



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS**

Glaécia Aparecida do Nascimento Pereira

**ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL E MODELAGEM
MOLECULAR DE NOVAS CHALCONAS E DERIVADOS.**

**BELÉM
2008**

Glaécia Aparecida do Nascimento Pereira

**ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL E MODELAGEM
MOLECULAR DE NOVAS CHALCONAS E DERIVADOS.**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Doenças Tropicais. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará

Orientadores: Prof. Dr. Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro
Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento

BELÉM

2008

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical

Pereira, Gláécia Aparecida do Nascimento Pereira

Atividade antiplasmodial e modelagem molecular de novas chalconas e derivados / Gláécia Aparecida do Nascimento Pereira; orientadores, Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro, José Luiz Martins do Nascimento. – 2009.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical, Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, Belém, 2009.

1. Chalconas. 2. Atividade Antiplasmodial. I. Título.

CDD: 21. ed. : 579.47

Glaécia Aparecida do Nascimento Pereira

**ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL E MODELAGEM
MOLECULAR DE NOVAS CHALCONAS E DERIVADOS.**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Doenças Tropicais. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro (Orientador)
Laboratório de Pesquisas em Malária, IOC/FIOCRUZ

Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento (Orientador)
Laboratório de Neuroquímica Molecular e Celular / Instituto de Ciências
Biológicas, UFPA

Prof. Dr. Davi do Socorro Barros Brasil
Faculdade de Engenharia Química/ Instituto de Tecnologia, UFPA

Prof. Dr. Evander de Jesus Oliveira Batista
Núcleo de Medicina Tropical, UFPA

Prof. Dr. José Luiz Fernandez Vieira
Núcleo de Medicina Tropical, UFPA

Aos meus pais, *Rosimeire e José*, aos meus irmãos, *Laércio, Laerton e Laerth*, e às minhas sobrinhas, *Marianna e Tatianna*, que iluminaram os caminhos com afeto e dedicação, para que eu os trilhassem com dignidade, coragem e cheia de esperanças e sonhos. Pela espera e compreensão durante minha longa ausência.

Ao companheiro ímpar e infalível dos momentos de conquistas e de desânimo. Que, por vezes, demonstrou seu carinho, renunciando seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Que entre sorrisos e lágrimas, aplaudiu minhas vitórias e acalentou minhas tristezas. Ao cúmplice de uma grande construção pessoal, *Marcelino Santos*.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu maior tesouro, que iluminou meus caminhos e me proporcionou lições de vida valiosas.

Ao meu orientador o Prof. Dr. Cláudio Daniel Tadeu-Ribeiro, pela orientação e ensinamentos singulares, pela confiança em mim depositada e pelas oportunidades, pela paciência e amizade zelosa demonstradas desde o início do mestrado, meus eternos e sinceros agradecimentos.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento, pela sua orientação e, principalmente, por estar sempre preocupado e empenhado a me ajudar na minha formação científica.

Ao Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira, do NMT – UFPA, por estar sempre sensível e disponível aos meus chamados. Pela amizade sincera e franca que me conduziu aos caminhos certos durante essa jornada, serei eternamente grata.

Ao Prof. Cláudio Nahum Alves, do LPDF/ Faculdade de Química – UFPA, que me acolheu como uma orientanda sua e sempre me ajudou neste trabalho e na minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Rosivaldo dos Santos Borges, do LQF/ Faculdade de Farmácia – UFPA, pelo companheirismo, pelo conhecimento a mim transmitido com tanto empenho e pela amizade de todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Heriberto Rodrigues Bitencourt, do LSO/ Faculdade de Química – UFPA, pela concessão dos derivados de chalconas para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Evander Batista, do NMT – UFPA, pelos conselhos, pela amizade e pelo companheirismo a mim nunca negados.

À Dra. Lilian Pratt Riccio, do LPM/ IOC – Fiocruz, pela colaboração fundamental na realização dos ensaios biológicos.

À Prof. Dra. Rosana Maria Feio Libonati, do NMT – UFPA, pela imprescindível colaboração na análise estatística e pela amizade que certamente está além dessas páginas.

À Dra. Ana Maria Revêredo Ventura, do Programa de Ensaios Clínicos em Malária – IEC, pelo companheirismo e pelas palavras que só poderiam vir de uma amiga.

À Dra. Dalma Maria Banic, do LPM/ IOC - Fiocruz, pela valiosa contribuição na revisão da dissertação.

À Cláudia Castro, secretária do LPM/ IOC - Fiocruz, pela incansável colaboração e pela sensibilidade nos momentos mais difíceis.

Às minhas amigas, Tânia Mara, Margareth Nascimento, Marina Santos, Larissa Borges, Kariane Mendes e Daniella Araújo, que sempre estiveram do meu lado em todos os momentos, torcendo pelo meu sucesso. Às minhas irmãs por opção, que com tanto carinho, cumplicidade, companheirismo e amizade a mim dedicados, ajudaram-me a vencer obstáculos importantes durante a realização deste trabalho e por sempre torcer pelo meu sucesso pessoal e profissional.

Às amigas de longas datas, Márcia Smith e Ana Paula Paiva, por compreender a inevitável ausência durante o mestrado, pelo carinho e por estarem sempre solidárias e dispostas a ajudar, meus sinceros agradecimentos.

Aos meus amigos de mestrado, Flávia Endres, Gisele Macêdo e Miguel Pinheiro, pelo companheirismo, carinho e força nas nossas aulas de mestrado.

Às amigas, Graça Vilhena e Valdenira Moreira, pelo carinho, pela força e por estarem sempre dispostas a me ajudar.

Ao amigo, Prof. Dr. Habib Fraiha Neto, do NMT – UFPA, pelos conselhos e palavras de incentivo e pela grande carinho a mim dedicado.

Aos amigos do LPM/ IOC – Fiocruz, em especial, Vitor Vidal e Elizângela Chagas, que foram de fundamental importância na realização dos ensaios biológicos.

Aos amigos do LPDF/ Faculdade de Química – UFPA, pela disposição e colaboração na realização deste trabalho.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa.

A autoconfiança do “Guerreiro” não é como a autoconfiança do homem comum. O homem comum procura certeza aos olhos do observador e chama isso de autoconfiança. O “Guerreiro” procura impecabilidade aos próprios olhos e chama isso de humildade. O homem comum está preso aos seus semelhantes, enquanto que, o “Guerreiro” só está preso ao infinito dos seus próprios objetivos.

Juan Matus

RESUMO

A malária é uma infecção causada pelo *Plasmodium* sp. e pode ser grave, se não tratada precocemente. Ela acomete importante fração da humanidade e tem profundo impacto sanitário mundial. Estima-se que 3,3 bilhões de pessoas estejam expostas ao risco de transmissão. Um dos problemas inerentes à infecção é o progressivo aumento da resistência do parasito aos antimaláricos. Nesse contexto, fazem-se necessários estudos para o desenvolvimento de novas alternativas quimioterápicas. Muitas substâncias têm atividade antiplasmodial comprovada, como as chalconas. Entretanto, as propriedades físico-químicas dessas moléculas, que são importantes para suas ações biológicas, não estão bem estabelecidas. Neste trabalho, foi realizada a modelagem molecular e avaliada a atividade antiplasmodial de duas chalconas (HBR1 e LH2) e quatro derivados de chalconas (GH3, IV4, LCH1 e LCH3). Para isso, foram determinadas: as concentrações inibitórias em 50% do crescimento do *P. falciparum in vitro* e as propriedades físico-químicas das substâncias, como HOMO, LUMO, potencial eletrostático, C log P, energia de hidratação, polarizabilidade e volume molecular, através de cálculos virtuais. Os resultados dos valores calculados foram correlacionados com a atividade biológica, a fim de se identificar parâmetros químicos que possam influenciar a ação antiplasmodial. As concentrações inibitórias em 50% do crescimento do *P. falciparum* variaram de 0,2 a 1,7 μM , sendo que estes valores foram menores do que os descritos na literatura. O estudo da correlação entre as atividades biológicas e as propriedades físico-químicas mostraram parâmetros determinantes de atividade biológica, como LUMO, potencial eletrostático, C log P e energia de hidratação, que podem auxiliar na seleção de moléculas mais ativas contra o *P. falciparum*. Assim, essas propriedades moleculares podem ser utilizadas no planejamento racional de novas chalconas e/ou derivados com atividade antiplasmodial.

Palavras-chave: chalconas, cultivo *in vitro*, *P. falciparum*, atividade antiplasmodial, modelagem molecular.

ABSTRACT

Malaria is an infection caused by *Plasmodium* sp. and It can be serious, if not treated precociously. It affects significant fraction of humanity and has profound health impact worldwide. It is estimated that 3.3 billion people are exposed to the risk of transmission. One of the problems of the infection is the growing emergence of parasite resistance to antimalarial drugs. In this context, studies are needed to develop new alternative chemotherapy. Many substances, such as the chalcones, have had their antiplasmodial activity proven. However, the physicochemical properties of these molecules, which are important for biological actions, are not well established. In this work, molecular modeling was performed and the antiplasmodial activity was evaluated of two chalcones (HBR1, and LH2) and four derivatives of chalcones (GH3, IV4, LCH1, and LCH3). For that, we determined the drug concentration inhibitory of 50% of the growth of *P. falciparum in vitro* as well as the physicochemical properties of derivatives of chalcones as HOMO, LUMO, electrostatic potential, C log P, hydration energy, polarizability and molecular volume through virtual calculations. The results of the calculated values were correlated with the biological activity in order to identify chemical parameters that can influence the antiplasmodial action. The inhibitory concentrations in 50% of the growth of *P. falciparum* ranged from 0,2 to 1,7 μM , and these values were smaller than described them in the literature. The study of the correlation between the biological activities and the physicochemical properties showed determining parameters for the biological activity, as LUMO, electrostatic potential, C log P and hydration energy, which may help in the selection of molecules more active against *P. falciparum*. Thus, these molecular properties can be used in the rational planning of new chalcones and/or derivatives with antiplasmodial activity.

Keywords: chalcones, culture *in vitro*, *P. falciparum*, antiplasmodial activity, molecular modeling.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Risco de transmissão da malária no mundo no ano de 2006.....	23
Figura 2. Risco de transmissão de malária projetado para o ano de 2020.....	23
Figura 3. Mapa de risco de transmissão na Amazônia Legal, 2007.....	24
Figura 4. Evolução do número de casos de malária por espécies no Brasil, 1960 a 2007.....	25
Figura 5. Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> spp. causador de malária em humanos.....	29
Figura 6. Classificação dos antimaláricos segundo a forma evolutiva alvo de ação do <i>Plasmodium</i> spp.....	33
Figura 7. Mecanismos propostos de ação da cloroquina no plasmódio.....	34
Figura 8. Esquema do mecanismo de ação da Quinina no vacúolo alimentar.....	35
Figura 9. Resistência do <i>P. falciparum</i> e falha terapêutica, pelo uso de cloroquina nas infecções por <i>P. vivax</i> , observada em locais sentinelas até o ano de 2004.....	37
Figura 10. Esquema da via metabólica de formação da L-lactato no <i>Plasmodium</i> spp.....	41
Figura 11. Mapa do potencial eletrostático da molécula de água.....	43
Figura 12. Equação para cálculo do coeficiente de partição óleo/água.....	43
Figura 13. Rota sintética de chalconas.....	45
Figura 14. Estrutura molecular da Licochalcona A.....	46
Figura 15. Estrutura molecular de derivados de chalconas.....	46
Figura 16. Estruturas moleculares de derivados naturais de chalconas.....	47
Figura 17. Estrutura molecular do Xantohumol.....	47
Figura 18. Estrutura molecular de derivados alcoiladas de chalconas.....	48
Figura 19. Estrutura molecular de derivadas hidroxiladas de chalconas.....	49
Figura 20. Estrutura molecular de derivados sulfonamidas de chalconas.....	50
Figura 21. Estrutura molecular da 2,4-dimetoxi-4'-butoxichalcona.....	51

Figura 22. Estrutura molecular da série de derivados 4'-fenilurenil e 3'-fenilurenil substituídos no anel A da chalcona.....	52
Figura 23. Estrutura molecular de bischalconas. n= 1,3,4,6; R= 3,4-(OCH ₃) ₂ ou 3-OCH ₃ ou 2,4-(OCH ₃) ₂	53
Figura 24. Estrutura molecular da 4-hidroxi-chalcona relacionada.....	54
Figura 25. Estruturas moleculares em duas dimensões dos derivados das chalconas em estudo.....	55
Figura 26. Equação para cálculo de concentração parasitária em porcentagem.....	57
Figura 27. Placa de ELISA para teste de quimiossensibilidade de <i>P. falciparum</i> em cultura.....	59
Figura 28. Equação para cálculo da densidade ótica na concentração inibitória em 50%.....	61
Figura 29. Orbitais de fronteira (HOMO e LUMO) dos derivados de chalconas em estudo.....	69
Figura 30. Estrutura molecular em três dimensões e mapa de potencial eletrostático dos derivados de chalconas em estudo.....	70
Figura 31. Sistema de Michael.....	76
Figura 32. Estrutura molecular das chalconas, LCH1 e LCH3.....	77
Figura 33. Duas potenciais orientações de ligações da chalcona no sítio de interação da protease de cisteína de <i>Plasmodium falciparum</i> , baseada em estudos de DOCK.....	78
Figura 34. Estrutura molecular das chalconas com menor concentração inibitória (IC ₅₀ = 0,20).....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Implantação da terapia de combinação com Artemisinina – ACT.....	26
Tabela 2. Classificação dos antimaláricos quanto ao grupo químico.....	33
Tabela 3. Gráficos de inibição, e respectivas concentrações inibitórias em 50% (IC ₅₀) do crescimento do <i>P. falciparum</i> expressos em densidade ótica (DO) da PfLDH obtidas com diferentes concentrações das substâncias ativas (chalconas e controles, cloroquina e mefloquina) nos dois experimentos realizados.....	63
Tabela 4. Concentrações inibitórias mínimas em 50% do crescimento do <i>P. falciparum</i> (IC ₅₀) dos derivados de chalconas, cloroquina e mefloquina, expressos em micromolar (μM).....	66
Tabela 5. Correlação entre os valores dos orbitais de fronteira (HOMO e LUMO) das chalconas e suas respectivas IC ₅₀	67
Tabela 6. Correlação entre os valores do coeficiente de partição octanol/água das chalconas e suas respectivas IC ₅₀	71
Tabela 7. Correlação entre os valores de energia de hidratação das chalconas e suas respectivas IC ₅₀	72
Tabela 8. Correlação entre os valores da polarizabilidade das chalconas e suas respectivas IC ₅₀	73
Tabela 9. Correlação dos valores de volume molecular e IC ₅₀ das chalconas.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

μg	Micrograma(s)
μl	Microlitro(s)
μM	Micromolar(s)
APAD	3-Acetil piridina adenina dinucleotídeo
ASMQ	Artemisinina-Mefloquina
ATC	Artemisinin-based combination therapies
BSA	Bovine serum albumin
C log P	Coefficiente de partição octanol/água
C_{aqu}	Concentração da substância na fase aquosa
C_{org}	Concentração da substância na fase orgânica
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DELI	Double-site enzyme linked immunodetection
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNDi	Drugs for Neglected Diseases Initiative
DO	Densidade ótica
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz.
g	Gravidade
h	Hora(s)
HD	Hardware
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid, N-(2-Hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)
HIV	Human immunodeficiency virus
HOMO	Highest occupied molecular orbital
IBEX	Instituto de Biologia do Exército
IC_{50}	Concentração inibitória em 50%
IEC	Instituto Evandro Chagas
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IPA	Índice parasitário anual
kg	Kilograma(s)
LDH	Lactato desidrogenase
LPDF	Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos
LPM	Laboratório de Pesquisas em Malária

LSO	Laboratório de Síntese Orgânica
LUMO	Lowest occupied molecular orbital
M	Molar
mAbs	Monoclonal antibodies
MEP	Molecular electrostatic potential
mg	Miligrama(s)
mg/L	Miligrama por litro
MHz	Megahertz
min	Minuto(s)
ml	Mililitro(s)
mM	Milimolar
MS	Ministério da Saúde
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
nm	Nanômetro(s)
NMT	Núcleo de Medicina Tropical
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPS	Organização Pan Americana da Saúde
PABA	Ácido <i>p</i> -aminobenzóico
PBS	Phosphate buffered saline
<i>Pf</i> LDH	<i>P. falciparum</i> Lactate dehydrogenase
pH	Potencial hidrogeniônico
pLDH	Lactato desidrogenase de <i>Plasmodium</i> spp.
PVC	Policloreto cloreto de vinila
QSAR	Quantitative structure-activity relationship
RAVREDA	Rede Amazônica de Vigilância da Resistência aos Antimaláricos
Rh+	Fator <i>Reshus</i> positivo
rs	Coefficiente de correlação de Spearman
SAR	Structure-activity relationship
SIVEP	Sistema de Vigilância Epidemiológica
SOD	Superóxido dismutase
SOD <i>Pf</i>	Superóxido dismutase de <i>P. falciparum</i>
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	20
2.1. OBJETIVO GERAL.....	20
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3. REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1. MALÁRIA.....	21
3.1.1. Considerações gerais.....	21
3.1.2. Epidemiologia da infecção.....	22
3.1.3. Ciclo evolutivo do <i>Plasmodium</i> spp.....	27
3.2. FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS.....	30
3.2.1. Histórico.....	30
3.2.2. Considerações gerais sobre os principais antimaláricos.....	32
3.3. RESISTÊNCIA DO <i>Plasmodium</i> spp A ANTIMALÁRICOS.....	36
3.3.1. Epidemiologia da resistência.....	36
3.3.2. Combinação terapêutica.....	38
3.4. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE ANTIMALÁRICA ÀS DROGAS.....	39
3.4.1. Avaliação <i>in vitro</i> da sensibilidade do parasito às drogas.....	40
3.4.2. Modelagem Molecular de Drogas.....	42
3.5. CHALCONAS.....	45
3.5.1. Atividade antimalárica de chalconas.....	45

4. MATERIAL E MÉTODOS.....	55
4.1. DERIVADOS DE CHALCONAS.....	55
4.2. DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE <i>in vitro</i> DO <i>Plasmodium falciparum</i> ÀS DROGAS.....	56
4.2.1. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>P. falciparum</i>	56
4.2.2. Sincronização das formas evolutivas.....	57
4.2.3. Diluição das drogas.....	58
4.2.4. Ensaio farmacológico.....	58
4.2.5. Deli-teste.....	60
4.2.6. Cálculo da concentração inibitória em 50% do crescimento parasitário (IC ₅₀).....	61
4.3. MODELAGEM MOLECULAR DOS DERIVADOS DE CHALCONAS.....	61
5. RESULTADOS.....	63
5.1. ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL (<i>in vitro</i>) DAS CHALCONAS.....	63
5.2. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS TEÓRICAS DAS CHALCONAS.....	66
5.2.1. Parâmetros eletrônicos.....	67
5.2.2. Parâmetros estéricos.....	71
6. DISCUSSÃO.....	74
6.1. ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL (<i>in vitro</i>) DAS CHALCONAS.....	74
6.2. CORRELAÇÃO ENTRE PROPRIEDADES QUÍMICAS TEÓRICAS E ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL DAS CHALCONAS.....	75
6.2.1. Propriedades eletrônicas.....	75
6.2.2. Propriedades estéricas.....	79
7. CONCLUSÕES.....	82
REFERÊNCIAS.....	83

1. INTRODUÇÃO

A malária representa uma das principais endemias no mundo, sendo responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade em mais de 102 países tropicais. A infecção é, ainda hoje, considerada um grande obstáculo ao desenvolvimento econômico de comunidades e nações. No Brasil, a Amazônia Legal é a região de maior transmissão da doença, concentrando quase a totalidade (mais de 99%) dos casos do país (WHO, 2008).

Muitos programas foram executados na tentativa de erradicar e, posteriormente, controlar a infecção. Nos anos 60, a principal ênfase foi dada ao controle do vetor, principalmente, através da utilização de inseticidas, como o DDT. No entanto, com o surgimento da resistência do mosquito a essa substância, a medida não foi mais satisfatória. A assistência terapêutica aos doentes, que era tomada como atividade complementar, ganhou maior importância no controle epidemiológico. Hoje, a quimioterapia comanda a linha de frente no combate à malária e as drogas antimaláricas têm, em muitos países, destaque como medida de controle da infecção (DIALLO et al, 1999).

As quinoleínas são os antimaláricos mais comumente empregados nos esquemas terapêuticos e, desde sua descoberta, são usados no mundo todo. Essa classe de fármaco adquiriu tal importância que o seu consumo se equivale ao dos antipiréticos em muitas áreas tropicais do mundo (WHITE, 2004). Entretanto, o advento da resistência aos antimaláricos, sobretudo à quinina e à cloroquina (WELLEMS; PLOWE, 2001; AHLM; WISTROM; CARLSSON, 1996; POTKAR; KSHIRSAGAR; KATHURIA, 1995) inseriu o controle da infecção em um preocupante cenário epidemiológico.

Atualmente, a multirresistência do *P. falciparum* aos antimaláricos e as evidências de perda da sensibilidade do *P. vivax* (WHITE, 2004) à cloroquina tornaram-se obstáculos relevantes à política de controle da infecção. Além disso, o futuro da quimioterapia antimalárica pode estar comprometido com o crescente surgimento da resistência cruzada entre as quinoleínas, à qual pertence à cloroquina. Assim, a necessidade de substâncias eficazes e estruturalmente distintas dessa classe farmacológica é evidente (BRASIL/MS/FUNASA/CENEPI, 2001).

Muitas classes de substâncias mostraram-se eficazes contra o parasito. Algumas delas chegaram a medicamentos e são aplicadas na terapêutica convencional. Outras moléculas se revelaram ativas *in vitro* e/ou *in vivo*, mas não conseguiram reunir as propriedades necessárias para se caracterizar como um medicamento. As chalconas compõem uma classe química de substâncias que tem demonstrado excelente atividade antiplasmodial, sendo então um protótipo promissor para o estudo de novas chalconas. Elas são encontradas naturalmente em muitas espécies de plantas rasteiras ou arbóreas (DIXON; STEEL, 1999) e apresentam diversas ações farmacológicas, como antibacteriana, leishmanicida, antiinflamatória, entre outras (TODA; TANAKA; HAMAI, 1990). Dentre as modificações nas chalconas, os substituintes mais promissores quanto à ação antiplasmodial foram os metoxilados e halogenados (LIU et al, 2001). Apesar da comprovada atividade das chalconas contra o plasmódio, substâncias ativas e seguras para o organismo não foram obtidas. Diante disso, estudos para um melhor conhecimento da ação farmacológica das chalconas sobre o plasmódio ainda são necessários.

Hoje, ferramentas importantes são aplicadas para a avaliação de substâncias com potencial atividade farmacológica, como os testes biológicos e as simulações virtuais. Elas foram desenvolvidas na tentativa de prever resultados de atividade farmacológica e, assim, diminuir o custo e o tempo do processo de descoberta de novos fármacos. Uma das técnicas virtuais que permite o cálculo de propriedades essenciais a uma molécula para uma determinada atividade biológica é a modelagem molecular. Esse método pode detectar, precocemente, futuros problemas que a substância pode trazer ao organismo e permite orientar a pesquisa na direção de moléculas com maior potencial terapêutico (TROULLIER et al, 2002; COLLINS et al, 2003; HANSCH et al, 2004).

A modelagem molecular também pode ser utilizada como técnica complementar na obtenção de uma molécula mais potente a partir de um protótipo de atividade biológica estabelecida. Assim, inúmeras pesquisas são realizadas a partir de uma estrutura química base e são sintetizadas novas substâncias que podem conferir, além de uma melhor ação biológica, uma maior seletividade de ação, maior biodisponibilidade ou, ainda, menor toxicidade ao organismo (CARVALHO et al, 2003).

Assim, neste estudo, foram avaliados seis chalconas metoxiladas ainda não testadas contra o plasmódio. O efeito antiplasmodial das moléculas propostas foi obtido através da avaliação das concentrações inibitórias em 50% (IC₅₀) do crescimento do *P.*

falciparum em cultura *in vitro*. Além disso, foram realizados cálculos, através da modelagem molecular, de propriedades químicas importantes para a atividade antiplasmodial. Os dados das IC_{50} e os parâmetros físico-químicos das chalconas foram correlacionados estatisticamente como uma proposta de obtenção de dados químicos determinantes para a ação farmacológica dessa classe de substâncias, a fim de estabelecer quais características químicas que as chalconas necessitam ter para uma boa ação antiplasmodial e, assim, servir de modelo para a síntese de possíveis compostos mais ativos farmacologicamente.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar a atividade antiplasmodial de novas chalconas em cultivo *in vitro* de *P. falciparum*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar, através de cálculos teóricos, as propriedades físico-químicas das chalconas;
- Determinar o perfil de inibição de 50% do crescimento do *P. falciparum in vitro*;
- Correlacionar os parâmetros físico-químicos teóricos das chalconas com a atividade biológica obtida.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. MALÁRIA

3.1.1. Considerações gerais

A malária é uma infecção sistêmica, causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida entre os humanos por vetores invertebrados do gênero *Anopheles*. Clinicamente, ela é caracterizada pela tríade sintomática: febre, calafrio e cefaléia.

A palavra ‘malária’ surgiu na Itália no século XVII, onde casos de febre foram atribuídos ao “mau ar” (mal’aria) dos pântanos. O protozoário convive com o homem provavelmente há muitos séculos, mas foi Hipócrates o primeiro a descrever as manifestações da doença e relacioná-las à estação do ano e ao local onde ocorria a transmissão. Em 1880, Laveran identificou pela primeira vez o protozoário causador da infecção (BRUCE-CHWATT, 1980).

Existem cerca de 120 espécies de plasmódios, incluindo 22 parasitos de primatas, 19 de roedores, morcegos e outros mamíferos e, em torno, de 70 outras espécies que infectam aves e répteis. Apenas cinco espécies podem infectar naturalmente, desenvolver-se e causar doença em humanos (CHAVATTE et al, 2007):

- *Plasmodium (Plasmodium) malariae*, a primeira espécie de plasmódio humano descrito, descoberta em 1881, por Laveran;
- *Plasmodium (Plasmodium) vivax*, descrito por Grassi & Feletti, em 1890;
- *Plasmodium (Laverania) falciparum*, descrito por Welch, em 1897;
- *Plasmodium (Plasmodium) ovale*, descrito por Stephens, em 1922, não sendo esta espécie transmitida no Brasil;
- *Plasmodium (Plasmodium) knowlesi*, descrito por Knowles & Das Gupta, em 1931, como uma espécie infectante em símios e por Singh e colaboradores em 2004 à infecção natural e malária grave em humanos, na Malásia.

Em 1902, Ross ganhou o Prêmio Nobel de Medicina ao demonstrar que o mosquito do gênero *Anopheles* é o vetor do parasito (BRUCE-CHWATT, 1980). Apenas as fêmeas, quando infectadas e infectantes, são responsáveis pela transmissão, pois precisam do sangue para o amadurecimento de seus óvulos. Existem cerca de 400 espécies de anofelinos, no entanto, apenas 60 destas podem ser vetores de plasmódios que causam malária humana (REY, 2001). No Brasil, os mais importantes vetores são: o *Anopheles (N.) darlingi*, principal responsável pela transmissão na maior parte do território nacional, e o *Anopheles (N.) aquasalis*, mais importante no litoral (TAUIL, 2005).

3.1.2. Epidemiologia da infecção

É, talvez, a mais antiga, distribuída e conhecida infecção parasitária que acomete o homem e, até hoje, é considerada um grave problema de saúde pública no mundo. A Organização Mundial de Saúde estima que haja 247 milhões (189-327 milhões) de casos de malária por ano no mundo (WHO, 2008). Só no Brasil, meio milhão de pessoas por ano contraem a doença (BRASIL/MS/SVS, 2008).

A infecção adquiriu particular importância devido à sua extensa distribuição geográfica e à sua atuação como fator limitante do crescimento demográfico, cultural e econômico em vastas áreas do globo (BRASIL/MS/SVS, 2008).

Em torno de 3,3 bilhões de pessoas, metade da população mundial, vivem em áreas de risco de transmissão da malária, sendo, mais de um terço deste valor, habitantes de áreas de alto risco (Figura 1). O aumento do risco de transmissão e a formação de novas áreas endêmicas, como as Regiões Temperadas, podem ser conseqüências do aquecimento global. A figura 2 ilustra o possível cenário de risco de transmissão da malária projetado para o ano de 2020 baseando-se no aumento de 1,1°C na temperatura global e na ausência de políticas de controle da infecção. No mapa, o risco de transmissão com a mudança de temperatura observada foi notável em algumas regiões da África, favorecendo a ocorrência de várias epidemias. Percebe-se a possibilidade do aumento dramático das condições de transmissão nas regiões orientais da Europa e dos Estados Unidos (MARTENS; ROTMANS; ROTHMAN, 2002).

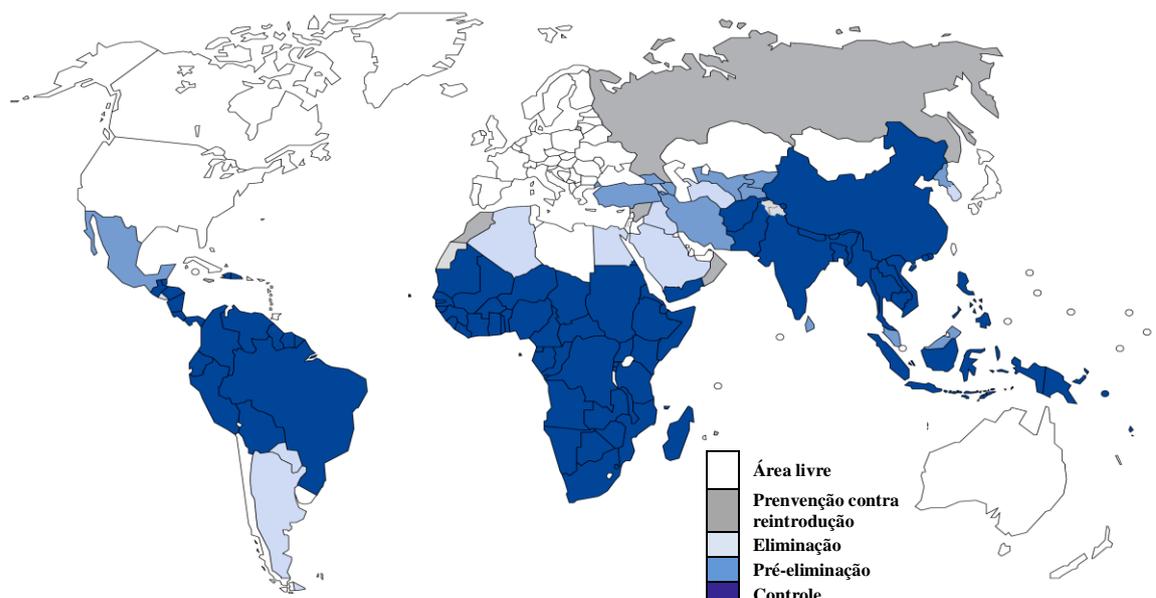


Figura 1. Risco de transmissão da malária no mundo no ano de 2006.
Fonte: WHO, 2008.

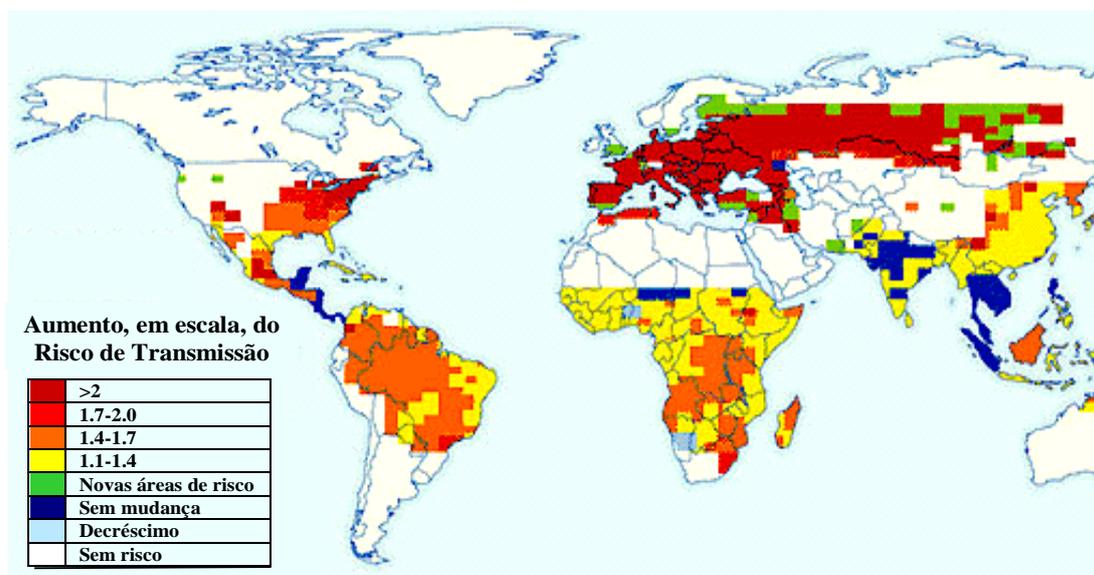


Figura 2. Risco de transmissão de malária projetado para o ano de 2020.
Fonte: MARTENS, 2002.

No Brasil, a Amazônia Legal é a área endêmica de malária, onde se concentram, aproximadamente, 99,9% dos casos (Figura 3). Na Região, apenas 60 municípios são responsáveis por 80% dos casos de malária notificados. A transmissão é favorecida, principalmente, pela presença de condições de manutenção dos criadouros de anofelinos, como a grande hidrografia, as elevadas temperaturas e as constantes chuvas típicas do clima tropical (BRASIL/MS/SVS, 2008).

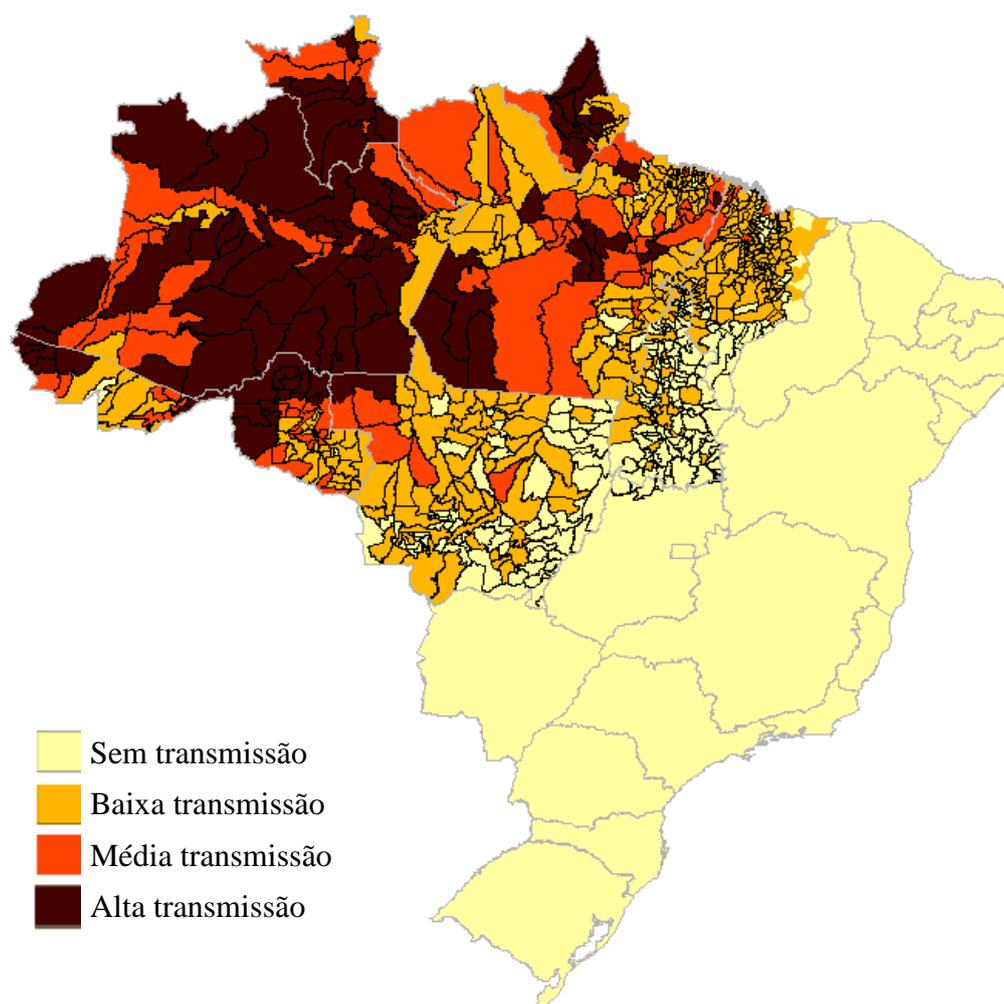


Figura 3. Mapa de risco de transmissão na Amazônia Legal, 2007.
Fonte: BRASIL/SVS/MS, 2008.

Até 1988, os índices de prevalência de *P. vivax* e *P. falciparum* no país eram praticamente iguais, mas a partir de então, o *P. vivax* vem se destacando como mais prevalente. Atualmente, o predomínio de *P. vivax* está em torno de 80% dos casos de malária (Figura 4), o que se pode atribuir, em parte, ao fato do ciclo sexuado do *P. falciparum* ter um processo de amadurecimento dos gametócitos mais tardio (de oito a dez dias após a infecção) quando comparado ao do *P. vivax*, possibilitando o diagnóstico e o tratamento precoces e anteriores ao desenvolvimento das formas sexuadas. Já o ciclo sexuado do *P. vivax* é concluído mais rapidamente e as formas infectantes aparecem no sangue do paciente dois ou três dias após a infecção (BRASIL/SVS/MS, 2008).

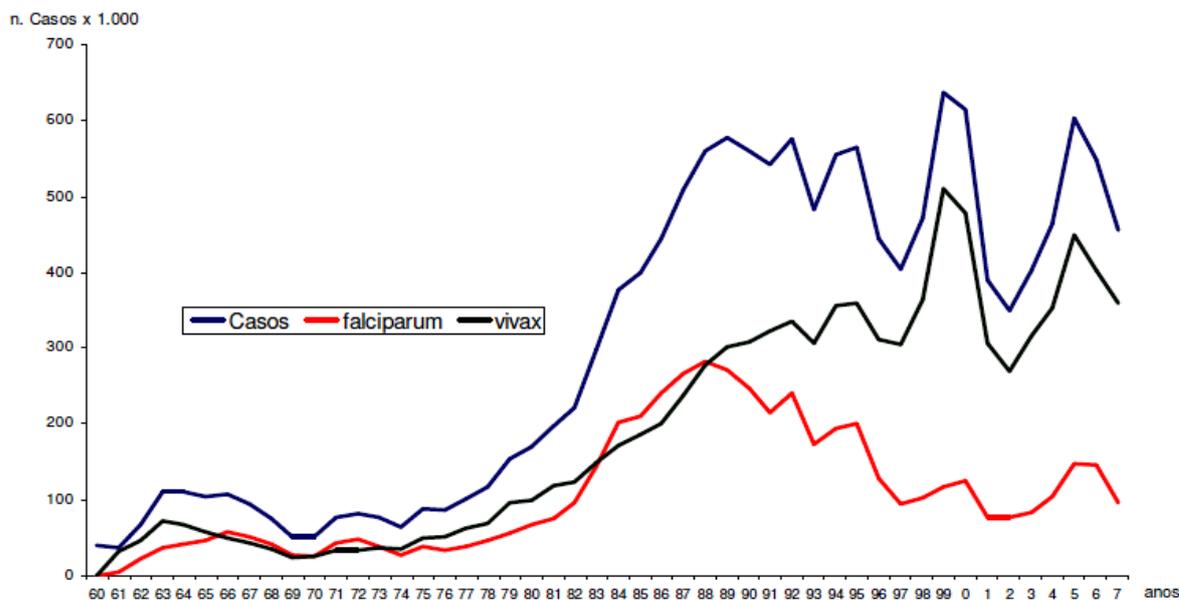


Figura 4. Evolução do número de casos de malária por espécies no Brasil, 1960 a 2007.
Fonte: BRASIL /SVS/MS, 2008.

Nas demais regiões do país (menos de 0,1% dos casos brasileiros), 64% dos casos registrados são importados das áreas endêmicas. Cerca de 55% são provenientes dos estados da Amazônia Legal e, aproximadamente, 9% de outros países (Guiana Francesa, Paraguai, Suriname e África). Destacam-se, na transmissão, os municípios localizados às margens do lago da usina hidrelétrica de Itaipu e em uma vasta área da Mata Atlântica. Os 36% restantes são casos autóctones esporádicos que ocorrem em áreas focais restritas (BRASIL/MS/SVS, 2008).

O Programa Brasileiro de Controle de Endemias apresentou resultados eficientes na década de 60, quando aplicou estratégias propostas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para a erradicação da malária e atingiu os níveis mais baixos já registrados - 36.900 casos em todo o país, em 1961. A partir de então, a prevalência voltou a crescer. Na tentativa de controlar a atual situação da infecção no Brasil, o governo federal junto à OMS colocou em prática estratégias que visam diminuir a morbidade, prevenir a mortalidade e aliviar as perdas econômicas e sociais produzidas pela doença, a partir da Reunião Internacional ocorrida em Amsterdã, em 1992. Apesar das conquistas temporárias os números voltaram a crescer em 1997, chegando a 637.470 casos nacionais em 1999. De acordo com o Ministério da Saúde, em 2007, 457.659 casos de malária foram confirmados no país (SILVEIRA; RESENDE, 2001).

Entre 1999 e 2007, o número de laboratórios habilitados ao diagnóstico de malária passou de 1.182 para 3.217, representando um acréscimo de 172,2%. Com a redução dos casos, houve impacto também nas internações, que caíram 35% no período de janeiro de 2007 (185.983 casos) a agosto de 2008 (121.132 casos). Os dados de redução da malária na Amazônia Legal confirmam a tendência de diminuição de pessoas infectadas verificadas pelo Ministério da Saúde em levantamentos anteriores. Na última avaliação, a queda foi de 16,9% no ano de 2007 em relação a 2006. Todos os estados apresentaram redução dos casos nos cinco primeiros meses de 2008 em relação a 2007, destacando-se o estado de Rondônia (47%), seguidos pelos estados do Amapá (45,3%), Maranhão (43,8%), Mato Grosso (42,7%), Roraima (40,6%), Acre (39,5%), Amazonas (33,2%), Tocantins (30,1%) e Pará (15,5%) (BRASIL/MS/SVS, 2008).

Uma estratégia do Ministério da Saúde foi a criação da Câmara Técnica de Terapêutica de Malária – CTTM, através da Portaria 22 /SVS/MS, de 13 de junho de 2005, com 14 membros e a finalidade de orientar a Política de Medicamentos Antimaláricos no Brasil. A associação de quinina, doxiciclina e primaquina, vinha sendo utilizada, desde 2006, como esquema de tratamento de primeira linha para malária por *P. falciparum*. Além disso, dois promissores esquemas terapêuticos estão sendo gradativamente implementados nos Estados da Amazônia, o Coartem e terapias de combinação baseada em artemisinina (ACT - Artemisinin-based Combination Therapy) (Tabela 1), seguindo a recomendação da OMS. Resultados promissores têm sido observados nos Estados do Amazonas e do Amapá, onde foram adotados os esquemas com ACT para tratamento de malária por *P. falciparum*, nos anos de 2006 e 2007, respectivamente. (BRASIL/SVS/MS, 2008).

Tabela 1. Implantação da terapia de combinação com Artemisinina – ACT

NÚMERO DE MUNICÍPIOS	2005	2006	2007
Endêmicos*	420	396	371
Endêmicos usando ACT	0	12	335
% municípios endêmicos usando ACT	0%	3%	90%

* Municípios com pelo menos um caso de malária por *P. falciparum* notificado no ano.

Fonte:BRASIL/SVS/MS, 2008.

A Rede Amazônica de Vigilância da Resistência aos Antimaláricos (RAVREDA), integrada pelo Ministério da Saúde do Brasil, Bolívia, Venezuela, Equador, Guiana, Peru, Colômbia, Suriname e o Departamento da Guiana Francesa, é um projeto da OMS/OPAS que

tem como objetivo monitorar a resistência terapêutica e, assim, estimar a magnitude e a distribuição da farmacoresistência dos parasitos aos medicamentos preconizados pelos Programas Nacionais de Controle da Malária - PNCM dos diversos países integrantes da rede (BRASIL/SVS/MS, 2005).

3.1.3. Ciclo evolutivo do *Plasmodium* spp. (BRUCE-CHWATT, 1980; REY, 2001).

A complexidade do ciclo de vida do parasito explica, em parte, as dificuldades para o estabelecimento de uma terapêutica eficaz. O ciclo evolutivo do plasmódio é o mais complexo do filo Protozoa, pois além de envolver dois tipos de multiplicação e dois hospedeiros, possui pelo menos seis formas evolutivas: esporozoítos, merozoítos, trofozoítos, esquizontes, gametócitos (masculino e feminino) e hipnozoítos (em *P. vivax* e *P. ovale*). A reprodução assexuada ou esquizogonia ocorre no hospedeiro vertebrado e a reprodução sexuada ou esporogonia, no hospedeiro invertebrado (Figura 5).

➤ Hospedeiro Vertebrado

Ao picar o individuo, o mosquito fêmea inocula os esporozoítos (forma infectante para o homem), que estão armazenados em suas glândulas salivares. Esses, após passarem pela derme e vasos linfáticos ganham a circulação através dos capilares sanguíneos e, após 15 a 45 minutos, chegam ao fígado, passando pelas células de Küpffer e alojam-se nos hepatócitos. Nos hepatócitos, os esporozoítos se desenvolvem em trofozoítos hepáticos, e em esquizontes teciduais que liberam, quando se rompem, os merozoitos hepáticos ou merossomos. Alguns desses merozoítos são fagocitados, pelas células de Küpffer, no próprio fígado e outros são lançados na circulação sanguínea. Esse ciclo de esquizogonia pré-eritrocítica (ou hepática) dura cerca de seis dias, no caso do *P. falciparum*; oito, no *P. vivax*; nove, no *P. ovale* e 16 dias na infecção por *P. malariae*. Existem esporozoítos que, ao invés de se infectarem hemáceas e se desenvolverem em trofozoítos, permanecem quiescentes no fígado e são denominados de hipnozoítos. Essa forma evolutiva é característica do *P. ovale* e do *P. vivax*.

Nos eritrócitos o parasito se diferencia em trofozoíto sanguíneo, dando início ao “ciclo eritrocítico”, que se desenvolvem em esquizontes, liberando na circulação sanguínea, merozoítos que invadirão novas hemácias. Os merozoítos do *P. vivax* invadem preferencialmente as hemácias jovens, já o *P. malariae* prefere eritrócitos maduros, enquanto

que o *P. falciparum* é indiferente quanto ao grau de maturidade dos eritrócitos que ele invadirá.

Os esquizontes possuem números característicos de merozoítos em cada espécie: de seis a 12 (geralmente, oito) no *P. malariae* e *P. ovale*, de oito a 24 (geralmente, 12 a 18) no *P. vivax*, e de oito a 26 (geralmente, oito a 18) no *P. falciparum*. Nesta última espécie, os esquizontes são encontrados nos capilares sanguíneos mais profundos do hospedeiro humano, devido à presença de protuberâncias formadas na superfície dos eritrócitos parasitados que aumentam sua adesão as células do endotélio vascular. Entretanto, quando a infecção apresenta-se em estágio avançado, os esquizontes podem ser observados no sangue periférico, o que é indicativo de doença grave.

No sangue, com a evolução da infecção, o ciclo esquizogônico tende a se repetir em prazos regulares e característicos para cada espécie: de 36 a 48 horas para *P. falciparum*, 48 horas para *P. vivax* e *P. ovale* e 72 horas para *P. malariae*, mas isso não acontece sempre. Como resultado do rompimento do esquizonte sanguíneo, advém os acessos febrís do paciente que, mesmo na ausência de periodicidade regular devem evocar o diagnóstico da doença. Após algum tempo de infecção, como recurso de sobrevivência induzido pelo “estresse” da infecção, uma pequena porção dos merozoítos sanguíneos sofre diferenciação em gametócitos feminino e masculino (diferenciados em macrogametócitos e microgametócitos, respectivamente) que darão continuidade ao ciclo no anofelino.

➤ Hospedeiro Invertebrado

Quando o *Anopheles* realiza o repasto no indivíduo infectado, todas as formas evolutivas circulantes, a exceção do gametócito (forma infectante para o mosquito), podem teoricamente ser ingeridas e digeridas no estômago do anofelino. Somente os macrogametócitos e os microgametócitos sobreviverão passando a macrogametas e microgametas, respectivamente. Após a formação do gameta masculino, processo conhecido por exflagelação, ocorre a fecundação e formação do zigoto, desenvolvendo-se em uma forma móvel e invasiva, denominada de oocineto, à qual se dirige ao revestimento epitelial da parede intestinal do inseto, perfurando-o e alojando-se no próprio epitélio ou entre este e a membrana basal, maturando-se em oocisto. Inicia-se, então, o processo de multiplicação esporogônica, originando dezenas de milhares de esporozoítos, que através da hemolinfa, deslocam até suas glândulas salivares, concentrando-se a espera da próxima hematofagia.

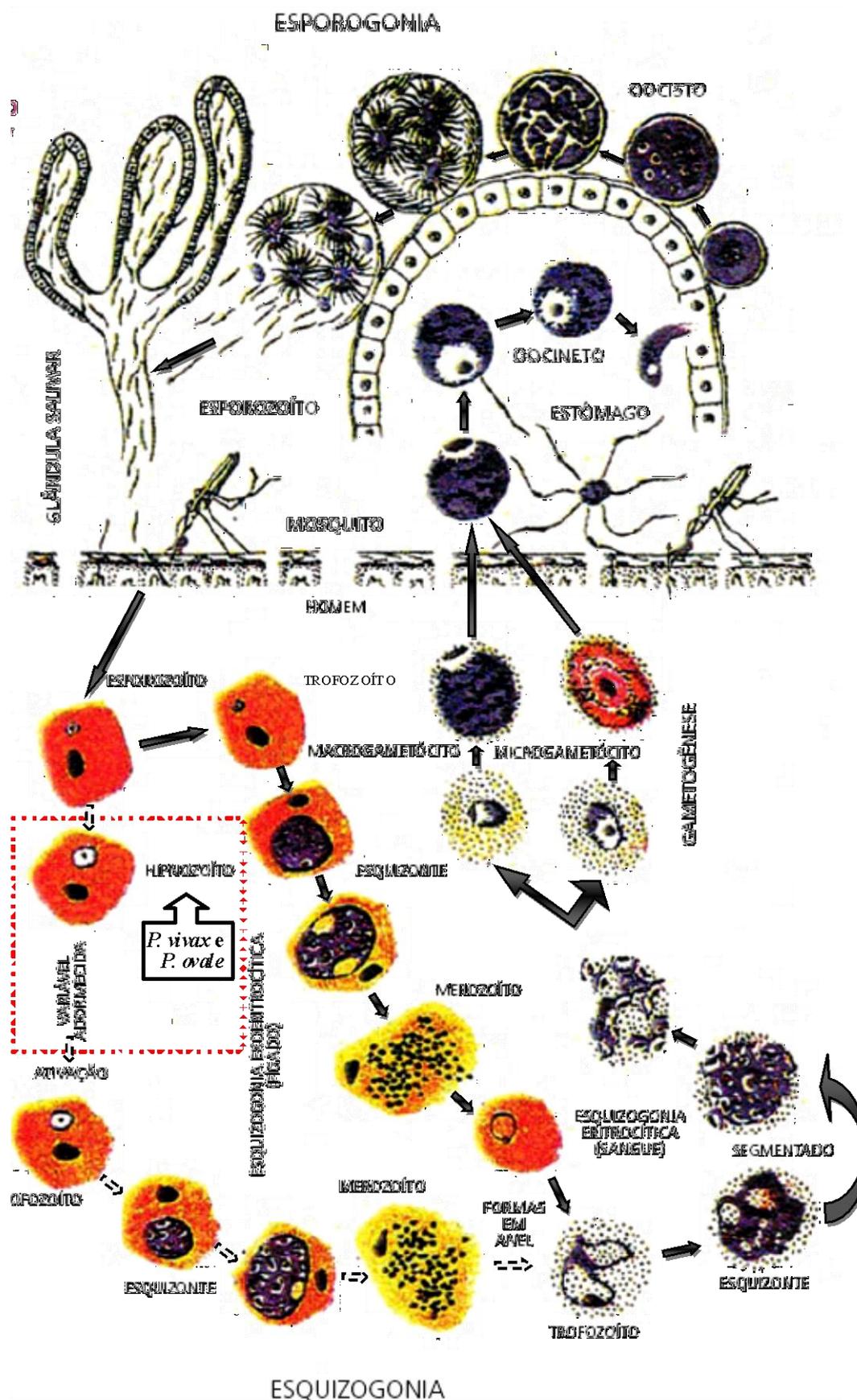


Figura 5. Ciclo biológico do *Plasmodium* spp. causadores de malária humana.
 Fonte: BRASIL/MS/SVS, 2005 (adaptado por PEREIRA, 2008).

3.2. FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS

A quimioterapia antimalárica permanece sendo umas das principais medidas de controle da infecção. Entretanto, dificuldades decorrentes do uso dos antimaláricos atualmente preconizados, como o surgimento da resistência e a toxicidade nas doses terapêuticas, têm representado grande entrave no tratamento da malária, gerando a incessante busca de novos fármacos mais eficazes e seguros.

3.2.1. Histórico

Os primeiros relatos de substância antimalárica foram antes da Era Cristã na China. A artemisinina e seus derivados já eram utilizados para febres desde 340 d.C. e passaram a ser recomendados, em 1596, na forma de chá, para o alívio dos sintomas da malária. Os chineses, também, tratavam a malária com *Ch'ang shan*, uma preparação de raiz de *Dichroa febrífuga* cujo princípio ativo era o alcalóide febrifugina. No Peru, os jesuítas começaram a utilizar a casca da árvore da quina para prevenir e tratar malária. Em 1645, o padre Bartolomeu Tafur levou algumas cascas para Roma e divulgou sua ação medicinal entre os clérigos e, em 1654, a casca peruana foi introduzida na Inglaterra. Logo após, em 1677, o primeiro registro de substância com atividade antimalárica foi oficializado na farmacopéia Européia com a inserção da quina sob a denominação de *Cortex peruano*. Em 1820, os franceses Pelletier e Caventou isolaram da casca da quina, o alcalóide quinina (KYLE; SHAMPE, 1974).

A primeira substância sintética utilizada como antimalárico foi o azul de metileno, por Paul Ehrlich, no fim do século XIX. Muitos anos depois, descobriu-se que essa substância inibia a glutatona redutase do plasmódio. Logo após seu sucesso terapêutico, foi realizada a primeira modificação química em um antimalárico, a síntese da pamaquina a partir do azul de metileno, em 1925, que também foi o primeiro fármaco capaz de agir nas formas tissulares do ciclo do plasmódio. Com o advento da segunda Guerra Mundial, foi sintetizada a mepacrina (também chamada de atebrina ou quinacrina) (WIESNAR et al, 2003).

Durante a Primeira Guerra Mundial, as grandes potências econômicas comandavam uma enorme produção de quinina que se esgotava com a necessidade gerada nos campos de guerra. Então, em 1934, os americanos Woodward e Doering sintetizaram a partir da quinina, um importante agente químico contra a infecção, a cloroquina (RIDLEY;

HUDSON, 1998). Com o nome de *Resochin* foi utilizada pela primeira vez, em 1935, na Alemanha em pacientes com malária causada por *P. vivax*, ganhando notoriedade por ser barata, segura e muito eficaz contra a malária por *P. vivax* e *P. falciparum*, tanto para cura radical quanto para profilaxia, além de bem tolerada pelos pacientes (WELLEMS, 2001). Entretanto, só em 1943, foi sintetizada em massa e, em 1944, comercializada com o nome comercial de *Aralen*, pela Polônia (RIDLEY; HUDSON, 1998).

Em 1945, um congênere da cloroquina, a amodiaquina, reacendeu a esperança de obtenção de uma droga segura e barata contra a infecção. A droga tem melhor resposta terapêutica e clareamento da parasitemia mais rápido, no entanto, sua utilização foi expressivamente menor quando, em 1986, detectaram reações adversas graves como hepatotoxicidade e agranulocitose (RIDLEY; HUDSON, 1998).

Em 1946, nos Estados Unidos, foi sintetizado um análogo da pamaquina, a primaquina, que foi a única droga que se mostrou eficaz e segura contra as formas tissulares quiescentes (hipnozoítos) do *P. vivax* e *P. ovale*. Foi produzida em larga escala muito tempo depois, em 1963, e ainda hoje é amplamente indicada contra as formas hepáticas (WHITE, 2004).

Com a expansão da resistência do *P. falciparum* à cloroquina na África Sub-Saariana iniciaram-se, na década de 60, novas buscas por antimaláricos mais eficazes. Nos anos 70, com o avanço descontrolado da resistência antimalárica, o norte-americano Ohnmacht e colaboradores, do Walter Reed Institute for Medicine Research, sintetizou a mefloquina a partir da quinina (SALLES; SALLES, 2000), a qual foi utilizada pela primeira vez na Tailândia em virtude da resistência à cloroquina (SIMPSON et al, 2000).

A eficácia do tratamento monoterápico com a mefloquina, mesmo com o uso de doses maiores, declinou rapidamente e, no fim do século XX, a taxa de cura em pacientes tailandeses foi reduzida em torno de 50%. Na mesma época, um esquema terapêutico, que se compunha de mefloquina e artesunato, foi utilizado e resultou em uma rápida resposta, altas taxas de cura e menor potencial de transmissão, sendo ainda hoje utilizado (PRICE et al, 1999).

Em 1950, na Inglaterra, foram desenvolvidos o proguanil e uma modificação deste, a pirimetamina, que foram associados às sulfonamidas em ação sinérgica. Logo foram

alvos de falhas terapêuticas descritas no sul da Ásia, pois o rápido desenvolvimento da resistência se deve a uma única mutação genética (WIESNAR et al, 2003; WHO, 2005). Nos anos 60, foram desenvolvidas duas moléculas que, até hoje, são utilizadas em alguns países, a piperaquina e halofantrina (RENGELSHAUSEN et al, 2004).

Em 1972, na China, foi isolada da *Artemisia annua* (*Qing hao*) um sesquiterpenóide com potente atividade antimalárica, a artemisinina (*Qinghaosu*). Na atualidade, vários derivados e análogos do fármaco estão incorporados em esquemas terapêuticos no mundo (GIAO et al, 2001).

Nos anos 90, a lumefantrina foi sintetizada e passou a ser administrada, na China, em combinação com o artemeter, como forma de prevenir a resistência (EZZET et al, 2000). Hoje, a associação entre artemisinina e halofantrina, está em implementação no Brasil como medicamento denominado de Coartem[®] (RIDLEY; HUDSON, 1998).

A alubaquina, ou bulaquina, foi sintetizada nos anos 80, sendo a mais recente droga aprovada em testes contra recidivas de *P. cynomolgi*, em macacos *rhesus*. Ainda na fase de testes em humanos, a droga não induziu metemoglobinemia, como visto no modelo canino (VALECHA et al, 2001).

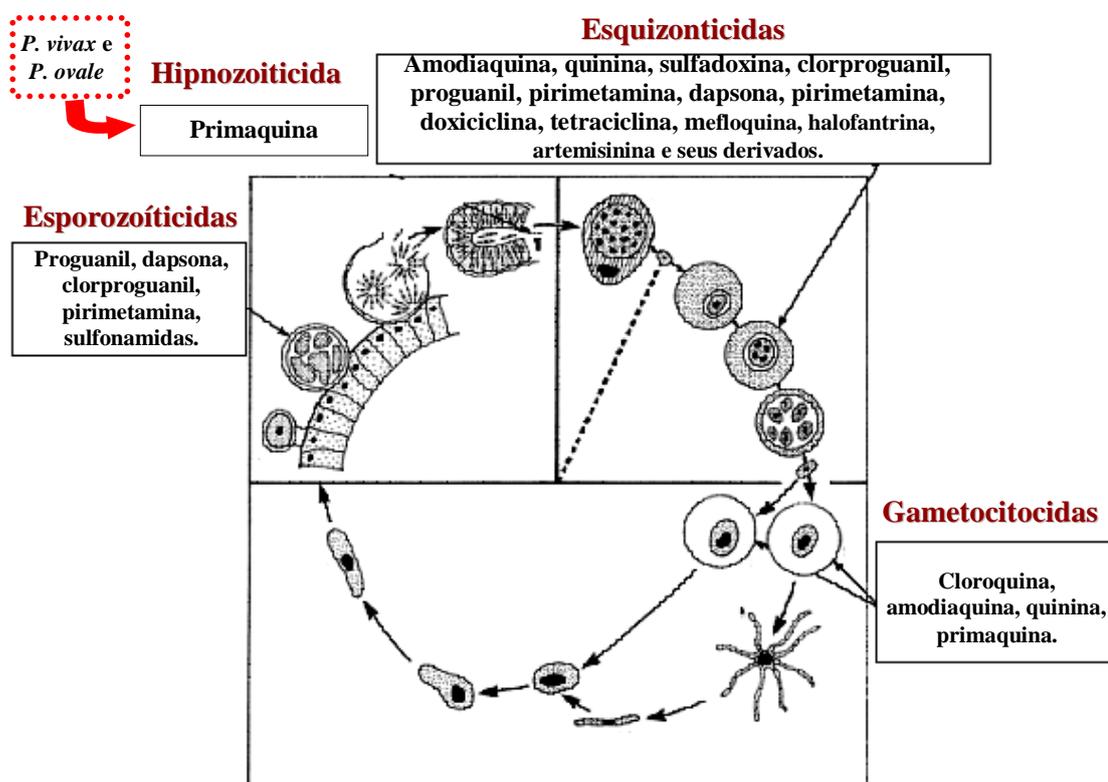
Mais recentemente, foi desenvolvida a tafenoquina, ainda em fase experimental, com resultados promissores em macacos *rhesus*. A droga apresentou ação hipnozoitocida 4 a 100 vezes superior à primaquina, com ação também contra as formas eritrocíticas do *P. falciparum* (NASVELD; KITCHENER, 2005).

3.2.2. Considerações gerais sobre os principais antimaláricos

Os antimaláricos podem ser classificados de acordo com o grupo químico a que pertencem (4-aminoquinolinas, 8-aminoquinolinas, arilaminoálcoois, naftoquinonas, lactonas sesquiterpênicas com ligação endoperóxido, inibidores de folato, antibióticos) (Tabela 2) ou de acordo com a forma evolutiva alvo de ação (esquizotocida, hipnozoitocida, gametocitocida, esporozoitocida) (Figura 6) (BRASIL/MS/SVS, 2001).

Tabela 2. Classificação dos antimaláricos quanto ao grupo químico.

	GRUPO QUÍMICO	DROGA(S)
	4-Aminoquinolinas	Cloroquina e amodiaquina
	8-Aminoquinolinas	Tafenoquina e primaquina
	Arilaminoálcoois	Halofantrina, mefloquina, quinidina e quinina
	Naftoquinonas	Atovaquona
	Lactonas sesquiterpênicas com ligação endoperóxido	Artemisinina e seus derivados: artemeter, arteeter, artesunato
Inibidores de folato	Inibidores de diidropteroato sintetase, por competitividade com o PABA	Sulfonas e sulfonamidas
	Inibidores da diidrofolato redutase	Proguanil e clorproguanil; pirimetamina.
	Antibióticos	Tetraciclina, doxiciclina, clindamicina, azitromicina, fluoroquinolonas

Figura 6. Classificação dos antimaláricos segundo a forma evolutiva alvo de ação do *Plasmodium* spp.

Fonte: ENCYCLOPEDIA REFERENCE OF PARASITOLOGY, 2008 (adaptado por PEREIRA, 2008).

➤ 4-Aminoquinolinas: Cloroquina e Amodiaquina

A cloroquina e a amodiaquina têm rápida atividade esquizonticida para todas as espécies de plasmódio, sendo também, gametocitocida para *P. vivax* e *P. malariae*. Em relação a esses efeitos, a amodiaquina é ligeiramente superior à cloroquina, mas nenhuma das duas tem ação contra as formas hepáticas (BRASIL/MS/SVS/CENEPI, 2001). Devido à semelhança estrutural da amodiaquina com a cloroquina, o *P. falciparum* já desenvolveu resistência cruzada à amodiaquina na maior parte das áreas endêmicas do mundo (BRASIL/MS/SVS/CENEPI, 2001).

O mecanismo de ação antimalárico da cloroquina mais aceito é a inibição da enzima que promove a polimerização do heme livre em hemozoína (substância inerte) durante a digestão da hemoglobina no vacúolo digestivo. O parasito degrada a hemoglobina para utilizar os aminoácidos em seu metabolismo. A importância desta polimerização se dá ao fato de que o heme livre é gerador de radicais livres e, quando não inibido, pode degradar o parasito via peroxidação lipídica (Figura 7) (FOLEY; TILLEY, 1997). Além disso, alguns estudos relatam o envolvimento da basicidade da cloroquina na inibição do metabolismo do parasito. O fármaco, por ser uma base forte, se acumula no vacúolo digestivo do parasito, aumentando o pH do meio e inativando as proteases necessárias à digestão da hemoglobina (Figura 7) (FOLEY; TILLEY, 1997).

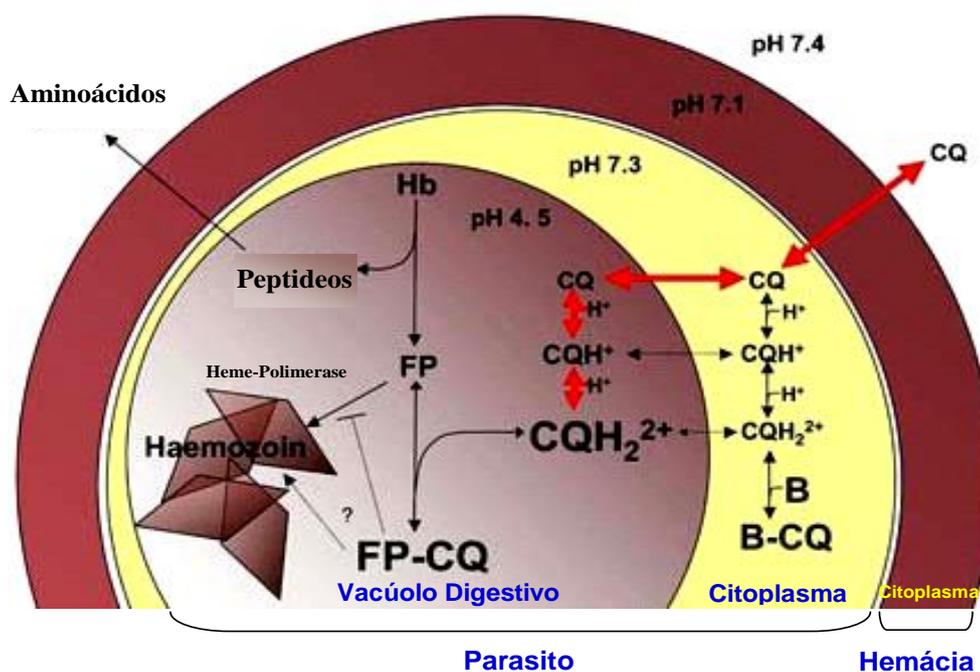


Figura 7. Mecanismos propostos de ação da cloroquina no plasmódio.

Fonte: HLADKY, 2008 (adaptado por PEREIRA, 2008).

➤ Arilaminoálcoois: Quinina e Mefloquina

A quinina é, ainda, adotada no Brasil em áreas onde as cepas de *P. falciparum* ainda não desenvolveram resistência, ou em associação com antibióticos nas áreas com comprovada resistência. No Brasil, ela foi até recentemente a droga de escolha para a malária não-grave ou complicada por *P. falciparum*, em associação com doxiciclina ou tetraciclina. Seu principal uso foi no tratamento da infecção severa por *P. falciparum* nas áreas com conhecida resistência a cloroquina (BRASIL/MS/SVS/CENEPI, 2001).

A quinina age como esquizonticida sanguíneo e gametocitocida contra *P. vivax* e *P. malariae*. Por ser uma base fraca, se concentra no vacúolo alimentar do *P. falciparum* podendo induzir um desequilíbrio de pH semelhante àquele da cloroquina, inibindo a formação da hemozoína através da inibição da Heme-Polimerase (Figura 8) (SCHLESINGER; KROGSTAD; HERWALDT, 1988), no entanto, é pouco efetiva e mais tóxica que a cloroquina (BRASIL/MS/SVS/CENEPI, 2001).

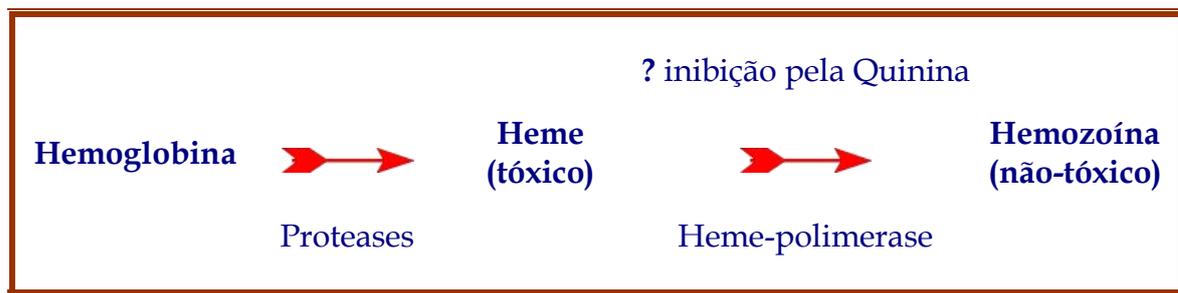


Figura 8. Esquema do mecanismo de ação da quinina no vacúolo alimentar.

A mefloquina é altamente lipofílica, por isso, possui um grande volume de distribuição aparente, que indica uma extensa distribuição tecidual com prolongada atividade e, conseqüentemente, meia-vida prolongada, em torno de 21 dias (KARBWANG; WHITE, 1990).

É um potente esquizonticida sanguíneo que atua nos estágios eritrocíticos assexuados do plasmódio, particularmente nas formas trofozoíticas e nos esquizontes de *P. falciparum* e *P. vivax* (GUSTAFSSON; ABBI; BEERMAN, 1987). O mecanismo de ação dos arilaminoálcoois não é bem conhecido, entretanto, ele pode envolver ligação direta ao grupo heme e inibição da heme-polimerase semelhante à cloroquina (FOLEY; TILLEY, 1998).

No entanto, a mefloquina (assim como a quinina) não se concentra tanto no parasito, quando comparada à cloroquina. De fato, estudos apóiam a idéia de que a

cloroquina, por ser uma base fraca diprotonada, se concentra cerca de 1000 a 5000 vezes mais no interior do vacúolo ácido do que no plasma, e a mefloquina, por ser uma base fraca monoprotônica, se acumularia no vacúolo cerca de 70 vezes em relação à concentração plasmática, que seria insuficiente para inibir a polimerização do heme (FOLEY; TILLEY, 1998).

3.3. RESISTÊNCIA DO *Plasmodium* spp. A ANTIMALÁRICOS

A resistência do plasmódio a antimaláricos já é uma realidade a décadas quando, pela primeira vez, se observou o evento com a quinina. Hoje, há relatos de resistência do parasito para todas as classes de antimaláricos. A maior parcela de participação nesse cenário é dos antimaláricos baratos, facilmente obtidos no mercado e eliminados lentamente do organismo, como a cloroquina e a combinação terapêutica, sulfadoxina-pirimetamina. Nas áreas endêmicas dos trópicos, a maioria da população tem concentrações detectáveis de cloroquina no sangue. O abuso das drogas antimaláricas, difundido nos últimos cinquenta anos, resultou em uma grande pressão seletiva sobre a evolução dos plasmódios com complexos mecanismos de resistência (WHITE, 2004).

3.3.1. Epidemiologia da resistência

O aparecimento da resistência, particularmente do *P. falciparum*, aos antimaláricos foi o principal fator contribuinte para o ressurgimento global da malária nas três últimas décadas, sendo uma das principais razões para o aumento da mortalidade de crianças com malária no leste e sul da África (KORENROMP et al, 2003). Atualmente, a resistência desta espécie à cloroquina ocorre na maioria das áreas endêmicas. A resistência do *P. falciparum* à sulfadoxina-pirimetamina se difunde rapidamente como resultado de mutações extremamente raras (HASTINGS, 2004) (Figura 9). A resistência à mefloquina era limitada às áreas endêmicas de países como a Tailândia, Camboja, Mianmar e Vietnã, no entanto, tem se dissipado pelo mundo, nos últimos seis anos (WHO, 2008).

Como resultado da expansão da resistência à cloroquina e à pirimetamina/sulfadoxina (Fansidar[®]), a amodiaquina foi considerada uma opção alternativa para o tratamento da malária não-complicada por *P. falciparum* na África até que a OMS preconizou o uso de ACT (SCHELLENBERG et al, 2002). A epidemiologia da resistência do *P. vivax* à cloroquina é menos estudada e representa uma preocupação séria em áreas da

Indonésia, Papua-Nova Guiné e adjacências (Figura 9). A resistência do *P. vivax* à sulfadoxina-pirimetamina é amplamente difundida e existem variações geográficas quanto à sensibilidade dos hipnozoítos desta espécie à primaquina (WHO, 2008). A artemisinina é a única droga eficaz contra *Plasmodium* spp. resistentes a quaisquer outras drogas (WHO, 2001). Os derivados da droga são particularmente efetivos devido a sua ação extremamente rápida e à boa tolerância pelos pacientes (WHITE, 2004).

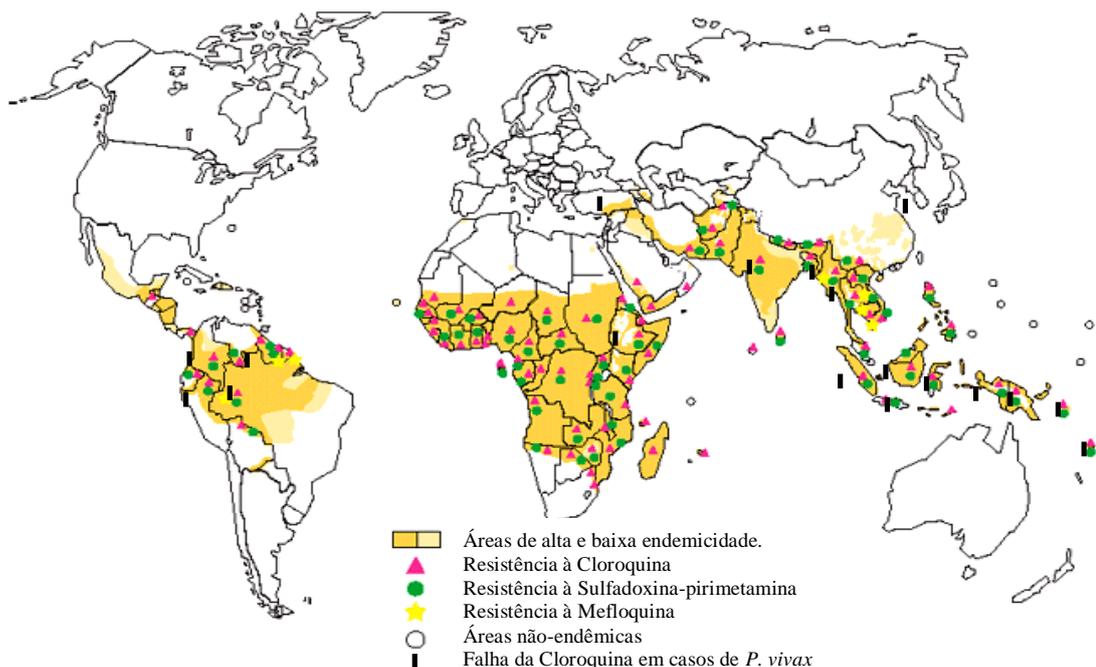


Figura 9. Resistência do *P. falciparum* e falha terapêutica, pelo uso de cloroquina nas infecções por *P. vivax*, observada em locais sentinelas até o ano de 2004.

Fonte: WHO, 2008 (adaptado por PEREIRA, 2008).

O desenvolvimento da resistência depende de fatores relacionados ao parasito, às drogas e ao paciente. Um dos fatores relacionados ao plasmódio é a capacidade de multiplicação e disseminação das cepas resistentes. O parasito resistente surge em concentrações muito pequenas e, a fim de alcançar uma concentração mínima de sobrevivência e transmissibilidade, é necessário levar em conta quaisquer desvantagens de desenvolvimento que os mecanismos de resistência possam conferir. Portanto, ao mesmo tempo em que o mecanismo protege o parasito contra a droga, pode também ser um fator negativo para sua multiplicação ou proliferação. Outro fator preponderante é a eficácia do mecanismo de resistência em relação à competição intra-hospedeiro com os parasitos sensíveis a outra(s) droga(s) simultaneamente coexistente(s) (WHITE, 2004).

As propriedades farmacocinéticas das drogas também influenciam o desenvolvimento da resistência. Esses parâmetros podem estar relacionados às propriedades físicoquímicas que uma molécula possui. Várias drogas como: lumefantrina, halofantrina, atovaquona e, em menos extensão, mefloquina, são lipofílicas e assim, proporciona um volume de distribuição aparente elevado, devido ao acúmulo nos tecidos. A correta dose terapêutica (sem riscos de doses tóxicas ou subterapêuticas) para cada paciente, que pode favorecer a seleção de cepas resistentes, é difícil de monitorar, na prática, pois há variação na absorção, principalmente, via oral (WHITE; VAN VUGT; EZZET, 1999).

A resistência se desenvolve quando uma quantidade suficiente de parasito sobrevive à seleção terapêutica. Então, a multiplicação do parasito resistente, o aumento das taxas de recrudescência e as respostas terapêuticas ineficazes propiciam densidades de gametócitos suficientes para transmissão e, conseqüentemente, a disseminação de cepas resistentes (WHITE, 1999).

3.3.2. Combinação terapêutica

A quimioterapia com a combinação de drogas como na tuberculose, na hanseníase e na infecção por HIV é o recurso terapêutico mais bem sucedido no combate à malária, pois minimiza o surgimento da resistência, uma vez que, se duas drogas com diferentes mecanismos de ação e, conseqüentemente, mecanismos de resistência diferentes, são utilizadas em combinação, a probabilidade da resistência ao esquema se desenvolver é igual ao produto das probabilidades de resistência de cada droga (WHITE; PONGTAVORNPINYO, 2003).

O tratamento da infecção sintomática expõe não só os parasitos que causam a sintomatologia da infecção, como também quaisquer infecções recentemente adquiridas que ressurgam do fígado durante a fase de eliminação da droga. Esse evento ocorre em muitas áreas de alta transmissão, pois existem portadores constantes de parasitos na circulação sanguínea, e cada pessoa abriga muitos parasitos de diferentes genótipos com densidade quase indetectável. Quanto mais longa a meia-vida de eliminação da droga, maior é a probabilidade do parasito, posteriormente adquirido, ser exposto à uma concentração subterapêutica de droga (BARNES; WATKINS; WHITE, 2008).

No âmbito da resistência, os antimaláricos de combinações terapêuticas deveriam ter propriedades farmacocinéticas semelhantes, principalmente, uma rápida eliminação. Assim, as concentrações residuais não favorecem pressão positiva de desenvolvimento de parasitos resistentes. Os esquemas terapêuticos prolongados representam um grande problema no tratamento da malária devido à baixa aderência do paciente, pois drogas de rápida excreção devem ser administradas por, pelo menos, sete dias. Então, para uma boa aderência, o esquema deveria ser de três dias para a droga de eliminação rápida (pelo menos uma droga precisa exceder 24 horas, como a artemisinina e derivados) juntamente com um fármaco de eliminação lenta em menor concentração do que a dose terapêutica (como a mefloquina) para garantir a eliminação do parasito e evitar a seleção de um novo mutante resistente (NOSTEN et al, 2000).

No noroeste da Tailândia onde a resistência do *P. falciparum* à mefloquina já se estabeleceu, esta combinação apresentou-se bastante efetiva (NOSTEN et al, 2000). No Brasil, em 2008, Fundação Oswaldo Cruz, junto à iniciativa Drogas para Doenças Negligenciadas (Drugs for Neglected Diseases initiative - DNDi), lançou o ASMQ (Artesunato-Mefloquina), que é uma nova formulação em dose fixa da associação artesunato-mefloquina. O ASMQ é um comprimido cuja formulação tem o objetivo de garantir a administração de ambos os fármacos ao mesmo tempo e na proporção correta. Esta associação é amplamente utilizada em países da América Latina e do sudeste Asiático desde a última década (AGÊNCIA FIOCRUZ DE NOTÍCIAS, 2008).

Os principais obstáculos para o sucesso do tratamento com combinações de fármacos na prevenção do surgimento da resistência são: o tratamento incompleto ou inadequado; drogas de má qualidade, que são comuns nos trópicos; antimaláricos disponíveis amplamente no comércio sem o controle do governo, entre outros. Neste sentido assegurar que pacientes com hiperparasitemias recebam o curso completo e adequado de doses preconizadas seria um método efetivo de reduzir a velocidade de surgimento da resistência a artemisinina e derivados (WHITE, 2004).

3.4. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE ANTIMALÁRICA ÀS DROGAS

Os esforços para o entendimento da infecção malárica têm gerado avanços científicos e tecnológicos em muitas áreas de pesquisa, como na quimioterapia. Muitos métodos e técnicas têm sido desenvolvidos ou adaptados para uma maior acuidade no

planejamento e avaliação de novos fármacos, como a avaliação *in vitro* da susceptibilidade do parasito a droga e a modelagem molecular de substâncias com potencial antimalárico.

3.4.1. Avaliação *in vitro* da sensibilidade do parasito às drogas.

Os métodos *in vitro* de avaliação da quimiossensibilidade do *Plasmodium* spp. a uma droga não determinam, à priori, se um isolado é sensível ou não a uma determinada droga, uma vez que, a evolução de uma droga para fármaco depende ainda de vários fatores inerentes à molécula e ao paciente, como aderência correta ao tratamento, absorção e biodisponibilidade da droga, grau de imunidade do hospedeiro, toxicidade, entre outros. Assim, os métodos são considerados na prática uma ferramenta de triagem de novas drogas com ação antiplasmodial (DRUILHE, 2001).

Por meio desses métodos pode-se avaliar quantitativamente o efeito de uma substância no crescimento e/ou maturação do parasito em meio de cultura (PRADINES et al, 1999; WONGSRICHANALAI et al, 2001). As técnicas avaliam o efeito antiplasmodial frente a uma gama de concentrações de droga, diferindo apenas no sistema de detecção da concentração parasitária, que pode ser feito por microscopia ótica, emissão de radioatividade por compostos marcados ou por ELISA, como o Deli-teste (RUSSELL, 2003).

➤ Cultura de *P. falciparum*

A técnica de cultivo *in vitro* de *P. falciparum* proposta por Trager e Jensen (1976) proporcionou uma revolução nos estudos sobre o parasito. Pela primeira vez, um método proporcionou o acesso fácil e contínuo ao material parasitário nos laboratórios de pesquisa no mundo todo. Até hoje, essa é a única espécie de plasmódio humano que pode ser cultivada de maneira contínua, devido ao fato de multiplicar-se não só em reticulócitos, mas também, em hemácias maduras.

O Deli-teste (Double-site enzyme-linked immuno-detection) foi desenvolvida no Instituto Pasteur e na Universidade de Rouen, em Paris-França, e se baseia na detecção da Lactato Desidrogenase de *Plasmodium* spp. A Lactato Desidrogenase do *Plasmodium* spp. (pLDH) é uma enzima produzida por todas as espécies de *Plasmodium* em ambos estágios, sexuados e assexuados. É uma enzima formada durante a via de Embden-Meyerhof ou glicólise anaeróbica e possui um papel importante no metabolismo de carboidrato, que é necessário para a sobrevivência do parasito no interior da hemácia (MAKLER et al, 1993). A

enzima possui um análogo no hospedeiro humano (LDH) que está presente no citoplasma de todas as células do organismo e catalisa, de modo reversível, na presença de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD), o piruvato em lactato. A pLDH catalisa o piruvato em L-lactato, através de outra coenzima (3-acetil piridina adenina dinucleotídeo - APAD), que resulta em um produto colorimétrico capaz de ser mensurado por espectrofotometria (Figura 10) (NOEDL et al, 2003; PIPER et al, 1999). A pLDH tem um tempo de *clearance* curto, ficando na circulação apenas poucas horas ou dias após a morte dos parasitos (BASCO et al, 1995; BROWN et al, 2004; GOMEZ et al, 1997, MOODY, 2002).

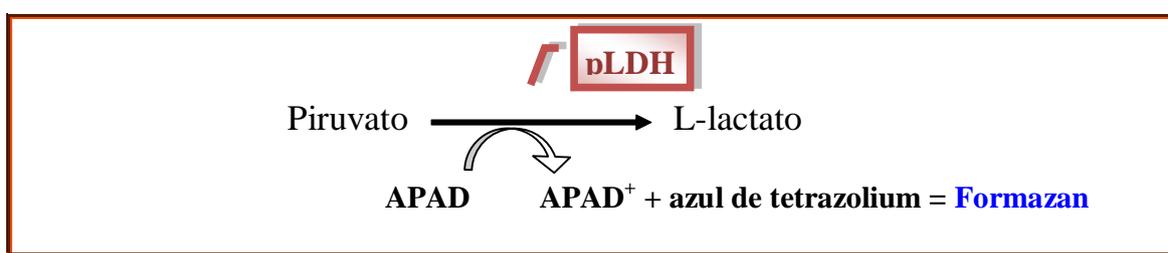


Figura 10. Esquema da via metabólica de formação da L-lactato no *Plasmodium* spp.

As primeiras tentativas de utilização da pLDH para mensurar a presença do parasito foram feitas por Makler e colaboradores, em 1993. Inicialmente, foi proposta a utilização de um método capaz de medir a atividade enzimática da pLDH, uma vez que sua produção é proporcional ao crescimento parasitário. No entanto, necessitava-se de parasitemias superiores a 1% para detecção da atividade enzimática. Assim, optou-se pela detecção imunológica da enzima. Anticorpos monoclonais dirigidos a diferentes epítomos da pLDH foram produzidos com o intuito de capturar a proteína em fase sólida em placa de ELISA, após cultivo *in vitro* do parasito.

O DELI-teste (*double-site enzyme-linked immunodetection*) é um método altamente sensível que se baseia na captura da pLDH através do método de ELISA sanduíche, ou de captura, utilizando dois anticorpos monoclonais (mAbs) específicos para epítomos distintos da mesma enzima. Nesse caso, um primeiro anticorpo (captura) é adsorvido em placas de poliestireno formando a fase sólida. A seguir, adiciona-se a amostra em teste contendo o antígeno, a pLDH. Posteriormente, incuba-se com o segundo anticorpo (detector) marcado com biotina e, a seguir, adiciona-se estreptavidina marcada com peroxidase. Ao adicionar o substrato cromogênico, a estreptavidina catalisa a reação do substrato a um produto solúvel colorido. Uma vantagem adicional da pLDH são as formas homólogas produzidas pelas diferentes espécies de plasmódios, que permitiu o desenvolvimento de

anticorpos monoclonais específicos para cada espécie (BRASSEUR et al, 2001; SANCHEZ, 2001).

3.4.2. Modelagem Molecular de Drogas

A modelagem molecular compreende a investigação teórica das propriedades estruturais (estéricas e eletrônicas) e físico-químicas de moléculas através da informática, de forma que a análise gráfica possa fornecer uma representação tridimensional, em condições selecionáveis. Esse recurso possibilita a simulação de valores aproximados de parâmetros importantes na avaliação biológica de substâncias químicas. Assim, através da modelagem molecular podem-se planejar racionalmente novos fármacos mais potentes e específicos a partir de correlações entre a estrutura da droga e a sua atividade biológica. Alguns parâmetros importantes podem ser empregados na predição da ação de uma molécula em seu sítio biológico, além de propriedades funcionais, como parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos (CARVALHO et al, 2003).

➤ Orbitais de Fronteira, HOMO e LUMO

Os orbitais de fronteira são importantes por responderem por muitas propriedades químicas e espectroscópicas da molécula (CLARE, 1994). O HOMO (Highest occupied molecular orbital) é o orbital molecular ocupado de maior energia e o LUMO (Lowest unoccupied molecular orbital) é o orbital desocupado de menor energia. O HOMO pode indicar a propensão de uma molécula doar elétrons. Quanto maior a energia do HOMO, mais facilmente a molécula doa elétrons, ou seja, maior a possibilidade da molécula se oxidar, caracterizando a molécula como espécie nucleofílica. O LUMO pode indicar a propensão de uma molécula receber elétrons. Quanto menor a energia do LUMO, mais facilmente a molécula recebe elétrons, ou seja, mais facilmente ela pode sofrer redução, caracterizando a molécula como eletrofílica (KOROLKOVAS, 1982).

A análise das densidades eletrônicas nos orbitais de fronteira sobre os átomos é uma forma de caracterizar de forma detalhada as possíveis interações entre doadores e aceptores de elétrons. De acordo com a teoria dos orbitais de fronteira para a reatividade, na maioria das reações químicas, ocorre na posição em que o HOMO e o LUMO dos respectivos reagentes podem ter a maior sobreposição de orbitais (CLARE, 1994).

➤ Potencial eletrostático molecular (MPE)

Geralmente, para se calcular o potencial eletrostático molecular, é usado dois passos. O primeiro consiste em definir os pontos onde o potencial eletrostático será calculado, enquanto que o segundo consiste em calcular o potencial desses pontos e usar um mapa colorido para diferenciar a variação do potencial (SHUSTERMAN, 2008).

O potencial eletrostático de um ponto (x,y,z) é dado em termos da energia do potencial eletrostático entre uma carga imaginária (+1) e a molécula. Se essa carga é atraída pela molécula o potencial é negativo, se a carga é repelida pela molécula o potencial é positivo. Desta forma, regiões ricas em elétrons são negativas, enquanto que regiões pobres em elétrons são positivas. Na figura 11, o potencial negativo é representado pelo vermelho, o potencial positivo é representado pelo azul e potenciais intermediários são representados de acordo com a cor do espectro (SHUSTERMAN, 2008).

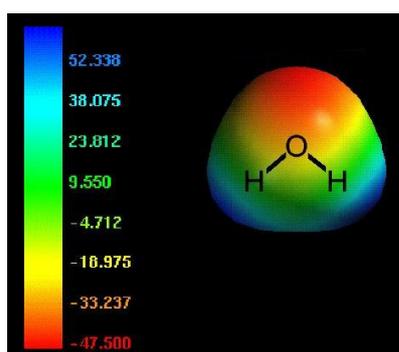


Figura 11. Mapa do potencial eletrostático da molécula de água.
Fonte: Shusterman, 2008.

➤ Coeficiente de Partição octanol/água (C log P)

O coeficiente de partição pode ser definido pela razão entre a concentração da substância na fase orgânica (C_{org}) e sua concentração na fase aquosa (C_{aquoso}) em um sistema de dois compartimentos sob condições de equilíbrio (Figura 12). Assim, quanto maior o valor de C log P mais afinidade da molécula pela fase orgânica, ou seja, mais lipofílica (BARREIRO; FRAGA, 2001).

$$P = \frac{[Droga] \text{ em meio orgânico}}{[Droga] \text{ em meio aquoso}}$$

Figura 12. Esquema do cálculo do coeficiente de partição óleo/água

O Octanol/água é o sistema mais escolhido para medidas de coeficiente de partição em estudos QSAR e SAR, devido sua similaridade aos sistemas biológicos. O octanol pode representar as membranas biológicas devido à sua estrutura possuir cadeias alquil (hidrofóbicas) e grupos polares (hidrofílicos) que expressam as características das membranas lipoproteicas. O octanol possui, também, algumas vantagens práticas sobre os outros solventes orgânicos, como o fato de uma grande variedade de compostos ser solúvel no solvente, que não ocorre com hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos. Além disso, o octanol apresenta baixa pressão de vapor à temperatura ambiente. Na literatura, o $C \log P$ é utilizado na caracterização de várias classes de substâncias (KUBINYI, 1979).

➤ Energia de hidratação

A energia de hidratação é a energia liberada quando moléculas de água se separam uma das outras e são atraídas por moléculas ou íons de um soluto, ou seja, é a energia liberada para que uma substância se solubilize em água. A energia de hidratação compreende as interações solvente-solvente e solvente-soluto. Experimentalmente, isso se deve, porque não se pode hidratar uma molécula sem antes separar as moléculas de água para dar lugar à molécula (JÄGER; KAST, 2001).

➤ Polarizabilidade

Quando um campo elétrico é aplicado a um átomo ou uma molécula a distribuição eletrônica é modificada e a geometria molecular é distorcida. A polarizabilidade representa a facilidade com que uma nuvem eletrônica pode se deformar num campo elétrico, tendo, desta forma, maior dispersão de elétrons (maior deslocamento). Quanto mais polarizável é a molécula, maior será sua tendência de unir-se a outras moléculas (ATKINS, 1999).

➤ Volume Molecular

O coeficiente de partição está correlacionado com o parâmetro estérico e com o volume molecular. O volume molecular permite avaliar o efeito estérico causado pela troca de substituintes de uma molécula, pois o volume molecular está relacionado com o tamanho do substituinte apenas, enquanto o volume avalia modificações de tamanho ocorridas na molécula toda, devido a possíveis alterações conformacionais que o substituinte pode causar (MARTIN, 1978).

3.5. CHALCONAS

A chalcona (Figura 13) é uma cetona aromática encontrada na natureza como intermediário da biossíntese de flavonóides de plantas rasteiras ou arbóreas (DIXON; STEEL, 1999). Essa classe também se apresenta como intermediário na síntese de Auwers das flavonas (YARISHKIN et al, 2008). Sinteticamente, as chalconas podem ser preparadas por uma condensação do aldol entre benzaldeído e acetofenona, na presença do hidróxido de sódio como catalizador (Figura 13) (TODA et al, 1990).

Essas substâncias têm várias atividades, dentre elas: antibacteriana (ALCARÁZ et al, 2000); fungicidas (LÓPEZ et al, 2001); leishmanicidas (DOMINGUÉZ et al, 2001); antiinflamatória (KO et al, 2003; HERENCIA et al, 2002; ROJAS et al, 2002); anticancerígeno (DEMULLE et al, 2006; YE et al, 2004; SAYDAM et al, 2003) e antiviral (KIAT et al, 2006; LALL; HUSSEIN; MEYER, 2006; PHRUTIVORAPONGKUL et al, 2003; WU et al, 2003).

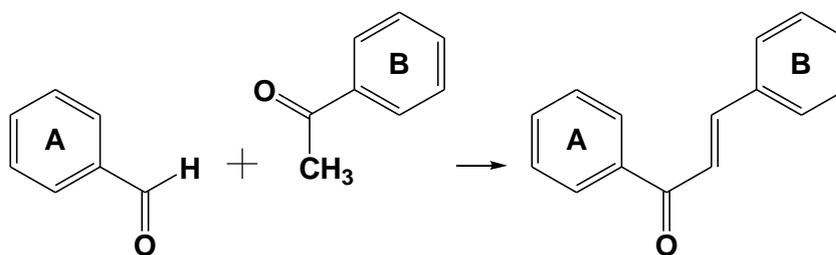


Figura 13. Rota sintética de chalconas.

3.5.1. Atividade antimalárica de chalconas

Muitas chalconas têm sido descritas como tendo atividade antimalárica. A Licochalcona A (Figura 14), isolada de raiz de *Liquorice chinesa*, foi testada contra cepas de *P. falciparum* sensíveis (3D7) e resistentes (Dd2) à cloroquina, apresentando atividade altamente inibidora do crescimento parasitário. Essa substância também demonstrou uma atividade protetora contra a infecção letal por *P. yoelii*, quando administrada intraperitoneal ou oralmente por 3-6 dias (CHEN et al, 1994; KHARAZMI et al, 1997).

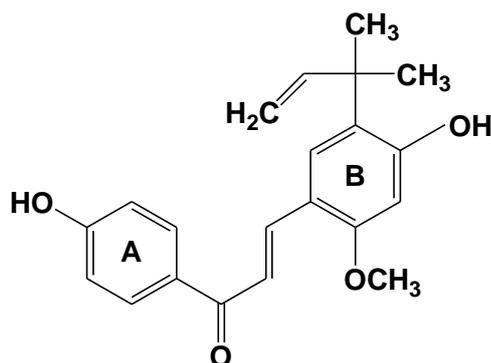


Figura 14. Estrutura molecular da Licochalcona A.

As chalconas, 5-Prenilbuteína, licoagrochalcona A e homobuteína (Figura 15), demonstraram atividade antiplasmodial *in vitro* contra a cepa de *P. falciparum* sensível (D6) e resistente (W2) a cloroquina com valores de IC₅₀ variando de 10,3 a 16,1 μ M, respectivamente (YENESEW et al, 2004).

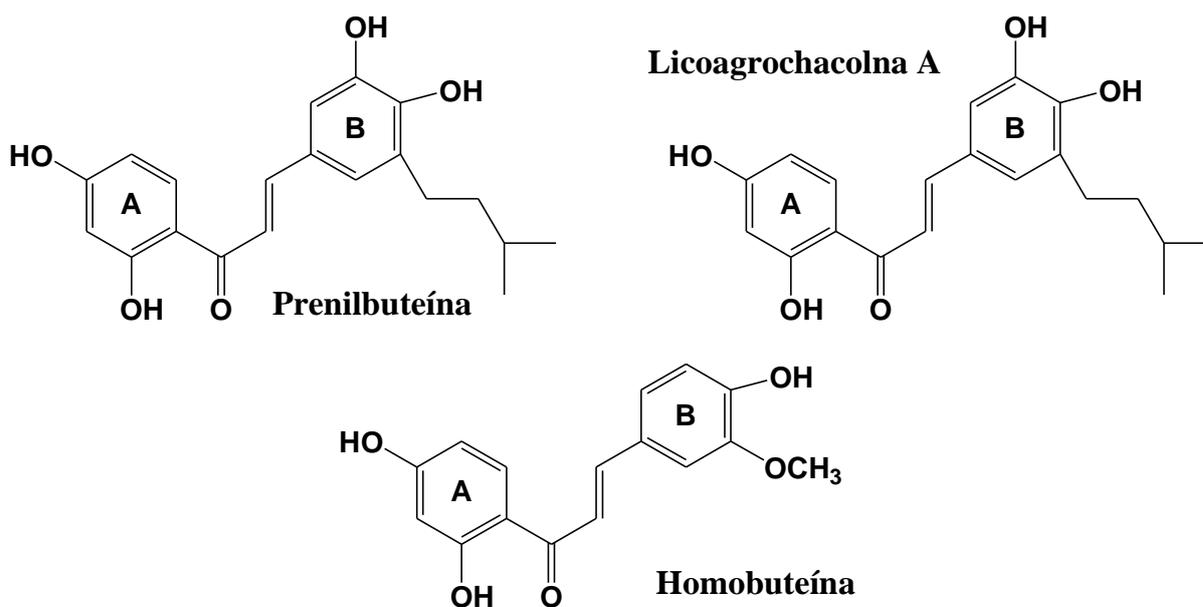


Figura 15. Estrutura molecular das chalconas: prenilbuteína, licoagrochalcona A e homobuteína.

A Crotaorixina (Figura 16) isolado de partes aéreas do *Crotalaria orixensis* exibiu 100% de inibição de maturação do estágio de trofozoíto jovem para esquizontes de *P. falciparum* (NF-54) nas concentrações de 10 e 50 μ g/mL (μ M). O composto diprenilado, Medicagenina (Figura 16), isolado de raízes de *Crotalaria medicagenia*, inibiu 100% a mesma cepa, na concentração de 5 μ M, enquanto que Cromenodihidrochalconas (Crotamosmina, Crotamina e Crotina) (Figura 16), da *Crotalaria ramosissima*,

apresentaram menor atividade. A diprenilação com um sistema 4,4'-diidroxil livre levou ao aumento da atividade nesse estudo (NARENDER et al, 2005).

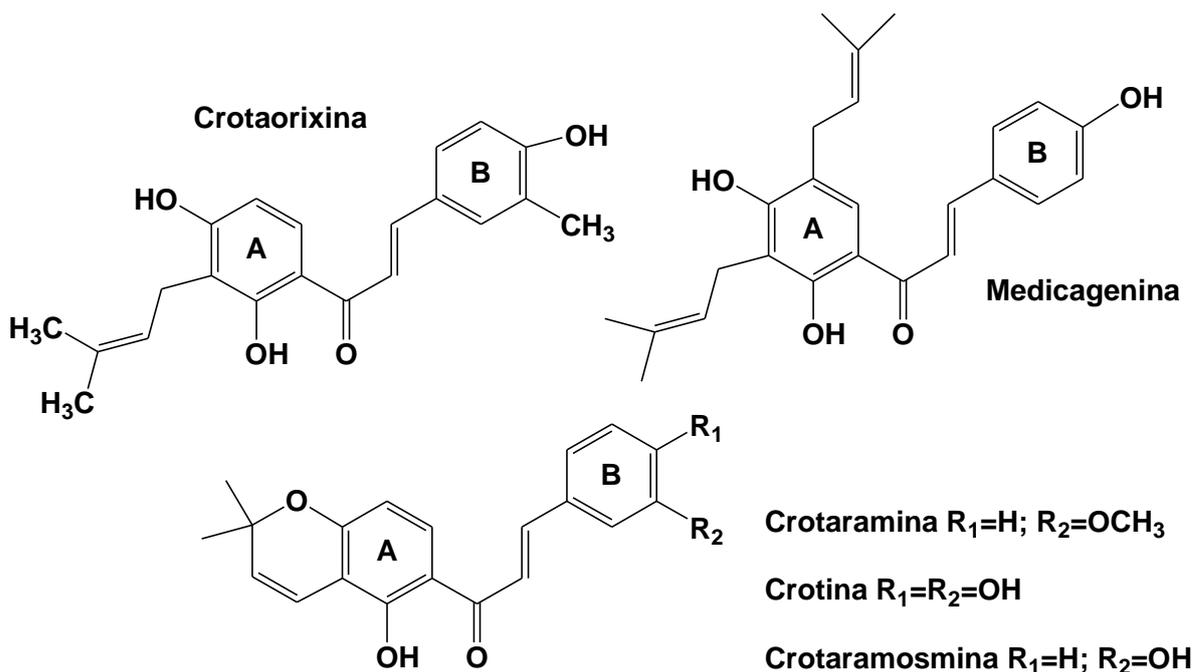


Figura 16. Estruturas moleculares de chalconas naturais.

Frölich e colaboradores (2005) isolaram e testaram a atividade antiplasmodial *in vitro* de chalconas preniladas dos frutos de lúpulos (*Humulus lupulus*) contra cepas de *P. falciparum* sensíveis à cloroquina (poW) e o clone (Dd2) multirresistente. O xantohumol (Figura 17), a principal chalcona do fruto, foi o mais ativo com IC₅₀ de 8,2±0,3 μM (poW) e 24±0,8 μM (Dd2). Os resultados parecem indicar que essas chalconas tiveram a capacidade de interferir na degradação do heme.

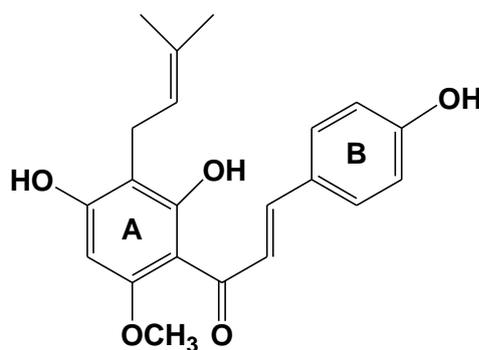


Figura 17. Estrutura molecular do xantohumol.

Liu e colaboradores (2001) e Liu; Wilairat; Go (2003) demonstraram que a atividade antimalárica *in vitro* de chalconas contra *P. falciparum* (K1) resistente a cloroquina

foi determinada, principalmente, pelas propriedades do anel B. O tamanho e a hidrofobicidade dos substituintes foram identificados como parâmetros críticos para uma boa atividade. Os mesmos autores demonstraram que as chalconas hidroxiladas (Figura 19) foram menos ativas que suas correspondentes alcoxiladas (Figura 18), que tiveram valores de IC_{50} abaixo de $6,5 \mu M$. Entre as hidroxiladas, a mais ativa foi a 4-cloro-2',4'-diidroxichalcona (Figura 19, molécula 7) com IC_{50} de $12,3 \mu M$. As demais derivadas (Figura 19, moléculas 8-11) tiveram valores de IC_{50} menores que $20 \mu M$.

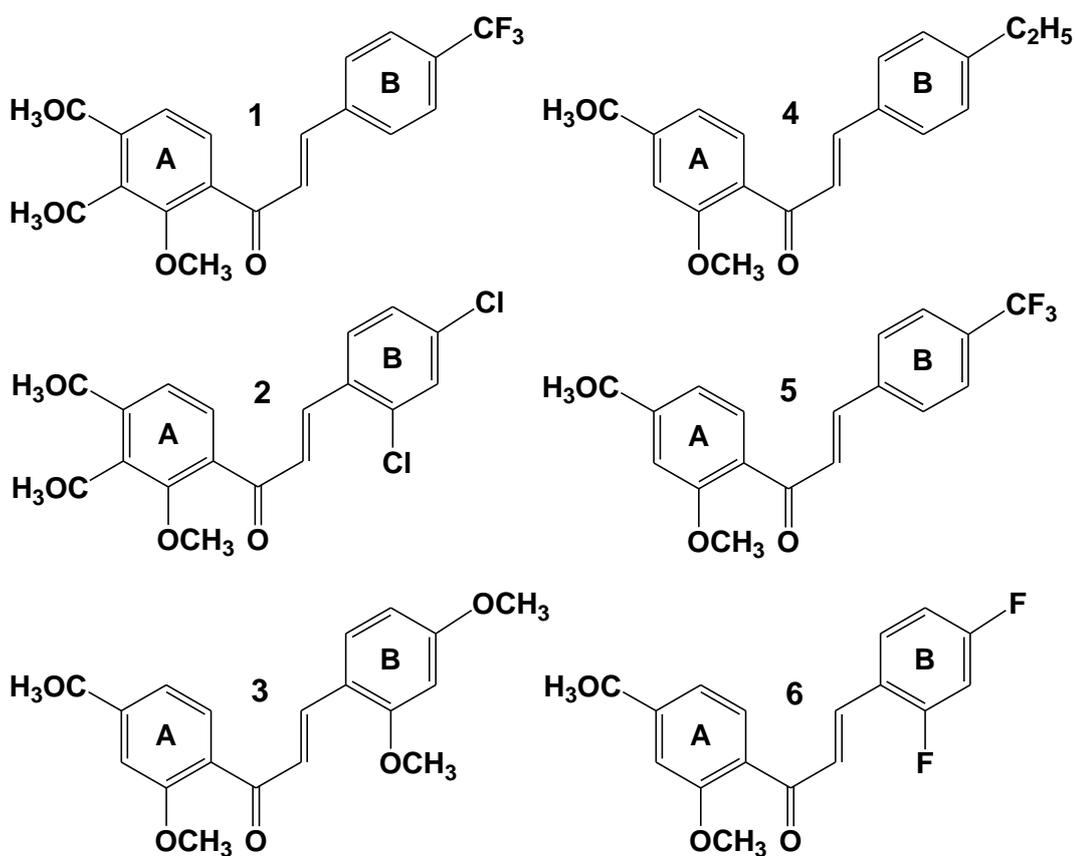


Figura 18. Estrutura molecular de chalconas alcoxiladas.

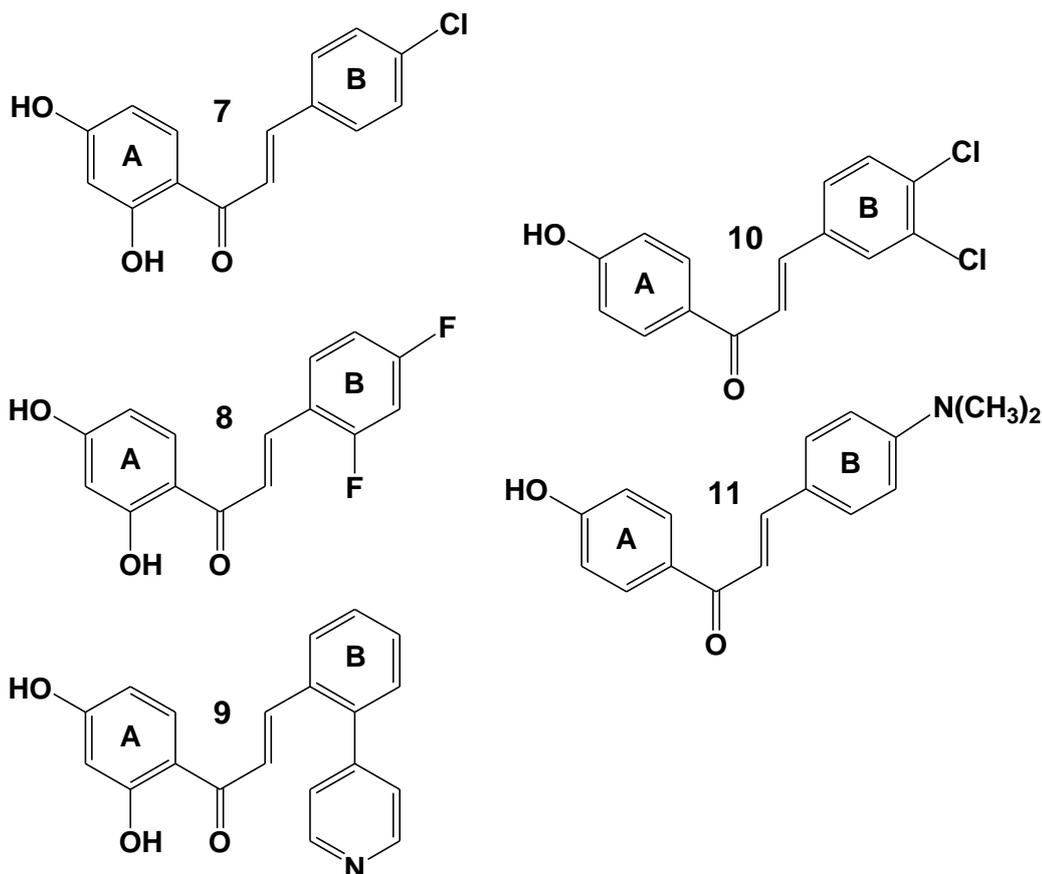


Figura 19. Estrutura molecular de chalconas hidroxiladas.

A atividade antimalárica *in vitro* de chalconas com substituições de cloro e flúor no anel A e com substituinte eletrodoador (metoxi) no anel B, mostrou-se superior quando comparada a de chalconas em que invertemos os substituintes nos anéis A e B. A α,β -insaturação ligada à cetona provê conjugação entre grupos aromáticos em ambos fins, o que parece ser crítico para uma boa atividade (LI et al, 1995).

As chalconas alcoxiladas e hidroxiladas inibem significativamente (em torno de 40%) a hemólise dos eritrócitos parasitados induzida por sorbitol na concentração de $10\mu\text{M}$. A maioria dos inibidores de hemólise induzida por sorbitol também é agente antiplasmodial ativo, mas nem todas as chalconas antiplasmodiais inibem a hemólise induzida por sorbitol. Existe uma hipótese, ainda não comprovada, de que os metabólitos e a substância inalterada de chalconas com atividade atuem em sinergismo no organismo (GO et al, 2004).

Domínguez e colaboradores (2001) testaram chalconas quinoleínil *in vivo*, em *P. berghei*, *in vivo* e em ensaio bioquímico com a protease de cisteína de *P. falciparum*, denominada falcipaína. Apesar dos bons resultados dos ensaios *in vivo*, os ensaios *in vitro* não renderam bons resultados, pois a maioria das IC_{50} foi superior a $200\mu\text{M}$. Por isso, os autores

concluíram que apesar das substâncias inibirem a atividade da falcipaina, o alvo de ação das chalconas provavelmente não é a inibição da enzima.

Domínguez e colaboradores (2005a) observaram em ensaios bioquímicos *in vitro* que a maioria das chalconas sulfonamidas, possuindo grupos dimetoxi e trimetoxi-substituídos no anel aromático A, demonstrou níveis mensuráveis de inibição da formação da β -hematina (hemozoína) com valores de IC_{50} iguais a: $0,48 \mu M$ para **15** e $0,67 \mu M$ para **16** (Figura 20). O composto mais ativo (**17**, com $IC_{50} = 0,5 \mu M$) no ensaio bioquímico, também foi efetivo contra *P. falciparum* (W2) a $1 \mu M$.

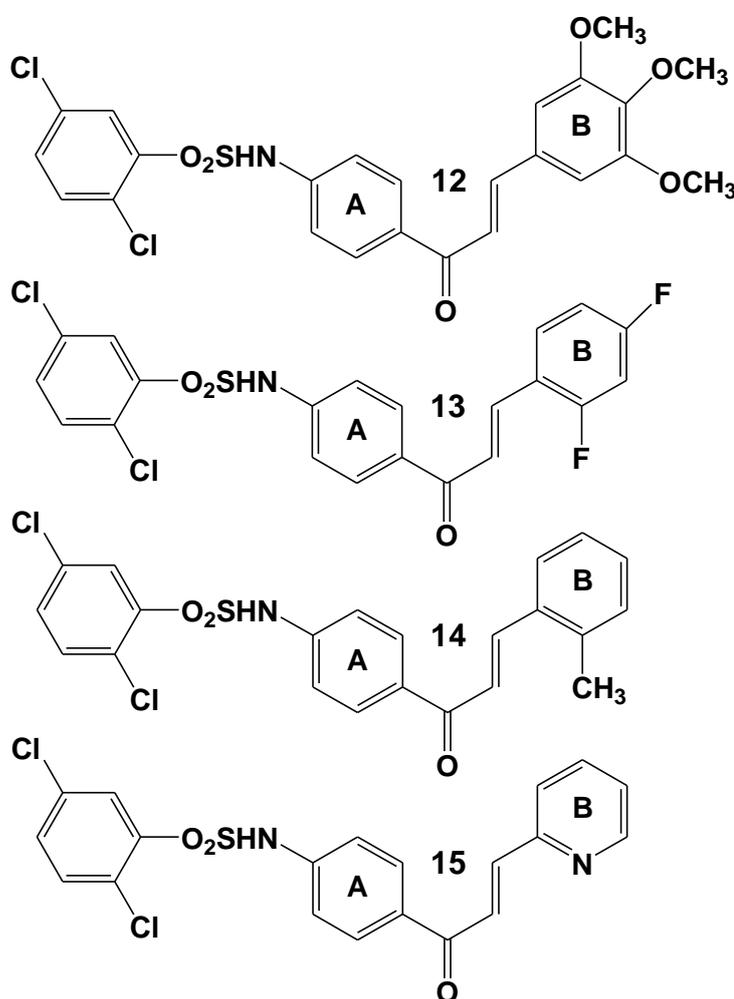


Figura 20. Estrutura molecular de derivados sulfonamidas de chalconas.

Uma relação estrutura-atividade foi observada nestas chalconas sulfonamidas quando houve apenas uma substituição (Cl, F, CH₃ ou OCH₃) no anel aromático, entretanto, as atividades não foram melhores que suas correspondentes di ou trissubstituídas. Outro achado está relacionado à basicidade dos compostos. As chalconas testadas não são

fortemente básicas e tiveram uma baixa atividade biológica, comprovando assim, a importância desta propriedade para sua acumulação no vacúolo alimentar do parasito, o suposto local de ação das moléculas (DOMÍNGUEZ et al, 2005a).

As chalconas treze e quinze possuem diferentes grupos substituintes no anel A, 2,4-difluoro e 3-piridinil, com excelente atividade de inibição da formação da β -hematina, aparentemente devido à propriedade de eletrodoador dos grupos, apresentando-se com nível interessante de atividade. Em geral, pode-se especular que os grupos eletroatraentes no anel aromático substituído para estas chalconas sulfonamidas poderiam favorecer a adição de Michael a uma cadeia lateral nucleofílica disponível na enzima (DOMÍNGUEZ, 2005a).

Resumindo os resultados das séries de chalconas alcoxiladas e halogenadas, a relação estrutura-atividade pode estar envolvida com o efeito de ressonância do sistema de Michael como grupo farmacóforo e o através do efeito indutivo dos grupos substituídos. Porém, é claro que a predominância do efeito eletronegativo do difluorido pode promover uma interação química mais forte no sítio do substrato biológico (DOMÍNGUEZ, 2005a).

A 2,4-dimetoxi-4'-butoxichalcona (Figura 21) mostrou excelente atividade antimalárica contra *P. falciparum*, *in vitro*, e *P. berghei*, *in vivo*, sem sinais de toxicidade detectáveis. A molécula exibiu efeito dose-dependente em *P. falciparum* susceptíveis (cepa 3D7 com IC_{50} de 8,9 μ M) e resistente (cepa Dd2 com IC_{50} de 14,8 μ M) a cloroquina. Essa chalcona inibiu completamente a parasitemia dos ratos infectados com *P. berghei* (K173) e os protegeu da infecção letal na dose de 50 mg/kg/dia (CHEN et al, 1997).

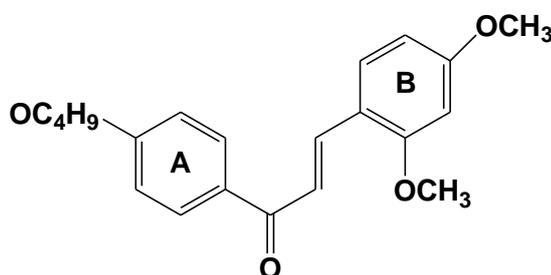


Figura 21. Estrutura molecular da 2,4-dimetoxi-4'-butoxichalcona.

Em uma série de chalconas fenilurenil com substituição no anel A, Domínguez e colaboradores (2005b) sugeriram que a atividade na maioria dos casos foi governada por grupos (difluoro, dicloro, trimetoxi) ligados a este anel. Essas chalconas foram excelentes inibidores do crescimento de *P. falciparum* *in vitro* (IC_{50} entre 1,76 e 10 μ M) com boa

correlação em murinos. Na série de derivados 4'-fenilurenil (Figura 22, moléculas 16-18), a posição *para* no anel urenil tem importante papel na atividade antimalárica, sendo as chalconas cloradas mais ativas. Porém, as chalconas 3'-fenilurenil (Figura 22, moléculas 19-22) foram mais ativas, quando comparados as chalconas 4'-fenilurenil correspondentes.

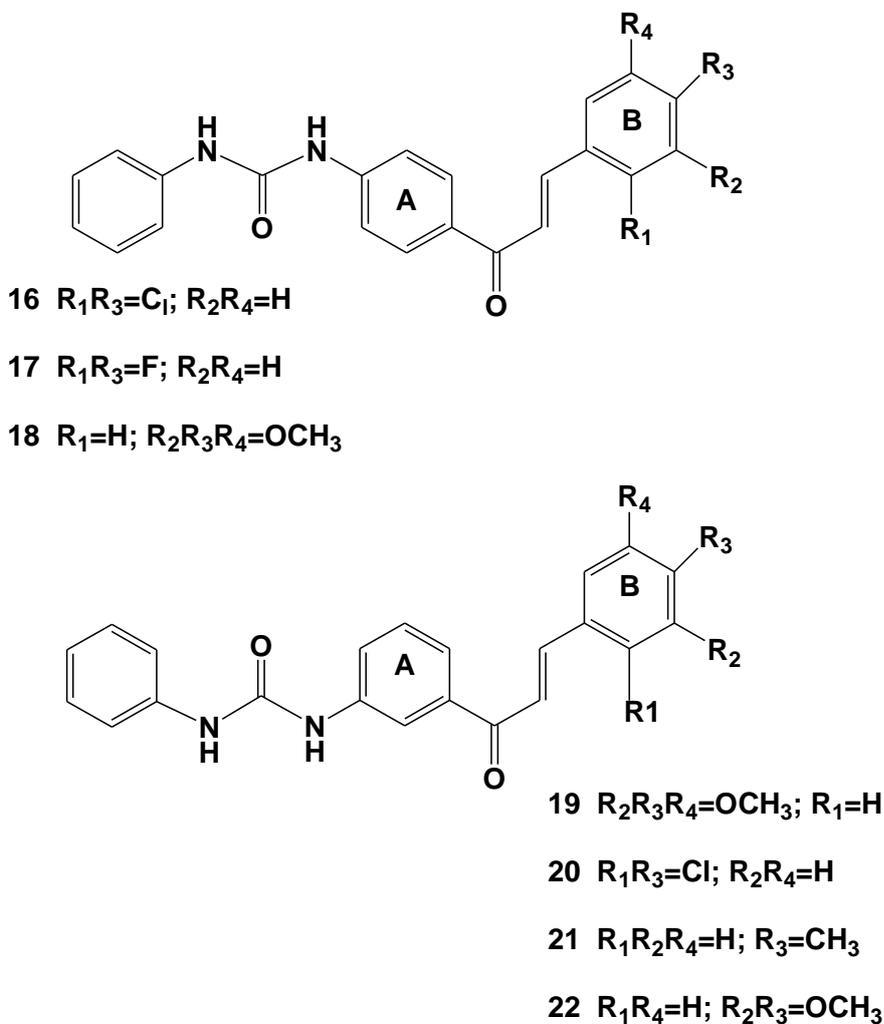


Figura 22. Estrutura molecular da série de chalconas 4'-fenilurenil e 3'-fenilurenil substituídos no anel A da chalcona.

Soulere e colaboradores (2003) observaram, em ensaios *in vitro*, que a 4'-terc-butil-4-bromo-chalcona inibe a superóxido dismutase de *P. falciparum* (*Pf* SOD) recombinante (83% a 50 μ M) e mostra atividade antimalárica significativa contra cepas de *P. falciparum* sensível (HB3 com IC_{50} de 37 μ M) e resistente (Dd2 com IC_{50} de 27 μ M) à cloroquina. A diminuição da atividade da SOD induzida por chalcona poderia ser atribuída à modificação covalente que ocorre em resíduos carregados positivamente responsáveis pelo controle

eletrostático da difusão de substrato, situado à entrada do canal conduzindo acerca do íon metal ativo.

Larsen e colaboradores (2005) resumiram a atividade antiplasmodial de duas séries de análogos de chalconas restritos conformacionalmente (*E* e *Z*) e suas estruturas bases contra *P. falciparum* 3D7. Os análogos com dupla ligação na conformação *Z* foram mais ativos, quando comparados aos análogos correspondentes de natureza fixa na conformação *E*, que foram equípotentes às suas estruturas bases.

A atividade antimalárica *in vivo* de bischalconas (Figura 23) também foi testada contra cepas de *P. berghei*, *in vivo*, sensíveis e resistentes à cloroquina. O trabalho mostra que os substituintes oxigenados do anel fenil tem uma grande influência no perfil de atividade antimalárica. Em geral, chalconas com substituintes 3-metoxi e 3,4-dimetoxi exibiram uma atividade significante em comparação aos substituintes 2,4-dimetoxi e as moléculas que tinham três grupos metilenos (em cada cadeia) contribuíram significativamente para atividade biológica que as cadeias com grupos de quatro e seis metilenos (RAM et al, 2000).

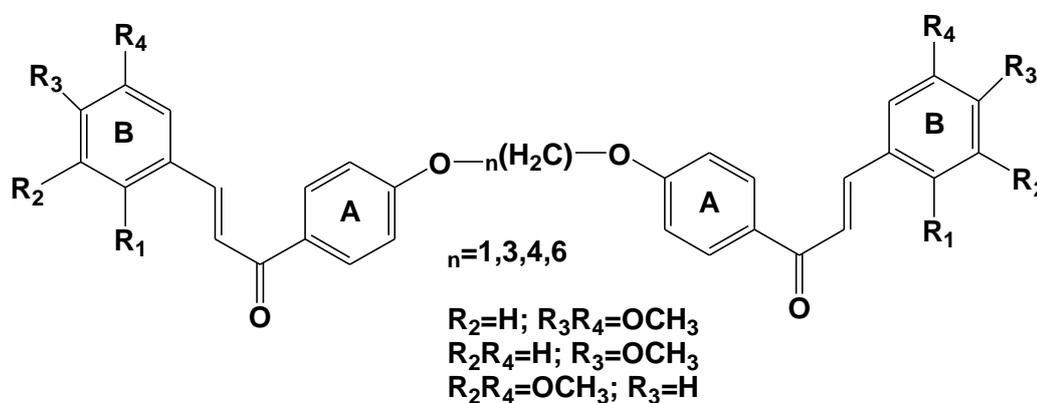


Figura 23. Fórmula molecular de bischalconas.

Atividade antimalárica de uma série de chalconas de ferrocenil foi avaliada *in vitro* contra cepas de *P. falciparum*, resistentes à cloroquina. As combinações mais ativas foram 1-(3-piridil)-3-ferrocenil-2-propen-1-ona e 1-ferrocenil-3-(4-nitrofenil)-2-propen-1-one com IC_{50} de 4,5 e 5,1 mM, respectivamente. No entanto, não foi possível explicar as diferentes atividades pelo tamanho e lipofilicidade das moléculas (WU; WILAIRAT; GO, 2002).

Ao comparar espécies de protozoários, Liu e colaboradores (2003) concluíram que para cada tipo de atividade biológica, a eficácia das chalconas exige parâmetros moleculares distintos. Segundo o autor, as chalconas com maior atividade leishmanicida (amastigotas) são pouco lipofílicas, em particular, aquelas 4'-hidroxil-substituídas no anel B e com o anel A hetero/poliaromático. Por outro lado, as chalconas com boa atividade contra *P. falciparum* (K1) apresentam no anel A, substituídas alcoxiladas e eletrodeficiência no anel B. Menciona ainda que os resultados eletrostáticos e estéricos gerados pela análise de campo molecular comparativo (CoMFA) indicam que o anel A teve uma maior contribuição para atividade leishmanicida e ambos os anéis foram importantes para atividade antimalárica.

A 4-hidroxi-chalcona relacionada (Figura 24), derivada da β -ionona exibiu um bom e reprodutível efeito inibitório em cultura de *P. falciparum*, com IC_{50} de 4,93 (K1) e 8,47 μ M (Thai). De acordo com Liu e colaboradores (2003) compostos com valores de IC_{50} inferiores a 10 μ M podem ser considerados com excelente atividade, mesmo se estes valores forem mais altos que os da cloroquina.

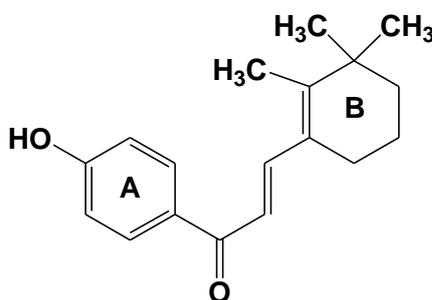


Figura 24. Estrutura molecular da 4-hidroxi-chalcona relacionada.

Os alvos das chalconas no plasmódio não foram claramente identificados em estágios eritrocíticos de *P. falciparum* (Thai e K1). As chalconas são consideradas inibidores de falcipaina, protease de cisteína de *P. falciparum* (DOMÍNGUEZ et al, 2001; LI et al, 1995). Em contraste com o potente efeito inibitório das chalconas sobre a função mitocondrial da *Leishmania donovani* (LIU et al, 2003), o mecanismo de ação no plasmódio permanece a ser esclarecido, pois a mitocôndria do parasito em estágio eritrocítico é considerada funcionalmente quiescente. Entretanto, recentes experimentos bioenergéticos (DESJARDINS et al, 1979; UYEMURA et al, 2000) e dados do projeto genoma sugerem que as mitocôndrias dos estágios sanguíneos do parasito podem realizar a fosforilação oxidativa e apresentar várias enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. SUBSTÂNCIAS EM ESTUDO.

Quatro derivados de chalconas e duas chalconas (Figura 25) foram sintetizados por Bitencourt (2008), no Laboratório de Síntese Orgânica da Faculdade de Química, Universidade Federal do Pará, Belém-PA. As moléculas foram testadas em cultivo *in vitro* de *P. falciparum*, no Laboratório de Pesquisas em Malária do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro-RJ.

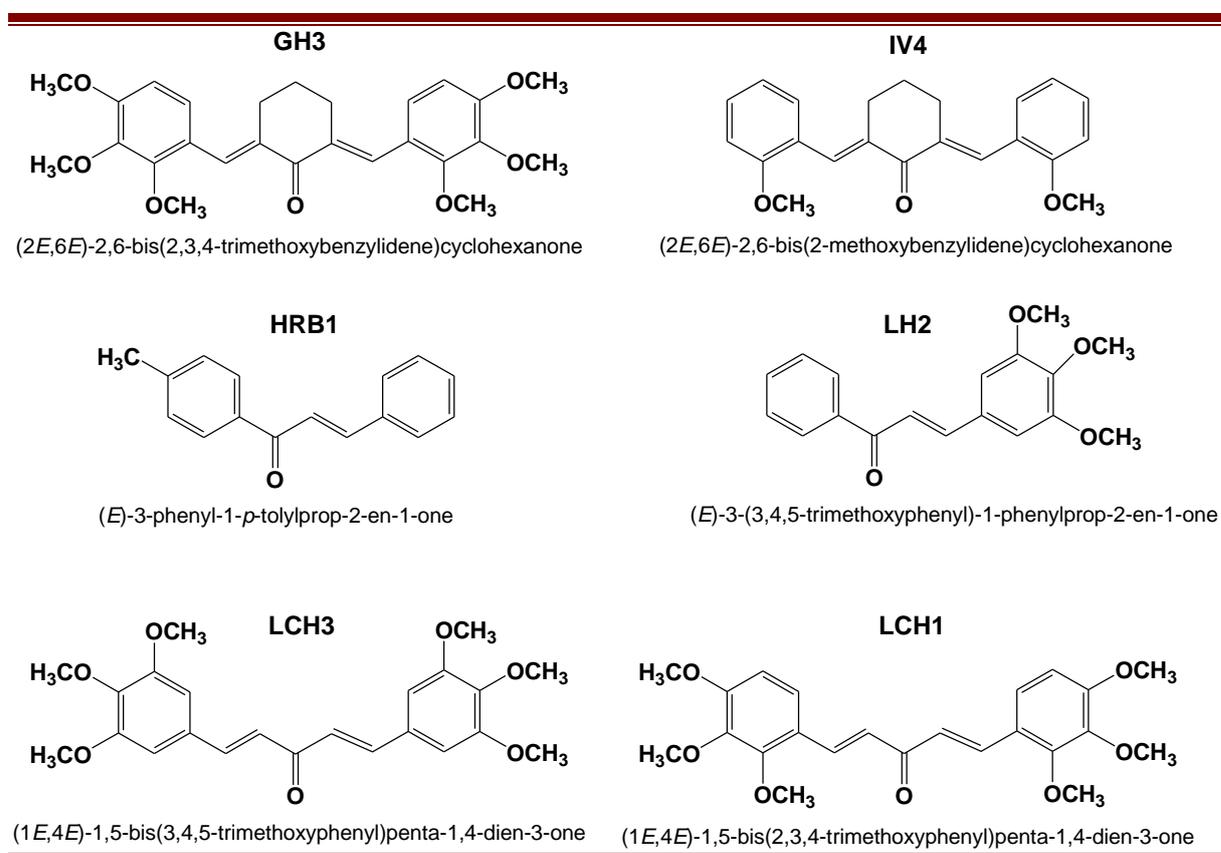


Figura 25. Estruturas moleculares em duas dimensões das substâncias em estudo.

Quatro derivados de chalconas são estruturalmente simétricas (GH3, IV4, LCH1, LCH3), sendo que duas delas apresentam um anel alifático entre os dois sistemas de Michael (GH3 e IV4). As duas restantes possuem a estrutura base de chalcona. À exceção da HRB1, que possui uma metila, todas as moléculas possuem metoxilas como substituintes nos anéis benzênicos. Para facilitar a análise e discussão dos resultados, as substâncias ganharam um código identificador (ver Figura 25).

As chalconas tiveram sua atividade antimalárica comprovada em muitos estudos (CHEN et al, 1994; KHARAZMI et al, 1997; YENESEW, 2004; NARENDER et al, 2005; FRÖLICH et al, 2005; LIU et al, 2001; LIU et al, 2003; DESJARDINS et al, 1979; UYEMURA et al, 2002; WU; WILAIRAT; GO, 2002; RAM et al, 2000; XUE et al, 2004; LARSEN et al, 2005; SOULERE et al, 2003; DOMÍNGUEZ et al, 2005b; DOMÍNGUEZ, 2005a; CHEN et al, 1997; GO et al, 2004; DOMÍNGUEZ et al, 2001; LI et al, 1995). Entretanto, selecionamos chalconas metoxiladas ainda não testadas, e, com base na literatura disponível, realizamos a análise comparativa entre parâmetros moleculares e a atividade biológica com o objetivo de identificar um grupamento químico importante para a atividade biológica em questão.

4.2. DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE *in vitro* DO *P. falciparum* ÀS DROGAS

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

Para a determinação da sensibilidade *in vitro* de *P. falciparum* às drogas, a cepa brasileira PSS1 (sensível à cloroquina) foi cultivada de acordo com o método descrito por Trager & Jensen (1976).

Os parasitos foram cultivados em hemácias do tipo O, fator Rh+ (obtidas no IBEX - Instituto de Biologia do Exército – Rio de Janeiro-RJ), com hematócrito a 5% em meio de cultura RPMI 1640 (*Sigma*), tamponado com 35 mM de HEPES (*Sigma*), 24 mM bicarbonato de sódio (*Sigma*), 1mg/L de hipoxantina (*Sigma*) e 5 µg/mL de gentamicina (*Sigma*). O meio para cultivo foi enriquecido com 10% de soro humano, de mesma tipagem sanguínea, e inativado a 56 °C durante 30 min. O meio completo continha pH final em torno de 7,0. Os parasitos foram cultivados a 37 °C em garrafas de cultura (*Nunc*, Nova Iorque, EUA), contendo uma mistura de gases com: 5 % de O₂, 5 % de CO₂ e 90 % de N₂ (*White Martins*, Rio de Janeiro, Brasil).

As trocas do meio de cultura e contagem da parasitemia foram realizadas diariamente (Figura 26). Quando a concentração parasitária atingia um valor maior que 1%, acrescentavam-se hemácias para diluir o cultivo, preservando o hematócrito em torno de 5%.

$$\text{Parasitemia (\%)} = \frac{(\text{Hemácias parasitadas} \times 100)}{\text{Hemácias totais}}$$

Figura 26. Equação para cálculo de concentração parasitária em porcentagem.

A fim de se evitar interferências diversas na avaliação da concentração da desidrogenase láctica do *P. falciparum* (PfLDH) o soro foi substituído por Albumax a 0,5%, como forma de padronização do método. A cultura também foi suplementada com 1,5% de hipoxantina e mantida por uma semana até o parasito se adequar ao novo meio.

4.2.2. Sincronização das formas evolutivas jovens de *P. falciparum*

A cultura foi mantida até a obtenção de uma parasitemia de pelo menos 4% e predomínio de trofozoítos jovens. Esse cenário foi necessário para uma boa sincronização das formas evolutivas do plasmódio, já que todas as formas maduras são mortas no procedimento. O cultivo foi sincronizado duas vezes em cada experimento através do tratamento com sorbitol (*Merck*), com um intervalo de, pelo menos, 26h entre as sincronizações, para uma melhor sincronia das formas jovens, de acordo com a técnica descrita por Lambros & Vanderberg (1979).

A cultura foi transferida para tubos de 15 mL (Falcon, BD) e centrifugada a 350 g por 5 min à temperatura ambiente. Ao sedimento foi adicionada uma solução de sorbitol a 15 % e glicose (*Sigma*) a 0,1 %, 3,3 vezes o volume do precipitado de eritrócitos. Logo após incubação da suspensão de hemácias (5 min a 37 °C), foi adicionada uma solução de glicose a 0,1 % na proporção de 6,67 vezes o volume inicial do sedimento. A suspensão foi novamente incubada, durante 5 min, a 37 °C, seguindo-se centrifugação por 5 min à temperatura ambiente.

Quando a cultura atingiu a proporção ideal para realização do ensaio (predomínio de pelo menos 90% de formas trofozoítos jovens), a suspensão de hemácias parasitadas foi ajustada para 6% de hematócrito e 0,5% de parasitemia.

4.2.3. Diluição das drogas

➤ Soluções de estoque

As substâncias avaliadas foram pesadas e diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO, *Sigma*) previamente à realização dos ensaios, como forma de manter sua estabilidade química, para uma concentração de 64 mM.

➤ Soluções de trabalho

Para o ensaio farmacológico, as soluções foram diluídas em meio RPMI com Albumax a partir das soluções concentradas de cada droga. As substâncias em análise foram utilizadas na diluição de 1:1000, e concentração final de 64 μ M. Essa concentração é importante para a obtenção de uma diluição com fração insignificante de dimetilsulfóxido (DMSO), para evitar a toxicidade ao parasito. Todas as moléculas em estudo foram diluídas para essa concentração, a fim de ser comparado os resultados, além da base teórica de IC_{50} encontradas na literatura (LIU et al, 1995).

➤ Soluções das drogas-controle

Os sais de cloroquina e de mefloquina foram utilizados como controle de inibição de crescimento/maturação do parasito. A cloroquina foi diluída em metanol absoluto e meio RPMI (na proporção de 3:7) para uma concentração final de 4,6 μ M. A mefloquina foi diluída em metanol absoluto para uma concentração final de 0,36 μ M.

4.2.4. Ensaio farmacológico

A partir das soluções diluídas, preparou-se a placa com as diluições seriadas de cada droga em quadriplicata (Figura 27). Partindo-se das soluções diluídas (64 μ M), foram feitas 10 diluições de 1:2, tendo o primeiro poço, uma concentração de 12,8 μ M. Nos poços das colunas 2-10 da placa de 96 poços, foram colocados 50 μ L do meio de cultura completo com albumax. Nos poços da coluna 1 foram adicionados 100 μ L da solução diluída de cada droga. Então, foram retirados 50 μ L da primeira coluna e homogeneizados na segunda coluna. Assim, os poços da coluna 2 ficaram com 100 μ L da droga em uma concentração final de 32 μ M (50 μ L de meio e 50 μ L de droga a 64 μ M). A solução da coluna 2 foi homogeneizada e 50 μ L foram transferidos para a coluna 3, que ficou com uma concentração final de 16 μ M.

Esse procedimento foi repetido sucessivamente até coluna 10, sendo homogeneizados e descartados 50 μ L.

Posteriormente, 200 μ L da suspensão de hemácias parasitadas com predomínio de trofozoítos jovens, parasitemia de 0,5% e hematócrito de 1,5 % foram depositados em cada poço da placa de cultura. As placas foram mantidas em estufa de CO₂ a 37°C por 48 h. Desse modo, foram obtidas 10 diluições seriadas das substâncias em estudo, partindo do primeiro poço a 12,8 μ M (12,8 μ M, 6,4 μ M, 3,2 μ M, 1,6 μ M, 0,8 μ M, 0,4 μ M, 0,2 μ M, 0,1 μ M, 0,05 μ M e 0,025 μ M). Nos poços da coluna 11 não foi adicionada droga, servindo de controle de crescimento do parasito. Os poços da última coluna (12) não foram utilizados para o teste.

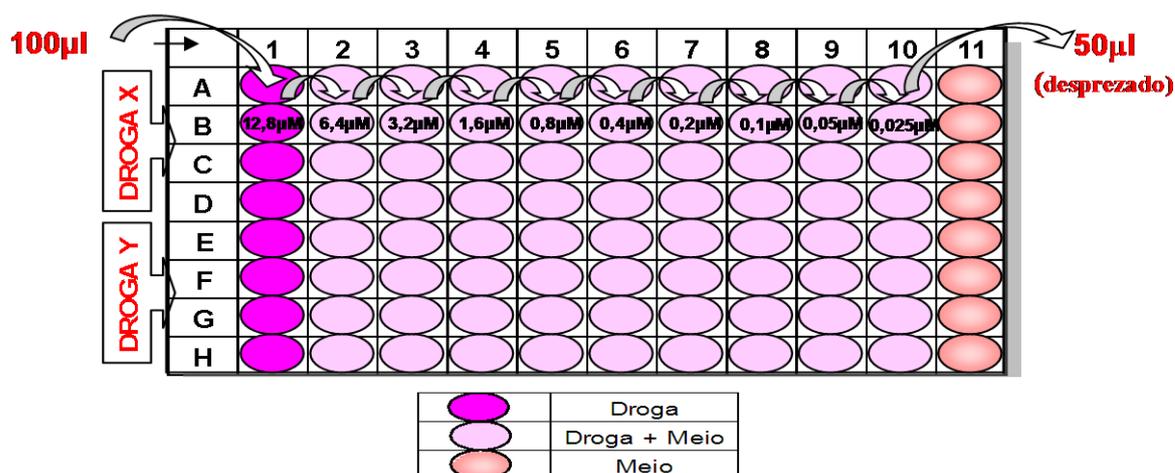


Figura 27. Placa de ELISA para teste de quimiossensibilidade de *P. falciparum* em cultura.

Ao fim desse período, o sobrenadante de um dos poços da coluna 11 (sem drogas) foi descartado e, com o precipitado de hemácias, foi confeccionada uma lâmina de distensão sanguínea que foi corada pelo método panótico rápido (*Merck*) para avaliação do crescimento e maturação do parasito. A placa foi envolvida em filme plástico tipo PVC e em papel alumínio e, posteriormente, congelada a -20°C até a realização do DELI-teste.

4.2.5. Deli-teste

Para a realização do Deli-teste, após as 48h de cultivo exposto às drogas, as placas foram congeladas e descongeladas três vezes seguidas para romper totalmente as membranas e liberar a *Pf*LDH contida nos parasitos viáveis.

Os anticorpos monoclonais utilizados (Dr Michael Makler, Flow Inc., Portland, EUA) foram:

- o MAb **17E4** monoclonal específico para lactato desidrogenase de *P. falciparum* (*Pf*LDH) (detecção);
- o MAb **19G7** anti-LDH gênero-específico marcado com biotina (revelação).

Placas de ELISA (*Nunc/ Maxisorp*) foram sensibilizadas *overnight* a 4°C com 100 µL de uma solução do anticorpo de captura MAb 17E4 a 1 µg/mL diluídos em solução salina tamponado com PBS (*Sigma* - Phosphate Buffered Saline) (0,1 M de NaCl, 10 mM de Na₂HPO₄, 3 mM de KH₂PO₄) em pH 7,4. As placas foram lavadas com PBS acrescido de 0,5% de Albumina de Soro Bovino (PBS-BSA) e saturadas durante quatro horas com uma solução de PBS suplementada com 1% de BSA, a temperatura ambiente. O lisado de cada poço da placa de cultura previamente congelada e descongelada foi transferido (puro ou diluído em PBS-DELI) para as placas de ELISA. As placas foram incubadas durante 1 hora a 37°C e, em seguida, lavadas cinco vezes com PBS-BSA. Após a lavagem foram adicionados 100 µL de solução de anticorpos monoclonais biotinizados 19G7 diluída de 1/4000 em PBS-BSA e, então, as placas foram incubadas durante 1 hora a 37°C. Após a segunda incubação, as placas foram novamente lavadas cinco vezes com PBS-BSA e, finalmente, incubadas com estreptavidina-peroxidase (*Sigma*) diluída 1:10.000 em PBS-1% de BSA, à temperatura ambiente durante 30 min. As placas foram novamente lavadas cinco vezes com PBS-BSA. Posteriormente foram adicionados 100 µL do substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) e as placas foram mantidas por 5 min ao abrigo da luz. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido fosfórico (H₃PO₄) 1M, e a leitura da intensidade óptica foi realizada em um espectrofotômetro (TP-Reader Thermoplate) a 450nm.

4.2.6. Cálculo da concentração inibitória em 50% do crescimento parasitário (IC₅₀)

As concentrações inibitórias das drogas em 50% do crescimento do parasito (IC₅₀) foram calculadas a partir de curvas traçadas em gráficos de concentrações de drogas e suas respectivas densidades ópticas (DOs). No gráfico, as curvas ideais devem ser do tipo sigmoidal onde se discrimina uma reta de inibição, que caracteriza a inibição dose-dependente do parasito pela droga. Desta reta deduz-se uma equação que vai servir para o cálculo das IC₅₀.

A IC₅₀ é calculada a partir da densidade ótica média (DO_{IC50}) que é obtida pelo somatório da metade da diferença entre as densidades máximas e mínimas e a densidade mínima (Figura 28). Então, projeta o dado (DO_{IC50}) na equação da reta obtida por regressão simples não linear, determinando-se a concentração de droga inibitória em 50% de crescimento/maturação do parasito. As estatísticas foram calculadas no programa *NONLIN*, com nível de significância (*p*) de 0,01.

$$DO_{IC50} = \frac{(DO \text{ máxima} - DO \text{ mínima})}{2} + DO \text{ mínima}$$

Figura 28. Equação para cálculo da densidade ótica na concentração inibitória em 50%.

4.3. MODELAGEM MOLECULAR DAS SUBSTÂNCIAS EM ESTUDO.

Os cálculos teóricos empregados para determinação da estrutura geométrica e obtenção de parâmetros moleculares das substâncias a serem testadas foram realizados com o emprego dos métodos PM3 (Terceira Parametrização Molecular) semi-empírico e Densidade Funcional (DFT - Theory of Functional Density).

Propriedades físico-químicas foram calculadas para avaliar as possíveis correlações entre a estrutura das moléculas e atividade antiplasmodial (STEWART, 1989). Parâmetros químicos, como: energia de hidratação, polarizabilidade e volume foram obtidos a partir do método PM3 no programa HYPERCHEM 7.5 (2002). O método da teoria do funcional de densidade foi usado para calcular o mapa de potencial eletrostático (MEP), o HOMO e o LUMO, utilizando-se o programa GAUSSIAN 03 (2003), com notação B3LYP (funcional com três parâmetros). Esse cálculo é realizado a partir do funcional de troca de Becke (1996) combinado com o funcional de correlação de Lee, Yang e Parr (1988) e com os

orbitais de Kohn e Sham (1965), obtidos pela equação de Schrödinger com o conjunto de base 6-31G* (PARR; YANG, 1989). O programa CHEM 3D 9.0 (2004) foi utilizado para os cálculos do logaritmo de coeficiente de partição octanol/água (CLog P).

Todos os cálculos foram operados em ambiente Windows XP (Microsoft®), em computadores Pentium IV com processador Intel 2.4 MHz, HD com capacidade de 80 Gigabytes e memória RAM de 1 Gigabyte, disponíveis nos Laboratórios: de “Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos”, da Faculdade de Química, e de “Química Farmacêutica”, da Faculdade de Farmácia, ambos da Universidade Federal do Pará.

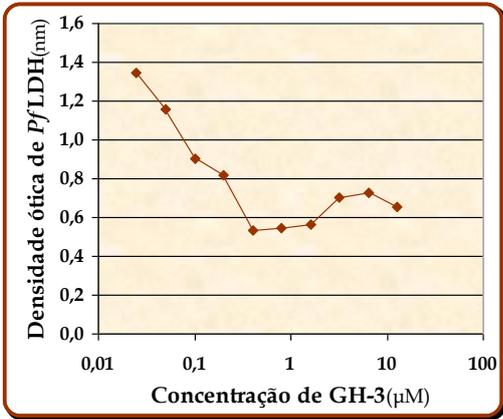
Os parâmetros moleculares calculados foram correlacionados com as concentrações inibitórias (IC₅₀), através da correlação de *Spearman*, para se avaliar uma possível relação estrutura-atividade.

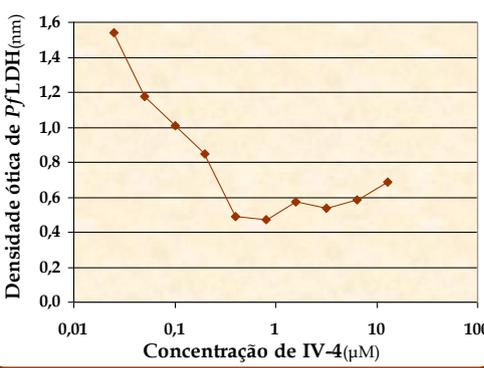
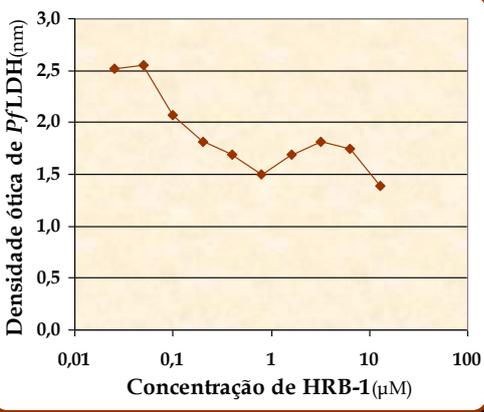
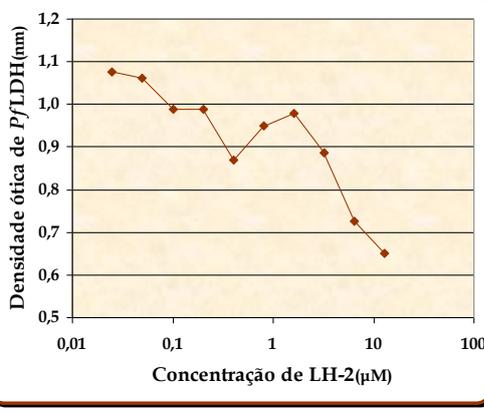
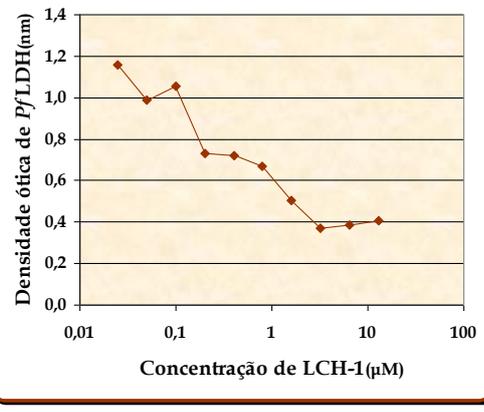
5. RESULTADOS

5.1. ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL (*in vitro*) DAS SUBSTÂNCIAS EM ESTUDO.

As substâncias (**GH3**, **IV4**, **HRB1**, **LH2**, **LCH3** e **LCH1**) (Figura 25) demonstraram atividade contra o *P. falciparum* (PSS1) estatisticamente significativa (ANOVA, $p < 0,01$), quando as densidades óticas dos poços, com diferentes concentrações das substâncias ativas, foram comparadas com as densidades óticas dos poços de controle negativo de inibição do crescimento do parasito (poços sem drogas). As substâncias ativas mostraram uma tendência de curva de inibição do tipo sigmoidal, como representado na tabela 3.

Tabela 3. Gráficos de inibição, e respectivas concentrações inibitórias em 50% (IC₅₀) do crescimento do *P. falciparum* expressos em densidade ótica (DO) da PfLDH obtidas com diferentes concentrações das substâncias ativas e controles (cloroquina e mefloquina) nos dois experimentos realizados.

Efeito antiplasmodial <i>in vitro</i> dos derivados das chalconas (48h) - curva dose-resposta	1º e 2º experimentos**	
	IC ₅₀	R ² *
	0,20	1,0000
	0,20	1,0000

 <p>Densidade ótica de PfLDH(nm)</p> <p>Concentração de IV-4(µM)</p>	0,20	1,0000
 <p>Densidade ótica de PfLDH(nm)</p> <p>Concentração de HRB-1(µM)</p>	0,20	0,9740
 <p>Densidade ótica de PfLDH(nm)</p> <p>Concentração de LH-2(µM)</p>	0,215	0,9186
 <p>Densidade ótica de PfLDH(nm)</p> <p>Concentração de LCH-1(µM)</p>	0,237	0,9999

	-	-
	0,576	0,9953
	0,495	0,9919
	0,100	1,0000

* R^2 – Correlação de *Pearson* na reta de inibição.

** $p \leq 0,01$

Os dados de concentração inibitória em 50% (IC_{50}) de crescimento de parasitos, expressos em micromolar (μM), são mostrados na tabela 4. As curvas foram reprodutíveis, excetuando-se aquelas obtidas para LCH1 e LCH3, pois suas densidades óticas foram semelhantes em todos os poços com drogas.

As substâncias ativas também foram comparadas com dois controles positivos de inibição, a cloroquina e a mefloquina (Tabela 4). A IC_{50} da cloroquina foi de $0,54 \pm 0,38 \mu M$ e a da mefloquina foi de $0,1 \pm 0,0 \mu M$.

Tabela 4. Concentrações inibitórias mínimas em 50% do crescimento do *P. falciparum* (IC₅₀) das substâncias ativas, cloroquina e mefloquina, expressos em micromolar (μM).

Drogas	IC₅₀ (μM)
<i>GH-3</i>	0,20±0,00
<i>IV-4</i>	0,20±0,00
<i>HRB-1</i>	0,20±0,00
<i>LH-2</i>	0,21±0,007
<i>LCH-1</i>	0,24
<i>LCH-3</i>	1,70
<i>Cloroquina</i>	0,54±0,038
<i>Mefloquina</i>	0,10±0,00

As substâncias GH3 e IV4 obtiveram curvas de inibição semelhantes com platô de concentração de *Pf*LDH definidos a partir da concentração de 0,8 μM de substâncias. O gráfico delineado em HRB1 apresentou dois platôs de concentração de *Pf*LDH, o primeiro, nas duas concentrações mais baixas (0,025 e 0,05 μM), e o segundo, a partir de 0,8 μM. Já a curva da LH2 não apresentou uma curva tipo sigmoidal bem delineada, mas foi possível calcular sua concentração inibitória em 50% de crescimento de parasitos através do programa estatístico. As duas substâncias (LCH1 e LCH3) que não tiveram reprodutibilidade apresentaram curvas semelhantes, com um decaimento pronunciado a partir de 3,2 μM.

5.2. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS TEÓRICAS DAS SUBSTÂNCIAS EM ESTUDO.

Através de programas de modelagem molecular é possível calcular propriedades físico-químicas de substâncias de interesse terapêutico. Novos agentes terapêuticos podem ser desenvolvidos com base na avaliação da relação estrutura-atividade, onde os dados estruturais podem ser obtidos por técnicas de modelagem molecular. As características estruturais das substâncias calculadas teoricamente podem resultar em parâmetros potencialmente indicadores de atividade biológica. No trabalho, foram estudados parâmetros eletrônicos, como os orbitais moleculares de fronteira e o potencial eletrostático, e parâmetros estéricos,

como o coeficiente de partição, a energia de hidratação, a polarizabilidade e o volume molecular.

5.2.1. Parâmetros eletrônicos

➤ HOMO e LUMO

O HOMO pode indicar a propensão de uma molécula em doar elétrons, caracterizando a nucleofilicidade, e o LUMO pode indicar a propensão de uma molécula em receber elétrons, caracterizando a eletrofilicidade. A importância dessa propriedade está diretamente relacionada com o tipo de interação da substância com o seu receptor, assim, se a atividade tiver uma correlação com o LUMO então, para a substância ser ativa, a substância tem que receber elétrons do receptor.

A chalcona GH3 foi a substância com maior valor para HOMO, sendo a substância ativa mais nucleolífica (Tabela 5). O menor valor de LUMO foi o de LCH3, sendo a substância ativa eletrofílica. Os valores dos orbitais foram correlacionados com as IC₅₀ e obtida uma correlação inversa entre o LUMO e a IC₅₀ (rs = 0,88) e relação direta com a atividade biológica. Por outro lado, não houve correlação entre os valores de HOMO e a atividade biológica, expressa pelas IC₅₀ (rs = 0,34) das drogas.

Tabela 5. Correlação entre os valores dos orbitais de fronteira (HOMO e LUMO) das substâncias ativas e suas respectivas IC₅₀.

Drogas	HOMO – (eV)	Correlação de Spearman (rs)*	LUMO + (eV)	Correlação de Spearman (rs)**	IC ₅₀ (μM)
<i>GH3</i>	-8.822456		-0.8085309		0,20
<i>IV4</i>	-9.115972		-0.8274031		0,20
<i>HRB1</i>	-9.184976		-0.8284381		0,20
<i>LH2</i>	-9.063787	0,33	-0.9426855	0,88	0,21
<i>LCH1</i>	-8.90621		-0.9026766		0,24
<i>LCH3</i>	-9.042512		-1.078319		1,70

* $p = 0,5$

** $p = 0,02$

Os valores de energia dos orbitais moleculares podem ser utilizados em um estudo de reatividade entre o ligante e seu receptor. Entretanto, a análise dos coeficientes dos orbitais pode dar indícios das possíveis regiões para o ataque nucleofílico (demonstrados nos gráficos de HOMO) ou eletrofílico (demonstrados nos gráficos de LUMO). Na figura 29 estão demonstradas as densidades eletrônicas dos orbitais de fronteira. Quanto maior a nuvem eletrônica, maior a probabilidade de reatividade nucleofílica (HOMO) ou eletrofílica (LUMO). As maiores regiões doadoras de elétrons demonstradas nos gráficos de HOMO encontram-se na posição α -carbonila. Enquanto que, as maiores regiões receptoras de elétrons demonstradas nos gráficos de LUMO mostram a posição β -carbonila como principal sítio de interação com um grupo rico em elétrons.

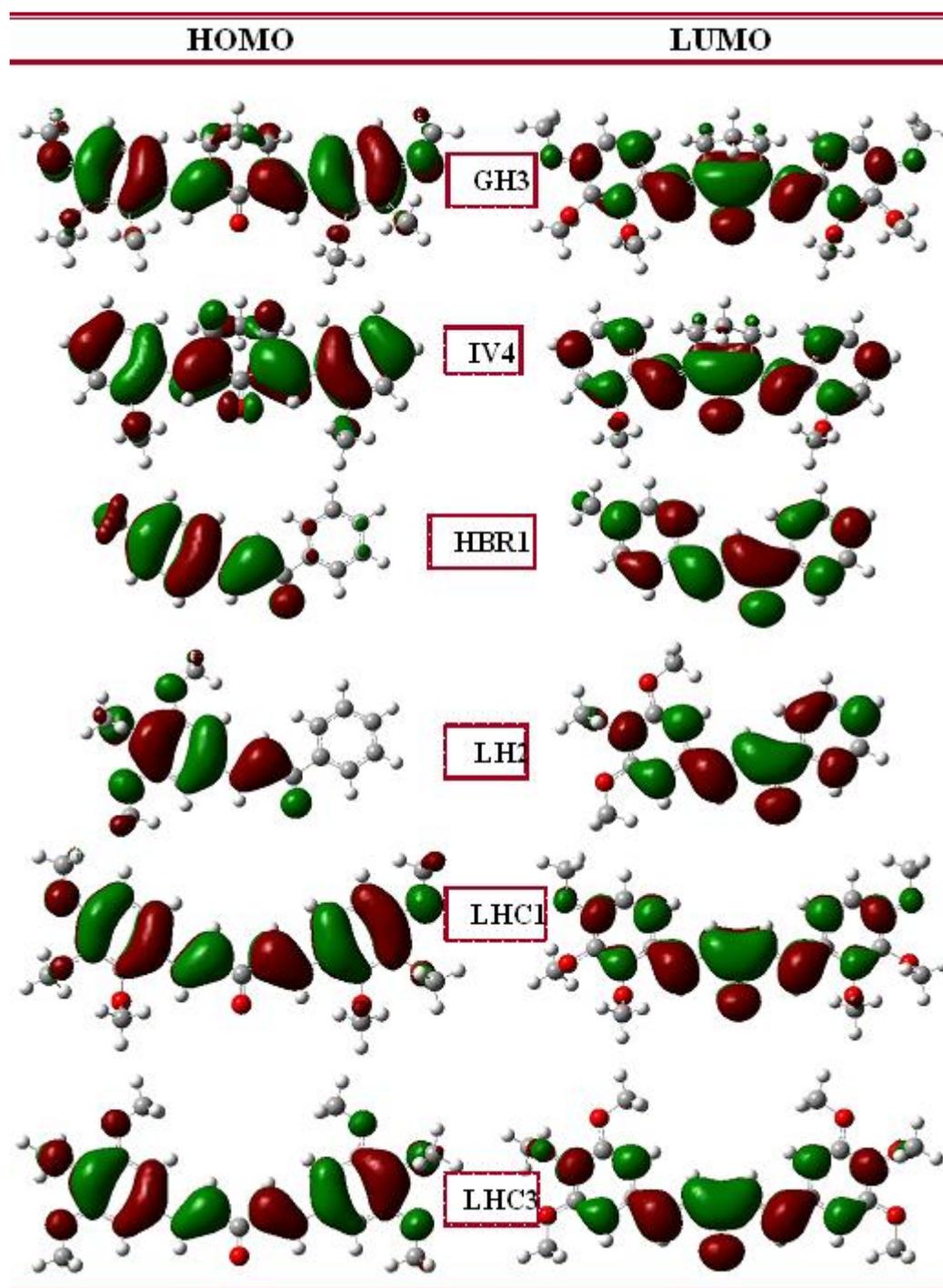


Figura 29. Orbitais de fronteira (HOMO e LUMO) das substâncias ativas em estudo.

➤ Potencial Eletrostático

Outro gráfico importante que descreve as regiões ricas e deficientes de elétrons, que podem indicar um possível ataque localizado de um nucleofílico ou eletrofílico, respectivamente, é o mapa do potencial eletrostático (MEP). O MEP mostra que as regiões mais ricas em elétrons ou nucleofílicas (destacadas em vermelho) estão localizadas no oxigênio das metoxilas e das carbonilas das moléculas (Figura 30). As regiões deficientes em elétrons ou eletrofílicas (representadas em azul) não são nítidas (Figura 30).

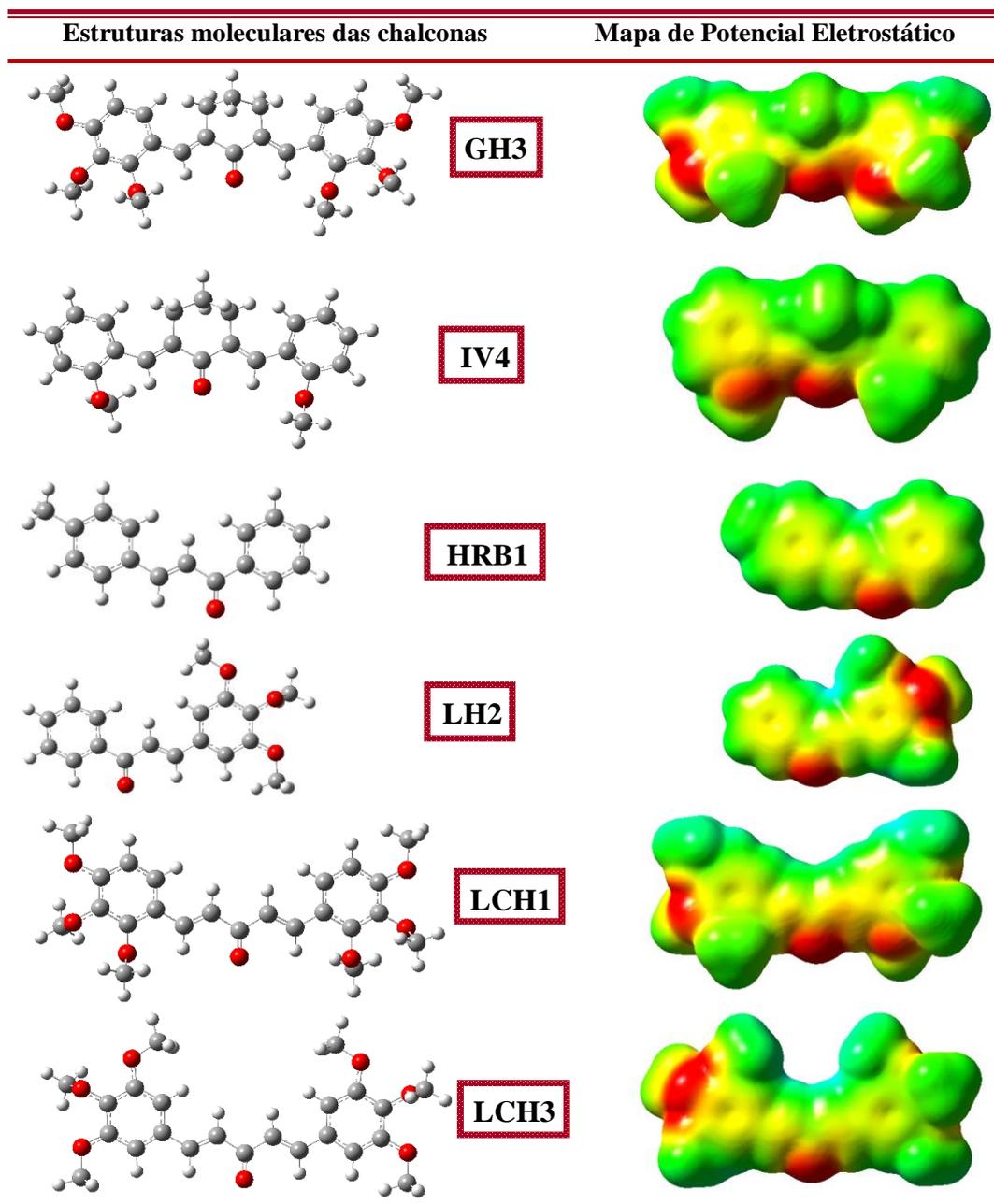


Figura 30. Estrutura molecular em três dimensões e mapa de potencial eletrostático das substâncias ativas em estudo.

5.2.2. Parâmetros estéricos

Os valores de coeficiente de partição octanol/água (C log P) e a energia de hidratação foram utilizados como parâmetros de lipossolubilidade e solubilidade em água, respectivamente, enquanto que a polarizibilidade e o volume foram calculados para análise da importância do ajuste estérico ou conformacional da molécula em seu receptor.

➤ Coeficiente de partição octanol/água (C log P)

O coeficiente de participação P estudado para o sistema octanol/água (C log P) foi adotado como um dos principais parâmetros capaz de descrever o caráter hidrofóbico, sendo um modelo otimizado para o processo de transferência da substância entre a fase aquosa e não aquosa (LEO; HANSCH; ELKINS, 1971). Em nossos resultados, a molécula IV4 apresentou o maior valor para o C log P, seguidas pelas GH3 e HRB1. A correlação direta entre atividade antiplasmodial e a lipofilicidade foi de 0,92 (Tabela 6).

Tabela 6. Correlação entre os valores do coeficiente de partição octanol/água das substâncias ativas e suas respectivas IC₅₀.

Drogas	C logP	IC ₅₀ (μM)	Correlação de Spearman (rs)*
<i>GH3</i>	3.9312	0,20	0,92
<i>IV4</i>	5.169	0,20	
<i>HRB1</i>	4.123	0,20	
<i>LH2</i>	2.9241	0,21	
<i>LCH1</i>	2.8782	0,24	
<i>LCH3</i>	2.8782	1,70	

* $p = 0,01$

➤ Energia de Hidratação

A energia de hidratação de uma substância farmacologicamente ativa quantifica a energia necessária para que as moléculas de água deixem de interagir entre si e passem a interagir com a substância. Assim, quanto maior o valor da energia de hidratação, em módulo, uma substância precisa, menor sua solubilidade em água ou solventes polares. O sinal do valor da energia de hidratação indica se a substância precisa perder (sinal negativo) ou absorver (sinal positivo) energia para que ela interaja com as moléculas de água. Em nosso

estudo, os compostos LCH3 e LCH1 apresentaram os maiores valores para a propriedade (Tabela 7). A atividade biológica demonstrou uma associação inversa com a energia de hidratação ($r_s = 0,82$).

Tabela 7. Correlação entre os valores de energia de hidratação das substâncias ativas e suas respectivas IC_{50} .

Drogas	Energia de Hidratação (kcal/mol)	IC_{50} (μM)	Correlação de Spearman (r_s)*
<i>GH3</i>	-7.51	0,20	0,82
<i>IV4</i>	-5.13	0,20	
<i>HRB1</i>	-2.22	0,20	
<i>LH2</i>	-5.87	0,21	
<i>LCH1</i>	-8.41	0,24	
<i>LCH3</i>	-8.56	1,70	

* $p = 0,05$

➤ Polarizabilidade

A polarizabilidade traduz o grau de deformação conformacional que uma molécula pode sofrer. Assim, se a mudança conformacional da molécula dentro do alvo for importante para a atividade farmacológica então essa propriedade é fundamental para a substância ser ativa. Nos dados obtidos para as substâncias estudadas, o composto GH3 possui o maior valor de polarizabilidade ($48,53 \text{ \AA}^3$) e a molécula HRB1 apresentou o menor valor, para essa propriedade, $27,33 \text{ \AA}^3$ (Tabela 8). Não foi observado correlação entre a polarizabilidade e a atividade biológica ($r_s = 0,25$).

Tabela 8. Correlação entre os valores da polarizabilidade das substâncias ativas e suas respectivas IC₅₀.

Drogas	Polarizabilidade (Å ³)	IC ₅₀ (µM)	Correlação de Spearman (rs)*
<i>GH3</i>	48.53	0,20	0,25
<i>IV4</i>	38.65	0,20	
<i>HRB1</i>	27.33	0,20	
<i>LH2</i>	32.91	0,21	
<i>LCH1</i>	43.80	0,24	
<i>LCH3</i>	43.80	1,70	

* $p = 0,6$

➤ Volume Molecular

Essa propriedade avalia as modificações de tamanho ocorridas na molécula toda como resultado de possíveis alterações conformacionais que os substituintes podem causar. Verificou-se que o maior valor obtido para o volume molecular (1305,93 Å³) foi da molécula GH3, e o menor volume, a HRB1 (737,85 Å³). O volume molecular não apresentou uma correlação com a atividade antiplasmodial de 0,27 (Tabela 9).

Tabela 9. Correlação dos valores de volume molecular e IC₅₀ das substâncias ativas.

Drogas	Volume (Å ³)	IC ₅₀ (µM)	Correlação de Spearman (rs)
<i>GH3</i>	1305.93	0,20	0,27
<i>IV4</i>	1006.88	0,20	
<i>HRB1</i>	737.85	0,20	
<i>LH2</i>	910.96	0,21	
<i>LCH1</i>	1223.01	0,24	
<i>LCH3</i>	1234.22	1,70	

$p = 0,6$

6. DISCUSSÃO

6.1. ATIVIDADE ANTPLASMODIAL (*in vitro*) DAS SUBSTÂNCIAS EM ESTUDO.

As chalconas são moléculas com ampla ação biológica (ALCARÁZ et al, 2000; LÓPEZ et al, 2001; DOMINGUÉZ et al, 2001; KO et al, 2003; HERENCIA et al, 2002; ROJAS et al, 2002; DEMULLE et al, 2006; YE et al, 2004; SAYDAM et al, 2003; KIAT et al, 2006; LALL et al, 2006; PHRUTIVORAPONGKUL et al, 2003; WU et al, 2003) e vêm sendo utilizadas como protótipo na síntese de novas substâncias mais eficientes em diversas atividades farmacológicas. Apesar de terem atividade antimalárica descrita, nenhuma chalcona alcançou as características necessárias para ser um fármaco. Uma dessas propriedades é a especificidade da substância pelo seu alvo.

As chalconas metoxiladas foram selecionadas como alvo deste estudo com base em dados da literatura sobre sua atividade antimalárica. Nesse sentido, o trabalho mais informativo para o nosso estudo foi o de Li e colaboradores (1995), que descreve, dentre diversos substituintes, as metoxilas e os halogenados como os melhores inibidores em cultivos de *P. falciparum*. No presente estudo, foram avaliadas chalconas metoxiladas ainda não testadas contra o plasmódio.

Em nossos resultados, a exceção da LCH3 (1,7 μM), as substâncias em estudo foram, em torno de, duas vezes mais ativas do que a cloroquina, no entanto, nenhuma foi mais ativa do que a mefloquina (Tabela 4). Diante disso, é importante que outras concentrações sejam testadas para uma melhor visualização dos pontos máximos e mínimos de inibição, principalmente, em relação a LCH1 e LCH3.

As seis substâncias (GH3, IV4, HRB1, LH2, LCH3 e LCH1) inibiram o crescimento do *P. falciparum in vitro*, em concentrações inibitórias menores do que as encontradas na literatura, a exceção da LCH3 (YENESEW, 2004; FRÖLICH et al, 2005; LI et al, 2001; DOMÍNGUEZ et al, 2001; CHEN et al, 1997; SOULERE et al, 2003; WU; WILAIRAT; GO, 2002). Comparando nossos resultados com os obtidos com as chalconas metoxiladas por Li e colaboradores (1995), nossas substâncias se mostraram mais ativas. As IC_{50} das chalconas metoxiladas encontradas por esse autor foram superiores a $0,43 \pm 0,34 \mu\text{M}$ (em cepas D6 sensíveis à cloroquina), maiores, portanto, do que os encontrados em nosso estudo, 0,2 a 0,24 μM , exceto a IC_{50} de 1,7 μM da LCH3.

Domínguez e colaboradores (2005b) testaram chalconas metoxiladas semelhantes com as que estudamos. Entretanto, as IC_{50} encontradas pelos autores, que variaram de 1,76 a 10 μM para as chalconas metoxiladas tri-substituídos no anel A, foram maiores que os valores encontrados no presente estudo.

Assim, as substâncias ativas em estudo apresentaram atividade antiplasmodial excelente, de acordo com Liu e colaboradores (2003), pois os autores assim as categorizam quando as concentrações inibitórias em 50% são menores que 10 μM para atividade antiplasmodial, mesmo se os valores forem superiores aos da IC_{50} da cloroquina.

A reprodutibilidade dos dados obtidos com os derivados LCH1 e LCH3 pode ter sido comprometida pela saturação do meio quando altas concentrações das moléculas foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO). Além disso, as IC_{50} das substâncias GH3, IV4 e HRB1, que foram semelhantes entre si ($IC_{50} = 0,20 \mu M$), também, podem ter sido afetadas pela dificuldade de solubilização das moléculas em DMSO. Apesar de, as chalconas serem solúveis em DMSO, o uso de uma solução saturada (64 μM) foi necessário para se ter uma solução de trabalho com pequena quantidade de solvente, pois o dimetilsulfóxido é tóxico ao parasito.

6.2. CORRELAÇÃO ENTRE PROPRIEDADES QUÍMICAS TEÓRICAS E ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL DAS SUBSTÂNCIAS EM ESTUDO.

6.2.1. Propriedades eletrônicas

➤ HOMO e LUMO

O composto GH3 possui o valor máximo (-8.822 eV) de HOMO, tendo, então, uma maior propensão de doar elétrons em relação às outras substâncias ativas propostas. O mais interessante é que a GH3, junto com HRB1 e IV4, tem uma das menores IC_{50} (0,2 μM) encontradas nos ensaios biológicos contra *P. falciparum*. Não houve correlação entre os valores de HOMO e a atividade biológica, expressa pelas IC_{50} ($r_s = 0,34$) das drogas.

Por outro lado, o composto LCH3 apresenta o menor valor para LUMO, traduzindo a maior facilidade em receber elétrons quando em reação. A atividade biológica, traduzida pela IC_{50} , e os valores de LUMO tiveram uma boa correlação ($r_s = 0,88$). A

associação entre esses valores foi inversa, demonstrando a importância da baixa eletrofilicidade molecular para a atividade biológica.

De acordo com os nossos resultados, os valores de LUMO ($r_s = 0,88$) foram mais importantes para a atividade biológica do que os valores de HOMO ($r_s = 0,34$). Somando-se a isso, os gráficos dos orbitais moleculares sugerem que a interação molécula-receptor seria mais efetiva para os orbitais desocupados (LUMO) nas moléculas de menores $IC_{S_{50}}$.

As regiões de maior densidade eletrofilica, demonstrada nos gráficos de LUMO, mostram que a posição β -carbonila é o principal sítio de interação com um grupo rico em elétrons do receptor biológico. Portanto, as regiões observadas nos gráficos de LUMO estão mais propensas ao ataque por grupos eletrofílicos, como as hidroxilas, aminas ou tióis, no carbo- β do sistema Michael.

Os resultados também foram semelhantes aos de Domínguez e colaboradores (2005a) que avaliaram uma série de chalconas alcooxiladas e halogenadas, no anel A, e sulfonamidas, no anel B. Esses autores concluíram que a atividade biológica está envolvida com o efeito indutivo dos grupos doadores no anel A e retiradores no anel B e, também da ressonância envolvendo o grupo cetona e os anéis. Isso se deve ao fato de que tais substituintes são grupos eletrodoadores para a ressonância entre os dois anéis aromáticos e o sistema de Michael, característico da classe de moléculas (Figura 31). Esses grupos doam elétrons para o sistema de ressonância fazendo com que a carga chegue ao sistema de Michael e carregue o oxigênio da carbonila, deslocando a nuvem eletrônica do carbono- β que, supostamente, é o principal ligante no receptor. Nossos achados corroboram os resultados de Liu e colaboradores (1995) que demonstraram que a boa atividade biológica dependia a α,β -insaturação ligada à cetona. Aquele autor sugere que os grupos eletrodoadores no anel A demonstram melhor atividade antimalárica.

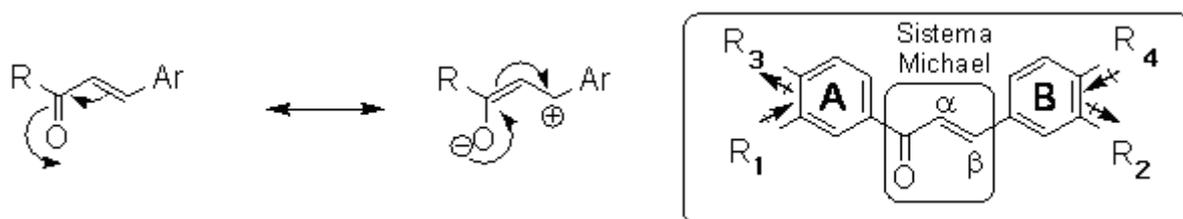


Figura 31. Esquema do sistema de Michael.

Nossos resultados mostram também que substituições nas posições *orto* e/ou *para* aumentam os valores de LUMO. Tal conclusão decorre da observação de que o GH3 apresenta o maior valor de LUMO (-0,808 eV) e foi um dos compostos mais ativos dentre as substâncias ativas estudadas. A importância das posições *orto* e/ou *para* na atividade biológica pode ser observada quando se compara LCH1 (0,24) com LCH3 ($IC_{50} = 1,7$) (Figura 32). Diante disso, a atividade antiplasmodial é melhorada com a presença de substituintes eletrodadores nas posições *orto* e *para* do que quando se tem a posição *meta*. Esses resultados foram semelhantes aos de Ram e colaboradores (2000) e Xue e colaboradores (2004), que mencionam que moléculas com até três grupos metoxilas substituídos são mais ativas.

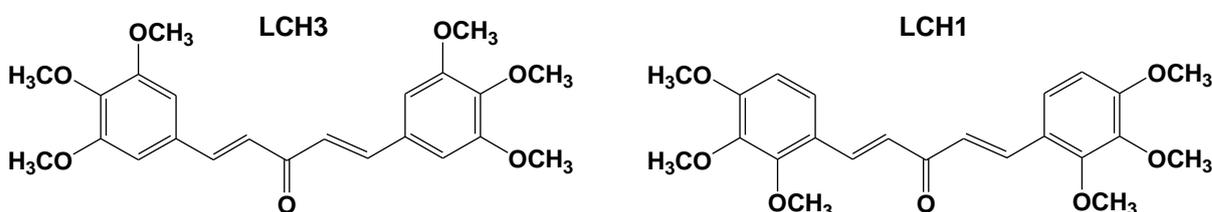


Figura 32. Estrutura molecular dos derivados de chalconas, LCH1 e LCH3.

➤ Potencial Eletrostático

O mapa de potencial eletrostático (MEP) pode indicar as possíveis regiões de ataque nucleofílico ou eletrofílico e os possíveis pontos de interação entre fármaco e receptor, principalmente, quando se conhece os sítios do receptor. O MEP mostra que as regiões mais ricas em elétrons ou nucleofílicas podem estar interagindo com os pontos deficientes em elétrons do receptor biológico.

As substâncias ativas testadas que possuem regiões contínuas ricas em elétrons (posições *orto* e carbonila) apresentaram maior atividade que aquelas com regiões eletrônicas mais dispersas (posições *meta* e carbonila). Diante disso, dois fatores podem estar sendo importantes para a atividade biológica. Em primeiro lugar, duas das substâncias ativas de menor IC_{50} possuem metoxilas nos dois anéis B, que podem estar influenciando para uma menor proteção do carbono- β do sistema de Michael. E em segundo lugar, quando se compara as substâncias ativas que possuem o anel alifático na carbonila, GH3 e IV4, com as substâncias ativas que não possuem anel alifático, LCH1 e LCH3, observa-se que este

substituinte pode estar influenciando ou na menor proteção do carbono- β do sistema de Michael ou de outra forma ainda não esclarecida.

Domínguez e colaboradores (2005b) sugeriram que a atividade antimalárica, na maioria dos casos das chalconas fenilurenil com substituintes no anel A, foram governadas por grupos (difluoro, dicloro, trimetoxi) ligados a este anel. Esses substituintes são grupos doadores de elétrons que podem estar influenciando na ressonância do sistema de Michael (α,β -insaturação ligada à cetona). Assim, provavelmente, as regiões do alvo ricas em elétrons devem estar interagindo com regiões eletrofílicas (pobre em elétrons) das moléculas, que estaria localizada no sistema de Michael, como sugerido pelo autor.

Na mesma linha de raciocínio, Li e colaboradores (1995) observaram que a atividade antiplasmodial aumenta com a presença de substituições como, cloro e flúor, no anel A, e com substituintes eletrodoadores como, metoxi, no anel B. O autor também comparou as atividades dessas mesmas moléculas, mas com os substituintes invertidos entre os dois anéis, e demonstrou que realmente os grupos eletrodoadores são importantes no anel B. Os autores mostram, no estudo de DOCK, uma grande aproximação do carbono- β do sistema de Michael com um ligante do receptor, sendo uma das principais interações entre a chalcona e a protease (Figura 33).

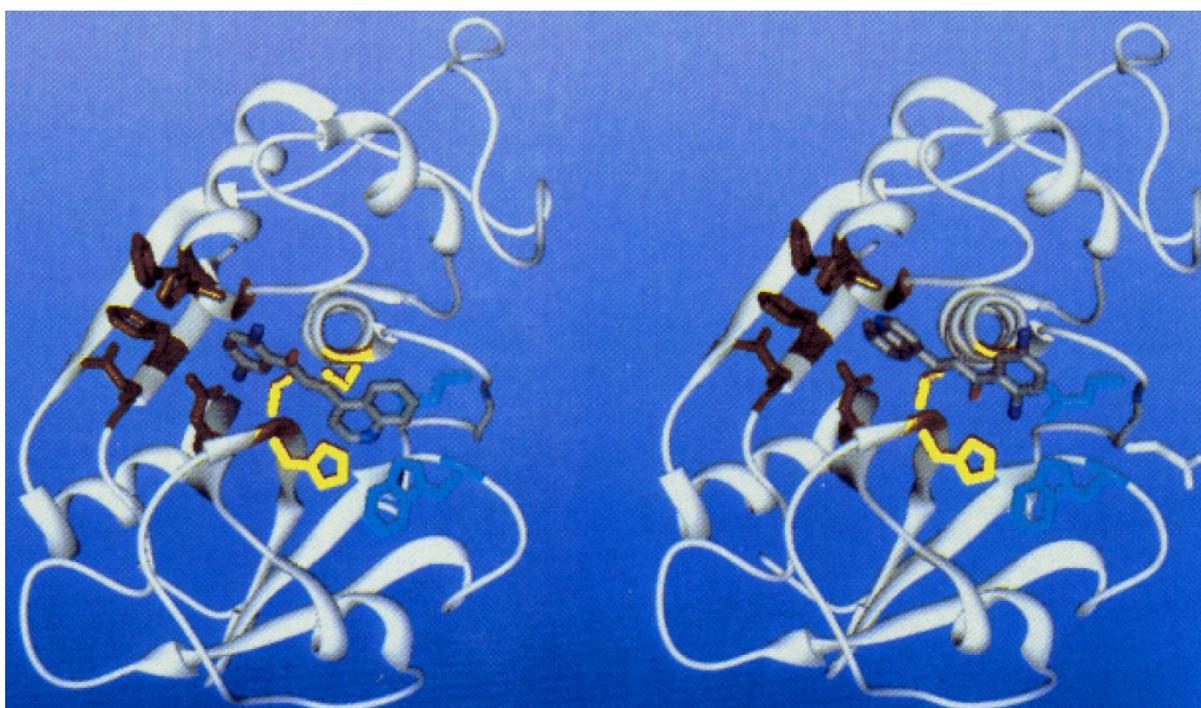


Figura 33. Duas potenciais orientações de ligações da chalcona no sítio de interação da protease de cisteína de *Plasmodium falciparum*, baseada em estudos de DOCK.

Fonte: LI et al, 1995.

Como comprovado pela correlação da atividade biológica com o LUMO, quanto maior a nuvem eletrônica do orbital desocupado no carbono- β do sistema de Michael, maior a possibilidade de interação fármaco-receptor, ou seja, maior a ação antiplasmodial.

Por outro lado, as regiões eletrofílicas são pouco nítidas quando se compara com a região nucleofílica, reafirmando a importante participação desta para a atividade em questão.

Assim, o mapa de potencial eletrostático (MEP) representa um parâmetro químico teórico que pode ser de grande contribuição na seleção de moléculas mais promissoras com atividade antiplasmodial.

6.2.2. Propriedades estéricas

➤ Coeficiente de partição octanol/água (C log P)

O C log P representa a lipofilicidade (hidrofobicidade) teórica de uma droga. Essa característica pode ser importante na interação da substância com os lipídeos das membranas celulares lipoprotéicas, ou, ainda, pode aumentar a interação com o sítio de ação farmacológica, através de ligações hidrofóbicas com estes. A hidrofília, na maioria das vezes, facilita o transporte de um fármaco até a célula alvo e sua concentração no citosol, onde irá efetuar sua ação farmacológica. Apesar disso, o valor do C log P ideal não deve ser elevado, pois deve possibilitar a interação com as membranas e a perfusão do composto no citosol.

Em nossos resultados, a chalcona IV4 apresentou o maior valor para essa propriedade seguida pelas HRB1 e GH3. Essas moléculas também apresentaram a maior atividade biológica ($IC_{50}=0,20\mu M$). Por outro lado, a molécula LCH3, que apresentou o menor valor de C log P, mostrou a segunda menor atividade biológica ($IC_{50} = 0,24\mu M$). Curiosamente, molécula LCH3 teve um C log P igual à LCH1, mas tem sua estrutura molecular diferente apenas pela mudança de posição das metoxilas, onde LCH3 tem presença de metoxilas na posição *meta* em ambos os anéis e LCH1 possui metoxilas na posição *orto*. Fato esse, que pode ser justificado pela maior desproteção do carbono- β do sistema de Michael pela metoxila (eletrodoador) quando esta se encontra na posição *orto*.

De fato, a correlação entre a atividade antiplasmodial e os valores de C log P das substâncias ativas testadas foi significativa ($r_s = 0,92$), sendo então, um parâmetro determinante para sua ação farmacológica. Esses dados são semelhantes aos de Liu e

colaboradores (2001) e Go e colaboradores (2004) que, avaliando uma série de chalconas metoxiladas, também observaram que a hidrofobicidade é um parâmetro crítico para uma boa atividade antiplasmodial.

A alta lipofilicidade das HRB1, em relação às outras substâncias testadas, pode estar contribuindo, particularmente, para uma maior concentração da substância em seu sítio de ação, podendo ser a lipofilia, a justificativa de esta chalcona ter, juntamente com GH3 e IV4, a menor concentração inibitória em 50% de crescimento de parasitos ($IC_{50} = 0,20$), já que existe uma falta de correlação estrutural de HRB1 com GH3 e IV4 (Figura 34). Além disso, essa substância foi a única que apresentou a melhor curva de inibição, sendo possível que a lipofilicidade de HRB1 seja responsável por a molécula atravessar as membranas em maior concentração e mais homogeneamente que as demais moléculas.

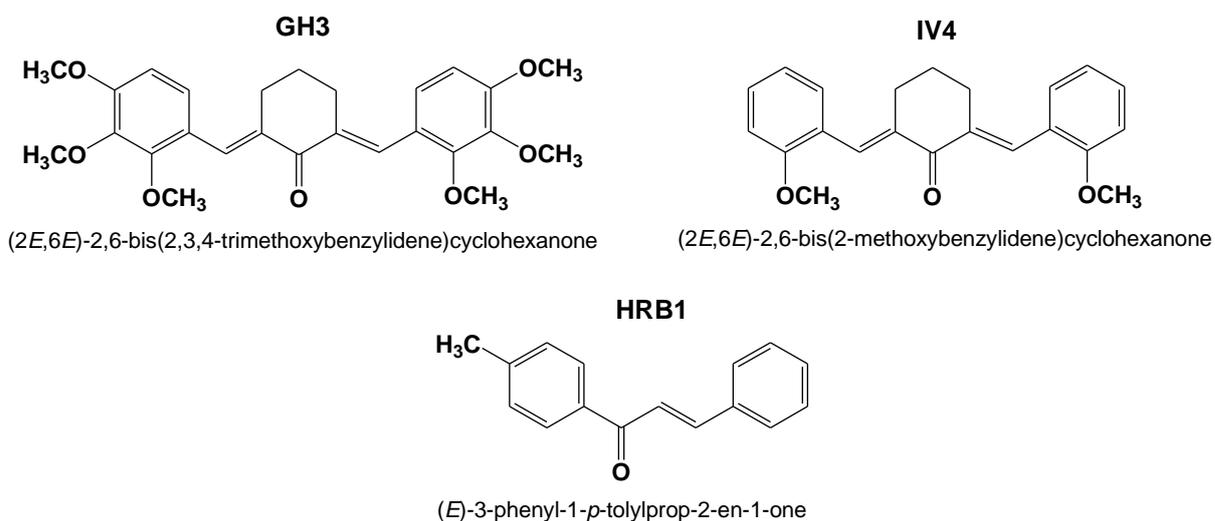


Figura 34. Estruturas moleculares das substâncias ativas com menor concentração inibitória ($IC_{50} = 0,20$).

De fato, a lipofilicidade tem fundamental papel na atividade biológica de uma substância, pois, no caso do plasmódio, a substância precisa passar por pelo menos três membranas (membranas: da hemácia, do parasito e do vacúolo alimentar) para poder chegar ao seu sítio de ação, visto que, as moléculas lipossolúveis atravessam as membranas celulares com maior facilidade e, supostamente, alcançam seu sítio em maior concentração.

Diante disso, a avaliação do coeficiente de partição octanol/água se torna muito importante na avaliação biológica, por proporcionar um parâmetro determinante na cinética da molécula.

➤ Energia de Hidratação

Como já mencionado, a energia de hidratação de uma molécula é o valor, em quilocalorias, liberado para dissociar moléculas de água entre si e interagir com outras substâncias. Se uma molécula precisa liberar muita energia para se hidratar, ela terá, conseqüentemente, mais dificuldade de se solubilizar em água, e mais afinidade pela fase orgânica (lipofilia). Assim, os valores da energia de hidratação têm relação inversa com os valores de $C \log P$. Se a energia de hidratação se correlacionar diretamente com a atividade biológica, provavelmente, a substância ativa deverá atravessar barreiras lipídicas (como, as membranas).

Os valores de energia de hidratação demonstraram uma associação inversa com a presença de grupos trimetoxi das substâncias ativas, LCH3, LCH1 e GH3. A correlação inversa da energia de hidratação e a atividade biológica das substâncias ativas ($r_s = 0,82$) reafirmam a importância da lipofilicidade para ação antiplasmodial, pois quanto maior a energia requerida para uma molécula se solubilizar em água, maior será sua solubilidade em meio orgânico.

➤ Polarizabilidade

A polarizabilidade não foi um parâmetro determinante ($r_s = 0,25$) para atividade *in vitro* contra *P. falciparum*, ou, em outras palavras, a facilidade com a qual uma nuvem eletrônica se deforma em um campo elétrico não é importante para a atividade biológica das substâncias ativas estudadas e, provavelmente, a interação do receptor com as chalconas não é dependente de uma redistribuição eletrônica dentro da substância.

➤ Volume Molecular

Essa propriedade avalia as modificações de tamanho ocorridas na molécula toda como resultado de possíveis alterações conformacionais que os substituintes podem causar. Assim, se de um substituinte para o outro, o volume molecular se diferenciar e isso resultar em uma maior ou menor atividade da substância em seu sítio, então essa propriedade terá correlação com a atividade farmacológica. O maior valor da propriedade foi o de GH3, o que pode ser justificado pelos três grupos metoxilas de cada anel e pela cadeia alifática presentes em sua estrutura molecular. No entanto, o volume molecular não se revelou importante para a eficácia da atividade antiplasmodial ($r_s = 0,27$).

7. CONCLUSÕES

- As chalconas podem representar uma alternativa terapêutica para a malária pelo baixo custo de produção da substância. A alternativa de um protótipo de molécula que já se tenha uma enzima alvo conhecida é uma vantagem que as chalconas possuem em relação a moléculas de mecanismo de ação desconhecido, pois isso possibilitaria o planejamento e o desenvolvimento de moléculas mais específicas e mais potentes.
- A atividade antiplasmodial detectada nas substâncias ativas estudadas pode ser considerada excelente, pois foi maior do que a da cloroquina. Por outro lado, as substâncias ativas estudadas não foram mais ativas que a mefloquina. Diante disso, estudos químicos mais numerosos e detalhados para melhorar a atividade e a solubilidade da classe são necessários.
- As substâncias ativas metoxiladas estudadas mostraram concentrações inibitórias muito inferiores às da maioria dos estudos disponíveis na literatura, o que corresponde a resultados encorajadores para o desenvolvimento de novas chalconas.
- Os resultados obtidos mostraram que os parâmetros: HOMO, polarizabilidade e volume molecular, não foram capazes de selecionarem compostos mais ativos contra o *P. falciparum*. Por outro lado, o LUMO, o C log P, a energia de hidratação e o potencial eletrostático podem ser utilizados como parâmetros indicativos na seleção de compostos mais ativos contra o *P. falciparum*.
- Os possíveis sítios de ligação das chalconas com o receptor (LI et al, 1995) demonstrado nos gráficos de LUMO e potencial eletrostático corroboram os estudos disponíveis na literatura.
- De acordo com os dados obtidos neste trabalho, as chalconas podem ser utilizadas como molécula protótipo no planejamento racional de novas chalconas com atividade antimalárica, auxiliando a seleção de moléculas mais ativas contra o *P. falciparum*.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA FIOCRUZ DE NOTÍCIAS. **Parceria internacional lança medicamento contra a malária.** Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe>. Acessado em: 12/11/2008.

AHLM, C; WISTROM, J; CARLSSON, H. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* in Borneo. **Journal of Travel Medicine.** v. 3, p. 124, 1996.

ALCARÁZ, L. E; BLANCO, S. E; PUIG, O. N; TOMÁS, F; FERRETI, F. H. Antibacterial activity of flavonoids against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Theoretical Biology.** v. 205, p. 231-240, 2000.

ATKINS, P. W. **Físico-Química.** 6ed. v. 2. Rio de Janeiro: L. T. C. 1999.

BARNES, K. I; WATKINS, W. M; WHITE, N. J. Antimalarial dosing regimens and drug resistance. **Trends in Parasitology.** v. 24, n. 3, p. 127-134, 2008.

BARREIRO, E. J; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal:** As bases moleculares da ação dos fármacos. Artemed Editora, Porto Alegre, 2001.

BASCO L. K; LE BRÁS, J; RHOADES, Z; WILSON, C. M. Analysis of *PfMDR1* and drug susceptibility in fresh isolates of *Plasmodium falciparum* from sub-Saharan Africa. **Molecular and Biochemical Parasitology.** v. 74, p. 157-166, 1995.

BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry - 4: A new dynamical correlation functional and implications for exact-exchange mixing. **Journal of Chemical Physics.** v. 104, p. 1040-1046, 1996.

BITENCOURT, H. R. **Síntese, caracterização e atividade alelopática e fungitóxica de chalconas e seus derivados.** 2008. Tese (Doutorado em química) - Universidade Federal do Pará, Belém-PA, 2008.

BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE / CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA / SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica.** Brasil, 2008.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE/ FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE / CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA/ ASSESORIA DE DESCENTRALIZAÇÃO E CONTROLE DE ENDEMIAS/ CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA. **Manual de Terapêutica da Malária.** 6ed. Brasil, 2001.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE/ FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE/ CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA/ ASSESORIA DE DESCENTRALIZAÇÃO E CONTROLE DE ENDEMIAS/ CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA. **1º Guia de Vigilância Epidemiológica.** 6 ed. Brasília, 2005.

BRASSEUR, P; AGNAMEY, P; MORENO, A; DRUILHE, P. Evaluation de la sensibilité in vitro de *Plasmodium falciparum* aux antimalariques par um test colorimetrique (DELI-microtest). **Médecine Tropicale.** v. 61, n. 6, p. 545-547, 2001.

BROWN, W; M. BROWN, W, M; YOWELL, C. A; HOARD, A; JAGT, T. A. V; HUNSAKER, L. A; DECK, L. M; ROYER, R. E; PIPER, R. C; DAME, J. B; MAKLER, M. T; JAGT, D. L. V. Comparative structural analysis and kinetic properties of lactate dehydrogenases from four species of human malarial parasites. **Biochemistry**. v. 43, p. 6219, 2004.

BRUCE-CHWATT, L. J. Historical outline. *In: Essential Malariology*. London: William Heinemann Medical Books Ltda, p. 1-9, 1980.

CARVALHO, I; PUPO, M. T; BORGES A. D. L; BERNARDES, L. S. C. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**. v. 26, p. 3, 2003.

CHAVATTE J. M; CHIRON, F; CHABAUD; LANDAU, I. Probable speciations by "host-vector" fidelity: 14 species of *Plasmodium* from magpies" (in French). **Parasite**. v. 14, n. 1, p. 21-37, 2007.

CHEM3D ULTRA 9.0 for Windows. Computer program manual. 2004.

CHEN, M; CHRISTENSEN, S.B; ZHAI, L; RASMUSSEN, M.H; THEANDER, T; FROKJAER, S; STEFFANSEN, B; DAVIDSEN, J; KHARAZMI, A. The novel oxygenated chalcone, 2,4-dimethoxy-4'-butoxychalcone, exhibits potent activity against human malaria parasite *Plasmodium falciparum* *in vitro* and rodent parasites *Plasmodium berghei* and *Plasmodium yoelii* *in vivo*. **Journal Infectious Diseases**. v. 176, p. 1327-1333, 1997.

CHEN, M; THEANDER, T.G; CHRISTENSEN, S.B; HVIID, L; ZHAI, L; KHARAZMI, A. [Antileishmanial activity of Licochalcone A in mice infected with *Leishmania major* and in hamsters infected with *Leishmania donovani*](#). **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 38, p. 1470-1475, 1994.

CLARE, B. W. Frontier orbital energies in quantitative structure-activity relationships: A comparison of quantum chemical methods. **Theoretica chimica acta**. v. 87, n. 6, p. 415, 1994.

COLLINS, F.S; GREEN, E.D.; GUTTMACHER, A.E.; GUYER, M.S. US National Human Genome Research Institute: A vision for the future of genomics research. **Nature**. v. 422, n. 6934, p. 835-47, 2003.

DELMULLE, L; BELLAHCÈNE, A; DHOOGHE, W; COMHAIRE, F; ROELENS, F; HUVAERE, K; HEYERICK, A; CASTRONOVO, V; KEKULEIRE, D. Antiproliferative preproperties of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.) in human prostate cancer cell lines. **Phytomedicine**. v. 13, n. 9-10, p. 732-734, 2006.

DESJARDINS, R. E; CANFIELD, C. J; HAYNES, J. D; CHULAY, J. D. [Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semi-automated microdilution technique](#). **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 16, n. 6, p. 710-718, 1979.

DIALLO, D. A; HABLUETZEL, A; CUZIN-OUATTARA, N; NEBIE, I; SANOGO, E; COUSENS, S. N; ESPOSITO, F. Widespread distribution of insecticide-impregnated curtains reduces child mortality, prevalence and intensity of malaria infection, and malaria transmission in rural Burkina Faso. **Parassitologia**. v. 41, n. 1-3, p. 377-81, 1999.

DIXON, R. A; STEEL, C. L. Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering. **Trends in Plant Science**. v. 4, n. 10, p. 394-400, 1999.

DOMÍNGUEZ, J. N; CHARRIS, J.E; LOBO, G; GAMBOA DE DOMÍNGUEZ, N; MORENO, M. M; RIGGIONE, F; SANCHEZ, E; OLSON, J; ROSENTHAL, P.J. Synthesis of quinolyl chalcones and evaluation of their antimalarial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 36, p. 555-560, 2001.

DOMÍNGUEZ, J. N; LEÓN, C; RODRIGUES, J; GAMBOA DE DOMÍNGUEZ, N; GUT, J; ROSENTHAL, P.J. Synthesis and evaluation of new antimalarial phenylurenyl chalcone derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 48, p. 3654-3658, 2005. B

DOMÍNGUEZ, J. N; LEÓN, C; RODRIGUES, J; GAMBOA DE DOMÍNGUEZ, N; GUT, J; ROSENTHAL, P.J. Synthesis and antimalarial activity of sulfonamide chalcone derivatives. **Farmaco**. v. 60, p. 307-311, 2005. A

DRUILHE, P. A colorimetric *in vitro* drug sensitivity assay for *Plasmodium falciparum* based on highly sensitive double-site lactate dehydrogenase antigen capture enzyme linked immunosorbent assay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 64, p. 233-241, 2001.

ENCYCLOPEDIA REFERENCE OF PARASITOLOGY. Parasitology Research. Disponível em: <http://parasitology.informatik.uni-wuerzburg.de/login/b/me10022.png.php>. Acessado em: 29/05/2008

EZZET, F; VUGT, M. V; NOSTEN, F; LOOAREESUWAN, S; WHITE, N. J. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Lumefantrine (Benflumetol) in Acute falciparum Malaria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 44, n. 3, p. 697-704, 2000.

FOLEY, M; TILLEY, L. Quinoline Antimalarials: Mechanisms of actions and Resistance Prospects for New agents. **Pharmacology and Therapy**, v. 79, p. 55-87, 1998.

FRÖLICH, S. SCHUBERT, C. BIENZLE, U. JENETT-SIEMS, K. [In vitro antiplasmodial activity of prenylated chalcone derivatives of hops \(*Humulus lupulus*\) and their interaction with haemin.](#) **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 55, p. 883-887, 2005.

GAUSSIAN 03W 6.0, Copyright© 2003, Gaussian, Inc.

GIAO, P. T; VRIES, P. J. Pharmacokinetics interactions of antimalarials agents. **Clinical Pharmacokinetic**. v. 40, p.343-373, 2001.

GLAUMANN H; MOTAKEFI, A. M; JANSSON, H. Intracellular distribution and effect of the antimalarial drug mefloquine on lysosomes of rat liver. **Liver**. v. 12, n. 4, p. 183-190, 1992.

GO, M. L; LIU, M; WILAIRAT, P; ROSENTHAL, P. J; SALIBA, K. J; KIRK, K. [Antiplasmodial chalcones inhibit sorbitol induced hemolysis of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes.](#) **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v.48, n. 9, p.3241-3245, 2004.

GOMEZ, M. S; PIPER, R. C; HUNSAKER, L. A; ROYER, R. E; DECK, L. M; MAKLER, M. T; JAGT, D. L. V. Substrate and cofactor specificity and selective inhibition of lactate

dehydrogenase from the malarial parasite *P. falciparum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 90, p. 235-246, 1997.

GUSTAFSSON, L. L; BEERMAN, B; ABBI, Y. A. **Handbook of drugs for Tropical Parasitic Infectious**. Taylor and Francis: London. v. 58-59, p. 122-126, 1987.

HANSCH, C; LEO, A; MEKAPATI, S. B.; KURUP, A. QSAR and ADME. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 12, p. 3391-3400, 2004.

HASTINGS, I. M. The origins of antimalarial drug resistance. **Trends in parasitology**. v. 20, n. 11, 2004.

HERENCIA, F; LÓPEZ-GARCIA, M. P; UBEDA, A; FERRÁNDIZ, M. L. Nitric oxide-scavenging properties of some chalcona derivatives. **Nitric oxide: Biology and chemical**. v. 2, n. 2, p. 242-246, 2002.

HLADKY, S. B. **Ion transport at the blood brain barrier, pH regulation, multidrug-resistance transporters in red blood cells and chloroquine accumulation by malaria parasites (*Plasmodium falciparum*)**. Disponível em: <http://www.phar.cam.ac.uk/ri/hladky.html>. Acessado em: 16/09/2008.

HYPERCHEM TM RELEASE 7.5 for Windows. Molecular Modeling System. Hypercube: Gainesville, FL, 2002.

JÄGER R; KAST S, M. Fast prediction of hydration free energies from molecular interaction fields. **Journal of molecular graphics & modeling**. v. 20, n.2, p. 123-31, 2001.

KARBWANG, J; WHITE, N. J. Clinical pharmacokinetics of mefloquine. **Clinical Pharmacokinetics**. v. 19, n. 4, p. 264- 279, 1990.

KHARAZMI, A; CHEN, M; THEANDER, T; CHRISTENSEN, S.B. [Discovery of oxygentade chalcones as novel antimalarial agents](#). **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. v. 91, p. 91-96, 1997.

KIAT, T. S; PIPPEN, R; YUSOF, R; IBRAHIM. H; KHALID, N; RAHMAN, N. A. Inhibitory activity of ciclohexenyl chalcone derivatives and flavonoids of figerrot, *Boesenbergia rotunda* (L.), towards dengue-2 virus NS3 protease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 16, n. 12, p. 3337-3340, 2006.

KO, H.-H; TSAO, L.-T; YU K.-L; LIU, C.-T; WANG, J.-P; LIN, C.-N. Structure-activity relationship studies on chalcone derivatives: the potent inhibition of chemical mediators release. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 11, p. 105-111, 2003.

KOHN, W; SHAM, L. J. Self-consistent equations including exchange and a correlation effects. **Physical Review**. v. 140, A1133, 1965.

KORENROMP, E. L; WILLIAMS, B. G; GOUWS, E; DYE, C; SNOW, R. W. Measurement of trends in childhood malaria mortality in Africa: an assessment of progress toward targets based on verbal autopsy. **Lancet Infectious Diseases**. v.3, p.349-358, 2003.

KOROLKOVAS, A. **Fundamentos da farmacologia molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara

Dois S. A. p. 783, 1982.

KUBINYI, H. Lipophilicity and drug activity. **Progress in Drug Research**. v. 23, p. 97-198, 1979.

KYLE, R; SHAMPE, M. Discoverers of quinine. **The journal of the American Medical Association**. v. 229, n. 4, p. 320, 1974.

LALL, N; HUSSEIN, A. A; MEYER, J. J. M. Antiviral and antituberculous activity of *Helichrysum melanacme* constituents. **Fitoterapia**. v. 77, p. 230-232, 2006.

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

LARSEN, M; KROMANN, H; KHARAZMI, A; NIELSEN, S.F. [Conformationally restricted anti-plasmodial chalcones](#). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 15, p. 4858-4861, 2005.

LEE, C; YANG, W; PARR, R.G. Development of the colle-salveti correlation energy formula into a functional of the electron density. **Physical Review B**. v. 37, p.785, 1988.

LEO, A; HANSCH, C; ELKINS, I. Partition coefficients and their uses. **Chemical Review**. v. 71, p. 525-616, 1971.

LI, R; KENYON, G.L; COHEN, F.E; CHEN, X; GONG, B; DOMINGUEZ, J. N; DAVIDSON, E; KURZBAN, G; MILLER, R. E; NUZUM, E. O; ROSENTHAL, P. J; MCKERROW, J. H. J. [In vitro antimalarial activity of chalcones and their derivatives](#). **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 38, p. 5031-5037, 1995.

LIU, M; WILAIRAT, P; CROFT, S. L; LAY-CHOOTAN, A; GO, M. L. Structure-Activity Relationships of Antileishmanial and Antimalarial Chalcones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.11, p.2729–2738, 2003.

LIU, M; WILAIRAT, P; GO, M. L. Antimalarial alkoxyated and hydroxylated chalcones: structure–activity relationship analysis, **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 44, p. 4443-4452, 2001.

LÓPEZ, S. N; CASTELLI, M. V; ZACCHINO, S. A; DOMÍNGUEZ, J. N; LOBO, G; CHARRIS-CHARRIS, K; CORTÊS, J. C. G; RIBAS, J. C; DEVIA, C; RODRIGUÉZ, A. M; ENRIZ, A. D. *In vitro* antifungal evaluation and struture-activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analougues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 9, p. 1999-2013, 2001.

MAKLER, M. T; RIES, J. M; WILLIAMS, J. A; BANCROFT, J. E; PIPER, R. C; GIBBINS, B. L; HINRICHS, D. J. Parasite lactate desidrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**. v. 48, n. 6, p. 739-741, 1993.

MARTENS, P. Health transitions in a globalising world: Towards more disease or sustained health? **Futures**. 34, n. 7, p. 635-648, 2002.

MARTENS, P; ROTMANS, J; ROTHMAN, D. S. Integrated assessment modeling of human health impacts. *In: Environmental change, climate and health: Issues and research methods*. Cambridge, UK: Cambridge University Press. p. 197-225, 2002.

MARTIN, Y. C. **Quantitative Drug Design: A critical introduction**. Marcel Dekker: New York. 87, 68, 1978.

MOODY, A. Rapid diagnostic tests for malaria parasit. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 15, n. 1, p. 66-78, 2002

NARENDER, T; SHWETA; TANVIR, K; RAO, M. S; SRIVASTAVA, K; PURI S. K. Prenylated Chalcones isolated from *Crotalaria* genus inhibits *in vitro* growth of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 15, p. 2453-2455, 2005.

NASVELD, P; KITCHENER, S. Treatment of acute vivax malaria with tafenoquine. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 99, n. 1, p. 2-5, 2005.

NOEDL, H.; WONGSRICHANALAI, C.; WERNSDORFER, W. Malaria drug-sensitivity testing: new assays, new perspectives. **Trends in Parasitology**. v. 19, n. 4, p. 175-181, 2003.

NOSTEN, F; VAN VUGT, M; PRICE, R; LUXEMBURGER, C; THWAY, K. L; BROCKMAN, A; MCGREADY, R; TER KUILE, F; LOOAREESUWAN, S; WHITE, N. J. Effects of artesunate-mefloquine combination on incidence of *Plasmodium falciparum* malaria and mefloquine resistance in western Thailand: a prospective study. **The Lancet**. v.356, p.297-302, 2000.

PARR, R. G; YANG, W. **Density Functional Theory Of Atoms And Molecules**. Oxford University Press: New York, 1989.

PHRUTIVORAPONGKUL, A; LIPUPUN, V; RUANGRUNGSI, N; KIRTIKARA, K; NISHIKAWA, K; MARUYAMA, S; WATANABE, T; ISHIKAWA, T. Studies on the chemical constituents of stem bark of *Milettia leucantha*: Isolation of new chalconas with cytotoxic, anti-herpes simplex virus and anti-inflammatory activities. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**. v. 51, n. 2, p. 187-190, 2003.

PIPER, R; [LEBRAS, J](#); [WENTWORTH, L](#); [HUNT-COOKE, A](#); [HOUZÉ, S](#); [CHIODINI, P](#); [MAKLER, M](#).. Immunocapture diagnostic assays for malaria using *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH). **American of Journal Tropical Medicine & Hygiene**. v. 60, p. 109-118, 1999.

POTKAR, C. N; KSHIRSAGAR, N. A; KATHURIA, R. Resurgence of malaria and drug resistance in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* species in Bombay. **J. Assoc. Physicians India**. v. 43, p. 336, 1995.

PRADINES, B; TALL, A; FUSAI, T; SPIEGEL, A; HIENNE, R; ROGIER, C; TRAPE, J. F; BRAS, J. L; PARZY, D. *In vitro* activities of benflumetol against 158 Senegaleses isolates of *Plasmodium falciparum* in comparison with those of standard antimalarial drugs. **Antimicrobial Agents an Chemotherapy**. v. 43, p. 418-420, 1999.

PRICE, R. N; CASSAR, C; BROCKMAN, A; DURAISINGH, M; VAN VUGT, M;

WHITE, N. J; NOSTEN, F; KRISHNA, S. The *PfMDR1* gene is associated with a multidrug-resistant phenotype in *Plasmodium falciparum* from the western border of Thailand. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 43, n. 12, p. 2943-2949, 1999.

RAM, V.J; SAXENA, A.S; SRIVASTAVA, S; CHANDRA, S. [Oxygenated chalcones and bischalcones as potential antimalarial agents](#). **Bioorganic & medicinal chemistry letters**. v. 10, n. 2, p. 2159-2161, 2000.

RENGELSHAUSEN, J; BURHENNE, J; FRÖHLICH, M; TAYROUZ, Y; SINGH, S.K; RIEDEL, S. D; MÜLLER, O; HOPPE-TICHY, T; HAEFELI, W. E; MIKUS, G; WALTER-SACK, I. Pharmacokinetic interaction of chloroquine and methylene blue combination against malaria. **European Journal of Clinical Pharmacology**. v. 60, n. 10, p. 709-715, 2004.

REY, L. Os plasmódios e a malária I: Os parasitos. *In*: REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 335, 2001.

[RIDLEY](#), R. G; [HUDSON](#), A. T. Quinoline antimalarials. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**. v. 8, n. 2, p. 121-136, 1998.

ROJAS, J; DOMÍNGUEZ, J. N; CHARRIS, J. ; LOBO, G; PAYÁ, M; FERRÁDIZ, M. L. Synthesis and inhibitory activity of dimetilanimino-chalcone derivatives on the induction of nitric oxide synthase. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 37, p. 699-705, 2002.

RUSSELL, B. M. UDOMSANGPETCH, R; RIECKMANN, K. H; KOTECKA, B. M; COLEMAN, R. E; SATTABONGKOT, J. Simple *in vitro* assay for determining the sensitivity of *Plasmodium vivax* isolates from fresh human blood to antimalarials in areas where *P. vivax* is endemic. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 47, n. 1, p. 170-173, 2003.

SALLES, J. M. C; SALLES, M. J. C. Antimicrobianos (Antibacterianos, Antifúngicos, antivirais, Antiparasitários): **Quando Indicar, Como usar**. Belém: Universitária-UFPA, p. 472-473, 2000.

SANCHEZ, M. C. A. Testes sorológicos. *In*: **Ferreira, A. W.; ÁVILA, S. L .M. Diagnóstico Laboratorial: avaliação das principais doenças infecciosas e parasitárias e auto-ímmunes**. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 263-272, 2001.

SAYDAM, G; AYDIN, H. H; SAHIN, F; KUCUKOGLU, O; ERCIYAS, E; TERZIOCLU, E; BUYUKKECCEI, F; OMAI, S. B. Cytotoxic and inhibitory effects of 4,4'-dihydroxi chalcone (RVC-588) on proliferation of human leukemic HL-60 cells. **Leukemia Research**. v. 27, p. 57-64, 2003.

SCHELLENBERG, D; KAHIGWA, E; DRAKELEY, C; MALENDE, A; WIGAYI, J; MSOKAME, C; APONTE, J. J; TANNER, M; MSHINDA, H; MENENDEZ, C; ALONSO, P. L. The safety and efficacy of sulfadoxinepyrimethamine, amodiaquine, and their combination in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. **American Journal of Tropical Medicine & Hygiene**. v. 67, p. 17-23, 2002.

SCHLESINGER, P. H; KROGSTAD, D. J; HERWALDT, B. L. Antimalarial agents: mechanisms of action. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 32, n. 6, p. 793-798, 1988.

SHUSTERMAN, A. J. **SPARTAN Procedure for Calculating Electrostatic Potential Maps**. Disponível em: <http://academic.reed.edu/chemistry/alan/ACS97/elpot.html>. Acessado em: 12//08/2008.

SILVEIRA, A. C; REZENDE, D. F. **Avaliação da estratégia global de controle integrado da malária no Brasil**. Brasília: Opas, 2001.

SIMPSON, J. A; WATKINS, E. R; PRICE, R.N; AARONS, L; KYLE, D. E; WHITE, N. J. Mefloquine pharmacokinetics-pharmacodynamic models: implications for dosing and resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 44, n. 12, p. 3414-3424, 2000.

SINGH, B; LEE, K. S; MATUSOP, A; RADHAKRISHNAN, A; SHAMSUL, S. S. G; COX-SINGH, J; THOMAS, A; CONWAY, D. J. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. **The Lancet**. v. 363, p. 1017-1024, 2004.

SOULERE, L; DELPLACE, P; DAVIOUD-CHARVET, E; PY, S; SERGHERAERT, CH; PERIE, J; RICARD, I; HOFFMANN, P; DIVE, D. Screening of *Plasmodium falciparum* iron superoxide dismutase inhibitors and accuracy of the SOD-assays. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.11, n. 11, p. 4941-4944, 2003.

TAUIL, P. L. Epidemiologia - Malária. In: VERONESE, R. **Tratado de infectologia**. 3ed. São Paulo: Atheneu. p. 1584-1595, 2005.

TODA, F; TANAKA, K; HAMAI, K. Aldol condensations in the absence of solvent: acceleration of the reaction and enhancement of the stereoselectivity, **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions**. v. 1, p. 3207-3209, 1990.

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

TROULLIER, P; OLLIARO, P; ORBINSKI, J; LAING, R; FORD, N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public health policy failure. **The Lancet**. v. 359, p. 2188-2194, 2002.

UYEMURA; S.A. LUO, S; MORENO, S. N. J; DOCAMPO, R. Oxidative phosphorylation, Ca(2+) transport and fatty acid-induced uncoupling in malaria parasites mitochondria. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 275, n. 13, p. 9709-9715, 2000.

VALECHA, N; ADAK, T; BAGGA, A. K; ASTHANA, O. P; SRIVASTAVA, J. S; JOSHI, H; SHARMA, V. P. Comparative anti-relapse efficacy of CDRI compound 80/53 (bulaquine) vs primaquine in double blind clinical trial. **Current Science**. v. 80, p. 561-563, 2001.

WELLEMS, T. E; PLOWE, C. V. Chloroquine-resistant malaria. **Journal of Infectious Diseases**. v. 184, p. 770-776, 2001.

WHITE, N. J. Antimalarial drug resistance. **European Journal of Clinical Investigation**. v. 113, n. 8, p. 1084-1092, 2004.

WHITE, N. J; PONGTAVORNPINYO, W. The de novo selection of drug-resistant malaria parasites. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**. v. 270, p. 545-554,

2003.

WHITE, N. J; VAN VUGT, M; EZZET, F. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of artemether-lumefantrine. **Clinical Pharmacokinetics**. v. 37, n. 2, p. 105-125, 1999.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimalarial drug combination therapy: Report of a technical consultation**. Geneva: Switzerland. 2001.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The World Malaria Report**. Geneva: World Health Organization. Disponível em: <http://rbm.who.int/wmr2005/>. Acessado em: 24/03/2008.

WIESNAR, J; ORTMANN, R; JOMAA, H; SCHLITZER, M. New antimalarial drugs. **Angewandte Chemie International Edition**. v. 42, n. 43, p. 5274-5293, 2003.

WONGRISCHANALAI, C; LIN, K; PANG, L. W; FAIZ, M. A; NOEDL, H; WIMONWATTRAWATEE, T; LAOBOONCHAI, A; KAWAMOTO, F. *In vitro* susceptibility of *Plasmodium falciparum* isolates from Myanmar to antimalarial drugs. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**. v. 65, n. 5, p. 450-455, 2001.

WU, H.-H; WANG, X.-H; YI, Y.-H; LEE, K.-H. Anti-AIDS agents 54. A potent anti-HIV calcones and flavonoids genus desmos. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 13, p. 1813-1815. 2003.

WU, X; WILAIRAT, P; GO, M-L. Antimalarial activity of ferrocenyl chalcones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, n. 17, p. 2299-2302, 2002.

YARISHKIN, O. V; RYU, H. W; PARK, J. Y; YANG, M. S; HONG, S. G; PARK, K. H. Sulfonate chalcone as new class voltage-dependent K⁺ channel blocker. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 18, n. 1, p. 137-140, 2008.

YE, C.-L; LIU, J.-W; WEI, D.-Z; LU, Y.-H; QIAN, F. *In vitro* anti-tumor activity of 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone against six established human cancer cell lines. **Pharmacological Research**. v. 50, n. 5, p. 505-510, 2004.

YENESEW, A; DULI, M; DERESE, S; MIDIWO, J.O; HEYDENREICH, M; PETER, M.G; AKALA, H; WANGUI, J; LIYALA, P; WATERS, N.C. Anti-plasmodial flavonoids from the stem bark of *Erythrina abyssinica*. **Phytochemistry**. v. 65, n. 22, p. 3029-3032, 2004.