria de ligação, o potencial de Lennard-Jones e a eletrostática. Neste tipo de campo de força, os elétrons não são considerados nos cálculos, permitindo uma maior rapidez durante os cálculos de, além de utilizar dados experimentais para aumentar a precisão dos cálculos. Caso seja necessário, o usuário pode escolher programas que possuem campos de força parametrizados com mecânica quântica, como semi-empíricos ou *ab initio* (que consideram os elétrons no cálculo); isso trará uma maior acurácia, porém, dependendo do computador ou do que está sendo calculado, o tempo é maior (PRIETO-MARTÍNEZ et al, 2018; KITCHEN et al, 2004).

Existem diferentes tipos de *docking* que são usados de acordo com a necessidade do usuário:

1. o *docking* rígido: onde o alvo e o ligante (seja ele macro ou micromolécula) ficam rígidos durante o processo. É mais usado em complexos ligados, devido a precisão ser maior nesses casos do que em complexos não ligados (PRIETO-MARTÍNEZ et al, 2018; AGARWAL e MEHROTRA, 2016).
2. O *docking* semi-flexível: o usuário escolhe os resíduos que serão flexíveis do alvo
3. (PRIETO-MARTÍNEZ et al, 2018; AGARWAL e MEHROTRA, 2016).
4. O *docking* rígido-flexível: onde o alvo geralmente é rígido e o ligante flexível (PRIETO-MARTÍNEZ et al, 2018; AGARWAL e MEHROTRA, 2016).

Utilizar ferramentas computacionais para a descoberta de novos fármacos faz com essa busca seja feita de maneira mais pontual, auxiliando o pesquisador nos estudos de características, tanto do ligante como do alvo, otimizando tempo e investimento financeiro. Isso é uma vantagem em termos de economia no geral, até mesmo na geração de resíduos em uma síntese ou em um ensaio biológico, por exemplo. Mas, por se tratar de estudos teóricos, podem não corresponder com a realidade podendo gerar resultados falsos positivos ou falso

negativos. Por isso, integrar essas ferramentas com estudos experimentais se torna fundamental nessa busca, permitindo validar as suposições estudadas por meio dos métodos computacionais, gerando resultados mais rápidos e até mais robustos em termos da compreensão de mecanismo de síntese ou inibição biológica.

### 3. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

Diante do exposto, é de grande valia a busca e o desenvolvimento de novos agentes antimaláricos. A cisteíno-protease falcipaina 2 é uma proteína que tem sido estudada e tem se mostrado um interessante alvo molecular sendo essencial para a sobrevivência do parasita, tendo a função de digestão da hemoglobina (CONRAD et al, 2014, BONILLA et al, 2007, GLENN et al, 2006).

Neste projeto foi proposto a utilização de métodos de planejamento de fármacos baseados na estrutura do ligante (*Ligand Based Drug Desing* – LBDD), o qual é um método que utiliza as informações de pequenas moléculas que são conhecidas por serem ativas ou não para determinado alvo (GUIDO, OLIVA e ADRICOPULO, 2012) e, com isso, desenvolveu três séries derivadas das tiossemicarbazonas e ditiocarbazatos, visto que estas classes apresentaram atividade contra a falcipaina 2 ou contra o parasita, demonstrado em estudos publicados de outros grupos de pesquisadores e citados neste projeto (TENÓRIO *et al*, 2005; SILVA *et al*, 2011; MURTAZA *et al*, 2014), também foi utilizado o *docking*, com o objetivo de entender a complementariedade molecular e possível mecanismo de ação dos compostos planejados para falcipaina 2 de *P. falciparum*.

As etapas desenvolvidas nesse projeto foram:

1. Estudos de modelagem molecular e *docking* das séries dos derivados das tiossemicarbazonas e ditiocarbazatos;
2. Síntese dos compostos; e
3. Ensaio de atividade frente a forma de esquizonte do *P. falciparum*.

A integração entre estratégias teóricas (computacionais) e experimentais (síntese e avaliação biológica), fundamental para o planejamento e obtenção de novos fármacos é demonstrada neste projeto, estando dentro do paradigma da Química Farmacêutica e Medicinal moderna, seguindo tendências científicas e tecnológicas atuais nos aspectos multi e interdisciplinares. Espera-se, dessa forma, contribuir para a quimioterapia da Malária, doença que necessita de atenção especialmente nos países acometidos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Reagentes e solventes

Hidrazina hidratada 80% (Synth)	Etanol p.a. e CLAE (Synth)
Dissulfeto de carbono (Sigma Aldrich)	Acetonitrila p.a. e CLAE (Synth)
Cloreto de benzila (Sigma)	Metanol p.a. e CLAE (Synth)
Brometo de 3-nitrobenzila (Sigma)	Benzeno (Synth)
Brometo de 2-metil 3-nitrobenzila (Sigma)	Acetato de etila (Sigma)
Brometo de 4-metil 3-nitrobenzila (Sigma)	Hexano (Synth)
Brometo de etila (Sigma)	Dimetilsulfóxido deuterado (Synth)
Anilina (Sigma)	3',4'-(Metilenodioxi) acetofenona (Sigma)
P-Amino fenol (Sigma)	2-Tiofeno- carboxaldeído (Sigma)
4-Imidazol-carboxaldeído (Sigma)	Furfural (Sigma)
2- Pirrol carboxaldeído (Sigma)	

#### 4.1.2 Equipamentos

Bomba de alto vácuo, modelo E2M5 EDWARDS
Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear 300 MHz BUNKER (Advance DPX-300)
Rotaevaporador R-3 Büchi
Aparelho capilar Büchi para determinar faixa de fusão
Cromatógrafo líquido SHIMADZU

#### 4.1.3 Computadores e estações de trabalho

- Workstations HP Z600 (Xeon X5650, HD 1Tb, NVIDIA Quadro 4000 1Gb)

- Computadores PC/Notebook Windows 10

#### 4.1.4 Softwares

Gaussian 03W	ChemDraw Ultra 12.0
GausView 4.1	Chem3D Pro 12.0
GOLD 5.4.0	Excel 2010
Pymol viewer 2.0.7	H++ (servidor da web)
Modeller 9.14	Rampage plot (servidor da web)
Sybyl-X 2.0	

## 4.2 Métodos

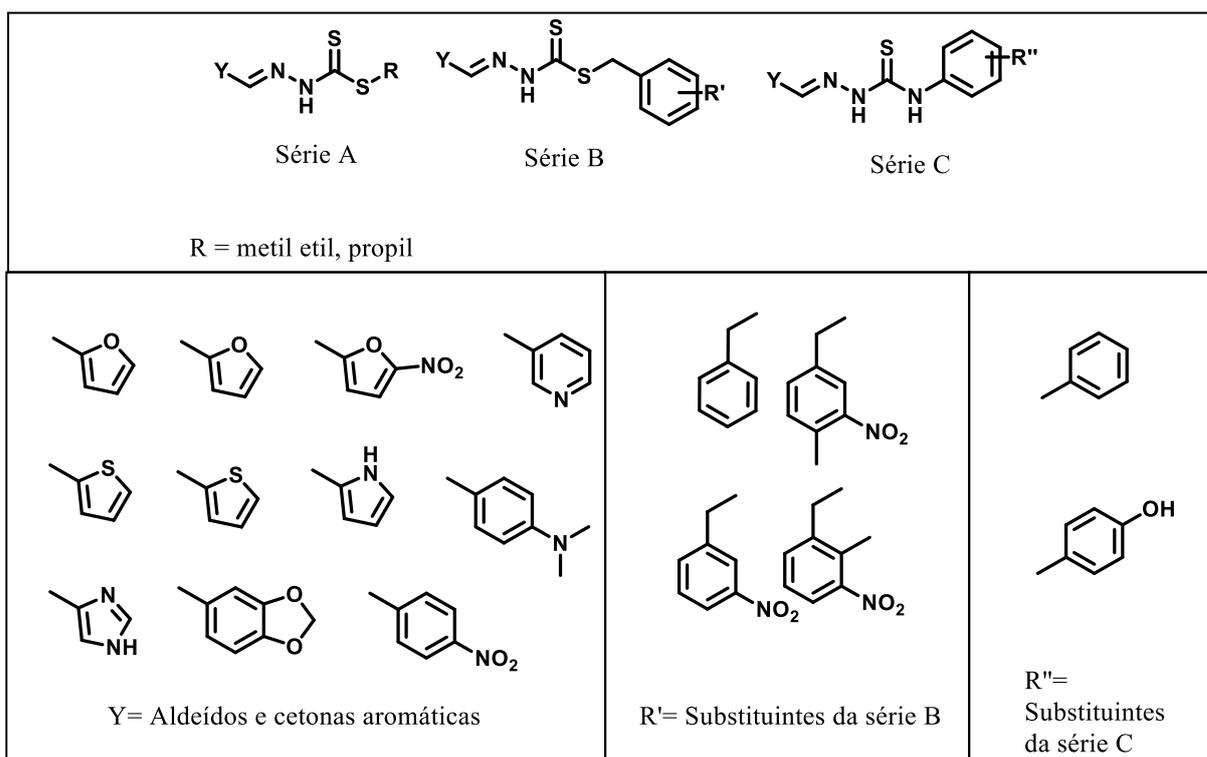
### 4.2.1 Planejamento das séries

O planejamento das séries foi baseado em estudos de Greenbaum (2004) (Esquema 1). Como estratégia mantivemos as partes estruturais importantes para a inibição, como a base de Schiff e a tiocarbonilas e trabalhamos pensando nas substituições aromáticas ligada à base de Schiff. Aplicamos técnicas de bioisosterismo também nessas substituições, para avaliar uma relação entre estrutura e atividade.

Além disso, também foram avaliadas as substituições no nitrogênio 3 das tiossemicarbazonas e no enxofre dos ditiocarbazatos e como essas afetariam em um possível mecanismo.

Os compostos foram divididos em três séries: A, B e C, sendo 33 compostos para a série A, 66 para a série B e 33 para a série C. Para cada série variou-se principalmente os anéis aromáticos e os radicais (Figura 10).

**Figura 10** – Estruturas gerais dos compostos de cada série e seus substituintes usados em cada série.



Fonte: Elaborada pelo autor

#### 4.2.2 Métodos computacionais

Para os estudos e cálculos computacionais foram utilizados os computadores disponíveis na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (sistema operacional Windows 10).

##### 4.2.2.1 Otimização da geometria molecular

Todos os compostos foram construídos no Gaussview 4.1. Para esses, foi realizada a otimização da geometria molecular e cálculo do mínimo de energia no Gaussian 03W, utilizando métodos semi-empírico PM3 e *ab initio* Hartree-Fock, utilizando primeiramente a base 3-21G e depois, 6-31G. Para análise das cargas atômicas, utilizou-se do tipo ESP.

#### 4.2.2.2 Mapas de potencial eletrostático (MEP)

Após os passos de otimização da geometria molecular e dos cálculos de energia, foram gerados os MEP para cada composto e analisados na faixa de cores de  $-3.704\text{e-V}$  para  $3.704\text{e-V}$  para série A,  $-3.704\text{e-V}$  para  $3.704\text{e-V}$  para série B e  $-3.850\text{e-V}$  para  $3.850\text{e-V}$  para série C.

#### 4.2.2.3. Orbital molecular de mais baixa energia não ocupado (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital* – LUMO) e orbital molecular de mais alta energia ocupado (*Highest Occupied Molecular Orbital* – HOMO)

Foram calculados e analisados o LUMO e o HOMO para cada uma das moléculas no programa Gaussian 03W.

#### 4.2.2.4. Estudos de *Docking*

Os estudos foram realizados no programa GOLD 5.4.0, em um computador PC, com sistema operacional Windows.

As estruturas cristalográficas da falcipaina 2 (3BPF e 2OUL) foram adquiridas no *Protein Data Bank* (PDB), preparadas nos programas Pymol viewer 2.0.7, para retirada das cadeias B,C, D (no caso da 3BPF) e moléculas de água. Ambos os cristais foram submetidos no programa Modeller 9.14 para consertar os aminoácidos faltantes do braço C do cristal 3BPF.

Após o modelo gerado, este foi minimizado a energia no programa Sybyl-X 2.0 pelo método *Steepest descente* e ajustado seu estado de protonação em pH 5,5 no servidor da web H++.

Com a proteína preparada foi feita uma validação por *re-docking* comparando as funções score Goldscore (rescore em Chemscore) com ChemPLP, variando as caixas em 5 Å, 8 Å e 10Å, com ponto centroide na Cis 42.

Os estudos de *docking* foram aplicados nos compostos escolhidos nos estudos de características estereoeletrônicas já otimizados no programa Gaussian 03W.

#### 4.2.3 Síntese geral do projeto

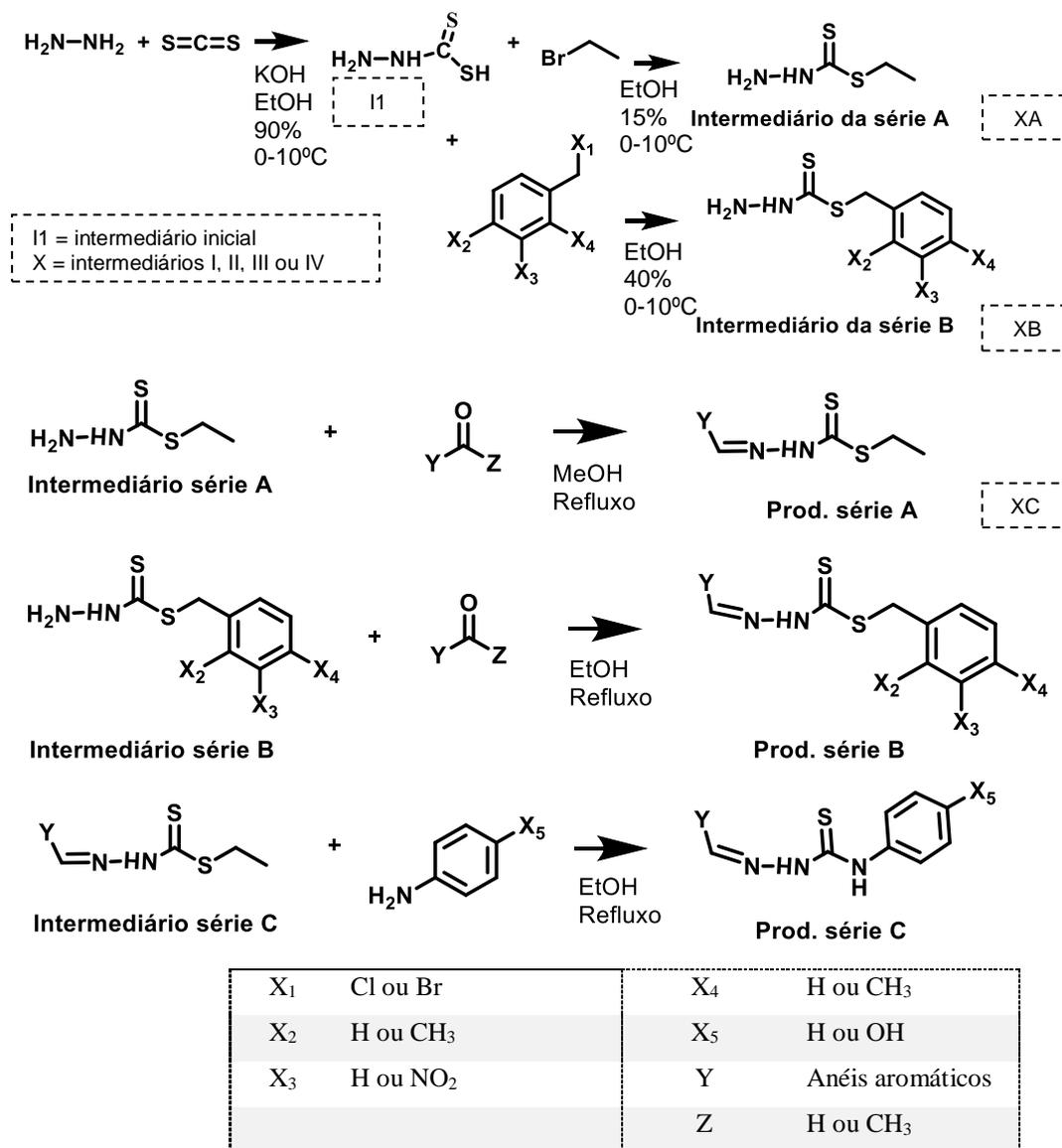
A síntese dos derivados propostos será realizada nas dependências do laboratório de química farmacêutica do LITEC (Laboratório de Integração entre Técnicas Experimentais e Computacionais, no planejamento de fármacos) situado na FCF-USP.

Os solventes e reagentes usados estavam em condições adequadas de uso, sem necessidade de purificação prévia. O único reagente que precisou ser purificado foi o furfural, e sua purificação seguiu-se conforme os procedimentos de Armarego e Chai (2009).

Foram sintetizadas três séries, nomeadas A, B e C, derivados dos ditiocarbazatos e tiossemicarbazonas.

Para obtenção da série A e B, serão reagiu-se por 2 a 5 horas uma mistura de hidrazina com dissulfeto de carbono, os possíveis substituintes: iodeto de etila ou cloreto de benzila com substituintes no anel ( $\text{CH}_3$  e/ou  $\text{NO}_2$ ) ou não, em uma solução de hidróxido de potássio (KOH) em etanol 90% (na primeira parte), etanol 40% ou 15% (na segunda parte), todas sob uma temperatura de  $0^\circ\text{C}$  -  $10^\circ\text{C}$  e com agitação (KINFE e BELAY, 2013; WATTS *et al*, 2014). Após a obtenção dos intermediários, estes foram reagidos com aldeídos aromáticos em metanol ou etanol, sob refluxo, para obtenção dos derivados da série A e B (SINGH; VARSHNEY, 2001). A série A ainda será reagida com anilinas substituídas ou não em etanol sob refluxo para obter a série C (KULANDAIVELU *et al*, 2014). A síntese geral está demonstrada no Esquema 2.

Esquema 2 – Esquema geral de síntese das séries planejadas.



Fonte: Elaborada pelo autor

#### 4.2.3.1 Síntese do intermediário inicial (II)

Primeiro foi calculado o mmol de cada parte da reação primária para se definir quanto de massa seria necessário de cada reagente e também, para o cálculo final do rendimento. Para essa síntese, foram feitos 50 mmol.

Em um balão de 50 mL diluiu-se 2,8g de KOH em 17,5 mL etanol 90% e adicionados 5 mL de hidrazina 80% hidratada. Mantendo esta solução abaixo de 10°C com um banho de gelo e em constante agitação magnética, gotejou-se 3 mL de dissulfeto de carbono. A reação permaneceu por 1 hora e o produto oleoso formado e foi separado.

#### 4.2.3.2 Síntese dos compostos da série A – derivados dos ditiocarbazatos

A 10 mmol do II adicionaram-se 20 mL de etanol 15%, mantendo essa solução em banho de gelo (0°-10°C) e agitação magnética, adicionou-se 0,73 mL (10mmol) de brometo de etila, gotejando. A reação foi mantida sob agitação por 2 horas sendo acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD) com sistema de solvente de acetato de etila e hexano (5:5). Os produtos formados (XA) foram extraídos com éter e secados com sulfato de magnésio.

A 2 mmol deste produto separado (XA), adicionou-se 10 mL de metanol e 0,19g (2 mmol) de 2-pirrol-carboxaldeído, 0,32g (2 mmol) de 3',4'-(metilenodioxi) acetofenona, 0,22 mL (2 mmol) 2-tiofeno- carboxaldeído e 0,18g (2 mmol) de 4-imidazol-carboxaldeído. A reação foi mantida sob refluxo e agitação magnética por 2 horas e acompanhada por CCD com sistema de solvente de hexano e acetato de etila (8:2). Após isso, o balão foi refrigerado para formação de cristais. Os cristais obtidos foram filtrados a pressão reduzida, lavados com metanol gelado, recristalizados de etanol e analisados por espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , infravermelho e ponto de fusão.

#### 4.2.3.3 Síntese dos compostos da série B – derivados dos ditiocarbazatos

A 10 mmol do II adicionou-se 6 mL etanol 40% e, mantendo essa solução em banho de gelo (0°-10°C) e agitação magnética, adicionou-se 1,14 mL (10 mmol) de cloreto de benzila, 1,85 g (10 mmol) de cloreto de 2-metil 3-nitro benzila ou 4-metil 3-nitro benzila ou 2,16 g (10 mmol) de brometo de 3-nitro benzila (diluídos com etanol e acetato de etila o suficiente apenas para solubilizá-los) lentamente. A reação foi mantida sob agitação de 2 a 4 horas sendo acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD) com sistema de solvente de acetato de etila e hexano (5:5). Os produtos sólidos formados (XB) foram filtrados em pressão reduzida, lavados com etanol, recristalizados de etanol e analisados por espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

A 2 mmol deste produto separado (XB), adicionou-se 10 mL de etanol e 0,19g (2 mmol) de 2-pirrol carboxaldeído, 0,32g (2 mmol) de 3,4-(metilenodioxi) acetofenona, 0,16 mL (2 mmol) furfural e 0,18g (2 mmol) de 4-imidazol-carboxaldeído. A reação foi mantida sob refluxo e agitação magnética por 2 horas e acompanhada por CCD com sistema de solvente de hexano e acetato de etila (8:2). Após o tempo de reação, o balão foi refrigerado. Os cristais obtidos foram filtrados a pressão reduzida, lavados com etanol gelado,

recristalizados de etanol e analisados por espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , infravermelho e ponto de fusão.

#### 4.2.3.4 Síntese dos compostos da série C – derivados das tiossemicarbazonas

A 2 mmol dos intermediários da série A (XA), adicionou-se 6 mL de metanol e 0,32g (2 mmol) de 3',4'-(metilenodioxo) acetofenona, 0,22 mL (2 mmol) de tiofeno-2-carboxaldeído ou 0,18g (2 mmol) de 4-imidazol-carboxaldeído. A reação foi mantida por 2 horas sob refluxo com agitação magnética. Os produtos precipitados (XC) foram filtrados com pressão reduzida, lavados com metanol gelado e analisados por CCD com sistema de hexano e acetado de etila (8:2).

A 1,5 mmol do produto formado (XC), adicionou-se 8,3 mL de etanol e 0,163g (1,5 mmol) de p-amino fenol ou 0,136 mL (1,5 mmol) de anilina. A reação foi mantida sob refluxo e agitação magnética *overnight* e acompanhada por CCD com sistema de solvente de hexano e acetado de etila (8:2). O produto foi evaporado em baixa pressão, os cristais coletados e purificados por cromatografia em coluna, utilizando sílica gel flash, em um sistema de solvente igual ao da CCD. Os produtos foram analisados por espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , infravermelho e ponto de fusão.

#### 4.2.4 Ensaios biológicos frente ao parasita *P. falciparum*

Os compostos sintetizados e purificados foram enviados para teste de inibição de crescimento celular que foi feita em colaboração com o Prof. Dr. Rafael V. C. Guido no Instituto de Física da USP de São Carlos. A metodologia seguida foi descrita por Smilkstein e colaboradores (2004).

A cultura de *P. falciparum* (cepa 3D7) foi mantida como descrito por Trager e Jensen, 1976. Os parasitas foram mantidos em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 10% de plasma humano, sob atmosfera 3%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$  e 92%  $\text{N}_2$ , a 37°C. Os eritrócitos foram lavados duas vezes e centrifugados a 1500g por 15 minutos em RPMI (RPMI 1640 kit, SIGMA). A parasitemia e sua fase foram determinadas ao microscópio, corando-se as células infectadas com GIEMSA.

Os compostos foram diluídos em DMSO e preparados em solução estoque à 20mM que foram mantidas à - 20°C. Os parasitas foram encubados por 72 horas com os compostos, e posteriormente foi adicionado o reagente SYBR Green (para marcação dos parasitas viáveis),

todos na concentração de 10  $\mu\text{M}$ . Um grupo controle sem a adição dos compostos foi utilizado para o cálculo de redução de parasitemia ( $\text{IC}_{50}$ ). O artesunato foi utilizado como composto de referência para o teste.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Estudos de características estereoeletrônicas das séries planejadas

Foram planejadas três séries derivadas das tiossemicarbazonas e ditiocarbazatos pensando no mecanismo de ação sugerido para esta classe de compostos frente às cisteíno-proteases por Du e colaboradores (2002) e Trossini e colaboradores (2009) (TROSSINI *et al*, 2010; VITAL *et al*, 2014). Com isso, aplicou-se a modelagem molecular para avaliar se as séries planejadas apresentariam disponibilidade para o ataque nucleofílico sugerido. Para isso, foram avaliados principalmente as cargas atômicas dos carbonos tiocarbonílicos, as distribuições orbitales de LUMO e as regiões de deficiência eletrônica ao redor da tiocarbonila (representada pela cor azul nas imagens de MEP).

Os compostos sugeridos como mais favoráveis a agir pelo mecanismo de ação proposto, em cada uma das 3 séries, conforme as análises realizadas, foram selecionados para síntese e posterior ensaios biológicos.

Na série A os compostos foram nomeados de 1A a 33A. Dentre eles, destacamos o 8A que apresentou o maior valor de carga atômica positiva na tiocarbonila (C=S) (Tabela 1) da série, além de região de deficiência eletrônica vista no MEP e LUMO disponível neste mesmo carbono, como observado na Figura 9, estrutura A. Essas observações sugerem que a tiocarbonila deste composto pode sofrer ataque da Cis 42. Quanto as análises dos valores de HOMO, LUMO e momento dipolo, a 8A se destacou com relação aos outros compostos por ter apresentado altos valores de HOMO e momento de dipolo e baixos valores de LUMO (Tabela 2) dentro desta série. Tais resultados sugerem que esta molécula possui uma densidade de elétrons que pode ser facilmente distorcida e, assim, interagir melhor com os resíduos do sítio ativo, visto que valores mais baixos de LUMO estão relacionados com um bom caráter elétron acceptor (ARROIO *et al*, 2010, PATRICK, 2013).

Ainda destacamos o 31A e o 10A, pois apresentaram o carbono da imina (C=N) com valor de carga atômica mais positiva do que o carbono tiocarbonílico (Tabela 1) de toda a série, região disponível de LUMO e uma deficiência eletrônica menos acentuada que se comparada com o 8A (Figura 11) na imina. Nosso objetivo em escolhermos tais compostos é verificar nos testes biológicos se nossas suposições teóricas mostrariam uma preferência do resíduo Cis 42 pela tiocarbonila mesmo quando exposta a outro carbono mais positivo como a imina e em condições eletrônicas favoráveis, como observado no MEP e no LUMO da Figura 11. E ainda, a influência dos valores teóricos de HOMO, LUMO e momento dipolo no

mecanismo de ação proposto. Principalmente no caso da 31A, que apresentou valores mais altos de LUMO e mais baixos de momento dipolo se comparado com a 8A, como é observado na Tabela 2. Ressaltamos que esses valores indicariam menor acepção eletrônica, podendo talvez interagir de maneira dificultosa com a Cis 42. Caso haja interação destes compostos com a Cis 42, essa interação é conhecida como adição de Michael. Nesse mecanismo o carbono  $\beta$  é atacado pelo grupo tiol do resíduo catalítico da Cis, deixando o carbono  $\alpha$  protonado, o resíduo histidina (His) abstrai o próton do carbono e o tiol se liga ao carbono  $\beta$  covalentemente (SANTOS e MOREIRA, 2007).

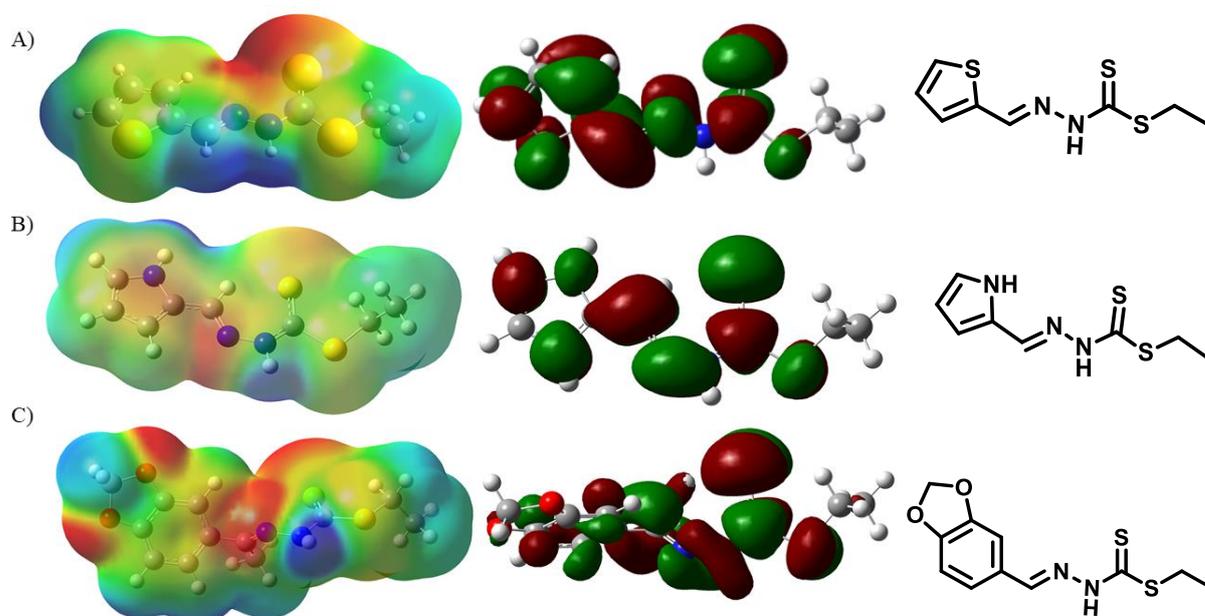
**Tabela 1** – Valores das cargas atômicas (ESP) dos compostos destacados da série A

Compostos	C(C=N)	C(C=S)
8A	0,40	0,59
10A	0,46	0,34
31A	0,59	0,57

Fonte: Elaborada pelo autor

**Figura 11** – Imagens do MEP e LUMO de todos os compostos escolhidos da série A –

A) 8A B) 10A e C) 31A.



Fonte: Elaborada pelo autor

**Tabela 2** – Valores de energia do HOMO, LUMO e momento dipolo dos compostos escolhidos da série A.

<b>Compostos</b>	<b>EHOMO (HF - eV)</b>	<b>ELUMO (HF - eV)</b>	<b>Momento de dipolo (Debye)</b>
<b>8<sup>a</sup></b>	-0,30622	0,05880	2,3781
<b>10A</b>	-0,27933	0,06698	0,9507
<b>31A</b>	-0,31493	0,08832	1,3610

Fonte: Elaborada pelo autor

Na série B, os compostos foram nomeados de 1B até 66B, dentre eles 15B e 66B foram escolhidos por apresentarem valores altos de HOMO e dipolo, baixos de LUMO e energia total, e cargas atômicas positivas na tiocarbonila e/ou na imina (dentro da série) (Tabela 3). Já 4B e 42B foram escolhidos para serem usados em comparação teórica com o restante, visto que apresentaram valores energeticamente desfavoráveis a uma interação com os resíduos do sítio se comparados com 15B e com 66B (Tabela 3).

Quanto aos valores das cargas atômicas, o 15B apresentou um alto valor para a tiocarbonila, enquanto as outras apresentaram valores mais altos para o carbono da imina como pode ser observado na Tabela 4.

Os valores de LUMO da série B foram menores em comparação dos valores obtidos na série A, apresentando valores de 0,0045 -eV a -0,0874 -eV em comparação com a A, que obteve uma faixa de 0,01141 a 0,0896 -eV. Esse resultado indicando uma melhor acepção de elétrons. Na análise do LUMO, tanto o carbono da imina quanto o da tiocarbonila se mostraram com uma grande região orbitalar (com exceção da 42B e 66B como pode ser observado na Figura 12), assim como na série A, sugerindo também que para esta série o mecanismo possa ocorrer conforme o proposto ou ainda pelo mecanismo de adição de Michael. Já analisando os momentos de dipolo e os valores de energia total foram mais altos do que os analisados da série A, indicando moléculas mais estáveis.

Na análise dos MEP, as regiões de ambos os carbonos (imina e tiocarbonila) mostrou uma baixa densidade eletrônica, sugerindo uma possível região de adição nucleofílica para os compostos 15B e 66B, mas levando em consideração o LUMO e as cargas atômicas destes compostos, apenas 15B sugere que seria mais suscetível ao ataque pelo mecanismo proposto. Já para 4B, 42B e 66B tal sugestão não fica tão pronunciada.

**Tabela 3** – Valores de HOMO, LUMO, momento dipolo e energia total dos compostos escolhidos – série B.

<b>Compostos</b>	<b>EHOMO (HF - eV)</b>	<b>ELUMO (HF - eV)</b>	<b>Momento de dipolo (Debye)</b>	<b>Ettotal (a.u)</b>	<b>Ettotal (kcal/mol)</b>
<b>4B</b>	-0,2792	0,06634	1,0579	-1457,8149	-9143326,34659
<b>15B</b>	-0,31018	0,05256	5,9115	-1719,9614	-1079292,3039
<b>42B</b>	-0,31259	0,04065	8,9003	-1677,1407	-1052421.9033
<b>66B</b>	-0,31597	0,05842	5,6348	-1948,5445	-1222730.3954

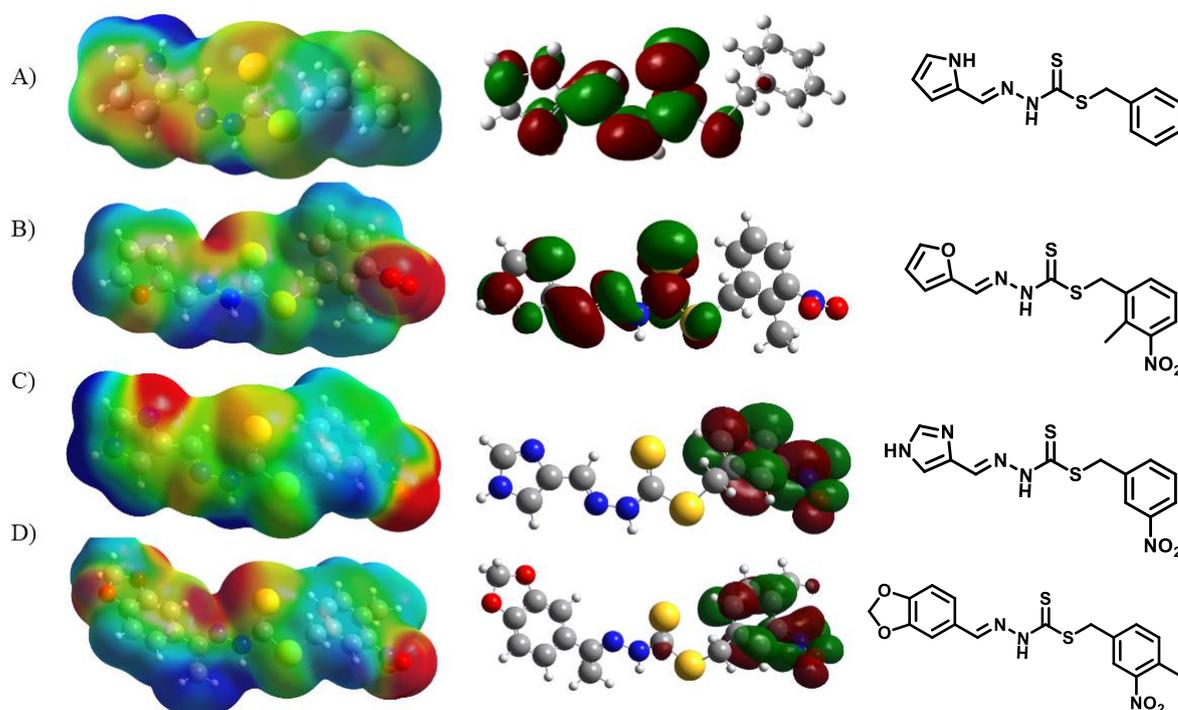
Fonte: Elaborada pelo autor

**Tabela 4** - Valores das cargas atômicas (ESP) dos compostos escolhidos- série B

<b>Compostos</b>	<b>C (C=N)</b>	<b>C (C=S)</b>
<b>4B</b>	0,48	0,33
<b>15B</b>	0,45	0,64
<b>42B</b>	0,46	0,29
<b>66B</b>	0,72	0,57

Fonte: Elaborada pelo autor

**Figura 12** – Imagens do MEP e LUMO de todos os compostos escolhidos da série B – A) 4B, B) 15B, C) 42B e D) 66B.



Fonte: Elaborada pelo autor

A série C foi composta por 33 moléculas, sendo nomeados de 1C até 33C. Os que se destacaram quanto aos valores de HOMO, LUMO, momento dipolo, energia total e cargas atômicas positivas na tiocarbonila e/ou na imina foram 3C, 18C e 22C. Destes, 3C foi escolhida por apresentar valores energéticos favoráveis (HOMO, LUMO, momento de dipolo, energia total), além da tiocarbonila positiva, o 22C por apresentar a imina mais positiva que a tiocarbonila, mesmo apresentando valores energéticos não tão favoráveis como a 3C, e a 18C para comparação (valores energéticos desfavoráveis) (Tabela 5 e 6).

No geral da série, tais valores se mostraram parecidos com a série A, com exceção da energia, que nesta série foi mais alta, indicando compostos menos estáveis em comparação com as outras séries analisadas (Tabela 5).

Na análise dos MEP, a região do carbono tiocarbonílico mostra uma forte deficiência eletrônica na maioria dos compostos (tanto os escolhidos quanto ao restante da série) como pode ser observado na Figura 13. Isso pode ser supostamente explicado porque o que difere esta série das demais é o fato do carbono tiocarbonílico estar ligado a dois nitrogênios (tiossemicarbazona). Visto que o nitrogênio é um átomo muito eletronegativo, eles contribuíram com o deslocamento da densidade eletrônica, deixando-a mais próxima ao

enxofre do carbono e do nitrogênio da imina. Sugere-se assim, que este deslocamento proporcione ao carbono tiocarbonílico maior susceptibilidade a um ataque nucleofílico.

Na análise do LUMO, os valores foram parecidos com a série A, e o LUMO ficou bem distribuído pela molécula no geral da série, e em todas observamos regiões orbitales de LUMO na tiocarbonila e na imina, assim como foi observado na maioria dos compostos escolhidos das outras séries (Figura 13).

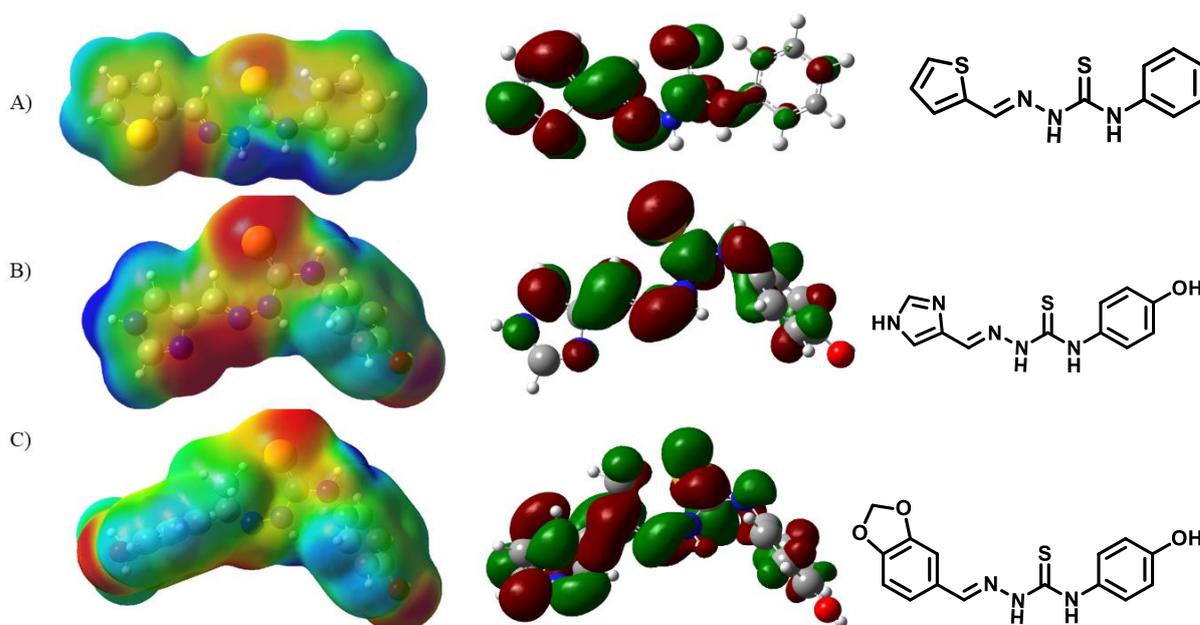
Sendo assim, para esta série também sugerimos que o mecanismo de ação proposto possa ocorrer, principalmente tendo em vista a deficiência eletrônica nas tiocarbonilas em todos os compostos e LUMO disponível, mas que no caso da 22C talvez ocorra por adição de Michael, tendo em vista as cargas atômicas e o LUMO deste composto (Tabela 6 e Figura 13).

**Tabela 5** - Valores de HOMO, LUMO, momento de dipolo e energia total dos compostos destacados da série C.

<b>Compostos</b>	<b>EHOMO (HF - eV)</b>	<b>ELUMO (HF - eV)</b>	<b>Momento de dipolo (Debye)</b>	<b>Etotal (a.u)</b>	<b>Etotal (kcal/mol)</b>
<b>3C</b>	-0,3025	0,07033	1,7673	-1418,7853	-890343,8899
<b>18C</b>	-0,30031	0,09418	3,0534	-1167,1314	-732386,1673
<b>22C</b>	-0,30496	0,09651	3,4599	-1399,5079	-878204,6537

Fonte: Elaborada pelo autor

**Figura 13** - Imagens do MEP e LUMO de todos os compostos escolhidos da série C – A) 3C, B) 18C e C) 22C.



Fonte: Elaborada pelo autor

**Tabela 6** – Cargas atômicas dos compostos escolhidos da série C (ESP).

Compostos	C (C=N)	C (C=S)
3C	0,31	0,77
18C	0,20	0,65
22C	0,72	0,71

Fonte: Elaborada pelo autor

## 5.2. Estudos de *docking*

Os estudos de *docking* foram realizados com intuito de avaliar a interação entre os compostos planejados e a estrutura da falcipaina 2. Assim, teoricamente, é possível avaliar se a disposição do ligante no sítio ativo da enzima favorece ou não o mecanismo de ação proposto. Os estudos de *docking* foram realizados seguindo o método com base nos procedimentos descritos pelos autores Sharma *et al*, 2015, Mahesh *et al*, 2014 e Teixeira *et al*, 2011.

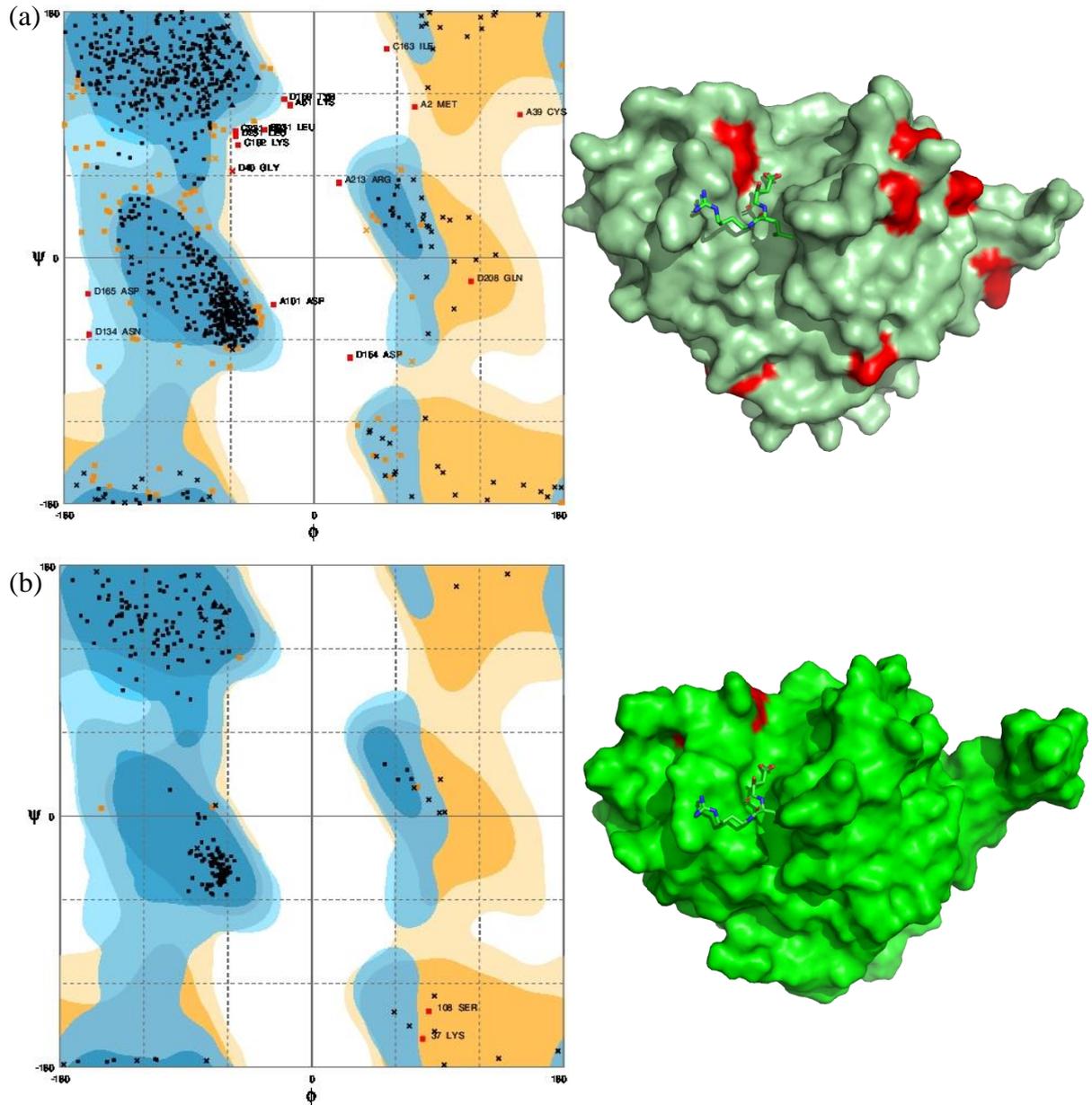
### 5.2.1. Preparo da proteína

Dentre os cristais de falcipaina 2 disponíveis (que são cinco no total), os mais utilizados para estudos de *docking*, até o momento são os com código PDB: 3BPF e 2OUL, sendo o primeiro prevalente. Optamos por usar a estrutura 3BPF (resolução 2,9 Å) por ser a única co-cristalizada com o ligante E64 e para termos essa molécula como referência para nossos estudos. Ao analisarmos este cristal, verificou-se que uma região da folha  $\beta$  com uma pequena sequência de aminoácidos faltantes. Uma análise de Ramachandran deste cristal foi realizada para verificar se essa falta de aminoácidos interferiria nos estudos; observou-se valor de 1,6 outliers (Figura 14a). Não foi possível determinar se essa cadeia faltante interferiria nos resultados de *docking*, então optou-se por corrigir este erro estrutural. Essa correção foi realizada utilizando o cristal 2OUL de resolução 2,2 Å como molde para a geração de um modelo mais completo, visto que elas possuem 100% de identidade. Para gerar este modelo, utilizou-se o programa Modeller 9.14.

Após a construção do modelo, este foi analisado por meio do gráfico de Ramachandran, apresentando 0,8 de outliers (Figura 14b), indicando que o modelo apresenta características estruturais melhores que a estrutura 3BPF. Diante disso, utilizamos o modelo construído para os estudos de docagem molecular.

O modelo foi submetido ao servidor da web H++ para ajuste de seu estado de protonação em pH 5,5 (pH do meio do local onde a proteína se encontra no parasita) e também foi feita a sua minimização de energia no programa Sybyl-X 2.0 (modelo com o ligante), além da retirada das águas, visto que elas não são necessárias para a interação do ligante com o sítio e nem para manter a estrutura terciária da proteína.

**Figura 14** – Gráficos de Ramachandran (feitos no servidor da web Rampage plot) e representação dos outliers em vermelho na proteína (gerada no programa Pymol) obtidos para o cristal 3BPF (a) e para o modelo gerado com os cristais 3BPF e 2OUL (b).



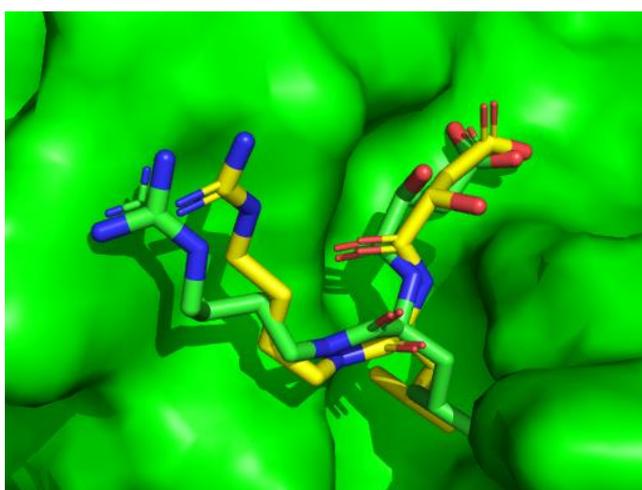
Fonte: Elaborado pelo autor

### 5.2.2. Validação do método de *docking*

A validação do método de *docking*, foi feito por meio de *re-docking* utilizando o ligante E64 com o anel epóxi aberto, tendo como ponto central a cisteína 42 (Cis 42), sem restrições quanto à flexibilidade do ligante, com os resíduos flexíveis padrões do programa, com funções *score* Goldscore e *rescore* Chemscore e outra corrida para comparação com a

função ChemPLP. Foram realizadas 30 ‘corridas’ para cada método, de modo a ter uma amostragem suficiente análise dos resultados. Com as análises do *re-docking* concluímos que o método utilizando a função ChemPLP, com caixa de docagem de 8 Å em ponto central na Cis 42, apresentou melhores resultados (pose do ligante e sua distância da Cis mais parecida com o cristal 3BPF apresentando um RMSD de 1,7 Å – Figura 15).

**Figura 15** – Estrutura do E64 cristalizado (em verde) em comparação com o re-docado (em amarelo) (cores dos átomos: nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho e carbonos em verde ou amarelo)

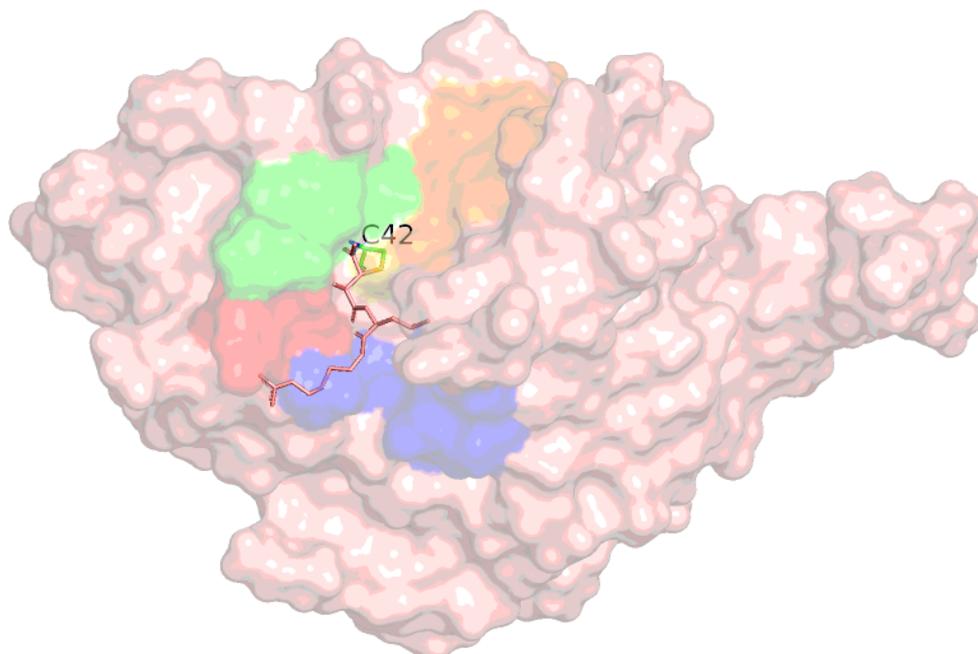


Fonte: Elaborado pelo autor

#### 5.2.4. Análises dos resultados

A falcipaina 2 (FP 2) tem sítio catalítico semelhante às outras cisteínas da família *papaína like*, sendo composto por três resíduos: a cisteína 42, a histidina 174 e a asparagina. 204. Seu sítio ativo se encontra entre os dois domínios, o R e o L. Ela também possui três subsítios (S1, S2 e S3), sendo o S2 o principal para a classe das cisteíno proteases, pois é o mais importante em relação à determinação de especificidade na maioria das proteínas dessa classe. No caso da FP 2, este bolso tem características hidrofóbicas, tendo preferências por resíduos hidrofóbicos, como cita a literatura. O E64, por exemplo, interage com os resíduos dos três subsítios (Figura 16) (PONSUWANNA *et al*, 2016; PANDEY e DIXIT, 2012; ETARRI *et al*, 2010; KERR *et al*, 2009).

**Figura 16** – Modelo gerado da falcipaina 2 com o inibidor E64 e os subsítios (laranja: S1', verde: S1, vermelho: S3 e azul:S2). Resíduo cisteína (Cis) apresentado em *stick* (carbonos em verde, enxofre em amarelo e oxigênio em vermelho).

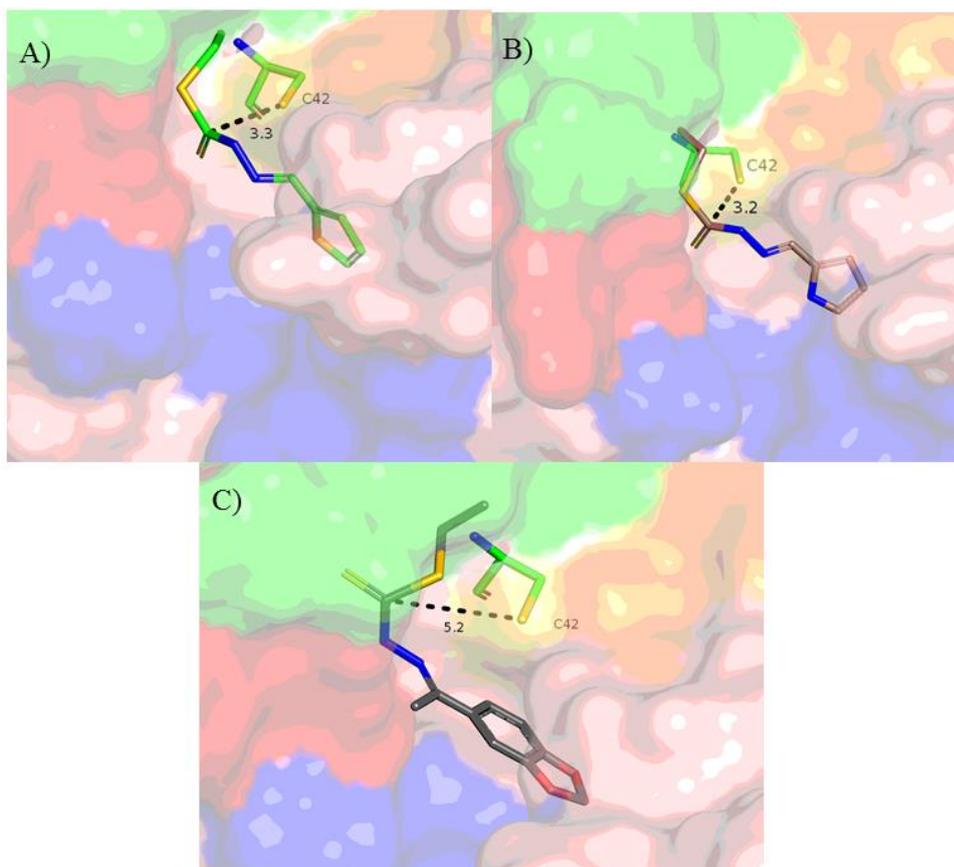


Fonte: Elaborada pelo autor

A análise dos resultados forma realizadas a partir das poses melhor ranqueadas pelo *docking*. Visualmente, avaliou-se a pose e a orientação do ligante em relação à proximidade entre o carbono tiocarbonílico e a Cis 42 que apresentaram uma maior proximidade entre o carbono tiocarbonílico e a C42. Tais análises foram feitas por meio do programa Pymol Viewer 2.0.7.

Dos três compostos da série A analisados (8A, 10A e 31A), 8A e 10A foram os que melhor apresentaram um perfil de interação com a Cis 42, sugerindo a proximidade da tiocarbonila com o resíduo de 3,2 Å para 8A e 3,2 Å para 10A. O outro composto desta série, 31<sup>a</sup>, não se mostrou tão suscetível ao ataque, visto que a proximidade dele com relação à Cis 42 foi de 5,2 Å. Com relação às interações com os subsítios, os grupos alifáticos de todos os produtos interagiram de maneira similar com o subsítio S1, e os anéis aromáticos possivelmente interagindo de forma hidrofóbica com os resíduos do S2, corroborando com a literatura (Figura 17).

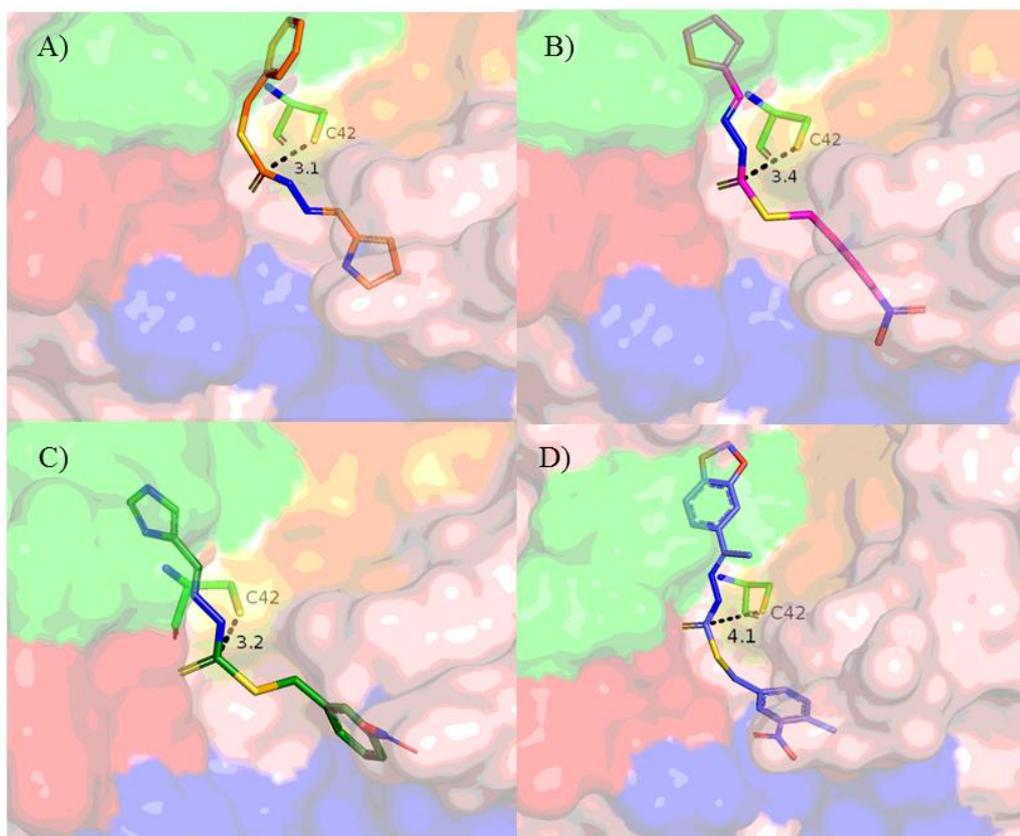
**Figura 17** – Interação dos compostos da série A com a Cis 42 e seus bolsos. (a) 8A, (b) 10A e (c) 31A.



Fonte: Elaborada pelo autor

Quanto à série B, foram analisados os compostos 4B, 15B, 42B e 66B, e todos, com exceção a 66B, obtiveram uma orientação que favoreceu uma distância provável de ataque nucleofílico da Cis 42, sendo estas 3,1 Å, 3,4 Å, 3,2 Å e 4,1 Å respectivamente. Todos compostos desta série possuem grupamentos aromáticos em suas extremidades e apresentaram uma possível interação hidrofóbica com os bolsos S1 e S2 (Figura 18).

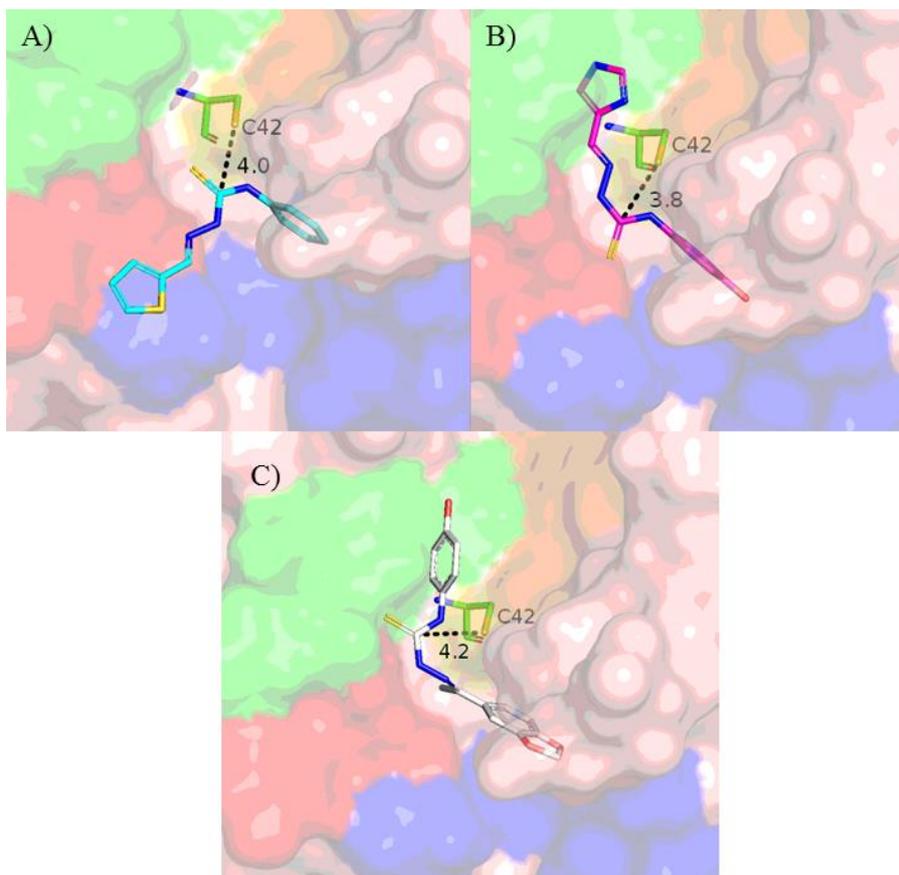
**Figura 18** - Interação dos compostos da série B com a Cys 42 e seus bolsos. (a) 4B, (b) 15B, (c) 42B e (d) 66B.



Fonte: Elaborada pelo autor

Da série C foram analisados os compostos 3C, 18C e 22C. Para estes compostos a distância entre a tiocarbonila e a Cys 42 não se apresentou favorável ao ataque nucleofílico, sendo estas distâncias de 4 Å, 3,8 Å e 4,2 Å para 3C, 18C e 22C, respectivamente. É interessante ressaltar que os compostos desta série também possuem grupamentos aromáticos em suas extremidades como a série B, mas uma das conformações analisadas desta série não mostrou o mesmo perfil de interação com os subsítios, como 3C, que um dos seus anéis interagiu com o bolso S3 e o outro com o S2 (Figura 19). Isto talvez possa ser explicado pelo fato desta série ser derivada das tiossemicarbazonas e a série B dos ditiocarbazatos.

**Figura 19** - interação dos compostos da série A com a C42 e seus bolsos. (a) 3C, (b) 18C e (c) 22C.



Fonte: Elaborada pelo autor

Os resultados dos estudos de *docking* sugerem que 8A, 10A, 4B, 15B e 42B (todas derivadas dos ditio-carbazatos) e nenhuma da série C (derivadas das tiossemicarbazonas), são teoricamente suscetíveis ao ataque nucleofílico pela a Cis 42, visto à proximidade do grupo tiol desta com a tiocarbonila dos compostos.

Comparando com os estudos de modelagem, pudemos observar que os compostos escolhidos que apresentaram o carbono da imina mais positivo que a tiocarbonila, teoricamente não seria favorável à adição de Michael. Analisando os compostos escolhidos para comparação de uma improvável interação, os estudos de *docking* sugeriram ao contrário para a série B, mas com relação a série A aconteceu como o esperado apenas para 31A e para série C, só esperávamos que ocorresse com a 18C, não para todo o resto. Porém, apenas com os ensaios de inibição da falcipaina 2 se tornará possível avaliar se as sugestões obtidas teoricamente são válidas.

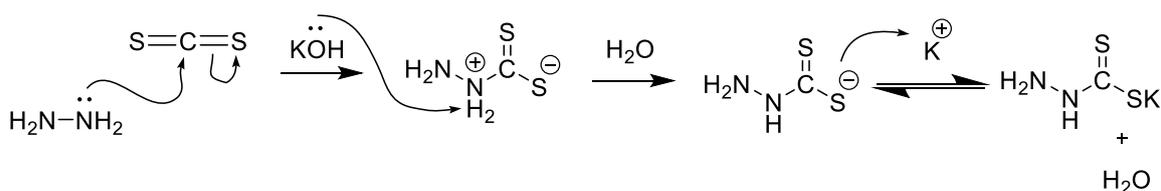
### 5.3. Síntese dos compostos

#### 5.3.1. Síntese dos intermediários

Nas primeiras tentativas para se obter o intermediário de síntese I, o qual é fundamental para todos os produtos finais, não obtivemos o produto esperado. Deste modo, foi realizada uma análise dos produtos de partida, na qual foi observado que o dissulfeto de carbono estava degradado.

Assim, para a síntese do intermediário inicial, seguiu-se a metodologia de WATTS *et al.*, (2014). Para a formação deste intermediário inicial, o mecanismo de reação sugerido é por adição da hidrazina no dissulfeto de carbono, onde a amina primária atua como nucleófilo atacando o carbono, quebrando uma das ligações  $\pi$  com o enxofre. Os elétrons dessa ligação vão para o enxofre, deixando-o negativo. A hidroxila do hidróxido de potássio se liga com um próton da amina protonada formando uma molécula de água. Com isso, o potássio perde um elétron, ficando em forma de cátion e se liga ao grupo tiol, como ilustra o Esquema 3.

**Esquema 3** – Mecanismo de adição da hidrazina ao dissulfeto para a formação do intermediário inicial.



Fonte: Adaptada de Clayden e colaboradores (2001)

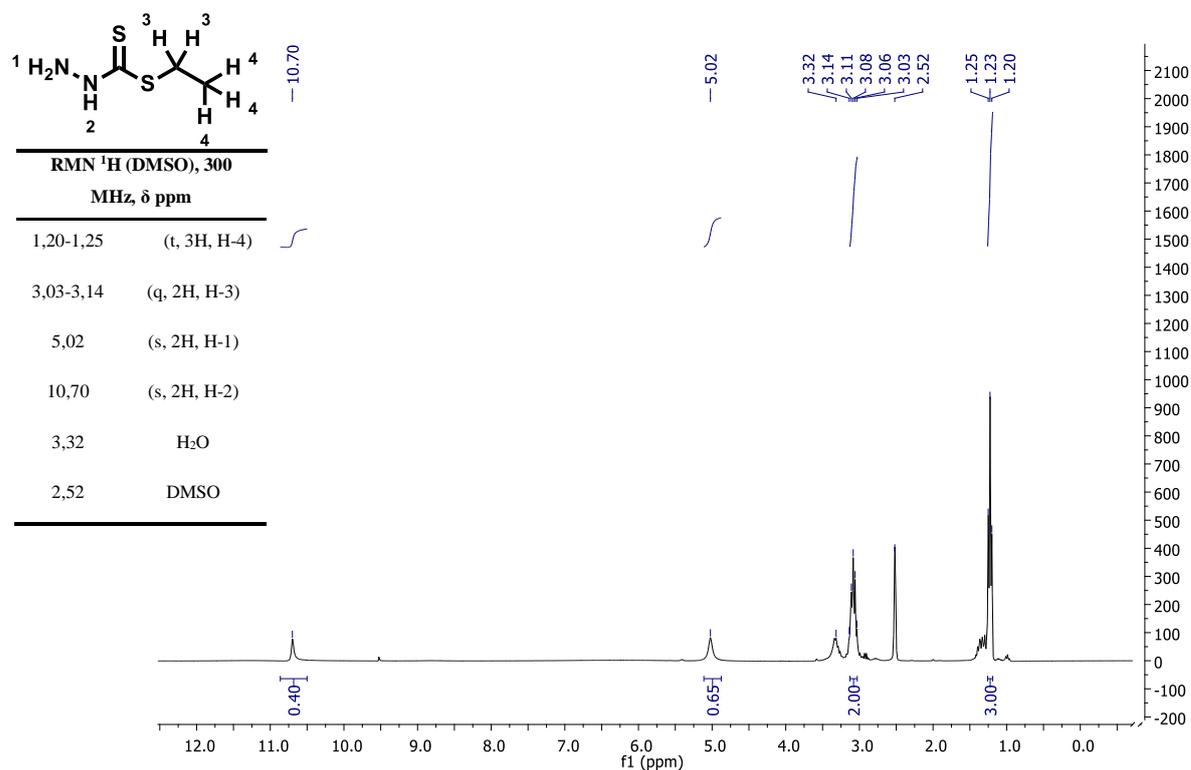
A síntese do intermediário da série A foi realizada seguindo a metodologia descrita por KINFÉ e BELAY, (2013). O intermediário inicial foi reagido com brometo de etila para formar o IA. Depois de 2 horas de reação, o produto obtido apresentou um aspecto oleoso esbranquiçado e foi isolado por extração líquido-líquido com éter e secado com sulfato de magnésio. Sua formação foi confirmada por CCD utilizando fase móvel de acetato de etila e hexano (5:5), revelados por ninidrina e com  $R_f$  de 0,53 cm.

Para confirmar a formação do intermediário os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  do intermediário IA (Figura 20 e 21). Pode-se observar na Figura 20 o deslocamento do hidrogênio 1 da amina primária em 5,02 ppm (singleto), do hidrogênio 2 da amina secundária observado em 10,70 ppm (singleto), que é importante para evidenciar a formação do

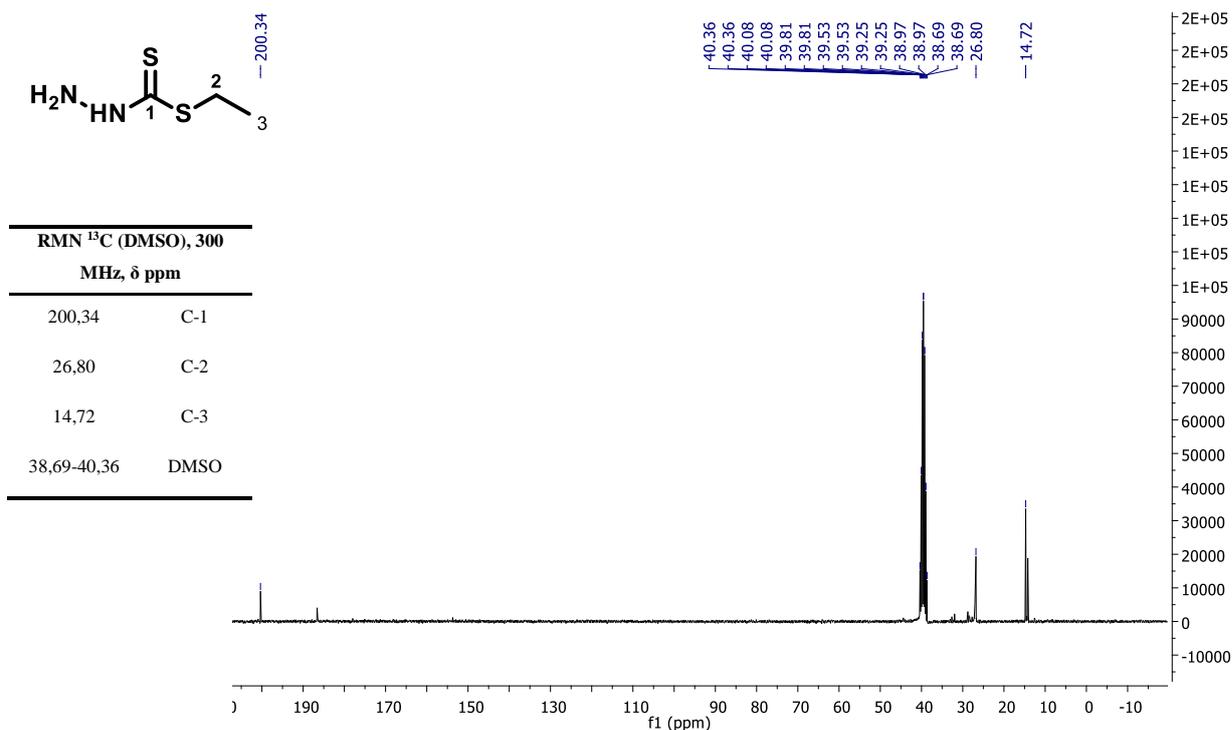
intermediário inicial, pois, demonstra a ligação da hidrazina com o dissulfeto, dos hidrogênios 3 do 3,03 ao 3,14 ppm (quarteto) e dos hidrogênios 4 do 1,20 ao 1,25 ppm (triplete), também importantes para demonstrar a formação deste intermediário, visto que estes hidrogênios (3 e 4) apareceriam em torno de 3,42 ppm para o H-3 e 1,70 ppm para o H-4 quando ligados ao bromo.

Na figura 21 é observado o sinal em 200,34 ppm referente a tiocarbonilas e os sinais do etil em 26,80 ppm e 14,72 ppm, todos evidenciando a formação do intermediário desta série.

**Figura 20** - Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) do intermediário da série A, nomeado como IA.

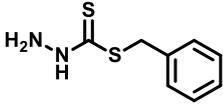
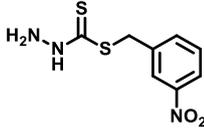
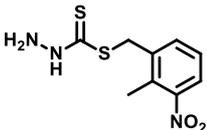
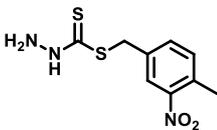


**Figura 21** - Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) do intermediário IA.



A síntese dos intermediários da série B foram realizadas seguindo as metodologias de WATTS *et al*, (2014) e SINGH; VARSHNEY, (2001). O intermediário inicial foi reagido com cloreto de benzila, brometo de 3-nitro benzila, cloreto de 2-metil 3-nitro benzila e com o cloreto de 4-metil 3-nitro benzila para formar os intermediários IB, IIB, IIIB e IVB respectivamente. O tempo de reação variou de 2 a 4 horas dependendo do substituinte, os produtos obtidos foram sólidos, apresentando colorações de brancas a amareladas, isolados por filtração em pressão reduzida e lavados com etanol. A formação dos produtos também foi confirmada por CCD com fase móvel de acetato de etila e hexano (5:5) e revelados por ninidrina. As características estão apresentadas na Tabela 7:

**Tabela 7** - Características dos intermediários da série B.

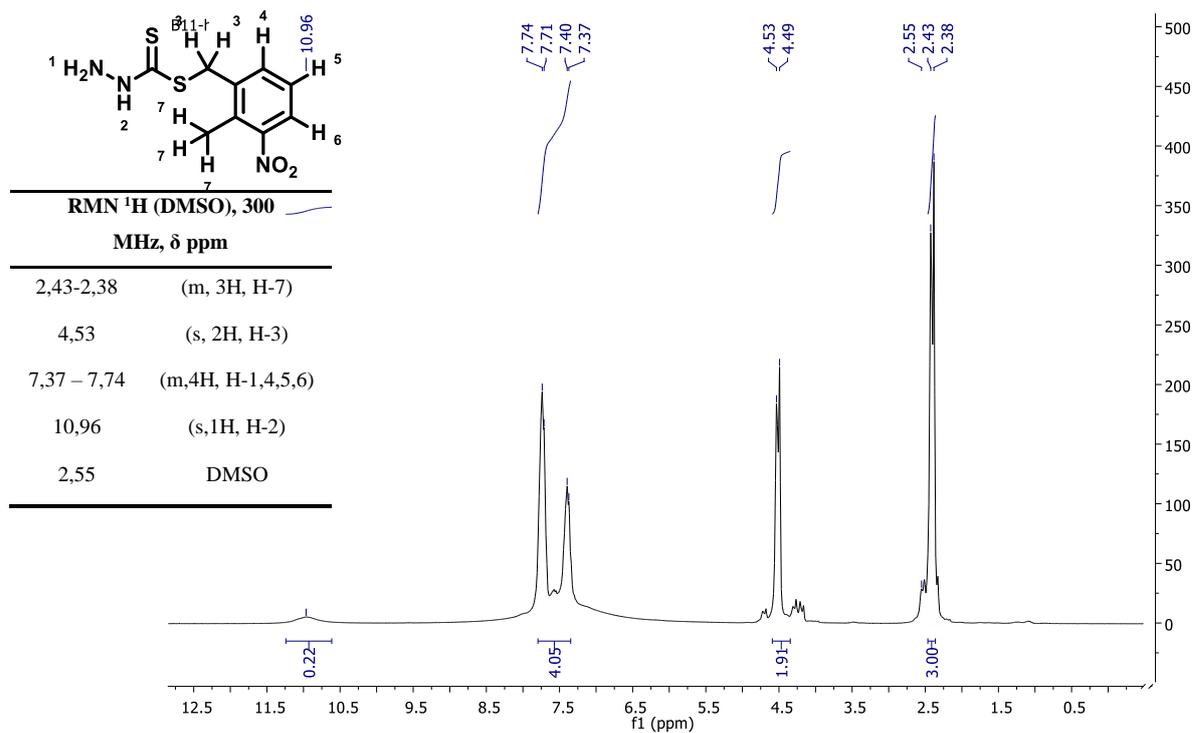
Intermediários	Aspecto	Tempo de reação	Rendimento	Rf
IB 	Sólidos brancos	2 h	43 %	0,6
IIB 	Sólidos amarelados	4 h	65%	0,8
IIIB 	Sólidos amarelados	2 h	90%	0,8
IVB 	Sólidos amarelados	4 h	53%	0,8

Nas Figuras 22 e 23 segue o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do intermediário IIIB da série B, para exemplificar a formação do produto.

Na Figura 22 pode-se observar o deslocamento dos hidrogênios 3 em 4,53 ppm indicando a formação do intermediário desta série, pois, assim como nos intermediários da série A, o ambiente eletrônico em volta desses hidrogênios está mais localizado aos átomos de nitrogênio e ao anel aromático, deixando-os mais desblindados do que quando ligados com o cloro. Além disso, também é observado o sinal do hidrogênio da amina primária (1) em um campo mais baixo em comparação com os do intermediário da série A (Figura 20), na região dos aromáticos em 7,37 a 7,74 ppm (H-2-6), os hidrogênios da metila do anel (H-7) em 2,38 a 2,55 ppm (singlete) e o sinal do hidrogênio 2 em 10,96 ppm (singlete).

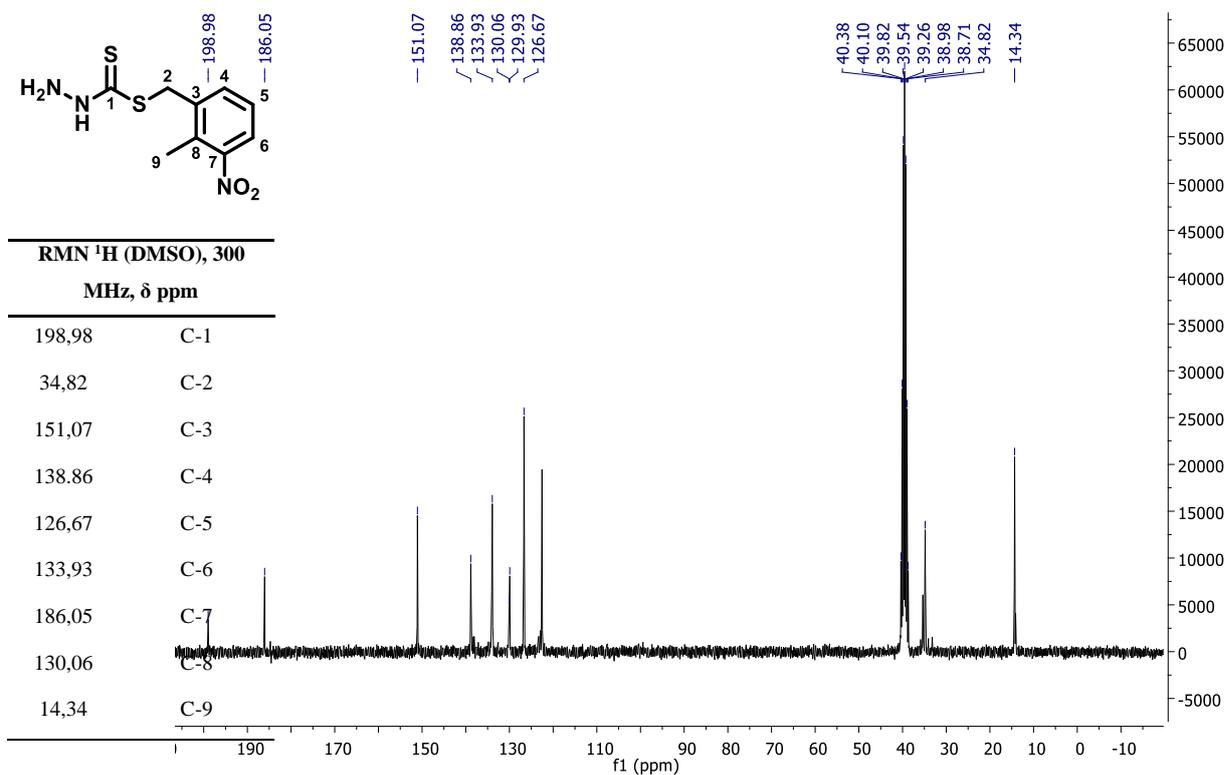
Quanto ao espectro de carbono demonstrado na Figura 23, observa-se o carbono tionílico 1 em 198,98 ppm, o carbono 2 em 34,82 ppm, os carbonos aromáticos de 126,67 a 186,05 e o carbono da metila 8 em 14,34 ppm.

**Figura 22** - Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) do intermediário IIIB



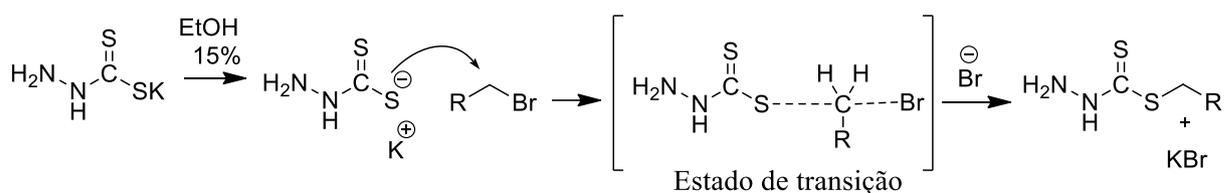
**Figura 23** - Espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) do intermediário

IIIB



Quanto a formação destes intermediários A e B, sugere-se que aconteça por reação de substituição nucleofílica 2 ( $S_N 2$ ). O grupo tiol ataca o carbono do brometo de etila ou do cloreto/brometo de benzila em direção oposta ao cloro/bromo, estes atuam como grupo abandonador durante o ataque, formando um estado de transição com o tiolato e, em sequência, o enxofre liga-se ao carbono do reagente, como mostra o Esquema 4.

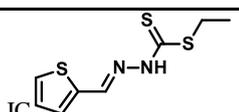
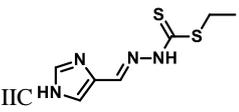
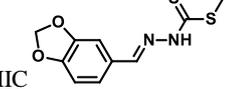
**Esquema 4** – Mecanismo de reação de formação dos intermediários das séries A por reação de  $S_N2$ .



Fonte: Adaptada de Clayden e colaboradores (2001)

Para obter os intermediários da série C o produto intermediário da série A foi reagido com o tiofeno-2-carboxaldeído, 4-imidazol-carboxaldeído e com o 3',4'-(metilenodioxi) acetofenona e a reação foi seguida como descrita na metodologia de SINGH; VARSHNEY, (2001) para obter os intermediários IC, IIC e IIIC respectivamente. Os produtos formados foram isolados por filtração em baixa pressão, lavados com metanol gelado e analisados por CCD com sistema de solvente de acetato de etila e hexano (8:2) e revelados em ninidrina. As características dos produtos intermediários obtidos estão descritas na Tabela 8:

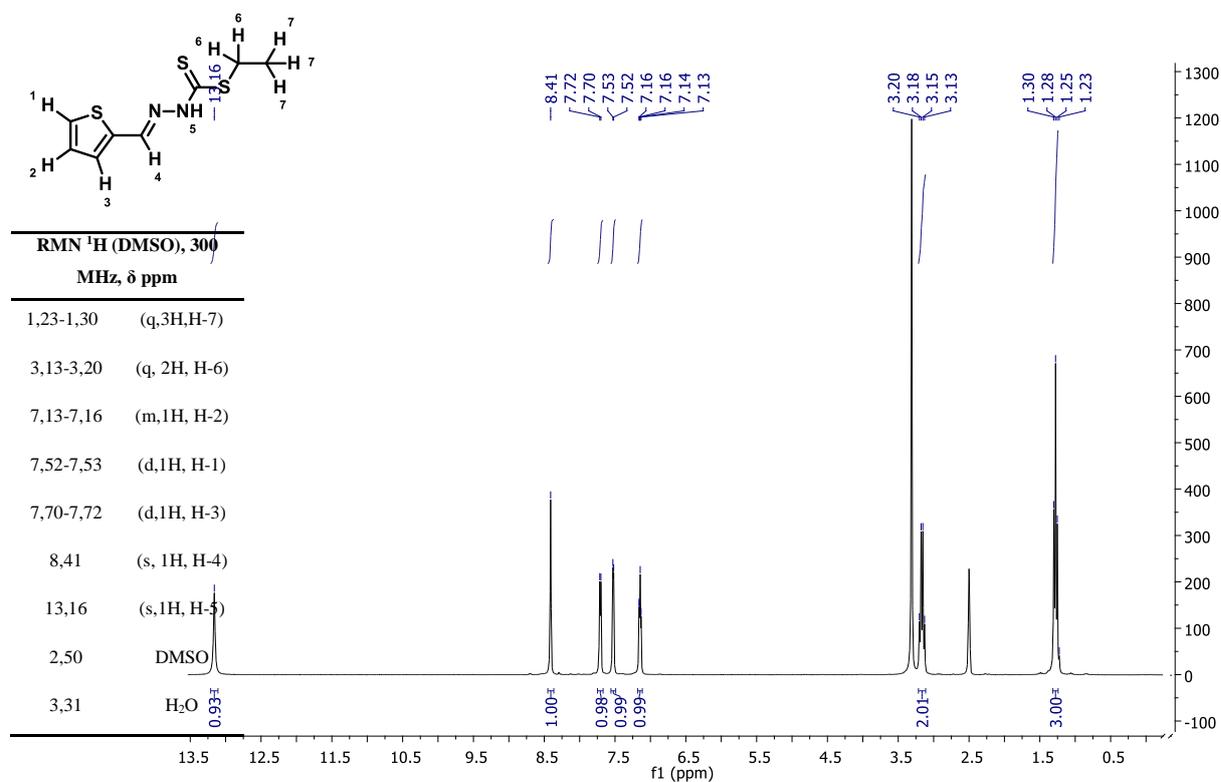
**Tabela 8** - Características dos intermediários da série C.

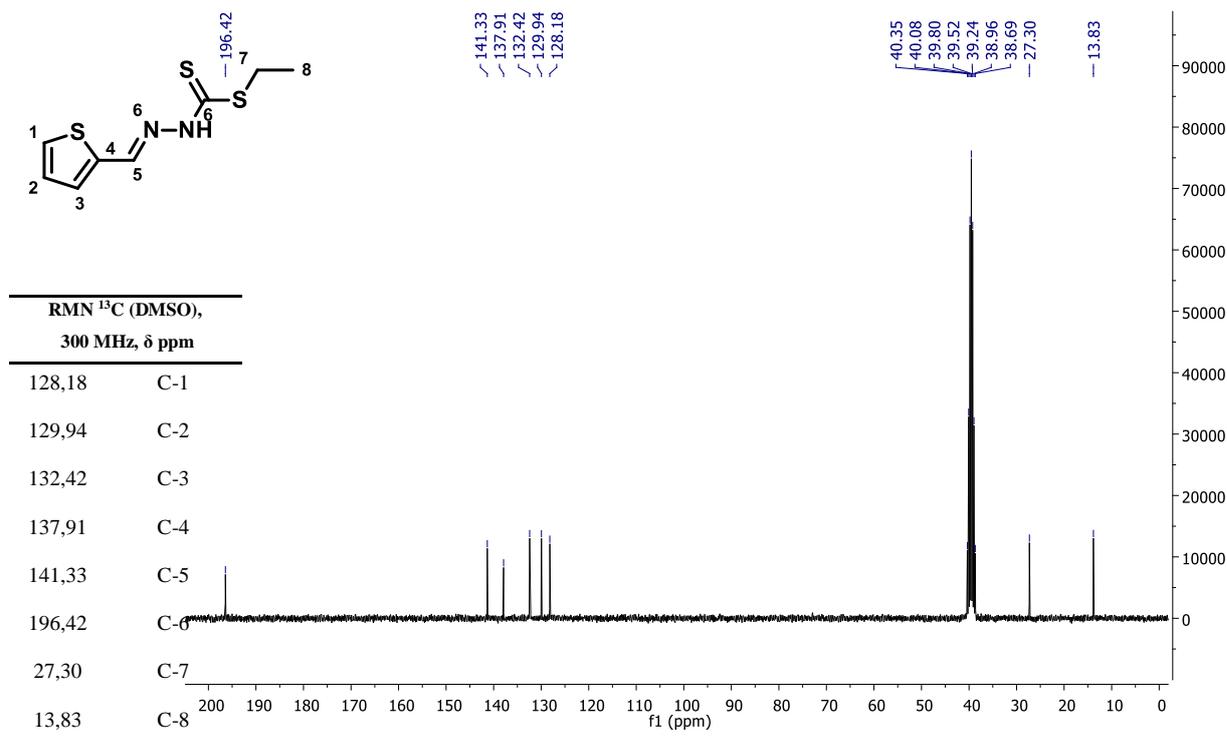
Intermediários	Aspecto	Rendimento	Rf
 IC	Cristais alaranjados	30%	0,5
 IIC	Cristais amarelados	30%	0,4
 IIIC	Cristais amarelados	25%	0,6

Na Figura 24 podemos observar principalmente o sinal do hidrogênio 4 da imina em 8,41 ppm, importante para constatar a formação dos intermediários desta série. Além disso, é

importante notar o deslocamento do hidrogênio 5 da amina, que devido a ligação com o anel aromático o deixa mais desblindado do que antes desta ligação como pode ser observado no espectro demonstrado na Figura 20 que apresentava o sinal de 10,70 ppm. E na Figura 25, é possível observar o sinal do carbono 5 da imina em 141,33 ppm, confirmando também a formação do produto.

**Figura 24** - Espectros de  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) do intermediário IC



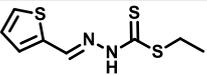
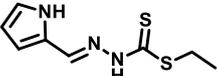
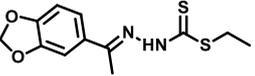
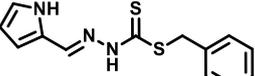
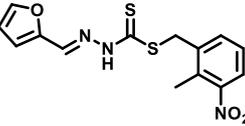
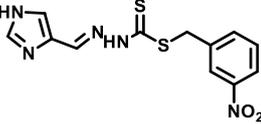
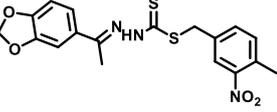
**Figura 25** – Espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) do intermediário IC

### 5.3.2. Síntese dos compostos finais

Após a formação dos intermediários A e B, estes foram reagidos com os aldeídos ou cetonas aromáticas já descritos acima (pg.42, seção 4.2.1) e seguiu-se a metodologia de SINGH; VARSHNEY, (2001). Os produtos formados foram filtrados em pressão reduzida e lavados com metanol (série A) ou etanol (série B) gelados e analisados por CCD com um sistema de solvente de hexano e acetato de etila (em diferentes concentrações).

Foram obtidos três produtos sólidos para a série A: 8A, 10A e 31A, e quatro para a série B: 4B, 15B, 42B e 66B. Todos se apresentaram estáveis em temperatura ambiente, solúveis em alguns solventes orgânicos, principalmente em acetato de etila e dimetilsulfóxido (DMSO), purificados por recristalização de etanol, analisados por ponto de fusão, espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e infravermelho. Suas características estão descritas na Tabela 9.

**Tabela 9** – Características dos produtos finais

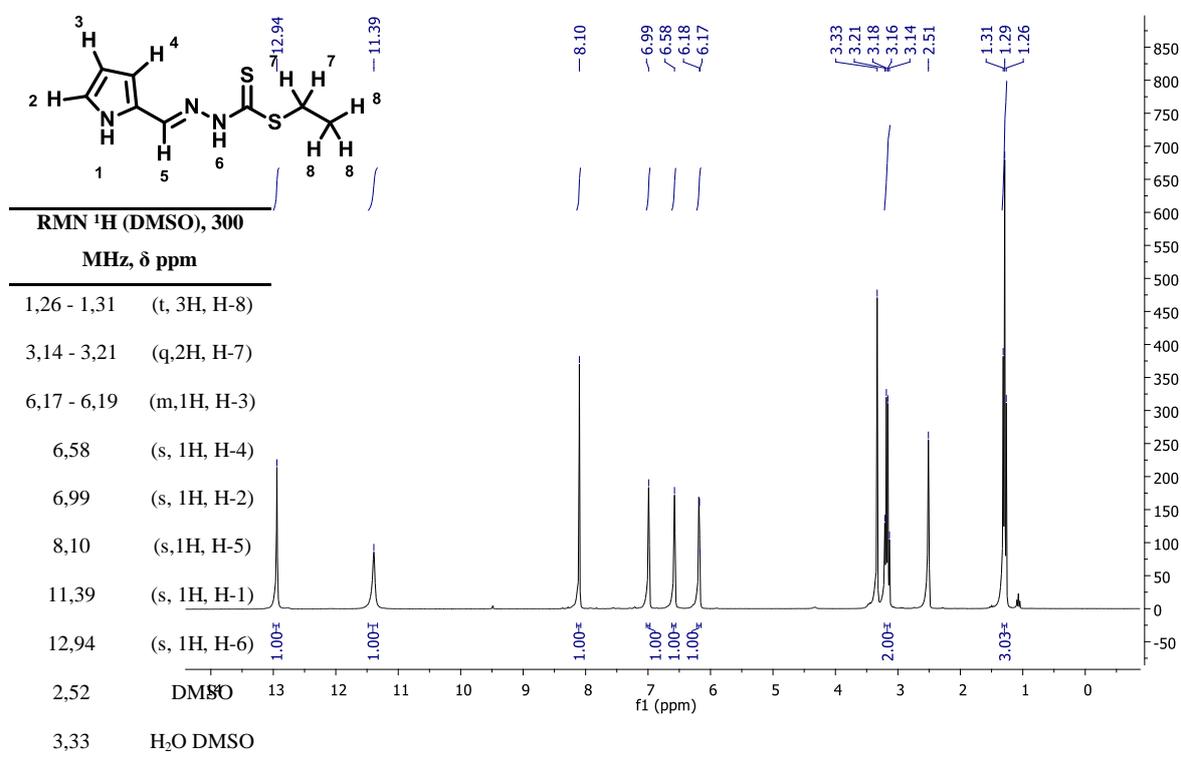
Compostos	Aspecto	Rend.	Faixa de fusão	Rf/ % Eluente	Pureza
8A 	Sólidos laranja	20%	133-136 °C	0,53 (8:2)	97%
10A 	Sólidos marrons	10%	120-123 °C	0,53 (7:3)	95%
31A 	Sólidos amarelos	40%	127-129 °C	0,53 (7:3)	98%
4B 	Sólidos marrons	32%	149-151 °C	0,51 (8:2)	96%
15B 	Sólidos amarelos	10%	156-158 °C	0,4 (8:2)	96%
42B 	Sólidos amarelos	30%	164-168 °C	0,62 (1:9)	97%
66B 	Sólidos brancos	30%	158-161 °C	0,51 (6:4)	95%

Como exemplo de confirmação de formação, os espectros de RMN e os espectros de infravermelho dos produtos 10A estão apresentados nas Figura 26, 27 e 28 e do 42B nas Figura 29, 31 e 31.

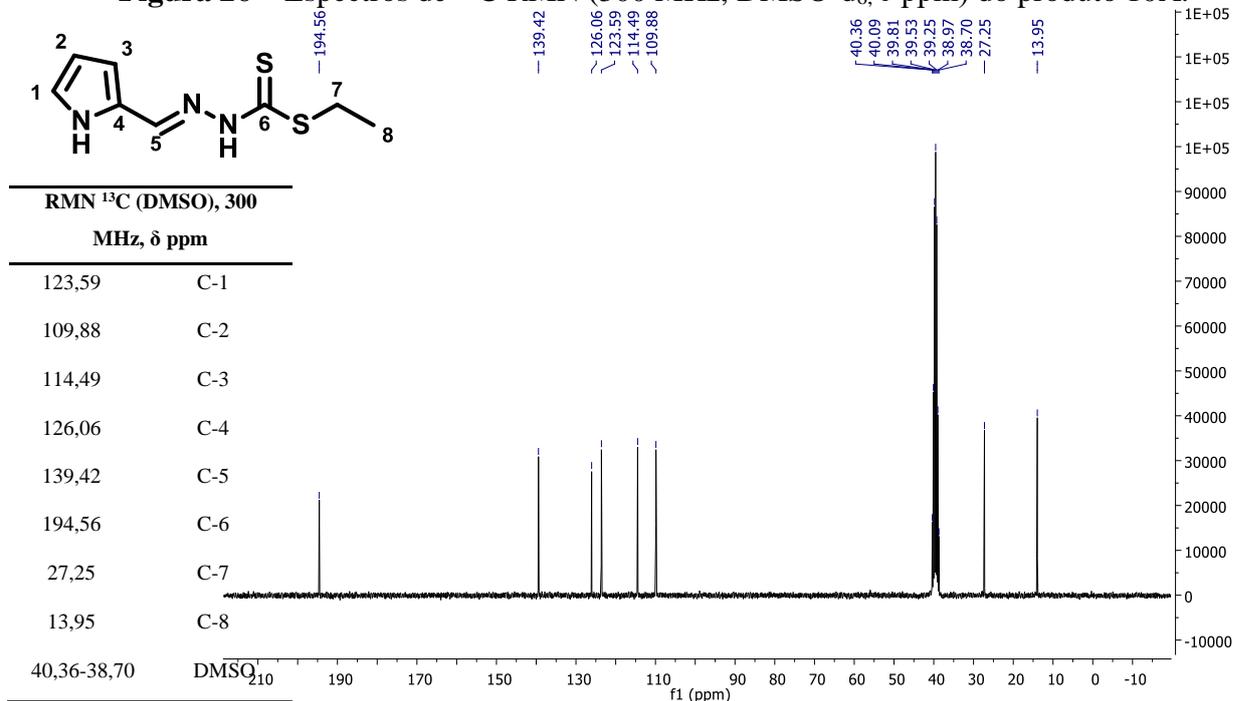
Nos espectros referentes ao produto 10A é importante destacar na Figura 26 o sinal do hidrogênio 5 do carbono da imina em 8,10 ppm e a ausência do sinal da amina primária (NH<sub>2</sub>) do intermediário em 10,70 ppm (Figura 20), e na Figura 27 o sinal deste carbono imínico é observado em 139,42 ppm. Tais sinais são importantes para a formação dos produtos desta série, indicando que houve a formação, pois tanto o hidrogênio quanto a carbonila do aldeído livre estariam em um campo mais baixo do espectro, devido ao oxigênio ser mais eletronegativo, desblindando mais estes elementos. Na Figura 26 ainda é observado o sinal do hidrogênio 6 da amina secundária em 12,94 ppm, que no intermediário aparecia em 10,70 ppm (Figura 20).

Já no espectro de infravermelho na Figura 27, é possível observar bandas de estiramento  $\nu(\text{N-H})$  em  $3.285\text{ cm}^{-1}$ , dos C-H alquílicos  $\nu(\text{C-H})$  em  $2.857\text{ cm}^{-1}$  e  $2.877\text{ cm}^{-1}$ , da tiocarbonila em  $\nu(\text{C=S})$   $1.063\text{ cm}^{-1}$ , da imina em  $\nu(\text{C=N})$   $1.680\text{ cm}^{-1}$  e do  $\nu(\text{C-S})$  em  $711\text{ cm}^{-1}$ . (YOUSOF *et al*, 2015; MANAN *et al*, 2011, SILVERSTEIN, 2005).

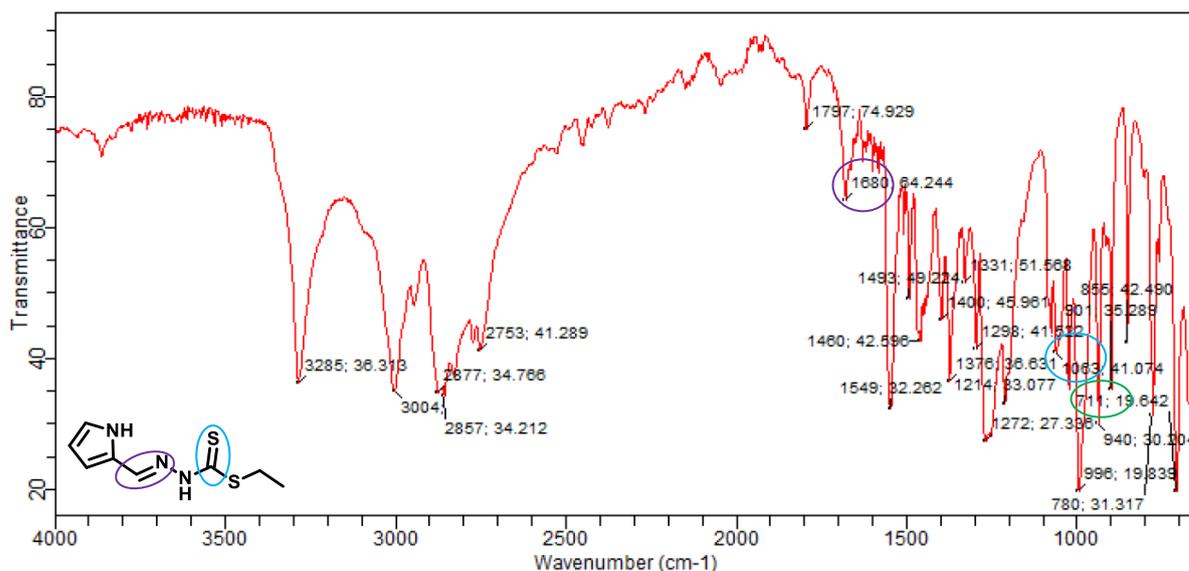
**Figura 26** – Espectros de  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) do produto 10A.



**Figura 26** – Espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) do produto 10A.



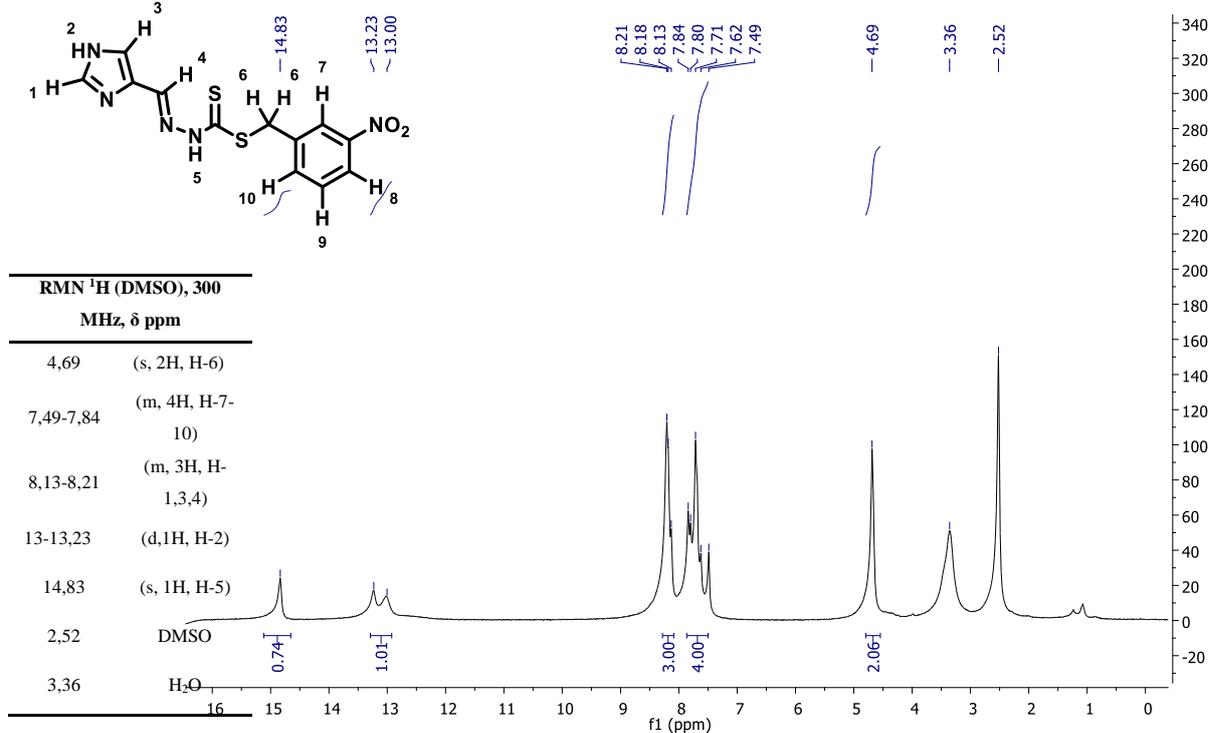
**Figura 27** – Espectro de infravermelho do produto 10A.



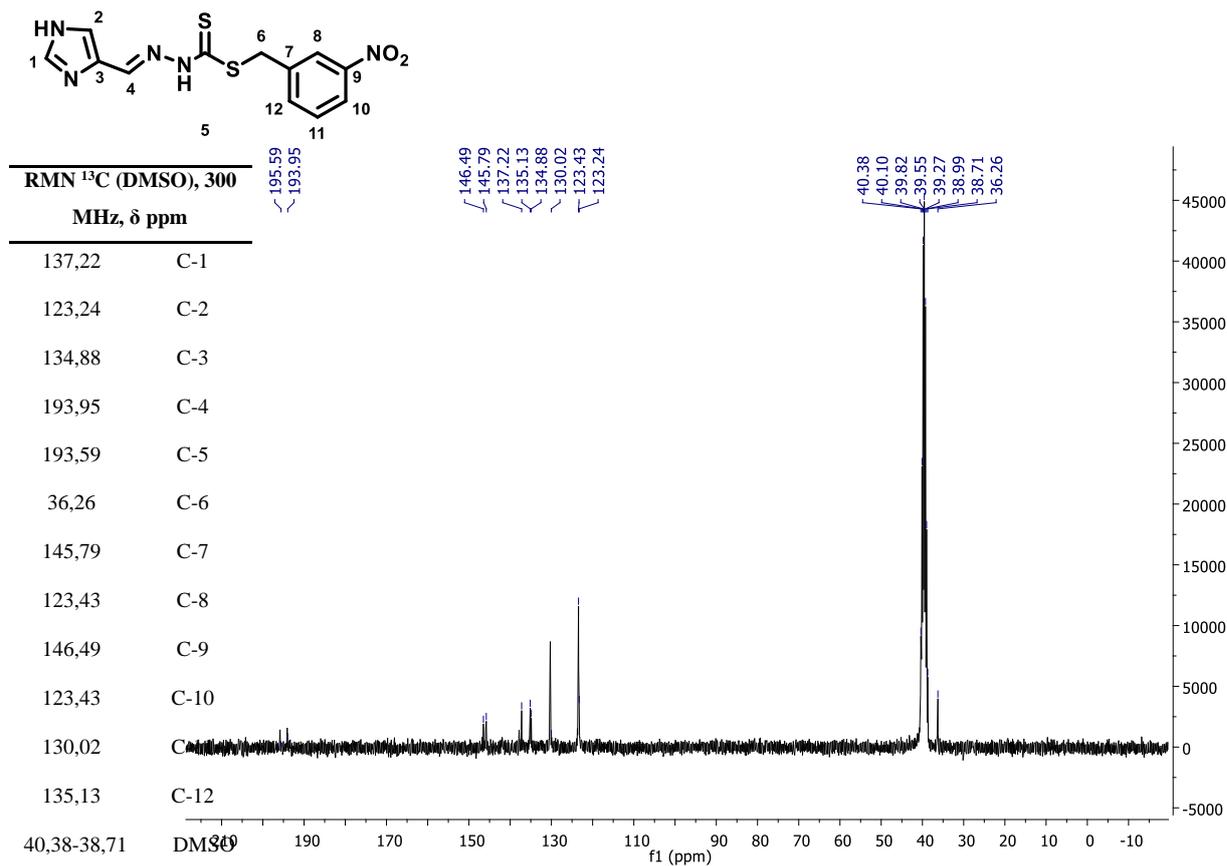
Quanto ao produto da série B, nas Figuras 28 e 29 é possível observar novamente os sinais do hidrogênio 4 da imina em 8,19 ppm e deste carbono em 193,95 ppm, respectivamente, além da ausência do sinal da amina primária do intermediário (Figura 19). Como citado no parágrafo acima, esses sinais são importantes para concluir a formação do produto. Neste caso, o carbono da imina se mostrou bem deslocado em comparação com o produto da série A, acreditamos que seja devido principalmente ao anel imidazólico que atrai mais os elétrons, desblindando o carbono.

Na Figura 30, no espectro de infravermelho, é observada novamente uma banda de estiramento do N-H em 3.205 cm<sup>-1</sup>, da  $\nu(\text{C}=\text{N})$  em 1.678 cm<sup>-1</sup>, da  $\nu(\text{C}=\text{S})$  em 1.097 cm<sup>-1</sup> e da  $\nu(\text{C}-\text{S})$  em 696 cm<sup>-1</sup> (YOUSOF *et al*, 2015; MANAN *et al*, 2011, SILVERSTEIN, 2005).

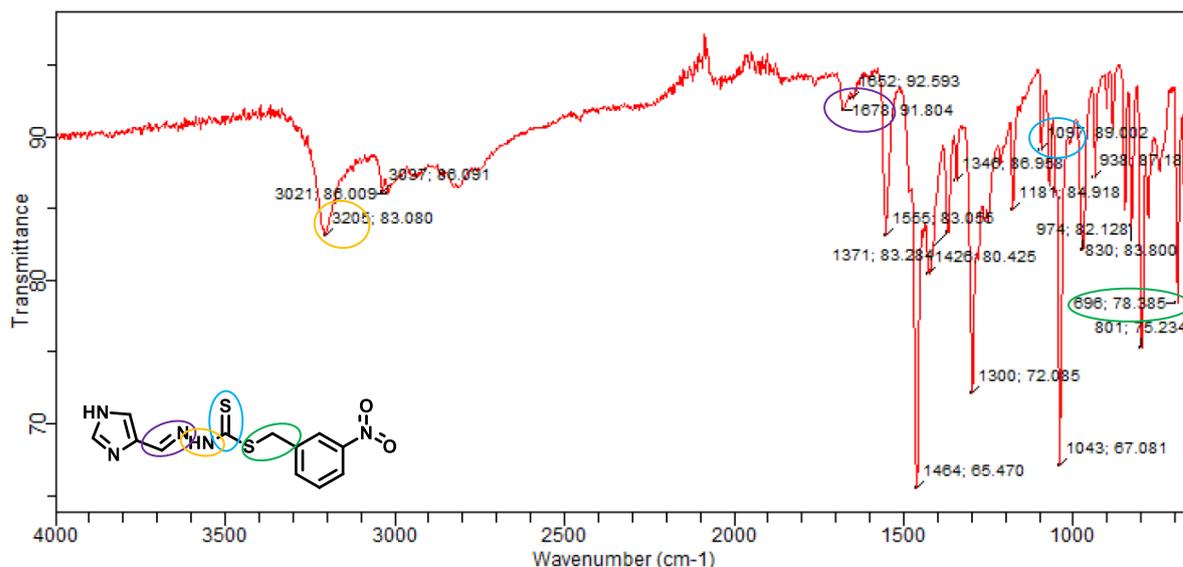
**Figura 28** – Espectros de  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) do produto 42B.



**Figura 29** – Espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) do produto 42B.

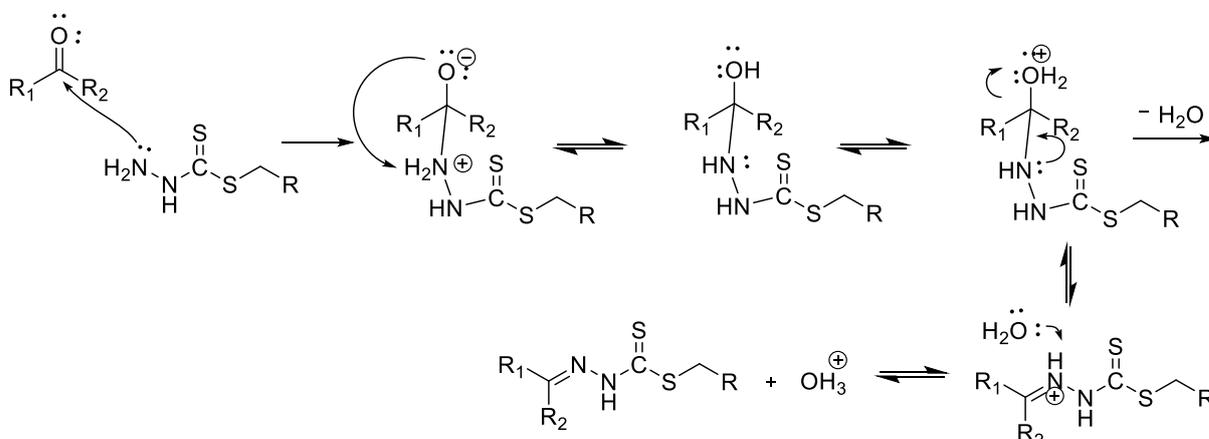


**Figura 30** – Espectro de infravermelho do produto 42B.



Com relação ao mecanismo de formação dos intermediários da série C e dos compostos finais das séries A e B, a carbonila eletrofílica é atacada pela amina primária do intermediário (nucleófilo), formando um intermediário tetraédrico. Esse nucleófilo é desprotonado, transferindo o próton para o oxigênio. A hidroxila formada é protonada, e com isso, atua como grupo abandonador, saindo como uma molécula de água, que ainda, desprotona nitrogênio da imina (esquema 5).

**Esquema 5** – Mecanismo de formação dos intermediários da série C e dos produtos finais das séries A e B.



Fonte: Adaptada de Clayden e colaboradores (2001)

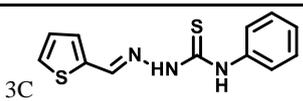
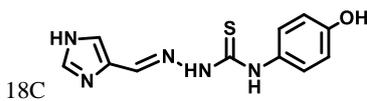
Para os produtos finais da série C, os intermediários foram reagidos com anilina e com o p-amino-fenol seguindo a metodologia de KULANDAIVELU *et al*, (2014). Os produtos

formados foram evaporados em baixa pressão, e os produtos coletados e analisados por CCD em um sistema de solvente acetato de etila e hexano em diferentes concentrações, revelados por vanilina e ninidrina. Os produtos desta série também se mostraram estáveis em temperatura ambiente, solúveis principalmente em acetato de etila, etanol e DMSO, purificados por cromatografia em coluna e analisados por ponto de fusão, espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e infravermelho.

Foram obtidos dois produtos: 3C e 18C. Produto 22C não foi formado durante as tentativas de síntese. Suspeitamos que a pureza do reagente p-Amino fenol comprometeu a formação do produto, pois mesmo com a formação do produto 18C, sua purificação foi muito dificultosa e seu rendimento foi muito baixo. Deste, obtivemos apenas uma pequena fração para o envio aos testes biológicos após as análises de RMN e faixa de fusão.

As características dos produtos desta série se encontram na Tabela 10.

**Tabela 10** – Características dos produtos da série C

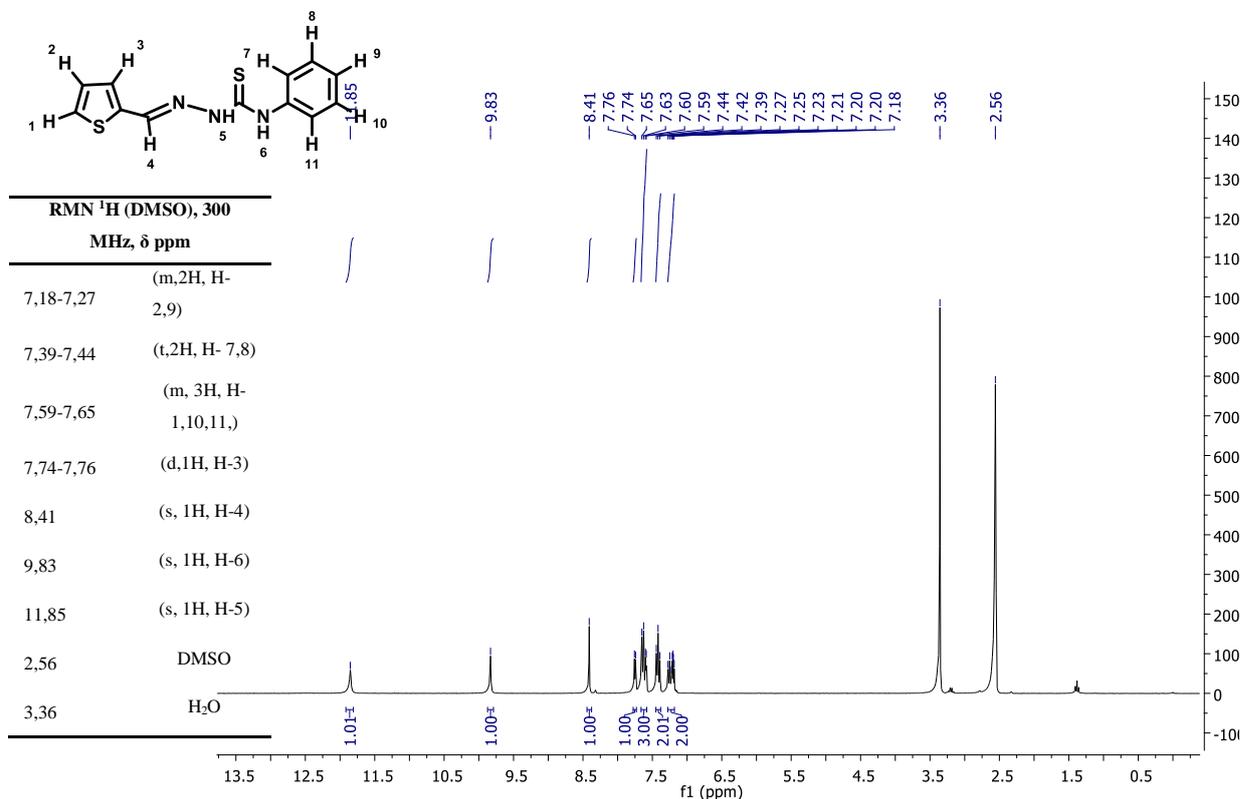
Compostos	Aspecto	Rend.	Faixa de fusão	Rf	Pureza
 3C	Sólidos brancos	20%	180-182°C	0,3 (4:6)	96%
 18C	Sólidos marrons	10%	Não foi possível	0,6 (8:2)	96%

Como exemplo de formação do produto, os espectros de RMN e de infravermelho do produto 3C estão apresentados na Figura 32 e 33. Na Figura 32 é possível observar o hidrogênio da amina 6 em 9,83 ppm, que é um sinal importante para a formação deste produto, visto que na séries A e B esse sinal é ausente por causa da presença de um enxofre ao invés de um nitrogênio (Figura 26). Com a quantidade de produto obtido só foi possível realizar análise de RMN de  $^1\text{H}$ , e os sinais esperados que este composto apresentasse foram observados, como os sinais dos hidrogênios 1,2,3,4 e 5, além de apresentar o sinal do hidrogênio 6 já discutido.

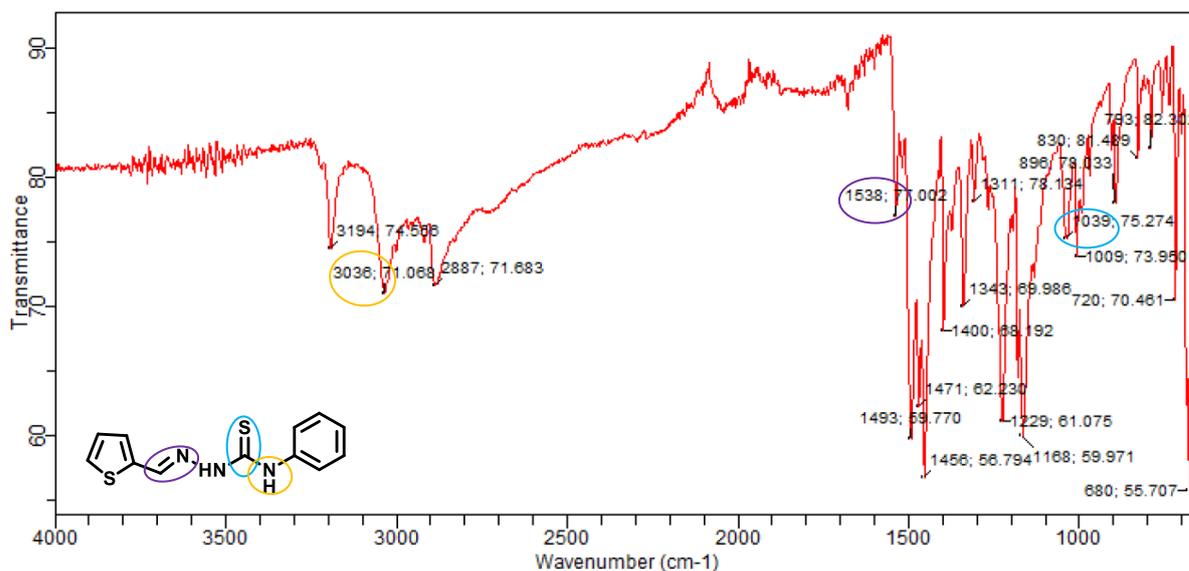
No espectro de infravermelho na Figura 33, é observado os sinais de estiramento da N-H em  $3.194\text{ cm}^{-1}$  e  $3.036\text{ cm}^{-1}$ , da  $\nu(\text{C}=\text{N})$  em  $1.538\text{ cm}^{-1}$ , da  $\nu(\text{C}=\text{S})$  em  $1.039\text{ cm}^{-1}$ , das  $\nu(\text{C}-\text{N})$  em  $1.229\text{ cm}^{-1}$  e  $1.168\text{ cm}^{-1}$  (YOUSOF *et al*, 2015; MANAN *et al*, 2011, SILVERSTEIN,

2005). Tais sinais em ambos espectros nos faz concluir que houve a formação do produto esperado.

**Figura 32** – Espectros de  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) do produto 3C



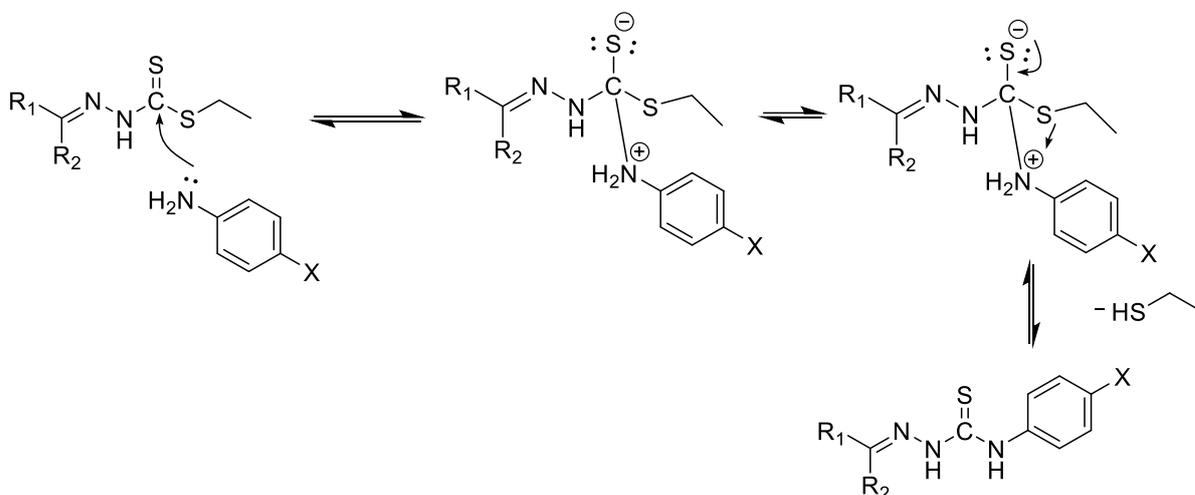
**Figura 33** – Espectro de infravermelho do produto 3C.



Acreditamos que o mecanismo desta série seja por reação de substituição acílica, onde a amina primária da anilina ataca a tiocarbonila do intermediário quebrando uma das ligações

$\pi$ , formando um intermediário tetraédrico. O par de elétrons que foi para o enxofre, reestabelece a ligação  $\pi$  da tiocarbonila e o etano tiol é expulso, se ligando ao próton da amina protonada (Esquema 6).

**Esquema 6** – Mecanismo de formação dos compostos da série C por reação de substituição acílica.



Fonte: Adaptada de Clayden e colaboradores (2001)

#### 5.4. Ensaios biológicos de inibição frente o parasita *P. falciparum*

Para os compostos sintetizados realizou-se ensaios de inibição de crescimento do parasita *P. falciparum*, cepa 3D7 (cloroquina sensível). Esses ensaios determinam a diminuição da parasitemia, ou seja, do crescimento do parasita por meio do reagente SYBR Green, adicionado após 72 horas de incubação. Os resultados obtidos para os compostos sintetizados são apresentados na Tabela 11, indicando que estes não foram ativos.

**Tabela 11** – Resultado da concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub> -  $\mu$ M) de *P. falciparum*

Compostos	Experimento 1	Experimento 2
8A	> 10	> 10
10A	> 10	> 10
31A	> 10	> 10
4B	> 10	> 10
15B	> 10	> 10

42B	> 10	> 10
66B	> 10	> 10
3C	> 10	> 10
Artesunato	0,005	0,006

Avaliou-se da atividade dos compostos sintetizados frente ao *P.falciparum* (cepa 3D7), visto terem sido planejados como inibidores da falcipaina 2.

Os ensaios biológicos demonstraram que esses compostos não inibiram o crescimento do *P. falciparum* em concentração 50%, como pode ser observado na Tabela 11.

Derivados de tiossemicarbazonas, são conhecidas como inibidores da falcipaina 2 e, também, por apresentarem inibição frente ao parasita *P. falciparum*. Porém, observamos que a substituição no nitrogênio 3 (Figura 9), por cadeias aromáticas foi desfavorável para a atividade ainda mais tendo em vista os resultados obtidos na literatura, onde o esqueleto das tiossemicarbazonas que mais mostraram ter ação inibitória são compostos principalmente sem tais substituições. Outra modificação em relação às tiossemicarbazonas ativas, foi a mudança nos anéis ligados a imina. Utilizamos heterocíclicos de cinco membros e não seis, mesmo sendo bioisósteros, essa diferença pode ter influenciado negativamente.

Os outros compostos das séries A e B (ditiocarbazatos) também não foram ativos, frente ao *P. falciparum*. Neste caso queríamos avaliar se as substituições do nitrogênio 3 por um enxofre teria influência na atividade. Porém, os testes biológicos indicaram, que mesmo sendo bioisósteros, os derivados com enxofre não têm atividade, o que pode ser justificado pelo maior volume deste átomo.

O levantamento bibliográfico apresenta relatos de que em muitos casos de planejamento de inibidores enzimáticos, os estes apresentavam ação sobre a enzima e não sobre o parasita, e o contrário também acontece. Esses relatos sugerem que em muitos casos os inibidores enzimáticos não conseguem ultrapassar barreiras e chegar ao alvo para o qual foram planejados (GREENBAUM *et al*, 2004; ETTARI *et al*, 2009).

Assim, para uma conclusão sobre se o planejamento realizado foi efetivo ou não se faz necessário ensaios de inibição da falcipaina 2.

## 6. CONCLUSÕES

A malária causada pelo *P. falciparum* tem demonstrado preocupação na área científica devido sua crescente resistência aos medicamentos atuais, tornando a busca de novos fármacos necessária. A falcipaina 2 tem sido estudada como um alvo promissor devido seu papel de digestão da hemoglobina no parasita e na literatura há estudos de inibição frente a essa proteína, e a classes das tiossemicarbazonas tem sido uma delas.

Nessa projeto, foram planejados compostos derivado das tiossemicarbazonas e seus bioisómeros, os ditiocarbazatos, para avaliar suas características estereoeletrônicas por meio da modelagem molecular com o intuito de predizer quais dos análogos planejados seriam mais promissores para inibição da falcipaina 2, baseado no suposto mecanismo de ação de ataque da Cis 42 a tiocarbolina descrito por Du e colaboradores. Assim os cálculos semi-empírico PM3 e *ab initio* na base 6-21G foram realizados, e estimou-se as conformações mais estáveis, cargas atômicas, o LUMO, e o MEP para os compostos das três séries planejadas.

Os resultados oriundos dos cálculos teóricos sugerem que as moléculas 8A, 10A, 31A, 4B, 15B, 42B, 66B, 3C, 18C e 2C, se apresentaram como melhores candidatos de cada série como inibidores da falcipaina 2, por apresentarem principalmente valores mais baixos de LUMO, cargas atômicas positivas no carbono da imina e/ou carbono tiocarbonílico, regiões eletropositivas e orbitales de LUMO disponíveis nesses carbonos, sendo suscetíveis ao ataque da C catalítica da falcipaina 2.

Os resultados dos estudos de *docking* sugerem que a 8A, 10A, 4B, 15B e 42B apresentaram uma distância com relação à Cis favorável a interação quando comparada com a distância do cristal, fato não observado nas moléculas escolhidas da série C.

A síntese dos produtos das séries A e B foi realizada com sucesso após a compra do dissulfeto de carbono, como confirmado nos resultados das análises de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e infravermelho. Quanto a série C, dos planejados para síntese, apenas dois foram obtidos, confirmado pela análise de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e infravermelho. Todos os compostos foram submetidos a análise de pureza.

Os ensaios biológicos contra o *P. falciparum* indicam que os derivados sintetizados não foram ativos. Porém, visto que foram planejados como inibidores da falcipaina 2, os ensaios de inibição enzimática são necessários para avaliar se o planejamento foi efetivo.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, M.; BARNARD, L.; KOCK, C. de.; SMITH, P. J.; WIESNER, L.; CHIBALEA, K.; SMITH, G. S. Cyclopalladated organosilane–tethered thiosemicarbazones: novel strategies for improving antiplasmodial activity. **Dalton Transactions**, v. 45, p. 5514-5520, 2016.

AGARWAL, S; MEHROTRA, R. An overview of Molecular Docking. **JSM Chem**, v.4(2), p. 1024, 2016. Disponível em:  
<<https://pdfs.semanticscholar.org/e562/1a1266f4967cf5db297bb18f982224831406.pdf>>.  
Acesso em: 24 de março de 2019.

ALVES, E.; MALUF, F. V.; BUENO, V. B.; GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; SINGH, M.; SCARPELLI, P.; COSTA, F.; SARTORELLO, R.; CATALANI, L. H.; BRADY, D.; TEWARI, R.; GARCIA, C. R. S. Biliverdin targets enolase and eukaryotic initiation factor 2 (eIF2 $\alpha$ ) to reduce the growth of intraerythrocytic development of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-12, 2016. Disponível em:  
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4768138/pdf/srep22093.pdf>>. Acesso em: 3 de junho de 2017.

ALVES, V.M.; BRAGA, R.C.; MURATOVA, E.N.; ANDRADE, C. H. QUÍMIOINFORMÁTICA: UMA INTRODUÇÃO. **Quim. Nova**, v. 41, n. 2, p. 202-212, 2017.

ARMAREGO, W. L. F.; CHAI, C. L. L. **Purification of laboratory chemicals**. (2009). 6ª ed. Elsevier, Amsterdam, 743p.

AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS). Computational Chemistry. **ACS Chemistry for life**, 2017. Disponível em: <<https://www.acs.org/content/acs/en/careers/college-to-career/chemistry-careers/computational-chemistry.html>>. Acesso em: 5 junho 2017.  
ANANDAKRISHNAN, R.; AGUILAR, B.; ONUFRIEV, A. V. H++ 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulation. **Nucleic Acids Research**, v. 40, (W1):W537-541, 2012.  
H++. Disponível em: <<http://biophysics.cs.vt.edu/H++>>. Acesso em: 12 de dezembro de 2017.

ANTONY, H. A.; PARIJA, S. C. Antimalarial drug resistance: An overview. **Tropical Parasitology**, v. 6, ed. 1, p. 30-41, 2016.

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

BARROS, M. P.; INNOCENTES, A. M.; SILVA, G. N. S.; DUARTE, M.; VUNDAS, S. L. L.; TASCA, T.. Mecanismos específicos de patogenicidade de protozoários intracelulares: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium* spp. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 13, n.20, p. 01-134, 2012.

BERTOLDO, J. B.; CHIARADIA-DELATORRE, L. D.; MASCARELLO, A.; LEAL, P. C.; CORDEIRO, M. N. S.; NUNES, R. J.; SARDUY, E. S.; ROSENTHAL, P. J.; TERENCEZI, H.

Synthetic compounds from an in house library as inhibitors of falcipain-2 from *Plasmodium falciparum*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v.30, p. 299-307, 2014.

BONILLA, J. A. et al. Critical roles for the digestive vacuole plasmepsins of *Plasmodium falciparum* in vacuolar function. **Molecular Microbiology**, v.65, n.1, p.64- 75, 2007.

CARNEIRO, Z.A; MAIA, P. I. da S.; SESTI-COSTA, R.; LOPES, C. D.; PEREIRA, T. A.; MILANEZI, C. M.; SILVA, M. A. P. da.; LOPEZ, R. F. V.; SILVA, J. S.; DEFLON, V. M. *In vitro* and *In vivo* Trypanocidal Activity of H2bdtc-Loaded Solid Lipid Nanoparticles. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, p. e284, 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, **Malaria's Impact Worldwide**, 2019. USA. Disponível em:

<[https://www.cdc.gov/malaria/malaria\\_worldwide/impact.html](https://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/impact.html)>. Acesso em: 23 de março de 2019.

CHAKKA, S. K.; KALAMUDDIN, M.; SUNDARARAMAN, S.; WEI, L.; MUNDRA, S.; MAHESH, R.; MALHOTRA, P.; MOHMMED, A.; KOTRA, L. P. Identification of novel class of falcipain-2 inhibitors as potential antimalarial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, p. 2221-2240, 2015.

CHIPELEME, A.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; CHIBALE, K. Synthesis and biological evaluation of phenolic Mannich bases of benzaldehyde and (thio)semicarbazone derivatives against the cysteine protease falcipain-2 and a chloroquine resistant strain of *Plasmodium falciparum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 273-283, 2007.

CHUGH, M.; SCHEURER, C.; SAX, S.; BILSLAND, E.; SCHALKWYK, D. A.; WICHT, K. J.; HOFMANN, N.; SHARMA, A.; BASHYAM, S.; SINGH, S.; OLIVER, S. G.; EGAN, T. J.; MALHOTRA, P.; SUTHERLAND, C. J.; BECK, H.; WITTLIN, S.; SPANGENBERG, T.; DING, X. C. Identification and deconvolution of cross-resistance signals from antimalarial compounds using multidrug-resistant *plasmodium falciparum* strains. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 59, p. 1110-1118, 2014.

CONRAD, M. D.; BIGIRA, V.; KAPISI, J.; MUHINDO, M.; KAMYA, M. R. ; HAVLIR, D. V. ; DORSEY, G.; ROSENTHAL, P. J. Polymorphisms in k13 and falcipain-2 associated with artemisinin resistance are not prevalent in *plasmodium falciparum* isolated from ugandan children. **Plos One**, v. 9. 2014.

CONROY, T.; GUO, J. T.; ELIAS, N.; CERGOL, K. M.; GUT, J.; LEGAC, J.; KHATOON, L.; LIU, Y.; MCGOWAN, S.; ROSENTHAL, P. J.; CAÇA, N. H.; PAYNE, R. J. Synthesis of gallinamide a analogues as potent falcipain inhibitors and antimalarials. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57 (24), p. 10557-10563, 2014.

COPELAND, R. A. Why enzymes as drug targets? In: COPELAND, R. A. (Ed) **Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists**. 2. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2013. p. 1-5.

CRUZ, L. N. **Estudos de fisiologia comparativa de modelos de malária em roedor**. 2010. 52 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São

Paulo, São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42135/tde-10082010-143652/pt-br.php>>. Acesso em: 25 de abril de 2015.

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

DNDi – Drugs for Neglected Disease initiative. **O que é a malária?** Disponível em: <<https://www.dndi.org/diseases-projects/malaria/>>. Acesso em: 10 de maio de 2017.

DU, X. et al. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.45, p. 2695-2707, 2002.

DUARTE, E. C.; RAMALHO, W. M.; TAUIL, P. L.; FONTES, C. J. F.; PANG, L.. The changing distribution of malaria in the Brazilian Amazon, 2003-2004 and 2008-2009. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.47, p. 763-769, 2014.

DUSCHAK, V.G.; COUTO, A.S. An Insight on targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas Disease, **Recent Patents Anti-Infect. Drug Discov.**, v. 2, p. 19-51, 2007.

ESPÍNDOLA, J. W. P.; CARDOSO, M. V. de O.; FILHO, G. B. de O.; OLIVEIRA E SILVA, D. A.; MOREIRA, D. R. M.; BASTOS, T. M.; SIMONE, C. S. de; SOARES, M. B. P.; VILLELA, F. S.; FERREIRA, R. S.; CASTRO, M. C. A. B. de; PEREIRA, V. R. A.; MURTA, S. M.F.; JUNIOR, P. A. S.; ROMANHA, A. J.; LEITE, A. C. L. Synthesis and structure-activity relationship study of a new series of antiparasitic aryloxy thiosemicarbazones inhibiting *Trypanosoma cruzi* cruzain. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 818–835, 2015.

ETTARI, R.; BOVA, F.; ZAPPALA, M.; GRASSO, S.; MICALE, N. Falcipain 2 inhibitors. **Medicinal Research Reviews**, v. 30, p. 136-167, 2010.

FERNANDES, L. A. L. **Desenho, Síntese e Avaliação Biológica de Inibidores de Proteases de Cisteína**. 2011. 152 f. Dissertação (Mestrado em Química Farmacêutica) – Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2011. Disponível em: <<http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/11596/1/Tese-%20Desenvolvimento%20de%20Inibidores%20de%20Proteases%20de%20Ciste%C3%ADna.pdf>>. Acesso em: 26 de abril de 2015.

FERNANDES, N. E. P.; CRAVO, P.; ROSÁRIO, V. E. Resistência à sulfadoxina-pirimetamina em Maputo, Moçambique: presença de mutações nos genes dhfr e dhps do *Plasmodium falciparum*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40(4), p. 447-450, jul-ago, 2007.

FERREIRA, L. G.; SANTOS, R. N. dos; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. **Molecules**, v. 20, p. 13384-13421, 2015.

FERREIRA, R. S.; ANDRICOPULO, A. D. Structure-Based Drug Design to Overcome Drug Resistance: Challenges and Opportunities. **Current Pharmaceutical Design** (Print), v. 19, p. 1-12, 2013.

FIOCRUZ. **Conheça a malária**. 2017. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ioc/media/malaria%20folder.pdf>>. Acesso em: 9 de junho de 2017.

FMUSP. Malária. **Patologia de Febres Hemorrágicas**. 2013. Disponível em: <<http://www2.fm.usp.br/pfh/mostrahp.php?origem=pfh&xcod=Malaria>>. Acesso em: 4 de maio de 2017.

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

GALACTIONOVA, K.; BERTRAM, M. C.; LAUER, J. C.; TEDIOSI, F. Costing RTS,S introduction in Burkina Faso, Ghana, Kenya, Senegal, Tanzania, and Uganda: A generalizable approach drawing on publicly available data. **Vaccine**. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X15015224>>. Acesso em: 5 de novembro de 2015.

GLEMSE, O. HANDBOOK OF PREPARATIVE INORGANIC CHEMISTRY, Volume 1, 2ª edição. Londres: Editora Academic Press, pg. 652, 1963.

MYERS, J; GROTHAUS, G; NARAYANAN, S; ONUFRIEV, A. A simple clustering algorithm can be accurate enough for use in calculations of pKs in macromolecules. **Proteins**, 63, p. 928-938, 2006.

GLENN, M. P. et al. Structurally simple, potent, Plasmodium selective farnesyltransferase inhibitors that arrest the growth of malária parasites. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.49, n.19, p.5710-27, 2006.

GlaxoSmithKline (GSK), **GSK's malaria candidate vaccine, Mosquirix™ (RTS,S), receives positive opinion from European regulators for the prevention of malaria in young children in sub-Saharan Africa**. Londres, Reino Unido. Disponível em: <<https://www.gsk.com/en-gb/media/press-releases/2015/gsk-s-malaria-candidate-vaccine-mosquirix-rtss-receives-positive-opinion-from-european-regulators-for-the-prevention-of-malaria-in-young-children-in-sub-saharan-africa/>>. Acesso em: 4 de novembro de 2015.

GOMES, A. P.; VITORINO, R. R.; COSTA, A. P.; MENDONÇAS, E. G.; OLIVERIA, M. G. A.; SIQUEIRA-BATISTA, R.. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, 2011, n. 23(3), p. 358-369, fev./ago. 2011.

GORDON, J.C; MYERS, J.B.; FOLTA, T.; SHOJA, V.; HEATH, L.S.; ONUFRIEV, A. H++: a server for estimating pKas and adding missing hydrogens to macromolecules. **Nucleic Acids Research**, v. 33, W368-W371, 2005.

GRAVES, P. M.; GELBAND, H.; GARNER, P. Primaquine or other 8-aminoquinoline for reducing *Plasmodium falciparum* transmission. **Cochrane Database of Systematic Reviews** 2015, ed. 2. 2015

GREENBAUM, D. C.; MACKEY, Z.; HANSELL, E.; DOYLE, P.; GUT, J.; CAFFREY, C. R.; LEHRMAN, J.; ROSENTHAL, P. J.; MCKERROW, J. H.; CHIBALE, K. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Parasitocidal Thiosemicarbazone Cysteine Protease Inhibitors against *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, and *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 3212-3219, 2004.

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

GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Structure- and ligand-based drug design approaches for neglected tropical diseases. **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 9, p. 1857–1866, 2012.

JORK, H. *et al.* **Thin-Layer Chromatography**. Weinheim , Basel (Switzerland): [s.n.], v. 1a, 1990.

KASPER, D. L. *et al.* **Medicina Interna de Harrison**. 19. ed. [S.l.]: artmed, v. 2, 2016.  
KONING-WARD, T. F. de; DIXON, M. W.A.; TILLEY, L.; GILSON, P. R. *Plasmodium* species: master renovators of their host cells. **Nature Reviews Microbiology**, v14, p. 494-507, 2016.

KERR, I.D.; LEE, J.H.; PANDEY, K.C.; HARRISON, A.; SAJID, M.; ROSENTHAL, P.J.; BRINEN, L.S. Structures of falcipain-2 and falcipain-3 bound to small molecule inhibitors: implications for substrate specificity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.52, p. 852-857, 2009.

KINFE, H. H.; BELAY, Y. H. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Thiosemicarbazone-Triazole Hybrid Compounds Antimalarial Agents. **South African Journal of Chemistry**, v. 130, n. 66, p. 130-135, 2013.  
Synthesis and Biological Evaluation of Novel Thiosemicarbazone-Triazole Hybrid Compounds Antimalarial Agents. **South African Journal of Chemistry**

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 935–949,2004.

KULANDAIVELU, U. CHILAKAMARI, L.M.; JADAV, S.S. RAO, T.R.; JAYAVEERA, K.N.; SHIREESHA, B.; HAUSER, A.T.; SENGER, J. MAREK, M.; ROMIER, C.; JUNG, M.; JAYAPRAKASH, V. Hydroxamates of para-aminobenzoic acid as selective inhibitors of HDAC8. **Bioorganic Chemistry**, v. 57, 116–120, 2014.

LIMA, L. M. Química Medicinal Moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1456-1468, 2007.

LEE, C. -H.; HUANG, H. -C.; JUAN, H. -F. Reviewing Ligand-Based Rational Drug Design: The Search for an ATP Synthase Inhibitor. **International Journal of Molecular Sciences**, v.12,ed. 8, p. 5304-5318, 2011.

LIU, Y.; LU W.; CUI, K.; LUO, W.; WANG, J.; GUO, C. Synthesis and Biological Activities of Novel Artemisinin Derivatives as Cysteine Protease Falcipain-2 Inhibitors. **Archives of Pharmacol Research**, v. 35, p. 1525–1531, 2012.

MAHESH, R.; MUNDRA, S.; DEVADOSS, T.; KOTRA, L. P. Design, synthesis and evaluation of 2-(4-(substituted benzoyl)-1,4-diazepan-1-yl)-*N*-phenylacetamide derivatives as a new class of falcipain-2 inhibitors. **Arabian Journal of Chemistry**. Disponível em: <[https://ac.els-cdn.com/S1878535214002561/1-s2.0-S1878535214002561-main.pdf?\\_tid=9d618f8b-8f85-49a5-995d-1703ac3d6d51&acdnat=1522200869\\_c622857a5bfeadb2ccaf9cce3c9b036c](https://ac.els-cdn.com/S1878535214002561/1-s2.0-S1878535214002561-main.pdf?_tid=9d618f8b-8f85-49a5-995d-1703ac3d6d51&acdnat=1522200869_c622857a5bfeadb2ccaf9cce3c9b036c)>. Acesso em 15 de março de 2018.

Malária. **Toda matéria**, 2014. Disponível em: <<https://www.todamateria.com.br/malaria/>>. Acessado em: 12 de março de 2019.

MANAN, M. A. F. A.; CROUSE, K. A.; TAHIR, M. I. M.; ROSLI, R.; HOW, F. N.-F.; WATKIN, D. J.; SLAWIN, A. M. Z. Synthesis, Characterization and Cytotoxic Activity of *S*-Benzylthiocarbamate Schiff Bases Derived from 5-Fluoroisatin, 5-Chloroisatin, 5-Bromoisatin and Their Crystal Structures. **J Chem Crystallogr**, v.41, p. 1630–1641, 2011.

MATHISON, B. A.; PRITT, B. S. Update on Malaria Diagnostics and Test Utilization. **Journal of Clinical Microbiology**, 2017. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/early/2017/04/06/JCM.02562-16.long>>. Acesso em: 23 de junho de 2017.

MONSALVE, M. S. **Síntese e Caracterização de Compostos de Coordenação Mistos de Cobre com Potencial Atividade Anti-*Mycobacterium tuberculosis***. 2013. 87f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75135/tde-30072013-092752/pt-br.php>>. Acesso em: 28 de abril de 2017

MURTAZA, G.; MUMTAZ, A.; KHAN, F. A.; AHMAD, S.; AZHAR, S.; NAJAM-UL-HAQ, M.; ATIF, M.; KHAN, S. A.; MAALIK, A.; ALAM, F.; HUSSAIN, I. RECENT PHARMACOLOGICAL ADVANCEMENTS IN SCHIFF BASES: A REVIEW. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 71, n. 4, p. 531-535, 2014.

NATURE. Computational chemistry. **Nature**, 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/subjects/computational-chemistry>>. Acesso em: 17 junho 2017.

OLIVEIRA, F. R.; PESSOA, M. C.; ALBUQUERQUE, R. F. V.; SCHALCHER, T. R.; MONTEIRO, M. C. Clinical applications and methemoglobinemia induced by dapsone. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 10, 2014.

OLIVEIRA, M. E.; CENZI, G.; NUNES, R. R.; ANDRIGHETTI, C. R.; VALADÃO, D. M. S.; REIS, C.; SIMÕES, C. M. O.; NUNES, R. J.; JÚNIOR, M. C.; TARANTO, A. G.; SANCHEZ, B. A. M.; VIANA, G. H. R.; VAROTTI, F. P.. Antimalarial Activity of 4-Metoxychalcones: Docking Studies as Falcipain/Plasmepsin Inhibitors, ADMET and Lipophilic Efficiency Analysis to Identify a Putative Oral Lead Candidate. **Molecules**, v. 18, ed. 12, p. 15276-15287. 2013

OLIVEIRA, R.; GUEDES, R. C.; MEIRELES, P.; ALBUQUERQUE, I. S.; GONÇALVES, L. M.; PIRES, E.; BRONZE, M. R.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; PRUDÊNCIO, M.; MOREIRA, R.; O'NEILL, P. M.; LOPES, F. Tetraoxane–Pyrimidine Nitrile Hybrids as Dual Stage Antimalarials. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 57 (11), p. 4916–4923, 2014.

PAGADALA, N. S.; TUSZYNSKI, K. S. J. Software for molecular docking: a review. **Biophysical Reviews**, v. 9, n. 2, p. 91-102, 2017.

PANDEY, K. C. Cysteine proteases of human malaria parasites. **Journal of Parasite Diseases**, v. 35, p. 94-103, 2011.

PARHIZGAR, A. R.; TAHGHIGHI, A. Introducing New Antimalarial Analogues of Chloroquine and Amodiaquine: A Narrative Review. **Iranian Journal of Medical Sciences**, v. 42, ed. 2, p. 115-128, 2017.

PARRA, M.; LIU, X.; DERRICK, S. C.; YANG, A.; MOLINA-CRUZ, A.; BARILLAS-MURY, C.; ZHENG, H.; THAO, P. P.; SEDEGAH, M.; BELMONTE, A.; LITILIT, D. D.; WALDMANN, T. A.; KUMAR, S.; MORRIS, S. L.; PERERA, L. P. Co-expression of Interleukin-15 Enhances the Protective Immune Responses Induced by Immunization with a Murine Malaria MVA-Based Vaccine Encoding the Circumsporozoite Protein. **Plos One**. Disponível em: < <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0141141>>. Acesso em: 6 de novembro de 2015.

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 5 ed. Oxford: Oxford University Press, 2013. pg. 342-344.

PENIDO, A. **Brasil registra menor número de casos de malária nos últimos 35 anos**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/23368-brasil-registra-menor-numero-de-casos-de-malaria-nos-ultimos-35-anos>>. Acesso em 14 de setembro de 2016.

PEREIRA, D. H.; LA PORTA, F. A.; SANTIAGO, R. T.; GARCIA, D. R.; RAMALHO, T. C. Novas Perspectivas sobre o Papel dos Orbitais Moleculares de Fronteira no Estudo Da Reatividade Química: Uma Revisão. **Revista Virtual de Química**, v.8, ed. 2, p. 425-453, 2016.

PONSUWANNA, P.; KOCHAKARN, T.; BUNDITVORAPOOM, D.; KÜMPORNSIN, K.; OTTO, T. D.; RIDENOUR, C.; CHOTIVANICH, K.; WILAIRAT, P.; WHITE, N. J.; MIOTTO, O.; CHOOKAJORN, T. Comparative genome-wide analysis and evolutionary history of haemoglobin-processing and haem detoxification enzymes in malarial parasites. **Malaria Journal**, 2016. Disponível em: < [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4731938/pdf/12936\\_2016\\_Article\\_1097.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4731938/pdf/12936_2016_Article_1097.pdf)>. Acesso em: 3 de maio de 2017.

PORTAL DA SAÚDE , **Descrição da Doença**, 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/662-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/malaria/11342-descricao-da-doenca>>. Acesso em 10 de maio de 2017.

PRASAD, R.; ATUL; KOLLA, V. K.; LEGAC, J.; SINGHAL, N.; NAVALE, R.; ROSENTHAL, P. J. ; SIJWALI, P. S.. Blocking Plasmodium falciparum Development via Dual Inhibition of Hemoglobin Degradation and the Ubiquitin Proteasome System by MG132. **Plos One**, v. 8, 2013.

PRIETO-MARTÍNEZ, F. D.; ARCINIEGA, M.; MEDINA-FRANCO, J. L. Molecular docking: current advances and challenges. **TIP Rev.Esp.Cienc.Quím.Biol.**, v. 21, 2018.

REDEMANN, C. E.; ICKE, R. N.; ALLES, G. A. RODHANINE. **Organic Syntheses Collective**, v. 3, p.763 (1955), v. 27, p.73 (1947). Disponível em: <<http://www.orgsyn.org/content/pdfs/procedures/cv3p0763.pdf>>. Acesso em: 24 de março de 2017.

RODRIGUES, C. R. Processos modernos no desenvolvimento de fármacos. **Cadernos Temáticos em Química Nova na Escola**, n. 3, p. 43-49, 2001.

ROSENTHAL, P. J. Cysteine proteases of malaria parasites. **International Journal for Parasitology**, v.34, n.13-14, p.1489-99, 2004.

ROSENTHAL, P. J. Hydrolysis of erythrocyte proteins by proteases of malária parasites. **Current Opinion in Hematology**, v.9, n.2, p.140-5, 2002.

ROSENTHAL, P. J. The interplay between drug resistance and fitness in malaria parasites. **Molecular Microbiology**, 2013.

SABNIS, Y. A.; DESAI, P. V.; ROSENTHAL, P. J.; AVERY, M. A. Probing the structure of falcipain-3, a cysteine protease from *Plasmodium falciparum*: Comparative protein modeling and docking studies. **Protein Science**, v. 12, ed. 3, p. 501–509, 2003.

SAJID, M., McKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, p. 1-21, 2002.

SANT'ANNA, C. M. R. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações da iupac para 1997). **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 505-512, 2002.

SANTOS, C. S.; GOMES, A. M. T.; SOUZA, F. S.; MARQUES, S. C.; LOBO, M. P.; OLIVEIRA, D. C. de. Representações sociais de profissionais de saúde sobre doenças negligenciadas. **Escola Anna Nery**, v. 21, n. 1, p. 1-9, 2017. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1414-81452017000100216&script=sci\\_arttext&tlng=pt#B](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1414-81452017000100216&script=sci_arttext&tlng=pt#B)>. Acesso em: 3 de junho de 2017.

SANTOS, E. A. **Papel do IP<sub>3</sub> na transdução de sinal de função da heme oxigenase em Plasmodium falciparum**. 2013. 48 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42135/tde-20032014-174955/pt-br.php>>. Acesso em: 25 de Abril de 2015.

SANTOS, M. M. M.; MOREIRA, R. Michael Acceptors as Cysteine Protease Inhibitors. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 1040-1050, 2007.

- SCIENTISTS AGAINST MALARIA. Transmission. **Scientists Against Malaria**, 2017. Disponível em: <<http://scientistsagainstmalaria.net/about-malaria/transmission>>. Acesso em: 30 maio 2017.
- SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE. **Doença**, 2017. Disponível em: <<http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/programas/malaria/doenca>>. Acesso em: 2 de julho de 2017.
- SHARMA, R. K.; YOUNIS, Y.; MUGUMBATE, G.; NJOROGE, M.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; CHIBALE, K. Synthesis and structure–activity-relationship studies of thiazolidinediones as antiplasmodial inhibitors of the *Plasmodium falciparum* cysteine protease falcipain-2. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 90, p. 507-518, 2015.
- SHRIVASTAVA, S.; FAHMI, N.; SINGH, D.; SINGH, R.V. Structural, spectroscopic, and biological aspects of S $\pi$ N donor Schiff-base ligands and their chromium(III) complexes. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 63, n. 10, 1807–1819, 2010.
- SILVA, C. M. da; SILVA, D. L. da; MODOLO, L. V.; ALVES, R. B.; RESENDE, M. A. de; MARTINS, C. V. B.; FÁTIMA, A. de. Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities. **Journal of Advanced Research**, v. 2, ed. 1, p. 1-8, 2011.
- SILES, R.; CHEN, S.; ZHOU, M.; PINNEY, K. G.; TRAWICK, M. L. Design, synthesis, and biochemical evaluation of novel cruzain inhibitors with potential application in the treatment of Chagas' disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 4405–4409, 2006.
- SINGH, H.L.; VARSHNEY, A.K. Synthesis and characterization of coordination compounds of organotin(IV) with nitrogen and sulfur donor ligands. **Applied Organometallic Chemistry**. v. 15, p. 762–768, 2001.
- SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P.; MENDONÇA, E. G. VITORINO, R. R.; AZEVEDO, S. F. M.; FREITAS, R. B.; SANTANA, L. A.; OLIVEIRA, M. G. A. Malária por *Plasmodium falciparum*: estudos proteômicos. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.24, n.4, p. 394-400, 2012.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Spectrometric identification of organic compounds. 7<sup>a</sup> ed. Estados Unidos: John Wiley & Sons, INC, 2005.
- SUNDARARAJ, S.; SINGH, D.; SAXENA, A. K.; VASHISHT, K.; SIJWALI, P. S.; DIXIT, R.; PANDEY, K. C. The Ionic and Hydrophobic Interactions Are Required for the Auto Activation of Cysteine Proteases of *Plasmodium falciparum*. **Plos One**, v.7, ed. 10, 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0047227&type=printable>>. Acesso em: 24 de maio de 2017.
- TEIXEIRA, C.; GOMES, J. R.; COUESNON, T.; GOMES, P. Molecular docking and 3D-quantitative structure activity relationship analyses of peptidyl vinyl sulfones: Plasmodium Falciparum cysteine proteases inhibitors. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v.8, p. 763-775, 2011.

TEIXEIRA, C.; GOMES, J. R. B.; GOMES, P. Falcipains, Plasmodium falciparum cysteine proteases as key drug targets against malaria. **Current Medicinal Chemistry**, v.18, p. 1555-1572, 2011.

TENÓRIO, R. P.; GÓES, A. J. S.; LIMA, J. G. de; FARIA, A. R. de; ALVES, A. J.; AQUINO, T. M. de. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1030-1037, 2005.

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

TROSSINI, G. H. G. *et al.* Cruzain inhibition by hydroxymethylnitrofurazone and nitrofurazone: investigation of a new target in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v, 25, p. 62-67, 2009.

TROSSINI, G. H. G.; CHIN, C. M.; MENEZES, C. M. de S.; FERREIRA, E. I. Molecular Modeling Suggests Cruzain Specificity for Peptide Primaquine Prodrugs. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 7, p. 528-533, 2010.

VALE, N.; MOREIRA, R.; GOMES, P. Quimioterapia da malária: um século no desenvolvimento de antimaláricos. **Química**, s. II, n. 99, p. 57-69, 2005.

VALVERDE, R. Doenças Negligenciadas. **Agência Fiocruz de Notícias**, 2013. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>>. Acesso em: 10 junho 2017.  
VENANZI, E.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Resistencia a los antimaláricos. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 29, p. 72-75, 2016.

VITAL, D. V. **Planejamento, síntese e avaliação biológica de análogos bioisostéricos da nitrofurazona: variações de anéis (pirrol e 4-dimetilaminobenzil) e cadeias laterais (semicarbazona, tiossemicarbazona e aminoguanidina)**. 2013. 99f. Dissertação (Mestrado) –Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de SãoPaulo, São Paulo, 2013.

VITAL, D. G.; ARRIBAS, M.; TROSSINI, G. H. G. Molecular Modeling and Docking Application to Evaluate Cruzain Inhibitory Activity by Chalcones and Hydrazides. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 11, p. 249-255, 2014.

WATTS, S.; JOSHI, SC.; SINGH, RV. Synthesis, characterization, antifertility and biochemical studies of organosilicon complex derived from schiff base ligand. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 4, ed. 2, p. 345-352, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **World Malária Report 2017**. Suíça. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/259492/1/9789241565523-eng.pdf?ua=1>>. Acesso em: 15 de março de 2018.

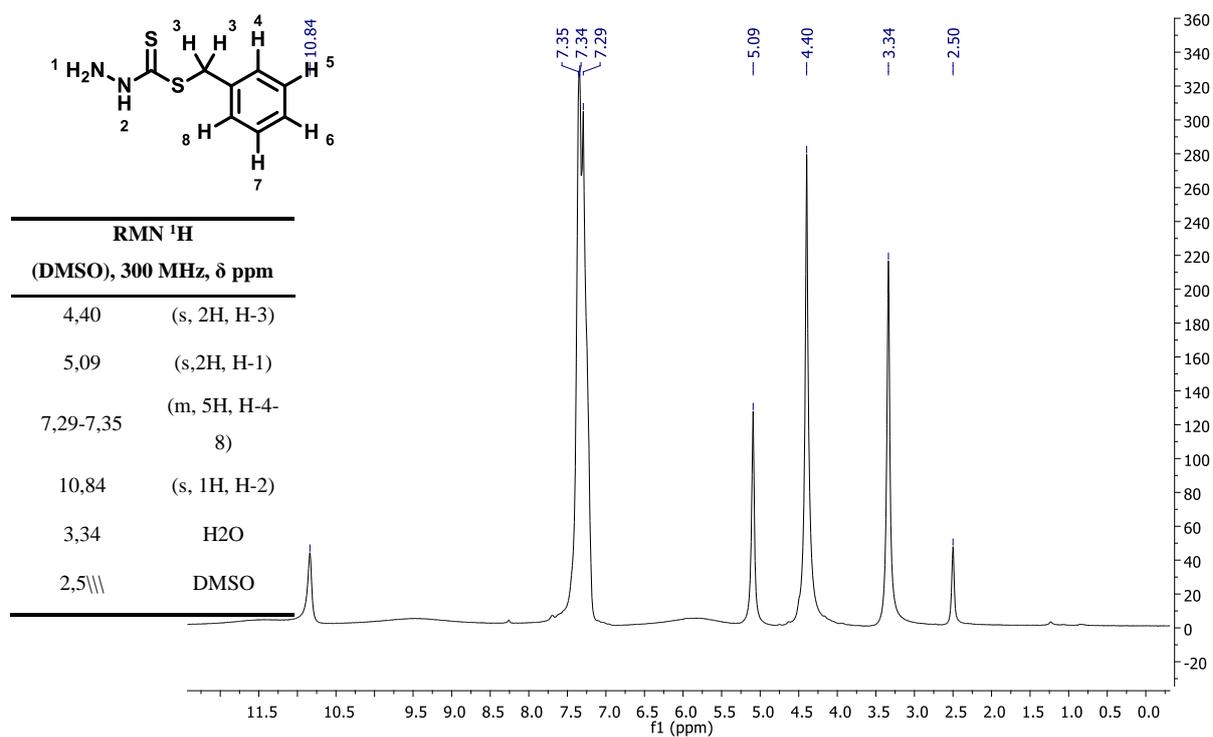
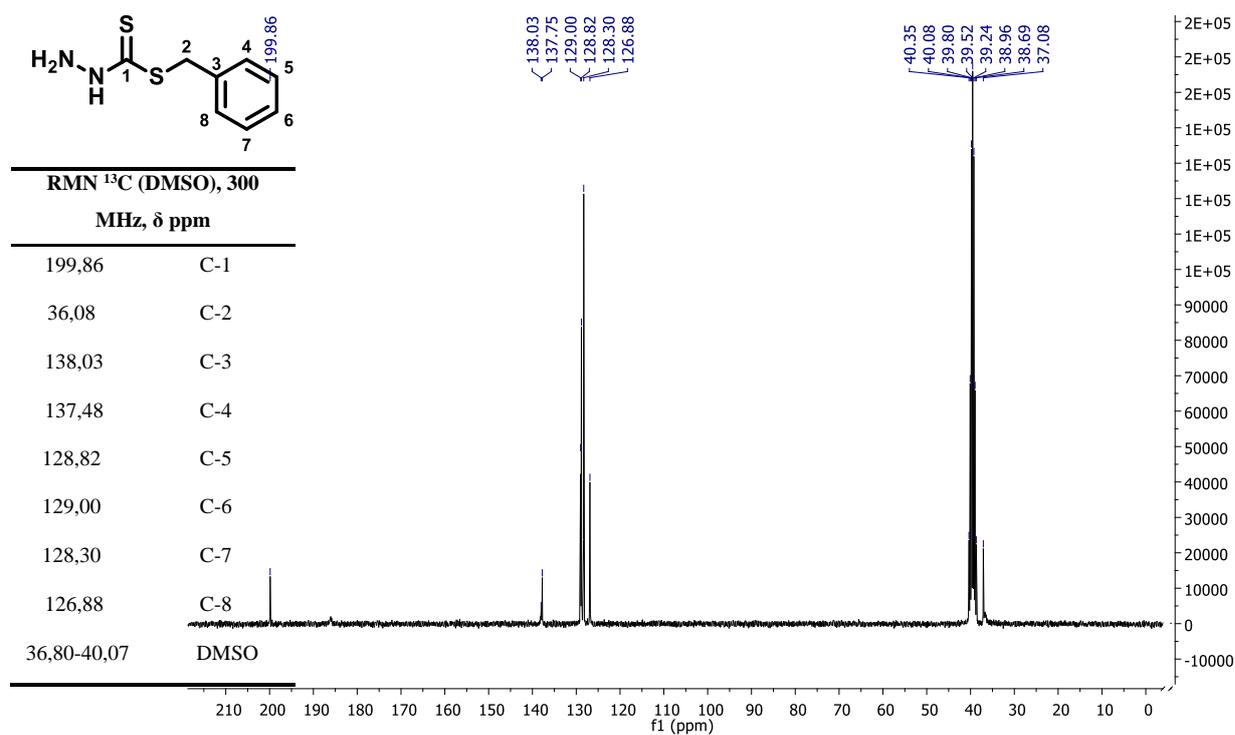
WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Doenças tropicais negligenciadas**. Suíça. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/252038/1/9789241511711-eng.pdf?ua=1>>. Acesso em: 2 de julho de 2017.

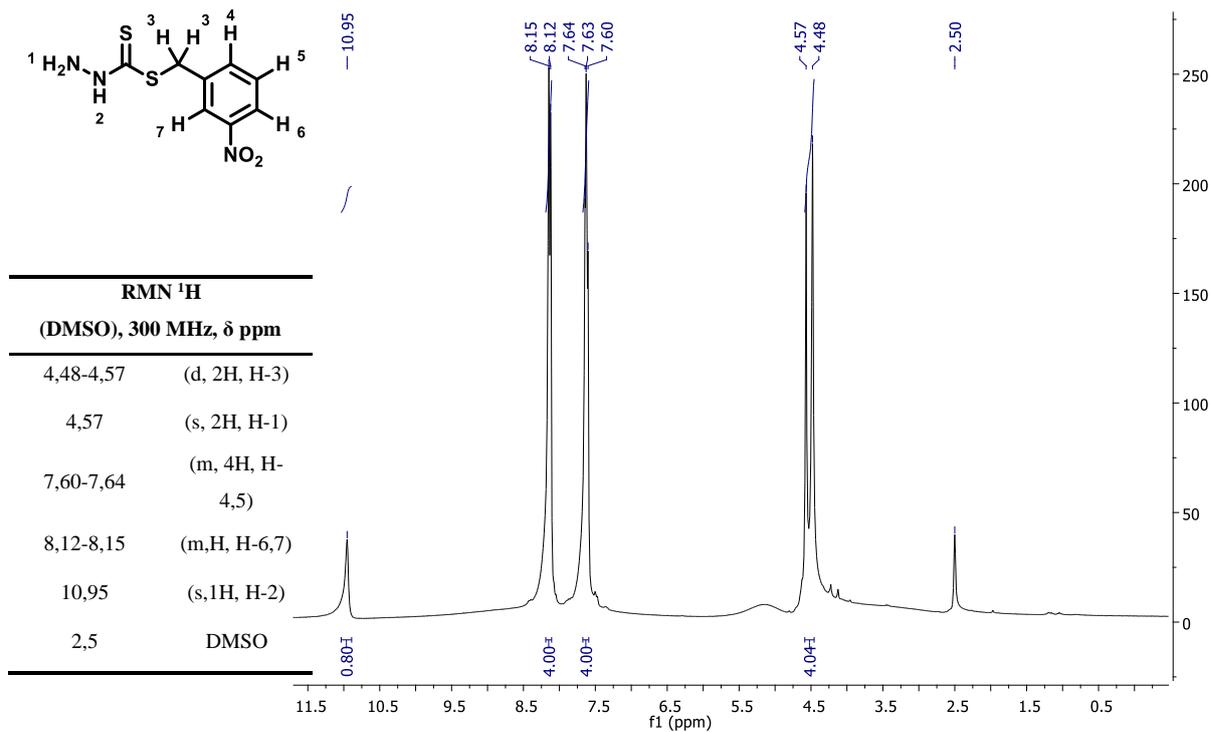
WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Malaria**, 2019. Disponível em:  
<<https://www.who.int/malaria/media/malaria-vaccine-implementation-qa/en/>>. Acesso em: 23  
de março de 2019.

YAM, X. Y.; NIANG, M; MADNANI, K. G.; PREISER, P. R. Three Is a Crowd – New  
Insights into Rosetting in *Plasmodium falciparum*. **Trends in Parasitology**, v. 33, p. 309–  
320, 2017.

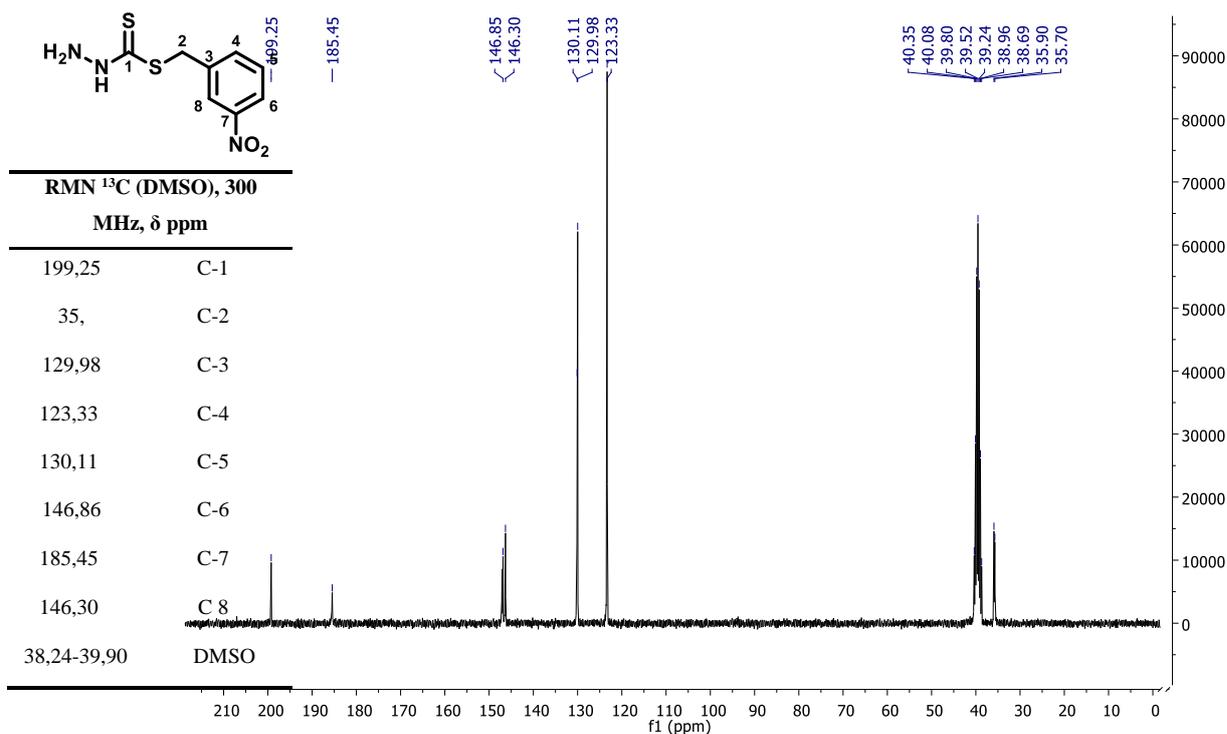
YUSOF, E. N. M.; RAVOOF, T. B. S. A.; TIEKINK, E. R. T.; VEERAKUMARASIVAM,  
A.; CROUSE, K. A.; TAHIR, M. I. M.; AHMAD, H. Synthesis, Characterization and  
Biological Evaluation of Transition Metal Complexes Derived from N, S Bidentate Ligands.  
**International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, ed. 5, 2015.

## Anexo A: Intermediários das séries B e C

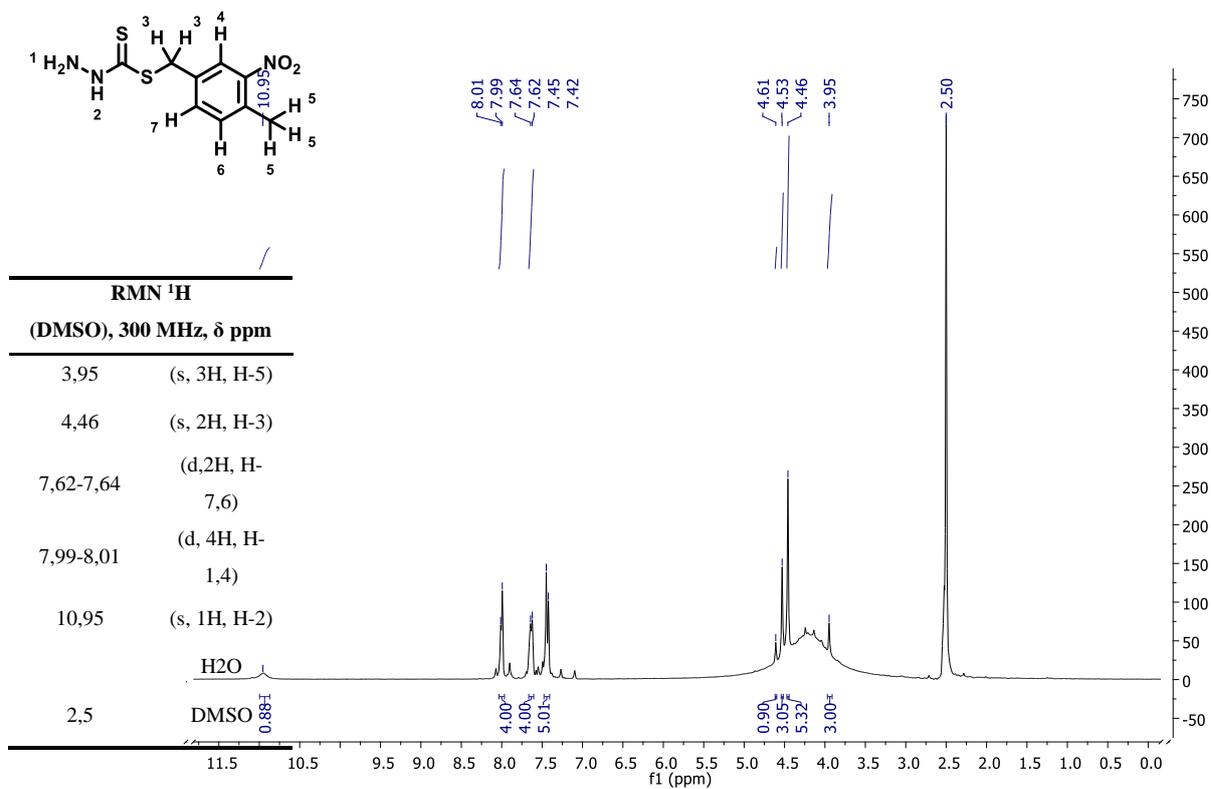
Espectro de <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) do intermediário IB.Espectro de <sup>13</sup>C (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) do intermediário IB.



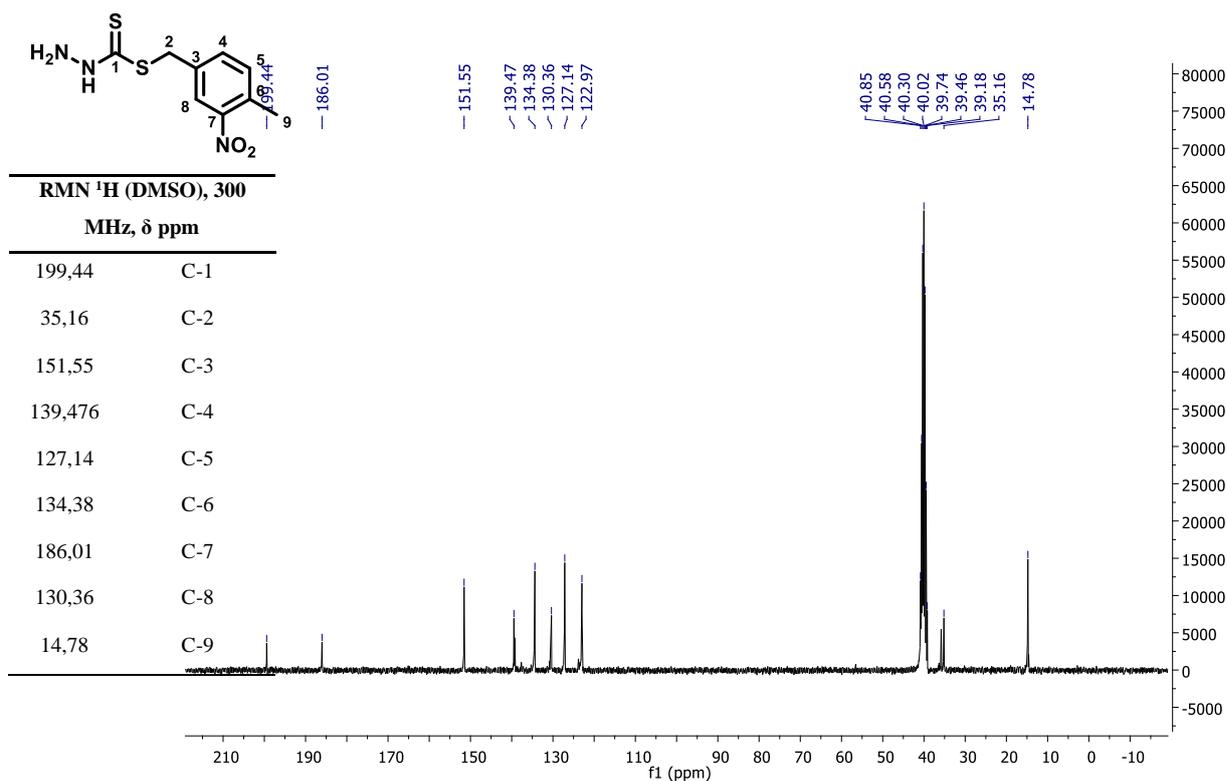
Espectro de <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) do intermediário IIB.



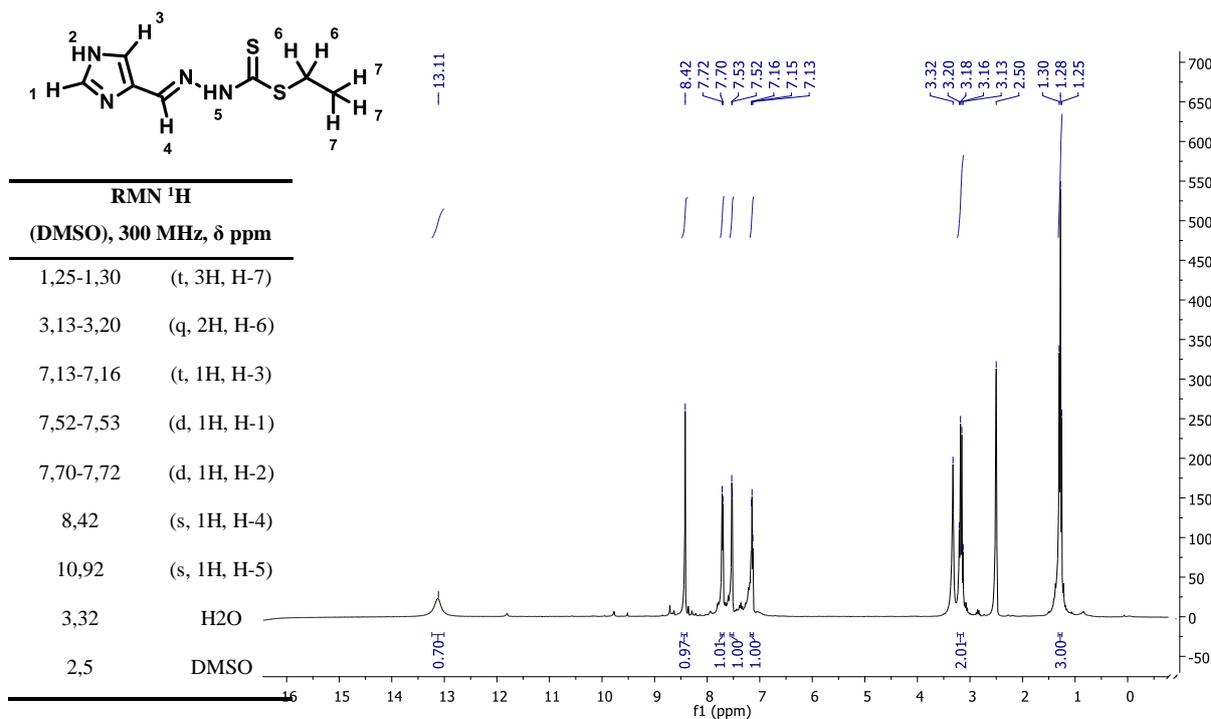
Espectro de <sup>13</sup>C (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) do intermediário IIB.



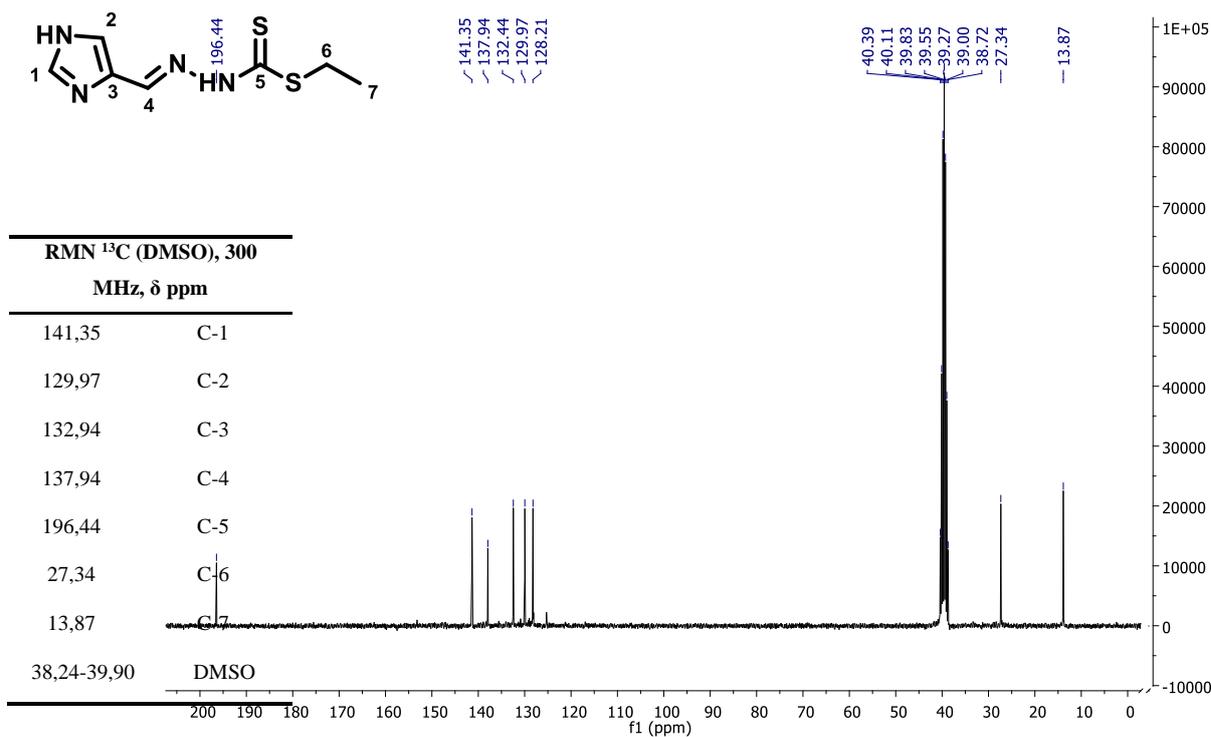
Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) do intermediário IVB.



Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) do intermediário IVB.

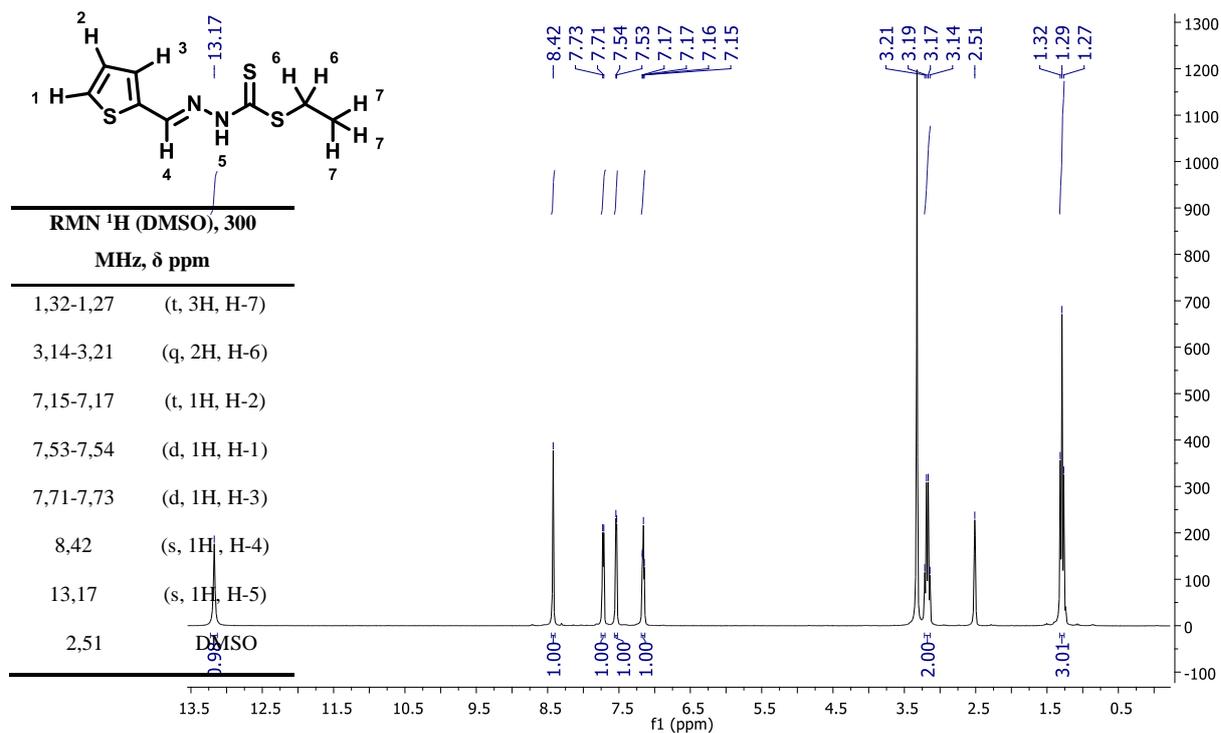


Espectro de <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) do intermediário IIC.

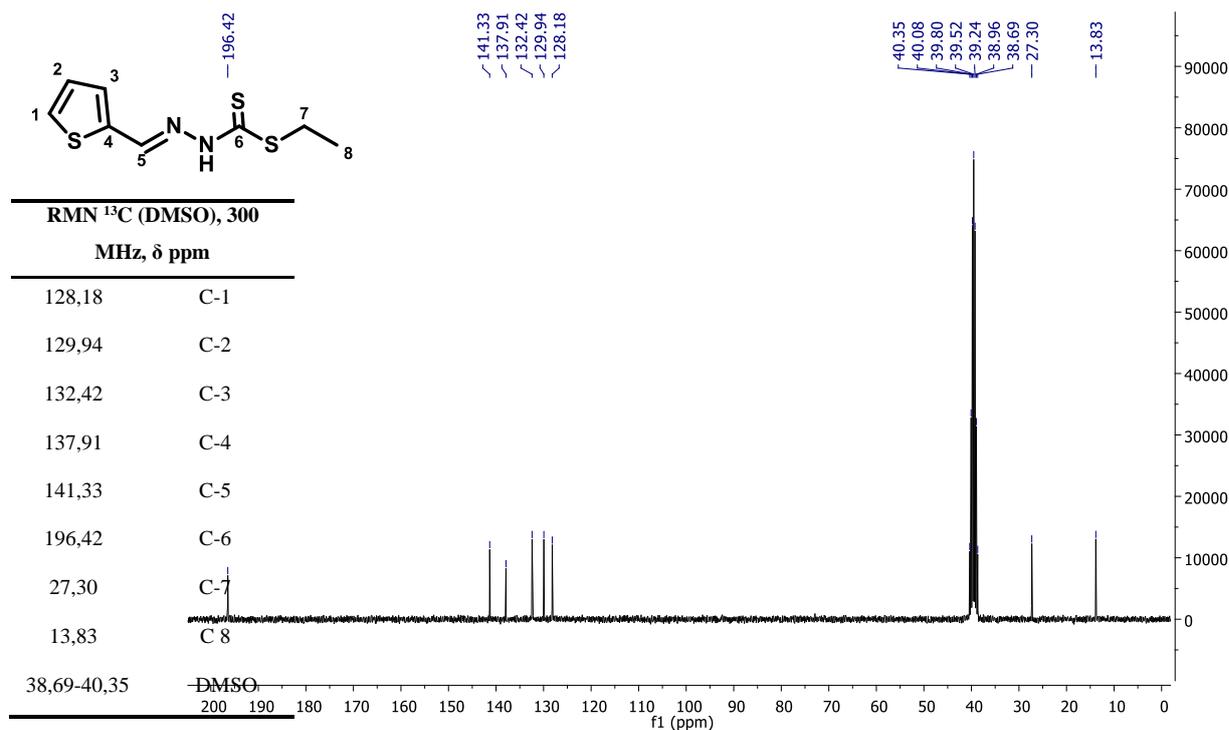


Espectro de <sup>13</sup>C (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) do intermediário IIC.

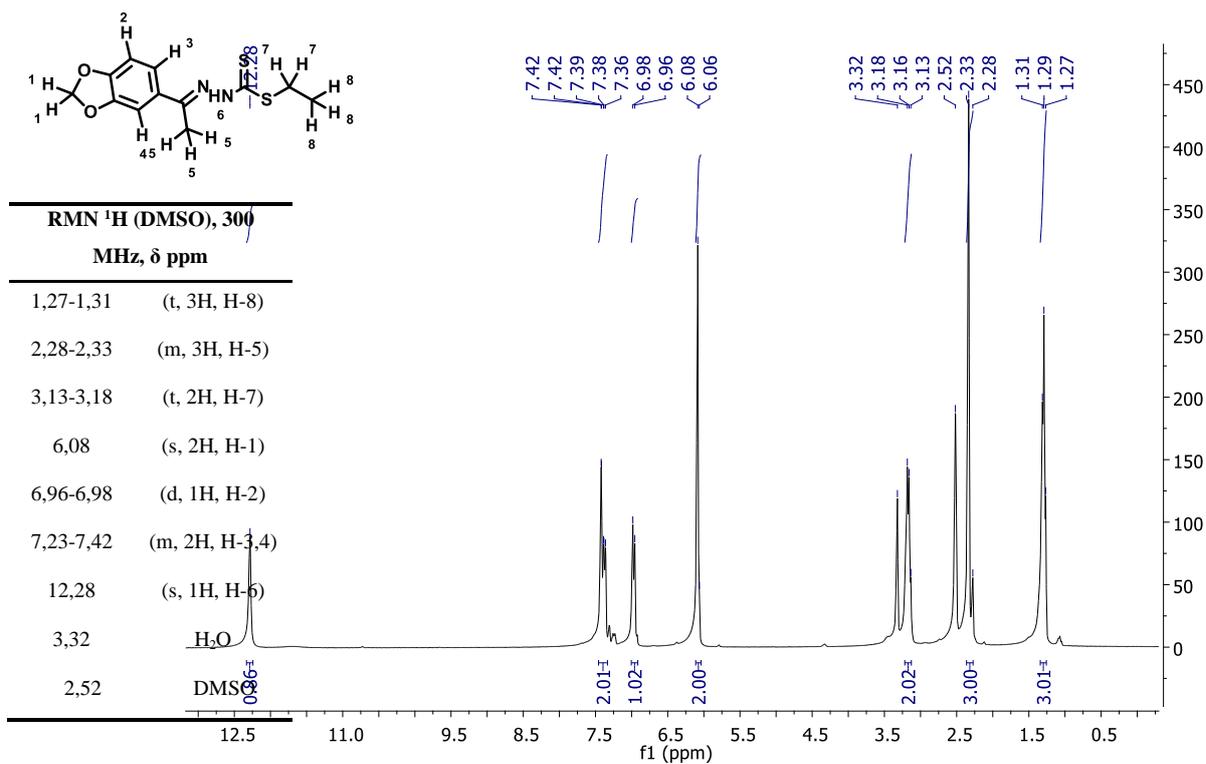
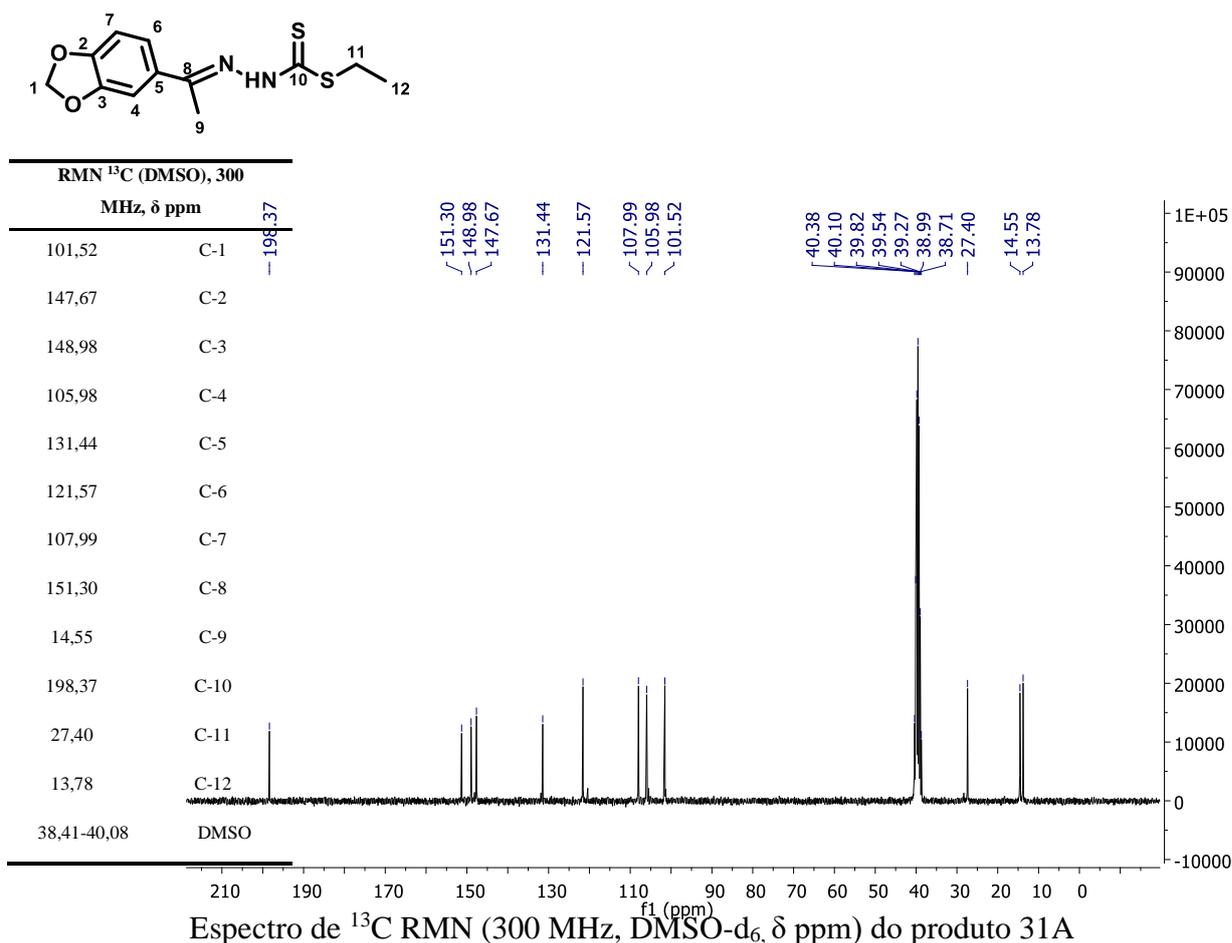
## Anexo B: Produtos das séries A



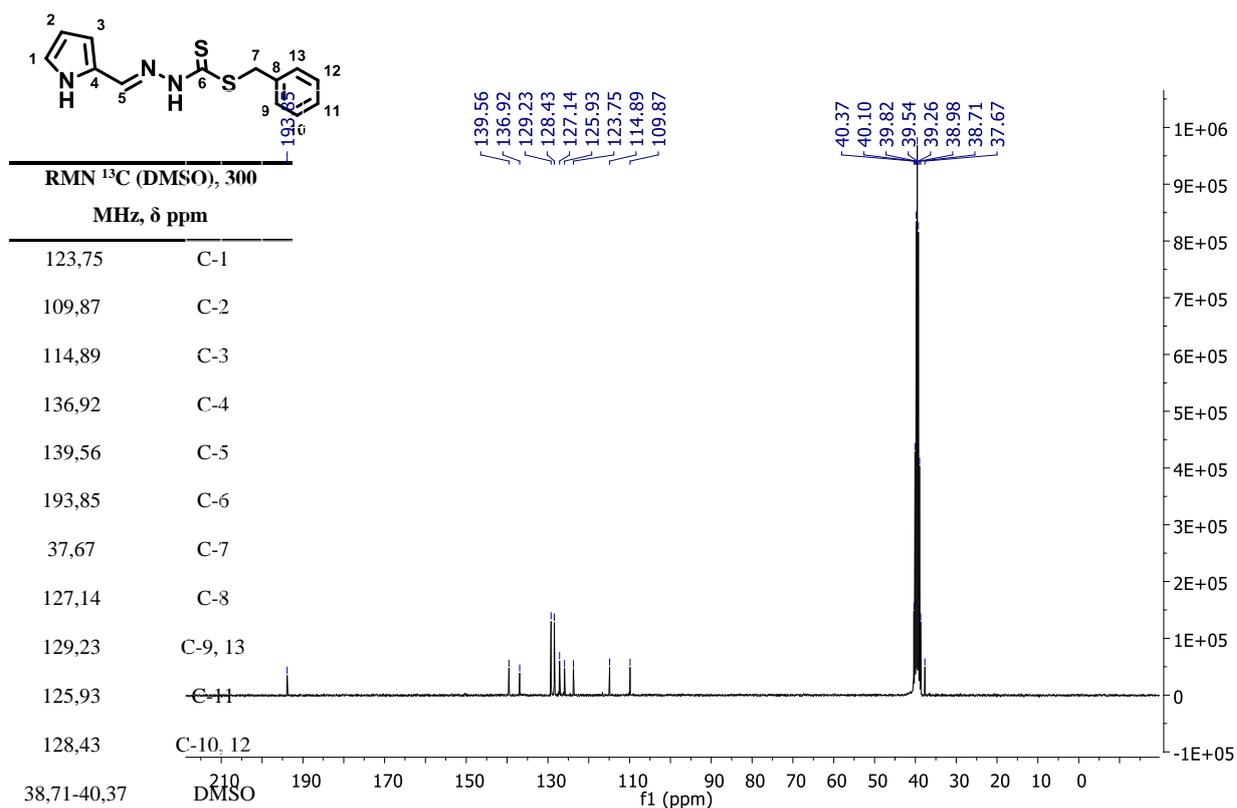
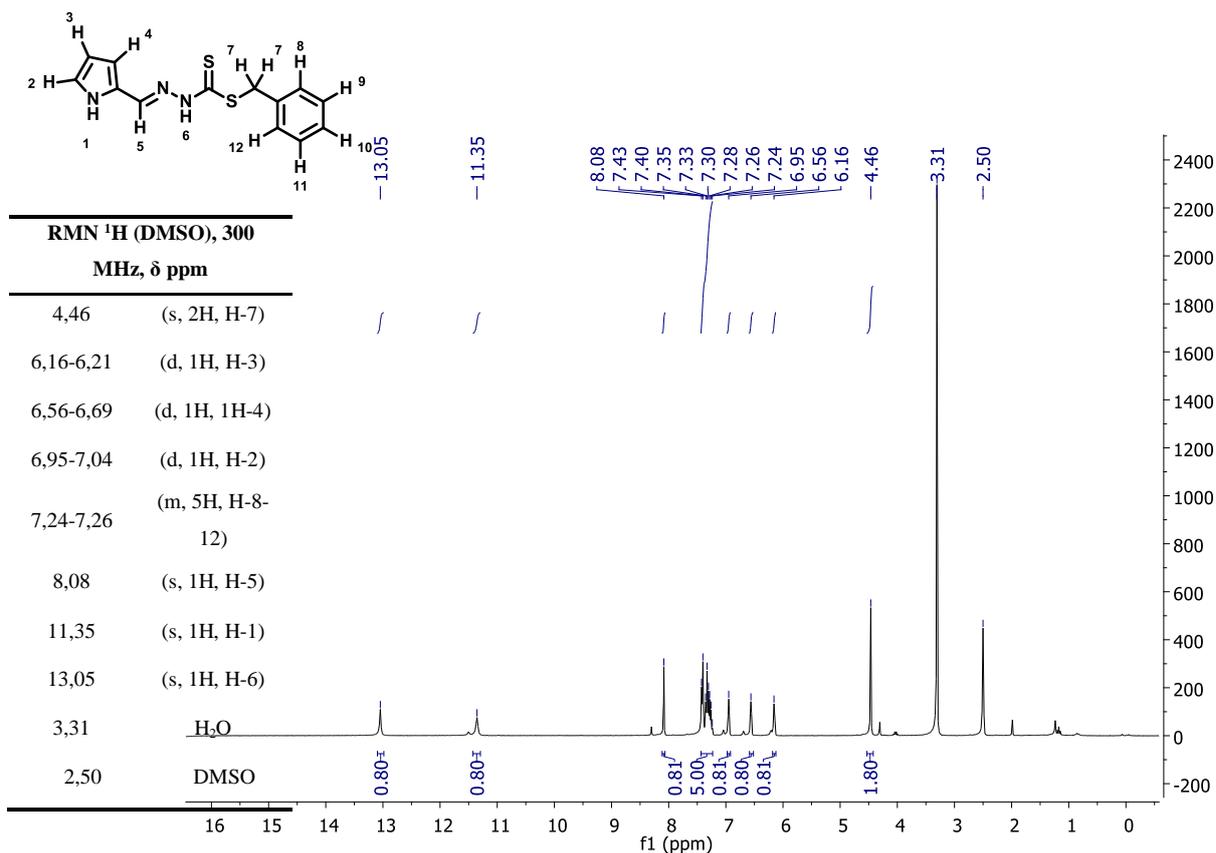
Espectro de <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) do produto 8A (também é intermediário do produto 3C).

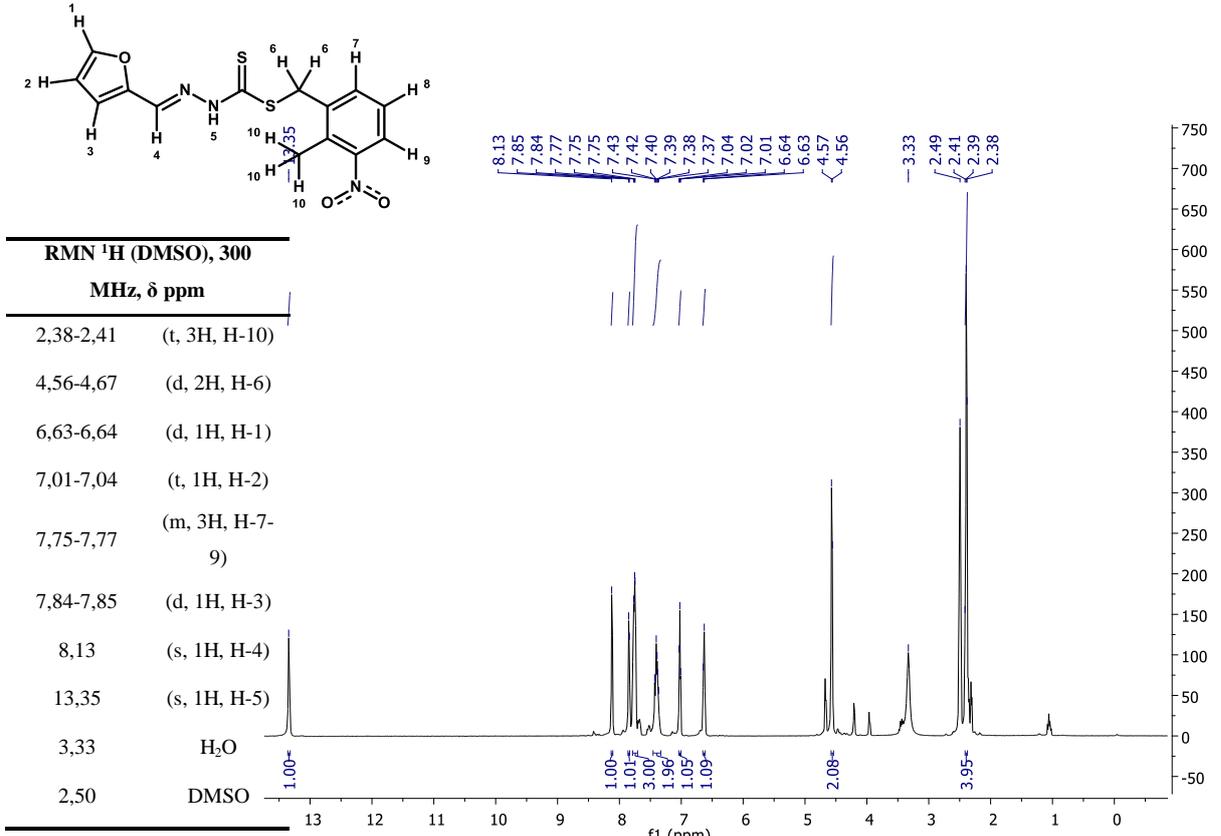


Espectro de <sup>13</sup>C RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) do produto 8A (também é intermediário do produto 3C).

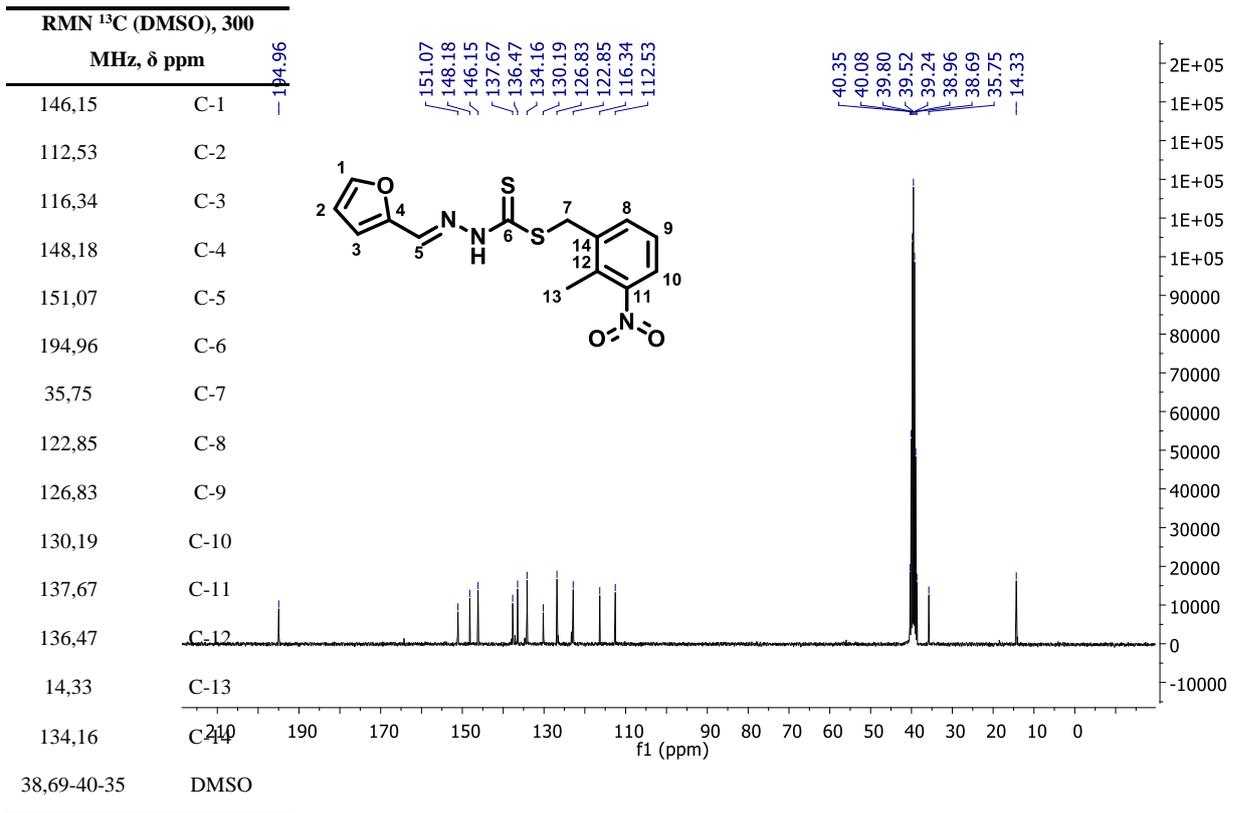
Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) do produto 31AEspectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) do produto 31A

## Anexo C: Produtos da série B

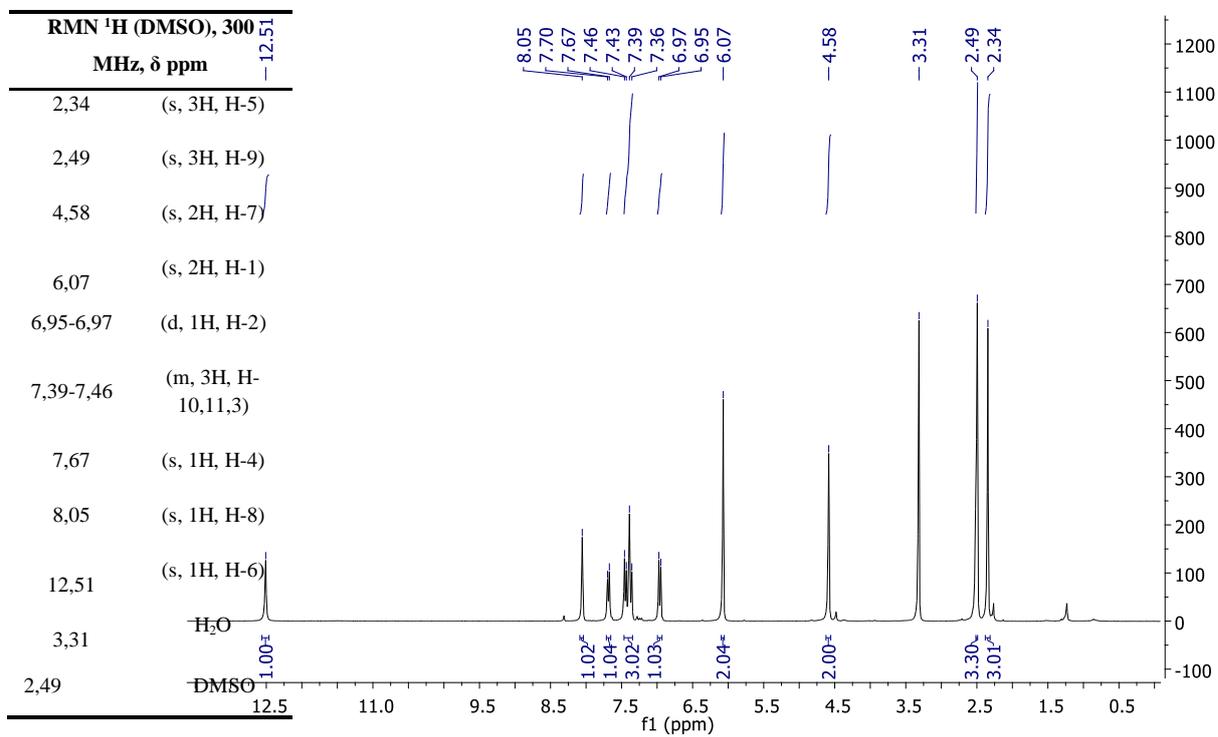
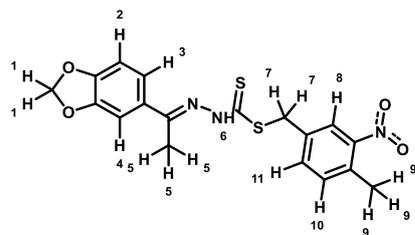




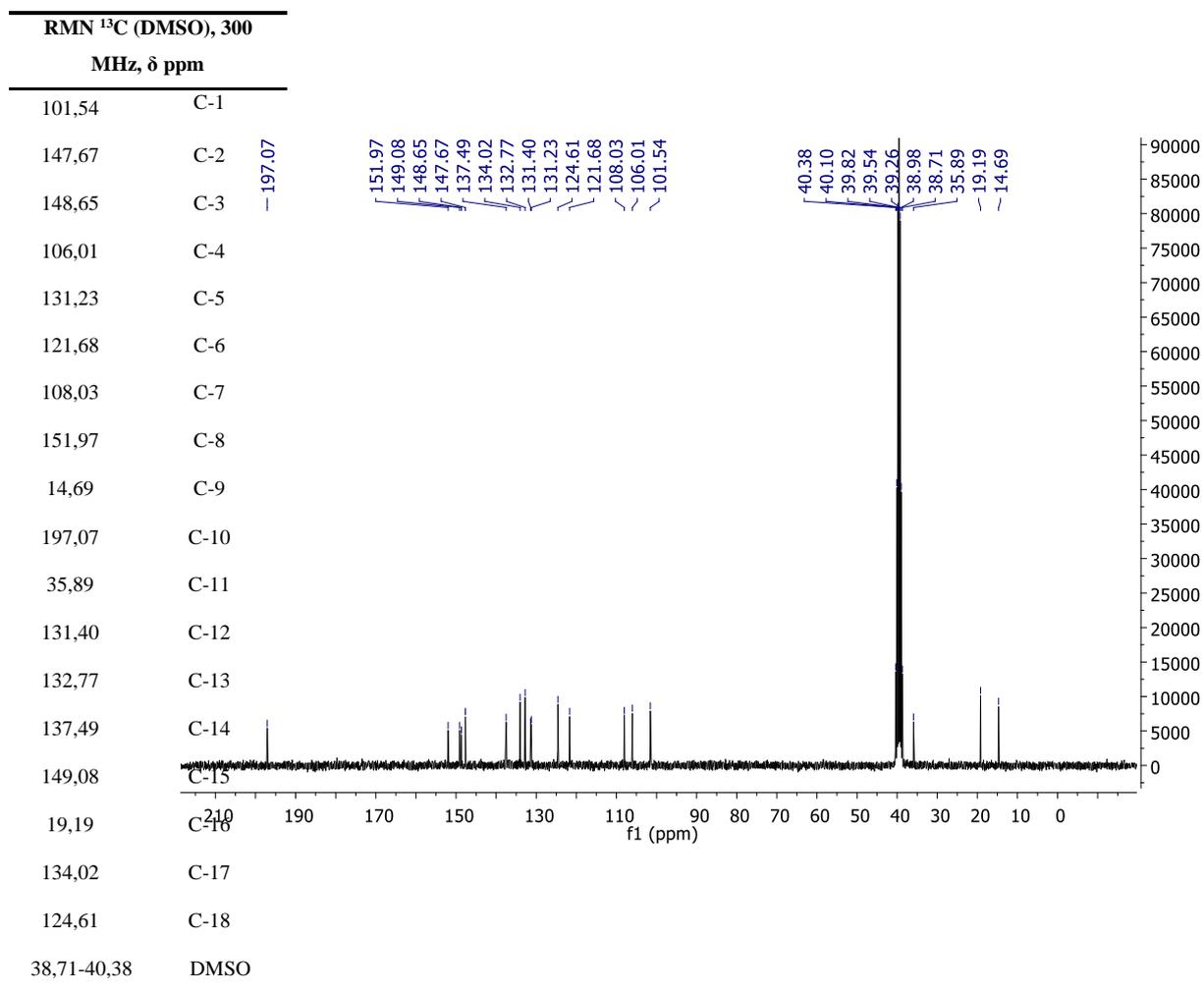
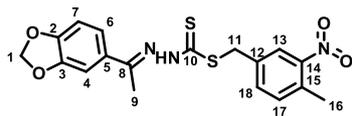
Espectro de <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) do produto 15B.



Espectro de <sup>13</sup>C RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) do produto 15B

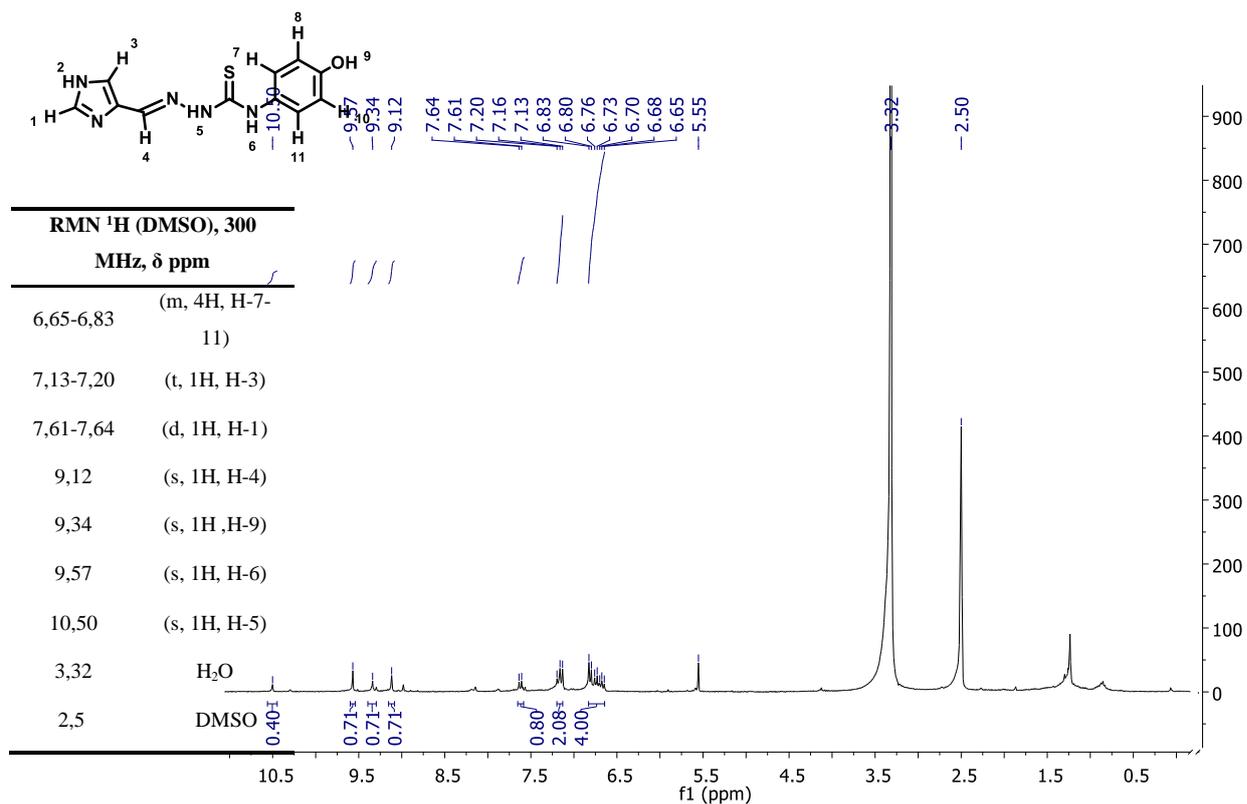
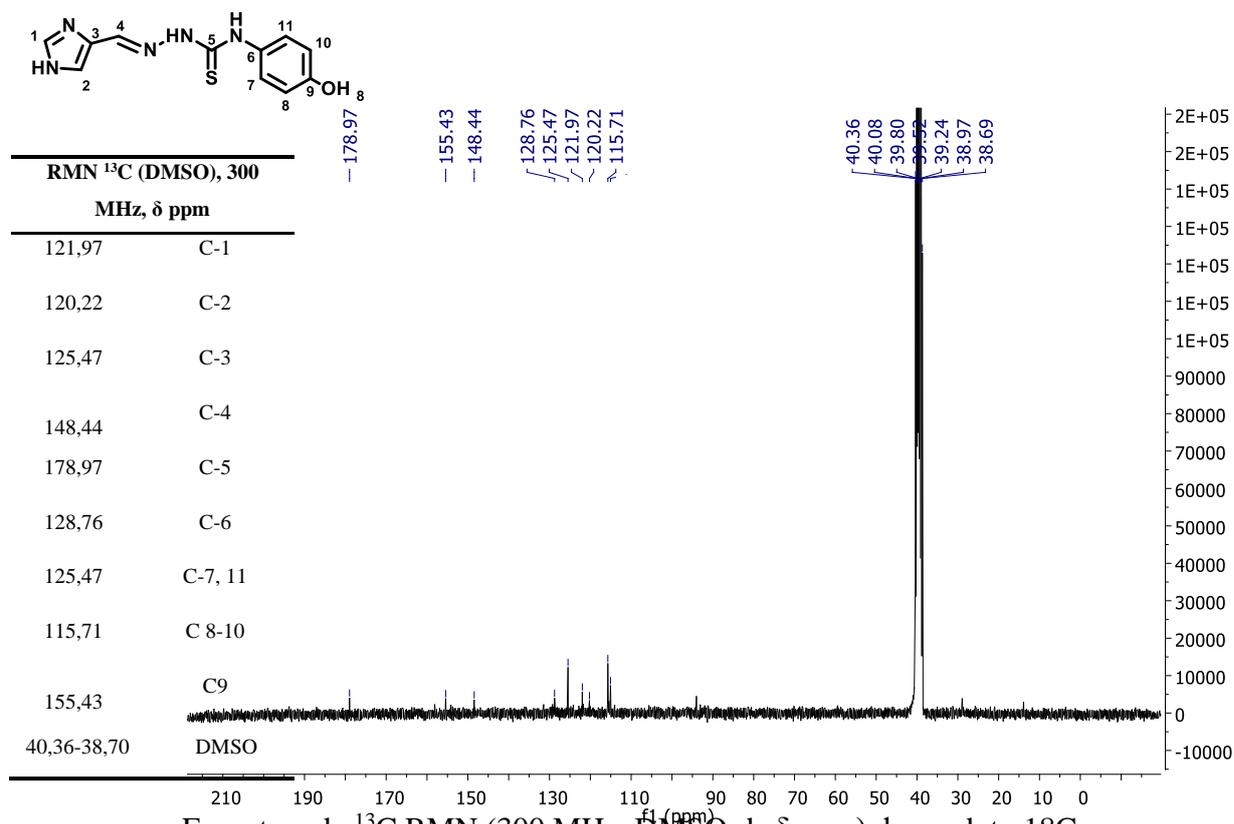


Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) do produto 66B.

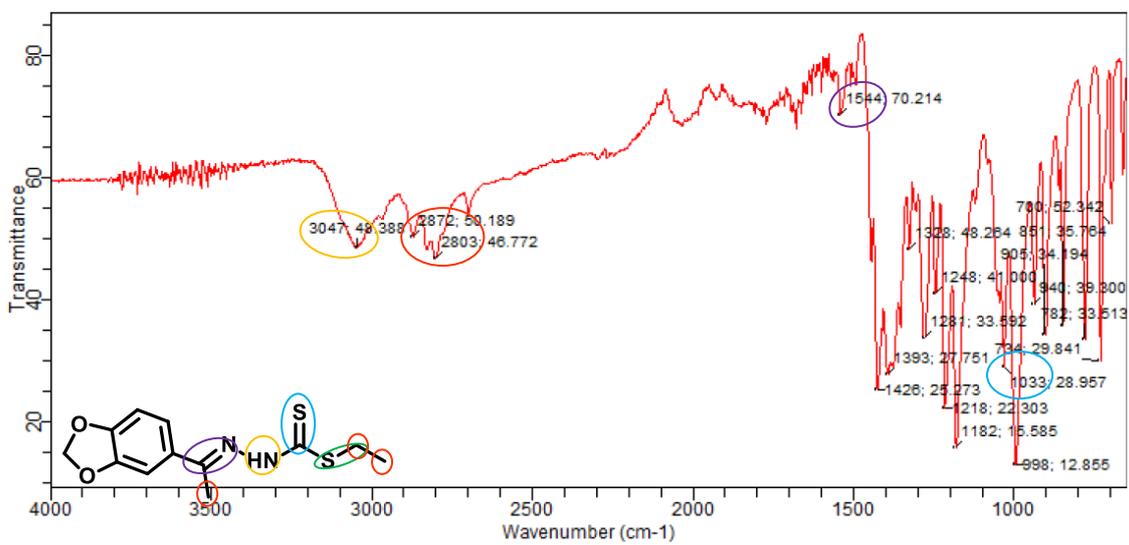
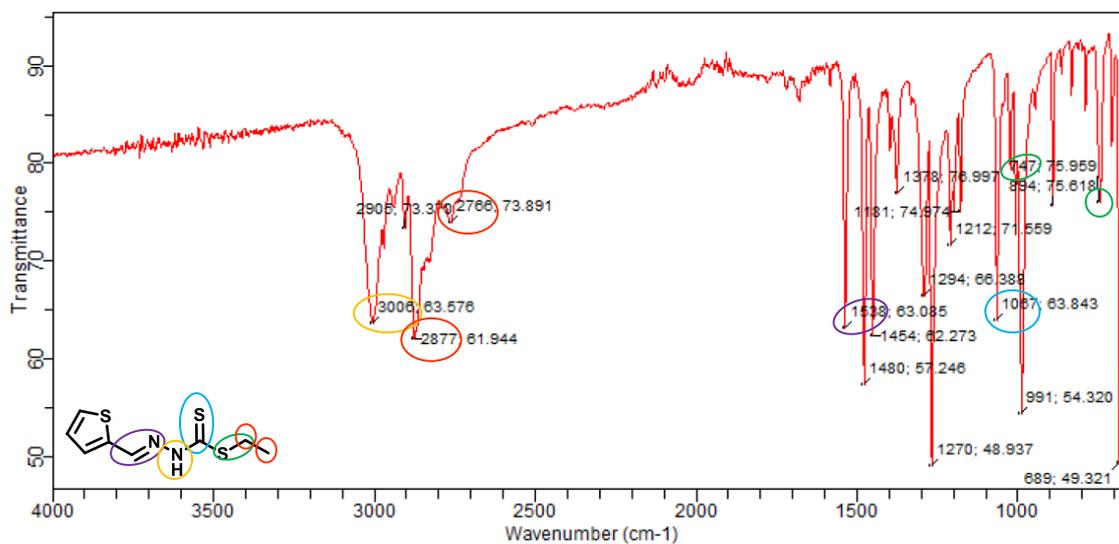


Espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) do produto 66B.

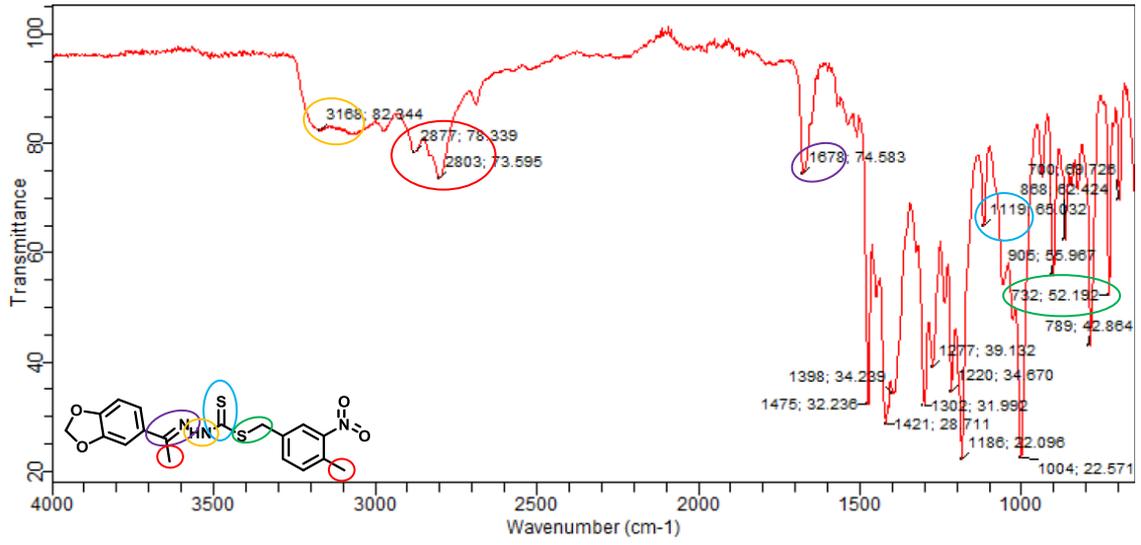
## Anexo D: Produtos da série C

Espectros de <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) do produto 18C.Espectros de <sup>13</sup>C RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) do produto 18C.

## Anexo E: Espectro de infravermelho dos produtos finais das séries A e B







Espectros de infravermelho do produto 66B.