UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DAVID BACELAR COSTA JÚNIOR

PLANEJAMENTO E AVALIAÇÃO DE NOVOS COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTIMALÁRICA

Feira de Santana, BA

2024

DAVID BACELAR COSTA JÚNIOR

PLANEJAMENTO E AVALIAÇÃO DE NOVOS COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTIMALÁRICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Franco Henrique Andrade Leite

Coorientador: Fernando de Pilla Varotti

Feira de Santana, BA

2024

DAVID BACELAR COSTA JÚNIOR

“Planejamento e avaliação de novos compostos com atividade antimalárica”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, área de concentração em Biotecnologia com ênfase em Recursos Naturais da Região Nordeste, como requisito para obtenção do grau de doutor, tendo sido aprovada pelos membros signatários abaixo.

Feira de Santana, Bahia, 15 de maio de 2024.

Orientadora: Prof. Dr. **Franco Henrique Andrade Leite**
Universidade Estadual de Feira de Santana

Membro: Profª. Dra. **Jaqueline França Costa**
Universidade Federal da Bahia

Membro: Prof. Dr. **Diogo Rodrigo Magalhães Moreira**
Fundação Oswaldo Cruz - BA

Membro: Prof. Dr. **Samuel Silva da Rocha Pita**
Universidade Federal da Bahia

Membro: Prof. Dr. **André Lacerda Braga Teles**
Universidade do Estado da Bahia

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

Costa Júnior, David Bacelar
C873p Planejamento e avaliação de novos compostos com atividade antimalárica. / David Bacelar Costa Júnior, 2024.
102 f.; il.

.

Orientador: Franco Henrique Andrade Leite
Coorientadora: Fernando de Pilla Varotti
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Feira de Santana, 2024.

1.Acoplamento molecular. 2.Enoil-ACP reductase. 3.Modelo farmacofórico. 4.Triagem virtual. 5.*Plasmodium falciparum*. I.Leite, Franco Henrique Andrade, Orient. II. Varotti, Fernando de Pilla, coorient. III.Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

CDU: 661.729

Maria de Fátima de Jesus Moreira - Bibliotecária - CRB-5/1120

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que tornou tudo isso possível e fez tudo dar certo;

Ao meu orientador Prof. Dr. Franco Henrique, pelo grande esforço, auxílio e por pacientemente, compartilhar seu conhecimento durante todos esses longos anos de convivência acadêmica;

A minha família: minha esposa Suzana e meus filhos Pedro Miguel e Samuel Tito pelo amor, e por serem a motivação para não desistir;

Aos meus pais e minhas irmãs pelo incentivo e pelos conselhos maravilhosos;

A Todos os colaboradores da UFSJ campus Dona Lindu, especialmente o Prof. Varotti que abriu as portas de seu laboratório;

A todos os meus amigos do Laboratório de Modelagem Molecular – LMM, especialmente o Prof. Manoelito pelo pronto auxilio nos momentos necessários;

A Pedro Lacerda pelo auxílio na parte computacional;

A banca examinadora pela gentileza em examinar este trabalho;

E ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana e por prover os recursos e infraestrutura necessária para o desenvolvimento da pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“O Senhor, pois, é aquele que vai adiante de ti”

(BÍBLIA SAGRADA, Deuteronômio 3: 8)

RESUMO

A malária é uma doença com grandes impactos em saúde pública com aproximadamente 608.000 mortes em 2022. Apesar disso, a quimioterapia antimalárica é limitada. Diante disso, torna-se emergencial o desenvolvimento de fármacos com novos mecanismos de ação através do estudo de alvos terapêuticos validados e/ou exclusivos do parasito como a Enoil-ACP redutase (ENR) e a diidroorotato desidrogenase (DHODH). Os estudos de reposicionamento de fármacos e a utilização de estratégias computacionais podem auxiliar na priorização de moléculas promissoras para os ensaios biológicos. Nesse sentido, este estudo propõe a utilização de dados experimentais e computacionais para auxiliar na priorização de moléculas presentes em base de dados de fármacos (DrugBank e Sigma-Aldrich) através de triagem virtual hierárquica (TVH – modelos farmacofóricos e acoplamento molecular) para testes fenotípicos. Inicialmente, uma série de 19 derivados tiazolidina com atividade antimalária (0,118 - 0,414 μM) foram utilizadas para construção e validação de modelos farmacofóricos. Após as etapas de TVH, ZINC61493 (Z61493) foi selecionada com base nos parâmetros de busca definidos para DHODH de *Plasmodium falciparum* (*Pf*DHODH) e encaminhada para estudos de dinâmica molecular (DM). Posteriormente, moléculas oriundas da base de dados DrugBank foram avaliadas através de protocolo definido em estudos anteriores (modelo farmacofórico para inibidores da ENR de *P. falciparum* (*Pf*ENR) e acoplamento molecular). Nos ensaios, a nitrofurantoína apresentou o melhor perfil de atividade antiplasmodial (13,92 μM). No intuito de melhorar seu perfil de permeabilidade frente as membranas biológicas do parasito, estudos de permeabilidade em modelo de bicamada lipídica através de simulações de DM foi realizado com a nitrofurantoína e seus derivados. As moléculas 14, 18, 21 e Z61493 apresentaram menores valores de energia livre que a nitrofurantoína ao cruzar a bicamada lipídica. A viabilidade de síntese das moléculas 14, 18, 21 pode ser avaliação a fim de encaminhar a ensaios fenotípicos.

Palavras-chave: Acoplamento molecular. Enoil-ACP reductase. Modelo farmacofórico. Triagem Virtual. *Plasmodium falciparum.*

ABSTRACT

Malaria continues to be a disease with major public health impacts with approximately 608,000 deaths in 2022 and limited chemotherapy. Therefore, the development of drugs with new mechanisms of action through the study of validated and/or exclusive therapeutic targets of the parasite such as Enoyl-ACP reductase (ENR) and dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) becomes an emergency. In drug development, drug repositioning studies and the use of computational strategies can help prioritize promising molecules for biological trials. In this sense, the study proposes the use of experimental and computational data to assist in the prioritization of molecules present in drug databases (DrugBank and Sigma-Aldrich) through hierarchical virtual screening (HVS – pharmacophoric models and molecular docking) for phenotypic tests. Initially, a series of 19 thiazolidine derivatives with antimalarial activity (0.118 - 0.414 μM) were used to construct and validate pharmacophore models. After the TVH steps, ZINC61493 (Z61493) was selected based on the search parameters defined for DHODH of *Plasmodium falciparum* (*Pf*DHODH) and sent for molecular dynamics (MD) studies. Subsequently, molecules from the DrugBank database were evaluated using a protocol defined in previous studies (pharmacophore model for ENR of *P. falciparum* inhibitors (*Pf*ENR) and molecular docking). In the tests, nitrofurantoin showed the best antiplasmodial activity profile (13.92 μM). In order to improve its permeability profile against the parasite's biological membranes, permeability studies in a lipid bilayer model through MD simulations were carried out with nitrofurantoin and its derivatives. Molecules 14, 18, 21 and Z61493 showed lower free energy values than nitrofurantoin when crossing the lipid bilayer. The feasibility of synthesizing molecules 14, 18, 21 can be evaluated in order to forward them to phenotypic tests.

Keywords: Enoyl-ACP reductase. Molecular docking. Virtual Screening. Pharmacophore model. *Plasmodium falciparum*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Número de casos de malária confirmados em 2022. 18
Figura 2. Estrutura química de representantes quinolínicos..... 19
Figura 3. Estruturas da artemisinina e seus derivados. "R" representa o substituinte para o respectivo composto. 20
Figura 4. Estrutura tridimensional da ENR – A. Cadeia A em azul; cadeia B em verde; cadeia C em amarelo e cadeia D em cor de rosa. Interações do tipo ligações de hidrogênio entre o NAD^+ e resíduos do sítio ativo – B. Interações intermoleculares de ligação de hidrogênio entre a hidroxila do triclosan e a hidroxilia fenólica da Tyr194 e duas ligações de hidrogênio entre uma das hidroxilas da ribose da nicotinamida do NAD^+ com ambos os oxigênio éter e hidroxila do triclosan – C. Representação em bastões em cor de rosa para o NAD^+, em cinza para o triclosan e representação em *lines* para aminoácidos. Linhas tracejadas em vermelho representando as distâncias das interações em angstroms (Å). 22
Figura 5. Esquema do mecanismo de reação da ENR. A redução da ligação dupla ocorre por adição de um íon hidreto a partir do NADH ao carbono C3. O par de elétrons em C2 ataca o próton cedido pela hidroxila da tirosina**.** 23
Figura 6. Estrutura química de inibidores da ENR. 24
Fonte: ANDRADE *et al*., 2008 (Adaptado). 24
Figura 7. Via biossintética *de novo* da pirimidina em *Plasmodium*. Enzimas: glutamina amidotransferase bifuncional (GAT) e carbamoil-fosfato sintetase (CPS), aspartato carbamoiltransferase (ACT), diidroorotase (DHOtase), diidroorotato desidrogenase (DHODH). Produto e substratos das enzimas: L-glutamina (L-Gln); carbamoil fosfato (CP); ácido L-aspártico (L-Asp); carbamoil aspartato (CA); diidroorotato (DHO); uridilato (UMP). Os nomes das enzimas são exibidos em azul. 25
Figura 8. Estrutura química de molécula contendo o núcleo tioxotiazolidina (X=S) ou tiazolidina-2,4-diona (X=O). 45
Figura 9. Curva ROC dos modelos farmacofóricos 3, 6 e 9. A linha de referência diagonal representa uma busca aleatória – linha sólida cinza. 48
Figura 10. Gráfico de representação dos parâmetros do GALAHAD de similaridade farmacofórica (SF), similaridade estérea (SE) e MOL_QRY dos modelos farmacofóricos 3, 6 e 9. Modelo farmacofórico 3 representado em verde e coordenadas dos melhores valores de cada parâmetros dentre os modelos farmacofóricos 3, 6 e 9 representado em azul. 49
Figura 11. Características farmacofóricas do modelo farmacofórico 3 para derivados tiazolidina com atividade biológica frente ao *P. falciparum*. As distâncias e raios estão representadas em angstrons (Å). Azul: centros hidrofóbicos (HY), verde: pontos aceitadores de ligação de H (AA) e magenta: pontos doadores de ligação de H (DA). O raio das esferas varia de acordo ao raio de tolerância calculado pelo GALAHAD™. 50
Figura 12. Características presentes no modelo farmacofórico para inibidores da PfENR. As distâncias e raios estão representadas em angstrons (Å). Azul: centros hidrofóbicos (HY), verde: pontos aceitadores de ligação de H (AA). O raio das esferas varia de acordo ao raio de tolerância calculado pelo GALAHAD™. 52
Fonte: COSTA JÚNIOR; 2021. 52
Figura 13. Estrutura química da flavina mononucleotídeo – A e 5-(4-ciano-2-metil-1H-benzimidazol-1-il)-N-ciclopropiltiofeno-2-carboxamida – C. Sobreposição entre a pose melhor pontuada obtida por acoplamento molecular e conformação cristalográfica do cofator – B e ligante – C. Representação em bastão para a conformação cristalográfica em vermelhos e; para pose gerada no reacoplamento em amarelo. 54
Figura 14. Curva ROC obtida para a função de pontuação do programa AutoDockVina 1.1.2. para avaliação no sítio de ligação do inibidor da *Pf*DHODH. A linha de referência diagonal representa uma busca aleatória – linha sólida cinza. 55
Figura 15. Distribuição do conjunto de moléculas filtradas pelo modelo farmacofórico de derivados tiazolidinas oriundas da base de dados Sigma-Aldrich por valor de energia de afinidade frente o sítio de ligação do cofator – A e inibidor – B. 56
Figura 16. Z61493. Estrutura 2D – A. Sobreposição ao modelo farmacofórico de derivados tiazolidinas. 57

Figura 17. Interações intermoleculares realizadas entre a molécula Z61493 e alguns aminoácidos do sítio de ligação do cofator da *Pf*DHODH. Resíduos e ligante representados em bastões. Interações do tipo ligação de hidrogênio representado por linha sólida azul. Interações hidrofóbicas representadas por linha cinza tracejada. Átomos de nitrogênio representados em azul. Átomos de oxigênio representados em vermelho. Átomos de enxofre representados em amarelo. Átomos de carbono pertencentes a resíduos do sítio ativo representados em ciano. Átomos de carbono dos resíduos representados em rosa. Átomos de carbono dos ligantes representados em verde..... 58
Figura 18. Interações intermoleculares realizadas entre a molécula Z61493 e alguns aminoácidos do sítio de ligação do inibidor. As interações intermoleculares estão representadas como descrito no título da Figura 17..... 59
Figura 19. Etapas de avaliação do programa AutoDock Vina 1.1.2 (Vina). Estrutura química do ligante 4-(2,4-diclorofenol)-3-hidroxibenzaldeído – A. Sobreposição entre a pose mais bem pontuada obtida pelo acoplamento molecular com o programa Autodock Vina 1.1.2 e o ligante – B. Curva ROC obtida para a função de pontuação do programa AutoDockVina – C. 60
Figura 20. Distribuição das moléculas da base de dados DrugBank por valor de energia de afinidade. 60
Figura 21. Estrutura química das moléculas selecionadas com base nos criétios de EA, EL e *c*logP. 61
Figura 22. Interações intermoleculares realizadas entre a nitrofurantoína e alguns aminoácidos do sítio ativo da *Pf*ENR. As interações intermoleculares estão representadas como descrito no título da Figura 17..... 62
Figura 23. Interações intermoleculares realizadas entre a hidroclorotiazida e alguns aminoácidos do sítio ativo da PfENR. As interações intermoleculares estão representadas como descrito no título da Figura 17. 62
Figura 24. Interações intermoleculares realizadas entre a acetazolamida e alguns aminoácidos do sítio ativo da *Pf*ENR. As interações intermoleculares estão representadas como descrito no título da Figura 17..... 63
Figura 25. Interações intermoleculares realizadas entre o metocarbamol e alguns aminoácidos do sítio ativo da *Pf*ENR. As interações intermoleculares estão representadas como descrito no título da Figura 17..... 64
Figura 26. Interações intermoleculares realizadas entre o dexpanthenol e alguns aminoácidos do sítio ativo da *Pf*ENR. As interações intermoleculares estão representadas como descrito no título da Figura 17..... 64
Figura 27. Gráfico de RMSD da cadeia principal da DHODH. 66
Figura 28. Gráficos de RMSF da cadeia principal dos aminoácidos da *Pf*DHODH. Marcações no eixo horizontal em verde para resíduos que interagem com o inibidor e em preto para resíduos que interagem com cofator..... 67
Figura 29. Interações intermoleculares realizadas entre a Z61493 e alguns aminoácidos do sítio de ligação do cofator da estrutura representativa da *Pf*DHODH. As interações intermoleculares estão representadas como descrito no título da Figura 17. 68
Figura 30. Interações intermoleculares realizadas entre a Z61493 e alguns aminoácidos do sítio de ligação do inibidor da estrutura representativa da *Pf*DHODH. As interações intermoleculares estão representadas como descrito no título da Figura 17. 69
Figura 31. Gráfico de RMSD. 71
Figura 32. Gráficos de RMSF da cadeia principal dos aminoácidos da *Pf*ENR. APO – A. APO+NADH – B. APO+NADH+dexpantenol – C. APO+NADH+ metocarbamol – D. APO+NADH+ acetozolamida – E. APO+NADH+ nitrofurantoína – F. APO+NADH+ hidroclorotiazida – G. 73
Figura 33. Interações intermoleculares realizadas entre a nitrofurantoína e alguns aminoácidos do sítio de ligação do substrato da estrutura representativa da *Pf*ENR. As interações intermoleculares estão representadas como descrito no título da Figura 17. 75
Figura 34. Interações intermoleculares realizadas entre a hidroclorotiazida e alguns aminoácidos do sítio de ligação do substrato da estrutura representativa da *Pf*ENR. As interações intermoleculares estão representadas como descrito no título da Figura 17. 75
Figura 35. Interações intermoleculares realizadas entre a acetozolamida e alguns aminoácidos do sítio de ligação do substrato da estrutura representativa da *Pf*ENR. As interações intermoleculares estão representadas como descrito no título da Figura 17. 76

Figura 36. Interações intermoleculares realizadas entre a metocarbamol e alguns aminoácidos do sítio de ligação do substrato da estrutura representativa da *Pf*ENR. As interações intermoleculares estão representadas como descrito no título da Figura 17. 76
Figura 37. Interações intermoleculares realizadas entre a dexpantenol e alguns aminoácidos do sítio de ligação do substrato da estrutura representativa da *Pf*ENR. As interações intermoleculares estão representadas como descrito no título da Figura 17. 77
Figura 38. Gráfico de representação do percentual de formação de interações do tipo ligação de hidrogênio entre a nitrofurantoína, acetozolaminda, Dexpantenol, Hidroclorotiazida e metocarbamol e resíduos do sítio ativo da *Pf*ENR durante a simulação de DM. 77
Figura 39. Representação esquemática de eritrócito infectado com *Plasmodium*. Eritrócito (Er); vacúolo parasitóforo (VP); membrana plasmática do parasito (MP); núcleo (Nu); retículo endoplasmático (RE); vacúolo alimentar (VA); mitocôndria (Mt) e apicoplasto (AP). 80
Figura 40. Gráfico de relação entre *c*logP e EA. Moléculas selecionadas com representantes em vermelho. 81
Figura 41. Estrutura 2D das moléculas selecionadas com base na relação *c*logP e energia de afinidade. 81
Figura 42. Pose geradas pelo acoplamento molecular no sítio ativo do *Pf*ENR. Molécula 18 – A; nitrofurantoína B. Moléculas representadas em bastão. Átomos de nitrogênio representados em azul. Átomos de oxigênio representados em vermelho. Átomos de carbono pertencentes a resíduos do sítio ativo representados em verde. Os átomos de carbono da molécula 18 são mostrados em cinza e da nitrofurantoína, em rosa. Superfície de Van der Waals representada na cor do respectivo átomo. 82
Figura 43. Representação esquemática do conjunto de quatro membranas pertencentes ao apicoplasto. Proteínas transmembranas – PT. 82
Figura 44. Gráfico da variação da área por lipídio durante a trajetória. 83
Figura 45. Gráfico de representação da densidade parcial dos componentes da bicamada lipídica. ... 84
Figura 46. Gráfico de energia livre das moléculas 14, 18, 21, 22 e nitrofurantoína através da bicamada ao longo do eixo z. 85
Figura 47. Gráfico de energia livre de Z61493 através da bicamada ao longo do eixo z. 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Moléculas do conjunto de treinamento.....32
Tabela 2. Moléculas do conjunto teste.....33
Tabela 3. Parâmetros estatísticos dos modelos farmacofóricos de derivados tiazolidinas com atividade frente ao *Plasmodium falciparum*. 46
Tabela. 4. Distância euclidiana entre um modelo farmacofórico hipotético e os modelos 3, 6 e 9.....49
Tabela 5. Valores QFIT para moléculas despositadas no DrugBank.....51
Tabela 6. Critérios para seleção de moléculas por triagem virtual. 57
Tabela 7. Moléculas selecionadas com base nos critérios de EA, EL. 61
Tabela 8. Número de agrupamento, valor de corte de RMSD e percentual dos maiores grupos de conformações da *Pf*ENR. 68
Tabela 9. Percentual de formação de interações do tipo ligação entre a molécula Z61493 e sítio de ligação do cofator da *Pf*DHODH durante a simulação de DM. 69
Tabela 10. Percentual de formação de interações do tipo ligação entre a molécula Z61493 e sítio de ligação do inibidor da *Pf*DHODH durante a simulação de DM. 70
Tabela 11. Energia livre de ligação e seus componentes entre a molécula Z61493 e o sítio de ligação do cofator e ligante da *Pf*DHODH calculados através do g_mmpbsa. 70
Tabela 12. Número de agrupamento, valor de corte de RMSD e percentual dos maiores grupos de conformações da *Pf*ENR. 74
Tabela 13. Energia livre e seus componentes calculados através do g_mmpbsa. 78
Tabela 14. Valores de EC_{50} em cepa W2 (cloroquina-resistente) e citotóxicidade em WI-26VA4 (fibroblasto pulmonar ATCC CCL-75) e índice de seletividade (IS). 79
Tabela 15. Energia livre de ligação média. 85

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Esquema simplificado da redução do trans-2 enoil para acil-ACP. 23
Esquema 2. Esquema simplificado da oxidação de diidroorotato a orotato e posterior reoxidação do cofator $FMNH_2$ a FMN com a utilização do segundo substrato ubiquinona (agente oxidante)..... 26
Esquema 3. Fluxograma das etapas avaliação *in silico*..... **Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D – Tridimensional
2D -Bidimensional
ACPYPE – AnteChamber PYthon Parser interfacE
ACT – *Artemisinin based Combination Therapy*
ADME-Tox – Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
AG – Algoritmo Genético
APL – Área por lipídio
AUC – *Areaunderthe curve*
BEDROC – *Boltzmann-enhanced discrimination of receiver operating characteristic*
CQR – Cepas cloroquina-resistentes
CURVA ROC – *Receiver Operating Characteristic*
DHODH – Diidroorotato desidrogenase
DM – Dinâmica molecular
DUD-E – *Directory of Useful Decoys Enhanced*
EA – Energia de Afinidade
EL – Eficiência de ligação
ENR – Enoil-ACP redutase
FAS I – *Type I Fatty Acid Synthases*
FAS II – *Type II Fatty Acid Synthases*
FDA – Food and Drug Administration
FMN – Flavina mononucleotídeo
GALAHAD – *Genetic Algorithm with Linear Assignment of Hypermolecular Alignment of Datasets*
GHIT – Global Health Innovative Technology
IS – Índice de Seletividade
LBVS – *Ligand Based Virtual Screening*
NAD+ – Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo
OMS – Organização Mundial da Saúde
PAMPA – parallel artificial membrane permeability assay
PDB – Protein Data Bank
*Pf*ENR – Enoil-ACP redutase de *Plasmodium falciparum*
PLIP – Protein-Ligand Interaction Profiler
QFIT – *Query Fit*
RMSD – *Root-mean-square deviation*
SBF – Soro Bovino Fetal
SBVS – *Structure Based Virtual Screening*
SE – Similaridade Estérea
SF – Similaridade Farmacóforica
TACT – *Triple Artemisinin based Combination Therapy*
TCL – Triclosan
TV – Triagem virtual
TVI – Triagem virtual inversa
VS –*Virtual Screening*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13
2. OBJETIVOS 16
2.1. OBJETIVO GERAL 16
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 16
3. REFERENCIAL TEÓRICO 17
3.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE A MALÁRIA 17
3.2. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA MALÁRIA 17
3.3. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO 19
3.4. ALVOS BIOLÓGICOS 21
3.4.1. Enoil-ACP redutase de Plasmodium falciparum 21
3.4.2. Diidroorotato desidrogenase de Plasmodium falciparum 24
3.5. ESTRATÉGIA IN SILICO PARA A SELEÇÃO DE MOLÉCULAS PROMISSORAS 26
4. METODOLOGIA 30
4.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 30
4.2. TRIAGEM VIRTUAL (TV) HIERÁRQUICA 32
4.2.1. Triagem virtual por modelo farmacofórico para moléculas com atividade frente ao P. falciparum (TVH-1) 32
4.2.2. Triagem virtual por modelo farmacofórico para inividores de PfENR (TVH-2) 35
4.2.3. Triagem virtual por acoplamento molecular (TVH-1) 35
4.2.4. Parâmentros de busca para PfENR por acoplamento molecular (TVH-2) 36
4.3. SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR 37
4.4. CÁLCULO DE ENERGIA LIVRE DE LIGAÇÃO 38
4.5. ENSAIOS BIOLÓGICOS 39
4.5.1. Cultivo das linhagens celulares humana 39
4.5.2. Ensaios de Citotoxicidade 40
4.5.3. Cultivo in vitro das fases intraeritrocitárias de P. falciparum 41
4.5.4. Determinação da parasitemia 41
4.5.5. Sincronização do cultivo de P. falciparum 41
4.5.6. Testes esquizonticidas in vitro com P. falciparum utilizando teste tradicional 42
4.5.7. Índice de Seletividade 42
4.6. MODELO PARA AVALIAÇÃO DE PERMEABILIDADE EM BICAMADA 42
4.6.1. Construção do modelo de bicamada 42
4.6.2. Cálculo de potencial de força média 43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 44
5.1. TRIAGEM VIRTUAL POR MODELOS FARMACOFÓRICOS 44
5.1.1. Geração dos modelos farmacofóricos para moléculas com atividade antimalárica (TVH-1) 44
5.1.2. Validação dos modelos farmacofóricos 47
5.1.3. Triagem virtual por modelo farmacofórico para inibidores da PfENR (TVH-2) 51
5.2. TRIAGEM VIRTUAL POR ACOPLAMENTO MOLECULAR 52
5.2.1. Triagem virtual por acoplamento molecular frente a PfDHODH (TVH-1) 52
5.2.2. Triagem virtual por acoplamento molecular frente a PfENR (TVH-2) 59
5.3. SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR 65
5.3.1. Estudos de dinâmica molecular com a PfDHODH 65
5.3.2. Estudos de dinâmica molecular com a PfENR 71
5.4. ENSAIOS BIOLÓGICOS 78
5.4.1. Testes esquizonticidas e Citotoxicidade 78
5.5. MODELO DE AVALIAÇÃO DE PERMEABILIDADE EM BICAMADA 80
6. CONCLUSÃO 88
REFERÊNCIAS 89
APÊNDICE A – ESTRUTURA 2D DE DERIVADOS DA NITROFURANTOÍNA. 99

1. INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium* spp. Dentre as espécies responsáveis pela doença no ser humano, *P. falciparum* merece destaque pois ele é a principal causadora da forma mais grave da doença, a malária cerebral, que pode levar o indivíduo a morte quando não tratado (WHO, 2023).

A malária é um dos problemas de saúde pública mais graves em todo o mundo, com 608.000 mortes e um impacto econômico de 7,8 bilhões de dólares (WHO, 2023). No ano de 2022, o número de casos de malária foi de aproximadamente 249 milhões no mundo (WHO, 2023). No Brasil, no mesmo ano foram registrados 150.337 casos, sendo que 99,5 % deles se concentram na região da Amazônia Legal (WHO, 2023; PAHO, 2017).

Apesar dos últimos avanços na terapia antimalárica, como a tafenoquina aprovada em 2018 pela Food and Drug Administration (FDA) para o *P. vivax*, o segundo causador mais comum de malária atrás de *P. falciparum*, o tratamento de pacientes com malária ainda é limitado devido aos casos de resistência e os efeitos adversos graves (ex. hepatotoxicidade e cegueira) (JAMSHIDZADEH *et al*., 2016).

No Brasil, devido aos relatos de resistência aos principais fármacos quinolínicos utilizados em monoterapia, a quimioterapia de primeira escolha para casos não complicados é feita empregando-se uma terapia combinada à base de artemisinina (do inglês, *Artemisinin based Combination Therapy* – ACT) (JELINEK, 2013; NDONG *et al*., 2015; WHO, 2023). Porém, evidências de multirresistência à combinação de fármacos contendo artemisinina (ex.: dihidroartemisinina-piperaquina) também já foram relatadas, o que levou a proposição da inserção de um terceiro fármaco à terapia ACT (do inglês, *Triple* ACT – TACT), por exemplo: arteméter-lumefantrina mais amodiaquina, combina um componente de artemisinina de ação curta com dois componentes de ação mais longa (VAN DER PLUIJM et al., 2021; WARD; FIDOCK; BRIDGFORD, 2022; WHO, 2023). Diante desse cenário, torna-se emergencial o desenvolvimento de novos fármacos com novos mecanismos de ação para o tratamento de pacientes com malária (SHIBESHI; KIFLE; ATNAFIE, 2020).

Uma maneira de alcançar tais objetivos é explorar alvos terapêuticos exclusivos do parasito, ou que pelo menos sejam suficientemente diferentes para garantir a inibição seletiva (FREARSON *et al*., 2007). Enoil-ACP redutase (E.C 1.3.1.9; ENR) é uma enzima da via biossintética de ácidos graxos do tipo II (do inglês, *Fatty Acid Synthases* II - FAS II). No sistema FAS II, a ENR merece destaque, pois ela catalisa a etapa limitante da biossíntese de ácidos graxos e regula o ciclo de alongamento de ácidos graxos (WALLER *et al*., 2003). A reação

consiste na redução estereoespecífica, NADH-dependente, de ácidos graxos α, β-insaturados ligados à proteína carregadora de acil (do inglês, *acyl carrier protein* – ACP) (HOPF et al., 2022).

Outro processo essencial é a síntese de pirimidinas, tiamina (vitamina B1) e as bases nitrogenadas timina, citosina. Existem duas maneiras de obter pirimidinas: recuperação e síntese *de novo*. Os parasitas da malária não possuem vias de recuperação de pirimidina e são completamente dependentes da síntese *de novo*. A enzima diidroorotato desidrogenase (E.C1.3.5.2; DHODH) catalisa a etapa limitante da biossíntese da pirimidina (ROSS, 2014).

A utilização de estratégias computacionais pode auxiliar na priorização de moléculas promissoras para ensaios biológicos nos estágios iniciais da descoberta de fármacos (BIELSKA *et al*., 2011). Em estudos anteriores (COSTA JÚNIOR et al., 2021), a aplicação de uma triagem virtual hierárquica (modelo farmacofórico e acoplamento molecular) foi empregada para priorização de moléculas a ensaios fenotípicos que resultou no registro de patente de atividade antimalárica da Anisodamina (BR 10 2019 004425 0). Esse é um fármaco anticolinérgico utilizado, principalmente nos casos de choque séptico na China (VARMA; YUE, 1986). O reposicionamento de fármacos consiste na descoberta de um novo uso terapêutico para fármacos existentes, o qual pode se tornar uma solução que acelera o desenvolvimento de medicamentos a custos experimentais reduzidos (PAN et al., 2022). Estudos mostram que o tempo (10 a17 anos) e custo médio (1 a 2 bilhões de dólares) para o desenvolvimento de novos fármacos podem ser reduzidos a 6 anos e 300 milhões de dólares, respectivamente (ABBRUZZESE et al. 2023; NOSENGO, 2016).

Existem diversos fármacos reposicionados no mercado como a aspirina (ácido acetilsalícilico), inicialmente comercializada como analgésico, foi reposicionada pela primeira vez como um medicamento antiagregante plaquetário (REAUME; REGAL; DORSCH, 2008). A talidomida, um antiemético que foi banida em 1962 devido à sua teratogenicidade, teve sua eficácia descrita contra o eritema nodoso hansênico (GREENSTONE, 2011).

Além do emprego de estratégias computacionais para priorizar moléculas a ensaios biológicos, as informações de atividades biológicas podem auxiliar na geração de novos dados computacionais. Em outra abordagem, uma série de derivados tiazolidinas apresentou atividade antiparasitária frente ao *P. falciparum* (COSTA JUNIOR, 2019). Essas informações podem, por exemplo, ser empregadas na geração de novo modelos farmacofóricos.

Diante do exposto, neste estudo foram estabelecidos dois protocolos de triagem virtual hierárquica (TVH) para selecionar moléculas com afinidade frente a *Pf*DHODH (TVH-1) e *Pf*ENR (TVH-2) a ensaios fenotípicos e/ou estudos de DM. Por fim, estudo de permeabilidade

em modelo de bicamada lipídica foram realizados com a melhor molécula avaliada nos ensaios biológicos e seus derivados.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Identificar moléculas com atividade antiparasitária frente ao *Plasmodium falciparum*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a atividade antiparasitária de potenciais inibidores frente a cepas de *P. falciparum* (W2) por dose única;

Determinar o valor de EC_{50} para as moléculas promissoras nos ensaios de dose única (redução de parasitemia ≥ 75% em 50µg/ml);

Avaliar a afinidade das moléculas mais potentes da série frente à estrutura 3D de oxidoredutases NAD(P)H/flavinas dependentes de *Plasmodium falciparum*;

Avaliar a estabilidade e permanência das interações intermoleculares para as duas moléculas mais potentes.

Avaliar o perfil de permeabilidade em membranas através de modelo de bicamada lipídica da molécula mais potente e seus derivados.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE A MALÁRIA

A malária é uma doença crônica infecciosa com manifestações episódicas de caráter agudo, causada por protozoários do gênero *Plasmodium* spp. (PHILLIPS et al., 2017; WHO, 2023). Dentre as espécies causadoras da doença em humanos, *P. falciparum; P. vivax; P. ovale, P. malariae* e *P. knowlesi*, a primeira é a mais virulenta (aproximadamente 95% dos casos) e a principal responsável pela forma mais severa da doença, malária cerebral (WHITE, 2008; GARCIA, 2010).

A malária manifesta-se por episódios de calafrios, seguidos de febre alta que duram de 3 a 4 horas, sendo a principal causa de febre em áreas endêmicas. Esses episódios são, em geral, acompanhados de mal-estar, náuseas, cefaleias e dores articulares. Após a crise, o paciente se recupera e retorna à sua vida habitual. No entanto, depois de um ou dois dias, o quadro calafrio/febre retorna e se repete por semanas até que o paciente, não tratado, pode melhorar espontaneamente ou morrer devido a complicações renais, pulmonares ou coma, no caso da malária cerebral. Contudo, quando o indivíduo é tratado a tempo, excepcionalmente, morrerá pelas complicações da doença (WALKER; NADJM; WHITTY, 2018; PHILLIPS et al., 2017).

O quadro de manifestações severas da malária causada pelo *P. falciparum* é influenciado pela faixa etária do paciente. A hipoglicemia severa é mais comum em crianças, enquanto, edema pulmonar agudo, lesão renal e icterícia são mais frequentes em adultos. Convulsões são associadas especificamente com a malária causada pelo *P. falciparum* e podem ser seguidas de coma (malária cerebral) (DONDORP *et al*., 2008). As complicações relacionadas à malária cerebral são associadas à adesão de eritrócitos invadidos por parasitos aos vasos sanguíneos do cérebro causando a desestabilização da barreira hematoencefálica (FREVERT; NACER, 2014; SOUZA *et al*., 2015)

3.2. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA MALÁRIA

A malária é uma doença que aflige milhões de pessoas nas zonas tropicais e subtropicais do globo (Figura 1). No ano de 2022, estima-se que o número de casos de malária foi aproximadamente 249 milhões com aproximadamente 608.000 mortes (WHO, 2023). Devido às medidas restritivas impostas durante a pandemia de COVID-19, estima-se um aumento global de 5% na taxa de incidência e 12% na mortalidade por malária em 2020 em relação a

2019, com 47.000 mortes adicionais devido às interrupções do serviço durante a pandemia COVID-19, especialmente nos países africanos (WHO, 2023; GAO et al., 2023).

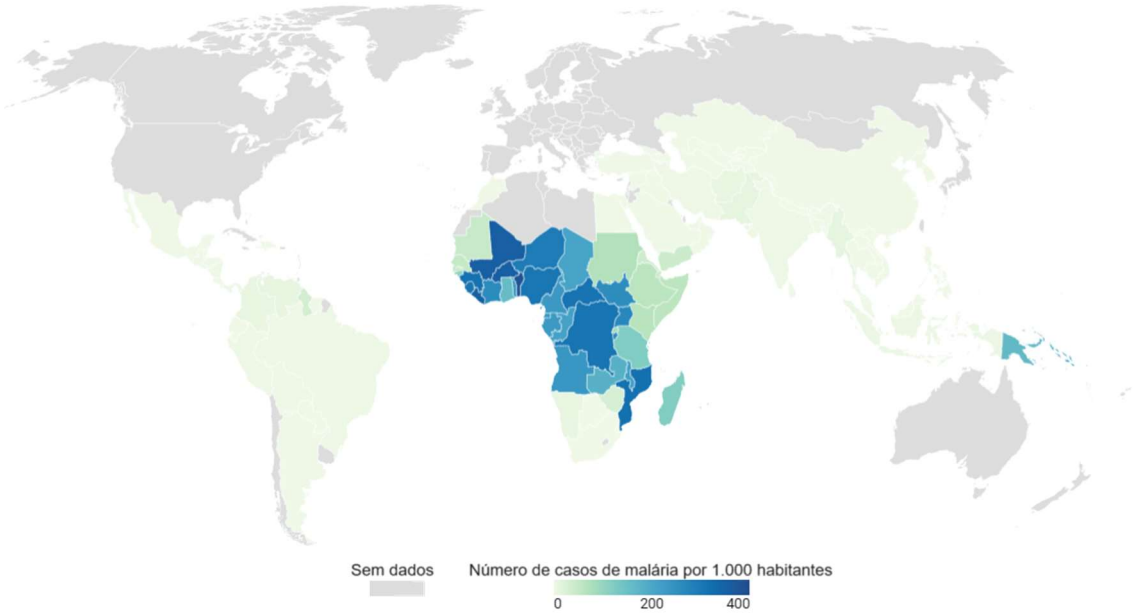


Figura 1. Número de casos de malária confirmados em 2022.
Fonte: WHO, 2023.

Apesar dos esforços no combate à doença, a malária continua a ser a principal causa de morbidade e mortalidade na África subsaariana (CHE et al., 2015). A malária é talvez a mais antiga, de maior distribuição e a mais conhecida das doenças parasitárias que afligem o homem (TALAPKO *et al*., 2019).

O Brasil é responsável por aproximadamente 22% de todos os casos de malária (DOMBROWSKI et al., 2022; WHO, 2023) nas Américas. O número de casos no país foi de aproximadamente 150.337 no ano de 2022, em que a maioria dos casos (aproximadamente 99,5%) ocorreram na Amazônia Legal que compreende sete estados (Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins e parte de Mato Grosso) em sua totalidade e parte de outros dois estados (Mato Grosso e Maranhão) (PAHO, 2017). Entretanto, a migração de pessoas da região amazônica ou de países endêmicos tem levado ao surgimento de casos em áreas onde a transmissão já fora interrompida (GARCIA et al., 2022; LORENZ *et al*., 2015). Nestes casos, atrasos e/ou erros no diagnóstico e falta de experiência dos profissionais de saúde em áreas não endêmicas contribuem para evolução da doença para a forma severa e pode explicar a maior proporção de casos de morte em regiões não endêmicas (cerca de 100 vezes maior) (LORENZ *et al*., 2015).

No Brasil, a infecção por *P. ovale* é inexistente e a infecção por *P. malarie* (1%) é muito rara. As espécies mais prevalentes são *P. vivax* (85%), responsável pela maioria dos casos de

malária, e o *P. falciparum* (25%), principal responsável pelas formas mais severas. Apesar dos impactos em termo de saúde pública, os principais fármacos utilizados na terapia antimalárica são derivados da quinina e artemisinina (NADEEM et al., 2021).

3.3. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

Alguns dos principais fármacos utilizados no tratamento de pacientes com malária pertencem ao grupo das quinolinas (4-aminoquinolinas, 8-aminoquinolinas e álcoois quinolínicos) (Figura 2). A quinina foi identificada a partir da *Cinchona* spp. (plantas naturais da região tropical da América do Sul) e tornou-se o primeiro fármaco no combate à malária e a principal terapia até a metade do século XX. No entanto, com o surgimento de cepas resistentes de *P. falciparum* e sua alta toxicidade (lesão do nervo ciático e hipoglicemia), o uso da quinina foi reduzido na Europa, América do Norte e Ásia. (FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008).

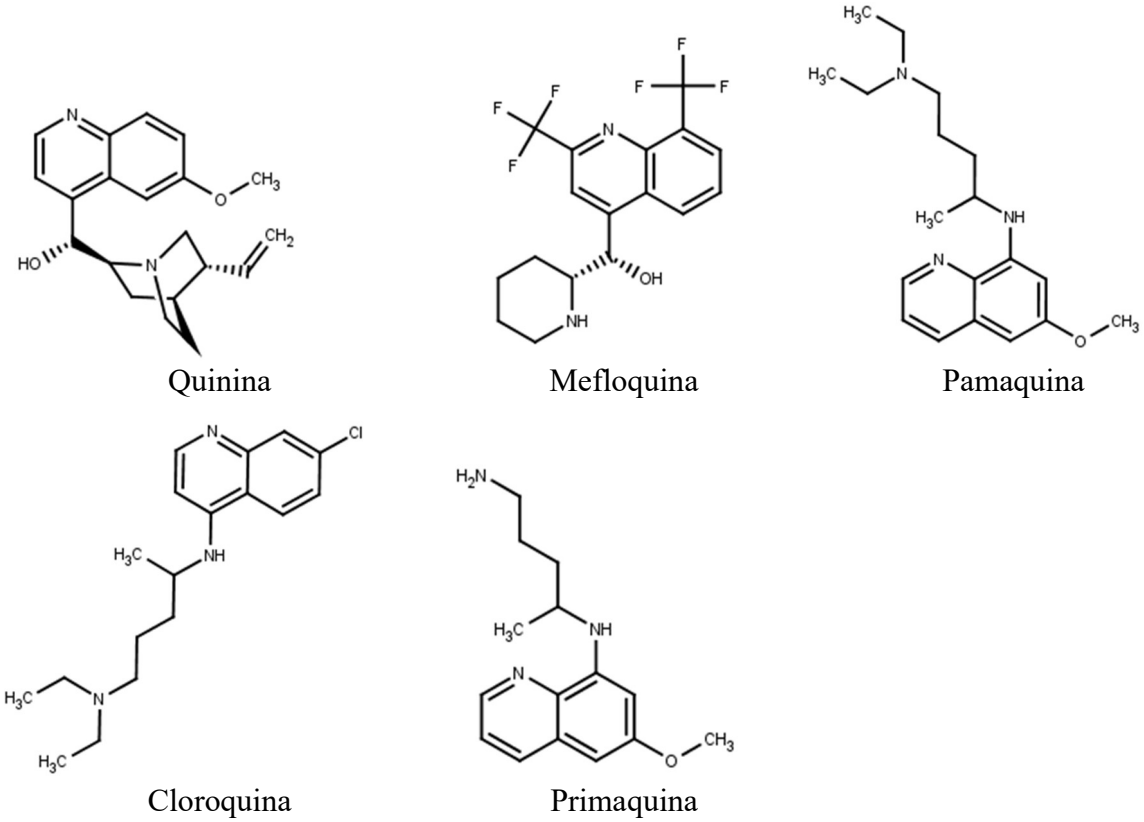


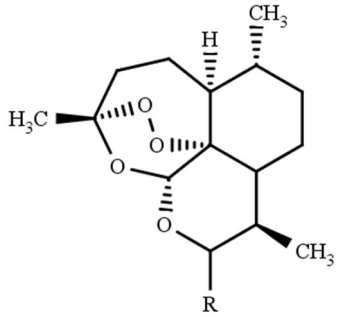
Figura 2. Estrutura química de representantes quinolínicos.
Fonte: FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008 (Adaptado).

Os fármacos quinolínicos são eficazes contra as formas eritrocitárias do parasito (quando são manifestados os sintomas da fase aguda). A quinina e mefloquina fazem parte do grupo dos álcoois quinolínicos; a cloroquina, do grupo 4-aminoquinolínicos e a pamaquina e primaquina fazem parte do grupo 8-aminoquinolinas. Essas moléculas se acumulam no vacúolo

digestivo do parasito onde impedem a cristalização do produto metabólico tóxico da hemoglobina, o heme ferriprotoporfirina IX em hemozoína (MUSHTAQUE; SHAHJAHAN, 2015).

A cloroquina foi o primeiro antimalárico produzido em larga escala e o mais eficaz entre os fármacos quinolínicos. A cloroquina foi o antimalárico mais utilizado em monoterapia e raramente produz sérios efeitos adversos na profilaxia. Entretanto, a utilização em profilaxia da cloroquina em muitos países contribuiu fortemente para o surgimento de resistência (GOEL; GERRIETS, 2023). Devido ao surgimento de cepas cloroquina-resistentes (CQR), outros derivados da quinina foram sintetizados como, por exemplo, a primaquina e a mefloquina (MUSHTAQUE; SHAHJAHAN, 2015).

A artemisinina é um fármaco oriundo da *Artemisia annua*, planta nativa da China. A artemisinina foi isolada na década de 70 e a partir dela foram sintetizados vários análogos como o artesunato de sódio, a diidroartemisinina, o arteéter e o arteméter (Figura 3). Estes compostos são esquizonticidas sanguíneos (destrói as formas assexuadas do parasita no sangue) e também possuem atividade gametocida, que limita a transmissão do parasito para o próximo hospedeiro humano, promovendo a redução da disseminação de formas resistentes (FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008).



R	Composto
=O	Artemisinina
OH	Dihidroartemisinina
OCH_3	Arteméter
OC_2H_5	Arteéter
$OCO(CH_2)_2COONa$	Artesunato de sódio

Figura 3. Estruturas da artemisinina e seus derivados. "R" representa o substituinte para o respectivo composto.
Fonte: FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008 (Adaptado).

Em áreas com a presença de CQR, as terapias baseadas na artemesinina devem ser empregadas (AGUIAR *et al*., 2012; BUTCHER, 1997). Em 2001, a OMS passou a recomendar uma terapia combinada à base de artemisinina (do inglês, *Artemisinin based Combination Therapy* – ACT) como estratégia de primeira escolha para casos não complicados de malária (quadro sintomático de febre, calafrios, mal-estar, desconforto abdominal e anemia leve). A ACT consiste na combinação de derivados da artemisinina com pelo menos um deles de modo de ação diferente (DONDORP *et al*., 2008; WHO, 2023;SIBLEY, 2014). Entretanto, a

resistência do *P. falciparum* à artemisinina foi detectada em alguns países: Camboja, República Democrática Popular do Laos, Mianmar, Tailândia e Vietnã. Em muitas áreas ao longo da fronteira do Camboja com a Tailândia, o *P. falciparum* tem se tornado resistente à maioria dos antimaláricos disponíveis (WHO, 2020). O surgimento de resistência do *Plasmodium* aos fármacos depende de múltiplos fatores como: taxa de mutação, carga parasitária total e a baixa adesão ao tratamento (PETERSEN; EASTMAN; LANZER, 2011).

Nos casos severos de malária (alterações da consciência, convulsões, acidose, hipoglicemia, insuficiência renal, icterícia, edema pulmonar, sangramento) geralmente, os pacientes são tratados, inicialmente com artesunato de sódio por via parenteral, com a mudança, posteriormente, para o esquema ACT com a adição de primaquina. Para a profilaxia em mulheres grávidas e em crianças em áreas de risco, geralmente é feito o uso intermitente da combinação sulfadoxina-pirimetamina (WHO, 2020).

3.4. ALVOS BIOLÓGICOS

3.4.1. Enoil-ACP redutase de *Plasmodium falciparum*

A maioria dos eucariotos, exceto as plantas, sintetizam os ácidos graxos pelo sistema de síntese do tipo I (FAS I – do inglês, *Type I Fatty Acid Synthases*) em que uma proteína multifuncional é responsável pelas quatro etapas do ciclo de alogamento de ácidos graxos. Diferente do hospedeiro humano, o *P. falciparum* contém a via de síntese de ácidos graxos (FAS II) semelhante à de bactérias e de plantas, em que quatro enzimas (β-cetoacil-ACP sintase, β-cetoacil-ACP redutase, β-Hidroxiacil-ACP desidratase e Enoil-ACP redutase*)* são responsáveis pelas quatro etapas do ciclo de alongamento de ácido graxo. Essa via parece ser interessante para o desenvolvimento de fármacos, sem homólogo em seres humanos, e uma conjunto de compostos já estabelecidos como inibidores das enzimas da FAS II em outros organismos (WALLER *et al*., 2003). Os ácidos graxos são necessários para a síntese de lipídeos de membrana e outros processos celulares essenciais, e a sua produção é um aspecto central do metabolismo lipídico parasito (SHEARS; BOTTÉ; MCFADDEN, 2015).

O sistema FAS II está localizado em uma organela semelhante a um plastídeo chamada de apicoplasto, relacionada ancestralmente com as cianobactéricas. O apicoplasto é uma organela essencial, e a inibição é letal. O apicoplasto é uma organela de quatro membranas, o que resulta em barreiras biológicas que os fármacos devem atravessar para alcançar seus alvos biológicos (SHEARS; BOTTÉ; MCFADDEN, 2015). A última etapa de biossíntese de ácido graxo é realizada pela Enoil-ACP redutase (ENR). Essa enzima é responsável pela etapa

determinante da via e regula o ciclo de alongamento (WALLER *et al*., 2003). Embora essa via seja dispensável em estágios sanguíneos, estudos têm demonstrado a sua essencialidade no desenvolvimento do parasito *Plasmodium* spp. no estágio hepático (YU *et al*., 2008). Nesse momento, o parasito encontra-se envolvido pelo vacúolo parasitóforo e há necessidade de um aumento da síntese de ácidos graxos para o crescimento celular (em um estágio ainda assintomático da doença) (KUO *et al*., 2003; SHEARS; BOTTÉ; MCFADDEN, 2015). Dessa forma, o bloqueio dessa via implica na interrupção do ciclo de vida do parasito ainda no estágio hepático, e consequentemente, evita que os parasitos sejam libertados na corrente sanguínea, onde invadiriam os glóbulos vermelhos para começar o ciclo de replicação responsável pelos sintomas da malária (WHITE *et al*., 2014). Portanto, essa via parece ser interessante para o desenvolvimento de fármacos para a profilaxia, assim como, para evitar a transmissão da doença para outro hospedeiro humano.

A ENR é uma enzima tetramérica formada por 41% de alfa-hélices (18 hélices; 136 resíduos) e 14% de folhas beta (9 folhas beta; 47 resíduos), NADH-dependente pertencente à superfamília desidrogenase/redutase de cadeia média (Figura 4).

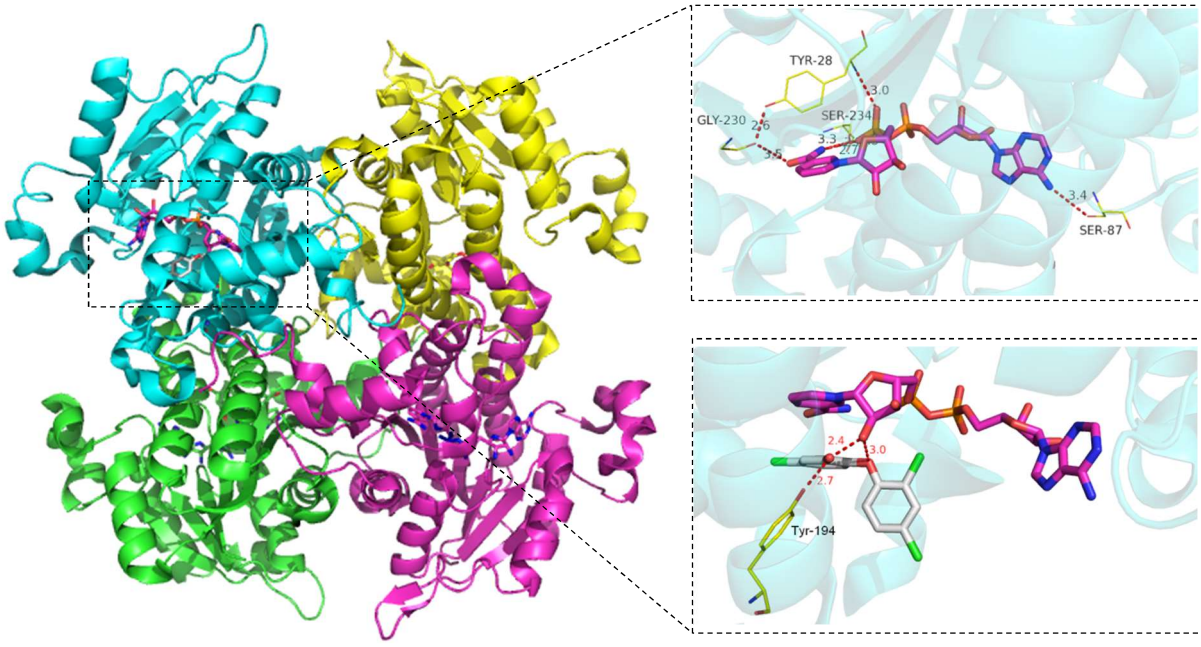
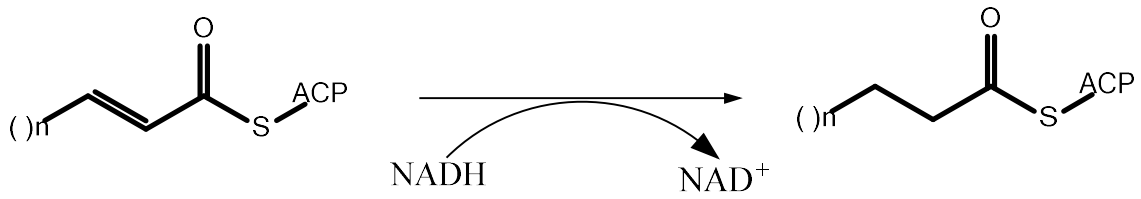


Figura 4. Estrutura tridimensional da ENR – A. Cadeia A em azul; cadeia B em verde; cadeia C em amarelo e cadeia D em cor de rosa. Interações do tipo ligações de hidrogênio entre o NAD^+ e resíduos do sítio ativo – B. Interações intermoleculares de ligação de hidrogênio entre a hidroxila do triclosan e a hidroxilia fenólica da Tyr194 e duas ligações de hidrogênio entre uma das hidroxilas da ribose da nicotinamida do NAD^+ com ambos os oxigênio éter e hidroxila do triclosan – C. Representação em bastões em cor de rosa para o NAD^+, em cinza para o triclosan e representação em *lines* para aminoácidos. Linhas tracejadas em vermelho representando as distâncias das interações em angstroms (Å).

Fonte: MUENCH *et al*. 2007 (Adaptado).

A ENR é responsável pela redução do trans-2 enoil para acil-ACP (BHAUMIK, 2005; MAITY *et al*., 2010), conforme Esquema 1.



Esquema 1. Esquema simplificado da redução do trans-2 enoil para acil-ACP.
Fonte: MASSENGO-TIASSÉ; CRONAN, 2009 (Adaptado).

A adição do hidreto oriundo do cofator NADH ao átomo C3 do substrato provoca a redução da dupla ligação trans-2-acil (C2-C3), completando assim, a síntese da cadeia acil (Figura 5) (LINDERT; MCCAMMON, 2012).

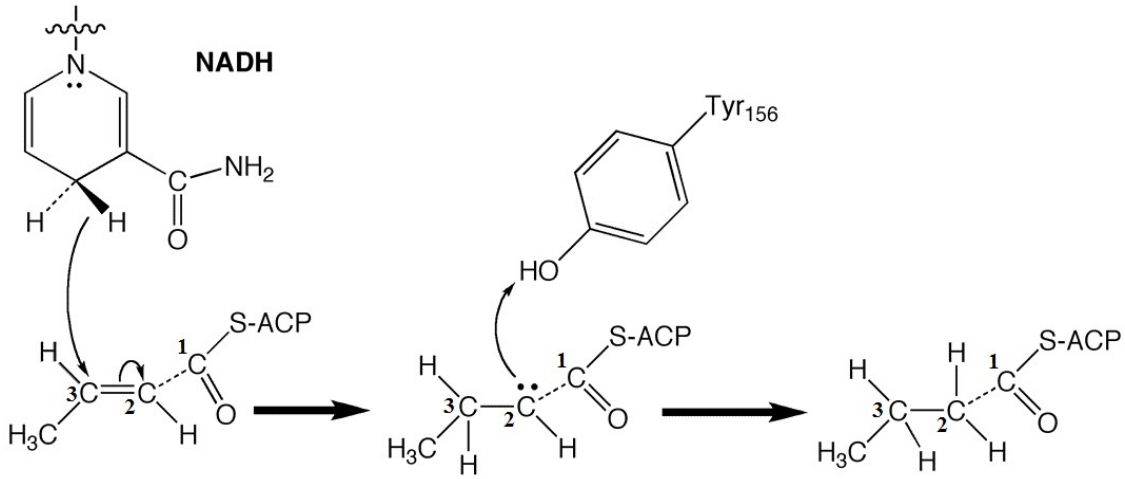
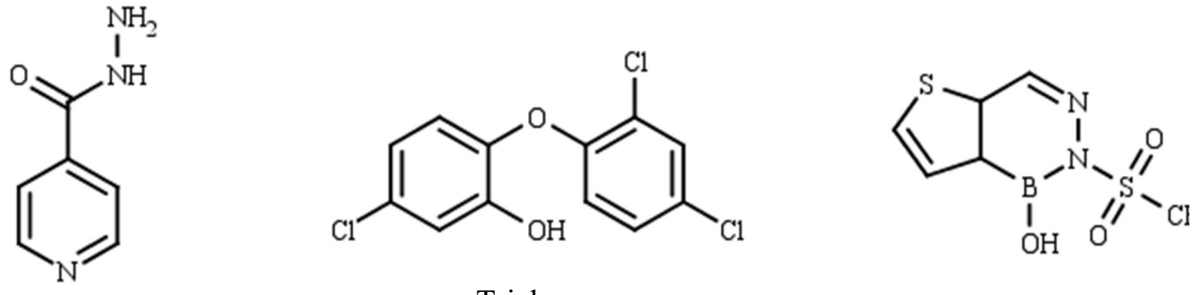


Figura 5. Esquema do mecanismo de reação da ENR. A redução da ligação dupla ocorre por adição de um íon hidreto a partir do NADH ao carbono C3. O par de elétrons em C2 ataca o próton cedido pela hidroxila da tirosina.
Fonte: MASSENGO-TIASSÉ; CRONAN, 2009 (Adaptado).

O local de ligação do substrato trans-2 enoil-ACP é o local de competição de inibidores como triclosan (TCL) e diazoborinas (Figura 6). A isoniazida (Figura 6) compete pelo sítio de ligação do cofator. O TCL é eficaz contra um largo espectro de bactérias, incluindo *Escherichia coli*, micobactérias e *Staphylococcus aureus* multirresistente, além disso, é utilizado como um agente antimicrobiano em formulações de uso doméstico, incluindo sabões e cremes dentais, sendo um composto protótipo para o desenvolvimento de novos inibidores da *Pf*ENR (WRIGHT; REYNOLDS, 2007; ANDRADE *et al*., 2008). Estudos têm demonstrado a inibição

da *Pf*ENR pelo TCL e análogos em concentrações (K_i e/ou IC_{50}) na ordem de nanomolar (nM) (MAITY *et al*., 2010; PIDUGU *et al*., 2004).



Isoniazida Triclosan Tiofeno-diazoborina

Figura 6. Estrutura química de inibidores da ENR.
Fonte: ANDRADE *et al*., 2008 (Adaptado).

O triclosan é um bisfenol clorado, que atua como inibidor específico da 2-trans-enoil-ACP do sistema FAS II. A ligação do TCL é competitiva com o NADH, mas não competitiva com NAD^+ (OLIVEIRA *et al*., 2007). De fato, a inibição requer que o NAD^+ esteja ligado (LU; TONGE, 2008). As características das ligações explicam a alta afinidade do TCL: extensos contatos de van der Waals, um anel fenol faz interações empilhamento π com o anel de nicotinamida do NAD^+ e ligações de hidrogênio que se formam entre a hidroxila fenólica do TCL e ambos o átomo de oxigênio fenólico de Tyr182 (Tyr156) e a hidroxila da nicotinamida da ribose (LINDERT; MCCAMMON, 2012; OLIVEIRA *et al*., 2007). Estudos com análogos do triclosan para o desenvolvimento de novos fármacos contra a malária tem sido feitos (BILSLAND al., 2018). Nos estágios iniciais da descoberta de fármacos, a utilização de estratégias computacionais pode auxiliar na priorização de novas moléculas promissoras para ensaios biológicos (BIELSKA *et al*., 2011).

3.4.2. Diidroorotato desidrogenase de *Plasmodium falciparum*

As pirimidinas são metabólitos essenciais na biossíntese de DNA e RNA (WANG, et al., 2021). As células adquirem pirimidinas através de duas vias: síntese *de novo* e via de recuperação. A síntese *de novo* ocorre a partir de amônia (derivada da L-glutamina), bicarbonato e L-asparagina. A via de recuperação acontece através do resgate de bases pirimidinas pré-formadas (uracila, citosina e timina) ou nucleosídeos (uridina, timidina e citidina) (CHEN et al., 2022).

Plasmodium spp. não possuem a via de recuperação de pirimidina e, portanto, a via *de novo* fornece a única fonte de pirimidinas para o crescimento celular. Em contraste, as células humanas são capazes de utilizar ambas as vias. Seis enzimas presentes em *Plasmodium* são necessárias para sintetizar o monofosfato de uridina (UMP), o qual é então usado para gerar uridina trifosfato (UTP), trifosfato de citidina (CTP), monofosfato de desoxitimidina (dTMP), e os subsequentes metabólitos adicionais desses nucleotídeos que são requeridos pela célula (CHEN et al., 2022).

Estas enzimas incluem a glutamina amidotransferase/carbamoilfosfato sintetase bifuncional (GAT/CPS), aspartato carbamoiltransferase (ACT), diidroorotase (DHOtase), diidroorotato desidrogenase ((E.C1.3.5.2; DHODH), orotato fosforibosiltransferase (OPRT) e orotidina 5'-monofosfato descarboxilase (OMPDC) (Figura 7).

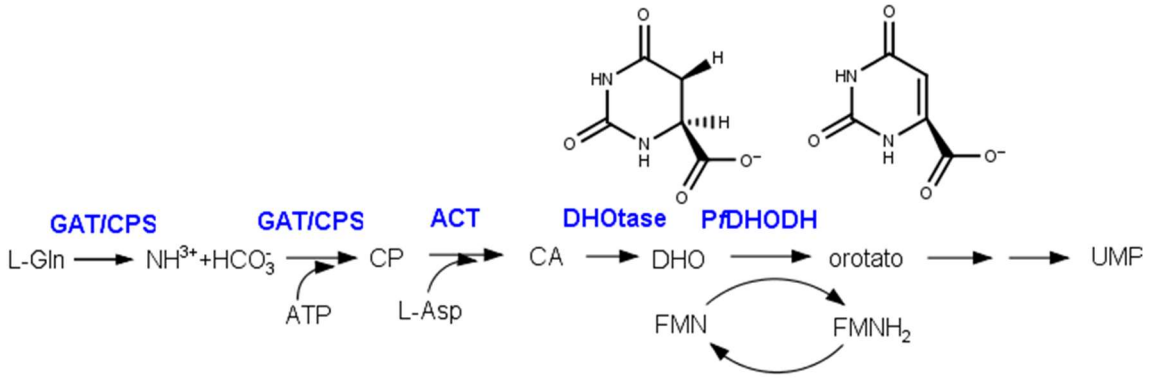


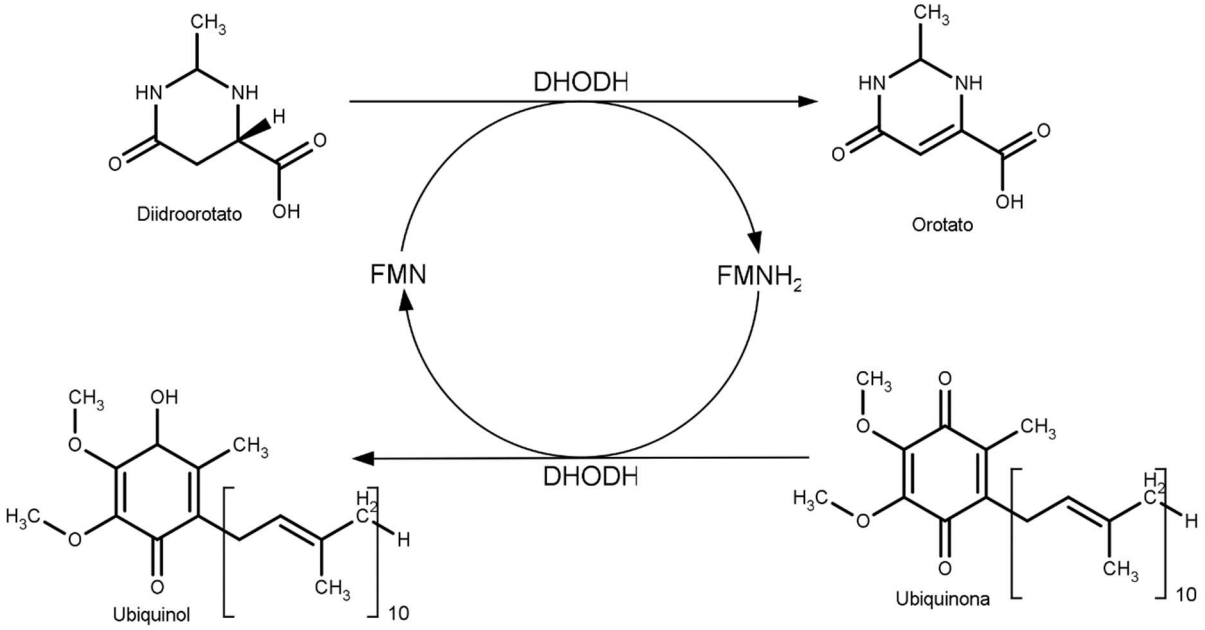
Figura 7. Via biossintética *de novo* da pirimidina em *Plasmodium*. Enzimas: glutamina amidotransferase bifuncional (GAT) e carbamoil-fosfato sintetase (CPS), aspartato carbamoiltransferase (ACT), diidroorotase (DHOtase), diidroorotato desidrogenase (DHODH). Produto e substratos das enzimas: L-glutamina (L-Gln); carbamoil fosfato (CP); ácido L-aspártico (L-Asp); carbamoil aspartato (CA); diidroorotato (DHO); uridilato (UMP). Os nomes das enzimas são exibidos em azul.

A organização das enzimas *do Plasmodium* difere de suas contrapartes em mamíferos. Em mamíferos, as quatro primeiras atividades (GAT/CPS/ACT/DHOtase) são fundidas em um único polipeptídio, assim como as duas últimas (OPRT/OMPDC). Em contraste, para as enzimas de *Plasmodium*, apenas as duas primeiras atividades estão presentes em uma única proteína (GAT/CPS) (PHILLIPS; RATHOD, 2010).

Plasmodium é o único gênero entre os apicomplexa que depende exclusivamente da biossíntese de pirimidina *de novo*. Na ausência na via de recuperação de pirimidina, todas as enzimas da via biossintética *de novo* são presumivelmente essenciais para as espécies de *Plasmodium*. No entanto, para o desenvolvimento de fármacos, além de essencialidade, é fundamental que o alvo seja passível de ser modulado por micromoléculas (HOPKINS;

GROOM; 2002), como a diidroorotato desidrogenase de *Plasmodium falciparum* (*Pf*DHODH) (PHILLIPS; RATHOD, 2010).

A DHODH é responsável pela reação de oxidação de diidroorotato a ácido orótico dependente de flavina mononucleotídeo (FMN). Duas reações diferentes são necessárias para completar o ciclo catalítico: 1) oxidação do diidroorotato pela redução do FMN e, 2) reoxidação do $FMNH_2$ para regenerar a enzima ativa (PHILLIPS; RATHOD, 2010).



Esquema 2. Esquema simplificado da oxidação de diidroorotato a orotato e posterior reoxidação do cofator $FMNH_2$ a FMN com a utilização do segundo substrato ubiquinona (agente oxidante).

3.5. ESTRATÉGIA IN SILICO PARA A SELEÇÃO DE MOLÉCULAS PROMISSORAS

A triagem virtual (do inglês, *Virtual Screening* – VS) é uma ferramenta importante nas fases iniciais da descoberta de fármacos e emprega uma variedade de métodos computacionais para priorizar a seleção de moléculas candidatas a ensaios biológicos (BARINGHAUS; HESSLER, 2004; WILLETT, 2006).

As estratégias de VS compreendem, basicamente, duas abordagens principais: a triagem virtual baseada na estrutura do alvo molecular (do inglês, *Structure Based Virtual Screening* – SBVS) e a triagem virtual baseada em ligantes (do inglês, *Ligand Based Virtual Screening* – LBVS). A SBVS utiliza as informações tridimensionais (3D) do alvo (ex.: acoplamento molecular) e a LBVS utiliza as informações estruturais e físico-químicas de moléculas bioativas (ex.: similaridade química e modelos farmacofóricos) no planejamento de fármacos (MONTANARI, 2008).

As técnicas LBVS utilizam informações de moléculas com atividade biológica conhecida, que por sua vez, são utilizadas como moldes para a triagem em bases de dados de novas entidades químicas com algum nível de similaridade, compartilhando com estes moldes a mesma atividade biológica (BARINGHAUS; HESSLER, 2004). Esse princípio de similaridade indica que moléculas que são estruturalmente semelhantes deverão apresentar propriedades biológicas semelhantes (WILLETT, 2006; ECKERT; BAJORATH, 2007).

Para quantificar a similaridade entre uma molécula referência e uma molécula problema, é necessária uma forma de representação molecular. A forma mais comumente usada é através de características moleculares específicas (*fingerprints*) derivado de moléculas ativas e comparado com os correspondentes descritores, utilizando índices de similaridade, como Índice de Tanimoto (IT). O IT pode variar entre 0 e 1, o qual corresponde ao grau de identidade entre as moléculas (RODRIGUES *et al*., 2012). Desse modo, um banco de moléculas pode ser organizado em ordem decrescente/crescente de similaridade para testes futuros.

Apesar da abordagem por similaridade química ser rápida comparada a triagem virtual por modelo farmacofórico e por acoplamento molecular, a mesma não consegue identificar quimiotipos diferentes. Assim, outro método largamente utilizado é a triagem virtual baseada no modelo farmacofórico. Segundo a IUPAC, farmacóforo é um conjunto de características estéreas e eletrônicas que é necessário para garantir as interações supramoleculares ideais com um alvo biológico específico (GANELLIN; LINDBERG; MITSCHER, 1998) e, portanto essenciais à atividade biológica. Para ser útil, um modelo farmacofórico deve demonstrar poder preditivo e ser capaz de descrever a natureza e localização dos grupos fundamentais (WOLBER *et al*., 2008; YANG, 2010).

Quando informações estruturais de conjunto de moléculas com atividade biológica conhecida que compartilham o mesmo mecanismo de ação é disponível, o desempenho dos modelos farmacofóricos depende basicamente da definição e localização das características farmacofóricas e alinhamento das moléculas. A determinação do espaço conformacional para cada molécula do conjunto que dará origem ao modelo farmacofórico (conjunto de treinamento) representa sua flexibilidade conformacional e o alinhamento dos ligantes múltiplos no conjunto de treinamento determina as características químicas essenciais para a construção do modelo farmacofórico. A seleção do conjunto de treinamento é também uma etapa crucial na construção de modelos farmacofóricos: variações como tipo das moléculas e tamanho do conjunto, podem levar a diferenças substancias nos modelos finais (YANG, 2010; WOLBER, 2008).

Devido à capacidade de identificar moléculas com características estéreo-eletrônicas essenciais, os modelos farmacofóricos representam filtros eficientes com desempenho superior

aos métodos de busca por similaridade (TIIKKAINEN *et al*., 2009) para triagem virtual de base de dados, além disso, permitem encontrar moléculas com esqueleto estrutural diferente em relação às moléculas que deram origem ao modelo farmacofórico (SEIDEL *et al*., 2010). Essa característica é interessante, levando em consideração a complexidade estrutural de compostos de origem natural, bem como, de interesse especial para as empresas farmacêuticas que querem evitar problemas de violação de patente ou necessidade de achar novos compostos líder com melhores propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADME-Tox) e/ou aumento da atividade frente ao alvo (KROVAT; LANGER, 2003). Entretanto, as informações geradas pelo modelo farmacofóricos são limitadas à descrição de características específicas, como resultado, questões de volume e estimativa de energia de afinidade frente ao alvo não são consideradas (YANG, 2010), por esse motivo técnicas baseadas no alvo como acoplamento molecular pode ser utilizada como filtro adicional.

O acoplamento molecular pode ser utilizado para ordenar as moléculas de uma base de dados com base na predição da afinidade com o local de ligação em um alvo molecular. O sucesso dessa técnica depende, em grande parte, das informações disponíveis da estrutura 3D do alvo molecular. Essas informações são provenientes de técnicas de cristalografia de raios X, ressonância magnética nuclear (RMN) ou modelagem por homologia (MONTANARI, 2008). No entanto, a técnica de acoplamento molecular, geralmente, não é aplicada a toda superfície do alvo 3D (do inglês, *blind docking*), sendo que informações biológicas sobre a proteína alvo são usadas para determinar o local de ligação, e o acoplamento, desta forma, se restringe a este local de interesse.

As aplicações do acoplamento molecular pedem considerar a flexibilidade do ligante e/ou do alvo 3D. A maioria dos programas de acoplamento molecular como o Autodock Vina considera a proteína como um corpo rígido e o ligante como uma molécula flexível (BELLO; MARTÍNEZ-ARCHUNDIA; 2013).

O acoplamento molecular emprega basicamente um algoritmo de busca para exploração dos possíveis modos de ligação de um ligante dentro do sítio de ligação na macromolécula. Posteriormente, a energia de afinidade é estimada através da função de pontuação. O algoritmo deve ser capaz de identificar modos de interação com conformações favoráveis energeticamente (GRINTER; ZOU, 2014).

Em relação à análise da flexibilidade do ligante, os algoritmos de busca são classificados em: sistemáticos, baseados em simulação e randômicos, sendo que em alguns casos, os algoritmos utilizam mais de uma dessas abordagens. Os algoritmos de simulação utilizam geralmente a dinâmica molecular para uma análise mais precisa das interações entre ligante e a

proteína. Essa abordagem leva a desvantagem do elevado custo computacional que inviabiliza a triagem de um grande número de compostos (RODRIGUES *et al*., 2012).

Os algoritmos sistemáticos utilizam geralmente uma construção incremental do ligante no sítio de ligação para explorar o grau de liberdade dessas moléculas. Essa construção incremental inicia-se pelo posicionamento de um fragmento rígido (âncora, ex.: anel aromático), posteriormente, os demais fragmentos são adicionados até a formação total do confômero. De forma semelhante, o programa Surflex-Dock (SPITZER; JAIN, 2012) emprega a busca conformacional sistemática com auxílio da similaridade morfológica para a orientação de conformações dos fragmentos.

Nos algoritmos randômicos, mudanças aleatórias no grau de liberdade das moléculas são realizadas. Nesta categoria destacam-se algoritmos genéticos (RODRIGUES *et al*., 2012). Os algoritmos genéticos são planejados para fornecer soluções para problemas de otimização combinatória (ex. geração de um número ilimitado) com base em alguns princípios da evolução biológica. Esses algoritmos utilizam os chamados "operadores genéticos" (os dois principais: *CROSS-OVER* e *MUTATION*) para criar soluções potenciais chamadas de "cromossomos" (informações de uma molécula armazenadas como sequência numérica). Uma "população" inicial é gerada aleatoriamente e modificações são realizadas pelos operadores genéticos até que critérios sejam atendidos como o número máximo de populações (WILLETT, 1995). Dentre os programas que implementam o algoritmo genético, o AutoDock Vina é um dos mais utilizados (TROTT; OLSON, 2010).

Para estimar a afinidade do modo de ligação do ligante no local de ligação do alvo molecular, o AutoDock Vina utiliza uma função de pontuação empírica: extrai informações empíricas tanto das preferências conformacionais dos complexos receptor-ligante quanto das medidas experimentais de afinidade. No AutoDock Vina, a energia de afinidade relativa é determinada a partir das contribuições intermoleculares, levando em consideração as contribuições hidrofóbicas e de ligações de H (TROTT; OLSON, 2010).

4. METODOLOGIA

4.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

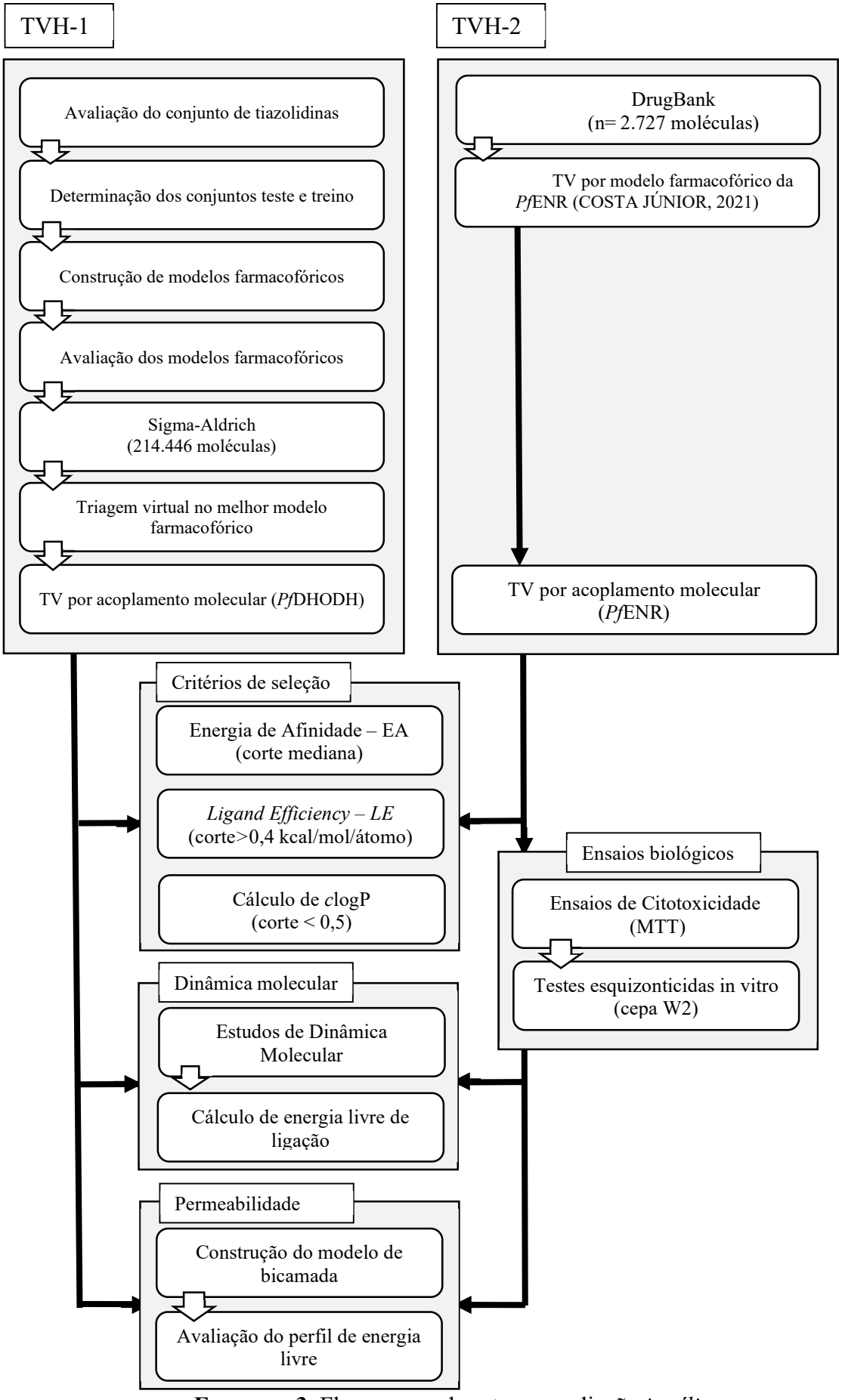
Foram estabelecidos dois protocolos de triagem virtual hierárquica (TVH) para selecionar moléculas com afinidade frente a *Pf*DHODH (TVH-1) e *Pf*ENR (TVH-2) a ensaios fenotípicos e/ou estudos de DM.

Para a TVH-1, informações de atividade antiparasitária frente ao *P. falciparum* para um conjunto de 19 moléculas contendo o núcleo tioxotiazolidina ou tiazolidina-2,4-diona (COSTA JUNIOR, 2019), foram utilizadas para construção e validação de modelos farmacofóricos para moléculas com atividade frente ao parasito. A seguir, moléculas presentes nas bases de dados DrugBank (n=2.727 moléculas) e Sigma-Aldrich (214.446 moléculas) foram avaliadas frente ao melhor modelo farmacofórico. Aquelas com QFIT > 0 foram direcionadas para a etapa de triagem virtual por acoplamento molecular frente a *Pf*DHODH.

Para a TVH-2, triagem virtual (TV) hierárquica (modelos farmacofóricos seguido por acoplamento molecular) (COSTA JUNIOR et al, 2021) foi realizada frente a moléculas contidas na base de dados DrugBank (n=2.727 moléculas) (WISHART et al., 2018). Dessa forma, foi realizada uma triagem virtual pelo modelo farmacofórico para inibidores da *Pf*ENR previamente obtido por Costa Júnior (2021), com o auxílio do módulo UNITY® disponível na plataforma SYBYL®-X 2.0. As moléculas foram alinhadas ao modelo farmacofórico e selecionadas com base no valor de QFIT. Aquelas que apresentaram QFIT > 0 foram direcionadas para a etapa da triagem por acoplamento molecular.

Triagem virtual por acoplamento molecular foi realizada com o conjunto de moléculas remanescentes da filtragem por modelo farmacofórico. De acordo com os pontos de corte: energia de afinidade (EA) < mediana; Eficiência de ligação (EL) > 0,4 kcal/mol/átomo(-H) e *c*logP < 0,5), um conjunto de moléculas foi selecionado para as próximas etapas. Dentre essas, as moléculas que possuíam baixo custo (< R$ 1,00/mg) foram encaminhadas para avaliação de atividade antiparasitária frente ao *P. falciparum*.

Após a etapas de triagem virtual, as moléculas foram avaliadas através de simulações de dinâmica molecular, cálculo de energia livre de ligação e avaliação do perfil de permeabilidade através de um modelo bicamada lipídica (Esquema 3).



Esquema 3. Fluxograma das etapas avaliação *in sílico.*

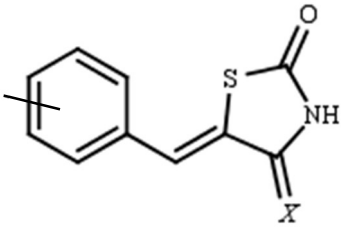
4.2. TRIAGEM VIRTUAL (TV) HIERÁRQUICA

4.2.1. Triagem virtual por modelo farmacofórico para moléculas com atividade frente ao *P. falciparum* (TVH-1)

4.2.1.1. Determinação dos conjuntos de treinamento

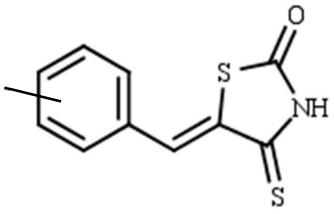
A partir de informações de atividades biológica frente ao *P. falciparum* de um conjunto de 19 moléculas contendo o núcleo tioxotiazolidina ou tiazolidina-2,4-diona com atividade antimalárica ($EC_{50} \leq 1$ μM), foram definidos os conjuntos de treinamento e teste (Tabelas 1 e 2) (COSTA JUNIOR, 2020). Dessa forma, 13 moléculas (~70% do conjunto inicial) mais potentes ($EC_{50} \leq 0{,}25$ μM) foram utilizadas como moléculas moldes para a geração de novos modelos farmacofóricos (conjunto de treinamento) (Tabela 1). As demais foram utilizadas nas etapas de avaliação dos modelos farmacofóricos (conjunto teste) (Tabela 2).

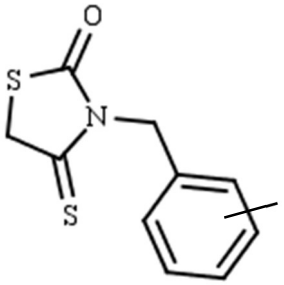
Tabela 1. Moléculas do conjunto de treinamento.



Molécula	R	X	EC_{50} (μM) *P. falciparum*
1	2, 4-Cl	S	0,141
2	3,4,5-OCH_3	S	0,145
3	4-OH	S	0,147
4	2-NO_2	S	0,225
5	4-$NHCOCH_3$	S	0,251
6	4-NO_2	S	0,225
7	4-$N(CH3)_2$	S	0,200
8	4-NO_2	O	0,232
9	3-NO_2	O	0,244
10	2,2'-Cl	O	0,164
11	2-Br,3-OH,4-OCH_2	O	0,118
12	4-bromo-2-tiofeno	O	0,159
13	4-quinolina	O	0,160

Tabela 2. Moléculas do conjunto teste.



Molécula	R	EC_{50} (µM) *P. falciparum*
14	3-F	0,334
15	2-OH, 4-OCH_3	0,340
16	9-cloroantraceno	0,253
17	4-piridina	0,414
18	4-bromo-2-piridina	0,325
		
19	4-Cl	0,260

4.2.1.2. Geração dos modelos farmacofóricos para moléculas com atividade antimalárica

Os modelos farmacofóricos foram gerados utilizando o módulo GALAHAD™ disponível na plataforma SYBYL®-X 2.0. (SYBYL-X 2.0, 2012). As moléculas foram alinhadas com base nas suas características farmacofóricas para produzir os modelos farmacofóricos.

O processo de alinhamento foi conduzido em duas etapas. Incialmente, as conformações dos inibidores foram obtidas através Algoritmo Genético (AG), no qual o tamanho da população e o número máximo de gerações foram ajustados para 55 e 40, respectivamente. Os demais parâmetros (TAXA DE CRUZAMENTO= 100,0%; TAXA DE MUTAÇÃO= 100,0%) foram mantidos em seus valores padrão. A seguir, os confôrmeros foram alinhados entre si para a construção dos modelos farmacofóricos.

4.2.1.3. Avaliação dos modelos farmacofóricos

Inicialmente, foi feita uma avaliação dos modelos farmacofóricos com base nos parâmetros estatísticos do GALAHAD™. Os seguintes parâmetros foram analisados de forma sucessiva: *ENERGY*, *SPECIFITY* e PARETO. Os modelos farmacofóricos que apresentaram valor de *ENERGY* superior a duas ordens de magnitude foram descartados. Logo após, os modelos farmacofóricos com valor de *SPECIFITY* menor que cinco foram descartados. Os modelos farmacofóricos remanescentes foram avaliados quanto à função de Pareto. Aquele com maior pontuação em Pareto foi avaliado quanto à capacidade de recuperar as moléculas do conjunto treino. Os modelos farmacofóricos remanescentes foram testados quanto à habilidade para diferenciar inibidores verdadeiros de falsos positivos, os quais foram construídos com auxílio do servidor DUD-E (MYSINGER et al., 2012, http://dude.docking.org), na proporção de um molécula ativa para 50 falso positivos.

Todas as moléculas (6 inibidores verdadeiros/300 falsos positivos) foram então reunidas em um banco de dados único, construído com a ferramenta "*create database*" disponível no módulo UNITY® 3D, da plataforma SYBYL®-X 2.0 (TRIPOS, 2011). A seguir, o banco contendo todas as moléculas foi alinhado de forma flexível aos modelos farmacofóricos remanescentes, com o auxílio do módulo UNITY® 3D e o seu encaixe avaliado com a função de pontuação QFIT (do inglês, *Query Fit*).

Esses valores foram utilizados para a construção da curva ROC (do inglês, *Receiver Operating Characteristic*) (GIGLIARANO; FIGINI; MULIERE, 2014) e calcular a área sob cada curva (AUC, do inglês, *Area under the curve*) para fins de comparação dos modelos farmacofóricos entre si. Apenas modelos farmacofóricos com AUC ≥ 0,7 foram avaliados quanto aos parâmetros estatísticos GALAHAD™ de Similaridade Farmacóforica (SF), Similaridade Estérea (SE) e MOL_QRY. Esses valores foram normalizados (equação 1) e utilizados como coordenadas para construir o gráfico 3D. Os melhores valores de SF, SE e MOL_QRY entre todos os modelos farmacofóricos foram utilizados como coordenadas de um modelo farmacofórico hipotético. O modelo farmacofórico com menor distância euclidiana para o modelo hipotético (equação 1 e 2) foi considerado adequado para a etapa de triagem virtual.

$$P = \frac{p - L}{\mathrm{H} - \mathrm{L}} \times 100 \qquad (1)$$

$$D^2 = (P_{hip1} - P_1)^2 + (P_{hip2} - P_2)^2 + (P_{hip3} - P_3)^2 \qquad (2)$$

Onde *p* é cada parâmetro analisado, *L* e *H* são, respectivamente, o menor e o maior valor entre os parâmetros correspondentes analisados. Cada parâmetro *p* é transformado em um valor *P* sem escala, onde $0 \leq P \leq 100$. *D* é a distância euclidiana entre cada modelo farmacofórico e o modelo farmacofórico hipotético, para os quais, os valores *P* são utilizados como coordenadas. O modelo farmacofórico como menor distância euclidiana a partir do modelo farmacofórico hipotético foi considerado como adequado para a etapa de triagem virtual.

4.2.1.4. Triagem virtual por modelo farmacofórico para moléculas com atividade frente ao *P. falciparum*

O modelo farmacofórico que atendeu aos critérios estabelecidos foi utilizado como *template* (molde) para a triagem virtual por meio da opção "alinhamento flexível 3D" disponível no módulo UNITY® 3D (TRIPOS, 2011) da plataforma SYBYL®-X 2.0., frente a biblioteca de fármacos presentes na base de dados DrugBank (WISHART et al., 2018; https://go.drugbank.com/) e Sigma-Aldrich (214.446 moléculas).

As moléculas que apresentaram QFIT > 0 foram direcionadas para a etapa de acoplamento molecular.

4.2.2. Triagem virtual por modelo farmacofórico para inibidores de *Pf*ENR (TVH-2)

O melhor modelo farmacofórico da *Pf*ENR construído em estudos anteriores (COSTA JÚNIOR; 2020) foi utilizado como molde para a triagem virtual por meio da opção "alinhamento flexível 3D" disponível no módulo UNITY® 3D (TRIPOS, 2011) da plataforma SYBYL®-X 2.0, frente a biblioteca de fármacos presentes na base de dados DrugBank (WISHART et al., 2018; https://go.drugbank.com/).

As moléculas que apresentaram QFIT > 0 foram direcionadas para a etapa de acoplamento molecular.

4.2.3. Triagem virtual por acoplamento molecular (TVH-1)

4.2.3.1. Seleção e Preparo do receptor (*Pf*DHODH)

A estrutura 3D do *Pf*DHODH (PDB ID: 4CQ8) foi obtida do banco de dados de macromoléculas biológicas Protein Data Bank (Berman, 2000, http://www.rcsb.org/pdb/) e preparada com a ajuda do módulo Biopolymer disponível na plataforma SYBYL-X 2.0.

As moléculas de água foram removidas e átomos de hidrogênio foram adicionados. Em seguida, os resíduos ácidos e básicos tiveram seu pKa calculado utilizando o servidor PropKa

3.0 (OLSSON et al., 2011), que se baseia no ambiente químico de cada resíduo (efeito de dessolvatação, ligações de hidrogênio e interação com grupos carregados) (Rostkowski et al., 2011). A protonação foi ajustada de acordo com o pH ótimo da catálise (entre 7,5 e 8) (BALDWIN et al., 2002). Por fim, cargas atômicas parciais de Gasteiger-Huckel € (GASTEIGER; MARSILI, 1980) foram atribuídas aos resíduos da proteína com auxílio do módulo Biopolymer da plataforma SYBYL-X 2.0 (TRIPOS, 2011).

4.2.3.2 Avaliação da função de pontuação para *Pf*DHODH

As etapas de busca conformacional e avaliação das poses foram realizadas com o programa AutoDock Vina 1.1.2 (TROTT; OLSON, 2010). Inicialmente, a localização espacial das regiões de busca foi delimitada com base nos resíduos que fazem interação com o ligante (inibidor ou substrato) da *Pf*DHODH (PDB: 4CQ8), os quais foram definidos através análise estrutural das estruturas cristalográficas.

As coordenadas do ligante cristalográfico e do cofator cristalográficos foram utilizadas para a determinação da região de busca no programa AutoDock Vina 1.1.2, definida através de determinação da caixa de simulação com auxílio do programa AutoDock Tools 1.5.6 (TROTT, OLSON, 2010). Inicialmente, os parâmetros de busca foram avaliados quanto à capacidade em reproduzir a conformação do ligante cristalográfico (inibidor ou substrato/cofator) através do cálculo do desvio médio da raiz quadrada (do inglês, *root-mean-square deviation* – RMSD). O cálculo do RMSD foi realizado com o auxílio do programa VMD 1.9.1 (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996).

O conjunto de 49 inibidores verdadeiros da *Pf*DHODH/2700 falsos positivos foi utilizado para avaliar a acurácia do programa AutoDock Vina 1.1.2 em diferenciar inibidores verdadeiros de falsos positivos com base no valor de energia de afinidade.

Os valores de energia de afinidade foram utilizados para a construção da curva ROC (GIGLIARANO; FIGINI; MULIERE, 2014) e o cálculo da área sob a curva (AUC). Valor de AUC $\geq$ 0,7 foi considerado como adequado para a etapa de triagem virtual. Os mesmo valores de energia foram utilizados para a geração da curva BEDROC com o auxílio do servidor ROCKER (LÄTTI; NIINIVEHMAS; PENTIKÄINEN, 2016).

4.2.4. Parâmentros de busca para *Pf*ENR por acoplamento molecular (TVH-2)

Nessa etapa, a função de pontuação do programa AutoDock Vina 1.1.2 que foi considerada adequada nas etapas de avaliação (curva ROC, AUC=91% e BEDROC=70,69%)

(COSTA JÚNIOR; 2021) foi empregada para avaliação da afinidade das moléculas filtradas pelo modelo farmacofórico frente ao sítio ativo da *Pf*ENR.

4.2.3.4. Critérios de priorização de moléculas

As moléculas oriundas do DrugBank foram classificadas com base nos valores de energia de afinidade (EA) e o valor da mediana foi utilizado como ponto de corte. Além disso, os valores de EA foram utilizados para o cálculo da eficiência de ligação (COSCONATI *et al*., 2010; HOPKINS *et al*., 2014). O cálculo da EL se dá pela razão entre o valor de energia livre de ligação (kcal/mol) e o número de átomos pesados (equação 3).

$$EL = -EA \,/\, \mathrm{n} \qquad (3)$$

Onde n é o número de átomos com exceção dos átomos de hidrogênio.

Adicionalmente, o coeficiente de partição octanol/água (clogP) foi calculado com auxílio do programa Marvin Sketch 6.0 (CHEMAXON, 2013). Assim, foram determinados pontos de corte para os conjuntos EA, EL e clogP. Com base na análise de EA, moléculas que apresentaram valores de EA superiores ao valor de mediana foram excluídas. Valor de EL superiores a 0,4 kcal/mol/ átomo(-H) é considerado bom (moléculas/fragmentos que podem, posteriormente, sofrer otimização adicional em sua estrutura) (HOPKINS *et al*., 2014). Por fim, o ponto de corte para *c*logP foi definido para moléculas com solubilidade em água (*c*logP < 0,5) (LISTON et al. 2022; BERGSTRÖM, LARSSON 2018; FOYE, 2008). Desse modo, os seguintes critérios de priorização foram concomitantemente tomados:

1 – EA < -6,6 kcal/mol;

2 – EL > 0,4 kcal/mol/átomo(-H);

3 – *c*logP < 0,5

Ao final dessa etapa, moléculas avaliadas com base nos paramêtros de busca para definidos para *Pf*ENR foram selecionadas para aquisição com base no valor monetário para serem encaminhadas para avalição da atividade antiparasitária por meio de ensaios fenotípicos. A cotação foi realizada na plataforma *on line* Sigma-Aldrich (https://www.sigmaaldrich.com/).

4.3. SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR

Moléculas selecionadas nas etapas anteriores foram avaliadas por dinâmica molecular (DM). O protocolo de dinâmica molecular foi executado no pacote GROMACS 5.1.2 (ABRAHAM *et al*., 2015), com os seguintes parâmetros: campo de força: gromos54a7; Tª 303K; pH 7,5 e pressão: 1atm. A seguir, ciclos de minimização energética (1000 ciclos de *steep*

descent e gradiente conjugado), dinâmica de restrição (1000 Kj/mol/nm2) e dinâmica de produção (50 ns) foram executados para avaliar a estabilidade da forma APO e APO com cofator em meio com solvente (água) através dos parâmetros de desvio médio da raiz quadrada (RMSD), flutuação das posições atômicas na trajetória e ligações de hidrogênio. As moléculas selecionadas foram submetidas ao programa ATB 3.0 (MALDE *et al*., 2011) para a geração da topologia. Por fim, sistemas binários e ternários foram construídos e a mesma rotina de DM foi realizada no intuito de avaliar a estabilidade, natureza e permanência das interações intermoleculares dos ligantes no sítio ortostético.

4.4. CÁLCULO DE ENERGIA LIVRE DE LIGAÇÃO

A energia livre de ligação dos complexos foi calculada utilizado o método Mechanics Poisson – Boltzmann surface area (MM/PBSA) implementado na ferramenta g_mmpbsa (GANESAN; COOTE; BARAKAT, 2017). A energia livre de ligação da proteína com o ligante no solvente pode ser expressado:

$$\Delta G_{ligação} = G_{complexo} - (G_{proteina} + G_{ligante}) \quad (4)$$

onde, $G_{complexo}$ é a energia livre total do complexo proteína-ligante e $G_{proteina}$ e $G_{ligante}$ são energias livres totais da proteína isolada e ligantes no solvente, respectivamente. Classicamente, a energia livre de ligação ($\Delta G_{ligação}$) na Equação (5) contém as contribuições de entalpia (ΔH) e entropia ($T \cdot \Delta S$). A componente entálpica da Equação (6) é composta pela energia potencial utilizada pela mecânica molecular no vácuo (E_{MM}) e pela energia livre de solvatação ($G_{solvatação}$). G_{MM} na Equação (7) é composto pela energia potencial das interações não covalentes para as forças de van der Waals (E_{vdW}) e as interações eletrônicas (E_{elec}), enquanto uma $G_{solvatação}$ na Equação (8) é composta por um componente polar (G_{polar}) e um componente não polar (G_{apolar}). G_{polar} foi calculado por resolução de uma equação de Poisson-Boltzmann; enquanto G_{apolar} foi determinado pela Equação (9), onde SASA é a área de superfície acessível ao solvente e os termos γ e β são constantes empíricas com valores padrão. Assim, a energia livre para cada $G_{complexo}$ individual, $G_{proteina}$ e $G_{ligante}$ foi estimada pelas Equações (5)-(9):

$$\Delta G_{ligação} = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (5)$$

$$\Delta H = (E_{MM}) + (G_{solvatação}) \quad (6)$$

$$E_{MM} = E_{vdW} + E_{elec} \quad (7)$$

$$G_{solvatação} = G_{polar} + G_{apolar} \quad (8)$$

$$G_{apolar} = \gamma SASA + \beta \quad (9)$$

Assim, para cálculo de energia livre de ligação, 10 quadros de DM de foram extraídos a cada 1 ns das trajetórias de produção. Os termos E_{elec} e E_{vdW} foram calculados usando funções de potencial de Coulomb e Lennard-Jones (LJ), respectivamente. O G_{polar} foi quantificado em uma caixa de grade (cfac = 2 e fadd = 20) com solvente NaCl 0,150M ($raio_{Na}$ = 0,95 Å; $raio_{Cl}$ = 1,81 Å) e constante dielétrica = 80,0 por aproximação Debye-Hückel; então, o G_{apolar} foi calculado usando um modelo de área de superfície acessível ao solvente (SASA) com uma tensão superficial padrão do solvente (γ = 0,02267 kJ.mol 1 .$Å^{-2}$; β = 3,84928 kJ.mol $^{-1}$) (GANESAN; COOTE; BARAKAT, 2017; WAGONER & BAKER, 2006).

4.5. ENSAIOS BIOLÓGICOS

Nessa etapa, foram avaliadas apenas as moléculas selecionadas por triagem virtual para *Pf*ENR.

4.5.1. Cultivo das linhagens celulares humana

A linhagem celular humana utilizada para análise de toxicidade foi WI-26VA4 (fibroblasto pulmonar ATCC CCL-75). Essa linhagem faz parte do banco de células animais do Serviço de Biologia Celular (SBC) da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) em Belo Horizonte - Minas Gerais.

As células foram cultivadas a partir de ampola crio preservada, as mesmas foram descongeladas a 37°C, seu conteúdo transferido para um tubo de 15mL com 10mL de meio RPMI 1640. As células foram centrifugadas a 1200rpm por cinco minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspendido em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) inativado pelo calor (meio completo). As células foram transferidas para garrafas plásticas de cultivo celular tratada para promover a adesão celular, T75 (75cm2) 10mL (Corning Costar Inc., EUA) e mantidas como monocamadas a 37°C em estufa (Thermo electron co. EUA) com uma atmosfera úmida de 5% de CO_2. O meio de cultura foi substituído a cada 48 horas de incubação. Contaminações, morfologia celular e formação da monocamada foram observadas ao microscópio invertido em aumento de 100x (modelo Olympus, CKX 41). O congelamento dessas células foi realizado em ampolas de criopreservação com uma solução contendo meio RPMI completo com 5% de DMSO e estas são mantidas em nitrogênio líquido no banco de criopreservação (CryoPlus 7405 / Thermo Scientific, EUA).

4.5.2. Ensaios de Citotoxicidade

Para os ensaios de citotoxicidade foi realizado o teste de químio-sensibilidade com uso de 3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo (teste MTT) (MATSUZAKI *et al*., 2006). Este teste consiste na avaliação colorimétrica rápida do crescimento de linhagens celulares in vitro. O ensaio baseia-se na redução do sal tetrazolato pela enzima succinato desidrogenase presente na mitocôndria das células eucarióticas viáveis, formando um cristal insolúvel em água conhecido como cristal de formazan (CARMICHAEL *et al*., 1987; PARK *et al*., 1987). Ao solubilizar o cristal com um solvente orgânico, adquire uma coloração violácea que é avaliada por espectrofotometria.

Após adquirir 80% de confluência as células foram tripsinizadas com 1,5mL da enzima tripsina (1:250 Sigma), incubadas a 37°C por cinco minutos, ressuspendidas em 10mL de meio completo e centrifugadas a 1200rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido com meio completo. As células foram distribuídas em microplacas de 96 poços a uma densidade de $4x10^5$ células/100µl por poço e incubadas em estufa de CO_2 a 37°C por 24h para a adesão das mesmas à placa. Após esse período de adesão o meio foi retirado, adicionado 180 µl de meio RPMI suplementado com 1% de SFB e foram adicionados 20µl de composto diluído em meio RPMI contendo diferentes concentrações dos compostos testados a partir das diluições iniciais, os compostos foram adicionados em triplicata nas concentrações 100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL, 0,1 µg/mL e 0,01 µg/mL. As placas foram incubadas por mais 48 horas. No final do período de tratamento foram adicionados 100µl/poço de uma solução brometo 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Sigma), o sal tetrazólico, na concentração de 0,5mg/mL em RPMI 1640 sem fenol (DENIZOT; LANG, 1986). Após três horas de incubação na estufa de CO_2 a 37ºC no escuro com o MTT, o sobrenadante foi aspirado e os cristais de formazan foram dissolvidos em 50µl/poço de DMSO e mantidos a 37°C durante 10 minutos. A absorbância por poço foi medida a um comprimento de onda de 550nm utilizando o Gen5 (Data Analysis Software -Bio-Tek). Os dados foram analisados a partir de experimentos independentes. A dose letal mínima que inibe em 50% (IC_{50}) o crescimento das células na presença dos compostos testes foi determinada em comparação com células cultivadas sem a presença de compostos (considerada 100% de crescimento), os cálculos foram realizados a partir de curvas de concentração dose-resposta sigmoidal usando Software OriginPro versão 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) (PATRA *et al*., 2011; PEREIRA *et al*., 2012).

4.5.3. Cultivo *in vitro* das fases intraeritrocitárias de *P. falciparum*

Os parasitos da cepa W2 (cloroquina-resistente) foram cultivados em hemácias humanas in vitro sob condições estabelecidas por Trager e Jensen (1976). Os parasitos foram cultivados em placas de Petri com hematócrito a 5% usando meio de cultivo completo (RPMI 1640 suplementado com 25mM de Hepes, 21mM de bicarbonato de sódio, 300µM de hipoxantina, 11mM de glicose, 40µg/ml de gentamicina e 10% (v/v) de plasma humano inativado pelo calor). As placas foram mantidas à 37°C e a concentração adequada de oxigênio foi obtida pela combustão de uma vela, sendo realizadas trocas diárias de meio. A parasitemia foi monitorada diariamente em esfregaços, corados com Giemsa, ao microscópio óptico (1000x).

4.5.4. Determinação da parasitemia

Foram confeccionados esfregaços sanguíneos de cultivo, secos ao ar, fixados com metanol e corados com solução recém diluída de Giemsa na proporção de três gotas para cada 1mL de solução salina tamponada pH 6,8. Após 10 minutos, as lâminas foram lavadas em água corrente, secas ao ar e examinadas ao microscópio óptico com objetiva de imersão (1000x). A parasitemia foi determinada através da contagem do número de hemácias infectadas. Para parasitemias maiores que 5%, 1000 hemácias foram contadas. No caso de infecções muito baixas, menores que 5%, foram contadas 6000 hemácias. Nesse caso, a avaliação foi feita pela estimativa do número total de hemácias por campo microscópico em um total de 50 a 100 campos, estimando-se o número de hemácias infectadas. A parasitemia foi expressa em percentagem de hemácias parasitadas.

4.5.5. Sincronização do cultivo de *P. falciparum*

Os parasitos de cultivo foram sincronizados pelo método do sorbitol (LAMBROS; VANDERBERG, 1979). Os cultivos com predomínio de formas jovens (anéis), obtidas logo após a sincronização, foram utilizadas nos ensaios quimioterápicos. Após a adição de 10 ml de sorbitol, os parasitos foram mantidos nas mesmas condições ambientais do cultivo (37 °C e 5% CO2) por 10 min. Após o tempo de ação do sorbitol, o conteúdo foi centrifugado em tubo falcon a 2500 RPM por 5 min e o volume do sedimento foi utilizado para determinação do hematócrito. O líquido sobrenadante foi removido e as hemácias foram ressuspendidas com meio de cultura RPMI com o hematócrito ajustado para 2%.

4.5.6. Testes esquizonticidas *in vitro* com *P. falciparum* utilizando teste tradicional

Inicialmente, foi realizado um ensaio preliminar de forma a avaliar se os compostos apresentaram atividade frente à cepa W2. Para a avaliação da redução da parasitemia, culturas sincronizadas com 2% de parasitemia no estágio de anel, e 2% de hematócrito, foram distribuídas em microplacas de 96 poços, com 180µL para cada poço. Acrescentou-se a cada poço 20µl de meio RPMI, contendo diferentes concentrações dos compostos (50 – 3,125 µg/mL), em triplicatas. Após 24h de incubação dos parasitos a 37°C, o meio de cultura com ou sem adição dos compostos foi trocado em cada poço. Esfregaços sangüíneos de todas as amostras foram confeccionados após 48h, corados com Giemsa e examinados ao microcópio óptico para a determinação da parasitemia. A média da parasitemia calculada nos poços sem adição de compostos, considerada como 100% de crescimento do parasito, foi comparada com as parasitemias nos poços que receberam os compostos-teste. A atividade dos compostos foi expressa pela percentagem de redução da parasitemia em relação aos controles sem a presença dos compostos. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

4.5.7. Índice de Seletividade

Um importante critério na pesquisa de compostos ativos como potencial terapêutico é determinar a ausência de efeitos tóxicos nas células do hospedeiro, através do índice de seletividade (IS), que mede o quanto o composto é ativo contra o parasito sem causar danos à viabilidade das células de mamíferos. Sendo assim, quanto maior for a proporção, maior será a seletividade do composto para as células do parasito. O índice de seletividade é calculado de acordo com a fórmula abaixo.

$$IS = \frac{IC_{50}\ do\ composto\ em\ linhagem\ de\ células\ de\ mamíferos}{IC_{50}\ do\ composto\ em\ linhagem\ parasitária} \qquad (2)$$

4.6. MODELO PARA AVALIAÇÃO DE PERMEABILIDADE EM BICAMADA

4.6.1. Construção do modelo de bicamada

O modelo de bicamada lipídica foi construído no servidor CHARMM-GUI (JO et al. 2008; LEE et al. 2020). Os dois fosfolipídios mais abundante na composição de bicamada do apicoplasto em *P. falciparum* foram selecionados para construção de um modelo simplificado (BOTTÉ et al. 2013). Os dois fosfolipídios: 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina

(POPC – 34:1) e 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE – 34:1) presentes no apicoplasto na proporção de ~30% e 10%, respectivamente, foram inseridos no sistema na proporção 3:1. A segunda fase aquosa foi obtida com um comprimento maior ao longo do eixo z, a fim de permitir que as moléculas atravessassem completamente a membrana antes de atingir 50% do comprimento total da caixa de simulação no eixo z, uma limitação de estratégia de tração de força constante com referencial fixo de coordenadas. Todo o sistema compreendeu 80 fosfolipídios, os ligantes e cerca de 14.673 moléculas de água do tipo TP3.

Foram realizados minimização de energética (1000 ciclos de steep-descent) e ciclos de equilíbrio NPT (isotérmico e isobárico). Foi realizada uma etapa de produção para avaliar a estabilidade da bicamada lipídica através da análise dos parâmetros de área por lipídio (eixo x,y); densidade média dos componentes do sistema ao longo do eixo z e variação da espessura da bicamada lipídica durante a trajetória. O protocolo de dinâmica molecular foi executado no pacote GROMACS 5.1.2 (ABRAHAM et al., 2015) com os seguintes parâmetros: T=303K; e pH 7,5. O mesmo sistema foi utilizado para o cálculo de potencial de força média (PFM).

4.6.2. Cálculo de potencial de força média

Após a avaliação da atividade antiparasitária, para a molécula mais potente da série foram propostas uma série de modificações no seu esqueleto estrutural a fim de avaliar a afinidade frente à *Pf*ENR e o perfil de permeabilidade em membrana plasmática através de modelo computacional. O incremento de lipossolubilidade foi estimado através do cálculo de logP com auxílio do programa Marvin Sketch 6.0 (CHEMAXON, 2013). Os valores de EA e *c*logP foram utilizados para plotar um gráfico de dispersão. Dentre as moléculas presentes no quarto quadrante do gráfico (maior valor de *c*logP e menor valor de EA), foram selecionados representantes com valores de *c*logP e EA menores (*c*logP ~ 2,0; EA ~ 8,0 kcal/mol), intermediários (*c*logP ~ 3,0; EA ~ 9,0 kcal/mol) e maiores (*c*logP ~ 4,0; EA ~ 10,0 kcal/mol).

A topologia das moléculas foi calculada com auxílio do *script* AnteChamber PYthon Parser interfacE (ACPYPE) (DA SILVA; VRANKEN, 2012) e os campos de força especializados das moléculas baseados em membrana CHARMM-GUI Amber e ACPYPE GAFF foram combinados antes da inserção da molécula com a correspondente substituição do volume de moléculas de água. Ciclos de minimização e equilibração energética foram realizados com restrições de posição da molécula antes da etapa produtiva em condições NVT para manter a referência de coordenadas absolutas. Na fase produtiva, uma força de 500 $kJ \cdot mol^{-1} \cdot nm^{-1}$ foi aplicada à molécula no eixo z na direção do centro de massa da bicamada lipídica. A energia livre durante a trajetória foi calculada como descrito na seção 4.4.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. TRIAGEM VIRTUAL POR MODELOS FARMACOFÓRICOS

A triagem virtual por modelo farmacofórico é amplamente utilizada como uma das etapas iniciais de busca por filtros sucessivos o que representa uma redução de custos no desenvolvimento de moléculas bioativas (BRAGA; ANDRADE, 2013). Outra estratégia que pode ser utilizada conjuntamente com a triagem virtual hierárquica a fim de reduzir custos é o reposicionamento de fármacos. Essa estratégia consiste em encontrar um novo uso terapêutico para um fármaco já aprovado ou para um fármaco/composto ainda em fase clínica de desenvolvimento (SCHERMAN; FETRO; 2020). As vantagens do reposicionamento culminam na simplificação dos procedimentos regulatórios para a introdução de um medicamento previamente aprovado no mercado. Este procedimento leva em consideração dados previamente adquiridos, em particular sobre segurança e toxicidade do medicamento, o que pode tornar as fases iniciais de desenvolvimento de um medicamento reposicionado consideravelmente mais rápidas, e, portanto, mais baratas (JOURDAN et al., 2020).

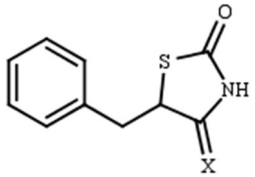
Com base no exposto acima, duas diferentes metodologias foram empregadas (TVH-1 e TVH-2), ambas com a utilização de modelos farmacofóricos nas etapas iniciais, para filtrar fármacos conhecidos catalogados na base de dados DrugBank (WISHART et al., 2018, www.drugbank.ca). Na primeira, um conjunto de derivados tiazolidinas com atividade antiparasitária ao *Plasmodium falciparum* foi empregado para a construção e avaliação de um modelo farmacofórico. Inicialmente, as moléculas do DrugBank foram analisadas, e em seguida, o mesmo processo foi realizado com a base de dados da Sigma-Aldrich (https://www.sigmaaldrich.com/). As moléculas filtradas pelo modelo farmacofórico foram analisadas por acoplamento molecular para avaliação e estudos de dinâmica molecular (DM).

Em um segundo momento, o mesmo protocolo empregado por Costa Junior e col. (2021) foi utilizado priorizar moléculas a ensaios fenotípicos frente ao *Plasmodium falciparum*. Dessa forma, o modelo farmacofórico para inibidores da *Pf*ENR foi empregado para filtrar moléculas da base de dados DrugBank para avaliação por acoplamento molecular e estudos de DM.

5.1.1. Geração dos modelos farmacofóricos para moléculas com atividade antimalárica (TVH-1)

Tiazolidina consiste em um sistema de anel heterocíclico com diversas aplicações farmacêuticas (JAIN; VORA; RAMAA, 2013). Dentre elas, destacam-se os antidiabéticos

(Glitazonas), antibióticos (penicilina), e anticâncer (DANIEL, 2000; ROMAGNOLI et al., 2013). Há estudos que demonstram atividade antiparasitária de derivados tiazolidinas frente à *Pf*ENR, posteriormente, essas informações biológicas foram utilizadas para a geração de modelos farmacofóricos baseados em ligantes (LBVS) (KUMAR et al., 2007; KUMAR et al., 2010). Além disso, o antidiabético rosiglitazona tem sido empregado como adjuvante na terapia antimalárica (VARO et al., 2017). Em estudos anteriores, um conjunto de 21 derivados tiazolidinas (figura 8) foram testados em ensaios fenotípicos frente ao *P. falciparum* (COSTA JUNIOR, 2019).



X = O ou S

Figura 8. Estrutura química de molécula contendo o núcleo tioxotiazolidina (X=S) ou tiazolidina-2,4-diona (X=O).

A construção de modelos farmacofóricos requer um conjunto de moléculas que apresentam atividade biológica conhecida frente ao mesmo alvo biológico, portanto, que compartilhem o mesmo mecanismo de ação (WOLBER *et al*., 2008). Entretanto, os ensaios fenotípicos são realizados com o uso de células intactas sem, necessariamente, a definição de um alvo molecular (ZHENG; THORNE; MCKEW, 2013). Apesar disso, o princípio de similaridade indica que moléculas que são estruturalmente semelhantes são prováveis de terem propriedades semelhantes e atividade biológica semelhante (WILLETT, 2006; ECKERT; BAJORATH, 2007).

O programa GALAHAD foi empregado na construção de modelos farmacofóricos para moléculas com atividade antimalárica. Devido à natureza estocástica do algoritmo genético, 10 modelos farmacofóricos foram gerados conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros estatísticos dos modelos farmacofóricos de derivados tiazolidinas com atividade frente ao *Plasmodium falciparum*.

Modelo	Energia (Kcal/mol)	Pareto	Especificidade	[1]Similaridade Estérea	[2] Similaridade farmacofórica	Concordância farmacofórica (MOL_QRY)
1	1,66	0	4,08	90,40	40,00	18,11
2	2,62	0	4,34	92,80	39,80	24,40
3	1,67	0	5,06	87,10	39,00	24,82
4	2,09	0	3,88	87,90	40,40	19,60
5	1,88	0	4,07	83,70	41,20	22,79
6	1,77	0	5,10	86,70	40,40	17,21
7	2,22	0	4,07	83,80	42,30	26,62
8	1,41	0	4,08	81,10	39,20	18,98
9	1,82	0	5,07	89,10	37,80	22,78
10	1,59	0	3,89	86,60	41,10	15,26

1. Similaridade estérea é descrita no GALAHAD com o termo “Sterics”.
2. Similaridade farmacofórica é descrita no GALAHAD com o termo “H-bond”.

O termo energia do modelo farmacoforico gerado designa a energia total de todas as moléculas nas suas respectivas conformações. No algoritmo presente no GALAHAD, similaridade estérea é definida como a similaridade estérea global entre os confôrmeros dos ligantes, enquanto que similaridade farmacofórica é a similaridade farmacofórica global entre os confôrmeros dos ligantes e por fim, MOL_QRY representa o acordo entre a molécula problema e o modelo farmacofórico dos ligantes como um grupo. A especificidade é um indicador logarítmico da discriminação esperada para cada modelo farmacofórico. Esse valor tem por base, por exemplo, no número de características farmacofóricas, restrição de correspondência parcial às características farmacofóricas e no grau em que as características estão separadas no espaço. Esse valor deve ser pelo menos cinco para uma busca flexível do UNITY (TRIPOS, 2011).

Com base nos parâmetros estatísticos internos, nenhum modelo farmacofórico foi excluído com base no valor de energia (> 100,0 Kcal/mol), o que aponta para um perfil de alinhamento aceitável entre as estruturas e, por conseguinte, as características farmacofóricas. Com base na análise do valor de especificidade, apenas os modelos farmacofóricos 3, 6 e 9 foram selecionados. Nos casos em que o conjunto treino é composto de moléculas análogas em detrimento da diversidade química, é esperado valores baixos de especificidade (<5) (TRIPOS, 2011). Todos os valores de Pareto encontrados (iguais a zero) indicam que a contribuição dos descritores de pós-processamento (energia, similaridade estérea e similaridade farmacofórica) para cada modelo farmacofórico não descriminou que qualquer modelo farmacofórico é

superior aos demais. Dessa forma, os modelos farmacofóricos remanescentes foram encaminhados para etapa de validação.

5.1.2. Validação dos modelos farmacofóricos

Apesar dos parâmetros estatísticos do programa apontarem a qualidade da sobreposição das moléculas moldes através dos valores de energia, similaridade estérea global, concordância farmacofórica e similaridade farmacofórica global, esses dados não são suficientes para avaliar a habilidade preditiva dos modelos farmacofóricos em identificar ativos em relação a falsos positivos. Dentre as métricas capazes de mensurar a habilidade preditiva de um método, a curva ROC (do inglês, *Receiver Operating Characteristic*) e área sob a curva ROC (AUC) são as mais utilizadas devido à facilidade na interpretação dos dados e por possibilitar uma análise direta do desempenho entre diferentes parâmetros de busca (MARTINEZ; LOUZADA-NETO; PEREIRA, 2003; SHEPPHIRD; CLARK, 2006). Dessa forma, métricas de desempenho com curva ROC e AUC podem ser usadas para mensurar a especificidade e seletividade dos modelos farmacofóricos em discriminar moléculas ativas.

Entretanto, nos ensaios fenotípicos não há dados experimentais disponíveis de mecanismo de ação dessa de moléculas. A fim de superar essa limitação, foi utilizado o servidor DUD-E (http://dude.docking.org) (MYSINGER *et al*., 2012) para gerar moléculas com características físico-químicas (carga, massa molecular, número de ligações rotacionáveis, número de doadores e aceitadores de ligação de H e log P) semelhantes a inibidores verdadeiros, porém suficientemente diferentes do ponto de vista topológico para serem consideradas como falsos positivos (MYSINGER *et al*., 2012).

Nessa etapa o conjunto teste contento 6 compostos bioativos (Tabela 2) e 300 falsos positivos foram reunidos. Os cálculos de recuperação de moléculas ativas foram conduzidos para os modelos farmacofóricos 3, 6 e 9, além disso, uma Curva ROC foi construída para cada modelo farmacofórico, sendo que o valor de área sob a curva (AUC) representa o desempenho global de cada modelo farmacofórico (Figura 9)

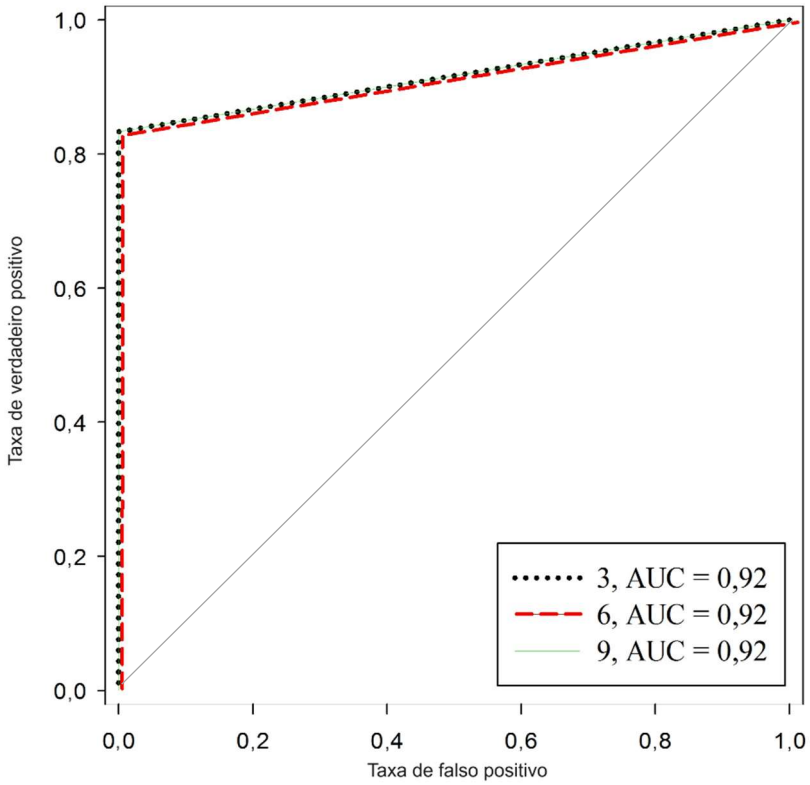


Figura 9. Curva ROC dos modelos farmacofóricos 3, 6 e 9. A linha de referência diagonal representa uma busca aleatória – linha sólida cinza.

Nesta análise, o eixo y representa a sensibilidade (taxa de inibidores verdadeiros) enquanto que o eixo x representa a especificidade (taxa de falsos positivos) dos modelos farmacofóricos. Os inibidores verdadeiros devem ter pontuação maior que os falsos positivos e, portanto, serem ranqueados nas primeiras posições. Assim, um modelo farmacofórico hipotético deve apresentar alta sensibilidade (valor =1, no eixo y) e especificidade (valor zero no eixo x), ou seja, deve-se observar uma linha que sai da origem e segue verticalmente até o canto superior esquerdo (SEIDEL *et al*., 2010; WU, FLACH, 2005). Ao atingir este ponto, a curva deve continuar horizontalmente até o canto superior direito, indicando que todos os inibidores verdadeiros foram identificados antes que qualquer falso positivo seja selecionado.

A habilidade preditiva de um método pode ser classificada com base no valor de AUC em não-preditivo (AUC = 0,5), pouco preditivo (0,5, < AUC < 0,7), moderadamente preditivo (0,7 < AUC < 0,9), altamente preditivo (0,9 < AUC < 1) e previsão perfeita (AUC = 1) (LANGER; HOFFMAN, 2006; VANAGAS, 2004). Os três modelos farmacofóricos avaliados apresentaram um mesmo comportamento de área sob a curva de 0,92, portanto, os três modelos farmacofóricos são considerados método de busca altamente preditivo.

Os critérios de exclusão com base nos parâmetros estatísticos internos do programa e as métricas de desempenho não foram suficientes para selecionar um único modelo farmacofórico. Os modelos farmacofóricos foram gerados com o mesmo conjunto de treinamento e, dessa forma, apresentam um conjunto de informações similares. De modo a evitar redundância de informações, os melhores valores dos parâmetros de similaridade estérea, similaridade farmacofórica e MOL_QRY dentre os três modelos farmacofóricos remanescentes foram utilizados para representar um modelo farmacofórico hipotético através da construção de um gráfico (Figura 10). O modelo farmacofórico 3 (Tabela 4 e Figura 10) é o modelo com a menor distância euclidiana para o modelo farmacofórico hipotético, portanto, foi selecionado para a etapa de triagem virtual.

Tabela. 4. Distância euclidiana entre um modelo farmacofórico hipotético e os modelos 3, 6 e 9.

Modelo	Distância euclidiana
3	89,45
6	106,59
9	110,19

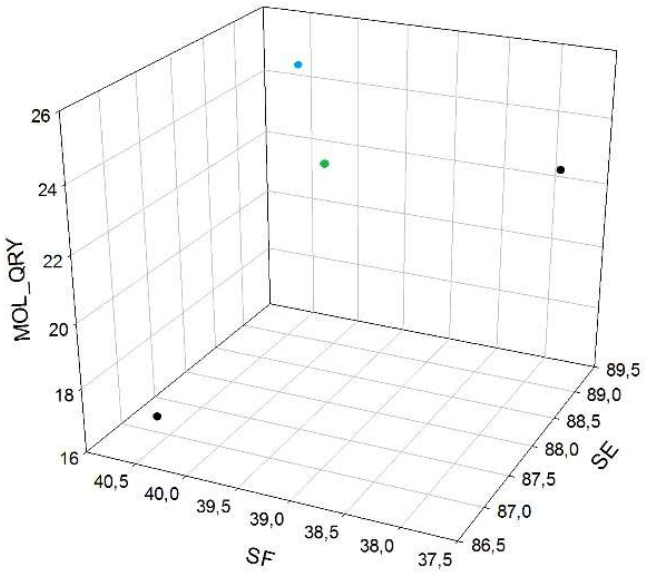


Figura 10. Gráfico de representação dos parâmetros do GALAHAD de similaridade farmacofórica (SF), similaridade estérea (SE) e MOL_QRY dos modelos farmacofóricos 3, 6 e 9. Modelo farmacofórico 3 representado em verde e coordenadas dos melhores valores de cada parâmetros dentre os modelos farmacofóricos 3, 6 e 9 representado em azul.

O modelo farmacofórico 3 possui as seguintes características: um centro hidrofóbico (HY1) que coincide com o centro do sistema de anel heterocíclico tiazolidina; duas características de átomos aceptores de ligação de hidrogênio (AA1 e AA2) que coincidem cada uma com a respectiva cetona do anel tiazolidina e; uma característica de átomo doador de

ligação de hidrogênio (DA1) que coincide com o átomo de nitrogênio do anel tiazolidina, por fim, dois centros hidrofóbicos (HY2 e HY3) que coincide com a benzila da cadeia lateral (Figura 11 e Tabela 1).

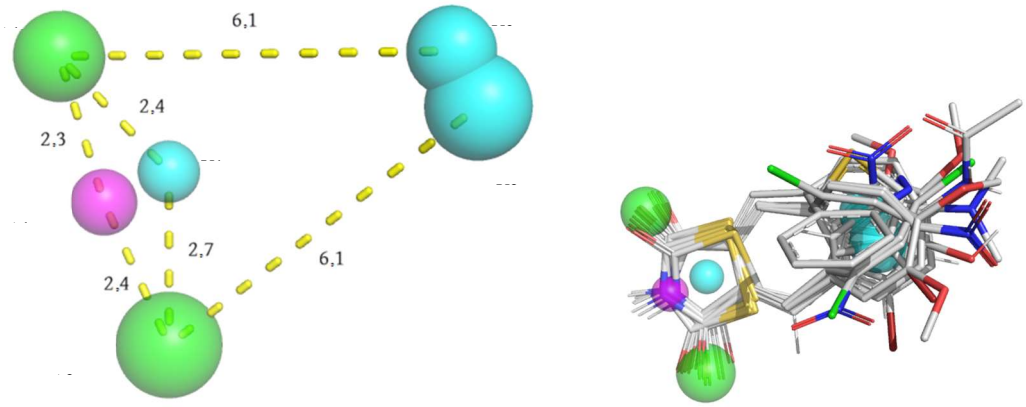


Figura 11. Características farmacofóricas do modelo farmacofórico 3 para derivados tiazolidina com atividade biológica frente ao *P. falciparum*. As distâncias e raios estão representadas em angstrons (Å). Azul: centros hidrofóbicos (HY), verde: pontos aceitadores de ligação de H (AA) e magenta: pontos doadores de ligação de H (DA). O raio das esferas varia de acordo ao raio de tolerância calculado pelo GALAHAD™.

Em estudos para avaliação de moléculas com atividade antimalárica, Kumar e cols. (2010) propuseram modelos farmacofóricos utilizando diversos derivados tiazolidina com cadeias laterais diferentes (anel furano em substituição ao benzeno; anel benzeno ligado ao nitrogênio do anel nitrofurânico). No entanto, algumas características desses modelos farmacofóricos são similares ao modelo farmacofórico 3, principalmente, no que diz respeito ao arranjo das características que coincidem com o núcleo tiazolidina próxima a um outro centro hidrofóbico. Diferentemente do modelo farmacofórico 3, outras características farmacofóricas (mais dois centros hidrofóbicos) são observadas devido à característica no conjunto de treinamento empregado naquele estudo. Após a triagem virtual através de uma busca flexível com a utilização do modelo farmacofórico 3, foram selecionadas 11 moléculas (Tabela 5 – 4,5 ≤ QFIT ≤ 43,59).

Tabela 5. Valores QFIT para moléculas despositadas no DrugBank.

Moléculas	QFIT
Tiopental	4,50
Butobarbital	5,05
Pentobarbital	6,01
Tiamilal	7,37
Sildenafil	9,32
Amobarbital	9,84
Troglitazona	21,29
Procasil	22,73
Uramustina	28,84
Metohexital	34,99
Pioglitazona	43,59

Dentre as moléculas filtradas através do modelo farmacofórico 3, sete moléculas pertencem à classe dos barbitúricos e duas pertencem à classe das glitazonas. Para essa última, há registro de representante com atividade antimalárica (VARO et al., 2017). Isso mostra que o modelo farmacofórico 3 é capaz de filtrar moléculas com atividade antimalárica. Por outro lado, os barbitúricos possuem atividade anticonvulsivante, sedativa e hipnótica. O primeiro barbitúrico foi introduzido na clínica em 1904 que levou a profundas mudanças na abordagem farmacológica das perturbações psiquiátricas e neurológicas. No entanto, devido aos problemas de segurança (fenómenos de dependência e morte por overdose) houve um declínio da terapia com barbitúricos na década de 1960 até o fim do seu uso, exceto em aplicações específicas, como a indução da anestesia (MUÑOZ; UCHA-UDABE; ALAMO, 2005). Assim, mesmo com a análise dos dados estruturais, os aspectos farmacológicos não podem ser negligenciados, pois se trata de fármacos e, portanto, essa base de dados não foi considerada para efeito de testes biológicos. Dessa forma, para o estudo de triagem virtual foi dado continuidade utilizando uma nova base de dados (Sigma-Aldrich).

Após triagem virtual por meio de busca flexível utilizando moléculas do banco de dados Sigma-Aldrich (214.446 moléculas), 2.337 moléculas apresentaram valor de QFIT > 0 ($2{,}78 \leq$ QFIT $\leq 92{,}01$) e foram enviadas para análise por acoplamento molecular.

5.1.3. Triagem virtual por modelo farmacofórico para inibidores da *Pf*ENR (TVH-2)

O modelo farmacofórico para inibidores da *Pf*ENR (Figura 12), construído em estudos anteriores (COSTA JÚNIOR; 2021), foi empregado para seleção de moléculas que possuem requisitos estéreo e eletrônicos para inibição da *Pf*ENR. Para a obtenção desse modelo

farmacofórico, foi construído um conjunto de treinamento com exploração da diversidade química (flavonoides, triclosan e tioxotiazolidina) de diferentes inibidores da *Pf*ENR.

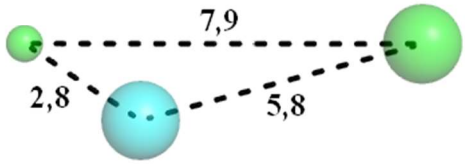


Figura 12. Características presentes no modelo farmacofórico para inibidores da PfENR. As distâncias e raios estão representadas em angstrons (Å). Azul: centros hidrofóbicos (HY), verde: pontos aceitadores de ligação de H (AA). O raio das esferas varia de acordo ao raio de tolerância calculado pelo GALAHAD™.

Fonte: COSTA JÚNIOR; 2021.

As moléculas de fármacos aprovados da base de dados DrugBank (n=2.727 moléculas) foram filtradas por triagem virtual baseada em modelo farmacofórico realizada no módulo UNITY® disponível na plataforma SYBYL®-X 2.0. A filtragem por modelo farmacofórico da base de dados Drugbank resultou na seleção de 301 moléculas (0,75 < QFIT < 89,33). Essas moléculas possuem os requisitos estéreo-eletrônicos para inibição da *Pf*ENR.

5.2. TRIAGEM VIRTUAL POR ACOPLAMENTO MOLECULAR

Apesar dos métodos computacionais baseados em ligantes como os modelos farmacofóricos possibilitarem a identificação de quimiotipos com parâmetros estéreo-eletrônicos essenciais para atividade biológica, esses não são capazes de avaliar a complementariedade de moléculas no ambiente do sítio ativo por não considerar o volume acessível ao ligante e as restrições espaciais impostas pelo sítio ativo. A fim de contornar essa limitação, estudo de acoplamento molecular das moléculas previamente filtradas por modelo farmacofórico pode auxiliar na priorização de moléculas candidatas a inibidores de *Pf*ENR com base também na informação 3D do alvo biológico (TROTT; OLSON, 2010). Dessa forma, o estudo do acoplamento molecular pode auxiliar na priorização de moléculas candidatas a inibidores de *Pf*ENR com base também na informação 3D do alvo biológico.

5.2.1. Triagem virtual por acoplamento molecular frente a *Pf*DHODH (TVH-1)

Devido a impossibilidade de determinar o alvo biológico através de ensaios fenotípicos, realizados em estudos anteriores (COSTA JUNIOR, 2019), um conjunto de 21 derivados

tiazolidinas (Tabela 1 e 2) com atividade antiparasitária frente ao *P. falciparum* foram empregadas em uma triagem virtual inversa (TVI) baseada em acoplamento molecular com objetivo de avaliar a afinidade dessas moléculas frente a um conjunto de alvos validados de *P. falciparum* (COSTA JUNIOR, 2019).

A partir de informações de possíveis relações bioisósternicas entre o anel tiazolidina presente nos derivados e o anel purina/pteridina dos cofatores de enzimas oxidoredutases em *P. falciparum*, estruturas cristalográficas dessa família enzimática presentes no *Protein Data Bank* (PDB) foram utilizadas para avaliar a afinidade do conjunto de derivados de tiazolidina (Tabela 1 e 2) em relação ao sítio de ligação do cofator (NAD/NADP ou uma coenzima flavina FAD ou FMN) dessas enzimas. A diidroorotato desidrogenase (DHODH –PDB ID 4CQ8 – resolução 1,98 Å) foi a única estrutura selecionada dentre o conjunto total com base na energia de afinidade ($-7{,}0 \leq EA \leq -10{,}4$ kcal/mol) e eficiência ligação ($0{,}43 \leq EL \leq 0{,}65$ kcal/mol/átomo não-H) (COSTA JUNIOR, 2019).

A *Pf*DHODH é um alvo validado para a identificação de novos candidatos a fármacos antimaláricos. Essa enzima catalisa a etapa limitante da biossíntese da pirimidina. As pirimidinas são metabólitos essenciais que são precursores da biossíntese de DNA e RNA. A reação consiste na oxidação do diidroorotato a orotato, enquanto que o FMN é reduzido a $FMNH_2$. Logo após, o $FMNH_2$ é reoxidado por um segundo substrato (agente oxidante) em uma reação de duplo deslocamento (ROSS et al., 2014).

Todos os inibidores foram planejados para bloquear o acesso do agente oxidante ao sítio ativo o que impede que a enzima retorne do estado intermediário para a conformação original (PHILLIPS; RATHOD, 2010). Dessa forma, moléculas que se liguem ao sítio de ligação do cofator podem impedir a adoção do estado intermediário da enzima sem a liberação do primeiro produto, enquanto moléculas que se ligam ao sítio de ligação do inibidor podem impedir o retorno da enzima para sua conformação inicial. Portanto, além da avaliação da afinidade dessas moléculas frente ao sítio de ligação do cofator, a análise foi estendida para o sítio de ligação do inibidor da *Pf*DHODH. Nessa etapa, foram utilizadas as moléculas oriundas da base de dados da Sigma-Aldrich que passaram pela filtragem pelo modelo farmacofórico de derivados tiazolidinas (n= 2.337 moléculas).

Primeiramente, a capacidade do algoritmo de busca em reproduzir as coordenadas cristalográficas do cofator e do ligante cristalográfico foi avaliada através do cálculo da raiz do desvio quadrático médio (RMSD). A pose de melhor pontuação, encontrada com auxílio do programa AutoDock Vina 1.1.2 apresenta RMSD = 0,05 e 0,17 para o cofator e inibidor cristalográfico, respectivamente (Figura 13).

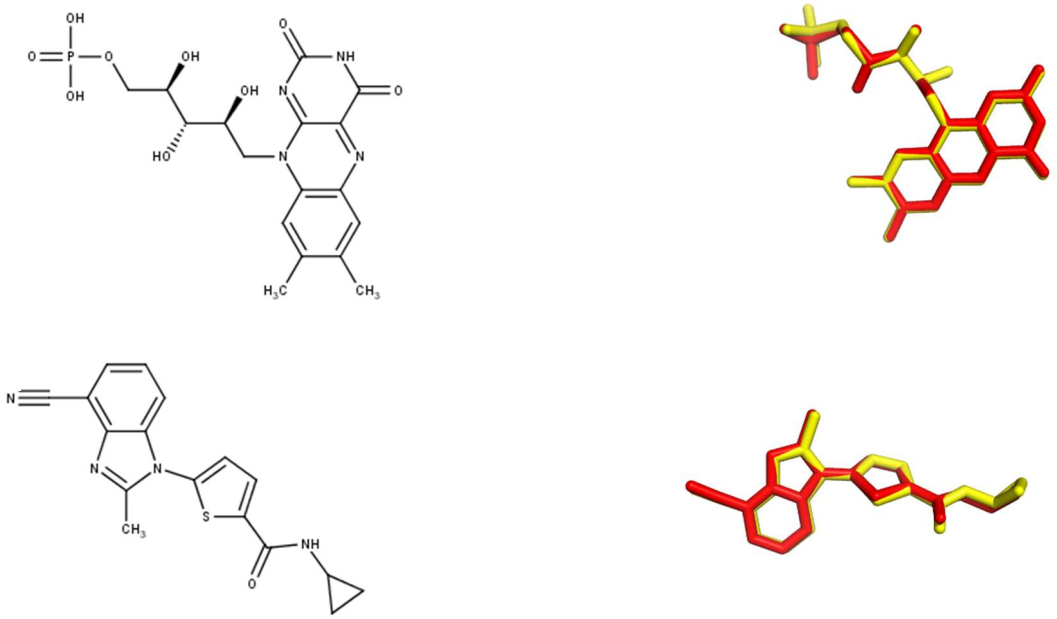


Figura 13. Estrutura química da flavina mononucleotídeo – A e 5-(4-ciano-2-metil-1H-benzimidazol-1-il)-N-ciclopropiltiofeno-2-carboxamida – C. Sobreposição entre a pose melhor pontuada obtida por acoplamento molecular e conformação cristalográfica do cofator – B e ligante – C. Representação em bastão para a conformação cristalográfica em vermelhos e; para pose gerada no reacoplamento em amarelo.

Os resultados sugerem que o uso de parâmetros de busca padrão do programa Autodock Vina 1.1.2 é suficiente para produzir poses confiáveis. Apesar de parâmetros acetáveis, a função de pontuação deve ser capaz de pontuar moléculas ativas nas primeiras posições na triagem virtual. Por esse motivo, um conjunto de inibidores foi catalogado na literatura com auxílio da base de dados CheMBL (MENDEZ at al., 2019 – https://www.ebi.ac.uk/chembl/) para avaliar a capacidade da função de pontuação em discriminar moléculas ativas em um banco de dados contendo falsos positivos (49 ativos e 2700 falsos positivos). No entanto, não existem dados biológicos sobre moléculas que se ligam ao subsítio do cofator do *Pf*DHODH. Portanto, esta análise foi realizada apenas no sítio de ligação do inibidor para a construção da curva ROC (Figura 14)

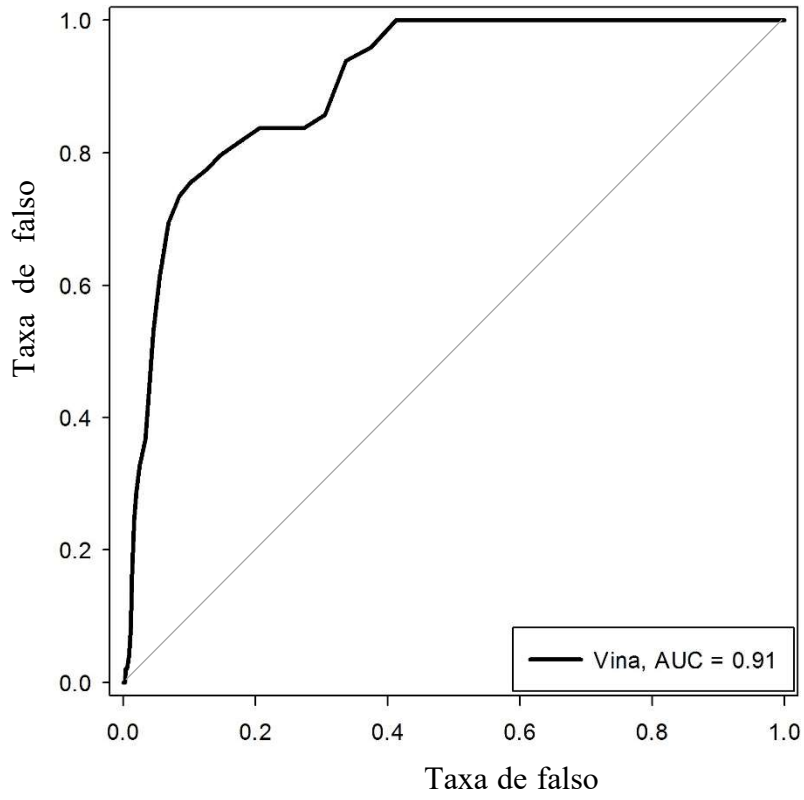


Figura 14. Curva ROC obtida para a função de pontuação do programa AutoDockVina 1.1.2. para avaliação no sítio de ligação do inibidor da *Pf*DHODH. A linha de referência diagonal representa uma busca aleatória – linha sólida cinza.

Os parâmetros de busca selecionados no AutoDock Vina 1.1.2 apresentou uma área sob a curva de 0,91, portanto, considerada altamente preditiva. A avaliação dos parâmetros de busca demonstrou que o programa de acoplamento molecular é capaz de reproduzir as coordenadas cristalográficas tanto para o sítio de ligação do cofator quanto do inibidor. Além disso, para os parâmetros de busca do sítio de ligação do inibidor foi possível avaliar a capacidade do programa de acoplamento molecular em recuperar moléculas ativas em uma biblioteca contendo falsos positivos. Por esse motivo, parâmetros de busca nos sítios de ligação do cofator e do inibidor da *Pf*DHODH foram utilizados para avaliar o conjunto de moléculas oriundas da base de dados Sigma-Aldrich, as quais passaram pela filtragem do modelo farmacofórico de derivados tiazolidina (n= 2.337 moléculas).

A distribuição das moléculas com base no valor de energia de afinidade apresentou uma mediana de -8,7 e -8,5 kcal/mol para os parâmetros de busca para o sítio do cofator e inibidor, respectivamente (Figura 15). Diversos estudos têm demonstrado que o ponto de corte para EA estimada pela função de pontuação do AutoDock Vina 1.1.2 dentro do intervalos superiores a de -6,0 kcal/mol é uma faixa capaz de discriminar ativos de falsos positivos para diferentes alvos biológicos (ex.: transportador de colina da barreira hematoencefálica) (SHITYAKOV;

FÖRSTER, 2014; SHITYAKOV *et al*., 2012). Dessa forma, dentre as 2.337 moléculas oriundas da base de dados Sigma-Aldrich e que foram filtradas através do modelo farmacofórico de derivados tiazolidina, 1.160 apresentaram valor de EA inferior a -8,7 kcal/mol (mediana) frente ao sítio de ligação do cofator e 1.206 moléculas apresentaram valor de EA inferior a -8,5 kcal/mol (mediana) frente ao sítio de ligação do inibidor.

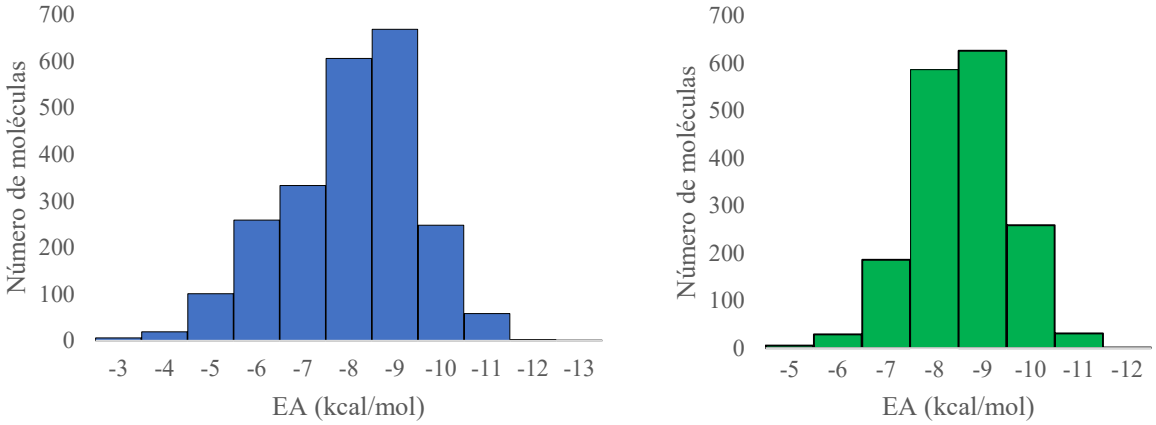


Figura 15. Distribuição do conjunto de moléculas filtradas pelo modelo farmacofórico de derivados tiazolidinas oriundas da base de dados Sigma-Aldrich por valor de energia de afinidade frente o sítio de ligação do cofator – A e inibidor – B.

As moléculas que passaram pelo ponto de corte com base no valor de EA (< mediana) são aquelas oriundas da base de dados Sigma-Aldrich que se alinharam ao modelo farmacofórico 3 (QFIT > 0), as quais possuem requisitos estéreo-eletrônicos para moléculas com atividade antiparasitária frente ao *Plasmodium falciparum* e apresentam afinidade frente ao sítio de ligação do inibidor e/ou cofator da *Pf*DHODH.

O programa de acoplamento molecular deve ser capaz de predizer modos de ligação entre uma molécula e seu alvo molecular o que implica em identificar de sua pose preferencial, energeticamente mais favorável (LEE *et al*., 2012). Uma análise baseada diretamente na estimativa de estimativa da energia livre de ligação pode favorecer a seleção de moléculas com maior massa molecular (MM) o que pode afetar adversamente a taxa de sucesso em ensaios biológicos (PAN *et al*., 2003). Nesse sentido, o conceito de eficiência de ligação (EL) pode ser aplicado (HOPKINS *et al*., 2014). Moléculas que possuem EL > a 0,4 kcal/mol/ átomo(-H) são moléculas promissoras, pois são passíveis de otimização estrutural com menor impacto em propriedades físico-químicas devido ao aumento da massa molecular (HOPKINS *et al*., 2014).

Dentre as 1.160 moléculas selecionadas com base nos parâmetros de busca para o sítio de ligação do cofator da *Pf*DHODH, 219 moléculas apresentam EL > 0,4 kcal/mol/átomo(-H);

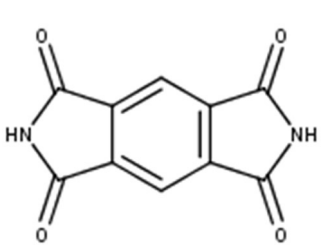
dentre as 1.206 moléculas selecionadas com base nos parâmetros de busca para o sítio de ligação do inibidor, 379 apresentaram valor de EL > 0,4 kcal/mol/átomo(-H).

Além das análises estruturais das moléculas nas etapas de TV, é importante que priorização de moléculas a ensaios biológicos leve em conta parâmetros de solubilidade aquosa. Uma das formas de estimar a solubilidade de moléculas em água é através do cálculo do coeficiente de partição octanol/água (*c*logP). Valores de *c*logP < 0,5 são considerados solúveis em água (LISTON et al. 2022; BERGSTRÖM, LARSSON 2018; FOYE, 2008). Dessa forma, as moléculas resultantes da triagem virtual por acoplamento molecular tiveram o valor de logP calculado (*c*logP) como descrito na seção 4.4.3. Dentre as moléculas que apresentaram valor de EA inferior à mediana e EL > 0,4 kcal/mol/átomo(-H), 45 e 74 moléculas apresentaram *c*logP <0,5 com base nos parâmetros de busca para o sítio do cofator e inibidor da *Pf*DHODH, respectivamente.

Após a aplicação dos critérios de seleção previamente estabelecidos para EA, EL e *c*logP, os três parâmetros foram utilizados para reclassificar as moléculas remanescente, no qual a molécula de código ZINC61493 (Z61493) está presente entre as 10 moléculas mais bem pontuadas em ambos parâmetros de busca para o sítio de ligação do cofator e inibidor e, dessa forma, foi selecionada para estudos de dinâmica molecular DM (Figura 16 e Tabela 6). Uma molécula com afinidade dual ao sítio de ligação do cofator e do inibidor pode impedir a formação do complexo enzima-cofator ou pode bloquear a ligação do agente oxidante e impedir o retorno do estado intermediário da enzima ao seu estado original.

Tabela 6. Critérios para seleção de moléculas por triagem virtual.

Z61493 **Sítio de ligação**	**EA** **(kcal/mol)**	***c*logP**	**EL** **kcal/mol/átomo(-H)**	**QFIT**
Cofator	-10,00	-0,18	-0,63	70,33
Inhibitor	-8,20		-0,51	



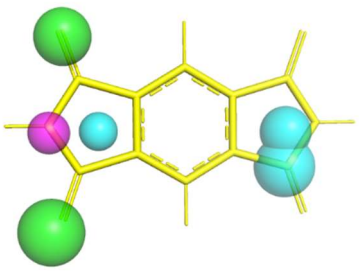


Figura 16. Z61493. Estrutura 2D – A. Sobreposição ao modelo farmacofórico de derivados tiazolidinas.

Apesar dos valores de EA demonstrarem um parâmetro razoável quanto ao encaixe das moléculas no sítio ativo, e, por conseguinte uma estratégia para classificação/priorização das moléculas, a descrição das interações intermoleculares é fundamental para a escolha de moléculas promissoras, bem como para a identificação do provável modo de interação que pode ser útil para o planejamento de novos inibidores. Dessa forma, as interações intermoleculares da molécula selecionada nas etapas de priorização foram analisadas com o auxílio do servidor Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) (Figuras 17 e 18).

Gly226, Lys229, Thr249, Asn274, Asn342, Lys429, Asn458, Ser477, Gly478, Gly507, Ser529 são reconhecidos para o sítio de ligação do cofator (ROSS ET AL., 2014). Na melhor pose do acoplamento molecular, a carbonila da amida da molécula Z61493 realiza interações de ligação de hidrogênio com os resíduos Lys229, Thr249, Lys429, Asn342, Asn458 e Ser477 e os anéis de cinco membros realizam interação do tipo empilhamento-pi com a Thr528 (Figura 17).

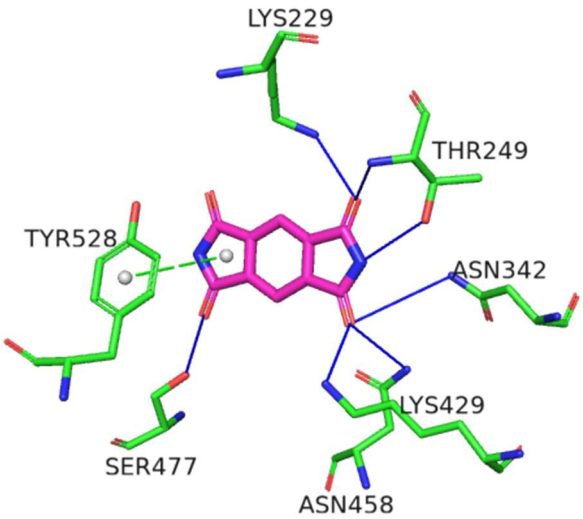


Figura 17. Interações intermoleculares realizadas entre a molécula Z61493 e alguns aminoácidos do sítio de ligação do cofator da *Pf*DHODH. Resíduos e ligante representados em bastões. Interações do tipo ligação de hidrogênio representado por linha sólida azul. Interações hidrofóbicas representadas por linha cinza tracejada. Átomos de nitrogênio representados em azul. Átomos de oxigênio representados em vermelho. Átomos de enxofre representados em amarelo. Átomos de carbono pertencentes a resíduos do sítio ativo representados em ciano. Átomos de carbono dos resíduos representados em rosa. Átomos de carbono dos ligantes representados em verde.

Para o sítio de ligação do inibidor são reconhecidos os seguintes resíduos: Tyr168, Phe171, Gly181, His185, Phe188, Ile263, Arg265, Leu531, Met536. Na pose do acoplamento molecular, a carbonila da amida da molécula Z61493 realiza interação de ligação de hidrogênio com a Leu172 e Met536; o nitrogênio da amida realiza interação de hidrogênio com a Phe171. Interações hidrofóbicas adicionais são realizadas entre o anel central e Leu172 e Phe188 (Figura 18). As interações com os resíduos Arg265, His185 e Leu531 foram relatadas como cruciais

para a ligação do ligante ao *Pf*DHODH (HEIKKILÄ et al., 2006). No entanto, essas interações não foram identificadas no acoplamento molecular. Uma análise de formação dessas interações com esses resíduos pode ser realizada em estudos de dinâmica molecular quando a liberdade conformacional é conferida ao sistema.

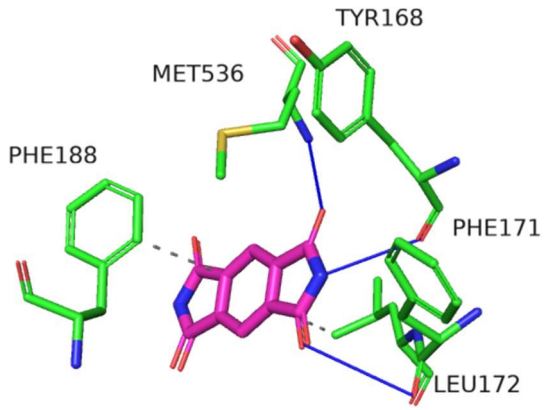


Figura 18. Interações intermoleculares realizadas entre a molécula Z61493 e alguns aminoácidos do sítio de ligação do inibidor. As interações intermoleculares estão representadas como descrito no título da Figura 17.

5.2.2. Triagem virtual por acoplamento molecular frente a *Pf*ENR (TVH-2)

Em estudos anteriores (COSTA JÚNIOR, 2021), a função de pontuação do programa AutoDock Vina 1.1.2 foi avaliada frente a *Pf*ENR (cód. PDB 3LT0 – resolução de 1,96Å). Nessa fase também foi avaliada a capacidade do programa em reproduzir a conformação cristalográfica do ligante através de cálculo de RMSD entre a melhor pose obtida por meio do programa e a conformação observada na estrutura cristalográfica. A pose de melhor pontuação encontrada com auxílio do programa AutoDock Vina 1.1.2 apresentou valor de RMSD de 0,40 Å (Figura 19, B), considerada uma solução satisfatória (inferior a 2Å). Logo após, a função de pontuação foi avaliada quanto a capacidade em discriminar moléculas ativas através da construção de uma curva ROC e cálculo de área sob a curva (AUC). A função de pontuação do programa AutoDock Vina 1.1.2 apresentou uma área sob a curva de 0,91 (Figura 19, C), considerado um método altamente preditivo.

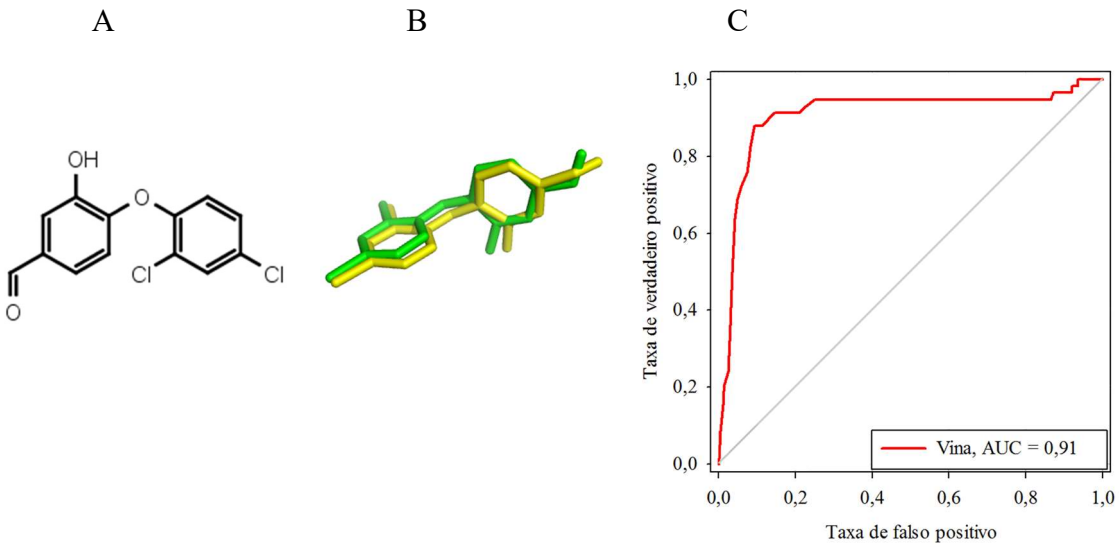


Figura 19. Etapas de avaliação do programa AutoDock Vina 1.1.2 (Vina). Estrutura química do ligante 4-(2,4-diclorofenol)-3-hidroxibenzaldeído – A. Sobreposição entre a pose mais bem pontuada obtida pelo acoplamento molecular com o programa Autodock Vina 1.1.2 e o ligante – B. Curva ROC obtida para a função de pontuação do programa AutoDockVina – C.

Nessa etapa, foram avaliadas as moléculas oriundas da base de dados DrugBank filtradas pelo modelo farmacofórico para inibidores da *Pf*ENR. Dessa forma, a energia de afinidade (EA) foi estimada para o conjunto de moléculas que possuem os requisitos estéreo-eletrônicos para inibidores da *Pf*ENR (301 moléculas – QFIT 0,75 – 89,33).

A distribuição das moléculas com base no valor de EA apresentou uma mediana de -6,6 kcal/mol (Figura 20). Após a aplicação dos critérios de seleção previamente estabelecidos para EA (< 6,6 kcal/mol), LE(<-0,4 kcal/mol/átomo-H) e *c*logP (<0,5), dentre as 301 moléculas selecionadas por modelo farmacofórico, 27 moléculas foram selecionadas.

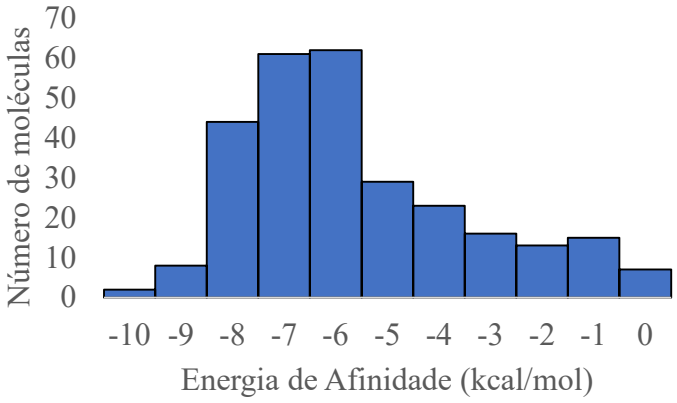


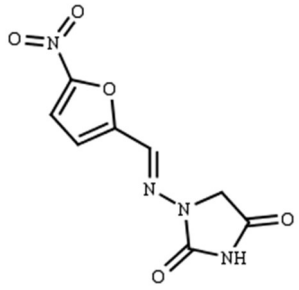
Figura 20. Distribuição das moléculas da base de dados DrugBank por valor de energia de afinidade.

Dentre as moléculas selecionadas através dos critérios de predefinidos, foram priorizadas cinco moléculas com base no custo para aquisição para serem encaminhadas para as etapas de avaliação da atividade antiparasitária e para estudo de dinâmica molecular (DM) (Tabela 7 e Figura 21).

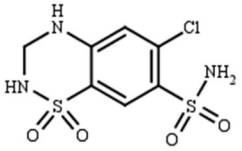
Tabela 7. Moléculas selecionadas com base nos critérios de EA, EL.

Molécula	EA (kcal/mol)	EL kcal/mol/átomo(-H)	Cotação* (R$)
Nitrofurantoína	-7,8	-0,46	0,04
Hidroclorotiazida	-7,1	-0,42	0,41
Acetazolamida	-6,8	-0,52	0,36
Metocarbamol	-6,8	-0,40	0,29
Dexpantenol	-6,7	-0,48	0,69

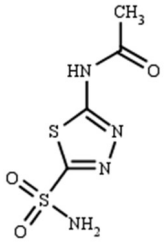
*Cotação do custo por mg realizada em maio de 2021.



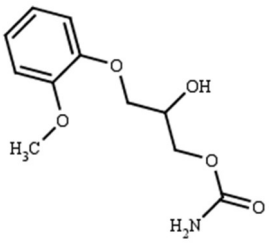
Nitrofurantoína



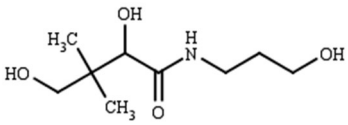
Hidroclorotiazida



Acetazolamida



Metocarbamol



Dexpantenol

Figura 21. Estrutura química das moléculas selecionadas com base nos criétios de EA, EL e *c*logP.

As interações intermoleculares foram analisadas pelo mesmo motivo mencionado anteriormente. Apesar da característica predominantemente hidrofóbica da região ocupada por inibidores da *Pf*ENR (Tyr-267, Tyr-277, Gly-313, Pro-314, Ala-320, Ile-323, Phe-368, Ile-369,

Ala-372, Ile-373), ligações de hidrogênio com a hidroxila de Tyr-267 e Tyr-277 parecem importantes para ligação do inibidor (FREUNDLICH *et al*., 2007). Dessa forma, as interações intermoleculares da molécula selecionadas nas etapas de priorização foram analisadas com o auxílio do servidor Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) (Figuras 22 a 26).

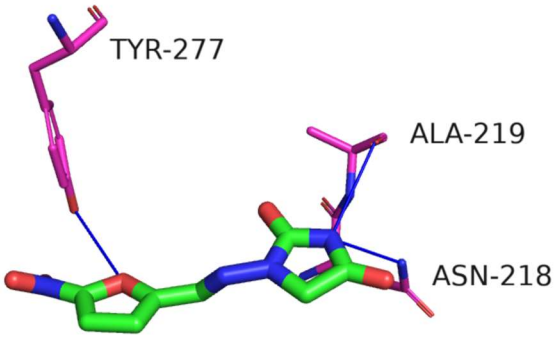


Figura 22. Interações intermoleculares realizadas entre a nitrofurantoína e alguns aminoácidos do sítio ativo da *Pf*ENR. As interações intermoleculares estão representadas como descrito no título da Figura 17.

Para a nitrofurantoína (Figura 22), foram identificadas as seguintes interações intermoleculares: ligação de hidrogênio entre a hidroxila do anel fenol da Tyr-277 e o oxigênio do anel furano da nitrofurantoína; ligação de hidrogênio entre o oxigênio da amida da cadeia principal da Ala-219 e a amina secundária da imidazolidina-2,4-diona da nitrofurantoína; ligação de hidrogênio entre o nitrogênio da amida da cadeia lateral da Asn-218 e a amina secundária da imidazolidina-2,4-diona da nitrofurantoína.

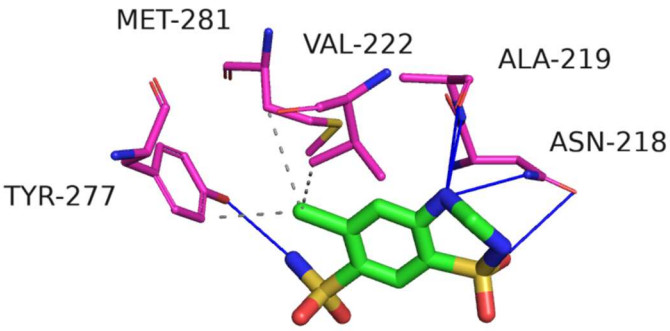


Figura 23. Interações intermoleculares realizadas entre a hidroclorotiazida e alguns aminoácidos do sítio ativo da PfENR. As interações intermoleculares estão representadas como descrito no título da Figura 17.

Para a hidroclorotiazida (Figura 23), foram identificadas as seguintes interações intermoleculares: ligação de hidrogênio entre a hidroxila do anel fenol da Tyr-277 e o oxigênio da sulfonamida da hidroclorotiazida; ligação de hidrogênio entre o oxigênio da amida da cadeia principal da Ala-219 e amina secundária do anel benzotiazida da hidroclorotiazida; ligação de hidrogênio entre o nitrogênio da amida da cadeia lateral da Asn-218 e o oxigênio da sulfonamida cíclica do anel benzotiazida da hidroclorotiazida; também foram identificadas ligações hidrofóbicas adicionais entre Tyr-277, Val-222 e Met-281 e a região do átomo de cloro ligado ao anel benzotiazida.

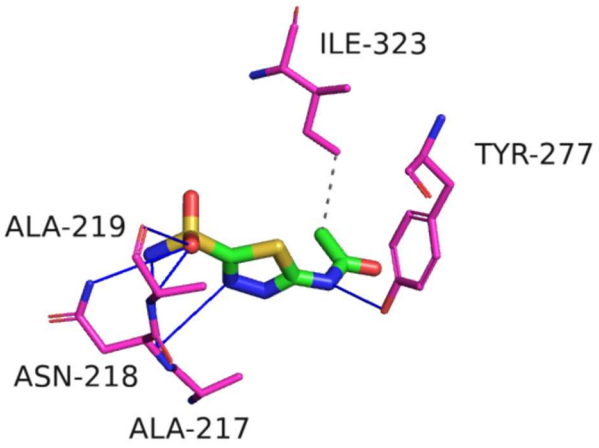


Figura 24. Interações intermoleculares realizadas entre a acetazolamida e alguns aminoácidos do sítio ativo da *Pf*ENR. As interações intermoleculares estão representadas como descrito no título da Figura 17.

Para a acetazolamida (Figura 24), foram identificadas as seguintes interações intermoleculares: ligação de hidrogênio entre a hidroxila do anel fenol da Tyr-277 e o oxigênio do grupo amida da acetazolamida; ligação de hidrogênio entre o oxigênio da amida da cadeia principal da Ala-219 e o oxigênio do grupo da sulfonamida da acetazolamida; ligação de hidrogênio entre o nitrogênio da amida da cadeia lateral da Asn-217 e o oxigênio do grupo sulfonamida da acetazolamida; ligação de hidrogênio entre o oxigênio da amida da cadeia principal da Ala-218 e o nitrogênio do grupo da sulfonamida; interação hidrofóbica entre a Ile-323 e a região do grupo amida da acetazolamida.

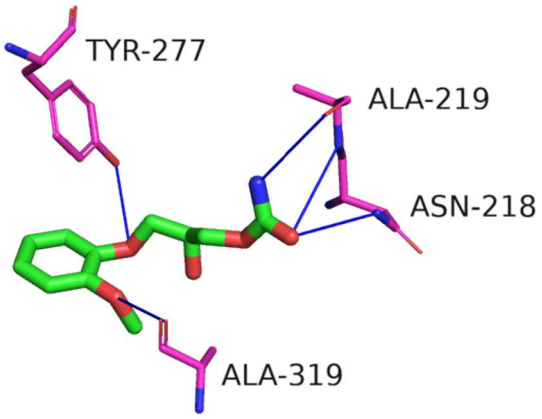


Figura 25. Interações intermoleculares realizadas entre o metocarbamol e alguns aminoácidos do sítio ativo da *Pf*ENR. As interações intermoleculares estão representadas como descrito no título da Figura 17.

Para a metocarbamol (Figura 25), foram identificadas as seguintes interações intermoleculares: ligação de hidrogênio entre a hidroxila do anel fenol da Tyr-277 e o oxigênio que conecta o anel à cadeia lateral do metocarbamol; ligação de hidrogênio entre o oxigênio da amida da cadeia principal da Ala-219 e nitrogênio do grupo amida do metocarbamol; ligação de hidrogênio entre o nitrogênio da amida da cadeia lateral da Asn-217 e o oxigênio do grupo amida da metocarbamol; ligação de hidrogênio entre o oxigênio da amida da cadeia principal da Ala-319 e o oxigênio da metoxila *orto*-substituída do anel aromático do metocarbamol.

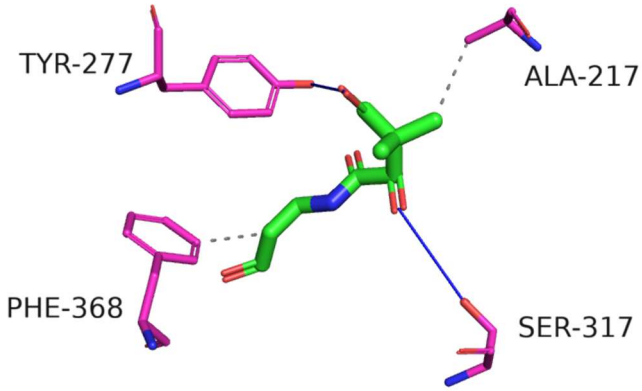


Figura 26. Interações intermoleculares realizadas entre o dexpanthenol e alguns aminoácidos do sítio ativo da *Pf*ENR. As interações intermoleculares estão representadas como descrito no título da Figura 17.

Para a dexpanthenol (Figura 26), foram identificadas as seguintes interações intermoleculares: ligação de hidrogênio entre a hidroxila do anel fenol da Tyr-277 e a hidroxila

do grupo metil hidroxilado ligado ao carbono quaternário do dexpanthenol; ligação de hidrogênio entre a hidroxila do grupo metil hidroxilado da Ser-317 e a hidroxila do grupo álcool secundário do dexpanthenol; também foram identificadas ligações hidrofóbicas adicionais entre Ala-217 e a região do carbono quaternário do dexpanthenol e entre a Phe-368 e a região do álcool propílico.

Apesar da técnica de acoplamento molecular possibilitar a predição do modo de ligação e estimar a afinidade de moléculas no sitio de ligação, simulações de Dinâmica Molecular (DM) devem ser realizadas a fim de avaliar a permanência e estabilidade das interações identificadas por acoplamento molecular.

5.3. SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR

Embora a técnica de acoplamento molecular possibilite a estimativa de afinidade de milhares de moléculas presentes em bancos de dados frente a diferentes alvos, ela não consegue contabilizar a flexibilidade total do complexo proteína-ligante e os efeitos da solvatação (YANG, 2010). Por esse motivo, a utilização das leis newtonianas do movimento pode contornar essa limitação, como as implementadas nas rotinas de dinâmica molecular. Dessa forma, torna-se possível a obtenção de informações do comportamento dinâmico de sistemas biológicos, os quais são fundamentais para o reconhecimento das interações fármaco-receptor e, portanto, úteis na identificação de moléculas bioativas e proposição do modo de ligação (SOTHISELVAM *et al*., 2014).

5.3.1. Estudos de dinâmica molecular com a *Pf*DHODH

Simulações de Dinâmica Molecular (MD) foram realizadas para a estrutura 3D *Pf*DHODH (PDB ID: 4CQ8). *Pf*DHODH é uma enzima dependente de mononucleotídeo de flavina (FMN). Por este motivo, a estabilidade do sistema foi avaliada utilizando as formas APO (sem ligante) e APO+FMN para comparar com os complexos obtidos com Z61493. No primeiro sistema, Z61493 foi posicionada no sítio de ligação do cofator (APO+Z61493) e no segundo, no sítio de ligação do inibidor (APO+FMN+Z61493) (Figura 27). A estabilidade dos sistemas foi avaliada através de cálculos de RMSD, raiz quadrada média de flutuação (RMSF) e análise de interações de ligações de hidrogênio.

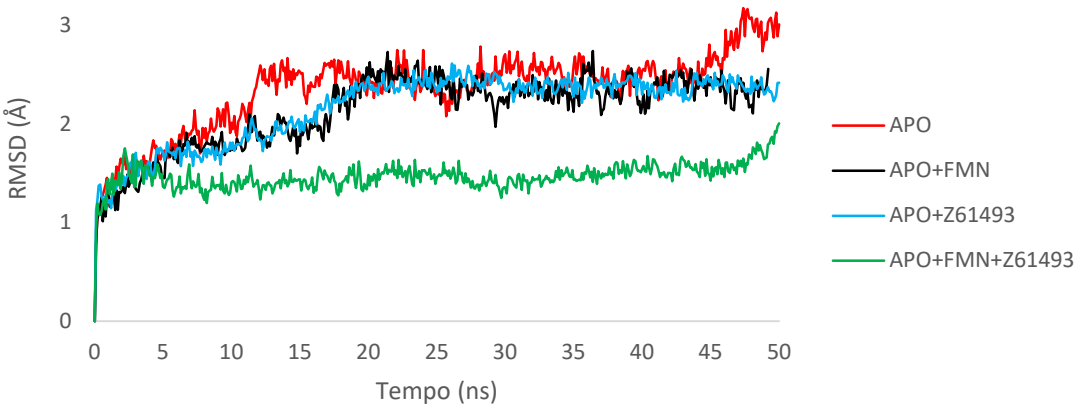


Figura 27. Gráfico de RMSD da cadeia principal da DHODH.

Para *Pf*DHODH, a forma APO apresentou valor RMSD de 3,35Å±0,040 e atingiu estabilidade em 10 nanossegundos (ns), portanto, obteve-se um total de 40 ns de dinâmica molecular "produtiva", que é a etapa em que o sistema atinge a estabilidade e os dados podem ser extraídos com precisão (COOKE; SCHMIDLER 2008). A forma APO+FMN apresentou valor de RMSD de 2,13Å±0,038 e obteve estabilidade em 20ns. A presença do cofator conferiu menor grau de desvio médio durante a trajetória e contribui para a redução do valor RMSD da forma APO+ FMN em comparação à forma APO devido à estabilização dos resíduos do sítio de ligação do FMN.

O FMN é essencial para a reação de redução do dihidroorotato em orotato. Desta forma, uma molécula capaz de se ligar aos locais de ligação do cofator e do inibidor pode impedir o início da reação ou impedir a liberação dos produtos da reação. O complexo APO+Z61493 apresentou valor RMSD de 2,16Å±0,035 e alcançou estabilidade em torno de 20 ns de simulação. O complexo APO+FMN+Z61493 apresentou valor RMSD de 1,47Å±0,013 e alcançou estabilidade em torno de 5ns de simulação. A presença de Z61493 no sítio do cofator mostrou RMSD durante toda trajetória muito similar ao complexo APO+FMN enquanto que o complexo APO+FMN+Z61493 apresentou uma maior estabilidade (RMSD = 1,47Å) em menor tempo de simulação (5 ns) (Figura 27).

Após a análise de RMSD, a obtenção da estabilidade foi determinada quando a estrutura flutua em torno de uma estrutura média e torna-se possível calcular o RMSF para os resíduos da estrutura. Assim, as análises do RMSF foram realizadas considerando a fase produtiva para as estruturas analisadas pelo RMSD (Figura 28).

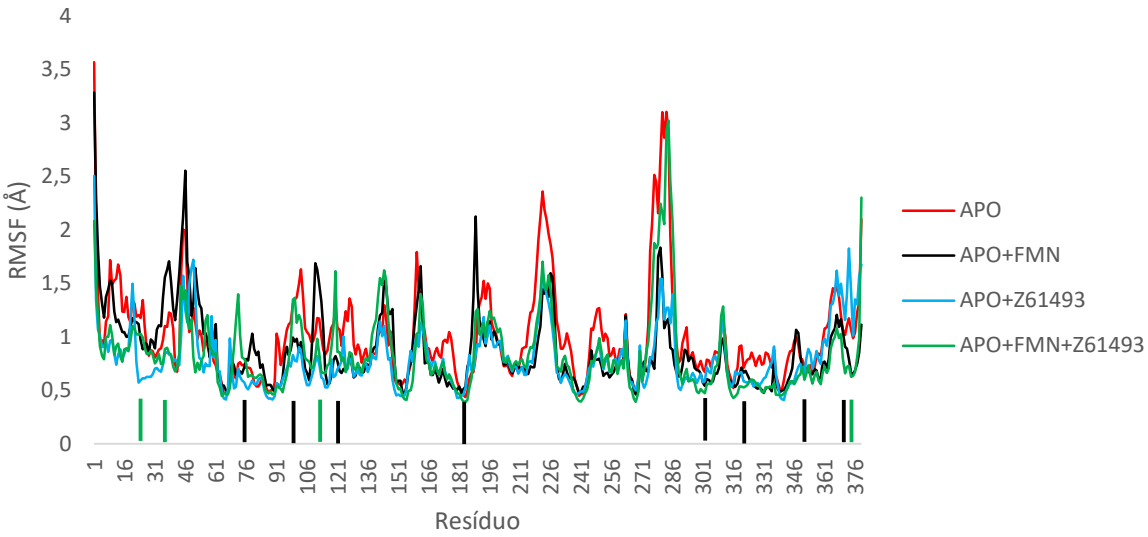


Figura 28. Gráficos de RMSF da cadeia principal dos aminoácidos da *Pf*DHODH. Marcações no eixo horizontal em verde para resíduos que interagem com o inibidor e em preto para resíduos que interagem com cofator.

A análise de RMSF para os complexos (Figura 28) mostrou que a maioria dos resíduos (mais de 95%) apresentou flutuações abaixo de 2Å. As regiões terminais, bem como a região entre os resíduos 271 e 289 pertencentes a região de alça apresentaram maior grau de flutuação por apresentarem, naturalmente maior mobilidade. No entanto, esta última não é uma região que faz parte do sítio de ligação. Por outro lado, alguns resíduos pertencentes ao sítio de ligação apresentaram maior estabilidade, principalmente na presença da molécula Z61493, o que indica a estabilidade do complexo (Figura 28).

As análises RMSD e RMSF desempenham um papel fundamental na interpretação dos dados. No entanto, durante a simulação, a estrutura adota uma série de conformações que podem ser agrupadas com base no desvio entre elas (KNAPP et al., 2011). A conformação média de cada um desses agrupamentos pode ser obtida como estrutura representativa o que permite avaliar as interações intermoleculares realizadas entre o ligante e alguns aminoácidos de sítio de ligação. Para avaliar interações intermoleculares realizadas pelas moléculas com alguns dos aminoácidos do sítio ativo, as respectivas estruturas representativas da DM foram selecionadas. Para tal, as conformações adotadas durante a trajetória na fase produtiva foram agrupadas ajustando-se o valor de corte de RMSD de modo que os três maiores grupos somaram mais de 50% do total da população (PITA; PASCUTTI, 2012). Dessa forma, a estrutura média do maior grupo foi selecionada para avaliação das interações intermoleculares (Tabela 8 e Figuras 29 e 30).

Tabela 8. Número de agrupamento, valor de corte de RMSD e percentual dos maiores grupos de conformações da *Pf*ENR.

Complexos	Número de agrupamentos	Valor de corte de RMSD (Å)	Percentual dos maiores grupos
APO+Z61493	14	1,58	81%
APO+FMN+Z61493	18	1,47	84%

Na estrutura representativa do complexo APO+Z61493, foram identificadas interações de ligações de hidrogênio com os resíduos Asn274, Gly277, Phe278 e Thr348 e interações hidrofóbicas adicionais com os resíduos Asn274 e Phe278 (Figura 29). As interações intermoleculares identificadas no acoplamento molecular não são mantidas na estrutura representativa. O acoplamento molecular é realizado com uma estrutura rígida da proteína. Por outro lado, nas simulações de dinâmica molecular, é considerado a flexibilidade total, da proteína com a consequente formação de diferentes interações intermoleculares em relação ao acoplamento molecular, além da presença de moléculas de água. Desta forma, análises das interações das ligações de hidrogênio durante a trajetória podem ser realizadas a fim de avaliar a permanência das interações identificadas no estudo de acoplamento molecular.

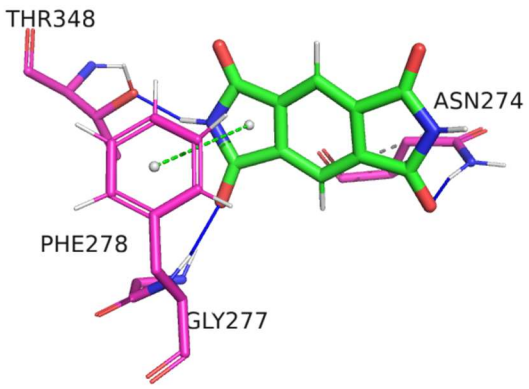


Figura 29. Interações intermoleculares realizadas entre a Z61493 e alguns aminoácidos do sítio de ligação do cofator da estrutura representativa da *Pf*DHODH. As interações intermoleculares estão representadas como descrito no título da Figura 17.

As interações de ligações de hidrogênio descritas na estrutura representativa são mantidas durante grande parte do tempo de simulação (10,0 <t < 90,03%), o que mostra a estabilidade dessas interações (Tabela 9).

Tabela 9. Percentual de formação de interações do tipo ligação entre a molécula Z61493 e sítio de ligação do cofator da *Pf*DHODH durante a simulação de DM.

Resíduo	Tempo de permanência (%)
Asn274	83,39
Cys276	11,30
Gly277	53,82
Phe278	77,08
Ser345	10,96
Ser345	22,59
Thr348	90,03
Asn428	19,27
Ala301	54,15

Na estrutura representativa do complexo APO+FMN+Z61493, as mesmas interações foram identificadas além de interações hidrofóbicas adicionais com Leu501 e Val502 e uma interação de ligação de hidrogênio do nitrogênio amida e Met506 (Figura 30). As interações com os resíduos Arg265, His185 e Leu531, assim como no acoplamento molecular, também não foram identificadas na estrutura representativa. Análises das interações de ligações de hidrogênio (principalmente com Arg265, His185 devido à sua maior suscetibilidade à realização de interações de ligações de hidrogênio) durante a trajetória podem ser realizadas a fim de avaliar o padrão de interações realizadas durante a trajetória de simulação MD.

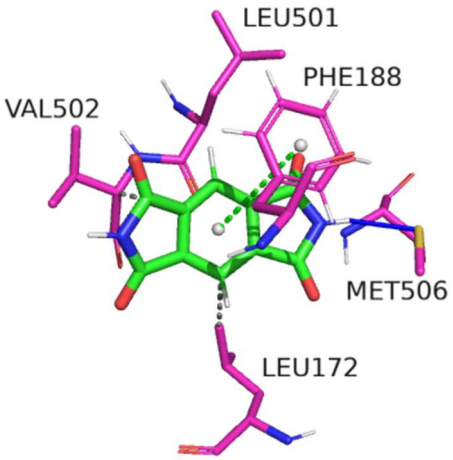


Figura 30. Interações intermoleculares realizadas entre a Z61493 e alguns aminoácidos do sítio de ligação do inibidor da estrutura representativa da *Pf*DHODH. As interações intermoleculares estão representadas como descrito no título da Figura 17.

Durante a trajetória foram identificadas interações de ligações de hidrogênio com His471 (18,07% das vezes). No entanto, não foram observadas interações de ligações de hidrogênio com Arg265 (Tabela 10). Com base em análises de interações intermoleculares, a molécula Z61493 parece ter maior afinidade pelo sítio de ligação do cofator. Isto pode ser avaliado através de estudos de cinética enzimática.

Tabela 10. Percentual de formação de interações do tipo ligação entre a molécula Z61493 e sítio de ligação do inibidor da *Pf*DHODH durante a simulação de DM.

Resíduo	Tempo de interação (%)
His41	18,07
Met506	6,72
Tyr498	1,26
Gly568	0,21

Além das limitações do acoplamento molecular a respeito da consideração de flexibilidade da proteína, as funções de pontuação geralmente consideram apenas interações de ligação, como ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas (KITCHEN et al., 2004). Isso exclui as contribuições da solvatação, tanto o deslocamento do solvente do sítio ativo quanto a estabilidade da molécula no solvente, e as contribuições entrópicas (MOBLEY; DILL, 2009). Existem abordagens para levar em conta essas discrepâncias como o Molecular Mechanics with Poisson Boltzmann and Surface Area solvation (MM-PBSA) (GENHEDEN; RYDE, 2015). Com base nessas informações, o método MM-PBSA foi empregado com o objetivo de avaliar a estabilidade e permanência das interações identificadas nas etapas de triagem virtual por acoplamento molecular.

A energia livre de ligação dos complexos foi estimada com a aplicação do método g_mmpbsa. Na análise no sítio cofator e inibidor, a energia livre de ligação foi negativa, o que indica um estado favorável (Tabela 11). A combinação de simulações MD e MM-PBSA pode ser utilizada para avaliar os complexos obtidos através do acoplamento molecular (KUMARI et al., 2014) e ser útil na priorização de moléculas para ensaios biológicos.

Tabela 11. Energia livre de ligação e seus componentes entre a molécula Z61493 e o sítio de ligação do cofator e ligante da *Pf*DHODH calculados através do g_mmpbsa.

Sítio de ligação	E_{vdW} (kJ/mol)	E_{Ele} (kJ/mol)	E_{MM} (kJ/mol)	G_{polar} (kJ/mol)	G_{apolar} (kJ/mol)	$\Delta G_{ligação}$ (kJ/mol)
Inibidor	-70,789	-18,966	-89,755	61,165	-7,402	-35,992
Cofator	-94,561	-53,902	-148,463	128,521	-11,382	-31,325

As análises dos valores de energia livre de ligação indicaram que Z61493 apresentou valores de ΔG semelhantes em relação ao sítio de ligação do cofator (-31,325 kJ/mol) e do ligante (-35,992 kJ/mol). Além disso, uma análise dos componentes individuais da energia livre de ligação indica que a energia livre de solvatação ($G_{solvatação}$) foi impulsionada positivamente por G_{polar} em detrimento de G_{apolar}. O termo $G_{solvatação}$ apresentou uma maior contribuição positiva para Z61493 no sítio do cofator (117,139 kJ/mol) em relação ao sítio do inibidor (53,763 kJ/mol). Essa diferença minimizou os efeitos da maior contribuição do termo E_{MM} para

o sítio do cofator (-94,561 kJ/mol) em relação ao sítio do inibidor (-70,789 kJ/mol). Em ambos os casos o termo E_{MM} que foi impulsionado principalmente pela E_{vdw} adicionada à E_{elec}.

A diferença do perfil de interações intermoleculares, realizadas em cada sítio de ligação pela mesma molécula Z61493, fica evidente quando se decompõe a componente E_{MM} nos termos E_{vdw} e E_{ele}. As contribuições do termo E_{ele} para o sítio cofator (-53,902 kJ/mol) são maiores que o dobro quando comparadas ao sítio inibidor (-18,966 kJ/mol). Por outro lado, esta diferença é compensada pela penalidade gerada pelo efeito de dessolvatação de grupos polares dos resíduos presentes no respectivo sítio de ligação, especialmente aquele que forma ligações de hidrogênio com moléculas de água. A molécula Z61493 tem um valor G_{polar} de 128,521 kJ/mol para o sítio cofator e 61,165 kJ/mol para o sítio inibidor.

Após os estudos de DM com a *Pf*DHODH, as moléculas oriundas das etapas de triagem virtual com a *Pf*ENR também foram encaminhadas para estudos de DM.

5.3.2. Estudos de dinâmica molecular com a *Pf*ENR

Foram realizadas simulações de Dinâmica Molecular (DM) com duração de 50ns com a estrutura da *Pf*ENR (PDB ID 3LT0) nas formas APO (sem ligante), APO+NADH e por fim, cada uma das moléculas selecionados nas etapas de triagem virtual foi empregada em complexo com a forma apo+NADH (Figura 31).

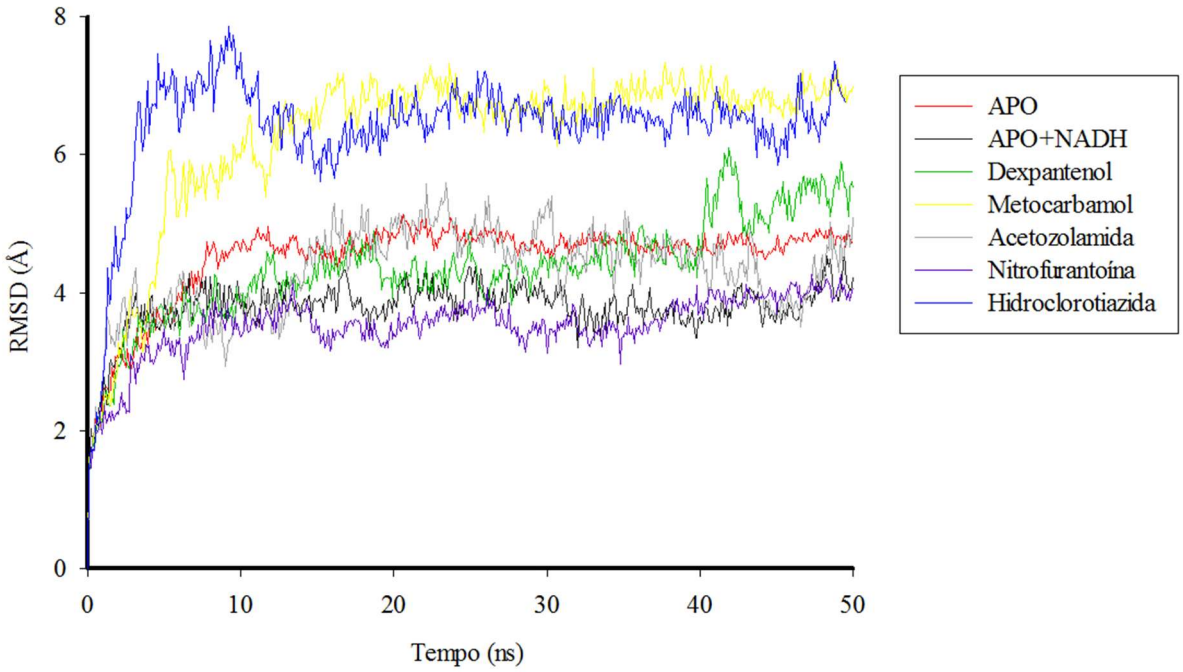


Figura 31. Gráfico de RMSD.

Para a *Pf*ENR, a forma APO apresentou valor RMSD de 4,343Å±0,061 e alcançou estabilidade em 8 ns. A forma APO+NADH apresentou valor de RMSD de 3,796Å±0,039 e alcançou estabilidade em 5ns. A presença do cofator contribuiu para a redução do valor de RMSD e do tempo necessário para alcançar a estabilização da forma APO+NADH em comparação com a forma APO devido à estabilização dos resíduos do sítio de ligação do NADH. Estudos demonstram que a *Pf*ENR apresenta um mecanismo de deslocamento duplo ("ping-pong"), evento catalítico pode ocorrer quando apenas um dos dois ligantes (cofator/substrato) está ligado à enzima (MEDEIROS *et al*., 2011), o que pode levar ao aumento da estabilidade na presença do NADH.

Embora a *Pf*ENR apresente mecanismo de deslocamento duplo, a maioria dos inibidores da *Pf*ENR requer a presença do cofator NAD(H) para a formação do complexo ternário estável (LINDERT; MCCAMMON, 2012). O complexo APO+NADH+dexpantenol apresentou valor de RMSD de 4,35Å e alcançou estabilidade próximo de 10ns de simulação. O complexo APO+NADH+metocarbamol apresentou valor de RMSD de 6,29Å e alcançou estabilidade por volta de 12ns de simulação. O complexo APO+NADH+acetozolamida apresentou valor de RMSD de 4,31Å e alcançou estabilidade por volta de 15ns de simulação. O complexo APO+NADH+nitrofurantoina apresentou valor de RMSD de 3,52Å e alcançou estabilidade por volta de 8ns de simulação. O complexo APO+NADH+hidroclorotiazida apresentou valor de RMSD de 6,41Å e alcançou estabilidade por volta de 10ns de simulação. Os valores de RMSD variaram estre 3,52 a 6,41Å o que pode acontecer devido ao tamanho da proteína (329 aminoácidos) embora os complexos APO+NADH+hidroclorotiazida e APO+NADH+metocarbamol tenham variações superiores à forma apo. No entanto, as flutuações dos resíduos não são uniformes ao longo da sequência e devem ser analisadas.

As análises de RMSF foram realizadas considerando a fase produtiva para as estruturas analisadas por RMSD (Figura 32).

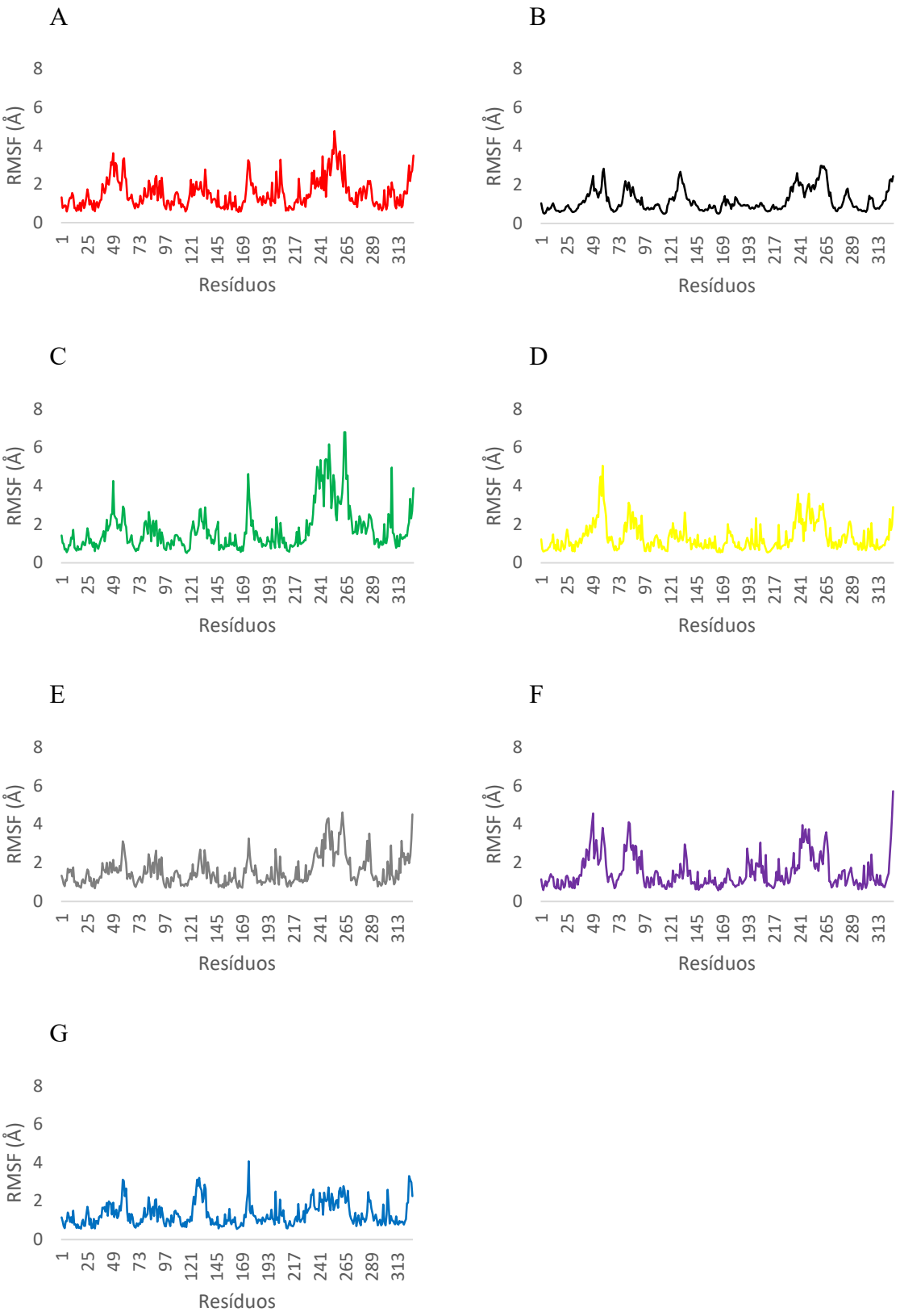


Figura 32. Gráficos de RMSF da cadeia principal dos aminoácidos da *Pf*ENR. APO – A. APO+NADH – B. APO+NADH+dexpantenol – C. APO+NADH+ metocarbamol – D. APO+NADH+ acetozolamida – E. APO+NADH+ nitrofurantoína – F. APO+NADH+ hidroclorotiazida – G.

A análise de RMSF para os complexos (Figura 32-C a G) demonstrou que a maior parte dos resíduos apresentaram flutuações abaixo de 2Å, com exceção do complexo APO+NADH+dexpantenol que apresentou maior variação de RMSD no intervalo de 40 a 50ns. Enquanto isso, para a forma APO grande parte dos resíduos apresentam flutuações acima de 2Å. Maiores flutuações podem ser observadas em regiões terminais e região de alça devido a sua maior flexibilidade. Com base nas análises de RMSF (Figura 32), observa-se que alguns dos principais resíduos conhecidos por interagirem com ligantes apresentaram maior estabilidade quando na presença das moléculas no sítio ativo em relação à forma APO. O resíduo Ile-323, o qual participa da estabilização do ligante no sítio de ligação, encontra-se próximo à região de alça que apresentam uma maior instabilidade. Isso pode explicar o ganho de estabilidade região de alça na presença das moléculas no sítio ativo em relação à forma APO (Figura 32).

Para avaliar interações intermoleculares realizadas pelas moléculas com alguns dos aminoácidos do sítio ativo, as respectivas estruturas representativas da DM foram selecionadas a partir das análises de agrupamentos de conformações adotadas durante a trajetória na fase produtiva através da aplicação de corte de valor de RMSD. Dessa forma, a estrutura média do maior grupo foi selecionada para avaliação das interações intermoleculares (Tabela 12 e Figuras 33 a 37).

Tabela 12. Número de agrupamento, valor de corte de RMSD e percentual dos maiores grupos de conformações da *Pf*ENR.

Complexo	Número de agrupamentos	Valor de corte de RMSD (Å)	Percentual dos maiores grupos
Nitrofurantoína	19	1,52	82%
Hidroclorotiazida	24	1,43	84%
Acetazolamida	21	1,54	71%
Metocarbamol	4	1,50	85%
Dexpantenol	6	1,55	62%

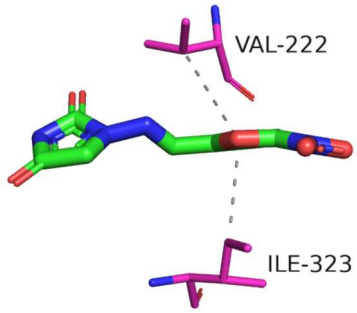


Figura 33. Interações intermoleculares realizadas entre a nitrofurantoína e alguns aminoácidos do sítio de ligação do substrato da estrutura representativa da *Pf*ENR. As interações intermoleculares estão representadas como descrito no título da Figura 17.

Para a nitrofurantoína (Figura 33), foram identificadas apenas interações hidrofóbicas entre a VAL-222 e ILE-323 e a região do anel furano da nitrofurantoína.

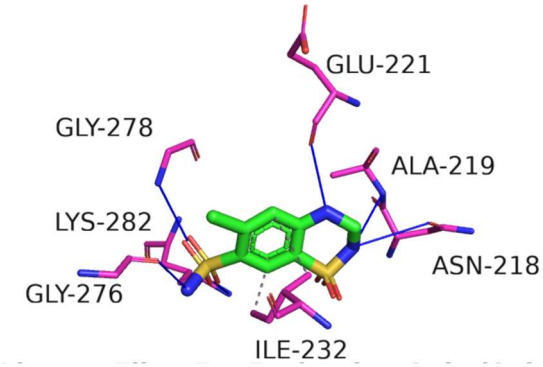


Figura 34. Interações intermoleculares realizadas entre a hidroclorotiazida e alguns aminoácidos do sítio de ligação do substrato da estrutura representativa da *Pf*ENR. As interações intermoleculares estão representadas como descrito no título da Figura 17.

Para a hidroclorotiazida (Figura 34), foram identificadas as seguintes interações intermoleculares: ligação de hidrogênio entre a o nitrogênio da amida da cadeia principal da Gly-278 e o oxigênio da sulfonamida da hidroclorotiazida; ligação de hidrogênio entre a o nitrogênio da amida da cadeia principal da Gly-276 e o nitrogênio da sulfonamida da hidroclorotiazida; ligação de hidrogênio entre a o nitrogênio da butilamina da Lys-282 e o oxigênio da sulfonamida da hidroclorotiazida; ligação de hidrogênio entre o oxigênio da amida da cadeia principal da Glu-221 e amina secundária do anel benzotiazida da hidroclorotiazida; ligação de hidrogênio entre o nitrogênio da amida da cadeia principal da Ala-219 e o nitrogênio da sulfonamida cíclica do anel benzotiazida da hidroclorotiazida; ligação de hidrogênio entre o nitrogênio da amida da cadeia lateral da Asn-218 e o nitrogênio da sulfonamida cíclica do anel

benzotiazida da hidroclorotiazida; também foram identificadas ligações hidrofóbicas adicionais entre Ile-323 e a porção fenólica do anel benzotiazida.

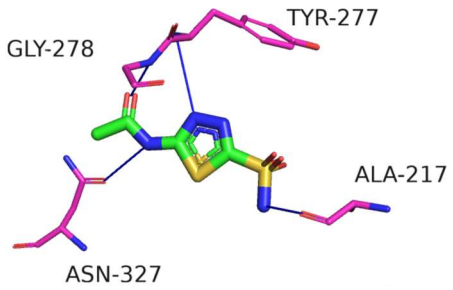


Figura 35. Interações intermoleculares realizadas entre a acetozolamida e alguns aminoácidos do sítio de ligação do substrato da estrutura representativa da *Pf*ENR. As interações intermoleculares estão representadas como descrito no título da Figura 17.

Para a acetazolamida (Figura 35), foram identificadas as seguintes interações intermoleculares: ligação de hidrogênio entre o nitrogênio da amida da cadeia principal da Tyr-277 e o nitrogênio do anel tiadiazol da acetazolamida; ligação de hidrogênio entre o oxigênio da amida da cadeia principal da Ala-217 e o nitrogênio do grupo da sulfonamida da acetazolamida; ligação de hidrogênio entre o oxigênio da amida da cadeia lateral da Asn-327 e o nitrogênio da amida da acetazolamida; ligação de hidrogênio entre o nitrogênio da amida da cadeia principal da Gly-278 e nitrogênio da amida da acetazolamida.

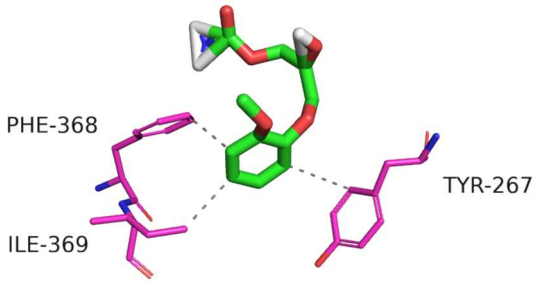


Figura 36. Interações intermoleculares realizadas entre a metocarbamol e alguns aminoácidos do sítio de ligação do substrato da estrutura representativa da *Pf*ENR. As interações intermoleculares estão representadas como descrito no título da Figura 17.

Para a metocarbamol (Figura 36), foram identificadas as seguintes interações intermoleculares: interações hidrofóbicas entre a Phe-368, Ile-369 e Tyr-267 e o anel aromático do metocarbamol.

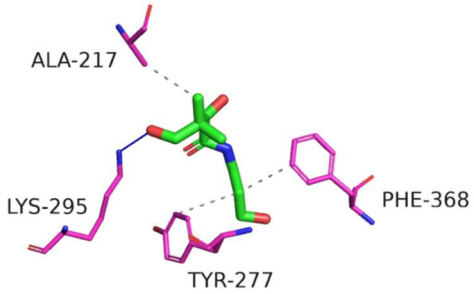


Figura 37. Interações intermoleculares realizadas entre a dexpantenol e alguns aminoácidos do sítio de ligação do substrato da estrutura representativa da *Pf*ENR. As interações intermoleculares estão representadas como descrito no título da Figura 17.

Para a dexpanthenol (Figura 37), foram identificadas as seguintes interações intermoleculares: ligação de hidrogênio entre o nitrogênio da butilamina da Lys-295 e a hidroxila do grupo metil hidroxilado ligado ao carbono quaternário do dexpanthenol; também foram identificadas ligações hidrofóbicas adicionais entre Ala-217 e a região do carbono quaternário do dexpanthenol e entre a Phe-368 e Tyr-277 e a região do álcool propílico.

Algumas interações identificadas por acoplamento molecular não foram reproduzidas na estrutura representativa da DM como interações do tipo empilhamento π com a Tyr-267 e ligações de hidrogênio com a Tyr-277. Isso se deve a acomodação do ligante no sítio ativo em ambiente com modelo solvatação e a formação de outras interações já descritas como ligações de hidrogênio (Figura 38).

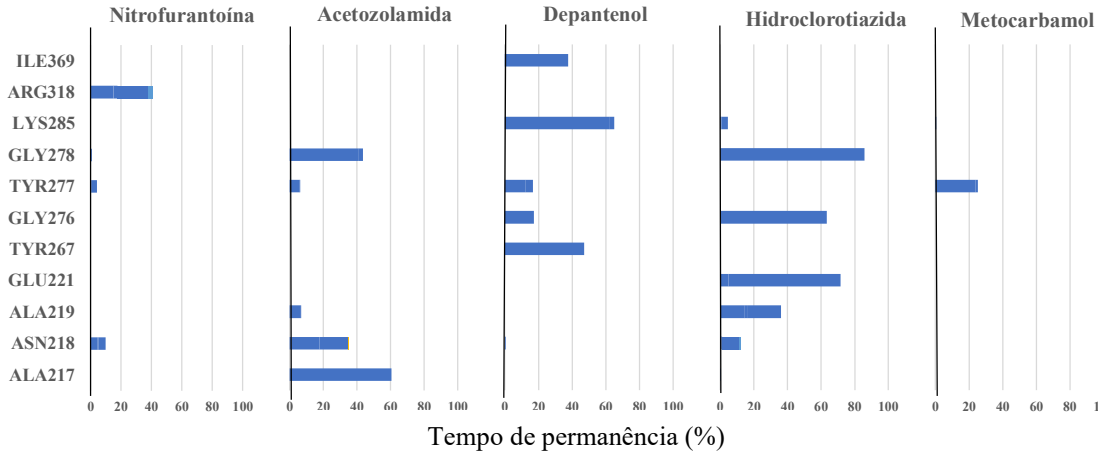


Figura 38. Gráfico de representação do percentual de formação de interações do tipo ligação de hidrogênio entre a nitrofurantoína, acetozolaminda, Dexpantenol, Hidroclorotiazida e metocarbamol e resíduos do sítio ativo da *Pf*ENR durante a simulação de DM.

Com a aplicação do método g_mmpbsa foi possível estimar a energia livre de ligação apenas para as formas proteína-ligante. Para todos os complexos, a energia livre de ligação foi favorável (-47,426 a -29,938 kJ/mol). Segundo uma análise das componentes da energia livre de ligação, energia de ligação eletrostática (E_{elec}) favorável (-62,717 a -4,996 kJ/mol) é acompanhada de uma energia polar de solvatação (G_{polar}) desfavorável (39,163 a 163,392 kJ/mol). Entretanto, as interações de van der Waals (E_{vdw}) e as energias solvatação apolar (G_{apolar}) de solvatação contribuem favoravelmente para associação das moléculas com a *Pf*ENR (Tabela 13). A combinação de simulações de DM e MM-PBSA pode ser utilizada para avaliar os complexos obtidos através do acoplamento molecular (KUMARI et al., 2014) e ser útil na priorização de moléculas a ensaios biológicos.

Tabela 13. Energia livre e seus componentes calculados através do g_mmpbsa.

Ligante	**E_{vdw} (kJ/mol)**	**E_{elec} (kJ/mol)**	**E_{MM} (kJ/mol)**	**G_{polar} (kJ/mol)**	**G_{apolar} (kJ/mol)**	**$\Delta G_{ligação}$ (kJ/mol)**
acetozolamida	-113,527	-38,228	-151,755	129,594	-12,089	-34,978
dexpantenol	-91,490	-41,042	-132,532	111,177	-12,354	-33,708
hidroclorotiazida	-124,296	-62,717	-187,013	163,392	-11,534	-35,156
metocarbamol	-112,670	-16,688	-129,358	95,285	-13,353	-47,426
nitrofurantoína	-57,330	-4,996	-62,326	39,163	-6,775	-29,938

5.4. ENSAIOS BIOLÓGICOS

5.4.1. Testes esquizonticidas e Citotoxicidade

Os ensaios fenotípicos são realizados com o uso de células intactas, portanto, podem garantir que as moléculas testadas são capazes de alcançar um determinado alvo biológico e potencialmente gerar a morte do parasito (ZHENG; THORNE; MCKEW, 2013). Dentre os parasitos do gênero *Plasmodium* spp., a única espécie capaz de ser cultivada continuamente *in vitro* é o *P. falciparum* por sua capacidade de invadir eritrócitos jovens e maduros (BILSLAND *et al*., 2018). Entretanto, esses ensaios devem ser realizados em conjunto com os ensaios de citotoxicidade, o qual é utilizado para avaliar a toxicidade e a viabilidade celular das moléculas testadas (ROGERO *et al*., 2000).

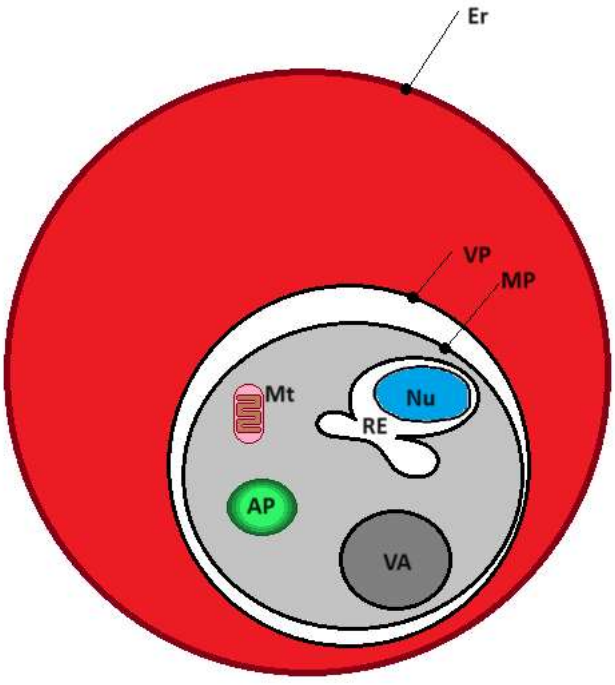
Foram determinados o efeito antimalárico (EC_{50}) e o efeito citotóxico (DL_{50}) das moléculas selecionadas nas etapas de triagem virtual, com exceção da acetazolamida. A razão entre os valores de DL_{50} e EC_{50} (índice de seletividade – IS) deve ser superior a 10 vezes, parâmetros esses, preconizados pela fundação Global Health Innovative Technology (GHIT) (KATSUNO *et al*., 2015).

Nos testes de citotoxicidade realizados em linhagem celular normal (WI-26VA4), o valor de DL_{50} foi determinado através do registro percentual de redução na absorbância. As moléculas testadas apresentaram valores de DL_{50} > 100µM (Tabelas 14). Geralmente, moléculas cuja concentração necessária para desencadear uma resposta biológica seja superior a 100 µg/mL é considerada inativa. Dessa forma, apenas a nitrofurantoína foi considerada ativa com valor EC_{50} de 13,92 ± 4,71 e IS de 7,18 (Tabela 14). Entretanto, é preconizado que as moléculas devam apresentar um valor de EC_{50} <1µM para cepas sensíveis e multirresistentes de *Plasmodium* spp. (KATSUNO *et al*., 2015).

Tabela 14. Valores de EC_{50} em cepa W2 (cloroquina-resistente) e citotóxicidade em WI-26VA4 (fibroblasto pulmonar ATCC CCL-75) e índice de seletividade (IS).

Molécula	**DL_{50} (µM)** **WI-26-VA4 ± DP**	**EC_{50} (µM)** ***P. falciparum* ± DP**	**IS**
Nitrofurantoína	>100	13,92 ± 4,71	7,18
Dexpantenol	>100	>300	-
Hidroclorotiazida	>100	330,05 ± 4,57	0,30
Metocarbamol	>100	259,20 ± 4,59	0,38
Cloroquina	>100	0,66 ± 0,41	151,51

As moléculas consideradas ativas em ensaios fenotípicos atravessam diversas barreiras biológicas para alcançar seu alvo molecular (CARTON; MALATESTA, 2022). A ENR encontra-se dentro de uma organela chamada apicoplasto a qual possui quatro membranas, além disso, o parasito encontra-se envolto em um vacúolo parasitóforo dentro do eritrócito (Figura



39) (BANERJEE et al., 2012). Portanto, nos ensaios fenotípicos, as moléculas ativas devem atravessar um total de sete membranas plasmáticas.

Figura 39. Representação esquemática de eritrócito infectado com *Plasmodium*. Eritrócito (Er); vacúolo parasitóforo (VP); membrana plasmática do parasito (MP); núcleo (Nu); retículo endoplasmático (RE); vacúolo alimentar (VA); mitocôndria (Mt) e apicoplasto (AP).

Outras moléculas com potencial afinidade frente ao seu alvo podem apresentar um perfil de permeabilidade baixo em membranas plasmáticas, portanto, não são capazes de alcançar uma concentração efetiva para modular seu alvo molecular em doses seguras (SWINNEY, 2013).

Para melhorar o perfil de permeabilidade de moléculas em membrana plasmática, existem abordagens tradicionais como o desenvolvimento de um pró-fármaco (moléculas que necessitam de biotransformação para se tornarem ativas) e outras mais modernas como a namoencapsulação. Uma outra estratégia é a modificação estrutural para incremento de lipossolubilidade. Essa estratégia possui uma autolimitação, uma vez que o incremento de lipossolubilidade diminui a solubilidade aquosa e a biodisponibilidade oral dos fármacos. Entretanto, essa estratégia pode apresentar um custo mais baixo de formulação do medicamento com biodisponibilidade oral se comparado a abordagens mais modernas (YANG; HINNER, 2015). E por esse motivo foi realizado um estudo de permeabilidade em membrana com a nitrofurantoína e derivados.

5.5. MODELO DE AVALIAÇÃO DE PERMEABILIDADE EM BICAMADA

Uma série de modificações no esqueleto estrutural da nitrofurantoína foi proposto a fim de avaliar a afinidade frente à *Pf*ENR e o perfil de permeabilidade em membrana plasmática através de modelo computacional. Para tanto, foi realizada a inserção de grupos metil (-CH3), halogênios (Cl e F) e anel aromático substituído (4 ou 2,4-substituído) e não substituído que sabidamente conferem incremento de lipossolubilidade. Dessa forma, um total de 23 moléculas (APÊNDICE A) foram avaliadas quanto ao valor de EA e *c*logP (Figura 40). As moléculas com menor valor de EA e maior valor de *c*logP (quarto quadrante – Figuras 40 e 41) foram analisadas. De modo a avaliar o quarto quadrante com um maior grau de cobertura, foi possível selecionar quatro moléculas para avaliação do perfil de permeabilidade em membrana plasmática, as quais apresentam valores de *c*logP e EA em níveis baixo, intermediário e alto.

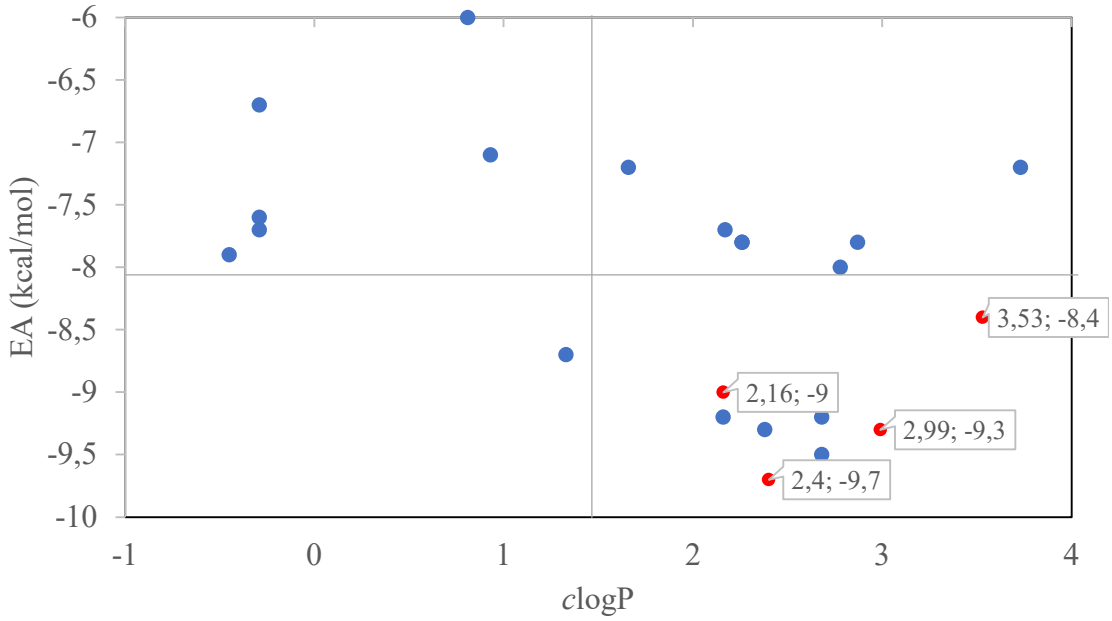
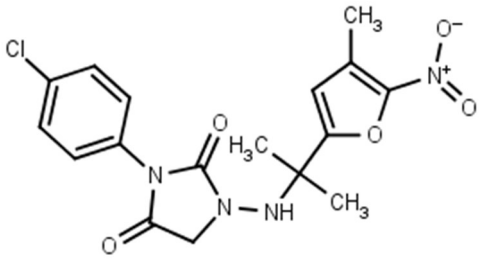
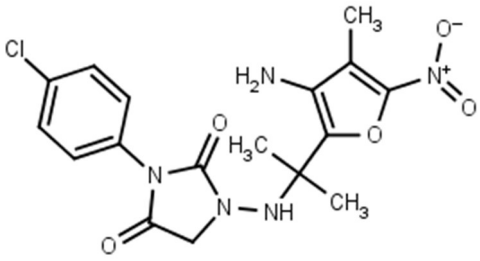


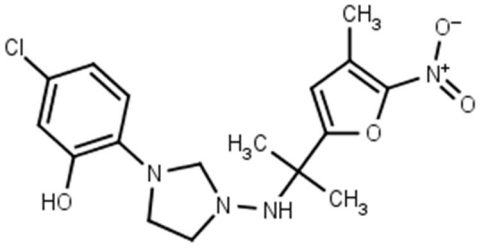
Figura 40. Gráfico de relação entre *c*logP e EA. Moléculas selecionadas com representantes em vermelho.



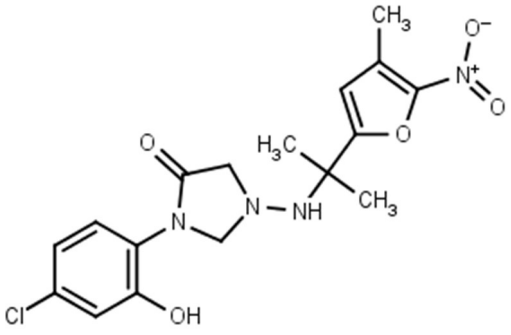
14
EA = -9,3 Kcal/mol
*c*logP = 2,99



18
EA = -9,0 Kcal/mol
*c*logP = 2,16



21
EA = -8,4 Kcal/mol
*c*logP = 3,53



22
EA = -9,7 Kcal/mol
*c*logP = 2,40

Figura 41. Estrutura 2D das moléculas selecionadas com base na relação *c*logP e energia de afinidade.

A inserção de um anel aromático substituído gerou derivados que apresentaram melhor perfil de afinidade contra *Pf*ENR e aumento no valor de *c*logP, além disso, foi possível melhorar o perfil de complementaridade ao sítio ativo da *Pf*ENR. O anel 4-clorofenil presente nas

moléculas 14, 18 e 22 ocuparam uma cavidade hidrofóbica formada pelos resíduos de Tyr-267, Phe-368, Pro-314, Ala-372 e Ile-369. No acoplamento molecular da nitrofurantoína, esta região não foi ocupada, assim como para a molécula 21 (Figura 42). Assim, o perfil de permeabilidade da membrana da nitrofurantoína e das moléculas 14, 18, 21 e 22 foi analisado através de simulações de DM. Além disso, a molécula Z61493 também foi incluída nessa análise

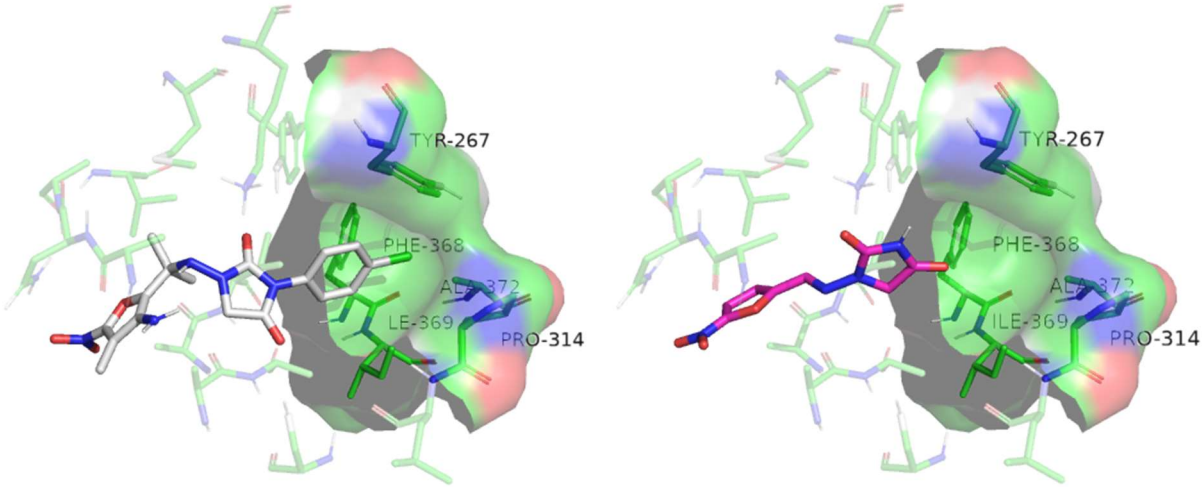


Figura 42. Pose geradas pelo acoplamento molecular no sítio ativo do *Pf*ENR. Molécula 18 – A; nitrofurantoína B. Moléculas representadas em bastão. Átomos de nitrogênio representados em azul. Átomos de oxigênio representados em vermelho. Átomos de carbono pertencentes a resíduos do sítio ativo representados em verde. Os átomos de carbono da molécula 18 são mostrados em cinza e da nitrofurantoína, em rosa. Superfície de Van der Waals representada na cor do respectivo átomo.

Existe diversos métodos para avaliação e/ou predição do perfil de permeabilidade passiva de moléculas através de membranas plasmáticas *in vivo* e *in vitro* como o ensaio de permeabilidade de membrana artificial paralela (do inglês, *parallel artificial membrane permeability assay* – PAMPA) (LOMIZE et al., 2019). Simulações de DM tem a vantagem de fornecer uma maneira de estudar a difusão no nível de uma única molécula e produz dados dinâmicos e termodinâmicos detalhados utilizados para calcular coeficientes de permeabilidade (BEMPORAD; ESSEX; LUTTMANN, 2004; SHINODA, 2016).

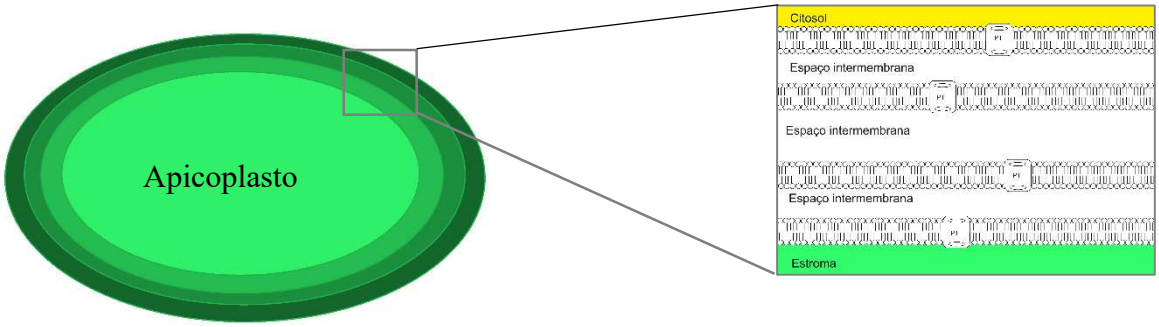


Figura 43. Representação esquemática do conjunto de quatro membranas pertencentes ao apicoplasto. Proteínas transmembranas – PT.

A última barreira biológica para os inibidores da ENR é o conjunto de quatro bicamadas lipídicas do apicoplasto (BANERJEE et al., 2012) (Figura 43). Dois fosfolipídios compõem aproximadamente 40% da membrana do apicoplasto (BOTTÉ et al. 2013). Dessa forma, o 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC – 34:1) e o 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE – 34:1) foram selecionados para a construção de um modelo simplificado de bicamada lipídica e estudo de permeabilidade em bicamada por DM. Modelos simplificados são utilizados para avaliação de permeabilidade passiva de fármacos, por exemplo, através da barreira hematoencefálica (LIANG et al., 2023; THAI; THEODORAKIS; LI, 2020). Inicialmente, a estabilidade da bicamada lipídica foi avaliada através do cálculo da área por lipídio (APL), a qual considera os eixos x e y (Figura 44).

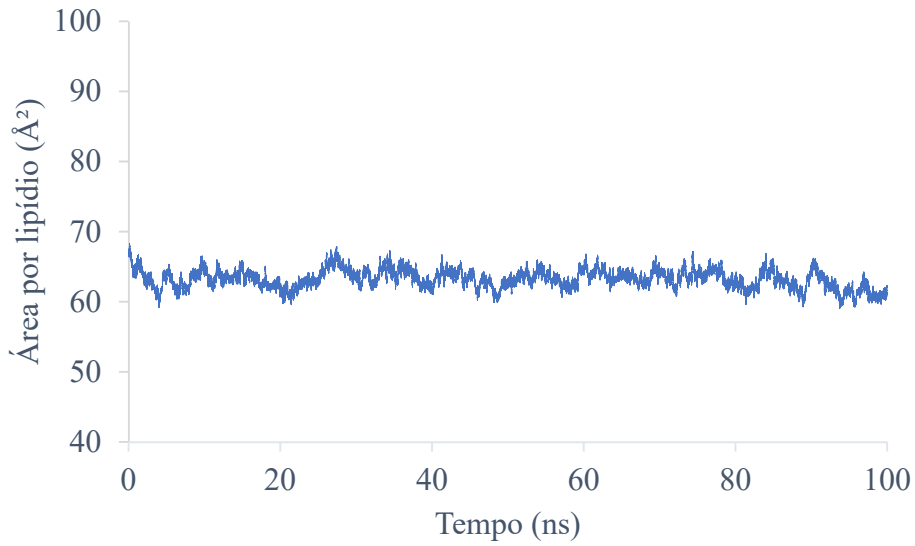


Figura 44. Gráfico da variação da área por lipídio durante a trajetória.

A APL de uma bicamada fornece informações importantes sobre uma bicamada lipídica, devido à sua alta sensibilidade à atração hidrofílica entre grupos de "cabeça" e repulsão hidrofóbica entre caudas de hidrocarbonetos apolares (CHABAN, 2014). O valor de APL foi de 63,22 Å² para o modelo contento dois tipos de lipídios (POPC e POPE). Esse valor está de acordo com modelos de único tipo de lipídio para POPC (entre 63 e 66Å²) e POPE (58 a 59,7 Å²) (PLUHACKOVA et al., 2016; SMABY et al., 1997; HYSLOP et al., 1990). Além disso, a área superficial por lipídio se manteve estável durante o tempo de simulação (figura 44).

Em uma bicamada, as moléculas lipídicas estão em um arranjo consecutivo com seus grupos polares (*Head groups*) expostos à fase aquosa e com um núcleo apolar formado por cadeias acilas. Esta organização das moléculas cria regiões horizontais distintas dentro da bicamada com propriedades contrastantes (PASENKIEWICZ-GIERULA et al., 2016). Essa

organização e a sua estabilidade pode ser analisada através do perfil de densidade parcial dos componentes do sistema (Figura 45).

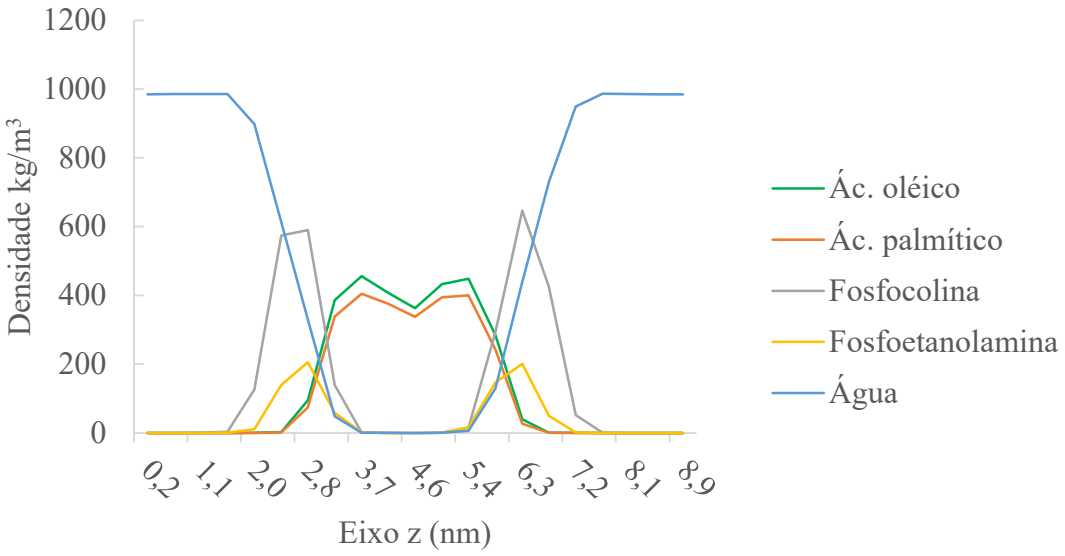


Figura 45. Gráfico de representação da densidade parcial dos componentes da bicamada lipídica.

Devido à complexidade de simulação do sistema de bicamada lipídica, a fluidez correta foi avaliada determinando o perfil de densidade parcial do sistema ao longo do eixo z (Figura 45). Os fosfolipídios foram analisados com base nas regiões polares ou *Head groups* (fosfocolina e fosfoetanolamina) e das cadeias hidrocarbonadas (ácido palmítico e ácido oléico). É observada uma menor densidade no centro da bicamada devido à desordem das caudas lipídicas (Figura 45). Nesse sentido, a espessura da membrana foi de aproximadamente 3,85 nm. Esse valor está de acordo modelos de bicamada composta por POPC e POPE (entre 3,78 e 4,33 nm) (PLUHACKOVA et al., 2016), no qual desordens do tipo interdigitações entre as duas camadas da membrana não são observadas.

A interface bicamada/água é uma região complexa constituída por moléculas de água, cujo número diminui com a profundidade da bicamada. Essa região, onde a densidade dos *Head groups* cai para menos de 10% a partir do seu pico, apresentou valor inferior a 1 nm, implicando mínimo movimento lipídico perpendicular e penetração de água (Figura 45). Essas informações demostram a estabilidade estrutural do modelo de bicamada lipídica construído para avaliação da permeabilidade em membrana da nitrofurantoína e das moléculas 14, 18, 21, 22 e Z61493 através do perfil de energia livre (Figura 46).

As moléculas 14, 18, 21 apresentaram valor de ΔG menor que a nitrofurantoína durante a trajetória (Tabela 15). As moléculas 14 e 18 apresentaram valores menores e mais próximos (-110.011 e -118.021 kJ/mol, respectivamente). A molécula 22 apresentou valor de ΔG maior

que a nitrofurantoína. Este comportamento pode ser analisado avaliando o perfil ΔG durante a passagem de cada molécula pela bicamada (Figura 46)

Tabela 15. Energia livre de ligação média.

Molécula	ΔG (kJ/mol)
Nitrofurantoína	-67,708
14	-110,011
18	-118,021
21	-79,846
22	-57,967
Z61493	-73.109

O perfil de energia livre foi calculado utilizando o potencial de força média baseado no Constant force (Figura 46).

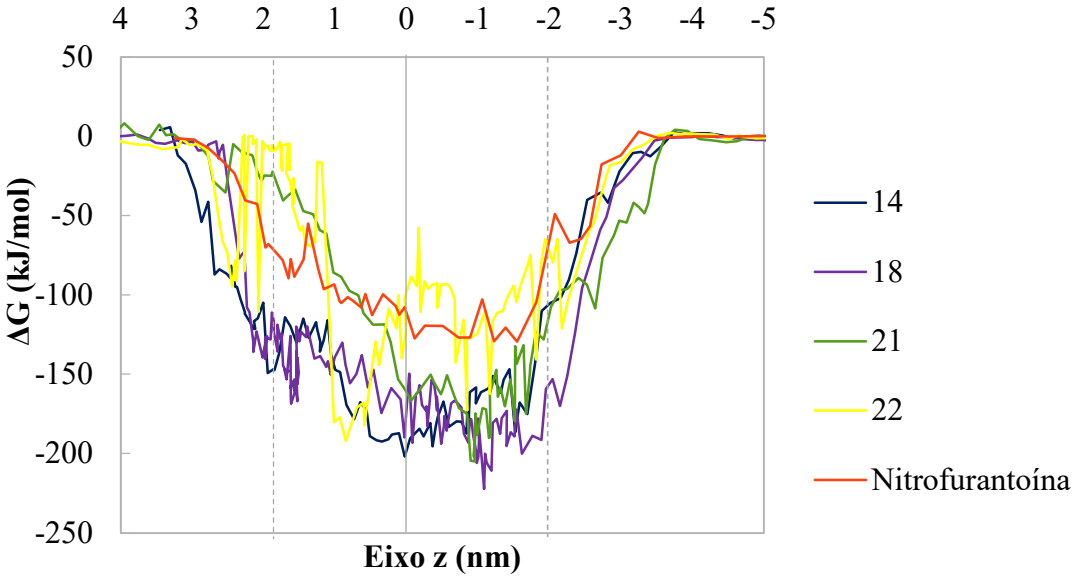


Figura 46. Gráfico de energia livre das moléculas 14, 18, 21, 22 e nitrofurantoína através da bicamada ao longo do eixo z.

Todas as moléculas apresentaram um perfil de energia livre semelhante ao atravessar a bicamada lipídica, com exceção da molécula 22. Há uma diminuição do valor de energia livre com a aproximação das moléculas à interface da água/bicamada. Uma diminuição constante do valor de energia livre pode ser observada na fase lipídica e um mínimo global é alcançado após passar pelo centro de massa da bicamada. A molécula 22 apresentou uma grande oscilação do valor de energia livre com a aproximação da interface da água/bicamada. Um mínimo global é alcançado na fase lipídica antes de alcançar o centro de massa da bicamada lipídica, a partir da qual o valor de energia livre volta a oscilar.

As moléculas 14, 18 e 22 apresentaram um valor de energia menor que a nitrofurantoína ao atravessar a bicamada lipídica o que pode representar um melhor perfil de permeabilidade passiva em membrana plasmática e possivelmente aumentar sua concentração próximo ao seu alvo molecular.

As moléculas Z61493 apresentou um valor de $\Delta G_{ligação}$ de -73.109 kJ/mol durante a trajetória. O perfil ΔG durante a passagem pela bicamada foi analisado (Figura 47). Há uma diminuição no valor da energia livre à medida que as moléculas se aproximam da interface água/bicamada. Uma diminuição constante no valor da energia livre pode ser observada na fase lipídica e um mínimo global é alcançado após passar pelo centro de massa da bicamada.

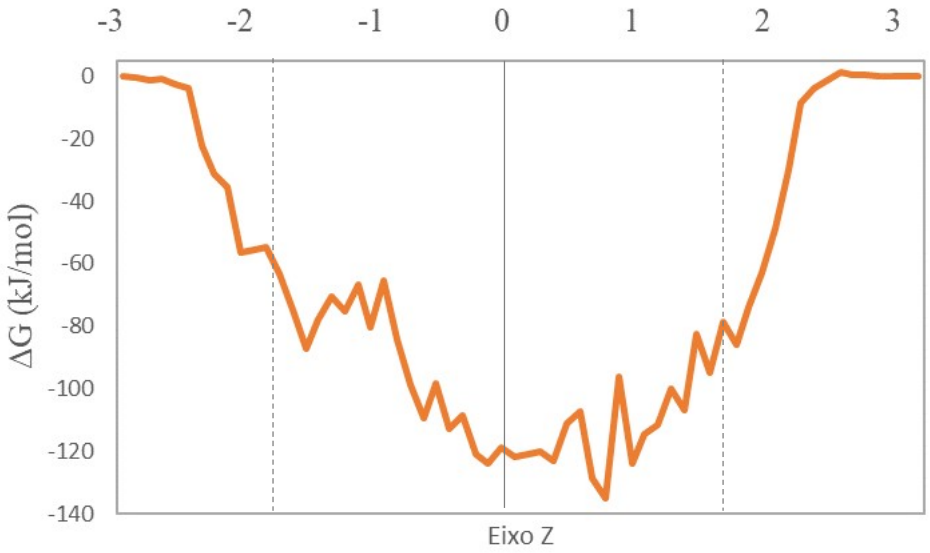


Figura 47. Gráfico de energia livre de Z61493 através da bicamada ao longo do eixo z.

A aplicação dos parâmetros de busca para *Pf*ENR e *Pf*DHODH foi capaz de priorizar moléculas a ensaios biológicos. As moléculas possuem requisitos estéreo-eletrônicos para inibidores da *Pf*ENR ou para moléculas com atividade frente ao *P. falciparum* baseado em derivados tiazolidinas. Além disso, apresentam afinidade ao sítio ativo da *Pf*ENR ou a ambos os sítios de ligação do inibidor e cofator da *Pf*DHODH. A estabilidade e permanência das interações intermoleculares foram avaliadas através de estudos de DM e cálculo de energia livre de ligação.

As moléculas selecionadas com bases nos parâmetros de busca para *Pf*ENR foram avaliadas por ensaios biológicos frente ao *P. falciparum* e a nitrofurantoína apresentou atividade antiparasitária no intervalo do baixo micromolar (EC_{50} = 13,92 µM). Uma melhora de atividade antiparasitária foi proposta através da proposição de derivados com grupos que conferem maior grau de lipossolubilidade e avaliação da permeabilidade em modelo de

bicamada lipídica. Dessa forma, a viabilidade de síntese das moléculas 14, 18 e 22 pode ser avaliada, além disso, a moléculas Z61493 pode ser adquirida para avaliação da atividade antiparasitária frente ao *P. falciparum*.

6. CONCLUSÃO

Nesse estudo, foram utilizados dados experimentais e computacionais obtidos em estudos anteriores para auxiliar na priorização de moléculas a ensaios fenotípicos através de triagem virtual hierárquica (TVH) (modelo farmacofórico e acoplamento molecular).

Inicialmente, um conjunto de 19 derivados tiazolidina com atividade antimalárica (0,118 - 0,414 μM) foi utilizado para construção e avaliação de modelos farmacofóricos. Moléculas presentes em base de dados Sigma-Aldrich foram alinhadas ao melhor modelo. Dentre aquelas moléculas com requisitos estéreo-eletrônico para moléculas com atividade antimalárica (QFIT > 0), a molécula ZINC61493 (Z61493) atendeu aos critérios estabelecidos no acoplamento molecular (energia afinidade – EA < mediana; eficiência de ligação – EL > 0,4) para os parâmetros dos sítios de ligação do cofator e do inibidor da diidroorotato desidrogenase de *Plasmodium falciparum* (*Pf*DHODH) e foi encaminhada para estudos de dinâmica molecular (DM).

Posteriormente, moléculas oriundas da base de dados DrugBank foram avaliadas através de protocolo definido em estudos anteriores (modelo farmacofórico para inibidores da Enoil-ACP redutase de *P. falciparum* (*Pf*ENR) e acoplamento molecular). As moléculas que atenderam aos critérios estabelecidos para EA e EL foram encaminhadas para estudos DM e ensaios fenotípicos.

As estratégias de TVH e reposicionamento de fármacos com base nos parâmetros de busca determinados para *Pf*ENR foram suficientes para priorizar moléculas a ensaios fenotípicos e/ou estudos de dinâmica molecular. Quatro moléculas foram encaminhadas para avaliação da atividade antiparasitária frente a cepa W2 cloroquina-resistente de *P. falciparum* (EC_{50} between 330.05 and 13.92 μM). A nitrofurantoína apresentou atividade antiparasitária no intervalo do baixo micromolar (EC_{50} = 13,92 μM). Entretanto, candidato a antimaláricos devem apresentar atividade abaixo e 1 μM. Investigações foram realizadas para avaliar a capacidade de moléculas em atravessar as diversas barreiras biológicas e alcançar seu alvo molecular. Por essa razão, análogos da nitrofurantoína foram propostos e avaliados por *c*logP e EA frente a *Pf*ENR, dentre essas, quatro moléculas foram selecionadas para avaliar o perfil de permeabilidade em modelo de bicamada lipídica através de estudos de DM. As moléculas 14, 18, 21 e Z61493 apresentaram menores valores de energia livre que a nitrofurantoína ao cruzar a bicamada lipídica. A viabilidade de síntese das moléculas 14, 18, 21 pode ser avaliação a fim de encaminhar a ensaios fenotípicos.

REFERÊNCIAS

ABBRUZZESE, Claudia et al. Drug repurposing for the treatment of glioblastoma multiforme. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 36, p. 1-11, 2017.

ABRAHAM, Mark James et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1, p. 19-25, 2015.

AGUIAR, A. C. C.; ROCHA, E. M. D.; SOUZA, N. B. D.; FRANÇA, T. C.; KRETTLI, A. U. New approaches in antimalarial drug discovery and development: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 831-845, 2012.

ANDRADE, Carolina Horta *et al*. Abordagem racional no planejamento de novos tuberculostáticos: inibidores da InhA, enoil-ACP redutase do M. tuberculosis. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo , v. 44, n. 2, p. 167-179, 2008.

BALDWIN, Jeffrey et al. Malarial dihydroorotate dehydrogenase: substrate and inhibitor specificity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 44, p. 41827-41834, 2002.

BANERJEE, Tanushree et al. 15-deoxyspergualin hinders physical interaction between basic residues of transit peptide in PfENR and Hsp70-1. **IUBMB life**, v. 64, n. 1, p. 99-107, 2012.

BARINGHAUS, Karl-Heinz; HESSLER, Gerhard. Fast similarity searching and screening hit analysis. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 3, p. 197-202, 2004.

BELLO, Martiniano; MARTÍNEZ-ARCHUNDIA, Marlet; CORREA-BASURTO, José. Automated docking for novel drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 8, n. 7, p. 821-834, 2013.

BEMPORAD, Daniele; ESSEX, Jonathan W.; LUTTMANN, Claude. Permeation of small molecules through a lipid bilayer: a computer simulation study. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 108, n. 15, p. 4875-4884, 2004.

BERGSTRÖM, Christel AS; LARSSON, Per. Computational prediction of drug solubility in water-based systems: Qualitative and quantitative approaches used in the current drug discovery and development setting. **International journal of pharmaceutics**, v. 540, n. 1-2, p. 185-193, 2018.

BHAUMIK, Prasenjit *et al*. Structural biology of the thioester-dependent degradation and synthesis of fatty acids. **Currentopinion in structuralbiology**, v. 15, n. 6, p. 621-628, 2005.

BIELSKA, Ewa *et al*. Virtual screening strategies in drug design–methods and applications. **BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology**, v. 92, n. 3, p. 249-264, 2011.

BILSLAND, Elizabeth *et al*. Plasmodium dihydrofolate reductase is a second enzyme target for the antimalarial action of triclosan. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1038, 2018.

BOTTÉ, Cyrille Y. et al. Atypical lipid composition in the purified relict plastid (apicoplast) of malaria parasites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 18, p. 7506-7511, 2013.

BRAGA, Rodolpho C.; ANDRADE, Carolina H. Assessing the performance of 3D pharmacophore models in virtual screening: how good are they?. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 13, n. 9, p. 1127-1138, 2013.

BUTCHER, G. Antimalarial drugs and the mosquito transmission of Plasmodium. **International Journal for Parasitology**, v. 27, p. 975 - 987, 1997.

CARMICHAEL, J. *et al*. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. **Cancer Reserarch**, v. 47, p.943-946, 1987.

CARTON, Flavia; MALATESTA, Manuela. In vitro models of biological barriers for nanomedical research. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 16, p. 8910, 2022.

CHABAN, Vitaly. Computationally efficient prediction of area per lipid. **Chemical Physics Letters**, v. 616, p. 25-29, 2014.

CHE, Jane Nchangnwi *et al*. Chemokines responses to Plasmodium falciparum malaria and co-infections among rural Cameroonians. **Parasitology international**, v. 64, n. 2, p. 139-144, 2015.

CHEMAXON. MarvinSketch version 5.12.1. [S.l]: ChemAxon, [2013?].

CHEN, Jie et al. De novo nucleotide biosynthetic pathway and cancer. **Genes & Diseases**, 2022.

COOKE, Ben; SCHMIDLER, Scott C. Statistical prediction and molecular dynamics simulation. **Biophysical journal**, v. 95, n. 10, p. 4497-4511, 2008.

COSCONATI, Sandro *et al*. Virtual screening with AutoDock: theory and practice. **Expert opinion on drug discovery**, v. 5, n. 6, p. 597-607, 2010.

COSTA JUNIOR, David Bacelar et al. A novel antiplasmodial compound: integration of in silico and in vitro assays. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 40, n. 14, p. 6295-6307, 2022.

COSTA JUNIOR, David Bacelar et al. Identification of novel antiplasmodial compound by hierarquical virtual screening and in vitro assays. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 39, n. 9, p. 3378-3386, 2021.

COSTA JÚNIOR, David Bacelar. **Triagem virtual e avaliação in vitro de moléculas com atividade frente ao *Plasmodium falciparum.*** 2019. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

DA SILVA, Alan W. S.; VRANKEN, Wim F. ACPYPE-Antechamber python parser interface. **BMC research notes**, v. 5, p. 1-8, 2012.

DANIEL, Krische. The glitazones: proceed with caution. Western Journal of Medicine, v. 173, n. 1, p. 54, 2000.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Juornal Immonol Methods**. V. 89, n. 2, p. 271-277, 1986.

DOMBROWSKI, Jamille Gregório et al. Mapping and characterizing areas with high levels of malaria in pregnancy in Brazil: A spatiotemporal analysis. **The Lancet Regional Health-Americas**, v. 12, p. 100285, 2022.

DONDORP, Arjen M. *et al*. The relationship between age and the manifestations of and mortality associated with severe malaria. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 2, p. 151-157, 2008.

ECKERT, Hanna; BAJORATH, Jürgen. Molecular similarity analysis in virtual screening: foundations, limitations and novel approaches. **Drug discovery today**, v. 12, n. 5, p. 225-233, 2007.

FOYE, William O. **Foye's principles of medicinal chemistry**. Lippincott williams & wilkins, 2008.

FRANÇA, Tanos CC; SANTOS, Marta G. dos; FIGUEROA-VILLAR, José D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1271-1278, 2008.

FREARSON, Julie A. *et al*. Target assessment for antiparasitic drug discovery. **Trends in parasitology**, v. 23, n. 12, p. 589-595, 2007.

FREUNDLICH, Joel S. *et al*. X-ray structural analysis of Plasmodium falciparum enoyl acyl carrier protein reductase as a pathway toward the optimization of triclosan antimalarial efficacy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 35, p. 25436-25444, 2007.

FREVERT, Ute; NACER, Adéla. Fatal cerebral malaria: a venous efflux problem. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.** v. 4, n. 155, p. 1-7, 2014.

GANELLIN, C. R.; LINDBERG, P.; MITSCHER, L. A. Glossary of terms used in medicinal chemistry. 1998.

GANESAN, Aravindhan; COOTE, Michelle L.; BARAKAT, Khaled. Molecular dynamics-driven drug discovery: leaping forward with confidence. **Drug discovery today**, v. 22, n. 2, p. 249-269, 2017.

GAO, Liping et al. Impact of the COVID-19 pandemic on malaria control in Africa: A preliminary analysis. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 8, n. 1, p. 67, 2023.

GARCIA, Klauss Kleydmann Sabino et al. Malaria time series in the extra-Amazon region of Brazil: epidemiological scenario and a two-year prediction model. **Malaria Journal**, v. 21, n. 1, p. 1-11, 2022.

GARCIA, L. S. Malaria**. Clinics in Laboratory Medicine**, v. 30, n. 1, p. 93-129, 2010.

GASTEIGER, Johann; MARSILI, Mario. Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, v. 36, n. 22, p. 3219-3228, 1980.

GENHEDEN, Samuel; RYDE, Ulf. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. **Expert opinion on drug discovery**, v. 10, n. 5, p. 449-461, 2015.

GIGLIARANO, Chiara; FIGINI, Silvia; MULIERE, Pietro. Making classifier performance comparisons when ROC curves intersect. **Computational Statistics & Data Analysis**, v. 77, p. 300-312, 2014.

GOEL, Pranshul; GERRIETS, Valerie. **Europe PMC**, Chloroquine. 2019.

GREENSTONE, Gerry. The revival of thalidomide: from tragedy to therapy. **BCMJ**, v. 53, n. 5, p. 230-233, 2011.

GRINTER, Sam Z. ; ZOU, Xiaoqin. Challenges, Applications, and Recent Advances of Protein-Ligand Docking in Structure-Based Drug Design. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 10150-10176, 2014.

HEIKKILÄ, Timo et al. The first de novo designed inhibitors of Plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 16, n. 1, p. 88-92, 2006.

HOPF, Fernanda SM et al. Bacterial enoyl-reductases: the ever-growing list of fabs, their mechanisms and inhibition. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 891610, 2022.

HOPKINS, Andrew L. *et al*. The role of ligand efficiency metrics in drug discovery. **Nature reviews Drug discovery**, v. 13, n. 2, p. 105-121, 2014.

HOPKINS, Andrew L.; GROOM, Colin R. The druggable genome. **Nature reviews Drug discovery**, v. 1, n. 9, p. 727-730, 2002.

HUMPHREY, William; DALKE, Andrew; SCHULTEN, Klaus. VMD: visual molecular dynamics. **Journal of molecular graphics**, v. 14, n. 1, p. 33-38, 1996.

HYSLOP, Paul A.; MOREL, Benoit; SAUERHEBER, Richard D. Organization and interaction of cholesterol and phosphatidylcholine in model bilayer membranes. **Biochemistry**, v. 29, n. 4, p. 1025-1038, 1990.

JAIN, Viral S.; VORA, Dhagash K.; RAMAA, C. S. Thiazolidine-2, 4-diones: Progress towards multifarious applications. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 21, n. 7, p. 1599-1620, 2013.

JAMSHIDZADEH, Akram *et al*. Antimalarial drugs-induced hepatic injury in rats and the protective role of carnosine. 2016.

JELINEK, Tomas. Artemisinin based combination therapy in travel medicine. **Travel medicine and infectious disease**, v. 11, n. 1, p. 23-28, 2013.

JO, Sunhwan et al. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. **Journal of computational chemistry**, v. 29, n. 11, p. 1859-1865, 2008.

JOURDAN, Jean-Pierre et al. Drug repositioning: a brief overview. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 72, n. 9, p. 1145-1151, 2020.

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

KITCHEN, Douglas B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature reviews Drug discovery**, v. 3, n. 11, p. 935-949, 2004.

KNAPP, Bernhard et al. Is an intuitive convergence definition of molecular dynamics simulations solely based on the root mean square deviation possible?. **Journal of Computational Biology**, v. 18, n. 8, p. 997-1005, 2011.

KROVAT, Eva M.; LANGER, Thierry. Non-peptide angiotensin II receptor antagonists: chemical feature based pharmacophore identification. **Journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 5, p. 716-726, 2003.

KUMAR, Gyanendra et al. Discovery of a rhodanine class of compounds as inhibitors of Plasmodium falciparum enoyl-acyl carrier protein reductase. **Journal of medicinal chemistry**, v. 50, n. 11, p. 2665-2675, 2007.

KUMAR, Gyanendra et al. SAR and pharmacophore models for the rhodanine inhibitors of Plasmodium falciparum enoyl-acyl carrier protein reductase. **IUBMB life**, v. 62, n. 3, p. 204-213, 2010.

KUMARI, Rashmi et al. g_mmpbsa–A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. **Journal of chemical information and modeling**, v. 54, n. 7, p. 1951-1962, 2014.

KUO, Mack R. *et al*. Targeting tuberculosis and malaria through inhibition of enoyl reductase compound activity and structural data. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 23, p. 20851-20859, 2003.

LAMBROS, C., VANDERBERG, J.P., Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. **J. Parasitol.** v. 65, p. 418–20, 1979.

LANGER, T.; HOFFMAN, R. D. **Pharmacophores and Pharmacophore Searches.** Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, FRG, p. 395, 2006.

LÄTTI, Sakari; NIINIVEHMAS, Sanna; PENTIKÄINEN, Olli T. Rocker: open source, easy-to-use tool for AUC and enrichment calculations and ROC visualization. **Journal of cheminformatics**, v. 8, p. 1-5, 2016.

LEE, Hui Sun *et al*. Application of binding free energy calculations to prediction of binding modes and affinities of MDM2 and MDMX inhibitors. **Journal of chemical information and modeling**, v. 52, n. 7, p. 1821-1832, 2012.

LEE, Jumin et al. CHARMM-GUI supports the Amber force fields. **The Journal of chemical physics**, v. 153, n. 3, 2020.

LIANG, Yanshu et al. Predicting Blood–Brain Barrier Permeation of Erlotinib and JCN037 by Molecular Simulation. **The Journal of Membrane Biology**, v. 256, n. 2, p. 147-157, 2023.

LINDERT, Steffen; MCCAMMON, J. Andrew. Dynamics of Plasmodium falciparum enoyl-ACP reductase and implications on drug discovery. **Protein Science**, v. 21, n. 11, p. 1734-1745, 2012.

LISTON, Lord Sam et al. Chemical permeation enhancers for topically-applied vitamin C and its derivatives: A systematic review. **Cosmetics**, v. 9, n. 4, p. 85, 2022.

LOMIZE, Andrei L. et al. PerMM: A web tool and database for analysis of passive membrane permeability and translocation pathways of bioactive molecules. **Journal of chemical information and modeling**, v. 59, n. 7, p. 3094-3099, 2019.

LÓPEZ-MUÑOZ, Francisco; UCHA-UDABE, Ronaldo; ALAMO, Cecilio. The history of barbiturates a century after their clinical introduction. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 1, n. 4, p. 329-343, 2005.

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

LU, Hao; TONGE, Peter J. Inhibitors of FabI, an enzyme drug target in the bacterial fatty acid biosynthesis pathway. **Accounts of chemical research**, v. 41, n. 1, p. 11-20, 2008.

MAITY, Koustav *et al*. X-ray crystallographic analysis of the complexes of enoyl acyl carrier protein reductase of Plasmodium falciparum with triclosan variants to elucidate the importance of different functional groups in enzyme inhibition. **IUBMB life**, v. 62, n. 6, p. 467-476, 2010.

MALDE, Alpeshkumar K. et al. An automated force field topology builder (ATB) and repository: version 1.0. **Journal of chemical theory and computation**, v. 7, n. 12, p. 4026-4037, 2011.

MARTINEZ, Edson Zangiacomi; LOUZADA-NETO, Francisco; PEREIRA, de Bragança Basílio. A curva ROC para testes diagnósticos. **Cad Saúde Coletiva**, v. 11, n. 1, p. 7-31, 2003.

MASSENGO-TIASSÉ, R. Prisca; CRONAN, John E. Diversity in enoyl-acyl carrier protein reductases. **Cellular and molecular life sciences**, v. 66, n. 9, p. 1507-1517, 2009.

MATSUZAKI, W. S. et al. Uso de teste de químio-sensibilidade para escolha da quimioterapia adjuvante no câncer gástrico avançado. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 33, n. 4, p. 228–234, jul. 2006.

MEDEIROS, Patrícia Soares de Maria de *et al*. Enzyme Mechanism and Slow-Onset Inhibition of Plasmodium falciparum Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase by an Inorganic Complex. **Enzyme research**, v. 2011, 2011.

MENDEZ, David et al. ChEMBL: towards direct deposition of bioassay data. **Nucleic acids research**, v. 47, n. D1, p. D930-D940, 2019.

MOBLEY, David L.; DILL, Ken A. Binding of small-molecule ligands to proteins:"what you see" is not always "what you get". **Structure**, v. 17, n. 4, p. 489-498, 2009.

MONTANARI, Carlos Alberto. **Química Medicinal:** Métodos e Fundamentos em Planejamento de Fármacos, 2008. 720 p.

MUENCH, Stephen P. *et al*. Studies of Toxoplasma gondii and Plasmodium falciparum enoyl acyl carrier protein reductase and implications for the development of antiparasitic agents. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 63, n. 3, p. 328-338, 2007.

MUSHTAQUE, M.; SHAHJAHAN S. Reemergence of chloroquine (CQ) analogs as multi-targeting antimalarial agents: a review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 90, p. 280-295, 2015.

MYSINGER, Michael M. *et al*. Directory of useful decoys, enhanced (DUD-E): better ligands and decoys for better benchmarking. **Journal of medicinal chemistry**, v. 55, n. 14, p. 6582-6594, 2012.

NADEEM, M. F. et al. Molecular Epidemiology of Plasmodium species in Conflicted Federally Administered Tribal Area (FATA) Pakistan. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, 2021.

NDONG, Ignatius C. *et al*. Trends in malaria case management following changes in the treatment policy to artemisinin combination therapy at the Mbakong Health Centre, Cameroon 2006–2012: A retrospective study. **Acta tropica**, v. 150, p. 100-106, 2015.

NOSENGO, Nicola. Can you teach old drugs new tricks?. **Nature**, v. 534, n. 7607, p. 314-316, 2016.

OLIVEIRA, J. S. *et al*. Enoyl reductases as targets for the development of anti-tubercular and anti-malarial agents. **Current drug targets**, v. 8, n. 3, p. 399-411, 2007.

OLSSON, Mats HM et al. PROPKA3: consistent treatment of internal and surface residues in empirical p K a predictions. **Journal of chemical theory and computation**, v. 7, n. 2, p. 525-537, 2011.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). **Report on the Situation of Malaria in the Americas 2017**. Washington, 2017.

PAN, Xiaoqin et al. Deep learning for drug repurposing: Methods, databases, and applications. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, p. e1597, 2022.

PAN, Yongping *et al*. Consideration of molecular weight during compound selection in virtual target-based database screening. **Journal of chemical information and computer sciences**, v. 43, n. 1, p. 267-272, 2003.

PAN, Yongping et al. Consideration of molecular weight during compound selection in virtual target-based database screening. **Journal of chemical information and computer sciences**, v. 43, n. 1, p. 267-272, 2003.

PASENKIEWICZ-GIERULA, Marta et al. Computer modelling studies of the bilayer/water interface. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1858, n. 10, p. 2305-2321, 2016.

PATRA, N. *et al*. A novel epoxypropoxy flavonoid derivative and topoisomerase II inhibitor, MHY336, induces apoptosis in prostate cancer cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 658, p. 98–107, 2011.

PEREIRA, J. R. *et al*. Cytotoxicity evaluation of marine alkaloid analogues of viscosaline and theonelladin C. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 2. p. 145–148, 2012.

PETERSEN, Ines; EASTMAN, Richard; LANZER, Michael. Drug-resistant malaria: molecular mechanisms and implications for public health. **FEBS letters**, v. 585, n. 11, p. 1551-1562, 2011.

PHILLIPS, M. A. et al. Nature reviews disease primers. **Malaria**, v. 3, p. 17050, 2017.

PHILLIPS, Margaret; K RATHOD, Pradipsinh. Plasmodium dihydroorotate dehydrogenase: a promising target for novel anti-malarial chemotherapy. **Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)**, v. 10, n. 3, p. 226-239, 2010.

PIDUGU, Lakshmi Swarnamukhi *et al*. Structural basis for the variation in triclosan affinity to enoyl reductases. **Journal of molecular biology**, v. 343, n. 1, p. 147-155, 2004.

PITA, Samuel S. da R.; PASCUTTI, Pedro Geraldo. Análise Farmacofórica da Tripanotiona Redutase (TR) de Trypanosoma cruzi complexada com Inibidores Peptídeo miméticos. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 788-804, 2012.

PLUHACKOVA, Kristyna et al. A critical comparison of biomembrane force fields: structure and dynamics of model DMPC, POPC, and POPE bilayers. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 120, n. 16, p. 3888-3903, 2016.

REAUME, Kristen T.; REGAL, Randolph E.; DORSCH, Michael P. Indications for dual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel: evidence-based recommendations for use. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 42, n. 4, p. 550-557, 2008.

RODRIGUES, Ricardo P. *et al*. Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 739-776, 2012.

ROGERO, S. O. *et al*. Cytotoxicity due to corrosion of ear piercing studs. **Toxicology in vitro**, v. 14, n. 6, p. 497-504, 2000.

ROMAGNOLI, Romeo et al. Anticancer activity of novel hybrid molecules containing 5-benzylidene thiazolidine-2, 4-dione. **European journal of medicinal chemistry**, v. 63, p. 544-557, 2013.

ROSS, Leila Saxby *et al*. In vitro resistance selections for Plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase inhibitors give mutants with multiple point mutations in the drug-binding site and altered growth. **Journal of Biological Chemistry**, p. jbc. M114. 558353, 2014.

SCHERMAN, Daniel; FETRO, Christine. Drug repositioning for rare diseases: Knowledge-based success stories.**Therapies**, v. 75, n. 2, p. 161-167, 2020.

SEIDEL, Thomas *et al*. Strategies for 3D pharmacophore-based virtual screening. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 7, n. 4, p. 221-228, 2010.

SHEARS, Melanie J.; BOTTÉ, Cyrille Y.; MCFADDEN, Geoffrey I. Fatty acid metabolism in the Plasmodium apicoplast: Drugs, doubts and knockouts.**Molecular and biochemical parasitology**, v. 199, n. 1, p. 34-50, 2015.

SHEPPHIRD, Jennifer K.; CLARK, Robert D. A marriage made in torsional space: using GALAHAD models to drive pharmacophore multiplet searches.**Journal of computer-aided molecular design**, v. 20, n. 12, p. 763-771, 2006.

SHIBESHI, Melkamu Adigo; KIFLE, Zemene Demelash; ATNAFIE, Seyfe Asrade. Antimalarial drug resistance and novel targets for antimalarial drug discovery. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 4047, 2020.

SHINODA, Wataru. Permeability across lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1858, n. 10, p. 2254-2265, 2016.

SHITYAKOV, Sergey; BROSCHEIT, Jens; FOERSTER, Carola. α-Cyclodextrin dimer complexes of dopamine and levodopa derivatives to assess drug delivery to the central nervous system: ADME and molecular docking studies. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 3211, 2012.

SHITYAKOV, Sergey; FÖRSTER, Carola. In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood–brain barrier choline transporter. **Advances and applications in bioinformatics and chemistry: AABC**, v. 7, p. 23, 2014.

SIBLEY, Carol Hopkins. Understanding drug resistance in malaria parasites: Basic science for public health. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 195, n. 2, p. 107-114, 2014.

SMABY, Janice M. et al. Phosphatidylcholine acyl unsaturation modulates the decrease in interfacial elasticity induced by cholesterol. **Biophysical journal**, v. 73, n. 3, p. 1492-1505, 1997.

SOTHISELVAM, Shanmugapriya *et al*. Macrolide antibiotics allosterically predispose the ribosome for translation arrest. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 27, p. 9804-9809, 2014.

SOUZA, Mariana C. *et al*. Lipoxin A 4 attenuates endothelial dysfunction during experimental cerebral malaria. **International immunopharmacology**, v. 24, n. 2, p. 400-407, 2015.

SPITZER, Russell; JAIN, Ajay N. Surflex-Dock: Docking benchmarks and real-world application. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 26, n. 6, p. 687-699, 2012.

SWINNEY, David C. Phenotypic vs. target-based drug discovery for first-in-class medicines. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 93, n. 4, p. 299-301, 2013.

SYBYL-X 2. 0. Discovery Software for Computational Chemistry and Molecular Modelling, St. Louis: TriposInc, 2012.

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

THAI, Nguyen Quoc; THEODORAKIS, Panagiotis E.; LI, Mai Suan. Fast estimation of the blood–brain barrier permeability by pulling a ligand through a lipid membrane. **Journal of chemical information and modeling**, v. 60, n. 6, p. 3057-3067, 2020.

TIIKKAINEN, Pekka *et al*. Critical comparison of virtual screening methods against the MUV data set. **Journal of chemical information and modeling**, v. 49, n. 10, p. 2168-2178, 2009.

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

TRIPOS, L. P. SYBYL-X, versão 2.0. [S. l.]: Molecular Silverware copyright © 1990 Rohm and Haas Company, 2011. Conjunto de programas. 1 CD-ROM.

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

VAN DER PLUIJM, Rob W. et al. Triple artemisinin-based combination therapies for malaria–a new paradigm?. **Trends in parasitology**, v. 37, n. 1, p. 15-24, 2021.

VANAGAS, G. Receiver operating characteristic curves and comparison of cardiac surgery risk stratification systems. **Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery**, [S.l.], v. 3, n. 2, p. 319–322, 2004.

VARMA, D. R.; YUE, T. L. Adrenoceptor blocking properties of atropine-like agents anisodamine and anisodine on brain and cardiovascular tissues of rats. **British journal of pharmacology**, v. 87, n. 3, p. 587, 1986.

VARO, Rosauro et al. Safety and tolerability of adjunctive rosiglitazone treatment for children with uncomplicated malaria. **Malaria Journal**, v. 16, p. 1-8, 2017.

WAGONER, Jason A.; BAKER, Nathan A. Assessing implicit models for nonpolar mean solvation forces: the importance of dispersion and volume terms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 22, p. 8331-8336, 2006.

WALKER, Naomi F.; NADJM, Behzad ; WHITTY, Christopher J.M. Malaria. **MEDICINE**, v. 46, n. 1, p. 52-58, 2018.

WALLER, Ross F. *et al*. A type II pathway for fatty acid biosynthesis presents drug targets in Plasmodium falciparum. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 297-301, 2003.

WANG, Wanyan et al. Targeting pyrimidine metabolism in the era of precision cancer medicine. **Frontiers in oncology**, v. 11, p. 684961, 2021.

WARD, Kurt E.; FIDOCK, David A.; BRIDGFORD, Jessica L. Plasmodium falciparum resistance to artemisinin-based combination therapies. **Current Opinion in Microbiology**, v. 69, p. 102193, 2022.

WHITE, N. J. Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. 2, p. 172-173, 2008.

WHITE, Nicholas J. *et al*. Malaria. **Lancet**, v. 383, p. 723-735, 2014.

WHO, Guideline WHO et al. Guidelines for malaria. **WHO Guidelines for malaria**, 2021.

WILLETT, Peter. Genetic algorithms in molecular recognition and design.**Trends in Biotechnology**, v. 13, n. 12, p. 516-521, 1995.

WILLETT, Peter. Similarity-based virtual screening using 2D fingerprints. **Drug discovery today**, v. 11, n. 23, p. 1046-1053, 2006.

WISHART, David S. et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. **Nucleic acids research**, v. 46, n. D1, p. D1074-D1082, 2018.

WOLBER, Gerhard *et al*. Molecule-pharmacophoresuperpositioning and pattern matching in computational drug design. **Drugdiscoverytoday**, v. 13, n. 1, p. 23-29, 2008.

WORLD HEALTHY ORGANIZATION (WHO). **World Malaria report 2020**. Geneva, 2020.

WORLD HEALTHY ORGANIZATION (WHO). **World Malaria report 2023**. Geneva, 2023.

WOUTERS, Olivier J.; MCKEE, Martin; LUYTEN, Jeroen. Estimated research and development investment needed to bring a new medicine to market, 2009-2018. **Jama**, v. 323, n. 9, p. 844-853, 2020.

WRIGHT, H. Tonie; REYNOLDS, Kevin A. Antibacterial targets in fatty acid biosynthesis. **Current opinion in microbiology**, v. 10, n. 5, p. 447-453, 2007.

WU, Shaomin; FLACH, Peter. A scored AUC metric for classifier evaluation and selection. In: **Second workshop on ROC analysis in ML, bonn, Germany**. 2005.

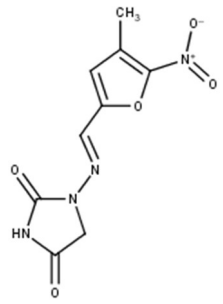
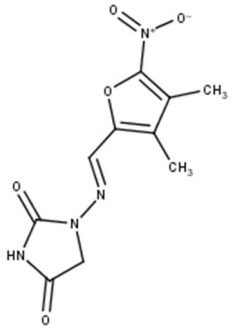
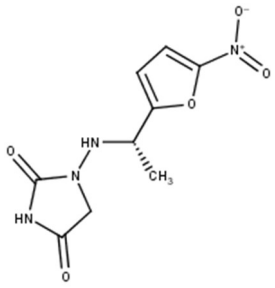
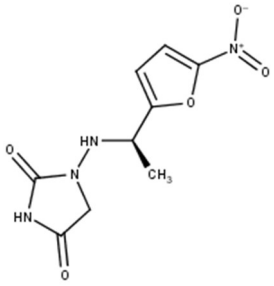
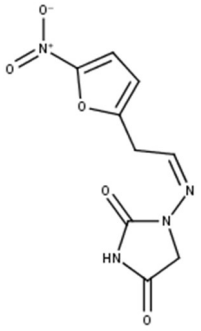
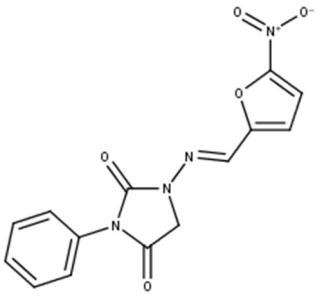
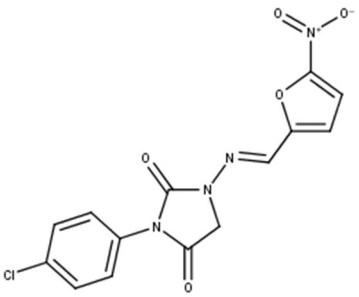
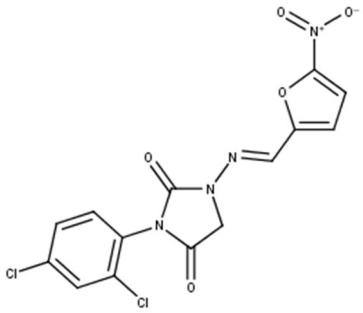
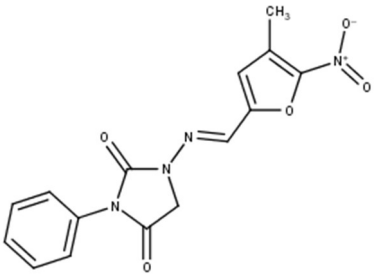
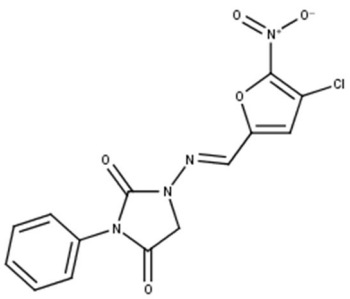
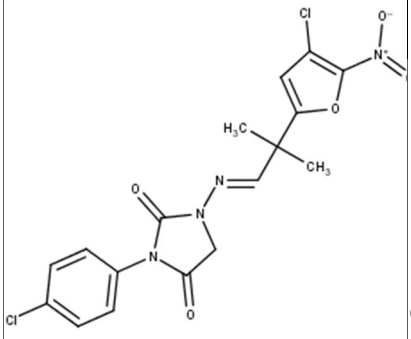
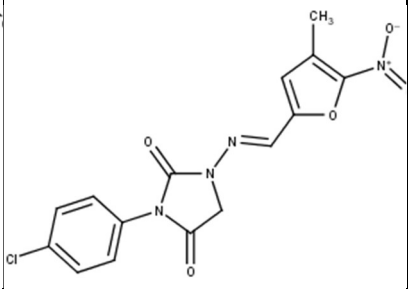
YANG, Nicole J.; HINNER, Marlon J. Getting across the cell membrane: an overview for small molecules, peptides, and proteins. **Site-Specific Protein Labeling: Methods and Protocols**, p. 29-53, 2015.

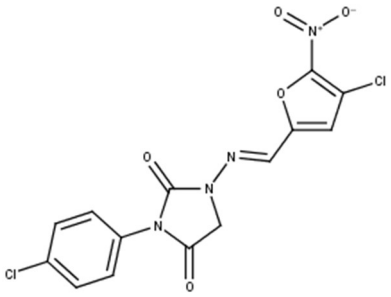
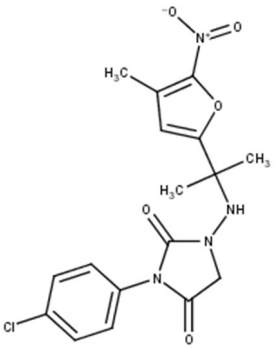
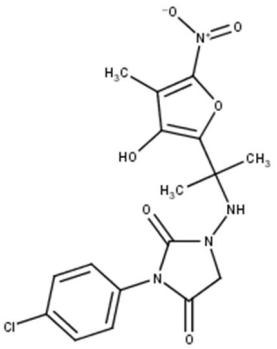
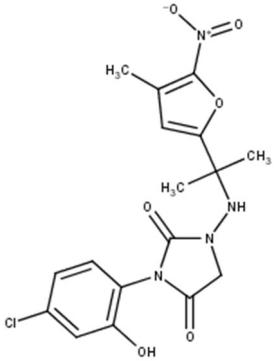
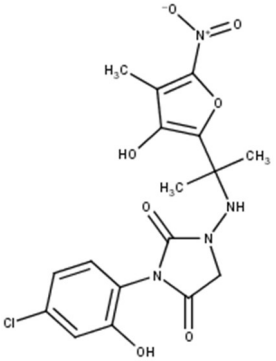
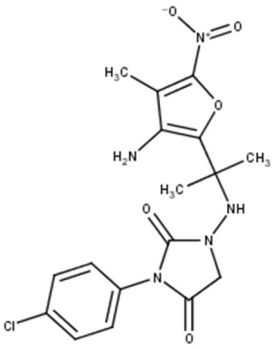
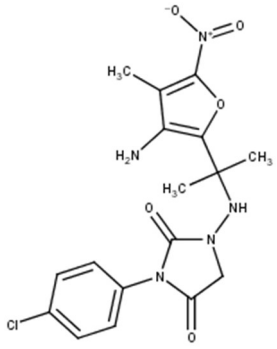
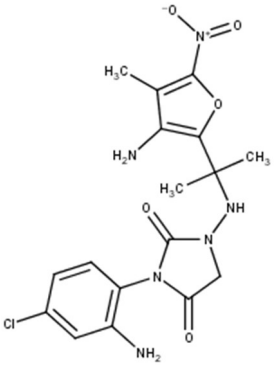
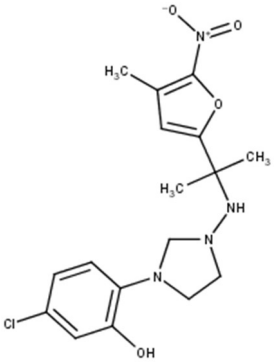
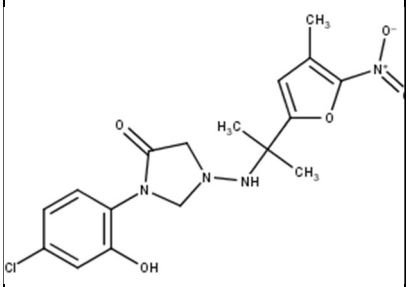
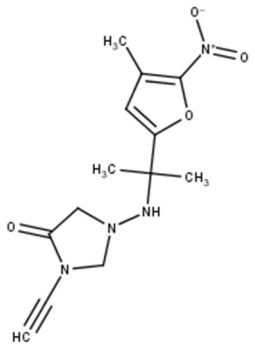
YANG, Sheng-Yong. Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 11, p. 444-450, 2010.

YU, Min *et al*. The fatty acid biosynthesis enzyme FabI plays a key role in the development of liver-stage malarial parasites. **Cell host & microbe**, v. 4, n. 6, p. 567-578, 2008.

ZHENG, Wei; THORNE, Natasha; MCKEW, John C. Phenotypic screens as a renewed approach for drug discovery. **Drug discovery today**, v. 18, n. 21-22, p. 1067-1073, 2013.

APÊNDICE A – ESTRUTURA 2D DE DERIVADOS DA NITROFURANTOÍNA.

 1 AE = -6,7 kcal/mol log P = -0,29	 2 AE = -6,0 kcal/mol log P = 0,81	 3 AE = 7,7 kcal/mol log P = -0,29
 4 AE = -7,6 kcal/mol log P = -0,29	 5 AE = -7,9 kcal/mol log P = -0,45	 6 AE = -7,2 kcal/mol log P = 1,66
 7 AE = -7,8 kcal/mol log P = 2,26	 8 AE = -5,9 kcal/mol log P = 2,87	 9 AE = -7,7 kcal/mol log P = 2,17
 10 AE = -7,8 kcal/mol log P = 2,26	 11 AE = -7,2 kcal/mol log P = 3,73	 12 AE = -8,0 kcal/mol log P = 2,78

 13 AE = -7,8 kcal/mol log P = 2,87	 14 AE = -9,3 kcal/mol log P = 2,99	 15 AE = -9,2 kcal/mol log P = 2,68
 16 AE = -9,5 kcal/mol log P = 2,68	 17 AE = -9,3 kcal/mol log P = 2,38	 18 AE = -9,0 kcal/mol log P = 2,16
 19 AE = -9,2 kcal/mol log P = 2,16	 20 AE = -8,7 kcal/mol log P = 1,33	 21 AE = -8,4 kcal/mol log P = 3,53
 22 AE = -9,7 kcal/mol log P = 2,4	 23 AE = -7,1 kcal/mol log P = 0,93	