

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

ANDRÉA FAGUNDES GRAVA

Utilização da enzima *β -cetoacil ACP redutase* (OAR) da via FAS II
de *Plasmodium falciparum* como um alvo para busca de novos
compostos antimaláricos

Manaus
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

Utilização da enzima *β -cetoacil ACP redutase* (OAR) da via FAS II
de *Plasmodium falciparum* como um alvo para busca de novos
compostos antimaláricos.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Multi-institucional em Biotecnologia da
Universidade Federal do Amazonas, como parte
dos requisitos para obtenção do título de Doutor(a)
em Biotecnologia.

Área de concentração em Biotecnologia para
Saúde.

Orientado(a): Andréa Fagundes Grava

Orientador: Dr. Spartaco Astolfi Filho

Co-orientador(a): Dra. Patricia S. de M. Medeiros

Manaus
2014

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

G775u Grava, Andréa Fagundes
Utilização da enzima -cetoacil ACP redutase (OAR) da via FAS II de Plasmodium falciparum como um alvo para busca de novos compostos antimaláricos / Andréa Fagundes Grava. 2014
80 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Spartaco Astolfi Filho
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Drogas antimaláricas. 2. Malária. 3. Ácidos Graxo II. 4. Rotas Metabólicas. I. Astolfi Filho, Spartaco II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Utilização da enzima β -cetoacil ACP redutase (FabG) da via FAS II de *Plasmodium falciparum* como um alvo para busca de novos compostos antimaláricos.

ANDRÉA FAGUNDES GRAVA

FOLHA DE APROVAÇÃO

REALIZADA EM : 11 / 12 / 2014 ÀS 8:00h

A BANCA JULGADORA DO TRABALHO DE TESE CONSIDERA A CANDIDATA:

APROVADA

BANCA JULGADORA:

DR. SPARTACO ASTOLFI FILHO
UFAM /AM

DRA. CARLA F. CELIDÔNIO FERNANDES
FIOCRUZ/RO

DR. ANDREIMAR MARTINS SOARES
FIOCRUZ/RO

DRA. JOANA D'ARC NEVES COSTA
CEPEM/RO

DR. LEONARDO DE AZEVEDO CALDERON
FIOCRUZ- UNIR/RO

DEDICATÓRIA

Mãe:

Obrigada por todos momentos dedicados a mim, pelas palavras, pelos conselhos, pelo amor, pela honestidade, pelo afeto, pela amizade.

Muito mais do que mãe você é minha amiga, meu escudo contra todas as coisas ruins. Você é essencial na minha vida.

Depois dos momentos que passamos juntas, olho para trás e vejo que tenho uma pessoa em quem posso me apoiar sempre que estiver necessitando de amor e compreensão.

Só duas palavras podem exprimir exatamente o quanto estou grata:

AMO VOCÊ!

Dedico à você, minha mãe Maria Elisa.

E a minha família:

Philip e as Marias da minha Vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço àqueles que entendem que nada se faz sozinho, que sabe que uma ideia pode se formar a partir de muitas opiniões e que acreditam que toda contribuição é importante.

Agradeço imensamente ao querido Dr. Luiz Hildebrando Pereira da Silva (*in memoriam*) por sua determinação, liderança, incentivo, estímulo e ideias durante todos esses anos. Esta Tese é uma pequena parte de um imenso trabalho que o senhor nos deixou de herança.

Muito Obrigada prof. Hildebrando!

Agradeço ao professor SPARTACO ASTOLFI FILHO, que nunca esteve ocupado para me atender. Eu me sinto honrada pela excelente orientação, confiança e empolgação transmitidas, pelas discussões e por compartilhar um pouco do seu vasto conhecimento comigo.

A Dra. Patrícia Soares de M. Medeiros, pela co-orientação, amizade e incentivos nesta jornada, contribuindo de forma sempre positiva.

Ao Dr. Eduardo R. Honda por sua disponibilidade em sempre me receber e discutir os resultados, novas ideias e auxílio primordial no projeto.

Ao Dr. Fernando B. Zanchi por sua disponibilidade em me auxiliar em uma área nova e disponibilidade de realizar os ensaios de Bioinformática, essencial para o desenvolvimento deste projeto. E com as ideias inovadoras, pensamento crítico e debate de ideias.

Ao Dr. Rudson de J. Holanda, ao Dr. Leandro de M. Dill e a Msc. Bruna L. Protti Wöhlke por contribuírem de forma tão positiva a esta Tese. Agradeço por cada conhecimento compartilhado e cada lição aprendida e principalmente pela amizade e por saber que eu posso contar com vocês.

Este trabalho não é resultado apenas de um esforço individual. Ele nasce de significativas contribuições que recolhi durante minha trajetória profissional, acadêmica e ao

lidar com pessoas (infelizmente algumas não estão mais entre nós) e Instituições que foram fundamentais a essa construção.

Consciente de que é impossível listar todos que de uma forma ou de outra me acrescentaram conhecimentos e experiências essenciais à forma de ver o mundo e nele atuar e preciso expressar meu agradecimento por:

Aos apoiadores e financiadores da pesquisa científica. Este trabalho contou com:

- Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq);
- Projeto CNPq- PRONEX - Rede Malária;
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Ao Centro de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas (CAM/UFAM)
- Centro de Pesquisa em Patologias Tropicais (CEPEM/RO) agradecendo a Dra Joana D'arc, Dra Rose e Dr. Mauro.
- Instituto de Pesquisa em Patologia Tropical – IPEPATRO/RO;
- Fundação Osvaldo Cruz – FIOCRUZ/RO e

De forma coletiva, preciso registrar a contribuição das equipes de trabalho das quais participei, como ao Laboratório CAM-UFAM/AM e uma parte da equipe que fizeram auxiliaram nesta jornada: Dr. Edmar Andrade, Dr. Carlos Gustavo Nunes, Msc. Enedina Nogueira, Msc.Tiago Santos de Oliveira, Msc.Edson Junior do Carmo, Msc.Rogério Neves, Elza, Joelma da Silva Reis, Elzimar Pacheco Braga e Nubiane dos Santos Pinon, e aos docentes e discentes, ao Laboratório PHAGE DISPLAY– Fiocruz/RO, agradecendo a Dra. Carla Celedonio, Dra. Soraya Santos, Msc. Marcos Barros, Msc. Michele, Gabriela, Nidiane, Andreilisse e aos demais alunos da equipe, ao Laboratório CEBIO–FIOCRUZ/UNIR/RO, agradecendo ao Dr. Andreimar Soares, Dr. Leonardo Calderon e todos os alunos da equipe, ao Laboratório de BIOENSAIOS DA MALÁRIA E LEISHMANIOSE– FIOCRUZ/RO agradecendo a Dra Carolina Bioni Teles, a Elci, ao Carlos, aos alunos Flávio Augusto, Flávia e Daniel Sol Sol.

Um agradecimento especial merece ser feito aos meus colegas destes departamentos com quem tive e tenho tido a oportunidade de unir uma convivência agradável, companheira e produtiva.

À minha família que reza por mim, sabe que a ciência é minha vida e que me entrego de corpo e alma a tudo que faço.

Ao Philip que me proporcionou muitas alegrias no decorrer desta Tese e hoje temos um sonho realizado, formamos nossa família e temos a convivência maravilhosa e inexplicável de duas princesas: Maria Antônia e Maria Teresa, que me deram ânimo e força para a conclusão desta Tese e permanência na pesquisa, sempre estudando e buscando o novo.

Aos meus pais Junior e Maria Elisa, irmãos Sílvia, Flávia e João Fernando, cunhados Edinaldo, Vânio e Andréia, sobrinhos Bruno, Luis Fernando, Ana Karolina, Igor, Letícia e Arthur (a caminho), avós Lázaro, Elisa, Lourdes e Almeirindo (*in memorian*), tios, primos e agregados que sempre torceram e me apoiaram em toda a minha trajetória: OBRIGADA!

Às minhas amigas: Roselane Costa, Paula Vitorino, Gabriela Zanetti, Leidiane Amorin, Taíse Vargas, Evanira dos Santos, Adriana Mari, Anny Beatriz Ueda, Fabiane Maciel, Ana Carolina Moreno, Sharon Cardoso e Roberta Alessandra. Amigos são como o vento: às vezes perto, outras longe, mas eternos em nossos corações. Obrigada amigas por fazerem parte da minha vida!

Aos amigos eternos, Hildon e Ieda Chaves, que nunca mediram esforço para me apoiar e acreditar em meu sonho.

“Seu trabalho vai ocupar uma grande parte da sua vida. A única maneira de estar verdadeiramente satisfeito é fazendo aquilo que você acredita ser um ótimo trabalho. E o único jeito de fazer um ótimo trabalho é fazendo algo que você ama.”

Steve Jobs

Utilização da enzima β -cetoacil ACP redutase (OAR) da via FAS II de *Plasmodium falciparum* como um alvo para busca de novos compostos antimaláricos.

RESUMO

Introdução: A Malária é a doença parasitária com maior número de interações e mortes por ano em todo o mundo, sendo um dos maiores problemas de saúde pública na África, América do Sul e Ásia Oriental. Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde, 198 milhões de pessoas ficaram doentes em 2014. Essas evidências levaram ao desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento da malária a fim de minimizar o crescente problema da resistência do parasita aos medicamentos de uso corrente. Com a elucidação de algumas Vias Metabólicas essenciais para do desenvolvimento do parasita da malária, novos alvos moleculares foram propostos para o desenvolvimento de novas drogas, entre eles pode-se citar a *Hipoxantina Guanina Fosforribosiltransferase* (HGPR), *Corismato sintase*, *Enoil –ACP redutase* e a *Fosforilase de nucleosídeos purínicos* (PNP). **Objetivo:** O objetivo desse estudo foi a identificação de compostos como possíveis inibidores contra a enzima *Beta-cetoacil-ACP- redutase* - OAR de *Plasmodium falciparum*. **Resultados:** A enzima de 28kDa, foi expressa em *Escherichia coli* e purificada através de cromatografia de afinidade. Buscas de novas moléculas através de *Sceenning Virtual* por *Docking* foram capazes de encontrar 30 moléculas das quais foi selecionada a molécula Skyrin por apresentar maior afinidade pela enzima OAR. Análise da atividade enzimática por espectrofotometria utilizando os substratos NADPH e Acetoacetil-COA a enzima OAR apresentou atividade reduzindo NADPH, em concentrações dos substratos variadas, e mostrou ser inibida por Skyrin. Foi possível mostrar também por Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) que a Skyrin liga-se à enzima OAR porém dissocia-se facilmente. Em testes utilizando-se culturas celulares infectadas com *P. falciparum* essa molécula apresentou atividade antimalárica com IC₅₀ de 8,88µg/mL, não sendo tóxica para a linhagem celular HepG2. **Conclusão:** Esta nova abordagem apresenta vantagens significativas quando comparada aos métodos tradicionais, uma vez que se estabelece antecipadamente a especificidade do bioativo e respectivo mecanismo de ação. Alvos ideais para o desenvolvimento de fármacos contra agentes infecciosos antimaláricos devem ser essencial para a sobrevivência do patógeno e estar ausente no hospedeiro.

Palavras-chave: Drogas antimaláricas, Malária, Via dos Ácidos Graxos II, Rotas Metabólicas,.

Use of the enzyme β -ketoacyl ACP reductase (OAR) of *Plasmodium falciparum* via FAS II as a target for the search for new antimalarial compounds.

ABSTRACT

Introduction: Malaria is a parasitic disease with the highest number of hospitalizations and deaths each year worldwide, one of the major public health problems in Africa, South America and East Asia. According to estimates by the World Health Organization, 198 million people became ill in 2014. This evidence led to the development of new strategies for the treatment of malaria in order to minimize the growing problem of parasite resistance to commonly used medicinal products. With the elucidation of metabolic pathways essential for some of the malaria parasite development, new molecular targets have been proposed for the development of new drugs, among which can be cited Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyltransferase (HGPRT) Chorismate synthase, enoyl-ACP reductase and purine nucleoside phosphorylase (PNP). **Objective:** The objective of this study was the identification of compounds as potential inhibitors of beta-ketoacyl-ACP reductase enzyme - OAR *Plasmodium falciparum*. **Results:** The 28kDa enzyme was expressed in *Escherichia coli* and purified by affinity chromatography. Searches of new molecules through Screening by Virtual Docking were able to find 30 molecules of which was selected Skyrin molecule due to its higher affinity for the enzyme OAR. Analysis of enzyme activity by spectrophotometry using NADPH and acetoacetyl-CoA substrates the enzyme showed activity OAR reducing NADPH in the various substrates concentrations, and was shown to be inhibited by Skyrin. It was also possible to show by surface plasmon resonance (SPR) Skyrin that the molecule binds to the enzyme OAR but dissociates easily. In tests using cell cultures infected with *P. falciparum* this molecule showed antimalarial activity with IC_{50} 8,88 μ g / ml, and is not toxic to HepG2 cell line. **Conclusion:** This new approach has significant advantages compared to traditional methods, since it establishes in advance the specific bioactive and its mechanism of action. Ideal targets for the development of antimalarial drugs against infectious agents must be essential to the survival of the pathogen and the host is absent.

Keywords: Antimalarial Drugs, Malaria, Via of Fatty Acids II, Metabolic routes.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACP – proteína transportadora de acil
- BL21 (DE3) – linhagem celular de *E.coli*
- C-16 – ácido palmítico
- CoA – coenzima A
- CQ – Cloroquina
- DMSO – dimetilsulfoxido
- E. coli* – *Escherichia coli*
- Fab B – *beta cetoacil ACP sintase I*
- FabA – *beta hidroxidecanoil ACP desidratase*
- FabF – *beta cetoacil ACP sintase II*
- FabG ou OAR – *beta cetoacil ACP redutase*
- FabI – *enoil ACP redutase*
- FAS I - via de biossíntese de ácidos graxos Tipo I
- FAS II - via de biossíntese de ácidos graxos Tipo II
- HepG2 – linhagem celular de Hepatoma Humano
- HGPRT – *hipoxantina guanina fosforribosiltransferase*
- His6X – cauda de histidina (seis vezes)
- HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência
- IC50 – Concentração Inibitória de 50% do parasita
- IPTG - Isopropil β -D-tiogalactopiranosideo
- IS – índice de seletividade
- Kcat – constante catalítica
- Kcat/Km – eficiência catalítica (especificidade)
- KD – Constante de afinidade
- Km – constante de Michaelis
- MEP - via metil-eritrol fosfato (MEP)
- MTT – Brometo 3-(4,5 dimetiltiazol 2 yl)-2,5-difeniltetrazol
- NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
- NTA/Ni – resina de níquel complexado com ácido nitriloacético
- P. brasilianun* – *Plasmodium brasilianum*
- P. cynomolgi* – *Plasmodium cynomolgi*

P. falciparum – *Plasmodium falciparum*

P. inui – *Plasmodium inui*

P. knowlesi – *Plasmodium knowlesi*

P. ovale – *Plasmodium ovale*

P. simium – *Plasmodium simium*

P. vivax – *Plasmodium vivax*

P. malarie – *Plasmodium malarie*

PCR – reação de cadeia polimerase

PDB – banco de dados virtual

pGS21a – plasmídeo recombinante de expressão

PI – ponto Isoelétrico

PNP – *fosforilase de nucleosídeos purínicos*

pUC57 – vetor de clonagem

RU – Unidade de Ressonância

SBF – soro fetal bovino

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida

V_{máx} – Velocidade máxima da reação inicial

WHO – Organização mundial de Saúde

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica e endemicidade da Malária no mundo.	19
Figura 2: Resistência do <i>Plasmodium falciparum</i> aos antimaláricos.....	22
Figura 3: Estrutura dos Álcoois Quinólicos e Aminoquinolinas.....	24
Figura 4: Metabolismo e transporte em <i>Plasmodium falciparum</i>	27
Figura 5: Biossíntese de ácidos graxos do Tipo II (FAS II)	29
Figura 6: Representação estrutural da enzima β -cetoacil ACP redutase / OAR.....	30
Figura 7: Redução da enzima β -cetoacil ACP redutase.....	31
Figura 8: Esquema representativo da metodologia	34
Figura 9: Sequência de nucleotídeos e aminoácidos da enzima <i>PfOAR</i>	36
Figura 10: Mapa do vetor de expressão pGS-21a	37
Figura 11: Estrutura tridimensional (3D) e bidimensional (2D) da molécula Skyrin.....	48
Figura 12: Molécula Skyrin ancorada no sitio de ligação da enzima OAR.	49
Figura 13: Perfil eletroforético das proteínas recombinante <i>E.coli</i> BL21(DE3) + pGSOAR. 51	
Figura 14: Análise do processo de purificação da enzima OAR por SDS-PAGE 12%.....	52
Figura 15: Atividade da enzima <i>PfOAR</i> em função da concentração de Acetoacetyl-CoA...53	
Figura 16: Mostra a atividade inibitória da molécula Skyrin na atividade da enzima <i>PfOAR</i> 55	
Figura 17: Níveis de interação dos substratos NADPH e Acetoacetyl-CoA com a.....57	
Figura 18: Sensorgrama da cinética de único fluxo da mol. Skyrin com a enzima <i>PfOAR</i> ... 58	
Figura 19: Sensorgrama da cinética de interação mol. Skyrin com a enzima <i>PfOAR</i>59	
Figura 20: Sensorgrama da interação dos extratos vegetais com o ligante <i>PfOAR</i> 60	
Figura 21: Interação dos 37 extratos vegetais testados com o ligante <i>PfOAR</i>	61
Figura 22: Extratos vegetais com potencial de interação ao ligante <i>PfOAR</i>	62
Figura 23: Atividade da Molécula Skyrin contra <i>Plasmodium falciparum</i> e Células HepG2 64	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Moléculas encontradas na análise de <i>virtual screening</i> , possíveis alvos contra a <i>Beta-cetoacil-ACP-redutase/OAR</i>	46
Tabela 2: Valores das constantes aparentes do substrato Acetoacetyl-COA.	53
Tabela 3: Avaliação do potencial Antimalárico e Citotóxico	65
Tabela 4: Extratos vegetais do potencial Antimalárico e Citotóxico	66
Tabela 5: Amostras de extratos vegetais aos testes de SPR, Anti-HRPII e Citotoxicidade....	67

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	MALÁRIA: HISTÓRICO E ETIOLOGIA.....	17
1.2	MALÁRIA NO BRASIL.....	19
1.3	ANTIMALÁRICOS: MECANISMO DE AÇÃO E RESISTÊNCIA.....	20
1.4	APICOPLASTO, UMA ABUNDANTE FONTE PARA ALVOS MOLECULARES TERAPÊUTICO.....	24
1.5	VIA METABÓLICA DE BIOSÍNTESE DOS ÁCIDOS GRAXOS EM <i>PLASMODIUM</i>	26
1.6	ENZIMA <i>B-CETOACIL-ACP REDUTASE</i>	30
2	OBJETIVOS:.....	33
2.1	GERAL.....	33
2.2	ESPECÍFICOS.....	33
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1	FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA APLICADA.....	34
3.2	ANÁLISE DA ENZIMA <i>B-CETOACIL ACP REDUTASE/OAR</i> POR <i>VIRTUAL SCRENNING</i> ATRAVÉS DE <i>DOCKING</i> MOLECULAR.....	35
3.3	IDENTIFICAÇÃO DO GENE E DA ESTRUTURA 3D DA ENZIMA <i>B-CETOACIL-ACP-REDUTASE</i> EM BANCOS DE DADOS.....	35
3.4	SÍNTESE QUÍMICA E SUBCLONAGEM DA ENZIMA <i>B-CETOACIL ACP REDUTASE/OAR</i> EM VETOR DE EXPRESSÃO EM <i>E. COLI</i>	36
3.5	EXPRESSÃO DA <i>B-CETOACIL-ACP-REDUTASE</i> RECOMBINANTE.....	37
3.6	ANÁLISE DA EXPRESSÃO POR ELETROFORESE SDS-PAGE.....	38
3.5	PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA PGS21A-PFOAR.....	38
3.6	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA.....	39
3.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PFOAR.....	39
3.8	ESTUDOS DE INTERAÇÃO MOLECULAR VIA RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE (SPR).....	40
3.9	EXTRATOS VEGETAIS DA BIODIVERSIDADE AMAZÔNICA.....	41
3.10	SOLUBILIZAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS BRUTOS E COMPOSTO SINTÉTICO PARA TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	42
3.11	TESTES <i>IN VITRO</i> CONTRA <i>P. FALCIPARUM</i>	42

3.11.1	<i>Cultivo contínuo da fase eritrocítica do parasito</i>	42
3.11.2	<i>Sincronização dos parasitos para utilização nos testes in vitro</i>	42
3.11.3	<i>Preparo das placas-testes para os ensaios de quimioterapia</i>	43
3.11.4	<i>Teste imunoenzimático anti-HRP II</i>	43
3.11.5	<i>Determinação da concentração inibitória de 50% do crescimento do parasito (IC₅₀)</i>	44
3.12	ENSAIOS <i>IN VITRO</i> DE CITOTOXICIDADE	44
3.12.1	<i>Cultivo de linhagens celulares</i>	44
3.12.2	<i>Preparo das placas-testes</i>	45
3.12.3	<i>Ensaio de citotoxicidade utilizando o método MTT</i>	45
3.12.4	<i>Índice de Seletividade</i>	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1	<i>VIRTUAL SCREENING VIA DOCKING MOLECULAR</i>	46
4.2	CLONAGEM E SUBCLONAGEM DA REGIÃO ESTRUTURAL DA OAR NO VETOR DE EXPRESSÃO	49
4.3	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA ENZIMA <i>BETA-CETOACIL-ACP-REDUTASE – OAR</i>	50
4.4	ANÁLISE DA ATIVIDADE DA ENZIMA <i>PfOAR</i>	52
4.5	INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA PELA SKYRIN	54
4.6	ANÁLISE DA INTERAÇÃO DA SUBSTÂNCIA SKYRIN E EXTRATOS VEGETAIS POR RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE.....	56
4.6.1	<i>Ensaio de pré-concentração, imobilização e ligação dos substratos com a enzima PfOAR</i>	56
4.6.2	<i>Ensaio de interação da Skyrin com a enzima PfOAR</i>	57
4.6.3	<i>Ensaio de interação dos extratos vegetais com a enzima PfOAR</i>	60
4.7	AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE <i>IN VITRO</i> DA MOLÉCULA SKYRIN CONTRA <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> E ANÁLISE DO EFEITO CITOTÓXICO.....	63
5	CONCLUSÕES	69
6	REFEÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária: histórico e etiologia

Em 1880, Charles Louis Alphonse Laveran, médico do exército colonial francês na Argélia, descobriu o agente etiológico da malária, um protozoário que parasita os glóbulos vermelhos do sangue. Mais tarde, outros autores descobriram que eram quatro as espécies parasitas da malária que infectam o homem, protozoários atualmente classificados como pertencentes ao Filo Apicomplexa, Classe Aconoidasida, Ordem Haemosporida, Família *Plasmodidae*, Gênero *Plasmodium* (CAMARGO, 2003).

Também conhecida como maleita ou paludismo, a Malária é uma doença infecciosa presente na história da humanidade provavelmente desde seu surgimento na África há milhões de anos, associada a pântanos, regiões palustres, várzeas e alagadiços (GOMES, 2011). Em geral os países que apresentam maior endemia são os países subdesenvolvidos, sendo que sua maior incidência é no continente africano, mais precisamente ao sul do deserto do Saara (GOMES, 2011).

A malária apresenta características clínicas que podem ser reconhecidas no curso de um acesso malárico típicos quais sejam: presença de calafrios seguidos pela sensação de calor, cefaléia intensa; febre alta, e, na fase final do acesso malárico, a sudorese seguida do declínio da temperatura. A pele sofre transpiração abundante que molha a roupa do paciente. Se a doença não for tratada adequadamente, em particular a malária provocada por *Plasmodium falciparum*, o mais virulento dos plasmódios que infectam o homem, pode desenvolver outros quadros como edema pulmonar, complicações renais, icterícia e obstrução de vasos sanguíneos no cérebro (nos casos graves da doença), situação que poderá levar à morte do indivíduo (MANDAL, 2014).

O *Plasmodium falciparum* é causador da forma grave da doença conhecida como terço maligna, com acessos febris a intervalos de 36 a 48 horas. Das mortes anuais devidas à malária, mais de 95% são causadas pelo *Plasmodium falciparum* (MANDAL, 2014). O homem é o hospedeiro natural de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. maláriae* e *P. ovale*, e, de forma geral, não se infecta com plasmódios de outros mamíferos, aves ou répteis. Entretanto, algumas espécies que causam malária em símios, como *P. simium*, *P. brasilianum*, *P. cynomolgi*, *P. inui* e *P. knowlesi*, já foram implicadas em malária em humanos, tanto em infecções experimentais e acidentais como em infecções naturais (KANTELE; JOKIRANTA, 2011; WHITE, 2008).

Atualmente, a malária é considerada endêmica em 104 países e territórios, sendo a maioria destes países localizados no continente africano. Aproximadamente 198 milhões de casos e 584.000 mortes foram registradas em 2013 em decorrência da malária. Em torno de 80% dos casos e 90% das mortes ocorreram no continente africano decorrentes de infecções por *P. falciparum*, sendo 78% delas em crianças com menos de 5 anos de idade. Em geral os países que apresentam maior endemia são os países subdesenvolvidos. Globalmente, estima-se que 3,2 bilhões de pessoas estão em risco de contrair malária, principalmente populações pobres (WHO, 2013).

O *P. falciparum* infecta eritrócitos em qualquer estágio de maturidade e em consequência resultando em parasitemias altas. Além disso, concentra-se nos pequenos vasos sanguíneos de órgãos interno vitais, devido a sua capacidade de citoaderência, causando eventualmente complicações clínicas e morte (HEDDINI, 2002).

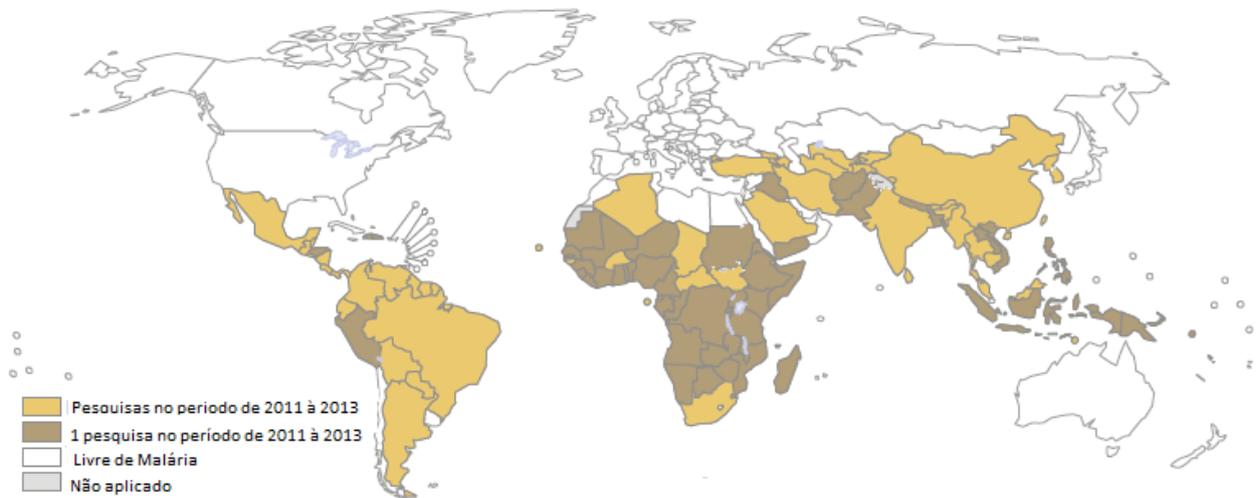
O vetor da transmissão é sempre um mosquito, fêmea do gênero *Anopheles*, no entanto, das 380 espécies conhecidas de mosquitos desse gênero, apenas cerca de 60 podem transmitir a doença (FRANÇA et al., 2004).

O diagnóstico laboratorial da malária é feito através do exame do sangue periférico ao microscópio de luz. As alternativas à microscopia tradicional são: microscopia de fluorescência, detecção de antígenos parasitários, anti-proteínas parasitárias e reação em cadeia da polimerase – PCR (MOHAPATRA et al., 2008).

A identificação microscópica do *P. falciparum* é geralmente baseada na presença de pequenos trofozoítos e gametócitos que apresentam formas característica, com aspecto crescente ou em formato de “banana”, inconfundível com de outras espécies que infectam naturalmente o homem. Este estágio surge no sangue periférico somente depois de 7 a 15 dias depois das crises febris (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). *P. falciparum* é espécie mais estudada dos plasmódios, por sua importância epidemiológica e pelo sucesso do cultivo *in vitro*.

Em 2002, um grande avanço na luta contra este parasita foi alcançado com o sequenciamento completo de seu genoma (GARDNER et al., 2013). Entre os plasmódios, o *P. falciparum* é considerado o mais recente e evolutivamente o menos eficiente como parasita (AGUIAR et al., 2014).

Figura 1: Distribuição geográfica e endemicidade da Malária no mundo.



Legenda: O mapa mostra as regiões do Mundo que apresentam os Países ou áreas onde há ocorrência da Malária (marrom claro) e os que apresentam risco limitado da transmissão (marrom escuro) com pelo menos uma pesquisa domiciliar durante o período de 3 anos 2011-2013, as regiões livre de Malária (em branco).

Fonte: Adaptado de WHO, 2013.

A grande divergência observada no estabelecimento da malária entre as diferentes regiões do mundo é resultado da variação da dinâmica de transmissão parasito-vetor-hospedeiro, que favorece ou limita a transmissão dos riscos da doença e morte (WHO, 2013).

1.2 Malária no Brasil

O Brasil é o país que apresenta o maior número de casos de malária nas Américas (WHO, 2012). A transmissão é praticamente restrita à região da Amazônia Legal, composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Mato Grosso, Maranhão e Tocantins onde são registrados 99,7% dos casos notificados no País (GRIFFING et al., 2013; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

A transmissão na Amazônia Legal esta relacionada a fatores biológicos, como a presença de alta densidade de vetores, agente etiológico, população suscetível; a fatores geográficos, como altos índices de pluviosidade, amplitude da malha hídrica e a cobertura vegetal; a fatores ecológicos, como desmatamentos, construção de hidroelétricas, estradas e sistemas de irrigação e açudes e a fatores sociais, como a presença de numerosos grupos

populacionais, morando em habitações com ausência completa ou parcial de paredes laterais e trabalhando próximo ou dentro das matas (BRASIL, 2013).

Alguns casos de malária no Brasil ocorrem fora da área de transmissão ativa da Amazônia Brasileira, como os correspondentes casos autóctones de malária transmitida e mantida em pequenos focos com características específicas (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

Em 2009, no período entre janeiro e agosto, 282.088 casos foram registrados na região amazônica. Deste total, 79,2% dos casos se concentraram nos estados do Amazonas, Pará e Rondônia (BRASIL, 2013). De acordo com o Ministério da Saúde, o estado do Amazonas é o maior estado com concentração de casos de malária do país. Em 2010, foram registrados 74.135 casos e, em 2011 foram 59.431 casos – uma redução de 18% e no ano de 2012 foram 82.692 casos positivos registrados, um aumento significativo devido às cheias dos rios e fortes chuvas (BRASIL, 2013).

No Estado de Rondônia foram notificados 23.773 casos de malária em 2012, correspondendo a 10% dos casos notificados no país. É o quarto entre os estados da Amazônia Legal, sendo os primeiros os estados do Amazonas, Pará e Acre. A distribuição da malária é bastante heterogênea no estado de Rondônia, tendo municípios com mais de 1.000 casos de malária (Porto Velho, Candeias do Jamari e Machadinho D'Oeste) e vinte três municípios com menos de 10 casos (BRASIL, 2013).

O município de Porto Velho, capital do Estado de Rondônia, ocupa frequentemente o primeiro lugar em termos de números de casos de malária, seguido pelos municípios de Candeias do Jamari e Machadinho D'Oeste (BRASIL, 2013). Dos casos de malária na capital, aproximadamente 80% incide em áreas ribeirinhas ou associadas a estas, observando-se nestas áreas um alto número de portadores assintomáticos (ALVES et al., 2002; KATSURAGAWA et al., 2010; 2013).

1.3 Antimaláricos: Mecanismo de ação e resistência

A partir de 1940, o tratamento para a Malária consistiu em uma monoterapia com a administração de Cloroquina, uma 4-aminoquinolina previamente caracterizada pela sua eficácia, baixa toxicidade e baixo custo (KRISTAN et al., 2009).

Atualmente os fármacos antimaláricos são baseados em produtos naturais ou compostos sintéticos produzidos a partir da década de 40. Esses fármacos são específicos para cada etapa do ciclo de vida do *Plasmodium*. Existem fármacos chamados eritrocíticos, que

atuam nas formas presentes nos eritrócitos do homem, os fármacos gametocíticos que matam as formas sexuadas do parasita (gametócitos) de um indivíduo infectado, de forma que quando esse é picado por outro mosquito se evita a transmissão da doença para o inseto e assim a disseminação da doença para outras pessoas e, por último, os fármacos esporonticidas (ou esporoitocidas), que atuam contra esporozoítos e são capazes de matar os parasitas assim que eles entram na corrente sanguínea, após a picada do mosquito, ou ainda destruí-los quando são liberados pelos esquizontes hepáticos ou sanguíneos. É importante mencionar que os fármacos antimaláricos podem atuar contra mais de uma forma do protozoário e serem efetivos contra uma espécie, mas totalmente ineficazes contra outras (FRANÇA; MARTA, 2008).

O mais eficaz dentre esta família de fármacos foi a Cloroquina, uma das substâncias antimaláricas mais utilizadas para o tratamento e profilaxia da malária em muitas regiões endêmicas. Foi sintetizada primeiramente na Alemanha, todavia, não foi reconhecida como um antimalárico potente até 1940, período a partir do qual teve a sua eficácia validada por militares americanos (FRANÇA; MARTA, 2008)

Por conseguinte, a Cloroquina foi o fármaco de escolha utilizado na campanha de erradicação da malária promovida no período de 1950 a 1960, até o surgimento da resistência do parasita. Apesar de seu mecanismo de ação não ser claramente estabelecido, raramente produz efeitos colaterais graves no tratamento profilático da doença (FRANÇA; MARTA, 2008).

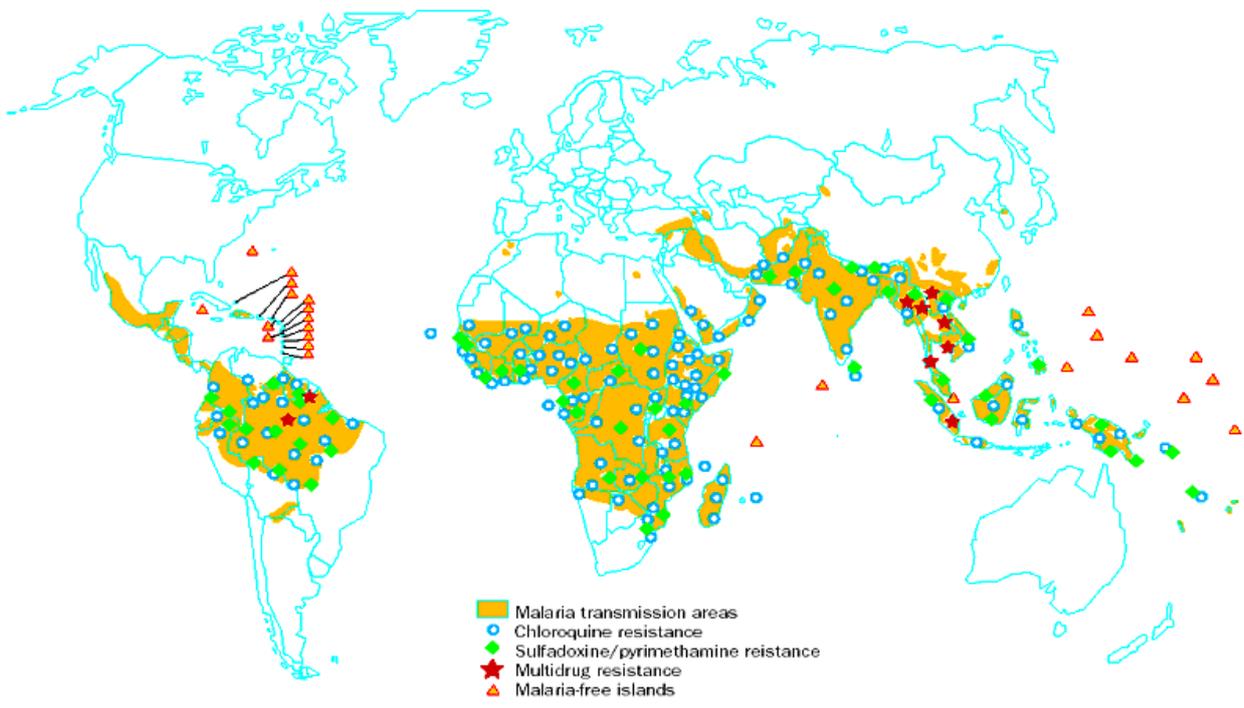
Acredita-se que a primeira ocorrência de cepas de *P. falciparum* resistentes à Cloroquina ocorreu no final dos anos 50, no Sudeste Asiático e também na América do Sul (WHO, 2012). Atualmente, todos os isolados de *P. falciparum* da Amazônia brasileira apresentam mutações que conferem resistência à Cloroquina (GRIFFING et al., 2013).

Apesar da prevalência da resistência a Cloroquina (Figura 2), esta droga continua sendo extensamente utilizada, devido a seu custo reduzido e disponibilidade nos países afetados. Juntamente a Quinona, o Artemisínico, o Antifolato e a Mefloquina constituem-se nas únicas alternativas de tratamento da malária a custo baixo, porém da mesma forma, cepas resistentes de *P. falciparum* surgem rapidamente, e contribuem para as atuais taxas inaceitáveis de falha de tratamento da malária na Ásia e África subsaariana (NTIE-KANG et al., 2014).

Extraída de plantas do género *Artemisia*, em especial da *A. annua L.*, a Artemisinina ou Qing Hao como era conhecida, é utilizada pelo menos desde o 2º século a.c. pelos terapeutas chineses pelas suas propriedades antimaláricas. A sua utilização crescente no

tratamento da malária deu-se a partir da década de 90 do século XX, passando a Artemisinina da medicina tradicional para a primeira linha terapêutica face à malária não complicada. A Artemisinina e os seus derivados mais recentes (Artesunato, Artemeter, Artemotil, dihidroartemisinina) produzem uma rápida resolução da parasitemia com redução do número de parasitas no sangue segundo um fator de aproximadamente dez mil em cada ciclo assexuado, muito mais do que qualquer outro antimalárico conhecido (TARANTO, 2006).

Figura 2: Resistência do *Plasmodium falciparum* aos antimaláricos.



Legenda: A resistência a medicamentos, como a Cloroquina, está espalhada por grande parte da África e por outras partes do mundo, onde a transmissão da Malária é elevada.
Fonte: WHO, 2005.

Muitos fatores contribuem para o desenvolvimento e a disseminação de resistência do Plasmodio aos fármacos, entre os quais se destacam: a interação de padrões de utilização do fármaco, como a dosagem, as características intrínsecas do medicamento, como a meia-vida; fatores relacionados ao hospedeiro, como o sistema imunológico; características do parasita, como a presença de mutações genéticas; fatores relacionados ao vetor, como a afinidade deste pelo parasita; e fatores relacionados ao meio ambiente, como as regiões endêmicas (NOEDL et al., 2002).

A grande capacidade de adaptação dos parasitas da malária revela-se na rapidez com que se desenvolveu, em particular em *P. falciparum*, resistência a praticamente todos os

antimaláricos sintéticos desenvolvidos a partir de 1940. Mutações em diferentes genes são o principal mecanismo capaz de produzir resistência dos plasmódios aos antimaláricos (SEGOVIA, 2013). Em decorrência deste fato, o tratamento inadequado das infecções seleciona eficazmente as mutações que conferem resistência (SEGOVIA, 2013).

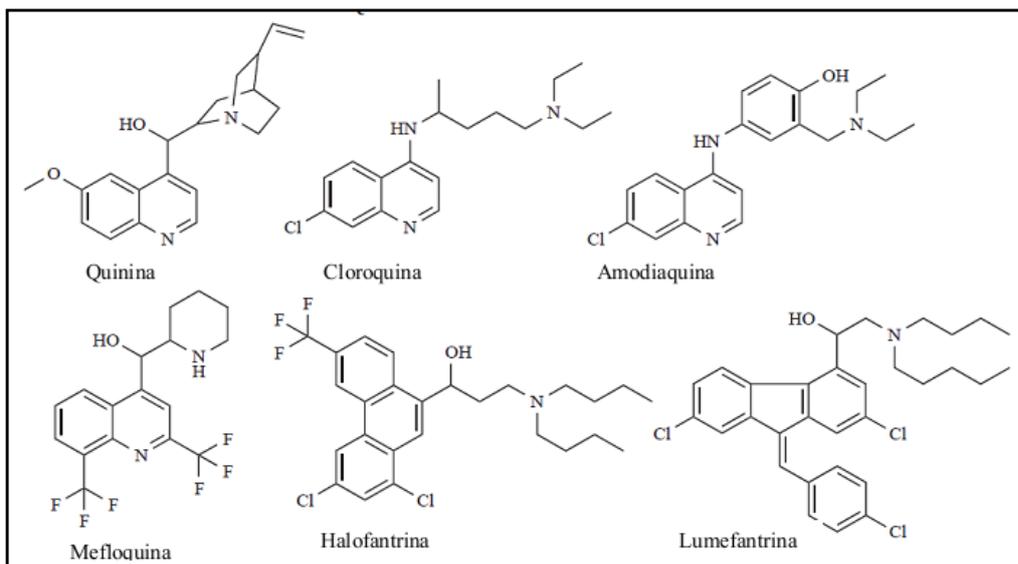
A resistência à quimioterapia é um dos maiores entraves no controle da malária. Ela se deve ao princípio da evolução das espécies, no qual a presença de fármacos, também conhecida como a “pressão dos fármacos”, funciona como processo de seleção natural dos parasitas resistentes no interior do hospedeiro (NTIE-KANG et al., 2014).

A suscetibilidade do *P. falciparum* aos quimioterápicos antimaláricos é comumente avaliada pela resposta terapêutica (teste *in vivo*), como também por ensaios de sensibilidade intrínseca do *P. falciparum* realizados *in vitro*, através da medida da inibição do crescimento do parasita, ou da maturação do esquizonte, a presença do fármaco (ROEPE, 2014; TUTEJA, 2007). A Organização Mundial da Saúde definiu originalmente que a resposta *in vivo* aos medicamentos, correspondente à sensibilidade do plasmódio ao fármaco utilizado, seria avaliada nos termos do clareamento da parasitemia, o que gerou a classificação das cepas de plasmódio em cepas sensíveis (S) e cepas resistentes (R), estas últimas sendo subdivididas em três graus de resistência, RI, RII e RIII (WHO, 2012).

O surgimento da resistência as 4-aminoquinoleínas e outros compostos, revelou a relativa “pobreza” do arsenal terapêutico, estimulando o governo dos Estados Unidos a desenvolver um programa de síntese de novos antimaláricos, cujos fármacos mais promissores foram a Mefloquina, que passou com o decorrer dos anos, a ser largamente utilizada em diversos países, e em menor escala a Halofantrina (FRANÇA; MARTA, 2008).

A Quinina faz parte da família das Quinolinas (Figura 3) que incluem as 4-aminoquinolinas (Cloroquina e Amodiaquina), as 8-aminoquinolinas (Pamaquina e Primaquina) e os Álcoois Quinolínicos (Mefloquina, Halofantrina e Quinina). Estes compostos são ativos contra formas eritrocíticas de *P. falciparum* e *P. vivax*. A Quinina é reservada ao tratamento da malária *falciparum* sensível a esse fármaco, sendo usualmente utilizada em conjunto com um segundo fármaco, como a Clamicidina ou a Tetraciclina, em áreas onde ocorre resistência. O principal efeito colateral produzido pela Quinina é o “chinchonismo”, caracterizado por zumbido e tonturas, que pode ser intenso o suficiente para diminuir a adesão ao tratamento (FRANÇA; MARTA, 2008).

Figura 3: Estrutura dos Álcoois Quinólicos e Aminoquinolinas.



Fonte: Adaptado por (FRANÇA; MARTA, 2008)

A falta de uma vacina profilática efetiva, associada à disseminação de cepas resistentes e multirresistentes aos fármacos em uso indicam claramente a necessidade de desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e identificação de novos alvos para a prevenção e terapêutica da Malária (TASDEMIR, 2006).

Além disso, novos fármacos efetivos contra todos os estágios, combinados ou não com Artesunato, vêm sendo testados na África e na Ásia. Os fármacos em uso clínico atuam em diferentes etapas de replicação do parasita, porém a maioria age inibindo a produção da hemozoína ou inibindo a síntese do ácido fólico (CUNICO et al., 2008).

O conhecimento da grande complexidade do ciclo de vida do parasita, explica as enormes dificuldades que têm surgido, para o estabelecimento de uma terapia antimalárica eficaz e segura (MEDEIROS et al., 2011).

1.4 Apicoplasto, uma abundante fonte para alvos moleculares terapêutico

O Filo Apicomplexa é composto por organismos unicelulares e intracelulares obrigatórios de grande importância médica e veterinária. Neste Filo encontram-se os patógenos humanos do gênero *Plasmodium*, o agente etiológico da malária, o *Toxoplasma gondii*, agente causal da toxoplasmose, bem como patógenos que causam doenças em criações de animais para o consumo humano, como *Babesia spp*, *Theileria spp* e *Eimeria spp* (FLEIGE; LIMENITAKIS; SOLDATI-FAVRE, 2010; WILSON, 2005).

A grande maioria dos representantes deste grupo apresenta um plastídeo não-fotossintético, delimitado por quatro membranas, contendo genoma próprio, o apicoplasto, que dá nome ao Filo. A origem provável do apicoplasto foi o processo de endossimbiose realizado através do indivíduo antecessor com uma célula procariótica semelhante à cianobactéria (WILSON, 2005).

A existência de quatro membranas no apicoplasto é indicativo de ter havido dois eventos endossimbióticos no decorrer do processo evolutivo dos apicomplexos. O primeiro evento endossimbiótico gerou um plastídeo caracterizado por duas membranas, semelhante ao das algas e vegetais. Este plastídeo, posteriormente, teria sofrido transferência lateral em várias linhagens eucarióticas, por um processo denominado endossimbiose secundária, no qual o endossimbionte que continha o plastídeo sofre agora fagocitose por outro eucarionte. Desta forma o plastídeo secundário que surge apresenta quatro membranas (MACRAE et al., 2012).

Embora o apicoplasto contenha um genoma circular pequeno, a maioria do proteoma desta organela é codificada no genoma nuclear do protozoário, e as proteínas são subsequentemente transportadas para o apicoplasto, por apresentarem na extremidade N-terminal uma sequência sinal, semelhante ao sinal clássico de secreção encontrado em peptídeos, que as direciona para o sistema de endomembranas do plastídeo (FLEIGE; LIMENITAKIS; SOLDATI-FAVRE, 2010).

O apicoplasto é reconhecido como essencial para a viabilidade dos parasitas de longo prazo, fato coerente com a sua conservação durante a evolução dos apicomplexos. Suas funções de manutenção, tais como, replicação de DNA, transcrição, processamento e tradução de RNA, são alvos estabelecidos para a intervenção médica, seja diagnóstica, ou terapêutica (GORNICKI, 2003; LINDNER et al., 2014).

Além disto, a finalização do sequenciamento do genoma do *P. falciparum* (GARDNER et al., 2013), juntamente com a disponibilidade dos bancos genômicos de *Plasmodium* (PlasmoDB, PATS e PlasmoAP), revelaram a existência de genes com produtos destinados ao plastídeo que constituem vias metabólicas típicas de plantas, tais como: a via de biossíntese de ácidos graxos Tipo II (FAS II), a via metil-eritrol fosfato (MEP) para biossíntese de isoprenóides, além da via de biossíntese de heme (LINDNER et al., 2014; WILSON, 2005).

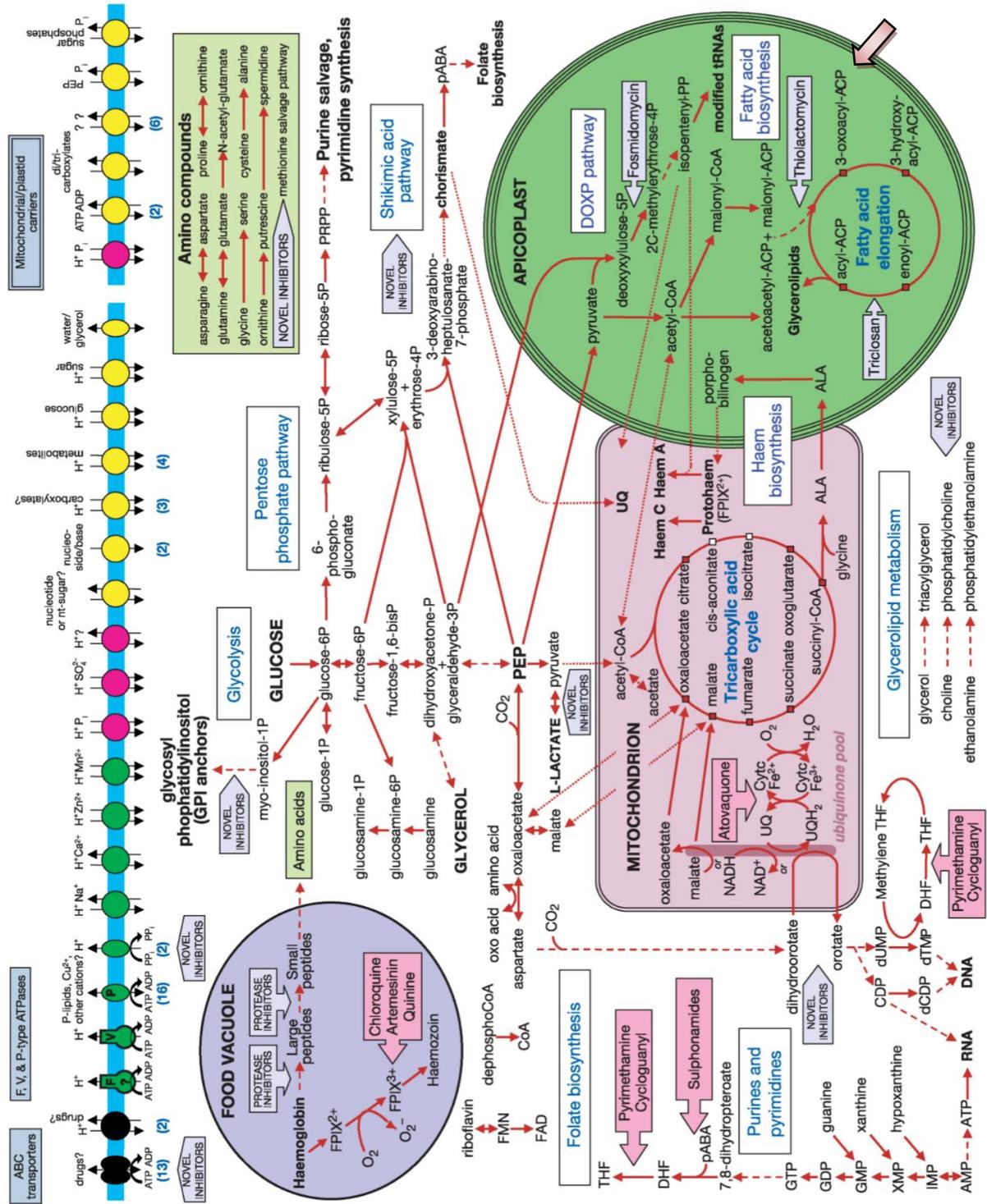
1.5 Via metabólica de biossíntese dos ácidos graxos em *Plasmodium*

Com a demonstração da incorporação de acetato em ácidos graxos de *P. falciparum* (SUROLIA et al., 2004) e a descoberta e caracterização de inúmeras enzimas participantes da síntese de ácidos graxos em *P. falciparum*, (MACRAE et al., 2012), foi esclarecido a via metabólica que até pouco tempo acreditava-se que, as espécies de *Plasmodium*, teriam a perdido (Figura 4) (GARDNER et al., 2013). A biossíntese de ácidos graxos é fundamental para o desenvolvimento do plasmódio. Além dos ácidos graxos constituírem os principais componentes das membranas celulares, é uma importante fonte de energia, desempenham papel fundamental na transdução de sinal, na acilação de proteínas, bem como são necessários para o crescimento, diferenciação e homeostase do *P. falciparum* (TASDEMIR, 2006).

Também é conhecido que a biossíntese de lipídios aumenta muito durante as fases eritrocitárias, nas quais o parasita cresce e se divide extremamente rápido. Quando o parasita invade seu hospedeiro, ele tenta se proteger, induzindo a formação de um vacúolo chamado vacúolo parasitóforo, que desempenha uma função protetora ao sistema imunológico do hospedeiro (LINDNER et al., 2014). Neste processo, o parasita necessita produzir seus próprios ácidos graxos de novo, de modo a formar e expandir a sua membrana celular. O mecanismo biossintético dos ácidos graxos, denominado sistema FAS (*Fatty Acid Synthase*), envolve ciclos repetitivos de condensação, ceto-redução, desidratação e enoil-redução (FLEIGE; LIMENITAKIS; SOLDATI-FAVRE, 2010).

Os fungos, mamíferos e algumas micobactérias realizam a síntese de ácidos graxos através da ação de proteínas multifuncionais, sendo cada reação catalisada por uma região distinta (domínio) desta proteína única, multifuncional. Essas enzimas são classificadas como ácido graxo sintases do Tipo I, e também são descritas como ácido graxo sintases do tipo “associadas”, pois etapas sucessivas na reação de síntese de ácidos graxos ocorrem em domínios específicos que estão juntos em uma mesma macromolécula (SUROLIA et al., 2004).

Figura 4: Metabolismo e transporte em *Plasmodium falciparum*.



A Glicose e o Glicerol fornecem as principais fontes de carbono para os parasitas da malária. Os passos metabólicos são indicados por setas, com linhas quebradas, indicando várias etapas intermediárias (não apresentados detalhadamente); As setas tracejadas indicam caminhos incompletos, desconhecidos ou questionáveis. Pequenos quadrados brancos indicam o ácido tricarbóxico (TCA) metabólicas do ciclo que podem ser derivados a partir do exterior da mitocôndria. Setas largas foscas

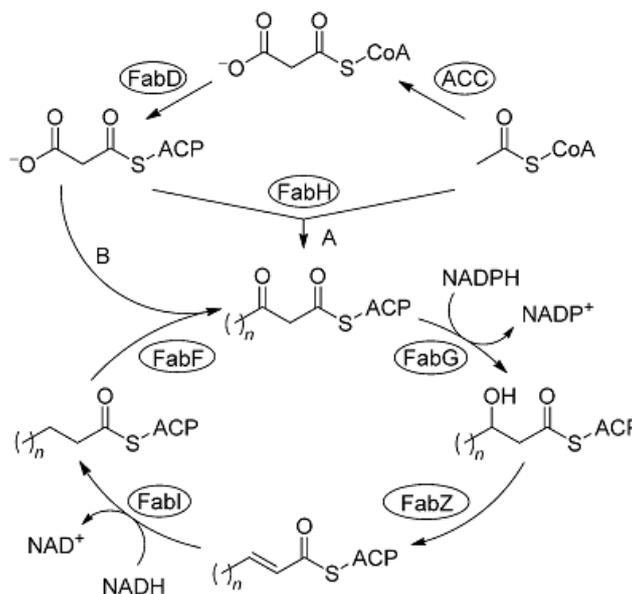
indicam os passos possíveis a antimaláricos; setas largas cinzentas destacam alvos potenciais da droga. Os transportadores são agrupados por especificidade de substrato: cátions inorgânicos (verde), ânions inorgânicos (magenta), nutrientes orgânicos (amarelo), o efluxo de drogas e outros (preto). As setas indicam sentido de transporte de substratos (e íons de acoplamento, se for o caso). Os números entre parênteses indicam a presença de múltiplos genes transportadores com previsões de substrato semelhantes. Transportadores de membrana de localização subcelular desconhecido ou putativo são mostrados em uma membrana genérica (barra azul). As abreviaturas: ACP, proteína transportadora de acilo; ALA, o ácido aminolevulínico; CoA coenzima A; DHF, dihydrofolate; DOXP, fosfato deoxyxylulose; FPIX 2 + e 3 + FPIX, ferro e ferriprotoporfirina IX, respectivamente; pABA, ácido para-aminobenzóico. A seta larga em rosa aponta o ciclo onde o alvo de estudo se encontra.

Fonte: GARDNER et al., 2013.

De outra forma, as plantas e muitas bactérias, utilizam as enzimas da síntese dos ácidos graxos Tipo II ou “dissociadas” (Figura 5). Neste caso, cada etapa do sistema de biossíntese de ácidos graxos do Tipo II (FAS II) é catalisada por uma enzima específica codificada por um determinado gene. Estas enzimas foram melhor caracterizadas em *E. coli* (SUROLIA et al., 2004). Uma vez que o sistema FAS II é ausente em humanos, representa uma grande oportunidade para aplicações terapêuticas.

A primeira enzima envolvida no sistema FAS II é a *acetil-CoA carboxilase* (ACC), uma proteína que carboxila *acetil-CoA* para produzir *malonil-CoA*, que é então transferido para a proteína transportadora de *acil* (ACP) pela enzima *transacilase* ACP (FabD) (Figura 5). A biossíntese de ácidos graxos, propriamente dita, é iniciada pela condensação de *malonil-ACP* e *acetil-CoA*, catalisada pela enzima β -*cetoacil* ACP sintase III (FabH). Logo após, inicia-se a série cíclica de alongamentos, que se repetem até que determinado ácido graxo saturado seja produzido (CARBALLEIRA, 2008).

A primeira etapa do ciclo é a redução NADPH-dependente de β -*cetoacil*-ACP a β -*hidroxilacil*-ACP, catalisada pela enzima β -*cetoacil*-ACP *reductase* (FabG ou OAR) (Figura 5). Em seguida, uma molécula de água é removida pela β -*hidroxiacil*-ACP desidratase/isomerase (FabA) e/ou pela β -*hidroxiacil*-ACP desidratase (FabZ) para formar *trans-2-enoil*-ACP. O passo final no processo de alongamento é a redução, NADH-dependente, da ligação dupla, formando *acil*-ACP. É um passo fundamental do processo, catalisado pela enzima *2-trans-enoil*-ACP *reductase* (FabI ou ENR). Ciclos subsequentes são iniciados pela condensação de *malonil*-ACP com *acil*-ACP, formando β -*cetoacil*-ACP com dois carbonos adicionais. Esta reação é catalisada pela β -*cetoacil*-ACP sintase I (FabB), ou pela β -*cetoacil*-ACP sintase II (FabF) (CARBALLEIRA, 2008).

Figura 5: Biossíntese de ácidos graxos do Tipo II (FAS II)

Legenda: As enzimas integrantes do processo. ACC: *acetil-CoA carboxilase*, ACP: proteína transportadora de acila, FabD: ACP transacilase, FabH: β -cetoacil-ACP sintase III, FabG: β -cetoacil-ACP redutase, FabA: β -hidroxidecanoil-ACP desidratase /isomerase, FabZ: β -hidroxi-ACP desidratase, FabI: enoil-ACP redutase, FabB: β -cetoacil-ACP sintase I, FabF: β -cetoacil-ACP sintase II.

Fonte: SCHRADER, et al., 2013.

Os ciclos continuam até que um determinado comprimento de cadeia de ácido graxo seja alcançado (KARMODIYA et al., 2008). Em *Plasmodium*, ciclos sucessivos de alongamento levam à formação dos ácidos decanoico (C-10), láurico (C-12) e Acetil-CoA, Malonil-CoA, Malonil-ACP, Acetil-CoA, CoA + CO₂, NADPH, NADP+ β -Cetoacil-ACP, Acil-ACP, β -Hidroxiacil-ACP e 2-trans-Enoilacil-ACP, mirístico (C-14), como os principais produtos do processo de síntese de ácidos graxos (SUROLIA et al., 2004), enquanto que o ácido palmítico (C-16) é o ácido graxo mais predominantemente sintetizado em seres humanos (TASDEMIR, 2006).

A biossíntese de ácidos graxos tem despertado atenção especial como alvo atraente para o desenvolvimento de novos fármacos antibacterianos, antifúngicos e antimaláricos. São exemplos de inibidores conhecidos que têm sido apresentados como agentes antimicrobianos em razão de inibir a biossíntese de ácidos graxos: Isoniazida (inibe a FabI), Tiolactomicina e seus derivados (inibe FabB e FabH), Ceruleína (inibe FabI) e Triclosan (inibe a FabI), entre outros inibidores reportados na literatura (CARBALLEIRA, 2008).

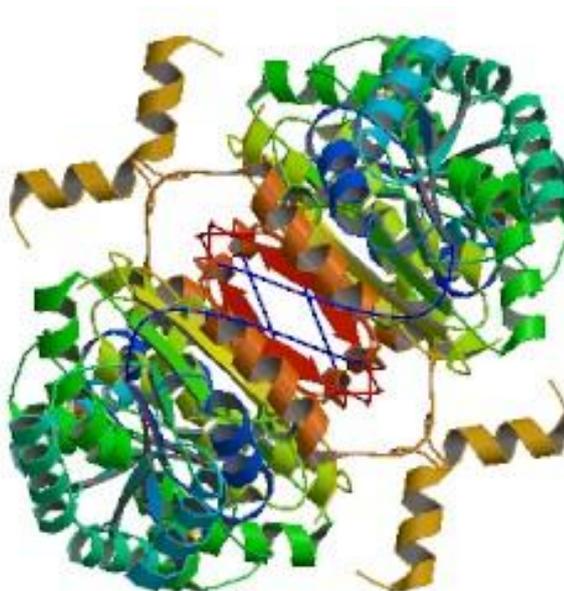
No campo da descoberta e do desenvolvimento de novos medicamentos para a terapêutica da Malária, a busca de inibidores da via dos ácidos graxos II como, por exemplo, a

enzima *2-trans-enoil-ACP-reductase* destaca-se como alvo promissor, principalmente pelo fato de não estar presente no homem e ser de vital importância para o Plasódio (MEDEIROS et al., 2011). A via das Purinas também vem sendo estudada e podem-se destacar os alvos de estudos em andamento, como as enzimas *Hipoxantina Guanina Fosforribosiltransferase* (HGPRT) e *Fosforilase de Nucleosídeos Purínicos* (PNP) de *Plasmodium falciparum*. Estas enzimas estão envolvidas na vida de salvamento das purinas e também vem sendo sugeridas como um promissor alvo para o desenho e desenvolvimento de drogas antimaláricas e antibacteriais (ZANCHI et al., 2010).

1.6 Enzima β -cetoacil-ACP reductase

A enzima *beta-cetoacil-ACP reductase* (Figura 6) foi identificada em poucos organismos e uma caracterização detalhada e estruturas cristalinas recentemente se tornaram disponíveis a partir dos organismos de *Bacillus, napus* e *E. coli*. Estudos estruturais sobre a OAR em bactérias e plantas forneceram uma visão sobre o mecanismo químico de catálise, no entanto, não foi estabelecido um mecanismo cinético detalhado desta enzima. Algumas propriedades da OAR em *P. falciparum* foram relatadas (PILLAI et al., 2003; WICKRAMASINGHE et al., 2006).

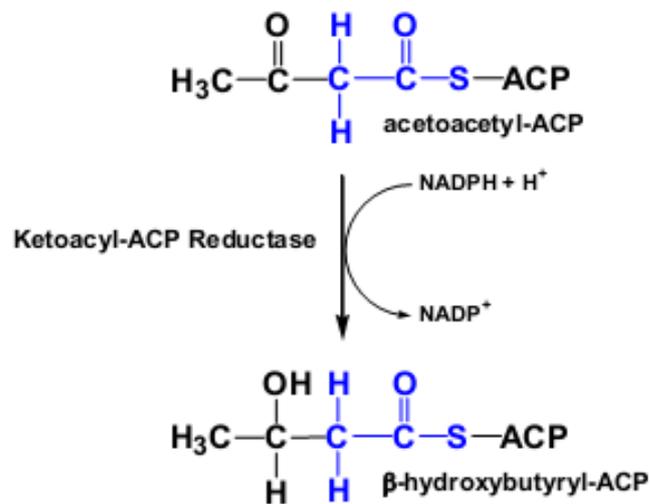
Figura 6: Representação estrutural da enzima *beta-cetoacil ACP reductase* / OAR



Legenda: Estrutura tridimensional da enzima *beta-cetoacil ACP reductase* / OAR, selecionada e que está depositada no banco de dados sob o código 2C07. **Fonte:** PDB protein, 2014 (DOI:10.2210/pdb2c07/pdb).

A enzima β -cetoacil ACP redutase/OAR, vem sendo descrita como a única enzima conhecida por catalisar a redução de grupo β eta-ceto (reduz a β -cetoacil-ACP por uma dependência NADPH, formando NADP^+ e β -hidroxiacil-ACP), representada na Figura 7 (PILLAI et al., 2003; SHAFREEN; PANDIAN, 2013; TASDEMIR, 2006). Esta enzima está localizada no cromossomo 9(nove) do gene do *P. falciparum* descrito no PDB (<http://plasmodb.org/plasmo/>).

Figura 7: Redução da enzima β -cetoacil ACP redutase



Legenda: Esquema do Ciclo de redução da enzima β -cetoacil ACP redutase/OAR utilizando o substrato Acetoacetyl COA para redução da NADPH em NADP^+ gerando como produto final β -hidroxybutyryl ACP. Fonte: (TASDEMIR, 2006)

Foi demonstrado anteriormente que os genes de várias enzimas-chave desta biossíntese de ácidos graxos são agrupados no cromossoma de *E. coli* conhecido como o Fab cluster. A inserção de um terminador de transcrição entre os genes FabD e FabG em *E. coli*, demonstrou que o bloqueio da transcrição impede o crescimento celular, demonstrando assim que é um gene essencial. Devido a poucos estudos sobre a enzima β -cetoacil ACP redutase no metabolismo do *Plasmodium*, existe uma necessidade de estudar esta enzima a partir do parasita da malária em maior detalhe, pois a mesma atua na síntese de ácidos graxos II, sendo presente no parasita e ausente no hospedeiro, o que facilita a descoberta de substâncias inibidoras com baixo nível de toxicidade a células de mamíferos (PILLAI et al., 2003; WICKRAMASINGHE et al., 2006).

Analisando as abordagens de estudos recentes, a enzima *β -cetoacil-ACP redutase* – FabG ou OAR é alvo validado e promissor para o desenvolvimento de agentes antimaláricos (KRISTAN et al., 2009; PILLAI et al., 2003; SHAFREEN; PANDIAN, 2013; WICKRAMASINGHE et al., 2006), pois catalisa a reação principal do processo de biossíntese dos ácidos graxos tipo II, é metabolismo de importância vital para o parasita no estágio de desenvolvimento hepático, bem como se encontra ausente no hospedeiro humano. Esta via está presente no apicoplasto, uma organela exclusiva de protozoários do filo *Apicomplexa* – que inclui o *Plasmodium* e o *Toxoplasma* e é responsável pela produção de proteínas que garante a construção de moléculas essenciais para a sua sobrevivência. Sem estas proteínas, o parasita não consegue se multiplicar.

2 OBJETIVOS:

2.1 Geral

O principal objetivo desse estudo foi à identificação de compostos capazes de se ligarem e/ou inibirem à enzima *Beta-cetoacil-ACP- redutase* - OAR de *Plasmodium falciparum*.

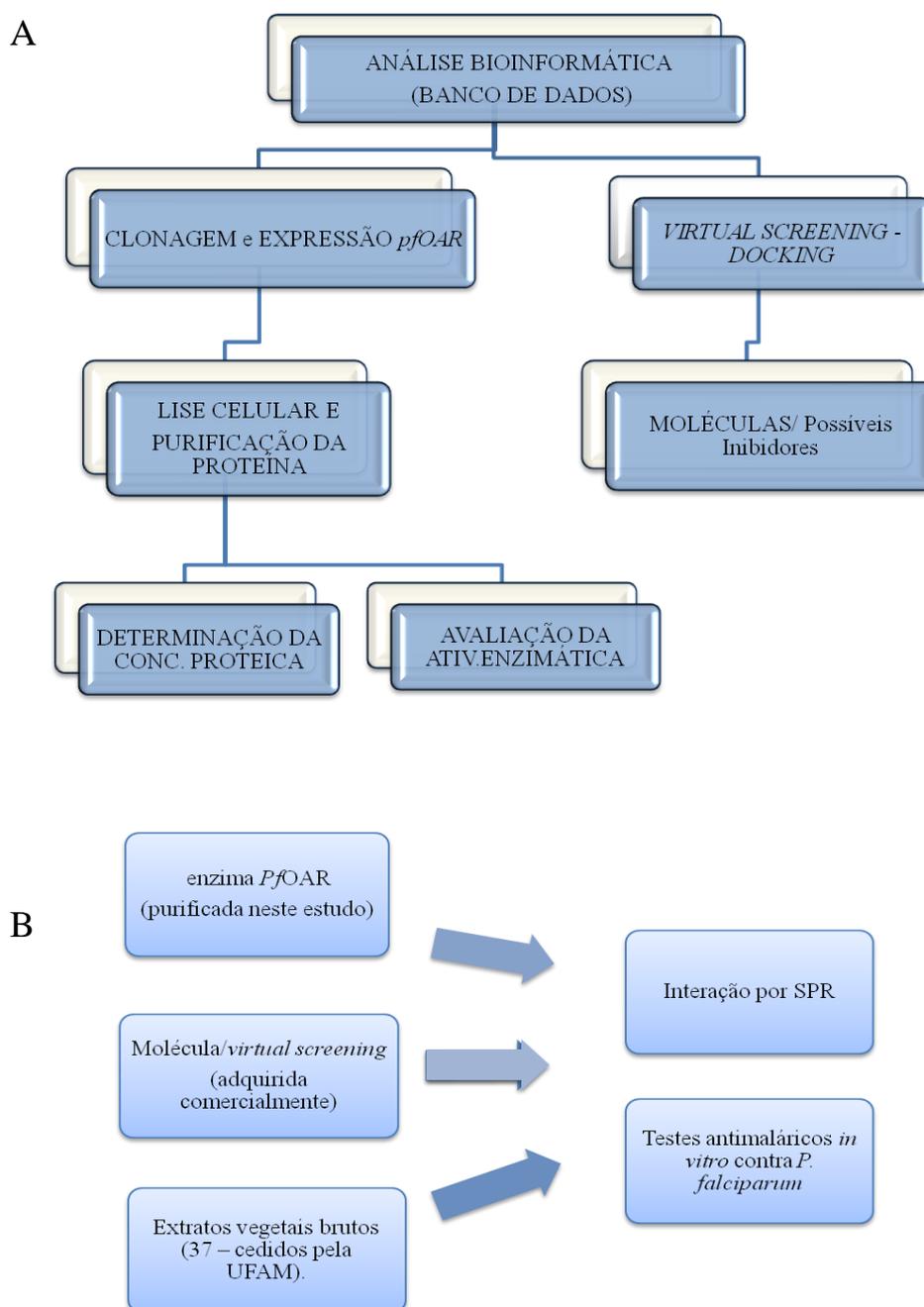
2.2 Específicos

- Produzir a enzima OAR recombinante ativa fundida a uma cauda de poli-histidina;
- Realizar *virtual screening* através de “docking” para identificação de moléculas ligantes à enzima *β -cetoacil ACP redutase/OAR*
- Imobilizar a enzima *β -cetoacil ACP redutase/OAR* sobre um *sensor chip* do sistema Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR), testar por essa metodologia a capacidade de substâncias de extratos alcoólicos de plantas amazônicas de se ligarem à OAR, bem como a substância identificada por *virtual screening*.
- Testar de atividade *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* e citotoxicidade em células HepG2 de extratos alcoólicos de plantas amazônicas e a substância identificada por *virtual screening*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Fluxograma da metodologia aplicada

Figura 8: Esquema representativo da metodologia para o desenvolvimento da Tese



Legenda: Na primeira etapa, demonstrado em A, se define quais as moléculas encontradas no *screening virtual* e a concentração e atividade enzimática da proteína OAR. Em B, a molécula comercializada, Proteína purificada e os extratos vegetais brutos foram submetidos a técnica de SPR e Testes antimaláricos.

3.2 Análise da enzima β -cetoacil ACP redutase/OAR por *virtual screening* através de *docking* molecular.

Os estudos de bioinformática foram realizados sob a orientação e colaboração do pesquisador Dr. Fernando Berton Zanchi da Fiocruz-RO. Para as análises de interação virtual para a busca de moléculas que interajam com a enzima OAR (*virtual screening*). A estrutura tridimensional utilizada está depositada no banco de dados do PDB <<http://www.pdb.org/>> sob o código 2C07, com intuito de determinar a geometria de um complexo receptor–ligante usando a estrutura do receptor livre, estabelecendo uma ordem hierárquica em função dos valores das constantes de afinidade de ligação, determinando assim a composição química de um ligante com as propriedades de ligação desejadas e desenho racional baseado em estruturas. Os programas utilizados para o *screening* foram AutoDocking 4.2 e o programa PyRx, utilizando para encontrar as moléculas, o banco de dados PubChem/NCBI (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary>).

3.3 Identificação do gene e da estrutura 3D da enzima β -cetoacil-ACP-redutase em bancos de dados.

O gene da proteína β -cetoacil-ACP-redutase - OAR da cepa 3D7 de *P. falciparum* está identificado no GenBank sob o código GI:124507005, enquanto no banco genômico específico para Plasmodio, o PlasmoDB <<http://plasmodb.org/plasmo/>>, está cadastrada sob o código PF3D7_0922900. A região estrutural do gene da PfOAR contém 906 pb (Figura 9A), está localizado no cromossomo 9 e codifica uma proteína com massa molecular de 34 kDa (Figura 9B). No banco de dados de proteínas PDB (<http://www.pdb.org/>), o código de acesso à estrutura tridimensional da enzima OAR definida por difração de raios-x utilizada neste trabalho é 2C07.

Figura 9: Em (A) sequência de nucleotídeos da enzima *PfOAR*. Em (B) sequência de aminoácidos da enzima *PfOAR*.

A) NUCLEOTÍDEOS

```
CATATGTCTGGTTCTCATCACCATCACCATCACAGCGGTACCGACGATGACGATAAAATGAACTATTATTATTG
TGGGGAAAATAAAGTTGCTTTAGTAACAGGTGCAGGAAGAGGAATAGGTAGAGAGATCGCTAAAAATGTTGGCAA
AATCAGTATCTCATGTTATATGTATAAGTAGAACGAAAAATCATGTGATAGTGTGTTGATGAAATAAAATCA
TTTGGTTATGAATCATCAGGTTATGCAGGTGATGTATCTAAAAAAGAAGAAATAAGTGAAGTGATTAATAAAAT
TTTGACAGAACATAAAAAATGTAGATATATTAGTTAATAATGCTGGAATAACTAGAGATAATCTTTTTCTAAGGA
TGAAAAATGATGAATGGGAAGATGTGTTAAGGACAAATTTAAATTCCTCTATTTTATATAACACACACCTATATCA
AAAAGAATGATTAATAATAGATATGGTTCGAATAATTAATATATCAAGTATAGTAGGGTTAACAGGAAATGTAGG
ACAAGCAAATTATTCTTCATCGAAAGCTGGTGTATTGGTTTTACAAAAAGCTTAGCAAAAAGAAATTAGCTTCAA
GAAATATAACTGTAAATGCCATAGCCCCTGGATTTATATCTAGTGATATGACAGATAAAATTAGCGAACAAATA
AAGAAGAACATAATTTCAAACATTCCTGCTGGACGAATGGGAACACCAGAAGAAGTAGCTAATTTAGCTTGTTT
TTTATCATCAGATAAGTCTGGTTATATTAATGGTTCGAGTTTTCTGTAATAGACGGTGGACTATCACCTTAACCGC
```

B) AMINOÁCIDOS

```
HMSGSHHHHHHSGTDDDDKMNYYYCGENKVALVTGAGRGIGREIAKMLAKSVSHVICISRTQKSCDSVVDEIKSF
GYESSGYAGDVSKKEEISEVINKILTEHKNVDILVNNAGITRDNLFLRMKNDEWEDVLRNLNLSLFYITQPI SKR
MINNRYGRI INISSIVGLTGNVGQANYSSSKAGVIGFTKSLAKELASRNITVNAIAPGFISSDMDTKISEQIKKN
IISNI PAGRMGTPEEVANLACFLSSDKSGYINGRVFVIDGGLSP
```

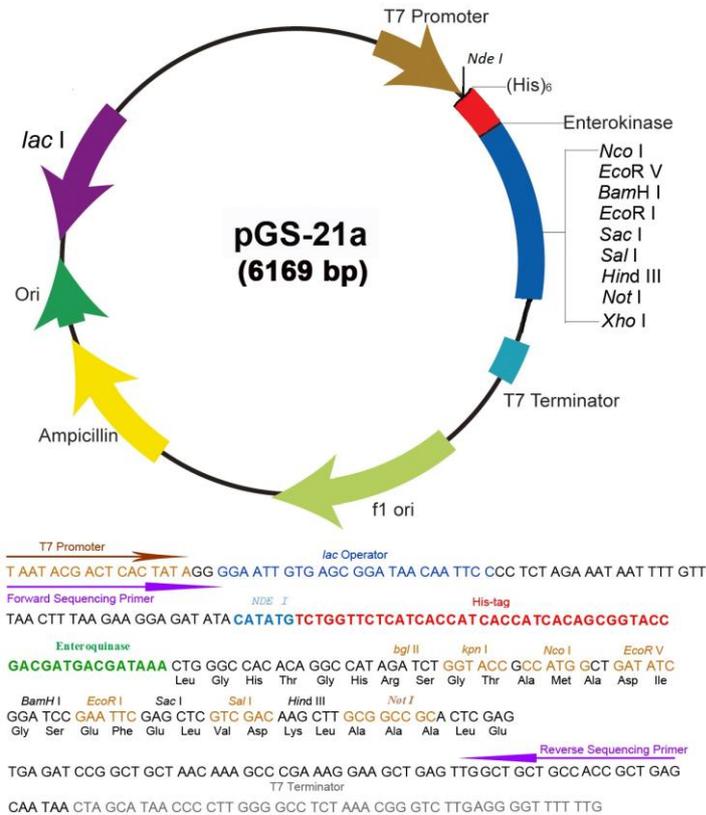
Legenda: Sequencia de nucleotídeos (em A) e aminoácidos (em B), no formato fasta. Em azul se destaca as enzimas de restrição adicionadas a sequencia. Em vermelho, a cauda de His-Tag e em verde o peptídeo sinal.

3.4 Síntese química e subclonagem da enzima β -cetoacil ACP redutase/OAR em vetor de expressão em *E. coli*.

A região estrutural do gene da enzima β -cetoacil ACP redutase/OAR de *P. falciparum* foi produzida por síntese química com códons preferenciais de *E. coli* e clonado no vetor pUC57 pela empresa GeneScript (USA) (Apêndice). A sequência do gene sintetizado possui sítios de restrição das enzimas *NdeI* e *NotI* nas bordas além da sequência responsável para a síntese de poli-histidina (6 His) e de um sítio de enteroquinase.

O vetor pGS-21a (Figura 10) possui 6.169 pb e foi projetado para subclonagem, expressão em alto nível (GenScript Corporation - Cat. No. SD0121). O gene da enzima β -cetoacil ACP redutase/OAR foi retirado do vetor pUC57, através de digestão com as enzimas *NdeI* e *NotI* e subclonado no vetor pGS21a pré-digerido com as mesmas enzimas, ficando sob regulação do promotor do fago T7. Para expressão o plasmídeo recombinante foi introduzido por eletroporação na hospedeira *E. coli* BL 21 DE3.

Figura 10: Mapa do vetor de expressão pGS-21a



Fonte: Genscript Corporation (cat. No. SD0121).

3.5 Expressão da β -cetoacil-ACP-redutase recombinante.

Após a subclonagem, o plasmídeo recombinante denominado pSGOAR, foi extraído da linhagem *DH5alfa* e introduzido por eletroporação nas linhagens de *E. coli* BL21(DE3). A eletroporação foi realizada a um pulso de 1.8kV com capacitância de 25 μ F e resistência de 200ohms (cubeta de 0,2mm) em aparelho Micro Pulser Electroporador/BioRad. Por conseguinte, as células transformantes foram selecionadas em meio LB sólido contendo o antibiótico ampicilina (100 μ g/mL).

Para expressão da enzima heteróloga um pré-inóculo foi produzido inoculando-se um clone transformante em 5mL de meio LB com ampicilina (100 μ g/mL) deixando-se crescer a 37°C, sob agitação de 150 RPM, durante a noite. A seguir 0,5 mL do pré-inóculo foi adicionado a 100 mL de meio de cultura LB, contendo a mesma concentração do antibiótico do pré-inóculo e as células foram crescidas a 37°C, sob agitação de 180 RPM até alcançarem uma OD₆₀₀ de 0,5 – 0,6, monitorada em espectrofotômetro.

Em seguida, a expressão do gene heterólogo foi induzida adicionando-se às culturas 1mM de *Isopropil β-D-tiogalactopiranosideo* (IPTG) que foram mantidas nas mesmas condições de cultivo. Como controle, foi utilizada culturas sem a indução de IPTG. Alíquotas de 1,0 mL de cada cultura foram coletadas, nos seguintes períodos de tempo: 0 e 4 horas. Em seguida as alíquotas das culturas foram centrifugadas a 4°C, 12.000RPM, por 3 minutos, o sobrenadante foi descartado e os sedimentos estocados a -20°C para posterior análise.

3.6 Análise da expressão por eletroforese SDS-PAGE.

Para análise da expressão da enzima por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) as frações celulares solúveis e insolúveis foram separadas. Para tal, os sedimentos contendo as bactérias recombinantes foram ressuspensas em 500 – 700μL de tampão fosfato (NaH₂PO₄–50Mm, NaCl–300mM, Glicerol 10%) pH 7.5 e depois submetidas ao processo de lise celular por ultrassom (3 pulsos de 30 segundos com 30 segundos de intervalo e 21% de amplitude) no equipamento MISONIX s4000. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C, a 14.000RPM por 30 minutos. As frações solúveis (sobrenadantes) e insolúveis (sedimentos) das amostras foram separadas. Uma alíquota da amostra da fração solúvel foi adicionada ao tampão de eletroforese (com DTT) (1:1) e desnaturada a 80°C por 10 minutos, período após o qual as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% segundo Laemmli (1970), para verificação da expressão da proteína alvo. No gel foram aplicados 10uL de cada amostra. A eletroforese foi realizada durante 1 hora a uma voltagem de 100V. Após a eletroforese, o gel contendo as proteínas desnaturadas foi corado com a solução de Azul Brilhante de Comassie Blue Fest Gel R (LAEMMLI, 1970).

3.5 Purificação da proteína pGS21a-*pfOAR*

A proteína de interesse contida na fração solúvel *PfOAR* diluída em tampão Fosfato (NaH₂PO₄ –50Mm, NaCl–300mM, Glicerol 10%) pH 7.5, foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de 1mL de resina de níquel-NTA (Quiagen, Valencia, C.A, Pierce) (PETTY, 1996).

A coluna foi previamente lavada com água mili-Q, para retirar o álcool. Após este procedimento foi aplicado 1mL de tampão Fosfato, para equilibrar a resina. A amostra contendo a proteína recombinante foi aplicada à coluna. Em seguida foi lavada com tampão Fosfato, e posteriormente foi aplicada um gradiente de Imidazol (10-500mM) à coluna de

níquel para a eluição das proteínas ligadas à resina, e em especial a proteína de interesse. As frações foram coletadas e as alíquotas quantificadas pelo método *DC Protein* (BioRad) e então analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) sob condições desnaturantes.

Os procedimentos de purificação foram realizados utilizando o sistema de purificação de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) ÄKTA (GE Healthcare) para o controle do fluxo, pressão da coluna cromatográfica, detecção em comprimentos de onda de 280 e 265nm, controle de gradiente, aplicação e coleta de amostras.

As amostras obtidas nesta etapa foram submetidas ao processo de diálise para retirar o Imidazol da solução. A diálise foi realizada em 1,0L de solução tampão Fosfato, pH 7,5, na qual a amostra ficou sob agitação, à temperatura de 5°C, por vinte e quatro horas, período após o qual se fez a retirada do Imidazol, num total de 3 substituições.

3.6 Determinação da concentração protéica

A determinação da concentração da proteína *PfOAR*, expressa no vetor pGS21a, foi realizada pelo método de *DC Protein Assay* (Manual BioRad), usando o kit para ensaio protéico *DC Protein Assay* (Bio-Rad) e Albumina de Soro Bovino (BSA) como padrão, conforme instrução do fabricante.

3.7 Avaliação da atividade enzimática da *PfOAR*

O ensaio de atividade enzimática da *PfOAR* purificada neste estudo foi realizado seguindo a metodologia adotada por Wickramasinghe e colaboradores (2006), utilizando como substrato Acetoacetil-CoA e cofator NADPH. O ensaio foi realizado a 25°C, com a seguinte mistura inicial de reação: tampão Fosfato (NaH_2PO_4) 100 mM, pH 6,8; NADPH 125 μM ; Acetoacetil-CoA 250 μM e 196,8 $\eta\text{M/mL}$ da enzima OAR purificada, num volume final de 1mL. As constantes cinéticas aparentes da reação foram determinadas variando-se as concentrações do substrato acetoacetil-COA de 0,005mM à 500mM. A velocidade inicial de oxidação de NADPH foi determinada espectrofotometricamente, medindo-se a redução da absorvância a 340nm (equipamento BioMate3 – Thermo Electron Corporation).

3.8 Estudos de interação molecular via Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)

Os ensaios de interação molecular foram realizados no Laboratório CEBio (Centro de Estudos de Biomoléculas aplicadas à Saúde) Fiocruz/UNIR-RO sob orientação e supervisão do Dr. Leandro Moreira Dill, utilizando equipamento BiacoreT200 (GE Healthcare). A análise de interação molecular via SPR ocorreu sobre a superfície de um *sensorchip* de ouro série S tipo CM5 carboximetilado, onde as moléculas da enzima *PfOAR* foram previamente imobilizadas, neste estudo esta molécula imobilizada sobre a superfície do *chip* denomina-se ligante. Após devidamente imobilizado o ligante, submeteu-se o *chip* preparado a pulsos de analitos para observação da interação em um sistema Biacore T200 – GE-LifeScience.

Neste estudo realizou-se previamente o estudo desta condição de pH ideal através da análise de pH *Scouting*. A análise de pH *Scouting* determinou a faixa de pH (4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0) em que a biomolécula melhor se aproxima da superfície do *sensorchip*. Antes de proceder com o início das análises no Biacore, foi preciso trocar o tampão de Imidazol onde a amostra se encontrava. A substituição foi necessária, para eliminar possíveis interferentes presentes na composição do meio que possam resultar em um falso positivo (falsa interação). O procedimento foi realizado utilizando um filtro *Amicon* com *cut off* de 3 kDa (centrifugo-filtração). Uma vez trocado o tampão do ligante por tampão fosfato 100mM pH 6,8, procedeu-se a análise submetendo a proteína a um escalonamento de pH utilizando vários tampões com diferentes pH's, as condições analíticas são descritas a seguir: Tampão de Acetato 10mM nos pH's 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0; tampão Fosfato 42mM no pH 6,5 e nas condições analíticas: Tampão de corrida = Tampão HBS-P 1X (0,1M HEPES; 1,5M NaCl; 0,5% surfactante P20; pH 7,4), Temperatura de análise = 25°C; Tempo de contato = 180s; Solução de regeneração = NaOH 50mM, Fluxo 5 μ L/min .

Para imobilização foi levada em consideração a massa do analito e do ligante para se calcular os níveis de ligante a ser imobilizado na superfície do *sensor chip*. Procedeu-se com a imobilização calculando o nível de ligante a ser imobilizado de acordo com a equação 2. Neste estudo o ligante tem massa molecular aproximada de 28.000Da, o analito, molécula sintetizada Skyrin de massa de 538,46Da, considerando $R_{m\acute{a}x}$ de 200RU, e estequiometria de ligação 1:1. A partir dos valores acima, foi possível calcular a quantidade de ligante a ser imobilizado em unidades de ressonância (10.400RU).

Equação 2:

$$R_{max} = \frac{MM \text{ analíto}}{MM \text{ ligante}} \times RL \times S$$

$R_{m\acute{a}x}$ = Resposta máxima do *sensor chip* em RU

MM analíto = Massa molecular do analíto em Da

MM ligante = Massa molecular do ligante em Da

RL = Nível de ligante imobilizado sobre o *sensor chip* em RU

S = Estequiometria da ligação

Pulsos sucessivos de enzima OAR na concentração de 50µg/mL diluída em tampão de acetato de sódio 10mM pH 4,5 foram injetados até que se atingisse o nível de imobilização de ligante (RL) previamente calculado.

Após atingir os níveis de imobilização calculados, o *sensor chip* teve os sítios ativos remanescentes bloqueados com um pulso de 400 segundos, em fluxo contínuo de 5µL/min de etanolamina 1M.

3.9 Extratos vegetais da biodiversidade amazônica.

Os ensaios de ligação com extratos foram realizados com as mesmas condições analíticas descritas no item 3.8, utilizando como tampão de corrida apenas PBS. Ao todo foram testados 37 extratos vegetais de diversas espécies coletadas na floresta do Campus Universitário da UFAM. Os extratos foram preparados por percolação com etanol e posterior evaporação do solvente utilizando evaporador rotativo a 65°C sob pressão reduzida. Para os ensaios de ligação utilizou-se apenas a fração solúvel em tampão PBS 1X (10mM fosfato de sódio; 2,7mM KCl; 137mM de NaCl , pH 7,4) (GE Healthcare Cat.#100672). O extrato foi inicialmente solubilizado em etanol 100%, posteriormente fez-se uma diluição 1:10 deste material em tampão PBS. A suspensão foi centrifugada a 13.000xg por cerca de 15 minutos, o sobrenadante foi separado do *pellet*, formado pelo material insolúvel precipitado. Alguns poucos extratos que persistiam com partículas em suspensão foram filtrados utilizando filtro de seringa Millex 22µm (Millipore Cat.#SLGVX13NL). O sobrenadante foi prontamente utilizado, sendo que todos os extratos tiveram sua concentração ajustada para 200µg/mL, diluídos novamente em tampão PBS.

3.10 Solubilização dos extratos vegetais brutos e composto sintético para testes de atividade biológica

Para a realização dos testes antimaláricos *in vitro*, os 37 extratos vegetais e o composto sintético foram solubilizados em concentrações de 1mM e diluídos em séries de 1:2. Para o preparo da solução estoque foi utilizado preferencialmente o solvente dimetilsulfóxido (DMSO 0,5%) (Sigma-Aldrich). Para esses testes, as concentrações finais de DMSO não ultrapassaram 0,005% para os testes *in vitro* (GOMES et al., 2014). Todas as soluções foram preparadas no dia da realização dos experimentos. Esses testes foram realizados no Laboratório de Quimioterapia da Malária/Fiocruz-RO, sob a orientação da Dra. Patrícia S. de Medeiros.

3.11 Testes *in vitro* contra *P. falciparum*

3.11.1 Cultivo contínuo da fase eritrocítica do parasito

Para os ensaios de atividade antimalárica foram utilizadas formas sanguíneas de um clone de *P. falciparum* CQ-resistente (W2). Os parasitos foram cultivados em hemácias humanas sob condições estabelecidas por Trager e Jensen (1976), com pequenas modificações (ANDRADE-NETO et al., 2003). Os parasitos foram cultivados em garrafas de cultura com hematócrito a 2%, diluídos em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 25mM de HEPES (Sigma-Aldrich), 21mM de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich), 11mM de glicose (Sigma-Aldrich), 40µg/mL de gentamicina e 10% (v/v) de albumax. As garrafas foram mantidas em dessecadores à 37°C ou em mistura gasogênica contendo 5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂. Diariamente, foram realizadas trocas do meio de cultura e a parasitemia monitorada em esfregaços sanguíneos, fixados com metanol, corados com Giemsa e visualizados em microscópio óptico com objetiva de imersão (1.000x).

3.11.2 Sincronização dos parasitos para utilização nos testes *in vitro*

Os cultivos com predomínio de trofozoítos jovens utilizados nos ensaios de quimioterapia foram obtidos através de sincronização com sorbitol conforme descrito na

literatura (LAMBROS & VANDERBERG, 1979). O hematócrito e a parasitemia, pré-determinados para cada teste, foram ajustados com a adição de hemácias e meio RPMI completo em quantidades adequadas.

3.11.3 Preparo das placas-testes para os ensaios de quimioterapia

As culturas de parasitos sincronizadas com predomínio de anéis de *P. falciparum* foram distribuídas em microplacas de 96 poços adicionando-se 180µL/poço de meio de cultura RPMI contendo: 0,05% de parasitemia e 1,5% de hematócrito para o teste de ELISA anti-HRPPII. Anteriormente a adição da suspensão dos parasitos, 20µL dos extratos vegetais e do composto testados foram adicionados à placa teste, em triplicata, e em diferentes concentrações seriadas (100-1,56µg/mL). Os poços controles (doze por teste) continham hemácias infectadas sem adição dos compostos-testes (controle negativo). O antimalárico padrão, CQ (controle positivo) foi testado em paralelo em todos os experimentos realizados, em diluições seriadas de 500 à 7,8ng/mL. Os compostos testes foram titulados, utilizando concentrações seriadas até atingir a concentração inibitória para 50% do crescimento dos parasitos (IC₅₀).

3.11.4 Teste imunoenzimático anti-HRPPII

No ensaio imunoenzimático anti-HRPPII (NOEDL et al., 2002) duas placas de 96 poços foram preparadas para cada experimento, uma placa-teste, contendo os parasitos e os compostos a serem testados (item 3.9), e outra pré-sensibilizada com o anticorpo monoclonal anti-HRPPII. As placas-testes foram incubadas por 24h à 37°C, e o conteúdo de seis poços (controle positivo de crescimento parasitário) foi retirado e congelado à -20°C para ser utilizado posteriormente como *background*. A placa foi novamente incubada por 48h nas condições ideais para o crescimento do parasito. Após 72h totais de incubação, as placas foram congeladas e descongeladas duas vezes à -70°C para que houvesse a lise das hemácias. Para a sensibilização das garrafas no teste anti-HRPPII, 100µL do anticorpo primário (MPFM-55A ICLLAB®, EUA) a 1,0µg/mL foram adicionados a cada poço da placa de ensaio (Maxysorp, Nunc, Denmark). Após incubação por 12h à 4°C, o conteúdo dos poços foi descartado e 200µL/poço de uma solução de bloqueio (PBS-BSA 2%) adicionada, sendo a placa mantida à temperatura ambiente por 2h. Após esse tempo, o conteúdo dos poços foi novamente descartado e a placa lavada três vezes com PBS-Tween 20 a 0,05% (PBS-T). A

cada poço da placa foram adicionados 100µL das amostras da cultura de *P. falciparum* hemolisadas. Em seis poços da placa foram adicionados 100µL dos controles congelados nas primeiras 24h (*background*). A placa foi então incubada por 1h à temperatura ambiente, em câmara úmida, em seguida foi lavada três vezes com PBS-T, adicionando-se a cada poço 100µL do anticorpo secundário (MPFG55P ICLLAB®, EUA) diluído a 1:5.000. Após incubação à temperatura ambiente por 1h, em câmara úmida, a placa foi lavada três vezes com PBS-T e 100µL de uma solução de 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) acrescentados a cada poço. A placa foi incubada por 5 a 10min à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, e a reação interrompida adicionando-se 50µL/poço de uma solução de ácido sulfúrico 1M. A leitura das absorbâncias foi realizada à 450nm em um espectrofotômetro de microplacas (leitor de ELISA) (Spectra Max 340PC 384, Molecular Devices).

3.11.5 Determinação da concentração inibitória de 50% do crescimento do parasito (IC₅₀)

A inibição do crescimento de 50% dos parasitos foi determinada através de curvas dose-resposta, em função de regressão não linear. Foi utilizado o programa Origin (Origin Lab Corporation, Northampton, MA, EUA), para determinar o valor de IC₅₀.

3.12 Ensaios *in vitro* de citotoxicidade

3.12.1 Cultivo de linhagens celulares

A linhagem celular HepG2 (derivada de hepatoma humano) foi cultivada como recomendado por Madureira e colaboradores (2002). A mesma foi mantida em garrafas de cultura de 75cm² (Corning) em meio RPMI contendo 5% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 40mg/L de gentamicina (Schering-Plough). As células foram mantidas em estufa com 5% de CO₂, a 95% de umidade e a 37°C. O meio das garrafas foi substituído a cada dois dias. Após confluência de cerca de 80%, a cultura de células foi repicada, ou utilizada na realização de ensaios de citotoxicidade. Quando necessário, o congelamento das células foi realizado em ampolas de criopreservação com uma solução contendo 95% de SBF e 5% de DMSO.

3.12.2 Preparo das placas-testes

Para o preparo das placas testes, as células foram lavadas com meio sem SBF, tratadas com 1mL de tripsina-EDTA a 0,25% (Gibco/Invitrogen) e incubadas a 37°C por 3 minutos, para que as células se descolassem da garrafa. Ao conteúdo resultante da tripsinização foram adicionados 9mL de meio completo, seguido por centrifugação a 80xg por 5min na temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em meio completo contendo 5% SBF. Após a contagem, em câmara de Neubauer, a suspensão de células foi ajustada para 5×10^3 /mL e 180µL acrescentados a cada poço da microplaca de 96 testes. As células foram incubadas por 12 à 16h em estufa de CO₂ a 37°C para adesão aos poços da microplaca. Em seguida, 20µL de meio completo contendo diferentes concentrações dos compostos (1000 - 1µg/mL) foram adicionados aos poços da microplaca. As garrafas foram incubadas por 24h à 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade.

3.12.3 Ensaio de citotoxicidade utilizando o método MTT

Os ensaios de citotoxicidade (MDL₅₀) foram realizados em triplicata, conforme descrito por Madureira e colaboradores (2002). Após o preparo das placas com os compostos, como anteriormente descrito no item 3.8, 20µL de uma solução de Brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Sigma-Aldrich), na concentração de 5mg/mL foram adicionados aos poços da placa (DENIZOT & LANG, 1986). Após 3h de incubação com o MTT, o sobrenadante foi retirado e o corante presente nos fundos dos poços da placa diluído em uma solução de DMSO em um volume de 100µL/poço. As microgarrafas foram então lidas em um leitor de ELISA, utilizando-se filtro de 570nm.

3.12.4 Índice de Seletividade

O índice de seletividade (IS) das amostras testadas foi obtido calculando-se a razão entre o valor de MDL₅₀ e o valor de IC₅₀. Valores maiores que 10 foram considerados indicativos de ausência de toxicidade, enquanto substâncias com valores abaixo de 10 foram consideradas tóxicas (BÉZIVIN et al., 2003).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 *Virtual Screening* via *Docking* Molecular.

Por meio de análise por *virtual screening*, utilizando a estrutura da enzima *Beta-cetoacil-ACP-redutase* – OAR foi possível encontrar moléculas com energia de ligação que poderiam apresentar ação inibidora em potencial contra a mesma.

Pode-se observar na

Tabela 1, as moléculas identificadas no experimento de *virtual screening* onde estão ranqueadas de acordo com menor valor de energia de ligação, e quanto menor valor, maior é a afinidade da molécula com a estrutura da OAR.

Tabela 1: Moléculas encontradas na análise de *virtual screening*, possíveis alvos contra a *Beta-cetoacil-ACP-redutase*/OAR.

Molécula	Energia de Ligação	Fórmula Molecular	Massa Molecular [g/mol]	Nome Comercial	logP*
73071_uff_E=1099.60	-11,67	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀	538.45792	Skyrin	8.91±1.05
70798261_uff_E=1006.90	-10,39	C ₃₀ H ₂₀ O ₈	508.475		
15680808_uff_E=1051.23	-10,03	C ₃₀ H ₁₆ O ₈	504.44324		
68374064_uff_E=595.72	-9,58	C ₃₀ H ₃₆ O ₄	460.60444		
177004_uff_E=717.17	-9,50	C ₃₀ H ₁₈ O ₉	522.45852		
197349_uff_E=689.36	-9,49	C ₂₉ H ₃₀ O ₅	458.5455	Benastatin D	10.208
44349182_uff_E=693.26	-9,31	C ₃₀ H ₃₆ O ₄	460.60444	Harunganol B	10.26±0.50
198788_uff_E=814.98	-9,31	C ₂₇ H ₂₂ O ₆	422.45998	Bequinostatin D	7.196
9840804_uff_E=1131.74	-9,25	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	338.39698		
20090141_uff_E=545.73	-9,24	C ₂₁ H ₁₆ O ₄	332.34934		
5386260_uff_E=549.39	-9,19	C ₂₅ H ₃₀ O ₅	410.5027		
10361260_uff_E=360.31	-8,86	C ₂₁ H ₁₄ O ₆	362.33226		
44348974_uff_E=486.05	-8,77	C ₂₅ H ₂₈ O ₄	392.48742		
10316565_uff_E=414.99	-8,76	C ₂₁ H ₁₄ O ₆	362.33226		
60151993_uff_E=259.96	-8,75	C ₁₅ H ₇ I ₃ O ₅	647.92649		
11496609_uff_E=1071.91	-8,71	C ₃₀ H ₃₆ O ₅	476.60384	kenganthranol B	8.45±0.89
11793280_uff_E=480.13	-8,67	C ₂₃ H ₂₆ O ₄	366.45014	Chembi 457950	
9842952_uff_E=813.22	-8,66	C ₂₃ H ₂₆ O ₅	382.44954		
11101574_uff_E=421.04	-8,62	C ₂₅ H ₂₆ O ₅	406.47094		
438991_uff_E=879.09	-8,58	C ₂₃ H ₁₆ O ₈	420.36834	NSC695598	5.96±0.88
9906692_uff_E=406.17	-8,56	C ₂₁ H ₂₄ O ₅	356.41226		
11392668_uff_E=340.57	-8,55	C ₁₉ H ₁₆ O ₄	308.32794		
14186718_uff_E=568.95	-8,49	C ₂₅ H ₃₀ O ₅	410.5027	Vismione F	5.88±1.07
354177_uff_E=549.39	-8,47	: C ₂₅ H ₃₀ O ₅	410.5027	AC1L73TC	
509243_uff_E=658.01	-8,42	C ₂₃ H ₂₆ O ₅	382.44954	Cudraphenone D	7.24±0.71
54752972_uff_E=613.08	-8,40	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀	538.45792		
60151992_uff_E=295.17	-8,33	C ₁₅ H ₇ I ₃ O ₅	647.92649		
14186716_uff_E=463.49	-8,25	C ₂₂ H ₂₄ O ₆	384.42236	Vismione C	4.70±1.06
146804_uff_E=423.42	-8,21	C ₂₃ H ₁₆ O ₈	388.36954	benzo(a)naphthacene	5.162
EMO401	-6,05	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.2369	Emodin	5.03±0.82

Legenda: As moléculas estão dispostas em ordem crescente de afinidade com a enzima OAR e são mostrados também nesta tabela a massa molecular, fórmula molecular e nome comercial quando existente e o LogP*, indicativo de hidrofobicidade, quanto maior o valor de LogP* mais hidrofóbica é a molécula.

Todas as moléculas foram pesquisadas no PubChem <www. Pubchem.org.br>. Na análise através do *virtual screening* via *Docking* Molecular, foram encontrados 30 compostos com afinidade aos sítios de ligação da enzima *Beta-cetoacil-ACP-redutase* – OAR, podendo ser considerados moléculas promissoras à um potencial antimalárico.

Esta técnica de busca de moléculas virtualmente vem demonstrando ser eficiente, Deepa e colaboradores (2010), descreve a importância da orientação e reconhecimento da afinidade entre as ligações de hidrogênio que contribui positivamente para a afinidade de ligação. Assim, interações favoráveis entre uma droga e o seu específico alvo biológico são possíveis através de um ajuste perfeito geométrico do ligando para o local de ligação, tanto estar em conformações de baixa energia.

A escolha da substância, para o teste de interação por SPR e para atividade antimalárica, foi possível devido a sua disponibilidade para a compra. A molécula com maior afinidade é a Skyrin, selecionada para dar continuidade a esses estudos, foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich (USA).

A Skyrin é uma bis-antraquinona pertence à família da Antraquinona, e é um produto natural isolado de algumas espécies botânicas (fungos) e é a primeira molécula de baixo peso não peptídico que bloqueia especificamente as sequelas metabólicas de ação do glucagon em hepatócitos (LU et al., 2014; PARKER et al., 2000).

Ao contrário dos antagonistas peptídicos, mostrados para baixar a glicose no sangue em modelos animais de diabetes, Skyrin não inibiu a ligação do glucagon ao seu receptor, mas em vez disso parece ser capaz de desacoplar o receptor de ativação da adenilato ciclase (PARKER et al., 2000). No fígado, a ligação do glucagon ao seu receptor na membrana de plasma de hepatócitos serve, através da interação com uma proteína G estimuladora, para ativar a adenilato ciclase. O cAMP produzido como resultado ativa a proteína quinase A, com um consequente aumento da quebra de glicogênio e tanto a gluconeogênese, levando a um aumento da produção de glucose. Parquer e colaboradores demonstraram que em hepatócitos de rato e a partir de fontes humanas, Skyrin pode bloquear esta sequência de transdução de sinal, tal que a interação do glucagon ao seu receptor não resulta num aumento da produção de cAMP.

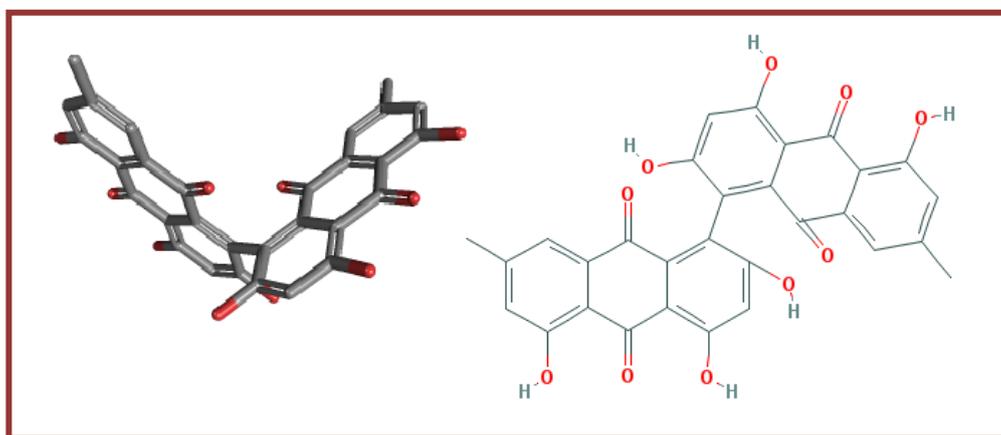
É possível que skyrin interage com um local secundário, possivelmente dentro da região da transmembrana do receptor e exercer um efeito alostérico que diminui a afinidade para o glucagon aos locais de ligação primários localizados nas alças internas e extracelulares N-terminal. Alternativamente, Skyrin pode atuar para interferir com a transmissão do sinal a

partir dos domínios de ligação extracelular para os domínios transmembrana e citoplasmático (PARKER et al., 2000).

Essa molécula é hidrofóbica e somente é solúvel em DMSO 100% num coeficiente de solubilização de 2,5mM. A presença do DMSO na diluição da molécula Skyrin, interferiu nos testes de SPR, mas não há interação deste com a molécula ligante *PfOAR*.

A Figura 11, mostra a estrutura química da molécula Skyrin nas formas tridimensional e bidimensional, que possui a fórmula molecular $C_{30}H_{18}O_{10}$, apresenta massa molecular monoisotópica de 538,09 Da, possui o nome sistemático segundo a IUPAC de 2,2',4,4',5,5'-Hexahydroxy-7,7'-dimethyl-1,1'-bianthracene-9,9',10,10'-tetrone.

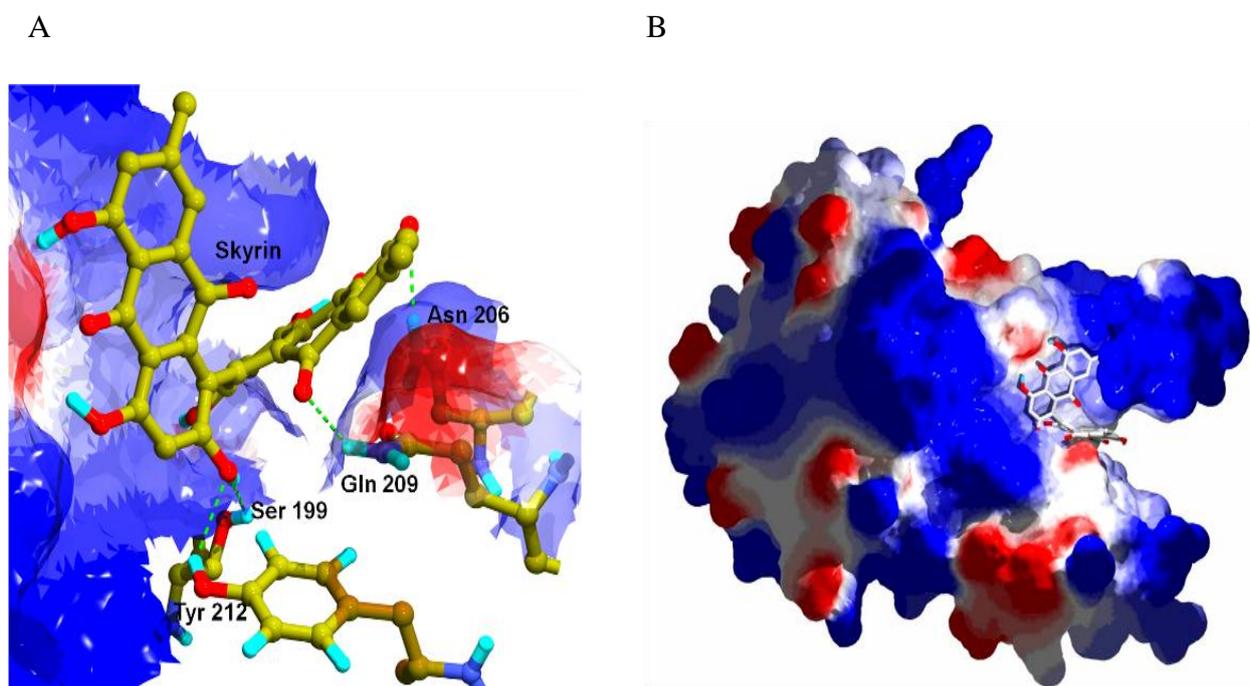
Figura 11: Estrutura tridimensional (3D) e bidimensional (2D) da molécula Skyrin.



Legenda: Bisanthroquinone, isolada de *Hypomyces lactifluorum* por Howard e Raistrick. Hatfield e Slagle em 1973. **Fonte:** <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary>

No resultado da análise de *Docking* molecular entre a *PfOAR* e a Skyrin, apresentados na Figura 12, pode-se observar (A) a interação entre ambas as moléculas a partir de duas interações de hidrogênio e o grupamento OH da Skyrin com os resíduos de serina 199, tirosina 212, asparagina 206 e glutamina 209. Estas ligações estabilizam a interação entre ambas as moléculas. Em B, a ancoragem da molécula Skyrin na superfície da enzima *Beta-cetoacil-ACP-redutase-OAR*, demonstrando a conformação estável que existe entre as duas.

Figura 12: Molécula Skyrin ancorada no sitio de ligação da enzima OAR.



Legenda: Em A, destaca-se as possíveis interações da Skyrin com a enzima OAR e em B a ancoragem da molécula na enzima *Beta-cetoacil-ACP-redutase* –OAR.

4.2 Clonagem e subclonagem da região estrutural da OAR no vetor de expressão

A sequência de nucleotídeos da enzima *β-cetoacil-ACP redutase* foi analisada e otimizada para expressão de sistema procaríoto e a região estrutural do gene foi sintetizada quimicamente e posteriormente clonada no vetor pUC57, pela empresa GeneScript (USA). O mapa do plasmídeo recombinante feito pela empresa foi denominado pUC57/OAR (Apêndice). Para a expressão da mensagem genética da enzima OAR na bactéria *E.coli* BL21 DE3 foi utilizado o vetor de expressão pGS21a.

A mensagem genética da OAR foi liberada do vetor pUC57/OAR por dupla digestão com *NdeI* e *Not I*, purificada por eletroforese em gel de agarose (1%) e ligada ao vetor de expressão pGS21a, sob regulação do promotor do fago T7 e purificado por eletroforese em gel de agarose. A mensagem genética de OAR possui aproximadamente 825pb e tamanho de aproximadamente 28kDa.

4.3 Expressão e Purificação da enzima *Beta-cetoacil-ACP-redutase* – OAR.

Algumas dificuldades foram encontradas quanto a utilização de *E.coli* como hospedeira para a síntese de proteínas recombinantes de *Plasmodium falciparum*. A *E. coli* pode não enovelar a proteína corretamente e geralmente é incapaz de sintetizar as ligações dissulfeto presentes em muitas proteínas recombinantes, pois não possui em seu citoplasma a enzima dissulfeto isomerase (KARMODIYA; SRIVASTAV; SUROLIA, 2005). Se a proteína não adota a sua estrutura terciária com enovelamento correto, ela geralmente fica insolúvel e forma corpúsculos de inclusão no interior da bactéria.

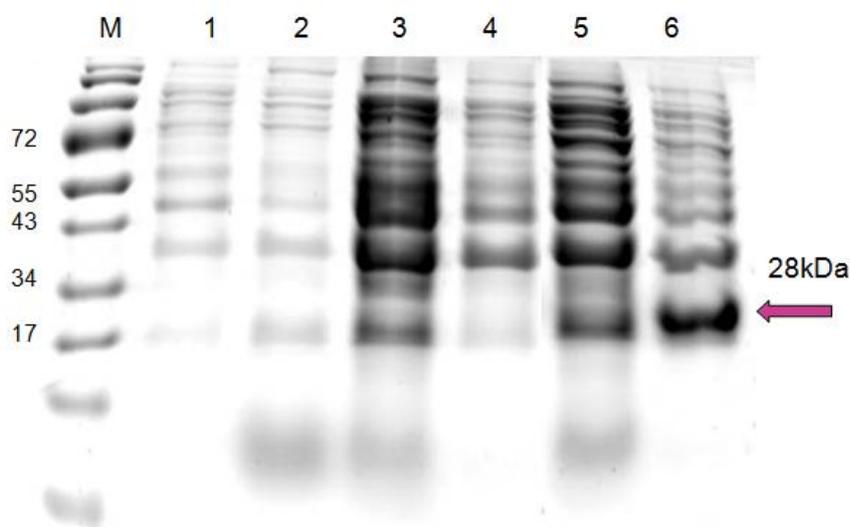
A recuperação da proteína a partir de corpúsculos de inclusão é possível, mas a sua conversão na forma corretamente enovelada é um processo laborioso (PILLAI et al., 2003). Nestas condições foi possível produzir 100mg de extrato bruto a cada 10mL de cultura celular e não houve dificuldades em expressar a proteína de interesse na forma solúvel. O fato de a enzima OAR ter sido expressa na forma solúvel, facilitou o processo de purificação, foi um indicativo de que a proteína estava com sua estrutura tridimensional correta.

Autores que também já trabalharam com esta proteína relataram que não apresentaram dificuldade em expressar esta enzima em sua forma solúvel (PILLAI et al., 2003; SHAFREEN; PANDIAN, 2013; WICKRAMASINGHE et al., 2006).

A expressão da OAR de *P. falciparum* em *E. coli* BL21(DE3) foi realizada em meio LB líquido durante quatro horas a 37°C com agitação a 180RPM com indução por IPTG.

A expressão eficiente da proteína recombinante pode ser observada na Figura 13, colunas 5 e 6 (seta vermelha), nas frações solúvel e insolúvel (respectivamente) induzida por 4h com IPTG. Essa banda deve ser correspondente à enzima *PfOAR* uma vez que não foi expressa nos controles (colunas 1, 2, 3, 4) e tem massa molecular de aproximadamente 28kDa. A análise ocorreu por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida a 12% com SDS (SDS-PAGE).

Figura 13: Perfil eletroforético das proteínas produzidas pelo clone recombinante *E.coli* BL21(DE3) + pGSOAR.

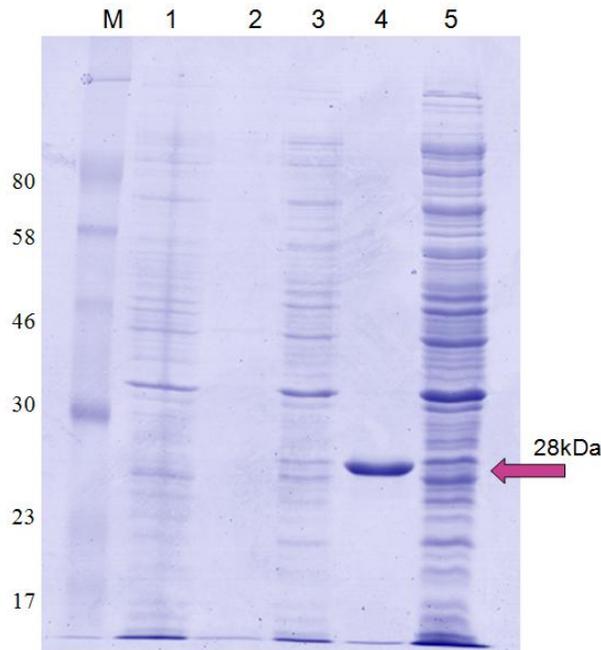


Legenda: M - marcador de peso molecular. 1- tempo de expressão zero, fração solúvel do lisado celular, 2- tempo de expressão zero, fração insolúvel do lisado celular, 3- tempo de expressão de quatro horas sem IPTG, fração solúvel, 4- tempo de expressão de quatro horas sem IPTG, fração insolúvel, 5- tempo de expressão de quatro horas com IPTG, fração solúvel, 6- tempo de expressão de quatro horas com IPTG, fração insolúvel.

A pGS-OAR foi purificada a partir da fração solúvel por cromatografia de afinidade com resina de níquel, pois esta proteína recombinante, foi construída com a inserção de uma cauda de histidina (His6x) que possui afinidade ao níquel complexado com o ácido nitriloacético (NTA/Ni) (Figura 14). A enzima recombinante foi purificada a partir de 2 mL de extrato bruto solúvel, resultante do cultivo de 100mL de meio líquido (LB) inoculado com o clone recombinante (*E.coli* BL21 DE3 contendo o plasmídeo pGS-OAR). Na Figura 14, coluna 4 foi possível observar a purificação da proteína de interesse. A proteína foi purificada utilizando o tampão de eluição com Imidazol na concentração de 500mM, e nas concentrações de 200 a 300mM de Imidazol, foi possível verificar a eluição da enzima da coluna parcialmente purificada. A utilização da resina de níquel para o processo de purificação, resultou na proteína com alto grau de pureza, sendo este método de fácil aplicabilidade e rápido, pois foi realizado de forma manual sem a necessidade da utilização de equipamentos sofisticados e de alto custo.

As concentrações de proteínas purificadas das frações de interesse foram estimadas pelo método *DC protein*, e, a partir de 20mg de extrato foi possível purificar 0,30mg/mL de enzima em volume final de 1mL.

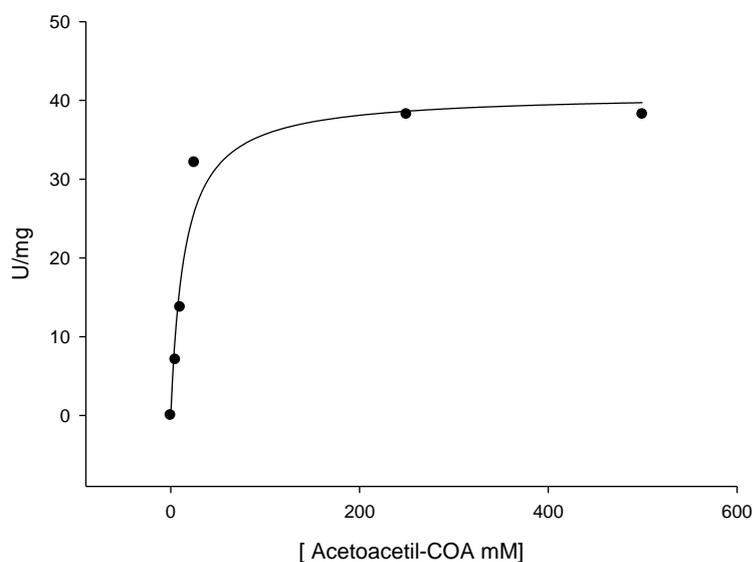
Figura 14: Análise do processo de purificação da enzima OAR por SDS-PAGE 12%.



Legenda: M- marcador de peso molecular. 1- eluato inicial da coluna, 2- eluato inicial da coluna, 3- conteúdo liberado com 125mM de Imidazol , 4- conteúdo liberado com 350mM de Imidazol, 5- extrato *E.coli* BL21 (DE3).

4.4 Análise da atividade da enzima *Pf*OAR

Nos ensaios de atividade enzimática, foram utilizados os substratos NADPH 0,5mM e Acetoacetyl COA 0,25mM. Para construção da curva de Michaelis-Menten foram medidas as velocidades iniciais da reação enzimática em função da concentração do substrato Acetoacetyl- COA. Os resultados apresentados na Figura 15, a partir do qual foi possível confirmar que a OAR tem um comportamento típico de uma enzima de Michaelis-Menten e determinar as constantes aparentes K_m e $V_{m\acute{a}x}$, utilizando o programa SigmaPlot 10.0, que estão mostradas na Tabela 2.

Figura 15: Atividade da enzima *PfOAR* em função da concentração de Acetoacetil-COA

Legenda: As concentrações de acetoacetil-CoA utilizadas variaram de 0,5mM a 0,005mM. A concentração de NADPH foi de 0,5 mM e a quantidade de enzima por sistema de reação foi 196,8 μ M.

Os valores encontrados das constantes aparentes do substrato Acetoacetil COA, estão representados na Tabela 2. Os valores das constantes aparentes do cofator NADPH, não foram possíveis calcular devido a não saturação do mesmo nos ensaios. Na concentração acima de 0,5mM, não foi possível captar a resposta de redução de absorvância no aparelho, sendo assim, no teste realizado, foram utilizadas as seguintes concentrações de NADPH: 0,5mM; 0,250mM; 0,150mM; 0,093mM e 0,065mM. Este ensaio permitiu atestar que a enzima *PfOAR*, estava ativa, reduzindo o cofator NADPH, na presença do substrato Acetoacetil-COA (dados não mostrados).

Tabela 2: Valores das constantes aparentes do substrato Acetoacetil-COA.

Substratos	K_m (μ M)	$V_{m\acute{a}x}$ (U/mg)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (M^{-1}/s^{-1})
Acetoacetil COA	$14,4 \pm 1$	$40,8 \pm 3$	$19,4 \pm 1$	$1,36 \pm 0,22 \cdot 10^6$

Legenda: Cálculo dos valores aparentes seguindo modelo das equações de Michaelis-Menten, utilizando o programa SigmaPlot 10.0.

Observa-se um valor de K_m aparente de $14,4 \pm 1\mu\text{M}$ e de $V_{m\acute{a}x}$ aparente igual a $40,8 \pm 3\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}$, e k_{cat} $1,4\text{s}^{-1}$. Nesse trabalho o termo aparente que acompanha a denominação das constantes, embora a enzima esteja pura, é utilizado pelo fato da enzima recombinante não ser idêntica à enzima nativa pois tem um His-Tag na região amino terminal, utilizado para a purificação e que não foi removido para as pesquisas relativas a essa tese.

Em estudos de atividade realizados por Wickramasinghe e colaboradores (2006) com a enzima *Beta-cetoacil-ACP-redutase* de *Plasmodium falciparum*, os valores das constantes encontrados foram similares aos deste estudo.

A relação entre a taxa de ligação e atividade catalítica é simplesmente realizada no conceito de que a taxa é proporcional para a formação do complexo enzima-substrato, que reflete a afinidade de ligação (MEDEIROS et al., 2011).

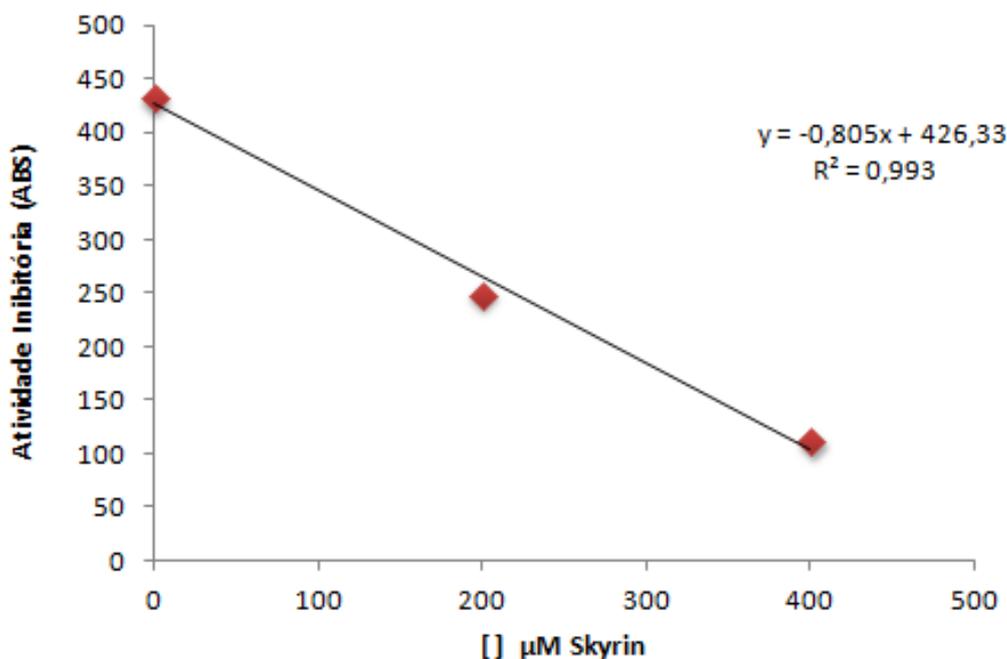
A enzima *Beta-cetoacil-ACP-redutase* vem sendo alvos de estudos em outros microrganismos por se apresentar um alvo atrativo para busca de drogas no tratamento de doenças infecciosas, Cukier e colaboradores (2013); Kristan e colaboradores (2009) e Silva e colaboradores (2008), demonstram isso em organismos como *Pseudomonas Aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Micobacterium tuberculosis*, respectivamente, e fornecendo uma visão importante mecanismo de inibição da caracterização estrutural e bioquímica.

4.5 Inibição da atividade enzimática pela Skyrin

A catálise da enzima pode ser impedida por compostos, que, quando presentes no meio, ligam-se diretamente a enzima, impedindo sua ação. Na reação contendo a proteína *PfOAR* e os substratos NADPH e Acetoacetyl-COA, foi observado a redução da absorvância de NADPH, como previsto, em ensaios realizados anteriormente por Pillai e colaboradores (2003) e Wickramasinghe e colaboradores (2006). No resultado deste teste foi observado uma inibição da redução da absorvância do NADPH. Ou seja, em condições saturantes dos substratos NADPH 0,25mM e Acetoacetyl-COA 0,25mM e utilizando-se as concentrações de 0,2mM e 0,4mM da molécula Skyrin, como pode ser observado na Figura 26, não houve conversão completa da utilização dos substratos. Como controle do teste foi realizado a mesma reação com a proteína *PfOAR* e substratos, utilizando somente o DMSO nas mesmas concentrações que a molécula Skyrin e a redução da absorvância ocorreu normalmente. Isso

demonstra que a inibição da reação é decorrente da presença da molécula Skyrin e não da presença de DMSO presente na diluição deste composto.

Figura 16: Mostra a atividade inibitória da molécula Skyrin na atividade da enzima *PfOAR*



Legenda: Inibição da redução de NADPH em função do aumento da concentração da molécula Skyrin.

Esta nova abordagem apresenta vantagens significativas quando comparada aos métodos tradicionais, uma vez que se estabelece antecipadamente a especificidade do bioativo e respectivo mecanismo de ação (BASSO et al., 2005).

Segundo Gomes e colaboradores (2014) atualmente é aceito que compostos com alta potência não resultam necessariamente em fármacos eficazes. Além da potência, fatores tais como a massa molecular e outras propriedades físico-químicas devem ser avaliadas quando administrados (GOMES, 2014). O atual arsenal terapêutico empregado no tratamento da malária bem como novas alternativas em teste clínico preconiza a administração por via oral. Nesse contexto, a regra dos cinco de Lipinski é uma forma simples de se avaliar a biodisponibilidade oral teórica de um composto. Esta regra determina que uma melhor absorção oral está associada a compostos com massa molecular (M.M) ≤ 500 , coeficiente de partição calculado octanol / água (cLogP) ≤ 5 , número de átomos doadores de ligação de hidrogênio (HDB) ≤ 5 e número de átomos aceptores de ligação de hidrogênio (HAB) ≤ 10 . Compostos que obedecem a três desses quesitos seguem a regra de Lipinski (GOMES, 2014).

Em nosso estudo, tomou-se o cuidado para que a molécula selecionada do resultado da análise do *Virtual Screening*, assim como as demais encontradas, obedecesse às regras de Lipinski para a biodisponibilidade das mesmas em uso terapêutico, se comprovado.

A abordagem moderna no desenvolvimento de novos fármacos contra doenças negligenciadas, entre estas a malária e a tuberculose, está baseada no uso de alvos moleculares definidos, selecionados devido à importância estratégica das rotas metabólicas das quais fazem parte, e, geralmente relacionadas a etapas críticas do desenvolvimento do parasita (LÍCIA et al., 2012).

4.6 Análise da interação da substância Skyrin e extratos vegetais por Ressonância Plasmônica de Superfície

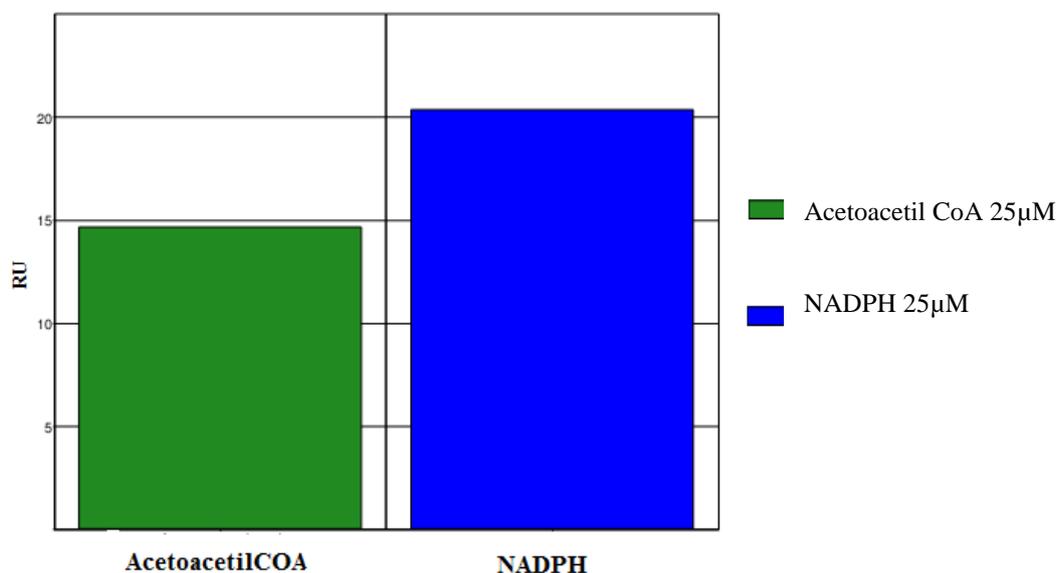
4.6.1 Ensaios de pré-concentração, imobilização e ligação dos substratos com a enzima PfoAR

Não existem dados na literatura sobre as condições ideais de imobilização desta enzima sob a superfície de *sensor chips* utilizados na técnica de Ressonância Plasmônica de Superfície. A imobilização depende fundamentalmente da aproximação do ligante à matriz de dextrana, esse contato varia de acordo com dois fatores principais, a taxa de fluxo em que o ligante passa pelo *sensor chip* e a interação eletrostática entre ligante e a matriz dextrana (MARIN et al., 2011).

Durante o experimento de variação de pH, é avaliado apenas quanto o ligante se aproxima da matriz de dextrana por interação eletrostática, nesta etapa não ocorre a imobilização dos ligantes a superfície do *sensor chip* por ligação química. Os níveis de aproximação variam de acordo com o pH, desta maneira o pH ideal para imobilização deve se encontrar acima de 3,5 e abaixo do pI da molécula a ser imobilizada (MARIN et al., 2011). Variações de pH na determinação das condições de imobilização da enzima *Beta-cetoacil-ACP-redutase* –OAR à superfície do *sensor chip*. O ponto isoelétrico (pI) da PfoAR é de 8,58 sendo que os valores de pH selecionados para o ensaio foram abaixo do pI, Pois valores abaixo do pI deixam a proteína com carga positiva e valores acima do pI deixam a proteína com carga predominantemente negativa. A enzima se aproximou do *chip* em diferentes níveis de acordo com o balanço de carga gerado em cada faixa de pH testado, observa-se que a concentração de 50µg/mL de PfoAR diluído num tampão de acetato de sódio no pH 4,5

promoveu um dos maiores níveis de aproximação, sendo o mais adequado para atingir os níveis esperados de imobilização. O procedimento de imobilização do ligante ao *sensor chip* resultou em 9.076 RU imobilizados. Após a imobilização da *PfOAR*, os ensaios de ligação foram realizados para determinar o comportamento de interação entre o ligante e os substratos NADPH e Acetoacetil-CoA, (Figura 17). Pode-se observar que nos resultados de interação entre o ligante e os substratos, que enzima mesmo imobilizada se mantém capaz de se ligar aos substratos. O gráfico de barras, na Figura 17, mostra os resultados dos substratos NADPH e Acetoacetil-CoA na interação ao ligante *PfOAR*.

Figura 17: Níveis de interação dos substratos NADPH e Acetoacetil-CoA com a Enzima *PfOAR*

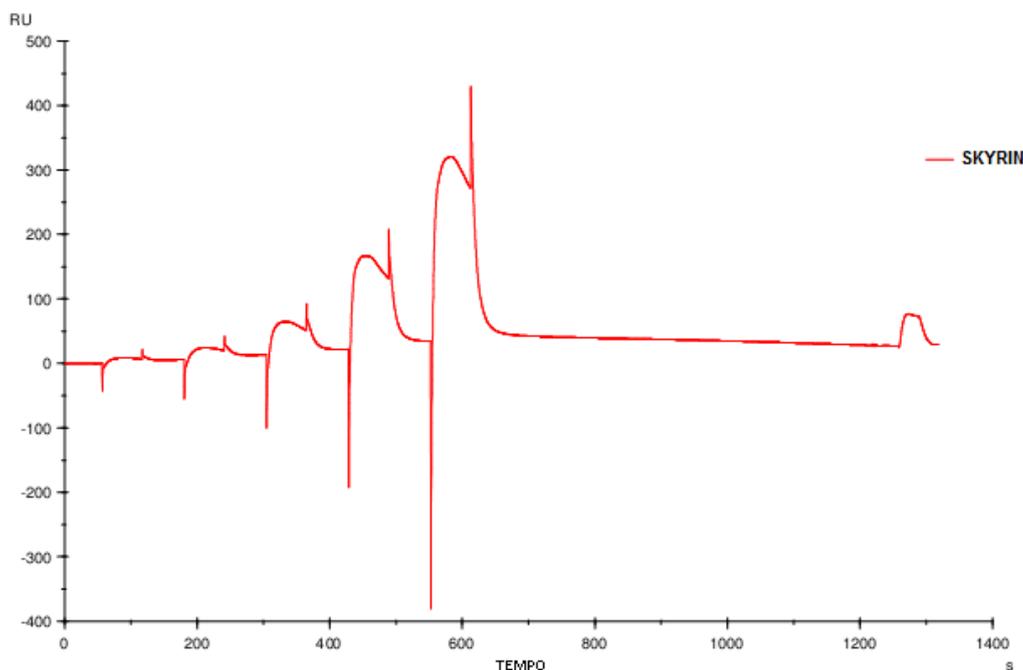


Legenda: Resposta de interação dos substratos testados ao ligante *PfOAR*

4.6.2 Ensaios de interação da Skyrin com a enzima *PfOAR*

O sensorgrama da Figura 18 demonstra o resultado da interação entre a molécula de Skyrin com o ligante *PfOAR* em cinética de único ciclo, em cinco concentrações diferentes (7,8µM, 15,6µM, 31,2µM, 62,5µM e 125µM) apresentando interação ligante-analito, resultando em níveis de interação da ordem de 8,5RU, 21,3RU, 53,5RU, 138,1RU, 280,5RU, respectivamente

Figura 18: Sensorgrama da cinética de único fluxo da molécula Skyrin com a enzima *PfOAR*



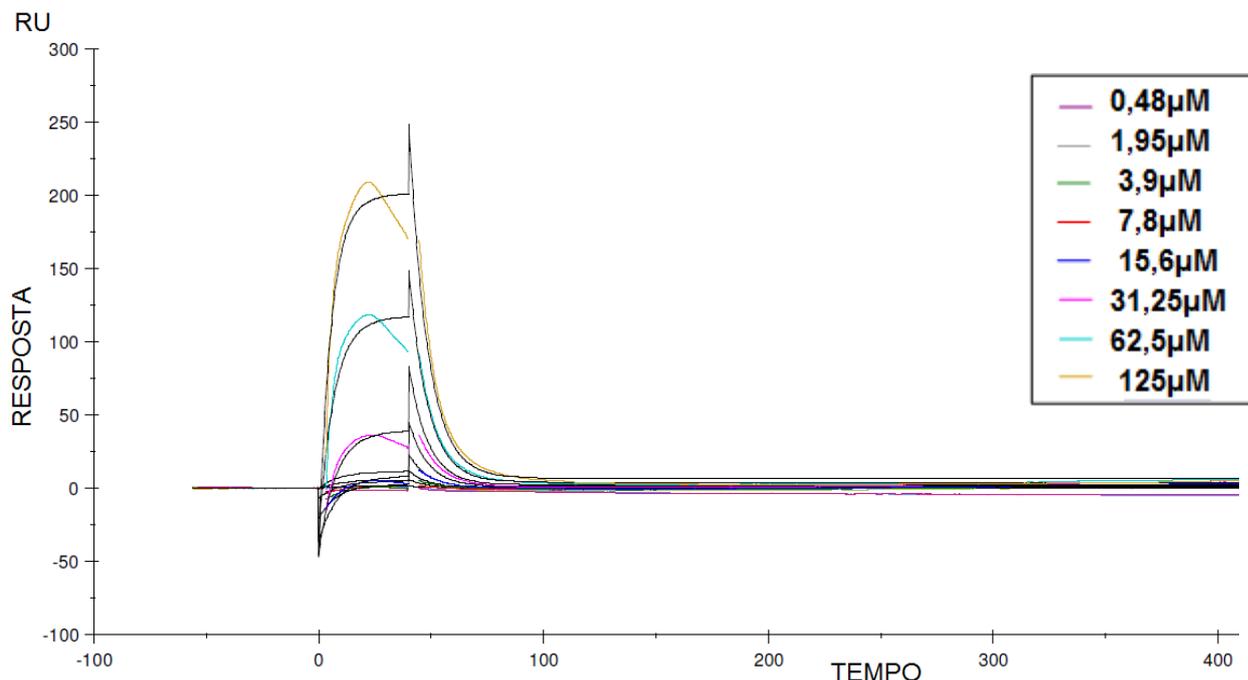
Legenda: Cinética de um único ciclo demonstrando a interação e dissociação da Skyrin com a enzima ligante.

O processo de regeneração é o último passo de um ensaio de ligação, nesta etapa tem-se por objetivo promover a dissociação das interações não covalentes entre ligante e analíto, possibilitando uma completa dissociação e restabelecimento do valor da linha de base, sem comprometer a estrutura do ligante imobilizado.

A cinética de interação apresentada na Figura 19, foi realizada em diferentes concentrações da molécula Skyrin (0,48 μ M, 1,95 μ M, 3,9 μ M, 7,8 μ M, 15,6 μ M, 31,25 μ M, 62,5 μ M, 125 μ M), mostrando a associação/dissociação entre a molécula sintética e a enzima OAR. Para a elucidação da constante real foi necessário realizar adequações metodológicas na diluição de Skyrin para minimização do efeito de avidéz e transporte de massa.

Devido ao fato da molécula Skyrin ser solubilizada somente em DMSO 100%, houve a princípio, um receio quanto à interferência desse solvente na interação. Pode-se observar que a presença de DMSO nas concentrações da Skyrin utilizadas (na maior concentração 125 μ M Skyrin = 5% DMSO) não prejudicou a interação entre o analíto e o ligante. A partir destes resultados, foi possível determinar-se o valor da constante aparente de afinidade (KD), ou seja 1,244 μ M.

Figura 19: Sensorgrama da cinética de interação molécula Skyrin com a enzima *PfOAR*



Legenda: Ensaio cinético de interação entre a Skyrin em diferentes concentrações variando de 0,48 μ M-0,039%DMSO à 125 μ M-5%DMSO em relação à *PfOAR* imobilizada.

Estas técnicas inovadoras possibilitam de maneira simples e reprodutível a identificação da atividade de interação entre analito-ligante.

Inicialmente os ensaios para avaliação do efeito de transporte de massa com a Skyrin numa concentração de 62,5 μ M, foi conduzido em condições fisiológicas, na temperatura de 37°C e em tampão de corrida PBS pH 7,4.

Estes resultados evidenciam a funcionalidade dessa metodologia de estudo, pois é o primeiro relato de ensaios experimentais entre a molécula Skyrin e a enzima *PfOAR* utilizando o método de SPR. O conjunto de resultados obtidos são indicativos de que esses experimentos dirigidos, com análise virtual através do método *Docking* Molecular, possibilitaram a identificação desta molécula com afinidade a enzima, é um método eficaz e que pode viabilizar com sucesso a busca de novas moléculas como candidatas a inibidores.

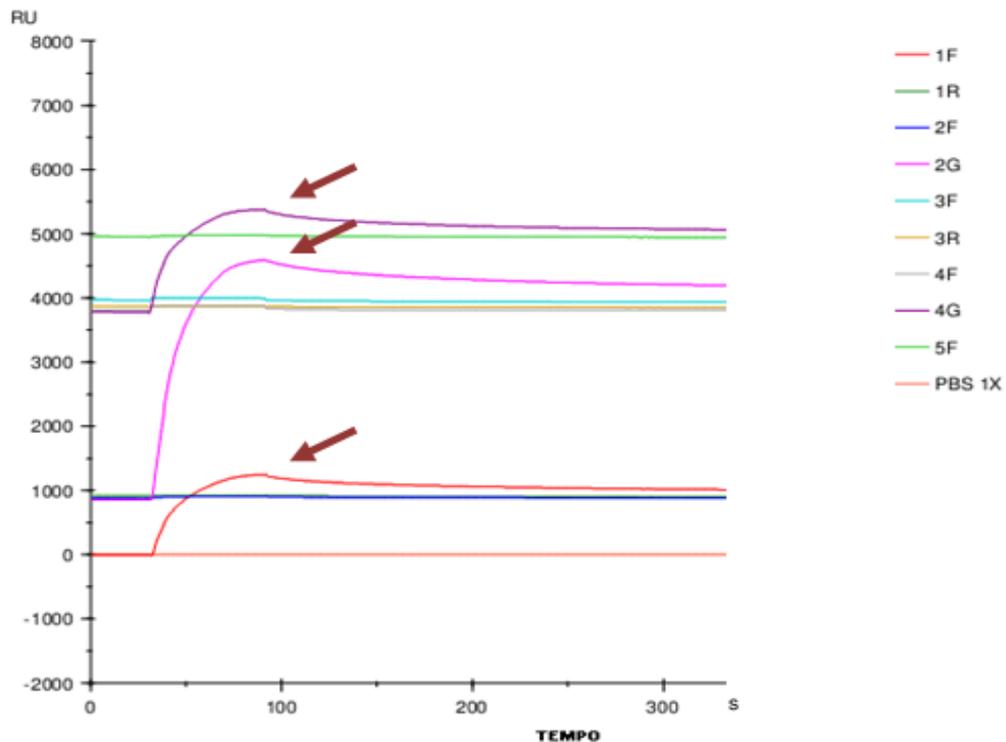
A concepção de medicamentos por química combinatória e por *screening virtual* criou uma grande demanda por pequenas moléculas orgânicas que atuam em alvos específicos de drogas. Essas tecnologias incidem sobre a geração de um grande número de moléculas integrados com a triagem biológica a partir de um muito grande número de amostras. Uma crescente pressão para reduzir o tempo de desenvolvimento de medicamentos e custo pelas indústrias farmacêuticas tem estimulado a busca por novas moléculas relevantes para doenças

comercialmente viáveis, como o cancro, doenças cardiovasculares, doenças neurológicas e infecções hospitalares (CALDERON et al., 2009)

4.6.3 Ensaios de interação dos extratos vegetais com a enzima *PfOAR*

Foram testados 37 extratos vegetais etanólicos preparados a partir de plantas coletadas na floresta do Campus da UFAM. Os extratos utilizados nesses testes foram padronizados com concentração de 200µg/mL. Destes extratos naturais testados, 17(dezessete) extratos apresentaram resultados inconclusivos de interação, 11(onze) extratos não apresentaram perfil indicativo de interação (dados não apresentados) e apenas 9(nove) apresentaram um perfil associativo/dissociativo típico indicando a existência de interação de componente(s) com a enzima imobilizada *PfOAR*. A Figura 20 apresenta as respostas de interação de alguns dos extratos vegetais com a enzima *PfOAR* imobilizada.

Figura 20: Sensorgrama da interação dos extratos vegetais com o ligante *PfOAR*.

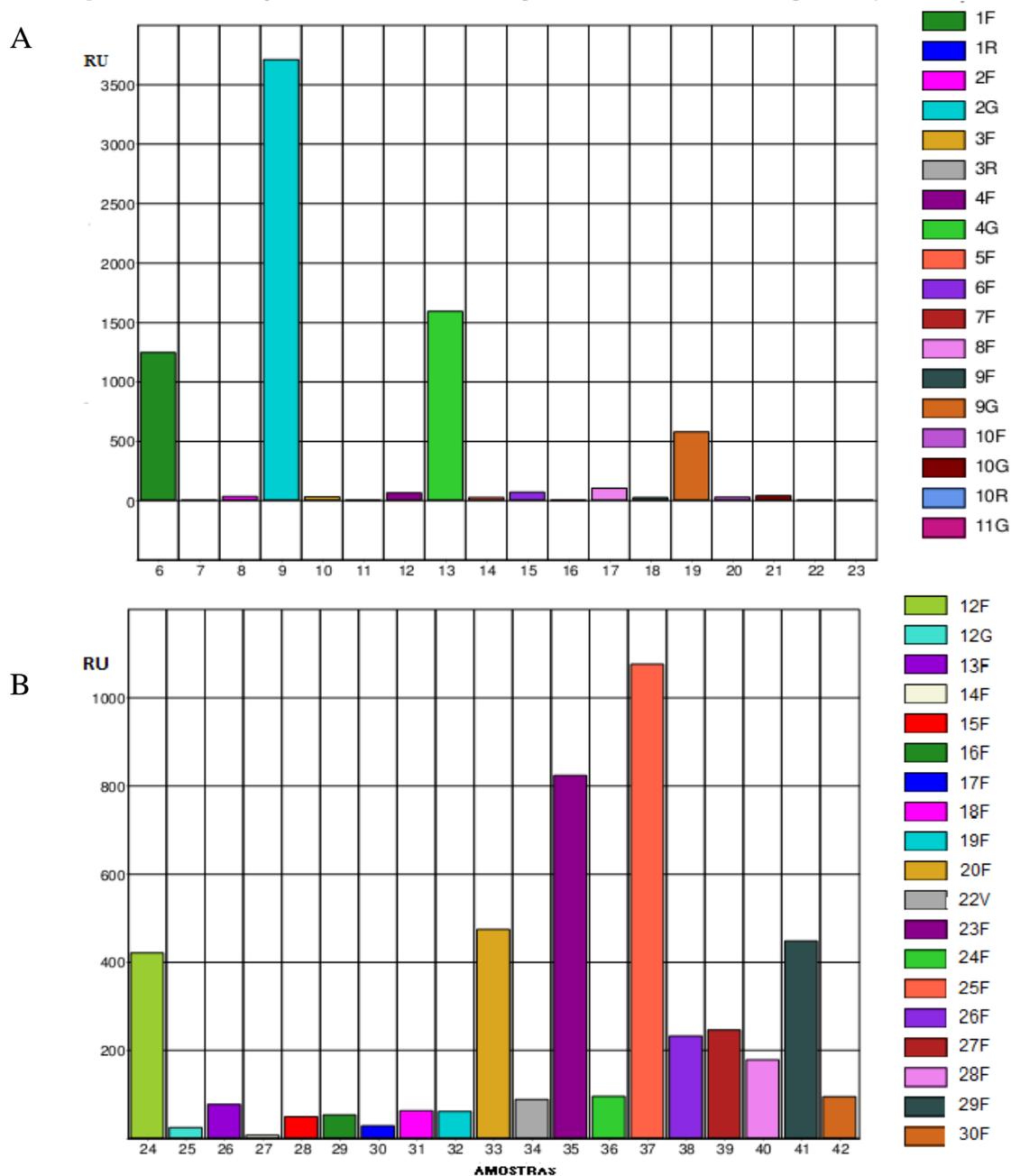


Legenda: Sensorgrama da associação/dissociação de 9 extratos vegetais, de um total de 37 extratos testados na interação com a *PfOAR*. As setas indicam perfil associativo/dissociativo típico de um analito.

Dos 37 extratos apenas 9(nove) apresentaram níveis significativos de interação com a *PfOAR* conforme ilustrado na Figura 21(A e B) e na Figura 22. Alguns aspectos desta interação chamam a atenção, como o fato de não dissociarem mesmo após as etapas de

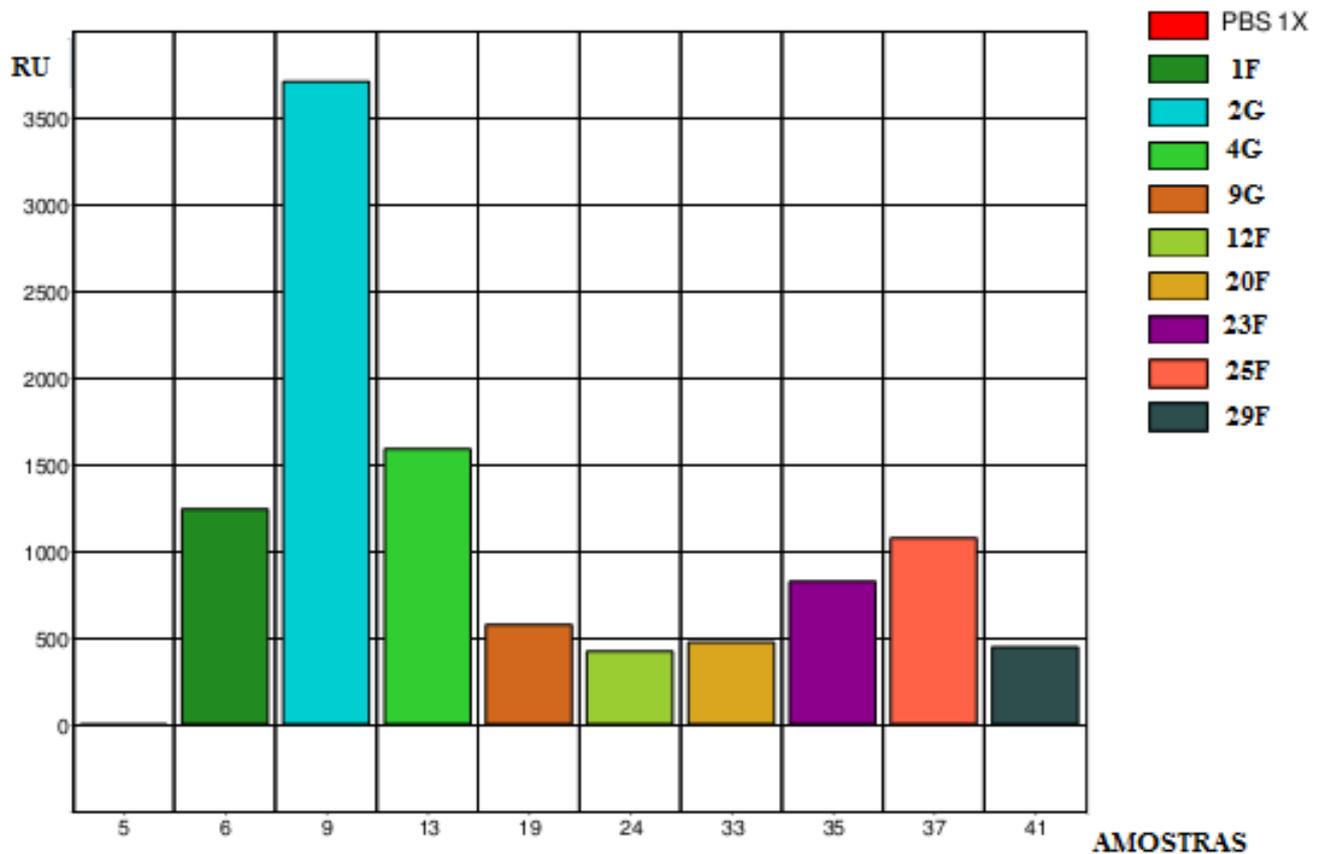
regeneração, isto evidência uma forte interação e uma alta afinidade entre estas moléculas, sendo este um efeito desejável quando se busca por um novo medicamento. Os demais extratos apresentaram distorções no sensorgrama que impede a correta interpretação das regiões de interação. Este efeito indesejado pode ser resultante da presença de moléculas interferentes desconhecidas, já esperadas para este tipo de abordagem, tendo em vista que não se conhece a natureza das moléculas constituintes destes extratos.

Figura 21: Interação dos 37 extratos vegetais testados com o ligante *PfOAR*



Dos resultados apresentados na Figura 21 (A), os extratos 1F, 2G, 4G e 9G apresentaram nível de interação com alta afinidade com resposta de 1.240RU, 3.705RU, 1.586RU e 574RU, respectivamente. E na Figura 21 (B), se destacam os extratos 12F, 20F, 23F, 25F e 29F com resposta de 420RU, 472RU, 822RU, 1074RU, 447RU respectivamente. A representação destes extratos com alta afinidade estão melhor visualizados na Figura 22.

Figura 22: Extratos vegetais com potencial de interação ao ligante *PfOAR*



Legenda: Extratos que apresentaram perfil de interação com a enzima *PfOAR*. Destaca-se o extrato 2G com nível de resposta alcançado de 3.705 RU, seguidos dos extratos 4G (RU 1.586) e 1F (RU 1.240).

Produtos naturais vêm sendo amplamente reconhecido como uma importante fonte da maior parte dos componentes ativos em medicamentos terapeuticamente eficazes. Uma das razões para este sucesso é, na maioria das vezes, os produtos naturais são mais facilmente absorvidos do que os produtos sintéticos. Produtos naturais nem sempre são utilizados apenas como medicamentos, mas suas ações também ajudaram a revelar aspecto importante da fisiologia por interações com canais de membrana, receptores e caminhos metabólicos (CALDERON et al., 2009).

4.7 Avaliação da bioatividade *in vitro* da molécula Skyrin contra *Plasmodium falciparum* e análise do efeito citotóxico

Para a busca por um novo quimioterápico para malária, deve levar em conta, que as áreas malarígenas endêmicas e hiperendêmicas concentram populações de menor poder aquisitivo, sendo a transmissão da malária concentrada nas regiões da África Subsaariana. Apesar da resistência a cloroquina (CQ), a busca por análogos desse fármaco é de grande relevância, uma vez que a CQ foi o fármaco mais eficaz, menos tóxico e de menor custo para uso humano até hoje em uso, principalmente para o tratamento de malárias não *falciparum* (ANDREWS et al., 2011; IWANIUKA, et al., 2009). Além disso, tem sido sugerido que se descontinuada a pressão da CQ ocorrerá reversão da resistência dos parasitos ao fármaco (PEREIRA et al., 2011).

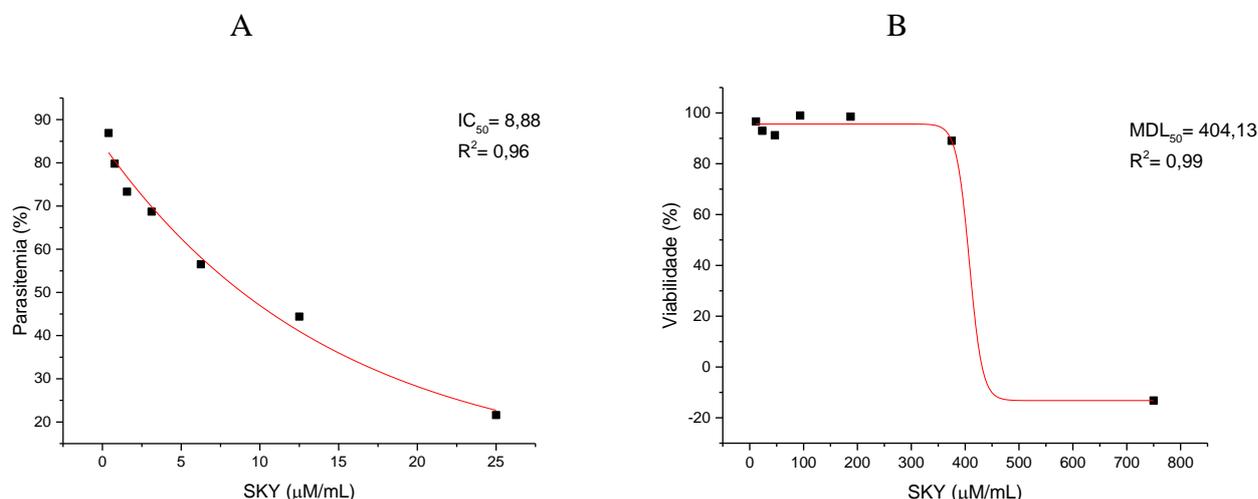
Para assegurar que o efeito antimalárico (IC_{50}) observado na ação dos extratos e da molécula sintética foi devido a uma ação específica contra o parasito, e não uma consequência de uma ação citotóxica contra a célula hospedeira, foram realizados os testes de citotoxicidade contra a célula HepG2, visando a obtenção da dose letal para 50% da população de células (MDL_{50}). IC_{50} e MDL_{50} foram definidos utilizando o método de regressão não linear em função de uma curva dose-resposta sigmoidal.

Até o presente momento não há dados na literatura, referentes à molécula Skyrin, em testes *in vitro* antimaláricos. Neste estudo submetemos esta molécula, numa concentração inicial de 25 μ M/mL na placa teste. Como controle, foram utilizados CQ, IQG607 (análogo da Isoniazida) e DMSO nas concentrações iniciais de 10 μ M/mL, 50 μ M/mL e 6,5%, respectivamente, na placa teste, utilizando a cepa W2- CQ resistente (MEDEIROS et al., 2011). Como demonstrado na Figura 23A, o valor obtido de IC_{50} da molécula sintética Skyrin foi de 8,88 μ M/mL, comprovando ação antiparasitária. No qual se evidencia um valor abaixo de 10 μ g/mL correspondente do critério de seleção para compostos com potencial antimalárico (BÉZIVIN et al., 2003). Todavia é importante ressaltar que por se tratar de um composto isolado, o desejável seria que este apresentasse atividade em concentração menor que 1 μ g/mL (KAUR et al., 2009). O valor da avaliação da citotoxicidade (MDL_{50}), apresentado na Figura 23B, foi de 404,13 μ g/mL, demonstrando que a molécula Skyrin não foi citotóxica nos ensaios realizados.

A presença do DMSO na diluição da molécula Skyrin é obrigatório para a solubilização total da mesma. Para os testes de avaliação de citotoxicidade, foi realizada uma

curva dose-resposta para avaliação do solvente DMSO, obtendo-se ao final o valor de MDL₅₀ igual a 6,3% (dados não mostrados).

Figura 23: Atividade da Molécula Skyrin contra *Plasmodium falciparum* e Células HepG2



Legenda: Curvas dose-resposta para obtenção de IC₅₀, para *P.falciparum* pelo método anti-HPRII e MDL₅₀ para Hep-G2 método de Citotoxicidade.

Os valores apresentados na Tabela 3, foram obtidos à partir da razão entre o IC₅₀ e o MDL₅₀ que corresponde ao índice de seletividade da substância, o que representa a relação entre a dose ativa e a dose tóxica. Sendo considerados IS <10 amostra tóxica, 10<IS<25 amostras parcialmente tóxica e IS>25 amostra não tóxica. O Índice de Seletividade da molécula sintética Skyrin (Tabela 3) demonstra que esta não é tóxica para a célula e é eficaz contra para o parasita. A literatura considera IS de pelo menos dez para que o composto seja considerado seguro (BÉZIVIN et al., 2003). É importante ressaltar que a linhagem celular *HepG2* e o ensaio de MTT são os testes que mais vem sendo utilizados na literatura para avaliação da toxicidade (GOMES et.al., 2014).

Cultura *in vitro* de *P. falciparum* permite que pesquisas sobre um real perfil de suscetibilidade para substâncias ativas e extratos de plantas que apresentam concentrações inibitórias promissoras. O conhecimento deste perfil pode ser útil para a identificação, com base em evidências experimentais de moléculas sintéticas e a maioria das plantas medicinais importantes e eficazes para o desenvolvimento dos antimaláricos novos e eficazes (POHLIT et al., 2013).

Tabela 3: Avaliação do potencial Antimalárico e Citotóxico

Amostra	<i>P. falciparum</i> HRPII - IC ₅₀	HepG2 MDL ₅₀	IS
Skyrin (µg/mL)	8,88	404,13	45,51
CQ (µg/mL)	2,8	290	103,57
IQG607(µg/mL)	4,77	676	141,72
DMSO (%)	0,5	4,2	8,40

Legenda: Amostras utilizadas para os testes contra o parasita da Malária e no teste citotóxico contra a Célula HepG2 para o cálculo do Índice de Seletividade.

Para a avaliação da atividade citotóxica dos compostos foram utilizadas uma linhagem celular HepG2, procedente de um hepatoma humano. O fígado é um dos principais órgãos envolvidos no metabolismo de fármacos e alguns estudos sugerem que o uso prolongado da CQ pode afetar sua função (MUSABAYANE et al., 1996).

O método de MTT avalia indiretamente a viabilidade celular através do dano na mitocôndria, uma vez que a enzima *Succinato Desidrogenase*, presente nessa organela, é responsável pela clivagem do sal tetrazólico (MTT). Essa clivagem resulta na formação de cristais de formazan, responsáveis pela coloração roxa, presente nas células vivas. Observando os resultados pode-se dizer que a molécula Skyrin no teste *in vitro* possui um IS não tóxico (Tabela 3) mostrando valor maior que 20, o que indica uma janela terapêutica considerável para desenvolvimento do composto como antimalárico (BÉZIVIN et al., 2003).

A avaliação da citotoxicidade nos programas de busca de novos fármacos é essencial, pois a atividade das substâncias contra o *P. falciparum* necessita ser específica e não tóxica.

Os resultados dos 37 extratos vegetais testados *in vitro* contra o *Plasmodium falciparum* (Teste Anti-HRPII-IC₅₀), Citotoxicidade (Teste MDL₅₀), estão apresentados na Tabela 4. No teste Anti-HRPII, 15 (quinze) extratos mostraram-se efetivos contra o *Plasmodium falciparum*, apresentando um valor de IC₅₀ abaixo de 20µg/mL, 16 (dezesseis) apresentando valores de IC₅₀ entre 20 e 99µg/mL e 6 (seis) valores de IC₅₀ acima de 100µg/mL não apresentando nenhuma atividade.

Dos 15 (quinze) extratos com resultados efetivos, 4 (quatro) extratos vegetais, não são tóxicos o que demonstra que eles são efetivos contra o *Plasmodium* e não apresentando

citotoxicidade para a linhagem celular HepG2, 7 (sete) extratos vegetais são parcialmente tóxicos e 4 (quatro) extratos vegetais são tóxicos para a célula HepG2.

Tabela 4: Extratos vegetais do potencial Antimalárico e Citotóxico

Amostra Extratos	Média IC ₅₀ \bar{x} ($\mu\text{g/mL}$) \pm DP	Média MDL ₅₀ \bar{x} ($\mu\text{g/mL}$) \pm DP	Índice de Seletividade	Resultados
01R	24,5 \pm 15,4	22,38 \pm 8,96	0,91	Inativo / Tóxico
01F	22,27 \pm 11,3	230,7 \pm 1,73	10,35	Inativo / Parcialmente Tóxico
02G	≥ 100	≥ 500	5	Inativo / Tóxico
02F	14,11 \pm 2	253,66 \pm 17,45	17,97	Ativo / Parcialmente Tóxico
03R	≥ 100	149 \pm 78,30	1,49	Inativo / Tóxico
03F	16,25 \pm 3,46	124,49	7,66	Ativo / Tóxico
04G	15,4 \pm 9,73	$\geq 32,3 \pm 1,6$	$\geq 2,09$	Ativo / Tóxico
04F	23,7 \pm 0,54	177,4 \pm 65,9	7,48	Inativo/ Tóxico
05F	19,74 \pm 5,08	260,3 \pm 23,34	13,18	Ativo/Parcialmente Tóxico
06G	≥ 100	314,25 \pm 108	3,14	Inativo / Tóxico
06F	38,76 \pm 4,11	174,3 \pm 23,7	4,5	Inativo/ Tóxico
07F	$\geq 66,6 \pm 47,1$	Amostra Insuficiente	-	Inativo
08F	79,2 \pm 10,85	≥ 500	6,31	Inativo/ Tóxico
09F	8,87 \pm 0,73	$\geq 456,9 \pm 61$	51,51	Ativo/Não Tóxico
09G	23,76 \pm 3,40	211,4 \pm 64,4	8,89	Inativo/ Tóxico
10F	3,33 \pm 1,53	263,45	79,11	Ativo/Não Tóxico
10R	7,94 \pm 1,12	408,38	51,43	Ativo/Não Tóxico
10G	35,65 \pm 6,23	435,45	12,21	Inativo/Parcialmente Tóxico
11F	33,47 \pm 3,70	≥ 500	14,93	Inativo/Parcialmente Tóxico
12F	13,2 \pm 4,57	262,8 \pm 88	19,9	Ativo/Parcialmente Tóxico
12G	20,5 \pm 11,7	109,99 \pm 51,1	5,36	Inativo/Tóxico
12R	12,61 \pm 4,37	193,14 \pm 64,2	15,31	Ativo/Parcialmente Tóxico
13F	48,98 \pm 8,02	104,5 \pm 10,0	2,13	Inativo/ Tóxico
14F	71,96 \pm 6,29	16,75	0,23	Inativo/ Tóxico
15F	49,60 \pm 18,3	183,1 \pm 106,6	3,69	Inativo/ Tóxico
17F	37,79 \pm 3,22	6,64	0,17	Inativo/ Tóxico
18F	63,95 \pm 0,37	$\geq 471,6 \pm 40,0$	7,37	Inativo/ Tóxico
19F	50,1 \pm 2,26	≥ 500	9,9	Inativo/ Tóxico
20F	18,08 \pm 17,2	87,04	4,83	Ativo/ Tóxico
22V	≥ 100	Amostra Insuficiente	-	Inativo
23F	22,82 \pm 0,8	188,1 \pm 91,2	8,24	Inativo/ Tóxico
24F	9,15 \pm 4,32	223,3 \pm 23,3	24,4	Ativo/Parcialmente Tóxico
25F	≥ 100	≥ 500	5	Inativo / Tóxico
26F	5,44 \pm 0,49	≥ 500	$\geq 91,91$	Ativo/Não Tóxico
27F	≥ 100	≥ 500	5	Inativo / Tóxico
28F	21,28 \pm 2,48	233,69 \pm 30,3	10,98	Inativo/Parcialmente Tóxico
29F	18,53 \pm 1,36	≥ 500	$\geq 26,98$	Ativo/Não Tóxico
30F	12,42 \pm 2,96	≥ 500	$\geq 40,45$	Ativo/Não Tóxico

Legenda: Os testes Anti-HRP II (IC₅₀) e Citotoxicidade (MDL₅₀) foram realizados em triplicata.

Durante a prospecção de novas substâncias bioativas é desejável que os compostos avaliados com potencial ação antimalárica apresentem valores reduzidos de IC₅₀ nos ensaios *in vitro*. Isso minimiza o risco de falta de especificidade da droga por seu alvo, além de possibilitar a administração de doses menores, reduzindo assim a chance de ocorrerem efeitos adversos (GOMES et al., 2014).

Os resultados demonstrados na Tabela 5, mostram a comparação entre as amostras de extratos vegetais que apresentaram níveis significativos de interação com perfil associativo/dissociativo no teste SPR, com os resultados obtidos dos testes *in vitro* IC₅₀ e MDL₅₀.

Dos 9 (nove) extratos vegetais positivos no teste de SPR, 4 (quatro) são efetivos contra *Plasmodium falciparum* com valores abaixo de 20µg/mL, sendo que 2 (dois) são tóxicos para a célula testada e 2 parcialmente tóxicos, 2 (dois) apresentam valores entre 20 e 99µg/mL e 3 (três) valores acima de 100µg/mL não apresentando nenhuma atividade.

É importante ressaltar que os resultados aqui apresentados são de extratos brutos vegetais e estes resultados promissores demonstram o potencial destes extratos no desenvolvimento de um possível novo antimalárico. Análises fitoquímicas são de grande relevância no conhecimento de metabólitos secundários, para que assim possa chegar ao isolamento de princípios ativos destes extratos vegetais, responsáveis pelos efeitos antiplasmodiais identificados neste estudo.

Tabela 5: Amostras de extratos vegetais aos testes de SPR, Anti-HRP II e Citotoxicidade

Amostra Extratos (SPR)	RU Máximo	Média IC ₅₀ \bar{x} (µg/mL) ± DP	Média MDL ₅₀ \bar{x} (µg/mL) ± DP	Índice de Seletividade	Resultados
01F	1240	22,27 ± 11,3	230,7 ± 1,73	10,35	Inativo / Parcialmente Tóxico
02G	3705	≥100	≥500	5	Inativo / Tóxico
04G	1586	15,4 ± 9,73	≥ 32,3 ± 1,6	≥ 2,09	Ativo / Tóxico
09G	574	23,76 ± 3,40	211,4 ± 64,4	8,89	Inativo/ Tóxico
12F	420	13,2 ± 4,57	262,8 ± 88	19,9	Ativo/Parcialmente Tóxico
20F	472	18,08 ± 17,2	87,04	4,83	Ativo/ Tóxico
23F	822	22,82 ± 0,8	188,1 ± 91,2	8,24	Inativo/ Tóxico
25F	1074	≥ 100	≥ 500	5	Inativo / Tóxico
29F	447	18,53 ± 1,36	≥ 500	≥ 26,98	Ativo/Não Tóxico

Legenda: Comparação dos resultados obtidos nos testes de SPR e Antimalárico.

Segundo Calderon e colaboradores (2009), com base em dados estatísticos, argumentam que a busca racional do produtos naturais da biodiversidade é mais vantajoso do que procurar bases dados molecular sintético desde que muitas vezes exibir ambas as propriedades biológicas únicas e uma complexidade estrutural desafiador. Por exemplo, a ampla capacidade de moléculas de metabolismo secundário encontradas nas plantas e venenos animais têm fornecido defesa contra ataques de microorganismos infecciosos para milhares de anos.

5 CONCLUSÕES

- A construção do plasmídeo recombinante de expressão pGS21a + *PfOAR*, para a expressão heteróloga da região estrutural do gene de β -acetoacetyl-*ACP-reductase* (OAR) permitiu expressar em *E. coli* a enzima recombinante *PfOAR* na forma solúvel.
- A técnica de cromatografia de afinidade com níquel mostrou-se adequada para purificação de *PfOAR* resultando na proteína com alto grau de pureza.
- A enzima *PfOAR* se apresentou ativa nos testes realizados, ocorrendo a redução de NADPH na reação testada.
- No SPR, houve interação da enzima com os substratos NADPH e Acetoacetyl-COA, assim como, com a molécula Skyrin, encontrada virtualmente.
- A molécula sintética Skyrin, apresentou atividade antimalárica nos testes *in vitro*, não sendo tóxica para a célula HepG2.
- Dos 37 extratos brutos vegetais testados, 9 apresentaram interação com a *PfOAR* pela técnica de SPR e no teste antimalárico *in vitro* 2 (dois) extratos vegetais apresentam toxicidade parcial sendo que 1 (um) deles mostrou-se não tóxico para a célula HepG2.
- A metodologia adotada e apresentada neste estudo permitiu aprimorar o conhecimento nos processos *in silico* e *in vitro*, e como consequência, resultou no desenvolvimento de abordagens paralelas robustas e de grande confiabilidade, e que serão muito importantes para o processo de planejamento de novos candidatos à fármacos a doença da Malária.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, A. C. C. et al. *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* ex vivo susceptibility to anti-malarials and gene characterization in Rondônia, West Amazon, Brazil. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 73, jan. 2014.

ALVES, F. P. et al. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 6, p. 641–8, jun. 2002.

ANDREWS, S. et al. Reversal Agent and Linker Variants of Reversed Chloroquines: Activities against *Plasmodium falciparum*. **NIH Public Access**, v. 53, n. 2, p. 916–919, 2011.

BASSO, L. A. et al. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of Malaria, Tuberculosis, and T-cell mediated diseases-a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 6, p. 475–506, out. 2005.

BÉZIVIN, C. et al. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 10, n. 6-7, p. 499–503, jan. 2003.

BRASIL, Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2000 a 2011. **Vigilância Epidemiológica em Saúde- MS, SIVEP**, p. 1–16, 2013.

CALDERON, L. A. et al. Amazonian Biodiversity: A view of drug development for leishmaniasis and malaria. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1011–1023, 2009.

CAMARGO, E. P. Malária , Maleita , Paludismo. **Ciência e Cultura - Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**, vol.55, n. 2317-6660, p. 26–29, 2003.

CARBALLEIRA, N. M. New Advances in Fatty Acids as Antimalarial, Antimycobacterial and Antifungal Agents. **Prog Lipid Res**, v. 47, n. 1, p. 50–61, 2008.

CUKIER, C. D. et al. Discovery of an allosteric inhibitor binding site in 3-oxo-acyl-ACP reductase from pseudomonas aeruginosa. **ACS Chemical Biology**, v. 8, n. 11, p. 2518–2527, 2013.

CUNICO, W. et al. Antimalarials Drugs – history and new approaches. **Rev. Bras. Farm.**, v. 89, n. 1, p. 49–55, 2008.

FLEIGE, T.; LIMENITAKIS, J.; SOLDATI-FAVRE, D. Apicoplast: keep it or leave it. **Microbes and Infection / Institut Pasteur**, v. 12, n. 4, p. 253–62, abr. 2010.

FRANÇA, T. E; MARTA, G. Malária: aspectos Históricos e Quimioterapia. **Quim. NOVA**, v. 31, n. 5, p. 1271–1278, 2008.

FRANÇA, T.C.C.; MEDEIROS, A. L.; SANTOS FILHO, O.A.; SANTOS, E.C.P.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. J. Short Report Reductase-Thymidylate Synthase . A Model to Design New Antimalarials. **J. Braz. Chem.Soc.**, v. 15, n. 3, p. 450–454, 2004.

GARDNER, M. J. et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Europe PMC Funders Group**, v. 419, n. 6906, p. 3–35, 2013.

GOMES, A. P. et al. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. **Rev. Bras. Ter. Intensiva**, v. 23, n. 3, p. 358–369, 2011.

GOMES, P. R. et al. Síntese e avaliação da atividade antimalárica de compostos derivados da Curcumina. **Quim. NOVA**, v. 37, n. 3, p. 492–496, 2014.

GOODMAN, C. D. et al. Apicoplast *acetyl Co-A* carboxylase of the human malaria parasite is not targeted by cyclohexanedione herbicides. **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 5, p. 285–9, abr. 2014.

GORNICKI, P. Apicoplast fatty acid biosynthesis as a target for medical intervention in apicomplexan parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 9, p. 885–896, ago. 2003.

GRIFFING, S. M. et al. Historical shifts in Brazilian *P. falciparum* population structure and drug resistance alleles. **PloS One**, v. 8, n. 3, p. e58984, jan. 2013.

GROUP, L. S. DC Protein Assay Instruction Manual. **Bio-Rad Laboratories**, p. 1–17, 2013.

HEDDINI, A. Malaria pathogenesis: a jigsaw with an increasing number of pieces. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 13, p. 1587–98, 4 dez. 2002.

KANTELE, A.; JOKIRANTA, T. S. Review of cases with the emerging fifth human malaria parasite, *Plasmodium knowlesi*. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 52, n. 11, p. 1356–62, jun. 2011.

KARMODIYA, K. et al. Deciphering the key residues in *Plasmodium falciparum* *beta-ketoacyl acyl carrier protein reductase* responsible for interactions with *Plasmodium falciparum* *acyl carrier protein*. **The FEBS journal**, v. 275, n. 19, p. 4756–66, out. 2008.

KARMODIYA, K.; SRIVASTAV, R. K.; SUROLIA, N. Production and purification of refolded recombinant *Plasmodium falciparum* *beta-ketoacyl-ACP reductase* from inclusion bodies. **Protein Expression and Purification**, v. 42, n. 1, p. 131–6, jul. 2005.

KATSURAGAWA, T. H. et al. The dynamics of transmission and spatial distribution of malaria in riverside areas of Porto Velho, Rondônia, in the Amazon region of Brazil. **PloS One**, v. 5, n. 2, p. e9245, jan. 2010.

KATSURAGAWA, T. H. et al. Selective intermittent preventive treatment of vivax malaria: reduction of malaria incidence in an open cohort study in brazilian Amazon. **Malaria Research and Treatment**, v. 2013, p. 310246, jan. 2013.

KAUR, K. et al. Antimalarials from nature. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 9, p. 3229–56, 1 maio 2009.

KRISTAN, K. et al. Novel inhibitors of *beta*-ketoacyl-ACP reductase from *Escherichia coli*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 178, n. 1-3, p. 310–6, 16 mar. 2009.

IWANIUKA, D.P. et al. Synthesis and antimalarial activity of new chloroquine analogues carrying a multifunctional linear side chain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 18, p. 6560–6566, 2009.

LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 15, p. 680–5, 1970.

LÍCIA, F. et al. Pesquisa , desenvolvimento e inovação para o controle das doenças negligenciadas. **Biol. Sciences**, v. 33, n. 1, p. 37–47, 2012.

LINDNER, S. E. et al. Enzymes involved in plastid-targeted phosphatidic acid synthesis are essential for *Plasmodium yoelii* liver-stage development. **Molecular Microbiology**, v. 91, n. 4, p. 679–93, mar. 2014.

LU, R.-L. et al. Comparison of cytotoxic extracts from fruiting bodies, infected insects and cultured Mycelia of *Cordyceps formosana*. **Food Chemistry**, v. 145, p. 1066–71, 15 fev. 2014.

MACRAE, J. I. et al. The apicoplast: a key target to cure malaria. **Current pharmaceutical design**, v. 18, n. 24, p. 3490–504, jan. 2012.

MADUREIRA M.C, et al. Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S. Tomé and Príncipe Islands. **Ethno Pharmacology**, v. 81, p. 23–29, 2002.

MANDAL, S. Epidemiological aspects of *vivax* and *falciparum* malaria: global spectrum. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. Suppl 1, p. S13–S26, 2014.

MARIN, A. et al. Biosensores based on Surface Plasmon Resonance phenomenon: a theoretical review. **Phytoc. Reviews**, n. February, 2011.

MEDEIROS, P. S. DE M. et al. Enzyme Mechanism and Slow-Onset Inhibition of *Plasmodium falciparum* *Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase* by an Inorganic Complex. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 642758, jan. 2011.

MOHAPATRA, P. K. et al. Detection & molecular confirmation of a focus of *Plasmodium malariae* in Arunachal Pradesh, India. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 128, n. 1, p. 52–6, jul. 2008.

MUSABAYANE, C. T. et al. Arginine vasopressin mediates the chloroquine induced increase in renal sodium excretion. **Tropical Medicine & International Health : TM & IH**, v. 1, n. 4, p. 542–50, ago. 1996.

NOEDL, H. et al. Histidine-Rich Protein II : a Novel Approach to Malaria Drug Sensitivity Testing. **Antim. Agents and Chem. and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1658–1664, 2002.

NTIE-KANG, F. et al. The potential of anti-malarial compounds derived from African medicinal plants, part II: a pharmacological evaluation of non-alkaloids and non-terpenoids. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 81, jan. 2014.

OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. Malaria in Brazil : an overview Review. **Malaria Journal**, v. 9, p. 1–15, 2010.

PARKER, J. C. et al. Effects of Skyrin, a Receptor-Selective Glucagon Antagonist, in Rat and Human Hepatocytes. **Diabetes**, p. 2079–2086, 2000.

PEREIRA, M. R. et al. *In vivo* and *in vitro* antimalarial properties of azithromycin-chloroquine combinations that include the resistance reversal agent amlodipine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3115–24, jul. 2011.

PILLAI, S. et al. Functional characterization of *Beta-ketoacyl-ACP reductase* (FabG) from *Plasmodium falciparum*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 303, n. 1, p. 387–392, mar. 2003.

POHLIT, A. M. et al. Amazonian plant natural products: Perspectives for discovery of new antimalarial drug leads. **Molecules**, v. 18, n. 8, p. 9219–9240, 2013.

ROEPE, P. D. To kill or not to kill, that is the question: cytotoxic antimalarial drug resistance. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 3, p. 130–5, mar. 2014.

SCHRADER, F.C., et al. Novel Type II Fatty Acid Biosynthesis (FAS II) Inhibitors as Multistage Antimalarial Agents. **ChemMedChem**, v. 8, n. 3, p. 442–461, 2013.

SEGOVIA, M. Diagnóstico y tratamiento de la malaria : análisis de la cohorte de pacientes ingresados en un hospital terciario (1998-2010). v. 26, n. 1, p. 6–11, 2013.

SHAFREEN, R. B.; PANDIAN, S. K. Molecular modeling and simulation of FabG, an enzyme involved in the fatty acid pathway of *Streptococcus pyogenes*. **Journal of Molecular Graphics & Modelling**, v. 45, p. 1–12, set. 2013.

SILVA, R. G. et al. Mycobacterium tuberculosis *beta-ketoacyl-ACP reductase*: alpha-secondary kinetic isotope effects and kinetic and equilibrium mechanisms of substrate binding. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 471, n. 1, p. 1–10, 1 mar. 2008.

SUROLIA, A. et al. “FAS”t inhibition of malaria. **The Biochemical Journal**, v. 383, n. 3, p. 401–12, 1 nov. 2004.

TARANTO, A. G. et al. Estudos sobre o mecanismo da ação da Artemisinina e dos endoperóxidos, a mais nova classe de agentes antimaláricos -Parte I. **Rev. Libertato**, v. 34, n. 75, p. 47–58, 2006.

TASDEMIR, D. *Type II Fatty Acid Biosynthesis*, a New Approach in Antimalarial Natural Product Discovery. **Phytochemistry Reviews**, v. 5, n. 1, p. 99–108, 21 jun. 2006.

TUTEJA, R. Malaria - an overview. **The FEBS Journal**, v. 274, n. 18, p. 4670–9, set. 2007.

WHITE, N. J. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. **Clinical Infectious Diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 46, n. 2, p. 172–3, 15 jan. 2008.

WHO, W. H. O. malaria. **WORLD MALARIA REPORT**, p. 823, 2012.

WICKRAMASINGHE, S. R. et al. Kinetic, inhibition and structural studies on *3-oxoacyl-ACP reductase* from *Plasmodium falciparum*, a key enzyme in fatty acid biosynthesis. **The Biochemical Journal**, v. 393, n. Pt 2, p. 447–57, 15 jan. 2006.

WILSON, R. J. M. I. Parasite plastids: approaching the endgame. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 80, n. 1, p. 129–53, fev. 2005.

ZANCHI, F. B. et al. Molecular dynamics studies of a hexameric purine nucleoside phosphorylase. **Journal of Molecular Modeling**, v. 16, n. 3, p. 543–50, mar. 2010.

APÊNDICES

APÊNDICE I

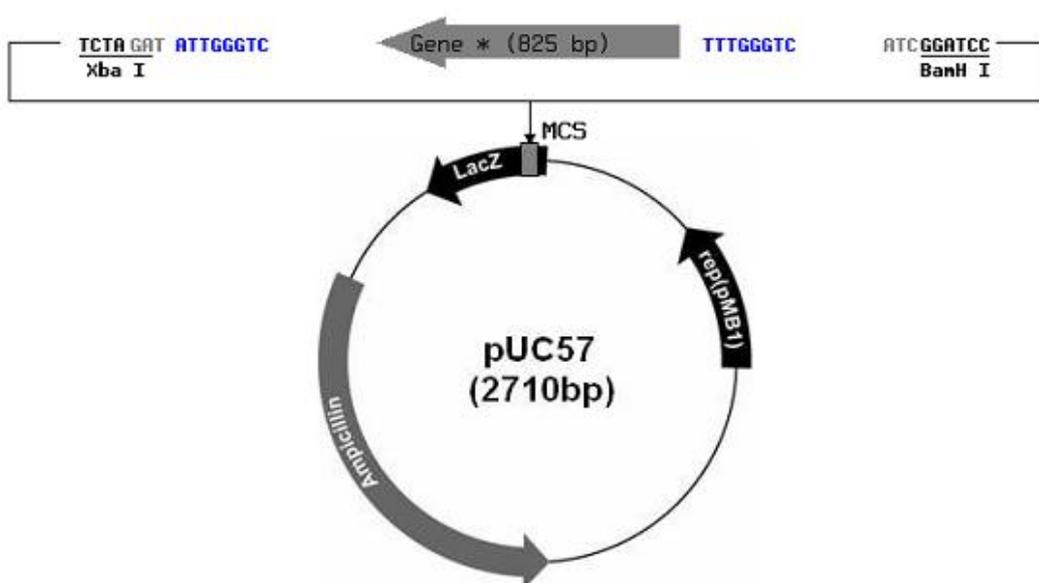


Your Innovation Partner in Drug Discovery!

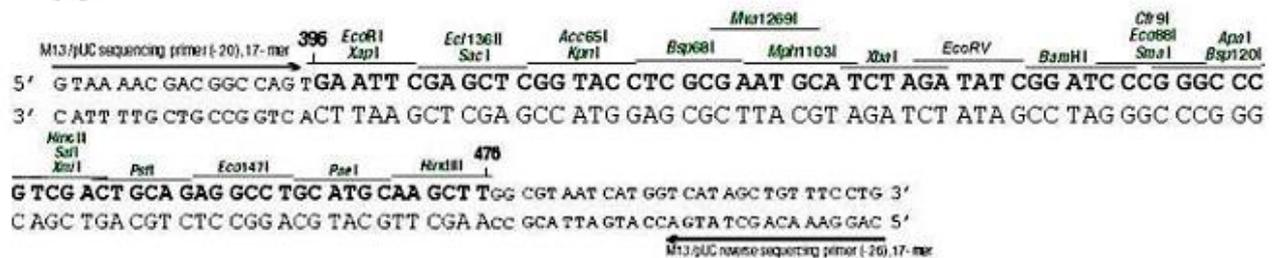
Plasmid Construct Map

Order ID: 123398-6 Gene Name: b β -Ketoacyl-ACP reductase (FabGorKAR) *The b β -Ketoacyl-ACP reductase (FabGorKAR) was cloned in pUC57 by EcoRV.

Blue sequences: Protective bases added by GenScript



MCS:



For research use only

860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, USA
 Tel: 1-732-885-9188 Fax: 1-732-210-0262 Email: info@genscript.com Web: www.genscript.com

APÊNDICE II



Your Innovation Partner in Drug Discovery!

Certificate of Analysis

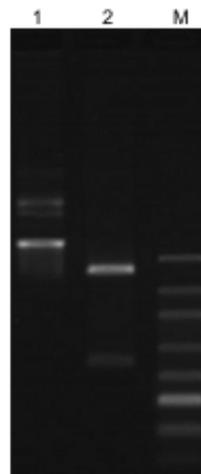
Project ID: 123398-6

Construct Information:

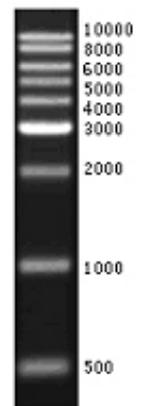
Gene Name: b β -Ketoacyl-ACP reductase (FabGorKAR)Gene Length: 825 bpCloning Vector: pUC57Cloning Strategy: EcoRVClone ID: T39425

QC Items	Specifications	Results
Sequencing Alignment	Sequencing results are consistent with the targeted insert sequence.	<input checked="" type="checkbox"/> Pass <input type="checkbox"/> Fail
Vector Sequence	The flanking sequences of the cloning site are correct.	<input checked="" type="checkbox"/> Pass <input type="checkbox"/> Fail
Reading Frame	<input checked="" type="checkbox"/> Not requested <input type="checkbox"/> Frame is correct and consistent with client's requirement.	<input checked="" type="checkbox"/> Pass <input type="checkbox"/> Fail
Restriction Digests	The size of inserted fragment is right and free of any contaminated bands.	<input checked="" type="checkbox"/> Pass <input type="checkbox"/> Fail
PCR Amplification	Amplification is correct and construct is free of any contaminated bands.	<input checked="" type="checkbox"/> Pass <input type="checkbox"/> Fail
DNA Quality	<input checked="" type="checkbox"/> Miniprep: 4 μ g, OD260/280=1.7~2.0 <input type="checkbox"/> Maxiprep: 100 μ g, OD260/280=1.8~2.0 Free of contamination.	<input checked="" type="checkbox"/> Pass <input type="checkbox"/> Fail
Appearance	Clear and free of foreign particles.	<input checked="" type="checkbox"/> Pass <input type="checkbox"/> Fail
Additional Test		

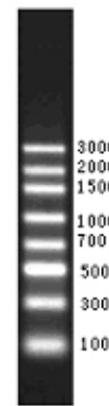
QC Results:



Lane M: DL3000
Lane 1: 123398-6 plasmid
Lane 2: 123398-6 plasmid digested
by KpnI and PstI



KB Ladder
of GenScript



DL3000
of GenScript

Certified by: *Catherine* Date: 02/24/2011

Thank you for your patronage to our Gene services! To maintain this working relationship, we shall be grateful if you can add our webpage URL into your lab website. As a token of appreciation, you will be rewarded by 1,000 EZcoupon™ points. For more information, please contact us by e-mail at web@genscript.com.

For research use only

860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, USA

Tel: 1-732-885-9188

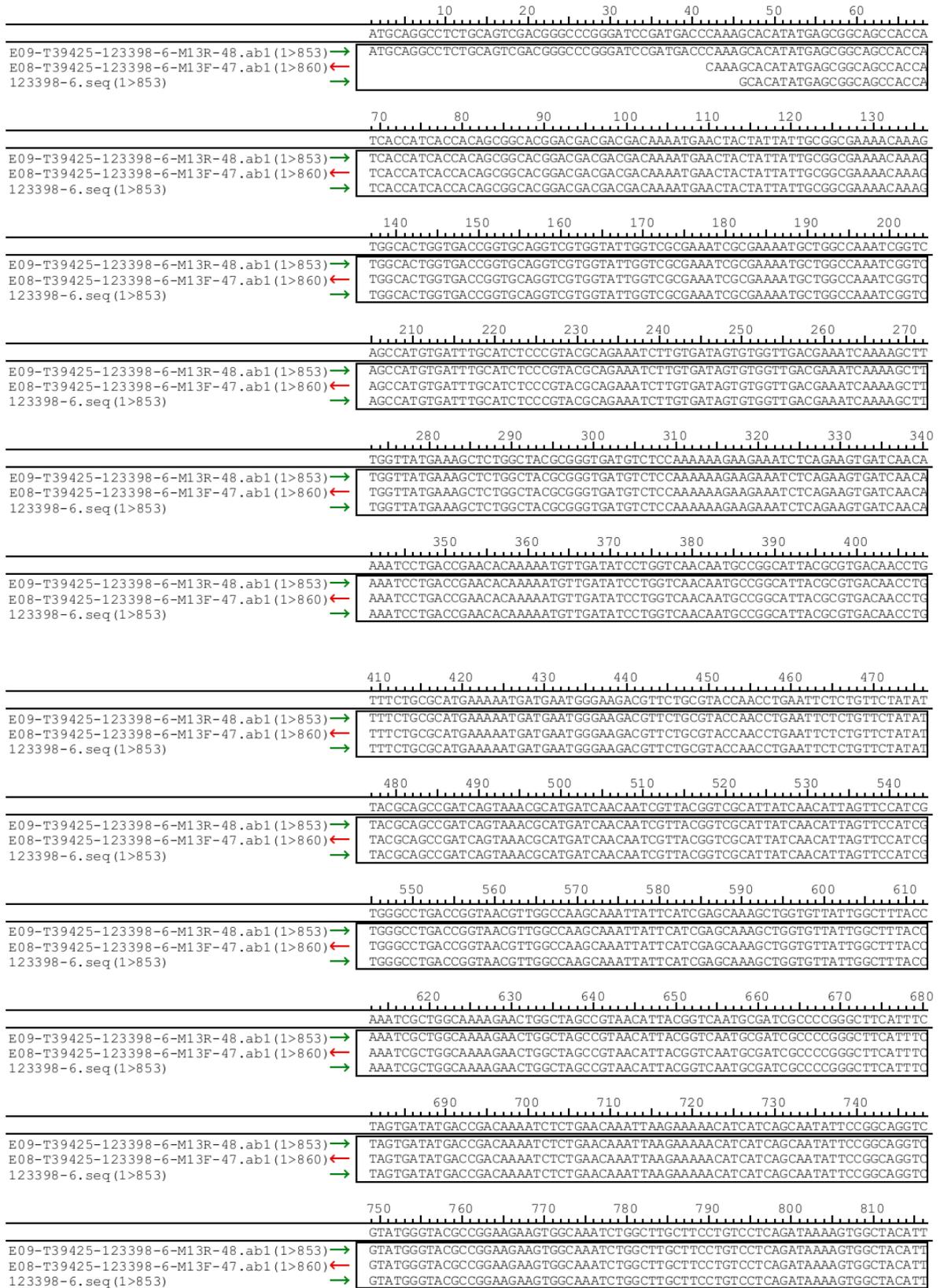
Fax: 1-732-210-0262

Email: info@genscript.comWeb: www.genscript.com

APÊNDICE III

Wednesday, February 23, 2011 4:24 PM
Project: 20110223032322123398-6[1].SQD Contig 1

Page 1

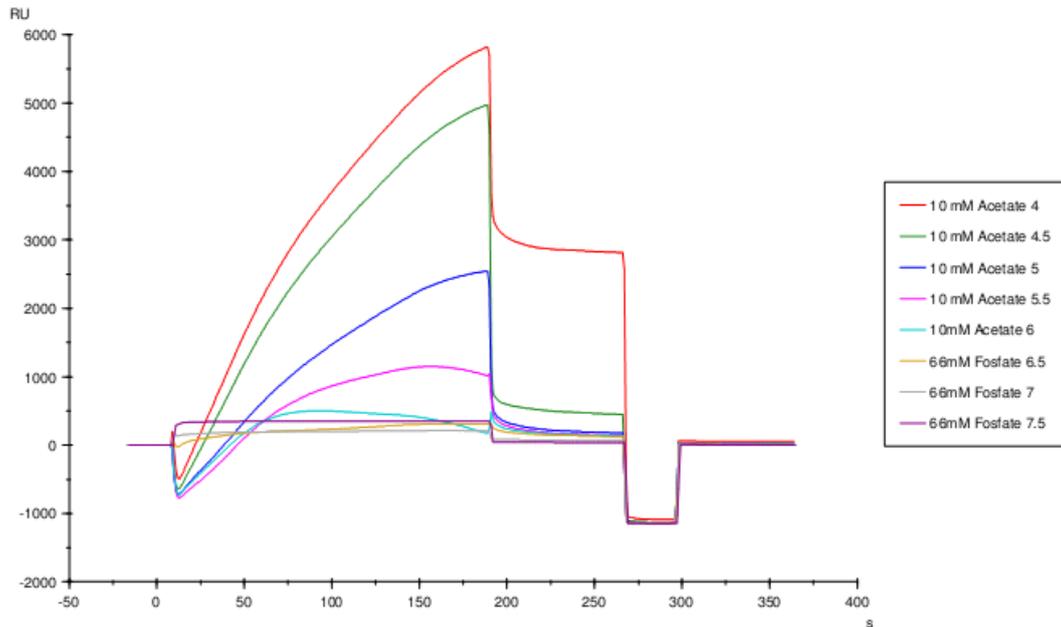


	820 830 840 850 860 870 880
	AACGGTCGTGCTTCGTGATTGATGGTGGTCTGTCCCCGTGAGCGGCCGCTAGGGACCAATATCTAG
E09-T39425-123398-6-M13R-48.ab1 (1>853) →	AACGGTCGTGCTTCGTGATTGATGGTGGTCTGTCCCCGTGAGCGGCCGCTAGGGACCAATATCTAG
E08-T39425-123398-6-M13F-47.ab1 (1>860) ←	AACGGTCGTGCTTCGTGATTGATGGTGGTCTGTCCCCGTGAGCGGCCGCTAGGGACCAATATCTAG
123398-6.seq (1>853)	AACGGTCGTGCTTCGTGATTGATGGTGGTCTGTCCCCGTGAGCGGCCGCTAGG

	890 900
	ATGCATTCGCGAGGTAC
E08-T39425-123398-6-M13F-47.ab1 (1>860) ←	ATGCATTCGCGAGGTAC

APÊNDICE IV

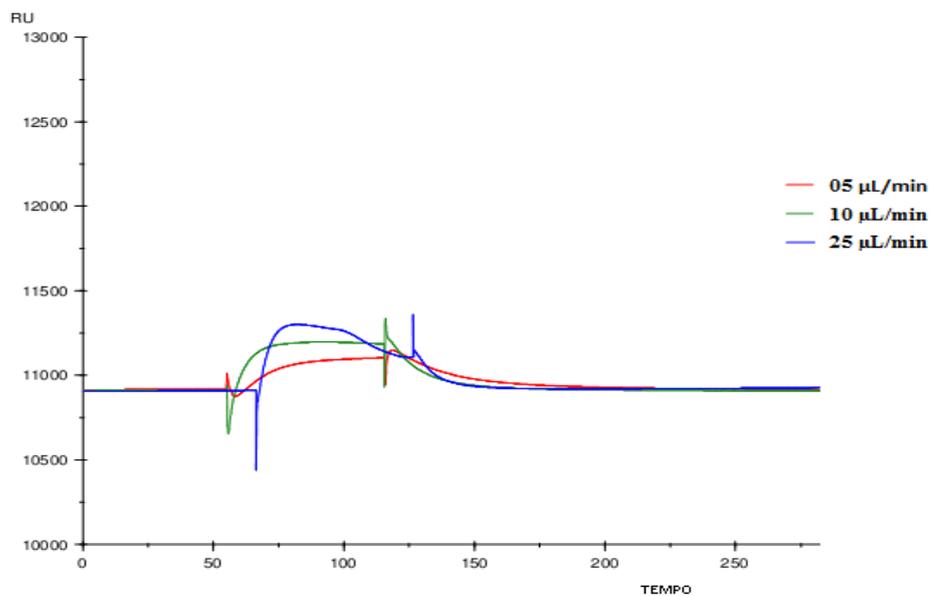
Sensorgrama da determinação das condições de imobilização (*pH Scouting*)



Ensaios de pré-concentração e escalonamento de pH ao ligante *PfOAR*, realizado em *sensor chip* serie S tipo CM5, utilizando fluxo de 5 μ L/mim

APÊNDICE V

Sensorgrama representativo do fluxo do transporte da molécula sintética Skyrin.



Sensorgrama do fluxo do transporte da molécula Skyrin [62,5 μ M] no chip imobilizado com a enzima β -acetoacil ACP redutase (*OAR*) em 9079RU.