

## Screening *in vitro* e *in silico* de amidas contra as formas sexuadas do *Plasmodium falciparum*

*In vitro* and *in silico* screening of amides against sexual forms of *Plasmodium falciparum*

Detección *in vitro* e *in silico* de amidas frente a formas sexuales de *Plasmodium falciparum*

Recebido: 10/07/2022 | Revisado: 22/07/2022 | Aceito: 24/07/2022 | Publicado: 31/07/2022

### **Minelly Azevedo da Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6052-6341>  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia, Brasil  
E-mail: [minelly.silva@ifro.edu.br](mailto:minelly.silva@ifro.edu.br)

### **Leandro do Nascimento Martinez**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0887-4784>  
Fundação Oswaldo Cruz, Brasil  
Universidade Federal de Rondônia, Brasil  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia, Brasil  
E-mail: [leandromartinezbio@gmail.com](mailto:leandromartinezbio@gmail.com)

### **Marcinete Latorre Almeida**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8963-5939>  
Fundação Oswaldo Cruz, Brasil  
Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte, Brasil  
E-mail: [marcinetelatorre@gmail.com](mailto:marcinetelatorre@gmail.com)

### **Amália dos Santos Ferreira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1691-1795>  
Fundação Oswaldo Cruz, Brasil  
E-mail: [amalia.ferreira@fiocruz.br](mailto:amalia.ferreira@fiocruz.br)

### **Saara Neri Fialho**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8667-2953>  
Fundação Oswaldo Cruz, Brasil  
Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte, Brasil  
E-mail: [saara.17.fialho@gmail.com](mailto:saara.17.fialho@gmail.com)

### **Harold Hilarion Fokoue**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7823-127X>  
Fundação Oswaldo Cruz, Brasil  
E-mail: [hfokoue@gmail.com](mailto:hfokoue@gmail.com)

### **Massuo Jorge Kato**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3315-2129>  
Universidade de São Paulo, Brasil  
E-mail: [majokato@iq.usp.br](mailto:majokato@iq.usp.br)

### **Maisa da Silva Araújo**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3607-0433>  
Fundação Oswaldo Cruz, Brasil  
Instituto Nacional de Epidemiologia na Amazônia Ocidental, Brasil  
E-mail: [maisaraujo@gmail.com](mailto:maisaraujo@gmail.com)

### **Carolina Bioni Garcia Teles**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4529-2137>  
Fundação Oswaldo Cruz, Brasil  
Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte, Brasil  
Centro Universitário São Lucas, Brasil  
Instituto Nacional de Epidemiologia na Amazônia Ocidental, Brasil  
E-mail: [carolina.teles@fiocruz.br](mailto:carolina.teles@fiocruz.br)

### **Resumo**

Objetivo: Avaliar a atividade desses compostos nas formas sexuadas do *Plasmodium falciparum* e determinar as propriedades farmacocinéticas teóricas dos compostos utilizando ensaios *in silico*. Métodos: Para a avaliação da inibição das formas exflagelantes foi utilizada a cepa de *Plasmodium falciparum* NF54 para a produção de gametócitos *in vitro*. Para os testes *in silico* foi utilizado o programa ADMETlab buscando identificar as propriedades farmacocinéticas teóricas de todos os compostos. Resultados: A série de amidas naturais e sintéticas testadas não se destacaram como possíveis bloqueadores de transmissão da malária. Porém, mostraram inibição moderada no bloqueio da exflagelação. Os resultados do *screening* virtual permitiram conhecer e explorar as propriedades farmacocinéticas teóricas interessantes dessa classe de compostos, como a permeabilidade moderada as células Caco-2 do composto **14f**; as substâncias mostram-se nocivas mais não letais (DL<sub>50</sub>); somente o composto **14f** pode causar

algum dano ao fígado (LHID); os compostos **1a**, **1b**, **1g** e **1k** podem ser administrados na sua dosagem máxima diária, observando sempre a toxicidade; baixa taxa de eliminação (CL); alta ligação a proteínas plasmáticas para os compostos **1a**, **14f** e **18a**; volume de distribuição ideal para **1b**, **1g**, **1k**, **18a** e **18b**. Considerações finais: Os resultados obtidos contribuem para aumentar o banco de dados sobre o perfil dessa classe de compostos e a ação antimalárica.  
**Palavras-chave:** *P. falciparum*; Gametócitos; Malária; Bloqueio da transmissão.

#### Abstract

**Objective:** To evaluate the activity of these compounds on sexual forms of *Plasmodium falciparum* and to determine the theoretical pharmacokinetic properties of the compounds using *in silico* assays. **Methods:** In order to evaluate the inhibition of exflagellant forms, *Plasmodium falciparum* strain NF54 was used for the production of gametocytes *in vitro*. The program ADMETlab was used in *in silico* tests to identify the theoretical pharmacokinetic properties of all compounds. **Results:** A number of tested natural and synthetic amides do not stand out as possible blockers of malaria transmission. However, they showed moderate inhibition in blocking exflagellation. The results of the virtual screening allowed to know and explore interesting theoretical pharmacokinetic properties of this class of compounds, such as moderate permeability with Caco-2 cells of compound **14f**; all can be harmful but non-lethal (LD<sub>50</sub>); only compound **14f** can cause damage to some food (LHID); compounds **1a**, **1b**, **1g** and **1k** can be administered at their daily maximum, always noting, **1g** and **1k** can be administered at their daily maximum; low throughput (CL); high plasma protein binding for compounds **1a**, **14f** and **18a**; optimal distribution volume for **1b**, **1g**, **1k**, **18a** and **18b**. **Final considerations:** The results obtained contribute to expand the database on the profile of this class of compounds and antimalarial action.

**Keywords:** *P. falciparum*; Gametocytes; Malaria; Transmission blocking.

#### Resumen

**Objetivo:** Evaluar la actividad de estos compuestos en las formas sexuales de *Plasmodium falciparum* y determinar las propiedades farmacocinéticas teóricas de los compuestos mediante un ensayo *in silico*. **Métodos:** Para evaluar la inhibición de las formas exflagelantes se utilizó la cepa de *Plasmodium falciparum* NF54 para la producción de gametocitos *in vitro*. Para las pruebas *in silico*, se utilizó el programa ADMETlab para identificar las propiedades farmacocinéticas teóricas de todos los compuestos. **Resultados:** varias amidas naturales y sintéticas probadas no se destacan como posibles bloqueadores de la transmisión de la malaria. Sin embargo, mostraron una inhibición moderada en el bloqueo de la exflagelación. Los resultados del cribado virtual permitieron conocer y explorar interesantes propiedades farmacocinéticas teóricas de esta clase de compuestos, como la permeabilidad moderada como células Caco-2 del compuesto **14f**; todos pueden ser dañinos pero no letales (LD<sub>50</sub>); solo el compuesto **14f** puede causar daño a algunos alimentos (LHID); los compuestos **1a**, **1b**, **1g** y **1k** pueden administrarse en su máximo diario, teniendo siempre en cuenta que **1g** y **1k** pueden administrarse en su máximo diario; bajo rendimiento (CL); alta unión a proteínas plasmáticas para los compuestos **1a**, **14f** y **18a**; volumen de distribución óptimo para **1b**, **1g**, **1k**, **18a** y **18b**. **Consideraciones finales:** Los resultados obtenidos contribuyen a aumentar la base de datos sobre el perfil de esta clase de compuestos y la acción antipalúdica.

**Palabras clave:** *P. falciparum*; Gametocitos; Malária; Bloqueo de transmisión.

## 1. Introdução

A malária é uma doença parasitária causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium*, esta doença atinge mais de 90 países nos diferentes continentes do mundo (Santos et al., 2021). Estima-se que somente no ano de 2020, foram notificados mais de 200 milhões de novos casos e mais de 600 mil óbitos devido as complicações clínicas da doença. Cabe ressaltar, que esse aumento está diretamente relacionado ao período de ascensão da pandemia de COVID-19 (World Health Organization, 2021).

Atualmente, seis espécies são descritas como capazes de infectar o homem e ocasionar o quadro clínico característico dessa patologia. Dentre essas espécies, são descritas: o *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium knowlesi* e *Plasmodium simium* (Sabbatani et al., 2010; Brasil et al., 2017).

O *Plasmodium* spp. depende de dois hospedeiros para completar seu ciclo de vida: o homem e o mosquito. Nesse sentido, a complexidade deste ciclo biológico torna mais difícil o combate e a eliminação do parasito (Tran et al., 2020). Outro fator que também pode contribuir com a não erradicação da doença, é o surgimento de cepas resistentes aos tratamentos utilizados atualmente para o *P. falciparum* e *P. vivax* (Khoury et al., 2020; Wicht et al., 2020).

Com a necessidade de selecionar e caracterizar possíveis compostos bloqueadores da transmissão da malária, tornou-se essencial a padronização da cultura de gametócitos, considerando que, esta permite a realização de triagem em larga escala de grandes bibliotecas de compostos voltados para a inibição das formas sexuadas (Delves et al., 2016; Miguel-Blanco et al., 2017), visto que os gametócitos são as formas responsáveis por dar continuidade ao ciclo biológico do parasito da malária dentro do hospedeiro invertebrado (Delves et al., 2013)

Essas ações e o avanço da tecnologia computacional (*screening* virtual *in silico*) auxiliam na busca de potenciais moléculas e torna possível investigar as propriedades físico-químicas, farmacocinética (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) e farmacodinâmica (mecanismo de ação) de protótipos para diversas doenças. Nessa perspectiva, os resultados das avaliações *in silico* podem orientar e auxiliar no melhoramento da bioatividade de moléculas em experimentações *in vitro* e *in vivo*. Essas ferramentas auxiliam na redução de custo e tempo, que são investidos no desenvolvimento de um fármaco (Lombardo et al., 2017).

A Piplartina e piperina, duas amidas isoladas de espécies de *Piper*, apresentam atividades biológicas interessantes (Silva, et al., 2019). No que diz respeito a ensaios parasitários, Silva et al. (2020) apontam a amida natural piplartina (**1a**) com atividade antiplasmodial de 20,54  $\mu\text{M}$ , enquanto seus derivados sintéticos (**1b**, **1g**, **1k** e **14f**) e a amida natural piperina (**18a**) como inativos ( $\text{IC}_{50} \geq 200 \mu\text{M}$ ). Mesmo com esses resultados optou-se em avaliar se os compostos poderiam agir como possíveis bloqueadores na transmissão da malária. Portanto, o estudo em questão tem como objetivo avaliar a atividade das amidas nas formas sexuadas do *Plasmodium falciparum* e avaliar as propriedades farmacocinéticas teóricas das substâncias utilizando ensaios *in silico*.

## 2. Metodologia

### 2.1 Obtenção dos compostos naturais (1a e 18a) e síntese dos análogos sintéticos (1b, 1g, 1k, 14f, 18a e 18b)

O isolamento das amidas naturais piplartina e piperina e os métodos para obtenção dos análogos sintéticos são descritos nos trabalhos (Fokoue et al., 2018; Silva et al., 2020).

### 2.2 Solubilização dos compostos

Os compostos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, USA), não ultrapassando a concentração de 0,5% que é considerada tóxica ao parasito (Miguel-Blanco et al., 2017). Os compostos foram testados em dois ou três experimentos independentes sempre em triplicata.

### 2.3 Aspectos éticos

O projeto foi iniciado após a aprovação do comitê de ética e pesquisa (CEP), sob o Certificado de apresentação para Apreciação Ética (CAAE): 77127017.1.0000.0011, e parecer de número: 2.469.074.

### 2.4 Experimentos *in vitro*

#### 2.4.1 Cultivo de gametócitos

Para a produção de gametócitos foi utilizada a cepa NF54 conhecida por produzir gametócitos maduros acima de 2%. As culturas com predominância de trofozoítos imaturos, foram sincronizadas (dia zero) como descrito por Lambros & Vanderberg (1979). Após esse processo, a parasitemia foi ajustada para 2% e o hematócrito para 5% em um volume final de 10 mL de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 25 mM/L de HEPES (Sigma-Aldrich), 0,36 Mm/L de hipoxantina (Sigma-Aldrich), 11 Mm/L de glicose (Sigma-Aldrich), 40 mg/mL de sulfato de gentamicina (Novafarma), 10%

(v/v) de soro humano O<sup>+</sup>, 2,5 mg/L Albumax II (Gibco) (Duffy & Avery 2013; Trager et al., 1976) com algumas modificações na concentração do HEPES e soro humano. As garrafas de cultivo foram mantidas em estufa a 37 °C com adição de uma mistura gasosa composta 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub>. Após um período de 24 horas foi realizada a troca de meio.

O meio de cultura foi trocado diariamente e a parasitemia foi acompanhada por meio de esfregaços sanguíneos, e posteriormente corados com kit panóptico. Esse acompanhamento foi realizado nos dias 2º, 4º, 6º, 7º, 8º, 10º, 12º, 14º, 16º (Delves et al., 2016) mediante a contagem de 5 mil hemácias por microscopia óptica. Ao atingir a parasitemia igual ou superior a 2% de gametócitos nos estágios iniciais (I, II), o meio continuou sendo trocado diariamente, mas dessa vez com a adição de heparina (HEMOFOL) (20 U/mL) para a eliminação das formas assexuadas restantes por 4 dias consecutivos (Miao et al., 2013).

Os estágios morfológicos dos gametócitos foram diferenciados de acordo com Delves et al. (2013), nos dias 4 e 5: espera-se alta parasitemia dos estágios assexuados, dia 7: estágio II, dia 9: estágio III, dia 11: estágio IV e dia 14: estágio V. No 14º dia em diante observou-se um aumento progressivamente de gametócitos maduros.

#### 2.4.2 Indução da exflagelação

Os ensaios de exflagelação foram realizados na Plataforma de Bioensaios em Malária e Leishmaniose - PBML da Fiocruz/RO. O procedimento foi iniciado após observação de parasitemia superior a 0,4% de micro e macrogametócitos maduros (IV, V) no cultivo. A maior porcentagem de gametócitos maduros foi observada entre os dias 14º e 16º dia após a indução.

A indução de exflagelação foi realizada de acordo com o protocolo de Leba et al. (2015) e Delves et al. (2013) com algumas modificações. Foram retirados 200 µL da cultura e transferidos para um tubo de 1,5 mL, em seguida, foi centrifugado a 637 xg por 30 segundos à 24 °C. Após esse procedimento, o sobrenadante foi retirado e o sedimento de hemácias foi ressuspenso em 20 µL de meio de oocineto (10,4 g/L RPMI-1640 (Gibco), suplementado com 25 Mm/L HEPES (Sigma-Aldrich), 0,36 Mm/L de hipoxantina (Sigma-Aldrich), 2 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich) e 50 µL de ácido xanturênico (Sigma-Aldrich) a 100 mM) pré-aquecidos a 37 °C (Delves et al., 2016).

O próximo passo foi a incubação dos parasitos já crescidos de meio de oocineto por 20 minutos em estufa BOD (Biochemical Oxygen Demand) a 24 °C. Ao término desse tempo, 3 µL da cultura foi introduzida na superfície de uma lâmina (OLEN) com uma lamínula (GLASSCYTO) com espessura de 0,13 – 0,16 mm para permitir a visualização no microscópio óptico e ser possível a formação de uma monocamada compacta por parte das células. A exflagelação foi observada no microscópio óptico (NIKON eclipse E200) com aumento de 100x. O número de gametócitos exflagelando foi determinado mediante a contagem de 1000 hemácias. Após a observação de 30 ou mais microgametócitos exflagelando iniciou-se o bioensaio de bloqueio da exflagelação com os compostos de interesse (Leba et al., 2015).

Para observar uma alta taxa de exflagelação, a temperatura ambiente foi ajustada para 24 °C, pois abaixo de 18 °C a exflagelação pode ser retardada ou ineficiente. Acima de 24 °C, a exflagelação pode ocorrer antes do tempo previsto, e acima de 30 °C esse processo pode não ocorrer em todos os gametócitos (Delves et al., 2016).

#### 2.4.3 Bloqueio da exflagelação

O ensaio de bloqueio de exflagelação com as substâncias de interesse foi realizado de acordo com o protocolo publicado por Delves et al. (2013) com algumas modificações, a saber: foi utilizado como controle negativo os gametócitos (IV, V) provenientes de cultura que tiveram o processo de exflagelação confirmados e tratados com DMSO abaixo de 0,5%; como controle positivo foi utilizado o fármaco de referência dihidroartemisinina (DHA) na concentração final de 1 µM. As amidas **1a**, **1b**, **1g**, **1k**, **14f**, **18a** e **18b** foram adicionadas na concentração final de 200 e 5 µM. A placa foi incubada por 48

horas, e após esse período, a exflagelação foi induzida. A porcentagem de inibição foi calculada considerando a razão entre o controle não tratado e o composto teste. O ensaio foi realizado em triplicata.

## 2.5 Predição *in silico*

### 2.5.1 Predição *in silico* da farmacocinética (ADMETlab)

O programa ADMETlab foi utilizado para avaliação *in silico* de farmacocinética e parâmetros físico-químicos. Para a predição *in silico* de permeabilidade na célula Caco-2 (Log de Papp) foi considerado:  $\geq \log(8 \times 10^{-6}) = -5.09$  alta solubilidade;  $\leq \log(8 \times 10^{-6}) =$  entre -4.69 e -5.09 moderada solubilidade;  $\leq \log(20 \times 10^{-6}) = -4.69$  baixa solubilidade (Pham et al., 2011).

A classificação da predição da ligação às proteínas plasmáticas (LPP) foi estabelecida de acordo com Kumar et al. (2018): LPP superior a 75% considerados compostos altamente ligados a LPP, compostos com valores igual ou menor que 75% de LPP são considerados de baixa ligação a LPP. Para o volume de distribuição (VD) foram consideradas os valores entre 0.04 L/kg-1 para 20 L/kg-1 (Belpaire & Bogaert, 2003).

A classificação do tempo de meia vida dos compostos (T 1/2) considerou-se:  $\leq 3$  horas meia-vida baixa,  $\geq 8$  horas meia-vida longa, entre 3 horas e 8 horas meia-vida moderada (Kerns & Di, 2008).

Para os valores de Clearance de eliminação (CL) considerou-se: alto ( $\geq$  que 15 mL/min/kg), moderado (entre 15 mL/min/kg e 5 mL/min/kg), e baixo ( $\leq$  que 5 mL/min/kg) (Kerns & Di, 2008d).

Os parâmetros para a determinação da dose letal para matar 50% da população, seguiu as orientações das Nações Unidas (GHS, 2005), logo, foi considerado: classe I: Letal ( $DL_{50} \leq 5$  mg/Kg), classe II: Letal ( $5$  mg/Kg  $\leq DL_{50} \leq 50$  mg/Kg), classe III: Tóxico ( $50$  mg/Kg  $\leq DL_{50} \leq 300$  mg/Kg), classe IV: Nocivo ( $300$  mg/Kg  $\leq DL_{50} \leq 2000$  mg/Kg), classe V: Pode ser nocivo ( $2000$  mg/Kg  $\leq DL_{50} \leq 5000$  mg/Kg), classe VI: Não tóxico ( $DL_{50} \geq 5000$  mg/Kg).

Para a lesão hepática induzidas por drogas (LHID) (Xu et al., 2015), dosagem máxima diária recomendada (DMDR) (Cao et al., 2012) e bloqueadores do canal de hERG (Sanguinetti & Mitcheson, 2005), os valores estabelecidos foram: positivo (+), negativo (-) de acordo com os autores citados.

## 2.6 Análise estatística

O programa GraphPad Prism versão 6.0. foi utilizado para tabulação dos resultados das predições *in silico* das amidas.

Para a determinação da porcentagem de inibição da exflagelação e diferença estatística entre os valores, foi utilizado o software Graphpad Prism versão 6.0, seguido de pós-teste de Tukey. Conforme a descrição abaixo:

Inibição de exflagelação (IE)

$$IE = \frac{E_c - E_r * 100}{E_c}$$

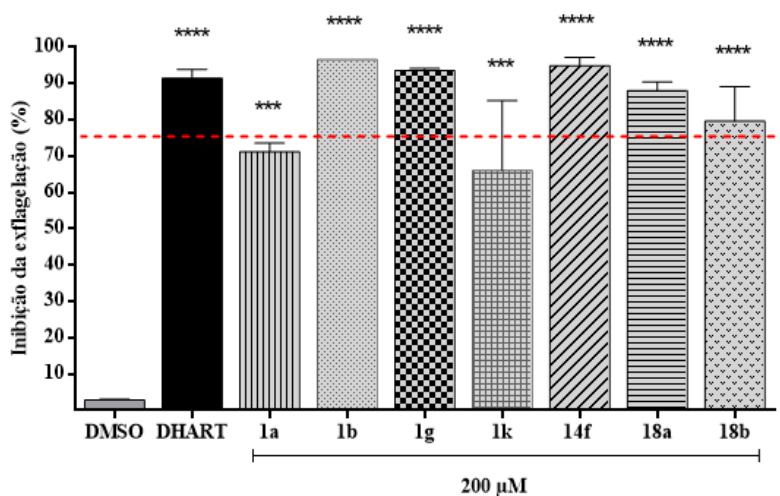
IE= inibição da exflagelação;  $E_c$ = exflagelação do controle;  $E_r$ = exflagelação com o composto teste. Fonte: Adaptado de Colmenarejo et al. (2018).

## 3. Resultados e Discussão

Ao longo dos últimos 10 anos, foi notório o desenvolvimento de novas técnicas para buscar e selecionar moléculas bloqueadoras da transmissão da malária. Atualmente, os únicos compostos aprovados para a eliminação dos gametócitos são a primaquina e a tafenoquina. No entanto, alguns fatores como a toxicidade para pessoas deficientes da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) limitam o uso destes fármacos (Calit et al., 2018; FDA, 2018).

O *screening* preliminar com as amidas **1a**, **1b**, **1g**, **1k**, **14f**, **18a** e **18b** na concentração de 200  $\mu$ M, apresentou os seguintes resultados de inibição: 71%, 96%, 93%, 66%, 95%, 88% e 80%, respectivamente (Figura 1).

**Figura 1.** Inibição da exflagelação de formas sexuadas da cepa *Plasmodium falciparum* NF54 utilizando os compostos **1a**, **1b**, **1g**, **1k**, **14f**, **18a** e **18b** na concentração de 200  $\mu$ M.



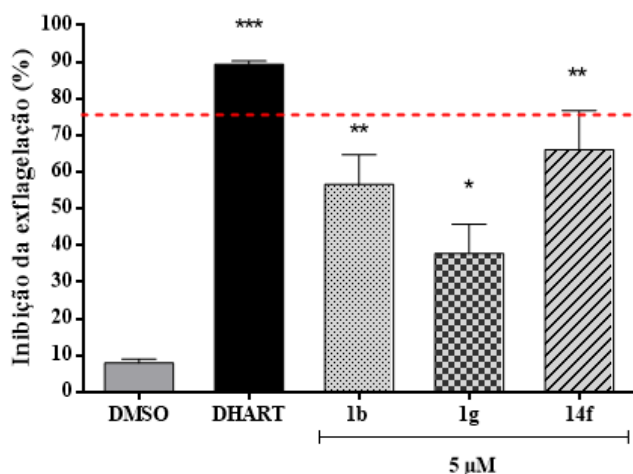
Foram utilizados como controles: DMSO-Dimetilsulfóxido (controle negativo) abaixo de 0,5%, DHA-Dihidroartemisinina a 1  $\mu$ M (controle positivo) e os compostos na concentração única de 200  $\mu$ M incubados por 48 horas. A porcentagem de inibição foi comparada com o controle tratado com DMSO. Os resultados referem-se à média e desvio padrão ( $\pm$ ) de duplicatas de um experimento. Colunas marcadas com asterisco (\*) representam diferença estatística significativa quando comparadas com o controle DMSO (\*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ ), (\*\*\*) =  $p \leq 0,001$ ) seguido de pós-teste de Tukey. Fonte: Autores.

As substâncias com inibição igual ou superior a 75%, foram direcionadas para o teste de bloqueio da exflagelação na concentração de 5  $\mu$ M, sendo assim, o ensaio foi realizado somente com as amidas **1b**, **1g** e **14f**. Por quantidade insuficiente de amostra, o ensaio não foi realizado com as amidas **18a** e **18b**.

No ensaio de bloqueio de exflagelação as substâncias apresentaram valores de 56%, 38% e 66%, respectivamente (Figura 2). Essa atividade é considerada moderada. Nesse sentido, nenhuma das amidas investigadas podem ser classificadas com alta probabilidade de bloqueadoras da transmissão da malária, embora a amida **1a** tenha apresentado resultado de  $IC_{50}$  moderado na inibição de formas assexuadas do *P. falciparum* (Silva et al., 2020).

De acordo com a literatura, para um composto ser considerado bloqueador da transmissão da malária, este deve inibir 75% da exflagelação na concentração de 1  $\mu$ M (Colmenarejo et al. 2018), além de ter ação em outros estágios sexuais do ciclo da malária (Delves et al., 2018). Sendo assim, os resultados apresentados sugerem que novas modificações estruturais sejam realizadas nas moléculas, a fim de que, seja possível obter compostos com atividade bloqueadora da transmissão da malária superior aos fármacos de referência.

**Figura 2.** Inibição da exflagelação utilizando os compostos **1a**, **1g** e **14f** na concentração de 5  $\mu$ M.



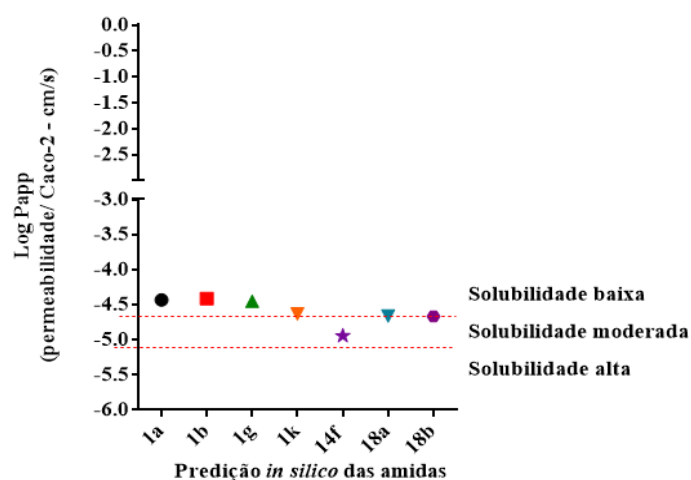
Foram utilizados como controles: DMSO-Dimetilsulfóxido (controle negativo) abaixo de 0,5%, DHA-Dihidroartemisinina a 1  $\mu$ M (controle de positivo) e os compostos na concentração única de 5  $\mu$ M incubados por 48 horas. A porcentagem de inibição foi comparada com o controle tratado com DMSO. Os resultados referem-se à média e desvio padrão ( $\pm$ ) de duplicatas de um dos experimentos. Colunas marcadas com asterisco (\*) representam diferença estatística significativa quando comparadas com o controle DMSO (\*\*\*) =  $p \leq 0,001$ ), (\*\* =  $p \leq 0,01$ ), (\* =  $p \leq 0,05$ ), seguido de pós-teste de Tukey. Fonte: Autores.

Além de avaliar o efeito das amidas nas formas evolutivas do parasito responsável pela transmissão da malária (gametócitos dos estágios IV, V), o presente estudo avaliou as propriedades farmacocinéticas das substâncias utilizando ferramentas computacionais (ensaios *in silico*) descritos na metodologia.

Para a predição da permeabilidade de fármacos no intestino, tanto em experimentos *in vitro* e *in silico*, comumente são utilizadas as células Caco-2 como parâmetro. Essas por sua vez, são células derivadas de adenocarcinoma de cólon humano. No entanto, outras células também podem ser utilizadas com esse propósito (Hosey & Benet, 2015; Yee, 1997).

A análise de permeabilidade das amidas na linhagem celular Caco-2 apontou apenas o composto **14f** Papp= -4.94 com permeabilidade moderada, as demais amidas foram classificadas com baixa permeabilidade: **1a** de Log de Papp= -4.43; **1b** Log de Papp= -4.41, **1g** Log de Papp= -4.45, **1k** Log de Papp= -4.63, **18a e 18b** Log de Papp= -4.66 (Figura 3).

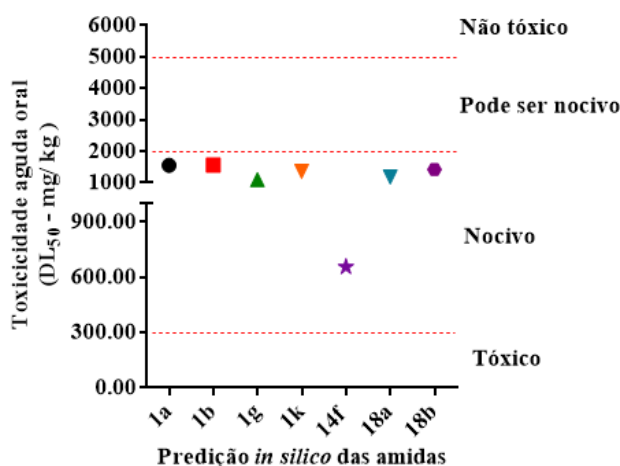
**Figura 3.** Predição *in silico* de permeabilidade a célula caco-2 das amidas.



A figura representa a predição *in silico* de permeabilidade a célula caco-2 dos compostos 1a,1b, 1g, 1k, 14f, 18a e 18b, a linha vermelha representa a linha de corte para os valores para permeabilidade da célula caco-2;  $\geq \log(8 \times 10^{-6}) = -5.09$  alta solubilidade;  $\leq \log(8 \times 10^{-6}) = -5.09$  moderada solubilidade;  $\leq \log(20 \times 10^{-6}) = -4.69$  baixa solubilidade. Fonte: autores.

Os parâmetros para a toxicidade aguda oral foram: **1a**  $DL_{50}$ = 1.554 mg/kg; **1b**  $DL_{50}$ = 1.563 mg/kg; **1g**  $DL_{50}$ = 1.097 mg/kg; **1k**  $DL_{50}$ = 1.366 mg/kg; **14f**  $DL_{50}$ = 655.83 mg/kg; **18a**  $DL_{50}$ = 1.184 mg/kg; **18b**  $DL_{50}$ = 1.420 mg/kg (Figura 4).

**Figura 4.** Predição *in silico* da toxicidade aguda e oral das amidas.



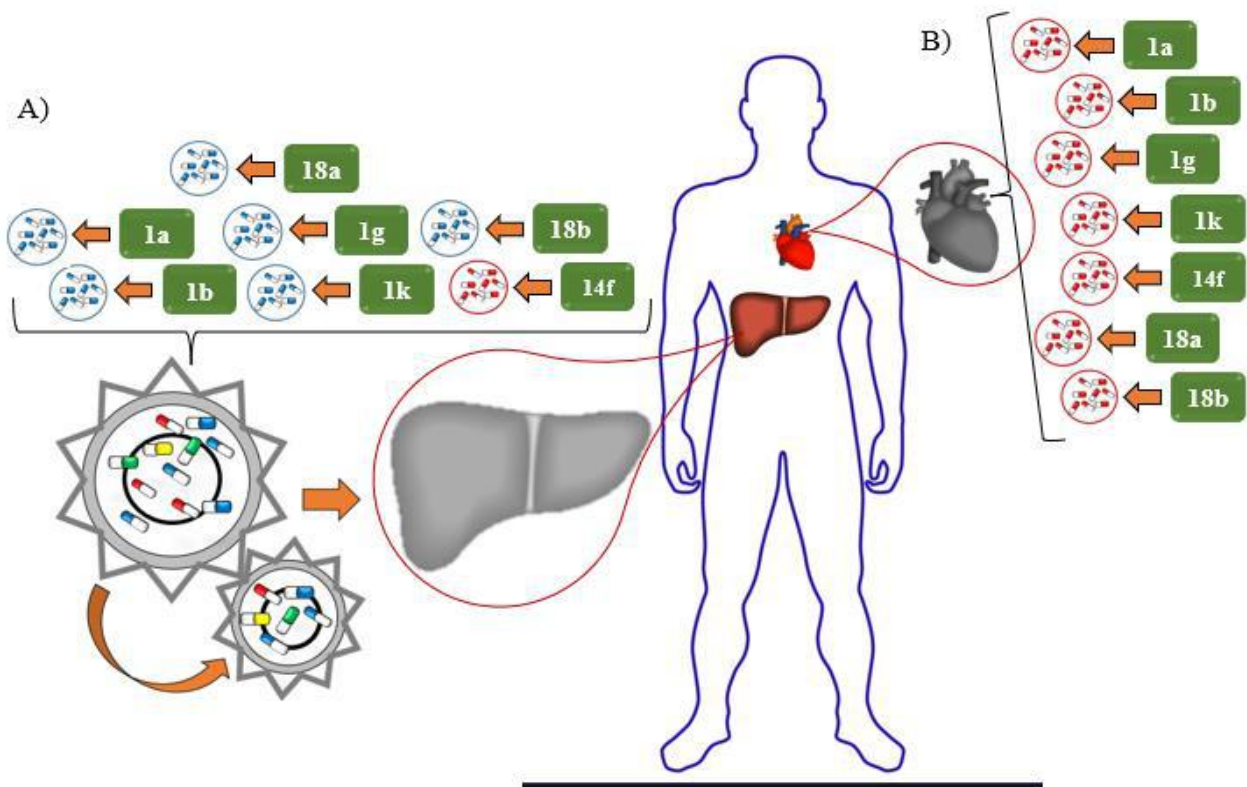
A figura representa a predição *in silico* de toxicidade aguda oral 1a,1b, 1g, 1k, 1m,14f, 18a e 18b, a linha vermelha representa a linha de corte para os valores de toxicidade; classe I: Letal ( $DL_{50} \leq 5$  mg/Kg), classe II: Letal ( $5$  mg/Kg  $\leq DL_{50} \leq 50$  mg/Kg), classe III: Tóxico ( $50$  mg/Kg  $\leq DL_{50} \leq 300$  mg/Kg), classe IV: Nocivo ( $300$  mg/Kg  $\leq DL_{50} \leq 2000$  mg/Kg), classe V: Pode ser nocivo ( $2000$  mg/Kg  $\leq DL_{50} \leq 5000$  mg/Kg), classe VI: Não tóxico ( $DL_{50} \geq 5000$  mg/Kg). Fonte: autores.

Como pode ser observado na predição *in silico*, as amidas podem ser prejudiciais, mas não letais se ingeridas (Figura 4). Geralmente, uma das causas mais comuns para a toxicidade de fármacos é a ativação metabólica que ocorre no fígado, neste órgão, existem muitas proteínas do citocromo P450, responsáveis pela metabolização de inúmeros fármacos. Nesse sentido, estima-se que 90% dos fármacos são metabolizados pelas enzimas CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 e CYP1A2, respectivamente (Pinto & Dolan, 2011). Em alguns casos essa metabolização pode modificar a molécula, tornando-a mais polar facilitando a sua eliminação na bile e na urina. Cumpre destacar que algumas modificações estruturais, podem aumentar os níveis de toxicidade observados para algumas moléculas (Kok-Yong & Lawrence, 2015).

Parâmetros de toxicidade, como LHID, bloqueadores de hERG, e DMDR, também são importantes na descoberta de novas fármacos. Nos ensaios *in silico* apenas a amida **14f** foi identificada como substância capaz de causar algum tipo de lesão hepática LHID (Figura 5-A). As amidas mostraram potencial como bloqueadoras de hERG (Figura 5-B).



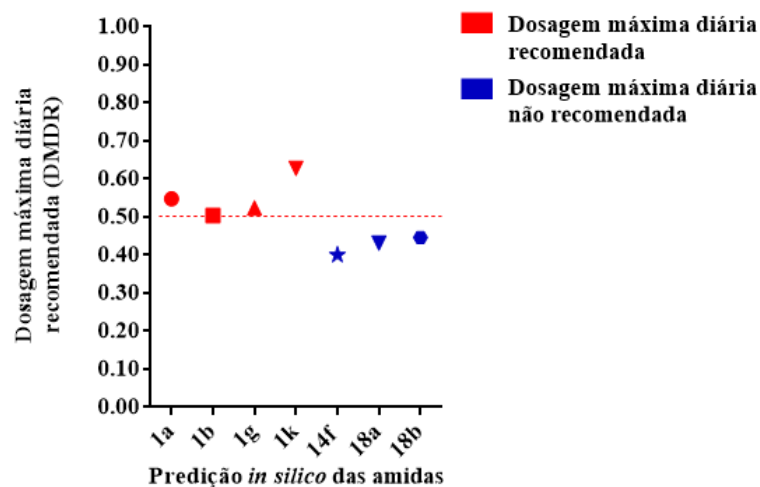
**Figura 5.** Representação esquemática dos resultados *in silico* dos compostos bloqueadores do canal de hERG e de lesões hepáticas causadas por drogas (LHID).



A figura A representa as possíveis lesões hepáticas causadas por drogas, cápsulas azuis são as substâncias que não tem a capacidade de causar lesões no fígado, as cápsulas vermelhas são as substâncias capazes de causar lesões no fígado. A figura B representa os compostos bloqueadoras do canal de hERG, cápsulas azuis são não bloqueadoras, cápsulas vermelhas são bloqueadoras. Fonte: autores.

Por fim, os resultados *in silico* para DMDR, sugerem que as amidas **1a**, **1b**, **1g** e **1k** podem ser administradas na dosagem máxima diária (Figura 6).

**Figura 6.** Predição *in silico* da dosagem máxima diária recomendada das amidas



A figura representa a predição *in silico* da dosagem máxima diária recomendada das amidas 1a, 1b, 1g, 1k, 14f, 18a e 18b, a linha vermelha representa a linha de corte para os valores de probabilidade que variam de 0.0 a 1.0, valores acima de 0.5 são compostos que podem ser aplicadas na dosagem máxima diária, valores abaixo de 0.5, são compostos que não necessitam de dosagem máxima diária. Fonte: autores.

As lesões hepáticas induzidas por drogas (LHID) estão relacionadas as lesões no fígado causadas por uso de alguns fármacos, em alguns casos por um longo período de tempo. Nesse contexto, além dos inúmeros parâmetros de toxicidade, a LHID também é um parâmetro essencial a ser investigado, no entanto, essa avaliação em muitos casos não é realizada, o que pode acarretar no surgimento de insuficiência hepática devido ao uso do medicamento (Suh, 2020).

De acordo com Chalasani et al. (2008), os fármacos que causam LHID em humanos não demonstram relação com a dose administrada, além disso, as lesões induzidas por fármacos podem ocorrer em menos de 1 indivíduo por 10.000 a 100.000 pessoas que venham a consumir o medicamento. Como foi demonstrado, apenas o composto **14f** apresenta um perfil que pode causar lesões hepáticas (Figura 5-A). Embora a incidência da LHID seja baixa, as demais amidas devem ser monitoradas.

No estudo publicado por Silva et al. (2020) foi evidenciado que apenas a amida **1a** (natural) foi tóxica frente a linhagem celular HepG2 (14,98  $\mu\text{M}$ ), toxicidade que não foi observada em seus análogos sintéticos, o que demonstra que possivelmente esses análogos não tenham potencial em causar LHID.

Na última década, foram desenvolvidos inúmeros modelos *in silico* para a predição de possíveis fármacos bloqueadoras do canal de hERG no coração (Villoutreix & Taboureau, 2015; Bains et al., 2004; Jing et al., 2015). O canal de hERG possui alguns resíduos específicos para a ligação de fármacos com características bloqueadoras, sendo eles a Tyr652, Phe656 e Val659 (Vandenberg et al., 2012). Logo, quando um fármaco bloqueia esse canal, o paciente pode sentir arritmia cardíaca, e em alguns casos pode levar a uma morte súbita (Witchel, 2007).

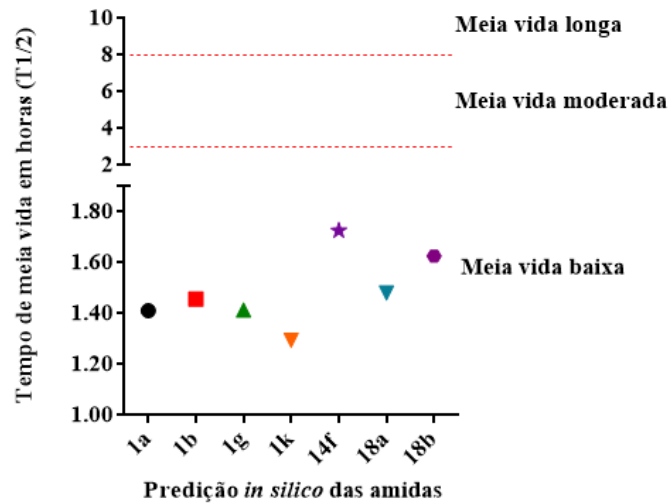
De acordo com a literatura, substâncias bloqueadoras de hERG possuem características físico-químicas, tais como: lipofilicidade entre 2 e 6, massa molecular maior que 300, área de superfície polar menor que 44 Å, ausência de grupos ionizáveis negativamente, ausência de aceptores de ligação hidrogênio e oxigênio e pKa maior que 7.3 (Sun et al., 2017; Kerns et al., 2008b).

As amidas avaliadas foram consideradas bloqueadoras do canal de hERG (Figura 5-B) e, tal característica pode ser atribuída à lipofilicidade maior que 2, com exceção da amida natural **1a**, que possui peso molecular maior que 300 (Silva et al., 2020).

A dosagem máxima diária recomendada (DMDR), é dependente dos parâmetros de absorção, distribuição, metabolização, eliminação e toxicidade. Portanto, alguns fármacos quando são administrados, independente da via de administração, são rapidamente eliminados, devido a meia vida curta e o baixo volume de distribuição. Assim, alguns compostos precisariam ser administrados na sua dosagem máxima diariamente, como é o caso das amidas **1a**, **1b**, **1g** e **1k** positivos para DMDR (Figura 6).

A eliminação dos compostos foi determinada mediante a análise de duas predições *in silico*, o tempo de meia vida e o *clearance* de eliminação. Entre os resultados, todas as amidas apresentaram tempo de meia vida abaixo de 2 horas, nesse sentido, todas foram classificadas como meia vida baixa: **1a** T<sub>1/2</sub>= 1.412 h, **1b** T<sub>1/2</sub>= 1.457 h, **1g** T<sub>1/2</sub>= 1.414 h, **1k** T<sub>1/2</sub>= 1.295 h, **14f** T<sub>1/2</sub>= 1.726 h, **18a** T<sub>1/2</sub>= 1.481 h, **18b** T<sub>1/2</sub>= 1.626 (Figura 7).

**Figura 7.** Predição *in silico* do tempo de meia vida das amidas.

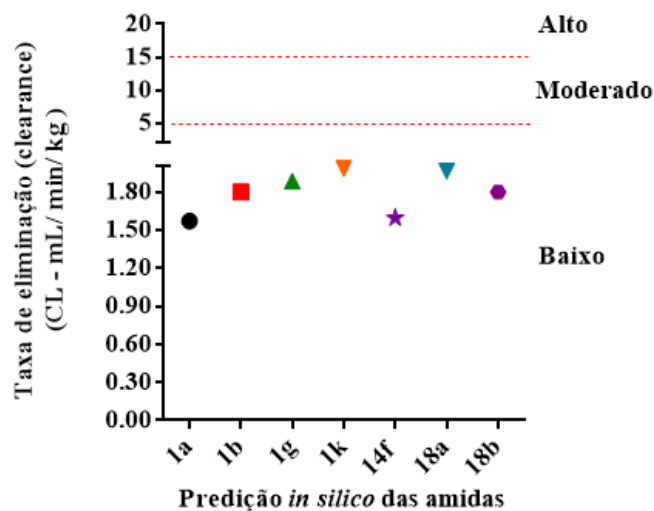


A figura representa a predição *in silico* de tempo de meia vida dos compostos 1a,1b, 1g, 1k, 1m,14f,18a e 18b, a linha vermelha representa a linha de corte para os valores de tempo de meia vida; < 3 horas meia-vida baixa, > 8 horas meia-vida longa, entre 3 horas e 8 horas meia-vida moderada. Fonte: Autores.

O tempo de meia vida de um fármaco avalia o período de tempo que ele será eliminado do corpo pelos órgãos responsáveis por esse processo (Belpaire & Bogaert, 2003; Kerns et al., 2008d). Uma alternativa a ser utilizada para evitar a administração em curtos intervalos de tempo, possivelmente seria aumentar as doses, com essa estratégia os intervalos entre as doses seria aumentado (Goodman & Gilman, 2012). No entanto, é importante não deixar de considerar a dose letal ( $DL_{50}$ ) e os demais parâmetros de toxicidade.

Os valores de *clearance* de eliminação foram considerados baixos para as amidas: **1a** CL= 1.571 mL/ min/ kg, **1b** CL= 1.799 mL/ min/ kg, **1g** CL= 1.886 mL/ min/ kg, **1k** CL= 1.984 mL/ min/ kg, **14f** CL= 1.596 mL/ min/ kg, **18a** CL= 1.965 mL/ min/ kg e **18b** CL= 1.800 (Figura 8).

**Figura 8.** Predição *in silico* do *clearance* de eliminação das amidas.



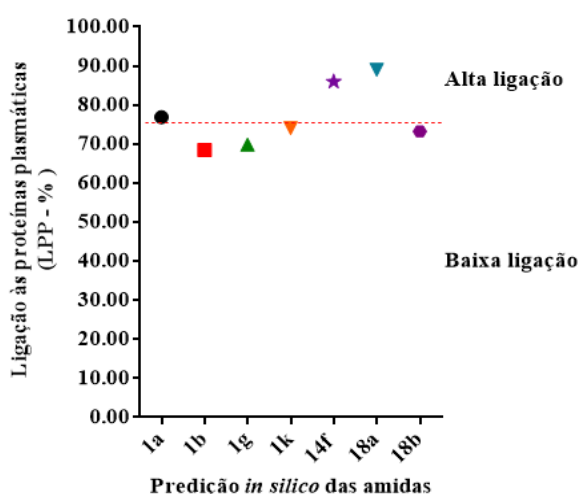
A figura representa a predição *in silico* *clearance* de eliminação dos compostos 1a,1b, 1g, 1k,14f, 18a e 18b, a linha vermelha representa a linha de corte para os valores do *clearance* de eliminação; maior que 15 mL/ min/ kg (ALTO), entre 15 mL/ min/ kg e 5 mL/ min/ kg (MODERADO), menor que 5 mL/ min/ kg. Fonte: Autores.

O *clearance* de eliminação de um fármaco está relacionado com a taxa de eliminação dos compostos (volume removido pela unidade de tempo). Os rins e fígado são os principais órgãos responsáveis por essa eliminação, no entanto, a bili também participa desse processo (Belpaire & Bogaert, 2003; Kerns et al., 2008d).

Roberts e Freshwater-Turner (2007), afirmaram que quando um fármaco tem uma taxa de eliminação constante, pode ter como consequência uma meia vida mais curta, e possivelmente poderia resultar em um alto *clearance* ou um baixo VD. Infere-se que as amidas possivelmente têm um CL constante o que pode ter provocado um valor baixo de VD. Isso sugere que as amidas podem ser eliminadas do corpo mais lentamente (Figura 8).

Para o parâmetro distribuição foram avaliados o LPP (ligação às proteínas plasmáticas) e o VD (volume de distribuição). Os valores de LPP para as substâncias foram: **1a** (76.87%), **14f** (85.94%) e **18a** (89.02%).

**Figura 9.** Predição *in silico* da ligação às proteínas plasmáticas ligada as amidas.

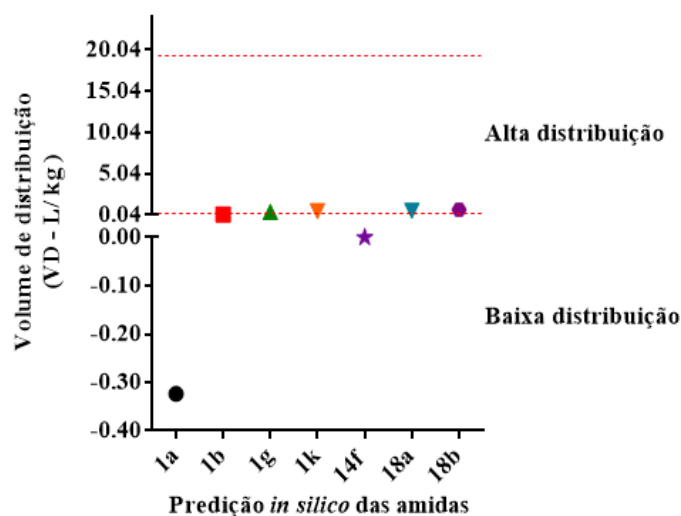


A figura representa a predição *in silico* da porcentagem de proteínas ligadas ao fármaco dos compostos 1a, 1b, 1g, 1k, 14f, 18a e 18b, a linha vermelha representa a linha de corte para ligação de proteínas aos fármacos; LPP superior a 75% são considerados como ALPP (compostos de alto LPP ou classe 1) e compostos com valores iguais ou menores que 75 % de LPP são considerados BLPP (compostos de baixo LPP ou classe '0'). Fonte: Autores.

As amidas com valores acima de 75%, foram classificadas como substâncias altamente ligadas a proteínas plasmáticas. As demais amidas: **1b** (68.49%), **1g** (69.87%), **1k** (74.08%), e **18b** (73.24%), foram classificadas como substâncias com baixa ligação a proteínas plasmáticas (Figura 9). Cumprir salientar, que em alguns casos os fármacos podem se ligar e rapidamente se dissociar das proteínas plasmáticas (Vuignier et al., 2010).

Para o volume de distribuição, os valores foram: **1b** VD= 0.102 L/kg, **1g** VD= 0.401 L/kg, **1k** VD= 0.510 L/kg, **18a** VD= 0.579 L/kg e **18b** VD= 0.699 L/kg. As amidas **1a** VD= -0.324 L/kg e **14f** VD= 0.000 L/kg, todas as amidas apresentaram valores de distribuição abaixo de 0.04 L/kg, sendo assim, as substâncias possivelmente não são bem distribuídas (Figura 10).

**Figura 10.** Predição *in silico* do volume de distribuição das amidas.



A figura representa a predição *in silico* do volume de distribuição do fármaco dos compostos 1a, 1b, 1g, 1k, 1m, 14f, 18a e 18b, a linha vermelha representa a linha de corte para os valores do volume de distribuição; VD de 0.04 L/kg-1 para 20 L/kg-1. Fonte: Autores.

O VD diz respeito à distribuição dos fármacos em uma concentração igual ao do plasma em L/kg no organismo, no entanto, alguns fatores como a ligação a proteínas plasmáticas e hidrofiliabilidade podem influenciar negativamente nessa distribuição (Belpaire & Bogaert, 2003).

Existem substâncias que têm afinidade de ligação com uma série de proteínas plasmáticas, seja para o transporte até o possível alvo farmacológico, ou até mesmo para a distribuição no plasma e no tecido. Alguns fármacos ácidos podem ter afinidade de se ligar à proteína albumina, outros classificados como básicos podem vir a se ligar as glicoproteínas e lipoproteínas. No entanto, nem todos os fármacos se ligam a proteínas, estes por sua vez, podem atravessar mais facilmente as biomembranas das células. Logo, os compostos ligados a proteínas podem estabelecer um equilíbrio entre si, fazendo com que o fármaco possa a ser liberado gradualmente para a sua forma livre, caso isso não aconteça, o fármaco pode não conseguir passar pelas membranas (Kerns et al., 2008e; Belpaire & Bogaert, 2003).

Como pode ser evidenciado, as análises computacionais são importantes e tem sido cada vez mais utilizada visando diminuir os custos dos experimentos tradicionais. As predições *in silico* não são utilizadas como uma única ferramenta de avaliação de compostos, mas podem em conjunto com outros ensaios, direcionar tomadas decisões ainda na fase inicial de descoberta e desenvolvimento de um fármaco, evitando a perda monetária em ensaios pré-clínicos e clínicos (Grime et al., 2013).

#### 4. Conclusão

A série de amidas naturais e sintéticas testadas não se destacaram como possíveis bloqueadores de transmissão da malária. Porém, mostraram inibição moderada no bloqueio da exflagelação. A partir desses resultados, novas modificações estruturais serão realizadas nos compostos com a finalidade de melhorar a ação. Os resultados do *screening* virtual permitiram conhecer e explorar as propriedades farmacocinéticas teóricas dessa classe de compostos, como a permeabilidade às células Caco-2; as doses letais (DL<sub>50</sub>); os danos ao fígado (LHID); bloqueio do canal de hERG; a administração de dosagem máxima diária, observando sempre a toxicidade; a taxa de eliminação (CL); a ligação a proteínas plasmáticas; tempo de meia vida e o volume de distribuição. Diante disso, esse estudo pode direcionar novas abordagens de investigação biológica, possibilitando identificar e selecionar compostos mais ativos e seletivos.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia (IFRO), a Plataforma de Bioensaios em Malária e Leishmaniose (PBML) da Fiocruz/RO, a Plataforma de Produção e Infecção de Vetores da Malária (PIVEM) da Fiocruz/RO, e ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo – USP.

## Financiamento

Os autores expressam sua gratidão à equipe da Fundação Oswaldo Cruz Rondônia (Fiocruz/RO) e ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia (IFRO) campus de Porto Velho – Calama pelo apoio financeiro.

## Referências

- Bains, W., Basman, A., & White, C. (2004). HERG binding specificity and binding site structure: evidence from a fragment-based evolutionary computing SAR study. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 86(2), 205–233. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2003.09.001
- Belpaire, F. M., & Bogaert, M. G. (2003). The Fate of Xenobiotics in Living Organisms. In *The Practice of Medicinal Chemistry: Second Edition* (Second Edi). Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-012744481-9/50034-9
- Brasil, P., Zalis, M. G., de Pina-Costa, A., Siqueira, A. M., Júnior, C. B., Silva, S., Areas, A. L. L., Pelajo-Machado, M., de Alvarenga, D. A. M., da Silva Santelli, A. C. F., Albuquerque, H. G., Cravo, P., Santos de Abreu, F. V., Peterka, C. L., Zanini, G. M., Suárez Mutis, M. C., Pissinatti, A., Lourenço-de-Oliveira, R., de Brito, C. F. A., ... Daniel-Ribeiro, C. T. (2017). Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *The Lancet Global Health*, 5(10), 1038–1046. doi: 10.1016/S2214-109X(17)30333-9
- Calit, J., Dobrescu, I., Gaitán, X. A., Borges, M. H., Ramos, M. S., Eastman, R. T., & Bargieri, D. Y. (2018). Screening the Pathogen Box for Molecules Active against *Plasmodium* Sexual Stages Using a New Nanoluciferase-Based Transgenic Line of *P. berghei* Identifies Transmission-Blocking Compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(11). doi: 10.1128/AAC.01053-18
- Cao, D.-S., Zhao, J.-C., Yang, Y.-N., Zhao, C.-X., Yan, J., Liu, S., Hu, Q.-N., Xu, Q.-S., & Liang, Y.-Z. (2012). In silico toxicity prediction by support vector machine and SMILES representation-based string kernel. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 23(1–2), 141–153. doi: 10.1080/1062936X.2011.645874
- Chalasanani, N., Fontana, R. J., Bonkovsky, H. L., Watkins, P. B., Davern, T., Serrano, J., Yang, H., & Rochon, J. (2008). Causes, Clinical Features, and Outcomes From a Prospective Study of Drug-Induced Liver Injury in the United States. *Gastroenterology*, 135(6), 1924–1934. doi: 10.1053/j.gastro.2008.09.011
- Colmenarejo, G., Lozano, S., González-Cortés, C., Calvo, D., Sanchez-Garcia, J., Matilla, J.-L. P., Leroy, D., & Rodrigues, J. (2018). Predicting transmission blocking potential of anti-malarial compounds in the Mosquito Feeding Assay using *Plasmodium falciparum* Male Gamete Inhibition Assay. *Scientific Reports*, 8(1), 7764. doi: 10.1038/s41598-018-26125-w
- Delves, M. J., Miguel-Blanco, C., Matthews, H., Molina, I., Ruecker, A., Yahiya, S., Straschil, U., Abraham, M., León, M. L., Fischer, O. J., Rueda-Zubiaurre, A., Brandt, J. R., Cortés, Á., Barnard, A., Fuchter, M. J., Calderón, F., Winzeler, E. A., Sinden, R. E., Herreros, E., ... Baum, J. (2018). A high throughput screen for next-generation leads targeting malaria parasite transmission. *Nature Communications*, 9(1), 3805. doi: 10.1038/s41467-018-05777-2
- Delves, M. J., Ruecker, A., Straschil, U., Lelièvre, J., Marques, S., López-Barragán, M. J., Herreros, E., & Sinden, R. E. (2013). Male and Female *Plasmodium falciparum* Mature Gametocytes Show Different Responses to Antimalarial Drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(7), 3268–3274. doi: 10.1128/AAC.00325-13
- Delves, M. J., Straschil, U., Ruecker, A., Miguel-Blanco, C., Marques, S., Dufour, A. C., Baum, J., & Sinden, R. E. (2016). Routine in vitro culture of *P. falciparum* gametocytes to evaluate novel transmission-blocking interventions. *Nature Protocols*, 11(9), 1668–1680. doi: 10.1038/nprot.2016.096
- Duffy, S., & Avery, V. M. (2013). Identification of inhibitors of *Plasmodium falciparum* gametocyte development. *Malaria Journal*, 12(1), 408. doi: 10.1186/1475-2875-12-408
- Fokoue, H. H., Marques, J. V., Correia, M. V., Yamaguchi, L. F., Qu, X., Aires-de-Sousa, J., Scotti, M. T., Lopes, N. P., & Kato, M. J. (2018). Fragmentation pattern of amides by EI and HRESI: study of protonation sites using DFT-3LYP data. *RSC Advances*, 8(38), 21407–21413. doi: 10.1039/C7RA00408G
- Food and Drug Administration (FDA). (2018). *Highlights of Prescribing Information-Krintafel*. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2018/210795s000lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/210795s000lbl.pdf)
- GHS. (2005). *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*. <https://unece.org/ghs-rev1-2005>
- Goodman, L. S., & Gilman, A. (2012). Farmacocinética: a dinâmica da absorção, distribuição, ação e eliminação dos fármacos. In I. L. O. Buxton & L. Z. Benet (Orgs.), *As Bases Farmacológicas da Terapêutica* (12ª ed, p. 1–2079). Porto Alegre: McGraw-Hill.
- Grime, K. H., Barton, P., & McGinnity, D. F. (2013). Application of In Silico, In Vitro and Preclinical Pharmacokinetic Data for the Effective and Efficient Prediction of Human Pharmacokinetics. *Molecular Pharmaceutics*, 10(4), 1191–1206. doi: 10.1021/mp300476z
- Hosey, C. M., & Benet, L. Z. (2015). Predicting the extent of metabolism using in vitro permeability rate measurements and in silico permeability rate predictions. *Molecular Pharmaceutics*, 12(5), 1456–1466. doi: 10.1021/mp500783g.Predicting

- Jing, Y., Easter, A., Peters, D., Kim, N., & Enyedy, I. J. (2015). In silico prediction of hERG inhibition. *Future Medicinal Chemistry*, 7(5), 571–586. doi: 10.4155/fmc.15.18
- Kerns, E. H., & Di, L. (2008a). Advantages of Good Drug-like Properties. In *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods* (1° ed, p. 6–16). San Diego, USA: Elsevier. doi: 10.1016/B978-012369520-8.50003-6
- Kerns, E. H., & Di, L. (2008b). hERG Blocking. In *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods* (1° ed, p. 209–214). San Diego, USA: Elsevier. doi: 10.1016/B978-012369520-8.50017-6
- Kerns, E. H., & Di, L. (2008c). Metabolic Stability. In *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods* (1° ed, p. 137–II). San Diego, USA: Elsevier. doi: 10.1016/B978-012369520-8.50012-7
- Kerns, E. H., & Di, L. (2008d). Pharmacokinetics. In *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods* (1° ed, p. 228–241). San Diego, USA: Elsevier. doi: 10.1016/B978-012369520-8.50020-6
- Kerns, E. H., & Di, L. (2008e). Plasma Protein Binding. In *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods* (1° ed, p. 187–196). San Diego, USA: Elsevier. doi: 10.1016/B978-012369520-8.50015-2
- Khoury, D. S., Cao, P., Zaloumis, S. G., & Davenport, M. P. (2020). Artemisinin Resistance and the Unique Selection Pressure of a Short-acting Antimalarial. *Trends in Parasitology*, 36(11), 884–887. doi: 10.1016/j.pt.2020.07.004
- Kok-Yong, S., & Lawrence, L. (2015). Drug Distribution and Drug Elimination. In *Basic Pharmacokinetic Concepts and Some Clinical Applications*. InTech. doi: 10.5772/59929
- Kumar, R., Sharma, A., Siddiqui, M. H., & Tiwari, R. K. (2018). Prediction of Drug-Plasma Protein Binding Using Artificial Intelligence Based Algorithms. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 21(1), 57–64. doi: 10.2174/1386207321666171218121557
- Lambros, C., & Vanderberg, J. P. (1979). Synchronization of *Plasmodium falciparum* Erythrocytic Stages in Culture. *The Journal of Parasitology*, 65(3), 418. doi: 10.2307/3280287
- Leba, L.-J., Musset, L., Pelleau, S., Estevez, Y., Birer, C., Briolant, S., Witkowski, B., Ménard, D., Delves, M. J., Legrand, E., Duplais, C., & Popovici, J. (2015). Use of *Plasmodium falciparum* culture-adapted field isolates for in vitro exflagellation-blocking assay. *Malaria Journal*, 14(1), 234. doi: 10.1186/s12936-015-0752-x
- Lombardo, F., Desai, P. V., Arimoto, R., Desino, K. E., Fischer, H., Keefer, C. E., Petersson, C., Winiwarter, S., & Broccatelli, F. (2017). In Silico Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Pharmacokinetics (ADME-PK): Utility and Best Practices. An Industry Perspective from the International Consortium for Innovation through Quality in Pharmaceutical Development. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(22), 9097–9113. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b00487
- Miao, J., Wang, Z., Liu, M., Parker, D., Li, X., Chen, X., & Cui, L. (2013). *Plasmodium falciparum*: Generation of pure gametocyte culture by heparin treatment. *Experimental Parasitology*, 135(3), 541–545. doi: 10.1016/j.exppara.2013.09.010
- Miguel-Blanco, C., Molina, I., Bardera, A. I., Díaz, B., de las Heras, L., Lozano, S., González, C., Rodrigues, J., Delves, M. J., Ruecker, A., Colmenarejo, G., Viera, S., Martínez-Martínez, M. S., Fernández, E., Baum, J., Sinden, R. E., & Herreros, E. (2017). Hundreds of dual-stage antimalarial molecules discovered by a functional gametocyte screen. *Nature Communications*, 8(1), 15160. doi: 10.1038/ncomms15160
- Pham The, H., González-Álvarez, I., Bermejo, M., Mangas Sanjuan, V., Centelles, I., Garrigues, T. M., & Cabrera-Pérez, M. Á. (2011). In Silico Prediction of Caco-2 Cell Permeability by a Classification QSAR Approach. *Molecular Informatics*, 30(4), 376–385. doi: 10.1002/minf.201000118
- Pinto, N., & Eileen Dolan, M. (2011). Clinically Relevant Genetic Variations in Drug Metabolizing Enzymes. *Current Drug Metabolism*, 12(5), 487–497. doi: 10.2174/1389200111795495321
- Roberts, F., & Freshwater-Turner, D. (2007). Pharmacokinetics and anaesthesia. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain*, 7(1), 25–29. doi: 10.1093/bjaceaccp/mkl058
- Sabbatani, S., Manfredi, R., & Fiorino, S. (2010). Malaria infection and the anthropological evolution. *Saúde e Sociedade*, 19(1), 64–83. doi: 10.1590/S0104-12902010000100006
- Sanguinetti, M. C., & Mitcheson, J. S. (2005). Predicting drug–hERG channel interactions that cause acquired long QT syndrome. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26(3), 119–124. doi: 10.1016/j.tips.2005.01.003
- Santos, B. M., Dias, B. K. M., Nakabashi, M., & Garcia, C. R. S. (2021). The Knockout for G Protein-Coupled Receptor-Like PfSR25 Increases the Susceptibility of Malaria Parasites to the Antimalarials Lumefantrine and Piperazine but Not to Medicine for Malaria Venture Compounds. *Frontiers in Microbiology*, 12. doi: 10.3389/fmicb.2021.638869
- Silva, M. A. da, Da Silva, F. B. ., Passarini, G. M. ., Fialho, S. N. ., Dos Santos, A. P. D. A. ., Martinez, L. D. N., Teles, C. B. G., & Kuehn, C. C. (2019). No Title. *South American Journal of Basic Education, Technical and Technological*, 6(2), 818–858.
- Silva, M. A., Veloso, M. P., de Souza Reis, K., de Matos Passarini, G., dos Santos, A. P. de A., do Nascimento Martinez, L., Fokoue, H. H., Kato, M. J., Teles, C. B. G., & Kuehn, C. C. (2020). In silico evaluation and in vitro growth inhibition of *Plasmodium falciparum* by natural amides and synthetic analogs. *Parasitology Research*, 119(6), 1879–1887. doi: 10.1007/s00436-020-06681-9
- Suh, J. I. (2020). Drug-induced liver injury. *Yeungnam University Journal of Medicine*, 37(1), 2–12. doi: 10.12701/yujm.2019.00297
- Sun, H., Huang, R., Xia, M., Shahane, S., Southall, N., & Wang, Y. (2017). Prediction of hERG Liability - Using SVM Classification, Bootstrapping and Jackknifing. *Molecular Informatics*, 36(4), 1600126. doi: 10.1002/minf.201600126
- Trager, W., & Jensen, J. B. (1976). Human Malaria Parasites in Continuous Culture. *Science*, 193(4254), 673–675. doi: 10.1126/science.781840

- Tran, T. M., & Crompton, P. D. (2020). Decoding the complexities of human malaria through systems immunology. *Immunological Reviews*, 293(1), 144–162. doi: 10.1111/imr.12817
- Vandenberg, J. I., Perry, M. D., Perrin, M. J., Mann, S. A., Ke, Y., & Hill, A. P. (2012). hERG K<sup>+</sup> Channels: Structure, Function, and Clinical Significance. *Physiological Reviews*, 92(3), 1393–1478. doi: 10.1152/physrev.00036.2011
- Villoutreix, B. O., & Taboureau, O. (2015). Computational investigations of hERG channel blockers: New insights and current predictive models. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 86, 72–82. doi: 10.1016/j.addr.2015.03.003
- Vuignier, K., Schappler, J., Veuthey, J.-L., Carrupt, P.-A., & Martel, S. (2010). Drug–protein binding: a critical review of analytical tools. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(1), 53–66. doi: 10.1007/s00216-010-3737-1
- Wicht, K. J., Mok, S., & Fidock, D. A. (2020). Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *Annual Review of Microbiology*, 74(1), 431–454. doi: 10.1146/annurev-micro-020518-115546
- Witchel, H. J. (2007). The hERG potassium channel as a therapeutic target. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 11(3), 321–336. doi: 10.1517/14728222.11.3.321
- World Health Organization – WHO. (2021). *World malaria report 2021*. <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2021>
- Xu, Y., Dai, Z., Chen, F., Gao, S., Pei, J., & Lai, L. (2015). Deep Learning for Drug-Induced Liver Injury. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 55(10), 2085–2093. doi: 10.1021/acs.jcim.5b00238
- Yee, S. (1997). In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man-Factor or myth. *Pharmaceutical Research*, 14(6), 4.