

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA  
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA  
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS – MBT  
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA COM MOLÉCULAS BIOATIVAS -  
LTMB**

**ESTUDOS DE QSAR-2D EM QUINOLINA METANOL COM  
ATIVIDADE ANTIMALÁRICA FRENTE AO *Plasmodium*  
*falciparum***

**CARLA DOS SANTOS DUARTE**

**MANAUS  
2012**

**CARLA DOS SANTOS DUARTE**

**ESTUDOS DE QSAR-2D EM QUINOLINA METANOL COM  
ATIVIDADE ANTIMALÁRICA FRENTE AO *Plasmodium*  
*falciparum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade do Estado do Amazonas, para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientador (a): **Prof (a) Dr. (a) Alberto dos Santos Marques**

Co-orientador (a) : **Prof (a) Dr. (a) Yuji Takahata**

**MANAUS**

**2012**

D812e Duarte, Carla dos Santos.

Estudos de QSAR-2D em quinolina metanol com atividade antimalárica frente ao *Plasmodium falciparum* / Carla dos Santos Duarte. – Manaus, AM: [ s.n.], 2012.

91f. : il.; 29 cm.

Orientador: Dr. Alberto dos Santos Marques; Co-Orientador: Yuji Takata.

Dissertação (Mestrado) Universidade do Estado do Amazonas, 2012.

1- Malária 2- QSAR 3-Quinolina Metanol. I- Marques, Alberto dos Santos (Orient.). II- Takahata, Yuji (Co-Orient.). III- Universidade do Estado do Amazonas, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais – MBT. IV- Título.

CDU 1997 – 616.936 (043)



GOVERNO DO ESTADO DO AMAZONAS

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – PROPESP  
 ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA  
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS  
 DA AMAZÔNIA – MBT

## Avaliação de Dissertação de Mestrado

### Parecer Final

A banca examinadora da defesa pública da dissertação de mestrado de Carla dos Santos Duarte, intitulada "Estudo de QSAR-2D em quinolina metanol com atividade antimalárica frente ao *Plasmodium falciparum*", tendo como presidente o Prof. Dr. Alberto dos Santos Marques, e como membros as professoras Dra. Iléa Brandão Rodrigues e a Dra. Cecilia Veronica Nunez, em sessão pública realizada aos onze dias do mês de junho do ano de dois mil e doze às quatorze horas e trinta minutos, no Miniauditório do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, no 4º andar do prédio anexo da Escola Superior de Ciências da Saúde, na Avenida Carvalho Leal, n.º 1.777, Cachoeirinha, emitiu o seguinte parecer:

Considerações finais \_\_\_\_\_

#### CONCEITO

- Aprovada (X)  
 Reprovada ( )  
 Necessita Revisão ( )

Dr. Alberto dos Santos Marques  
 CPF: 02696273272

Dra. Iléa Brandão Rodrigues  
 CPF: 603243897-34

Dra. Cecilia Veronica Nunez  
 CPF: 249679728-5

## DEDICATÓRIA

*Com todo meu amor, dedico este trabalho à minha mãe Sra. Lúcia Castro dos Santos, por todo o apoio e incentivo ao longo de minha vida e em especial nestes últimos dois anos e meio, em que foi infinitamente compreensível e leal, suportando meus temores e vibrando com minhas vitórias, apesar de toda distância, haja vista que nesta vida só temos uma à outra. Amo-te minha mãe querida, razão de todas as minhas conquistas. Recebe agora a honra e o mérito de toda uma vida de dedicação a esta que doravante será para sempre tua eterna filha e amiga.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS em primeiro lugar pela vida por ele concedida e por caminhar sempre ao meu lado em todos os momentos, até mesmo naqueles em que achei estar à deriva em meio a tempestades e turbulências, quando na realidade era nesses momentos que ele mostrava que quando eu me sinto mais fraca é que descubro o quanto sou forte;

Agradeço a minha mãe por toda dedicação dada a mim, desde o instante da minha geração até os dias atuais;

Agradeço a todas as pessoas que me acolheram e abrigaram em suas casas quando da minha chegada a Manaus. A estes posso considerá-los como meus colaboradores e amigos por confiarem e acreditarem em mim, afinal amigos são aqueles que estão contigo não somente nas horas alegres mais também nas horas tristes e que mais se precisa. Não vou citar nomes, pois como sou humana e minha memória não é perfeita por algum lapso da mesma posso acabar esquecendo algum e isso seria uma injustiça;

Agradeço a FAPEAM- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (Edital, N. 015/2010 – RH - Interiorização), pela bolsa de mestrado concedida a mim;

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCT/CNPq) pelo apoio financeiro vindo dos editais (553292/2005-6, CT/AMAZÔNIA/MCT/CNPq) e (MCT/CNPq/FNDCT No. 19/2009, 556853/2009-1) e a Bolsa de Pesquisa da Fundação de Apoio Institucional MURAKI;

Agradeço a FAPEAM a bolsa de Pesquisador Visitante Sênior (PVS) concedida ao Prof. Dr. Yuji Takahata, meu co-orientador;

Agradeço em especial ao Dr. Yuji Takahata, como já mencionado meu co-orientador, por dispor de boa parte do seu tempo para ensinar as técnicas, a execução do trabalho, o esclarecimento de dúvidas e a correção da Dissertação;

Agradeço aos meus colegas de trabalho do Laboratório de Tecnologia com Moléculas Bioativas – LTMB, da Universidade do Estado do Amazonas, Escola Superior de Tecnologia, por serem companheiros e terem colaborado para a realização deste trabalho, em especial a Doutora Luiza Gabriel, quando a mesma fazia parte deste grupo, a Doutora Ângela Makawa, aos mestrandos André Henrique, Diego dos Santos e Gisele Franco, por toda ajuda concedida a mim, estando sempre disponíveis nas horas que mais precisei;

Agradeço a Universidade do Estado do Amazonas – UEA – pela disponibilização deste curso de Mestrado e a todos os mestres e colaboradores que

fazem parte da equipe pedagógica e administrativa desta Instituição que tem grande influência na profissional que me tornei. Por fim agradeço ao meu orientador, Professor Dr. Alberto dos Santos Marques, por acreditar na realização deste sonho e por sua compreensão nos percalços em que me encontrei.

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO/REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1 A Malária.....	1
1.1.1 No mundo.....	3
1.1.2 No Brasil.....	4
1.1.3 Ciclo de Vida.....	6
1.1.4 Manifestações clínicas.....	8
1.1.5 Diagnóstico.....	8
1.1.6 Características do <i>Plasmodium falciparum</i> .....	10
1.1.7 Tratamento.....	12
1.2 Os Antimaláricos.....	14
1.2.1 Classificação.....	15
1.2.2 Quinolinometanóis.....	17
1.2.3 Mecanismo de ação.....	21
1.2.4 A resistência do <i>Plasmodium falciparum</i> .....	24
1.2.5 Planejamento e Desenvolvimento de Antimaláricos.....	27
1.3 A Química Medicinal.....	27
1.3.1 A Interação fármaco-receptor.....	28
1.4 QSAR.....	31
1.4.1 Dimensões em QSAR.....	34
1.4.2 QSAR-2D.....	34
1.4.3 Metodologia geral para o estudo QSAR.....	36
1.4.3.1 Seleção de ligandos e otimização estrutural.....	37
1.4.3.2 Descritores Moleculares.....	39
1.4.3.3 Seleção de Variáveis.....	40
1.4.3.4 Análise de Regressão e Validação.....	44
1.4.3.5 Análise do Domínio de Aplicabilidade do Modelo.....	50
1.5 Estudo da Relação Estrutura-Atividade de Quinolina metanóis...	52
2. OBJETIVOS.....	55
2.1 Geral.....	55



2.2	Específicos.....	55
3.	METODOLOGIA/MATERIAL E MÉTODOS.....	56
3.1	Seleção de Ligandos.....	56
3.2	Geometria Molecular e Otimização.....	58
3.3	Cálculo dos Descritores.....	59
3.4	Seleção das Variáveis e Construção do Modelo.....	59
3.5	Validação do Modelo.....	62
4.	RESULTADOS.....	66
4.1	Modelo QSAR e Descritores.....	66
5.	DISCUSSÃO.....	73
5.1	Modelo QSAR e Descritores.....	73
6.	CONCLUSÃO.....	76
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

## LISTA DE TABELAS

		Página
TABELA 1	Zonas climáticas internacionais.....	4
TABELA 2	Principais fármacos antimaláricos organizados por grupo químico e atividade.....	16
TABELA 3	Tabela ANOVA para o modelo de regressão linear.....	47
TABELA 4	Tabela ANOVA para o modelo de regressão linear múltipla.....	48
TABELA 5	Valores de IC90 (ng/mL), IC90 (mol/L) e Log 1/IC90 contra o <i>Plasmodium falciparum</i> a partir da seletividade de alquilamino quinolina metanol (AAQMs).....	58
TABELA 6	Valores da atividade biológica observada, prevista, dos resíduos e os valores de G3v e R2e de cada alquilamino quinolina metanol (AAQM).....	67
TABELA 7	Tabela ANOVA para o modelo de regressão linear múltipla representado pela Eq. 30.....	68
TABELA 8	Validação do QSAR (n = 12) pelos parâmetros RQK.....	69
TABELA 9	Valores da atividade biológica observada, prevista, dos resíduos e os valores de G3v e R2e de cada alquilamino quinolina metanol (AAQM) da validação externa.....	70
TABELA 10	Tabela ANOVA para o modelo de regressão linear múltipla representado pela Eq. 31.....	71
TABELA 11	Validação do QSAR (n = 9) pelos parâmetros RQK.....	72

## LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Mapa dos países ou áreas de risco de transmissão da Malária, 2010.....	3
FIGURA 2	Classificação das áreas de risco para malária segundo a Incidência Parasitária Anual (IPA).....	5
FIGURA 3	Ciclo biológico do <i>Plasmodium sp.</i> .....	7
FIGURA 4	Elementos que podem confundir o diagnóstico de malária.....	10
FIGURA 5	Desenvolvimento intra-eritrocítico do <i>P. falciparum</i> .....	11
FIGURA 6	Local de ação dos agentes antimaláricos.....	15
FIGURA 7	Estrutura da quinina.....	18
FIGURA 8	Estrutura da quinidina.....	19
FIGURA 9	Estrutura da mefloquina (* indica os centros quirais).....	20
FIGURA 10	Estrutura da Ferriprotoporfirina IX, $\beta$ -Hematina e Hemozoína.....	22
FIGURA 11	Organização molecular da membrana celular.....	29
FIGURA 12	Modelo chave-fechadura.....	30
FIGURA 13	Concepção esquemática do planejamento racional de fármacos.....	31
FIGURA 14	Esquema ilustrativo dos passos na elaboração de um estudo QSAR e construção do modelo preditivo.....	36
FIGURA 15	Mapeamento do espaço conformacional em espaços regulares.....	41
FIGURA 16	A combinação de ângulos torsionais gera novas conformações.....	42
FIGURA 17	Ilustração de um cromossomo. Cada cor representa um gene diferente que por sua vez está associado a presença (1) ou ausência (0) de determinada variável.....	42
FIGURA 18	Explicação gráfica para a decomposição da variância total.....	46
FIGURA 19	Andaime quinolina metanol.....	52
FIGURA 20	Síntese da nova geração do andaime quinolina metanol.....	53
FIGURA 21	Compostos alquilamino quinolina metanol (AAQM) estudados.....	57
FIGURA 22	Interface do programa DRAGON com os blocos de descritores.....	59
FIGURA 23	Gráfico da atividade experimental ( $Y_{exp}$ ) em função da atividade calculada ( $Y_{cal}$ ).....	67
FIGURA 24	Diagrama de Williams – Domínio de Aplicabilidade do conjunto de treinamento.....	68
FIGURA 25	Gráfico da atividade experimental ( $Y_{exp}$ ) em função da atividade calculada ( $Y_{cal}$ ) da validação externa.....	70
FIGURA 26	Diagrama de Williams – Domínio de Aplicabilidade do conjunto teste.....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
AAQM	Alquilamina Quinolina Metanol
AD	Domínio de Aplicabilidade ( <i>Applicability Domain</i> )
AM1	Modelo de Austin 1 ( <i>Austin Model 1</i> )
ANOVA	Análise de variância
C	Concentração Molar de um composto
CADD	<i>Computer Assisted Drug Design</i>
CEFIC	<i>European Chemical Industry Council</i>
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
ED <sub>50</sub>	Concentração Molar correspondente a 50% da dose efetiva
Fe(II)PPIX	Ferriprotoporfirina IX
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
GA	Algoritmo Genético ( <i>Genetic Algorithm</i> )
HRPII	<i>Histidine rich protein II</i>
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória média (concentração que reduz o efeito em 50%)
IC <sub>90</sub>	Concentração inibitória que reduz o efeito em 90%
ICCA	<i>International Council of Chemical Associations</i>
IPA	Incidência Parasitária Anual
IUPAC	União Internacional da Química Pura e Aplicada ( <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> )
K <sub>i</sub>	Constante de dissociação de um inibidor
LD <sub>50</sub>	Dose letal média (concentração letal para 50% da população de animais de teste em um tempo prescrito)
LNO-CV	<i>Leave-N-out</i>
log 1/IC <sub>90</sub>	Atividade biológica
LOO-CV	<i>Leave-one-out</i>
MS	Ministério da Saúde
MQ	Mefloquina
NGQM	Nova Geração de Quinolina Metanol
OECD	<i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCA	Análise de Componentes Principais
Q <sup>2</sup>	Coefficiente de correlação da validação cruzada
QMs	Quinolina Metanóis
QSAR	Relações Quantitativas Estrutura-Atividade ( <i>Quantitative Structure-Activity Relationships</i> )
R	Coefficiente de correlação
R <sup>2</sup>	Coefficiente de Determinação
R <sub>ajust</sub> <sup>2</sup>	Coefficiente de Determinação ajustado
RAVREDA	Rede Amazônica de Vigilância da Resistência às Drogas Antimaláricas

RLM	Regressão Linear Múltipla
RM1	Modelo Recife 1 ( <i>Recife Model 1</i> )
ROS	<i>Reactive Oxygen species</i>
S <sub>e</sub>	Desvio padrão ou erro de estimativa
SAR	Relações Estrutura-Atividade ( <i>Structure-Activity Relationships</i> )
SPRESS	Desvio padrão da validação
SSE	Soma dos Erros Quadráticos ( <i>Sum of Squared Errors</i> )
SVS	Secretaria de Vigilância Sanitária
VD	Vacúolo digestivo
WHO	<i>World Health Organization</i>

## RESUMO

Foi realizada uma análise de QSAR-2D em doze quinolinas metanol substituídas na posição 4 com atividade antimalárica frente ao *Plasmodium falciparum*. Os métodos quânticos semi-empíricos AM1 e RM1 foram usados para calcular a geometria e algumas propriedades moleculares. O programa DRAGON também foi usado para produzir os descritores e o MobyDigs foi usado para selecionar descritores e construir modelos QSAR. Os melhores modelos QSAR obtidos usaram regressão linear múltipla. O modelo com 12 compostos teve como descritores, G3v e R2e, resultando em  $r^2 = 0,90$ ,  $q^2 = 0,79$  e  $q^2_{boot} = 0,72$ . A validação foi feita com funções de aptidão RQK. Foi mostrado que o modelo QSAR satisfaz a todos os critérios requeridos para validação, indicando que o modelo de regressão é aceitável. A validação externa foi feita com a exclusão dos compostos AAQM\_4, AAQM\_7 e AAQM\_11. O novo modelo gerado teve como descritores, MPC05 e Mor28u, com  $r^2 = 0,98$ ,  $q^2 = 0,97$  e  $q^2_{boot} = 0,94$ . Considerado válido pelas funções RQK de ajuste.

**Palavras chaves: malária, QSAR, quinolina metanol**

## ABSTRACT

An analysis of 2D-QSAR was realized in twelve two quinoline methanol substituted in position 4 with antimalarial activity against the *Plasmodium falciparum*. The semi-empirical quantum methods AM1 and RM1 were used to calculate the geometry and some molecular properties. The DRAGON program was also used to produce descriptors and MobyDigs was used to select descriptors and build QSAR models. The best obtained from QSAR models used multiple linear regression. The model with 12 composed have descriptors, and G3v R2e, resulting in  $r^2 = 0.90$ ,  $q^2 = 0.79$  and  $q^2_{boot} = 0.72$ . The validation was performed on RQK fitness functions. It was shown that the QSAR model satisfies all the criteria required for validation, indicating that the regression model is acceptable. The external validation was performed with the exclusion of compounds AAQM\_4, AAQM\_7 and AAQM\_11. The new model was generated as descriptors, and Mor28u MPC05, with  $r^2 = 0.98$ ,  $q^2 = 0.97$  and  $q^2_{boot} = 0.94$ . Considered valid for the functions RQK adjustment.

**Keywords:** malaria, QSAR, quinoline methanol.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 A MALÁRIA

A malária também conhecida como paludismo, febre palustre, impaludismo, maleita ou sezão é uma doença que acompanha a história da humanidade desde os seus primórdios, tendo vitimado muitos personagens importantes da nossa história e muitas vezes mudado o rumo dos acontecimentos. Reis, rainhas, líderes religiosos e militares, pensadores e até papas foram vítimas desta doença que continua sendo uma ameaça global de saúde pública (Foye *et al.*, 1995; França *et al.*, 2008).

Ela foi identificada, em escritos chineses, datados de 3000 a.C., e na medicina ocidental através de sua descrição detalhada por Hipócrates que descobriu as suas características de ocorrência sazonal e de febre intermitente. Entretanto, foi somente no século XIX que o termo malária teve origem. Escritores italianos defendiam a tese de que a doença era causada por vapores nocivos exalados dos pântanos tiberianos, designando-a “mal aria” cujo sentido literal é “mau ar” ou “ar insalubre” (Braga & Fontes, 2002; Nogueira, 2007).

Em 1880, um médico francês, Charles Louis Alphonse Laveran, conseguiu observar organismos em movimento ao examinar, a fresco, o sangue de um paciente com malária, identificando os parasitas causadores da doença. Ronald Ross, cirurgião do Serviço Médico Indiano, em 1897, tornou possível a elucidação do modo de transmissão, ao encontrar formas do parasito da malária no interior de um mosquito que havia se alimentado em um portador da doença. O ciclo completo de desenvolvimento do parasito no homem e na fêmea do mosquito *Anopheles* foi descrito pelos pesquisadores italianos Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli e Batista Grassi, em estudos realizados entre 1898 e 1899 (Villalón, 2004; Gomes, 2006).

Durante a primeira metade do século XX muitas pesquisas foram dedicadas ao controle da malária, especialmente no sentido de reduzir ou eliminar a presença de criadouros do inseto transmissor. Em outra direção, as dificuldades no fornecimento da



quinina durante a Primeira Guerra Mundial estimularam pesquisadores alemães à obtenção de antimaláricos sintéticos, culminando com o desenvolvimento da pamaquina (1924), mepacrina (1930) e cloroquina (1934). Também foram desenvolvidos estudos para a síntese de substâncias com ação inseticida, que apresentaram seu ápice em 1942, quando Paul Hermann aplicou com fins inseticidas o composto dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), que demonstrou grande atividade inseticida, elevado poder residual e baixo custo (Dutra, 2001; Gomes, 2006).

Considerando os conhecimentos adquiridos sobre o inseto transmissor, que apresenta atividade no interior dos domicílios, o qual após o repasto sangüíneo repousa por horas nas paredes internas das casas, associado com as características do DDT, que seria aplicado nas paredes, e na existência de drogas efetivas para o tratamento, muitos foram levados a crer na possibilidade da doença ser erradicada (Dutra, 2001; Gomes, 2006).

Entretanto, por volta da década de 60, surgiram cepas do *Plasmodium falciparum* resistentes às drogas antimaláricas. Simultaneamente algumas espécies de anofelinos demonstraram resistência ao inseticida DDT. Com isso, a malária voltou a se expandir em diversos países (Mouchet, 1988; Wernsdorfer, 1991).

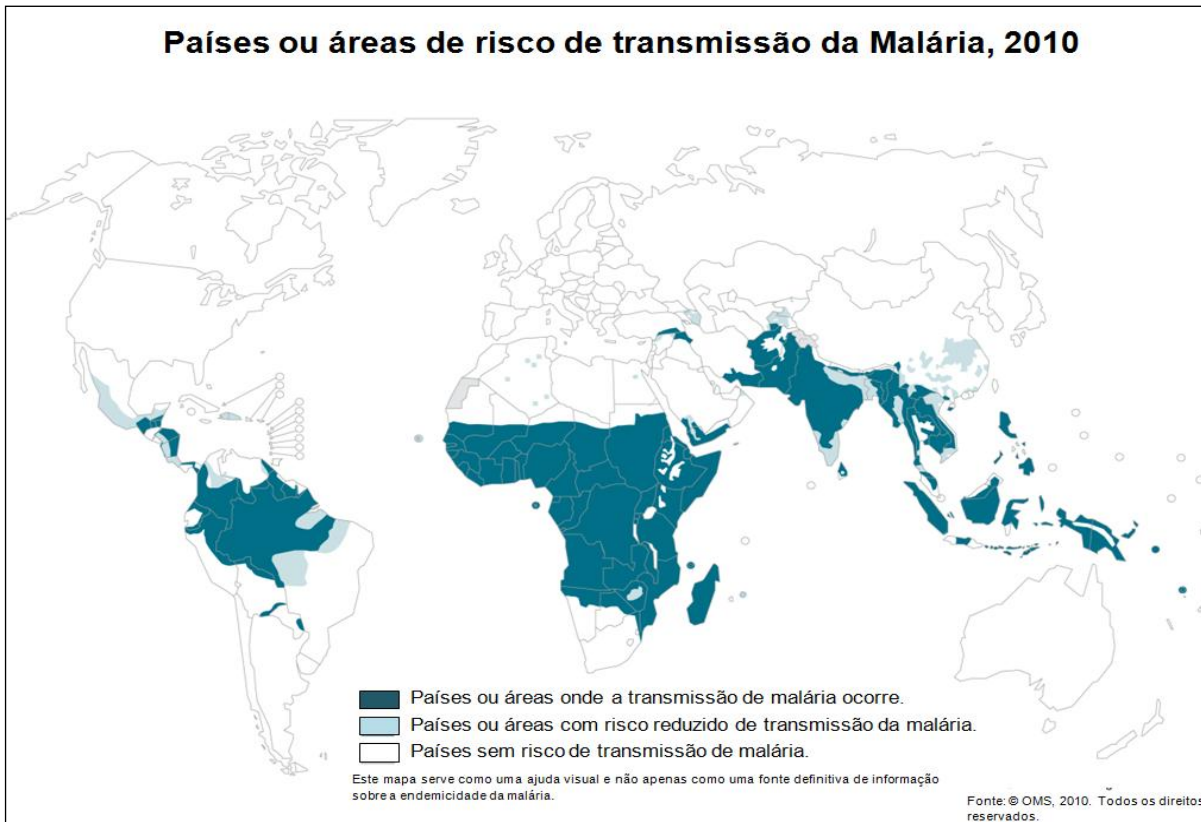
Todo esse sofrimento da humanidade deve-se a dois inimigos que se aliaram há milênios: um protozoário e um mosquito. O protozoário é um parasita unicelular do filo *Apicomplexa*, classe *Sporozoea*, ordem *Haemosporidia*, família *Plasmodiidae* e gênero *Plasmodium*. Os vetores são mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles*. O ciclo de vida ocorre nos vertebrados, de forma assexuada, e no mosquito fêmea, de forma sexuada, atingindo órgãos variados nos dois hospedeiros. Ocasionalmente, a transmissão também pode ocorrer por transfusão sanguínea, por compartilhamento de agulhas e seringas infectadas com o parasito, acidentes laboratoriais e outras formas menos freqüentes como a transmissão congênita (Gomes, 2006; Scalercio, 2010; Gomes *et al.*, 2011).

Atualmente são conhecidas 150 espécies causadoras de malária em diferentes hospedeiros vertebrados. Destas, até o ano de 2008, quatro espécies de protozoários causadores da malária humana haviam sido descritas, *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*. Recentemente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconheceu o *P. knowlesi* como a quinta espécie de plasmódio causadora da malária em seres humanos (Cox-Singh & Singh, 2008; Cox-Singh *et al.*, 2010).

Dentre as espécies causadoras da malária o *P. falciparum* é considerado o mais virulento e potencialmente letal para humanos, por causar a forma mais grave da doença. Crianças, mulheres grávidas e viajantes de zonas não endêmicas são mais susceptíveis de apresentar a forma mais grave da doença e suas complicações (Gomes *et al.*, 2011; Macufa & Bassanezi, 2011).

### 1.1.1 No MUNDO

Metade da população mundial, 3,3 bilhões de pessoas, está exposta à transmissão da malária em áreas de risco. Ela ocorre em 109 países, sendo endêmica nas regiões tropicais e subtropicais da África, sudeste asiático e América Latina (**Figura 1**) (WHO, 2010).



**Figura 1.** Mapa dos países ou áreas de risco de transmissão da malária, 2010. Fonte: Adaptado, WHO, 2010.

No ano de 2009 foram registrados no mundo 500 milhões de casos e 800.000 óbitos causados por esta doença. Isto representou uma queda de 20% em dez anos de combate (Aguiar, 2011).

Segundo a OMS, em 2010 houve 655 mil mortes por malária, sendo que 91% dos casos ocorreram na África e 86% tiveram como vítimas crianças com menos de cinco anos. Porém, uma nova pesquisa publicada na revista *The Lancet* aponta que a malária é responsável pela morte de 1,2 milhões de pessoas ao ano em todo o mundo, quase o dobro do que se estimava anteriormente pela OMS (WHO, 2011; Murray *et al.*, 2012).

A nova pesquisa verificou que de 1980 a 2010 o total de mortes aumentou de 1 milhão em 1980 para o máximo de 1,8 milhão em 2005. O aumento se deve, segundo os autores, à resistência do *Plasmodium* e a maior suscetibilidade da população com risco de ser contaminada (Murray *et al.*, 2012).

Apesar do número elevado, o 1,2 milhão de mortes em 2010 representam uma queda de 32% desde 2004. A situação é mais crítica na África, com 700 mil mortes pela

doença em crianças com menos de 5 anos em 2010. Mas os adultos têm sido muito atingidos. O estudo indica que um terço das mortes atribuídas à malária em 2010 ocorreu em adultos (Murray, 2012).

Na comparação com o relatório da OMS, o estudo indica 1,3 vezes mais mortes de crianças com menos de 5 anos, 8,1 vezes mais mortes de crianças mais velhas na África, e um aumento na mortalidade de 1,8 vezes para pessoas de todas as idades no resto do mundo (Murray, 2012).

Apesar disso, as intervenções adotadas na última década para tentar conter a transmissão têm contribuído para diminuir a mortalidade da malária, no mundo (Murray, 2012).

### 1.1.2 No BRASIL

Aproximadamente 99,9% dos casos de malária no Brasil ocorrem na Amazônia Legal, que compreende os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (Secretaria de Vigilância Sanitária – SVS, 2009; Aguiar, 2011).

Isso ocorre devido a Amazônia Legal ser uma região com temperatura e umidade relativamente altas, sendo classificada segundo as zonas climáticas internacionais na zona climática IV (**Tabela 1**, Zona Climática IV, clima quente, úmido, Região Brasil). Estas condições climáticas geralmente aceleram a degradação química e podem alterar as propriedades biofarmacêuticas dos medicamentos. Este é um dado importante, pois o uso de doses subterapêuticas de antimaláricos pode exercer uma pressão seletiva le-

**Tabela 1.** Zonas climáticas internacionais (THE UNITED, 2006).

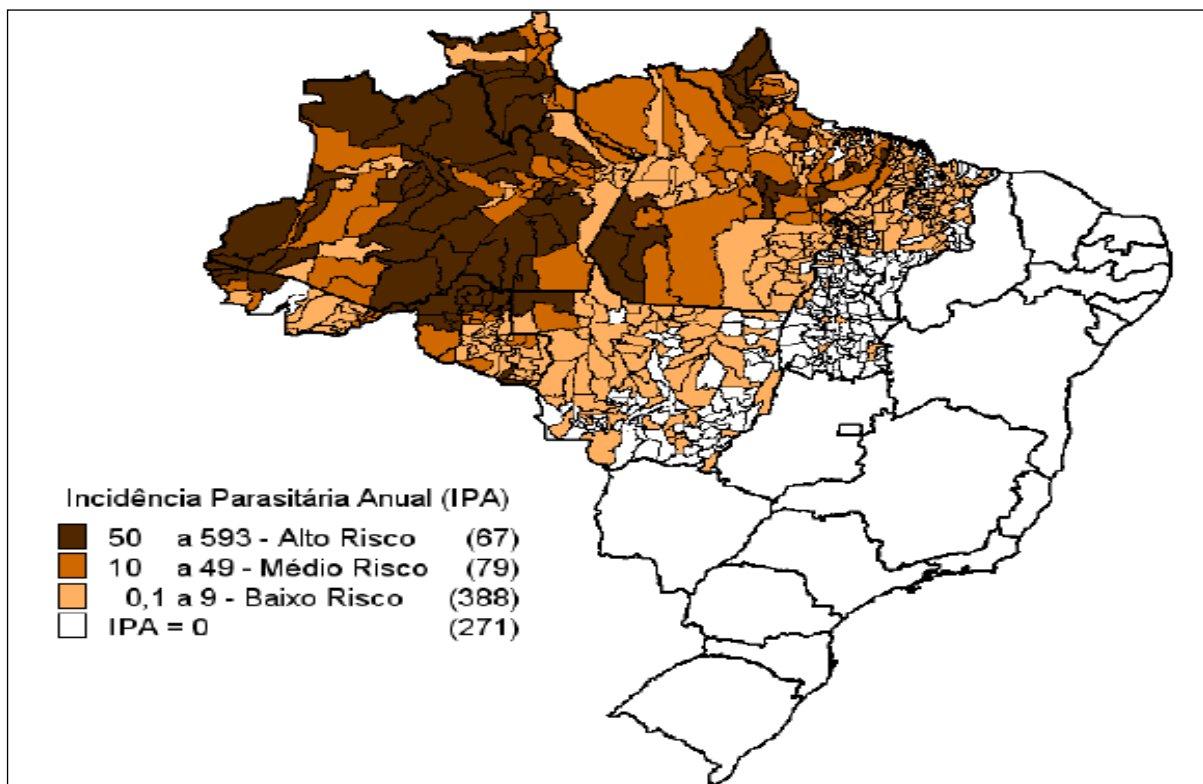
<i>Zona Climática</i>	<i>Regiões</i>
I. Temperada	Japão Reino Unido Europa Setentrional Canadá Rússia Estados Unidos da America
II. Mediterrânea, subtropical	Estados Unidos da América Japão Europa Meridional (Portugal – Grécia)
III. Quente, seco	Irã Iraque Sudão
IV. Quente, úmido	Brasil Gana Indonésia Nicarágua Filipinas

vando a organismos resistentes aos fármacos, resultado de infecções tratadas incompletamente com medicamentos de má qualidade ou medicamentos degradados (Taylor *et al.*, 1995; Kayumba *et al.*, 2004; Nogueira, 2007).

Outro fator também importante é que o cotidiano do homem da Amazônia, se tratando especificamente do Amazonas, está diretamente ligado ao ambiente natural, até mesmo nas cidades entrecortadas pela rica malha hídrica da região. O trabalho de grande parcela da população está ligado a essas condições naturais também nos ambientes não urbanos, e essa necessidade muitas vezes impõe aos trabalhadores amazônicos o contato direto com as situações de risco malarígeno (Silva *et al.*, 2009).

Três espécies de plasmódio são responsáveis pelos casos de malária humana no Brasil: *P. falciparum*, *P. vivax*, e *P. malariae* (SVS, 2009).

No ano de 2008 foram registrados 315.823 mil casos de malária, sendo 83% causados pelo *P. vivax*, 15% *P. falciparum*, 1% por infecções mistas e 0,02% por *P. malariae*. Na região extra-amazônica, mais de 80% dos casos registrados no Brasil são importados da área endêmica e do continente africano. A distribuição espacial do risco de transmissão da doença no Brasil é apresentada na **Figura 2**. (SVS, 2008; MS, 2010a).



**Figura 2.** Classificação das áreas de risco para malária segundo a Incidência Parasitária Anual (IPA).  
Fonte: SVS/MS, 2009.

As principais medidas de controle da doença são baseadas na proteção individual contra a picada do mosquito vetor com o uso de repelentes e mosquiteiros impregnados de

inseticida, diagnóstico específico e tratamento imediato com antimaláricos, e através de atividades de saneamento ambiental para controle do vetor (SVS, 2009).

### 1.1.3 O CICLO DE VIDA DO *PLASMODIUM*

O ciclo biológico dos plasmódios ocorre em dois hospedeiros. O homem que é considerado, o hospedeiro intermediário onde ocorre reprodução assexuada do tipo esquizogonia, e o mosquito, o hospedeiro definitivo onde ocorre a reprodução sexuada do tipo esporogonia, de acordo com o ciclo descrito na **Figura 3** (CDC, 2006).

A transmissão ao hospedeiro vertebrado inicia-se quando o inseto vetor, durante o repasto sanguíneo, inocula o parasito na forma evolutiva de esporozoítos na epiderme do hospedeiro (1). Krettli e Miller (2001) sugeriram que os mesmos poderiam ser transportados passivamente por linfócitos ou macrófagos, permanecendo íntegros até invadirem um vaso sanguíneo ativamente. Recentemente, foi proposto que cerca de 10% dos esporozoítos inoculados pela picada do inseto permanecem e evoluem na pele, no sítio de inoculação (Gueirard *et al.*, 2010).

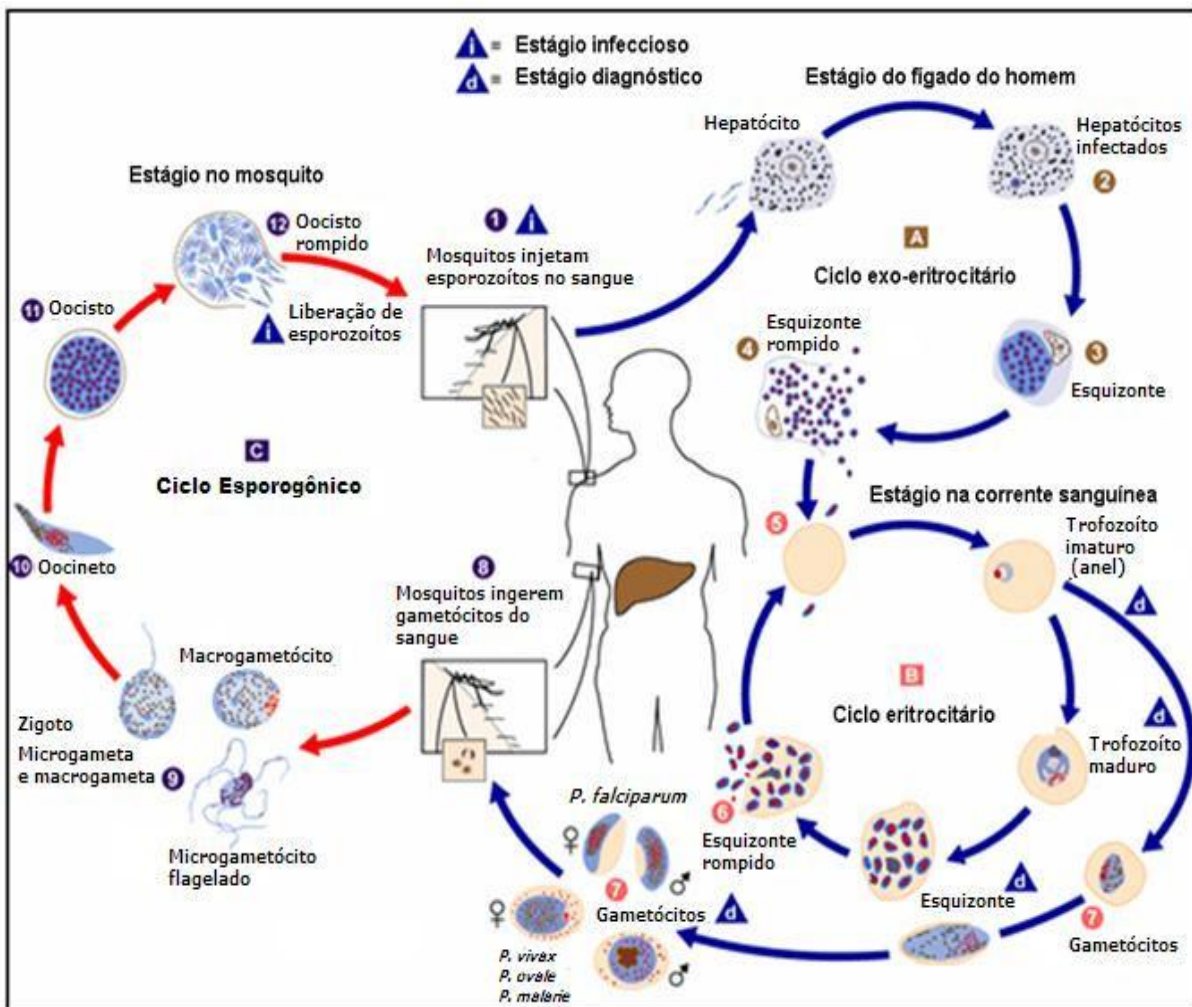
Uma vez no sistema circulatório, durante alguns minutos, os esporozoítos atingem o fígado infectando os hepatócitos (2), e iniciando a fase exo-eritrocítica ou pré-eritrocítica do ciclo (A), que é um estágio tissular primário assintomático que dura 6 dias para a espécie *P. falciparum*, 8 dias para a *P. vivax* e 12 a 15 dias para a *P. malariae*. Durante esta fase, o *P. vivax* e o *P. ovale* apresentam desenvolvimento lento de alguns dos seus esporozoítos, formando os hipnozoítos, formas latentes (dormentes) do parasito responsáveis pelas recaídas da doença meses ou anos após (Krotoski, 1982; Brasil, 2009).

Os esporozoítos invadem vários hepatócitos, migrando através deles antes de finalmente desenvolver em seu interior, um vacúolo parasitóforo. Nesse vacúolo, os parasitos se desenvolvem assexuadamente por esquizogonia dando origem aos esquizontes maduros (3) que se rompem (4) e liberam na corrente sanguínea os merozoítos, através de um processo de brotamento de vesículas denominadas merozomos. Ressalte-se que cada hepatócito rompido libera cerca de 2.000 merozoítos quando a infecção é devida ao *P. malariae*, 10.000, quando devida ao *P. vivax* e 40.000, quando devida ao *P. falciparum*. (Mota *et al.*, 2001; Sturm *et al.*, 2006; Brasil, 2009).

Os merozoítos infectam os eritrócitos iniciando uma nova fase do ciclo de reprodução assexuada (ciclo eritrocitário ou sanguíneo, B) (5). O *P. malariae* só invade hemácias velhas (0,1% do total), o *P. vivax* invade preferencialmente as hemácias jovens e o *P. falciparum*, hemácias em qualquer fase evolutiva (Brasil, 2009).

Durante um período que varia de 48 a 72 horas, o parasito se desenvolve no interior da hemácia até provocar a sua ruptura, liberando novos merozoítos que irão invadir novas

hemácias. A ruptura e consequente liberação de parasitos na corrente sanguínea traduz-se clinicamente pelo início do paroxismo malárico, que se repetirá com o término do novo ciclo



**Figura 3.** Ciclo biológico do *Plasmodium* sp. Fonte: Adaptado CDC (2006).

(em dois dias, quando a infecção for devida ao *P. falciparum* ou *P. vivax* e em três dias, quando devida ao *P. malariae*) (Brasil, 2009).

Inicialmente, no ciclo sanguíneo, o parasito sofre uma série de transformações morfológicas – sem divisão celular – até chegar à fase de esquizonte, quando se divide e origina novos merozoítos que serão lançados na corrente sanguínea, após a ruptura do eritrócito (6). Assim, no exame microscópico do sangue pode-se observar variada morfologia do parasito – trofozoítos jovens (anéis), trofozoítos maduros, formas irregulares, esquizontes jovens e esquizontes maduros (Brasil, 2009).

Após um período de replicação assexuada, alguns merozoítos se diferenciam em gametócitos machos e fêmeas (7), que amadurecem sem divisão celular e tornam-se infectantes aos mosquitos. A função desses gametócitos é reprodutiva, isto é, garantir a perpetuação da espécie. Eles podem ser de dois tipos, diferenciados microscopicamente nos esfregaços sanguíneos: os microgametócitos (masculinos) e os macrogametócitos (femininos) (Brasil, 2009).

Ao serem ingeridos por fêmeas dos mosquitos do gênero *Anopheles* (8) iniciarão o ciclo esporogônico (C), que ocorre no estômago do mosquito, após a diferenciação dos gametócitos (em macrogametas e microgametas, 9) e a sua fusão, com formação do ovo (zigoto). Este se transforma em uma forma móvel (oocineto, 10) que migra até a parede do intestino médio do inseto, formando o oocisto (11), no interior do qual se desenvolverão os esporozoítos. O tempo requerido para que se complete o ciclo esporogônico nos insetos varia de acordo com a espécie de *Plasmodium* e com a temperatura, situando-se geralmente em torno de 10 a 12 dias. Os esporozoítos produzidos nos oocistos são liberados (12) na hemolinfa do inseto e migram até as glândulas salivares, de onde são transferidos para o sangue do hospedeiro humano durante o repasto sanguíneo (Brasil, 2009).

#### 1.1.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Os sintomas da malária envolvem a clássica tríade febre, calafrio e dor de cabeça. Sintomas gerais – como mal-estar, dor muscular, sudorese, náusea e tontura – podem preceder ou acompanhar a tríade sintomática. Contudo, esse quadro clássico pode ser alterado pelo uso de drogas profiláticas ou aquisição de imunidade, e muitos desses sintomas podem ou não estar presentes e até mesmo todos podem estar ausentes. Nos casos complicados, podem ainda ocorrer dor abdominal forte, sonolência e redução da consciência – podendo levar ao coma nos casos de malária cerebral (Brasil, 2009; França *et al.*, 2008).

Embora os ciclos evolutivos das espécies causadoras sejam similares, do ponto de vista patológico a infecção malárica apresenta diferenciações que podem determinar as variações na evolução clínica da doença. A infecção de indivíduos não imunes pelo *P. falciparum* pode resultar em forma grave e complicada, caracterizada pelo acometimento e disfunção de vários órgãos ou sistemas: sistema nervoso central, sistema hematopoiético, aparelho respiratório, fígado, sistema circulatório, rins e coagulação sanguínea. Assim, todo paciente portador dessa espécie de plasmódio deve merecer atenção especial, de modo a receber tratamento imediato, essencial para prevenir tais complicações (Brasil, 2009).

#### 1.1.5 DIAGNÓSTICO

**Diagnóstico clínico:** Por orientação dos programas oficiais de controle, em situações de epidemia e em áreas de difícil acesso da população aos serviços de saúde, indivíduos com febre são considerados portadores de malária. Entretanto, os sintomas da malária são extremamente inespecíficos, não se prestando à distinção entre a malária e outras infecções agudas do homem. Além disso, indivíduos semi-imunes ao plasmódio

podem ter parasitos da malária sem sintomas da doença. Portanto, o fundamental no diagnóstico clínico da malária, tanto nas áreas endêmicas como nas não endêmicas, é sempre pensar na possibilidade da doença. Como a distribuição geográfica da malária não é homogênea nem mesmo nos países onde a transmissão é elevada, torna-se importante, durante a elaboração do exame clínico, resgatar informações sobre a área de residência ou relato de viagens indicativas de exposição ao parasito. Além disso, informações sobre transfusão de sangue ou uso de agulhas contaminadas podem sugerir a possibilidade de malária induzida (MS, 2001; Gomes *et al.*, 2011).

**Diagnóstico laboratorial:** É realizado pela visualização microscópica do *Plasmodium* em exame da gota espessa de sangue, corada pela técnica de Giemsa ou de Walker, e em distensão sanguínea, que permite a identificação da espécie, mas apresenta menor sensibilidade. Apesar da microscopia ser considerada o padrão-ouro para o diagnóstico e o monitoramento do tratamento da malária, essa técnica exige pessoal treinado e experiente no exame de distensões sanguíneas (Brasil, 2005; Gomes *et al.*, 2011).

Desta forma, os exames preconizados pelo Ministério da Saúde são:

1) **Gota espessa** - considerado o exame padrão-ouro para diagnóstico da malária. Permite a contagem da parasitemia – fator preditor de gravidade na infecção por *P. falciparum* – além de permitir o acompanhamento da queda da mesma, após o início da terapêutica (Gomes *et al.*, 2011).

2) **Distensão sanguínea** - permite a identificação da morfologia do protozoário, e consequente diferenciação da espécie infectante – que é importante para a adequação do tratamento (Gomes *et al.*, 2011).

O sangue para a realização da hematoscopia pode ser colhido em qualquer veia periférica, não havendo obrigatoriedade na colheita por punção de polpa digital (Gomes *et al.*, 2011).

No diagnóstico pela observação de lâminas deve-se estar atento para as características das diversas espécies, as quais são diagnóstico diferencial da malária falcípara. O *P. falciparum* – pela sua propriedade de citoaderência –, só permite a detecção de trofozoítos na periferia e ao se observar a lâmina só se verifica a presença dessas estruturas (Gomes *et al.*, 2011).

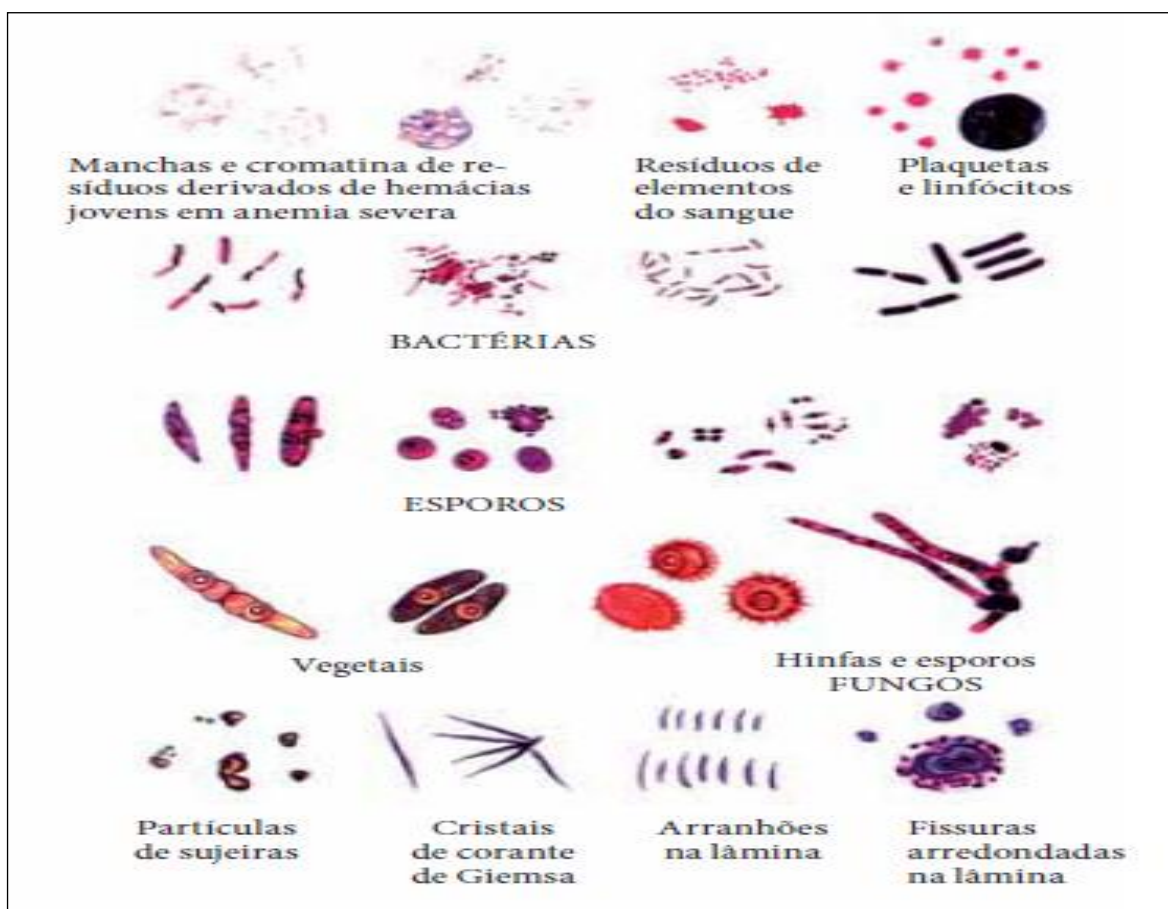
Além da hematoscopia, existem outros métodos que vem sendo desenvolvidos para o estabelecimento do diagnóstico da malária, tais como a pesquisa do parasita pelo “método dos capilares” – com utilização de acridina-laranja como corante – e o ParaSightR. Neste último, empregam-se anticorpos monoclonais dirigidos aos antígenos do *P. falciparum*, obtendo-se em alguns estudos sensibilidade e especificidades superiores a 95%. Não se presta, entretanto, para controle de cura (Brasil, 2005; Gomes *et al.*, 2011).



Nos últimos anos, vários estudos tem utilizado a reação de polimerização em cadeia (PCR) como método de detecção de DNA de *Plasmodium* circulante. Contudo, devido ao elevado custo da técnica, a mesma não é utilizada como rotina para diagnóstico de casos, permanecendo restrita a centros de pesquisa (Speers *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2006; Andrade *et al.*, 2010).

#### 1.1.6 CARACTERÍSTICAS DO *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Individualmente, os parasitos do gênero *Plasmodium* variam em tamanho, forma e aparência, confundindo-se com elementos estranhos, contaminantes das amostras de sangue, como fungos, bactérias, etc., como mostra a **Figura 4** (Brasil, 2009).



**Figura 4.** Elementos que podem confundir o diagnóstico de malária. Fonte: Brasil, 2009.

Em alguns casos, no exame da gota espessa as formas de determinada espécie se assemelham muito as de outras (anéis, pré-esquizontes e gametócitos arredondados). A única forma que se pode considerar como típica nesse exame é o gametócito de *P. falciparum*, que se apresenta em forma de “banana”, “crescente” ou “salsicha”. Ainda assim torna-se frequentemente arredondado (em vista da secagem do sangue ser demorada em clima quente e úmido), com aparência de formas de outras espécies (*P. vivax* e *P. malariae*) (Brasil, 2009).

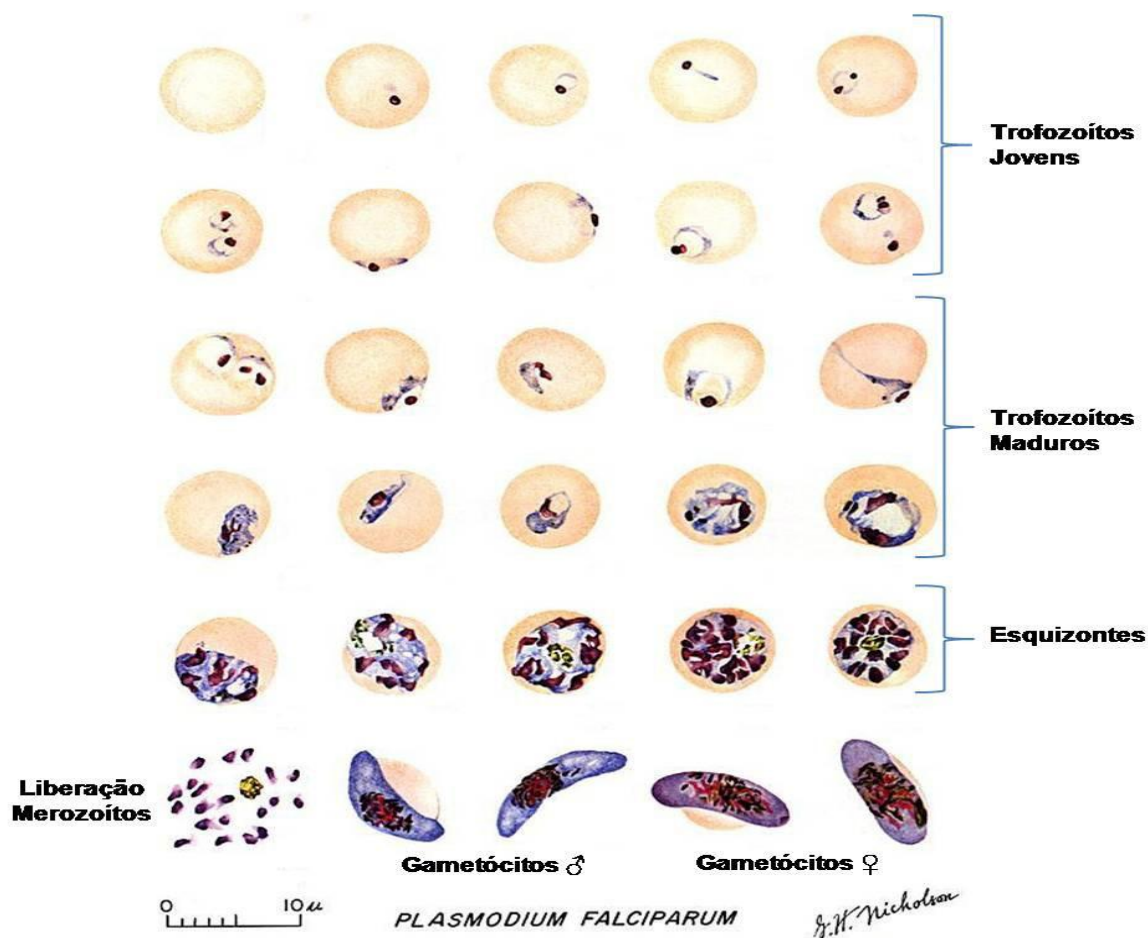
A comparação entre o tamanho das formas evolutivas dos plasmódios, de acordo com a variação de crescimento de cada espécie e o tamanho do linfócito pequeno (microlinfócito), cujo diâmetro se aproxima do diâmetro do glóbulo vermelho, pode auxiliar no diagnóstico da espécie (Brasil, 2009).

Na espécie *P. falciparum* as principais características são:

- **Trofozoíto jovem:** em forma de pequeno anel ou às vezes aberto, formando vírgulas, regulares, ligadas a uma, duas e até três pequenas massas de cromatina. Ausência de pigmento malárico (**Figura 5**).

- **Trofozoíto maduro** (forma rara): compacto, com aspecto sólido, sem vacúolo ou com pequeno vacúolo. Coloração mais escura que o mesmo estágio das outras espécies. Massa única de pigmento malárico, cuja cor varia do castanho ao negro (**Figura 5**).

- **Esquizonte:** redondo e de tamanho variado. Apresenta duas ou mais massas de cromatina e massa única de pigmento malárico. Comumente, não é visto em amostra de sangue periférico. Pode aparecer em infecções graves por esta espécie, assim como em pacientes esplenectomizados. Cada esquizonte pode apresentar de 8 a 40 merozoítos (cromatinas), usualmente de 16 a 24, assimetricamente arranjados (**Figura 5**).



**Figura 5.** Desenvolvimento intra-eritrocítico do *P. falciparum*. Fonte: Coatney et al., 1971.

- As hemácias parasitadas podem apresentar-se com a superfície irregular, sem granulações de Schuffner nem aumento do diâmetro. Parasitemias mais altas são comuns nesta espécie. O parasitismo múltiplo da hemácia é comum nas infecções graves (Brasil, 2009).

- Os parasitos invadem hemácias jovens, maduras e velhas. O pigmento malárico pode ser encontrado nos leucócitos circulantes, sendo sinal de alerta para infecção grave (Brasil, 2009).

- Os gametófitos aparecem por volta da segunda semana da parasitemia assexuada e podem permanecer no sangue periférico de 5 a 7 semanas (Brasil, 2009).

- Rotineiramente, as únicas formas parasitárias do *P. falciparum* encontradas na leitura de uma lâmina de gota espessa são anéis (trofozoítos jovens e maduros) e gametócitos (em forma de banana) (Brasil, 2009).

- Nos casos de malária grave, podem ser encontradas todas as formas evolutivas descritas, acompanhadas de esquizontes, geralmente nos casos de elevada parasitemia devida à doença por mais de uma semana (Brasil, 2009).

- O encontro de parasitos pequenos, médios e grandes é sinal de mais de uma geração, sendo raras as parasitemias sincrônicas, isto é, crescimento uniforme de uma única camada. A coleta de sangue realizada em diferentes horários pode acarretar resultados contraditórios, positivos ou negativos. Por isso, em alguns casos suspeitos, recomenda-se a coleta das lâminas em diferentes horários (Brasil, 2009).

### 1.1.7 TRATAMENTO

O tratamento oportuno e eficaz da malária é provavelmente o elemento que tem a melhor relação custo/benefício nas estratégias de controle. A maior parte da terapia antimalárica no mundo é feita com medicamentos orais para malária causada por *P. falciparum*. O tratamento por via oral previne a progressão da doença, além de, se realizado a tempo e com eficácia, ser capaz de reduzir a sua morbidade e mortalidade. Entretanto, muitas pessoas que vivem em áreas endêmicas têm pouco ou nenhum acesso ao diagnóstico e tratamento, além disso, este último comumente é inadequado porque medicamentos de qualidade e eficazes não estão disponíveis para a população, ou, se estão, são ingeridos incorretamente (prescrição incorreta ou baixa adesão ao tratamento) ou são utilizados erroneamente (em pacientes que não possuem malária). Muitos países afetados pela malária incluem, em seus esquemas terapêuticos, fármacos que são parcialmente ou completamente ineficazes (Guerin *et al.*, 2002; Nogueira, 2007).

Em várias áreas, a doença e o tratamento tendem a acontecer fora do setor de saúde formal e por isso não são incluídos nas estatísticas oficiais, ou seja, pouco se sabe sobre o comportamento das pessoas que procuram tratamento com malária sem

complicações. Estes fatores influenciam a eficiência dos programas nacionais de controle da malária. A falha em prover tratamento imediato e eficaz aos pacientes com malária não complicada leva à malária severa. Quando as condições do paciente se deterioram, o tratamento oral não é mais possível, sendo necessário o uso de medicamentos de uso retal ou injetáveis. Este atraso pode ser fatal (Guerin *et al.*, 2002; Nogueira, 2007).

Em relação aos seus objetivos, o tratamento da malária visa à interrupção da esquizogonia sanguínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da infecção. Entretanto, pela diversidade do seu ciclo biológico, é também objetivo da terapêutica proporcionar a erradicação de formas latentes do parasito no ciclo tecidual (hipnozoítas) das espécies *P. vivax* e *P. ovale*, evitando assim as recaídas tardias. Além disso, a abordagem terapêutica de pacientes residentes em áreas endêmicas pode visar também à interrupção da transmissão, pelo uso de fármacos que eliminam as formas sexuadas dos parasitos (Braga & Fontes, 2002).

Para atingir esses objetivos, diversas drogas são utilizadas, cada uma delas agindo de forma específica, tentando impedir o desenvolvimento do parasito no hospedeiro (MS, 2010b).

A decisão de como tratar o paciente com malária deve ser precedida de informações sobre os seguintes aspectos:

- a) Espécie de plasmódio infectante, pela especificidade dos esquemas terapêuticos a serem utilizados;
- b) Idade do paciente, pela maior toxicidade para crianças e idosos;
- c) História de exposição anterior à infecção uma vez que indivíduos primoinfectados tendem a apresentar formas mais graves da doença;
- d) Condições associadas, tais como gravidez e outros problemas de saúde;
- e) Gravidade da doença, pela necessidade de hospitalização e de tratamento com esquemas especiais de antimaláricos.

Qualquer paciente portador de exame positivo para a malária *falciparum* que apresente sinais e sintomas de malária grave e complicada o tratamento deve ser orientado em uma unidade hospitalar e nesses casos o principal objetivo do tratamento é evitar que o paciente morra. Para isso antimaláricos potentes e de ação rápida devem ser administrados, juntamente com todas as medidas de suporte à vida do paciente. Secundariamente, após evidência de melhora das complicações da malária grave, deve-se preocupar com a prevenção de recrudescência, da transmissão ou da emergência de resistência (MS, 2010b).

A malária grave deve ser considerada uma emergência médica. Portanto, a permeabilidade das vias aéreas deve estar garantida e os parâmetros da respiração e circulação avaliados. Se possível, o peso do paciente deve ser aferido ou estimado, para

facilitar os cálculos dos medicamentos a serem administrados. Um acesso venoso adequado deve ser providenciado e as seguintes determinações laboratoriais solicitadas: glicemia, hemograma, determinação da parasitemia, gasometria arterial e parâmetros de função renal e hepática. Exame clínico neurológico minucioso deve ser realizado, com especial atenção para o estado de consciência do paciente, registrando-se o escore da escala de coma (por exemplo, a escala de Glasgow) (MS, 2010b).

É da maior importância também que todos os profissionais de saúde envolvidos no tratamento da malária, desde o auxiliar da comunidade até o médico, orientem adequadamente, com uma linguagem compreensível, os pacientes quanto ao tipo de medicamento que está sendo oferecido, a forma de ingeri-lo e os respectivos horários. Pois, muitas vezes os pacientes são pessoas humildes que não dispõem nem mesmo de relógio para verificar as horas. O uso de expressões de 8 em 8 horas ou de 12 em 12 horas muitas vezes não ajuda o paciente a saber quando deve ingerir os medicamentos. Sempre que possível deve-se orientar os acompanhantes ou responsáveis, além dos próprios pacientes, visto que, geralmente estes, além de humildes, encontram-se desatentos, devido a febre, dor e mal-estar causados pela doença (MS, 2010b).

Em vários lugares, as pessoas que distribuem os remédios e orientam seu uso utilizam envelopes de cores diferentes para cada medicamento. O importante é que se evite ingestão incorreta dos remédios, pois as consequências podem ser graves. Portanto, uma prescrição legível, clara e compreensível deve ser feita, para que a adesão do paciente ao tratamento seja garantida (MS, 2010b).

## 1.2 Os ANTIMALÁRICOS

Atualmente os fármacos antimaláricos são baseados em produtos naturais ou compostos sintéticos produzidos a partir da década de 40. Esses fármacos são específicos para cada etapa do ciclo de vida do *Plasmodium* (França *et al.*, 2008).

A eficácia deles depende da interação de três fatores: humano (imunidade), do parasito (resistência à droga) e da farmacocinética (variação individual). A quimioterapia adequada e oportuna da malária é hoje fundamental no controle da doença. Tão importante quanto é o conhecimento das características químicas e farmacológicas dos antimaláricos é o entendimento das propriedades farmacocinéticas, eficácia, grau de tolerância e a capacidade de induzir os efeitos tóxicos do parasito (Melo, 2005).

Tradicionalmente, estágios sanguíneos assexuados são alvos terapêuticos, particularmente nas infecções pelo *P. falciparum*, na qual os parasitas maduros nos estágios trofozoíta e esquizonte invadem os capilares do sistema nervoso central (SNC) e de outros órgãos, conduzindo às complicações severas da malária. Também merecem atenção,

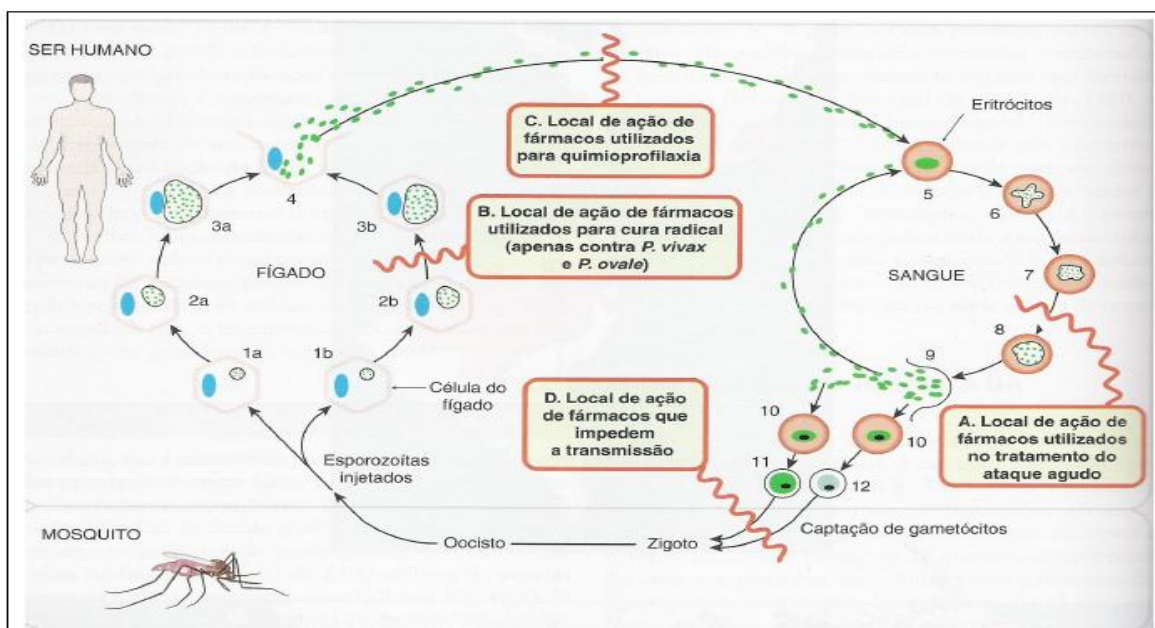
drogas para o estágio hepático, principal recidiva da doença. Já os tratamentos associando drogas que impedem a formação do gametócito são utilizados para impedir a transmissão (MS, 2009; Scalercio, 2010).

### 1.2.1 CLASSIFICAÇÃO

Segundo Sweetman (2005) e França *et al.* (2008), os principais fármacos antimaláricos podem ser classificados de acordo com a fase do ciclo de vida do parasita que afetam (**Figura 6**), em:

- **Esquizotípicos sanguíneos**: agem nos estágios eritrocíticos do parasita, responsáveis pelos sintomas clínicos da doença, no tratamento do ataque agudo (**Figura 6.A**). Podem produzir uma cura clínica ou supressão da infecção por cepas suscetíveis das quatro espécies de plasmódio, mas não produzem uma cura radical das formas latentes das malárias *vivax* ou *ovale*;

- **Esquizotípicos teciduais**: agem nos estágios exoeritrocíticos do parasita e são utilizados para profilaxia para prevenir a invasão das células sanguíneas, ou para promover a cura radical das malárias *vivax* e *ovale* (**Figura 6.B**);



**Figura 6.** Local de ação dos agentes antimaláricos. Fonte: Boareto, 2007.

- **Gametocitocidas**: destroem as formas sexuadas do parasita para interromper a transmissão do homem para o inseto vetor, de forma que quando esse é picado por outro mosquito se evita a transmissão da doença para o inseto e assim a disseminação da doença para outras pessoas (**Figura 6.C**);

- **Esporonticidas**: não têm efeito direto sobre os gametócitos no hospedeiro, mas previnem a esporogonia no mosquito vetor, visto que, são capazes de matar os parasitas

assim que eles entram na corrente sangüínea, após a picada do mosquito, ou ainda destruí-los quando são liberados pelos esquizontes hepáticos ou sanguíneos (**Figura 6.D**).

Os fármacos antimaláricos podem também ser classificados de acordo com o grupo químico ao qual pertencem (**Tabela 2**) (Nogueira, 2007).

**Tabela 2.** Principais fármacos antimaláricos organizados por grupo químico e atividade (Sweetman, 2005).

Grupo Químico	Principais Fármacos	Atividade
4-metanolquinolinas	Alcalóides da cinchona Quinina Quinidina Mefloquina	Esquizonticida sanguíneo de ação rápida. Atividade gametocitocida marginal Esquizonticida sanguíneo
4-aminoquinolinas	Cloroquina Hidroxicloroquina Amodiaquina	Esquizonticidas sanguíneos de ação rápida. Atividade gametocitocida marginal.
8-aminoquinolinas	Primaquina Tafenoquina	Esquizonticidas teciduais. Apresentam atividade gametocitocida e agem em outras fases do ciclo de vida do parasita.
Biguanidas	Proguanil Chorproguanil	Esquizonticidas teciduais e esquizonticidas sanguíneos de ação lenta. Atividade esporonticida marginal. Inibidores da diidrofolato redutase.
Diaminopirimidinas	Pirimetamina	Esquizonticida tecidual e esquizonticida sanguíneo de ação lenta. Inibidor da diidrofolato redutase. Usualmente empregado em associação com fármacos que inibem diferentes estágios da síntese do folato, para ação sinérgica.
Diclorobenzilidinas	Lumefantrina	Esquizonticida sanguíneo.
Hidroxinaftoquinonas	Atovaquona	Esquizonticida sanguíneo. Usualmente empregado em combinação com proguanil.
9-Fenantrenometanóis	Halofantrina	Esquizonticida sanguíneo.
Lactonas sesquiterpênicas	Artemisinina e seus derivados	Esquizonticidas sanguíneos.
Sulfonamidas	Sulfadoxina Sulfametopirazina	Esquizonticidas sanguíneos. Inibidores do diidropteroato e do folato. Usualmente empregados em combinação com pirimetamina.
Tetraciclinas	Doxiciclina Tetraciclina	Esquizonticidas sanguíneos. Atividade esquizonticida tecidual marginal.
Lincosamidas	Clindamicina	Esquizonticidas sanguíneos. Atividade esquizonticida tecidual marginal.
Sulfonas	Dapsona	Esquizonticida sanguíneo. Inibidor da síntese do folato. Usualmente empregado em combinação com pirimetamina.

De acordo com o modo de ação, os principais fármacos antimaláricos são classificados em dois grandes grupos: O primeiro grupo inclui os alcalóides derivados da *cinchona*, as aminoquinolinas e as acridinas. Acredita-se que esses fármacos podem interferir no metabolismo da glicose em diferentes pontos e também na habilidade do parasita de digerir a hemoglobina, impedindo, assim, que ele se alimente ou intoxicando-o com altos níveis de ferriprotoporfirina-IX, que é um subproduto tóxico da digestão da hemoglobina (Rey, 2001; Robert *et al.*, 2001; Silva, 2005).

O segundo grupo inclui as pirimidinas e biguanidas e envolve a interferência na síntese do ácido tetra-hidrofólico, importante cofator no processo de síntese de DNA e de aminoácidos (Delfino *et al.*, 2002; França *et al.*, 2008).

É importante mencionar que os fármacos antimaláricos podem atuar contra mais de uma forma do protozoário e serem efetivos contra uma espécie, mas totalmente ineficazes contra outras.

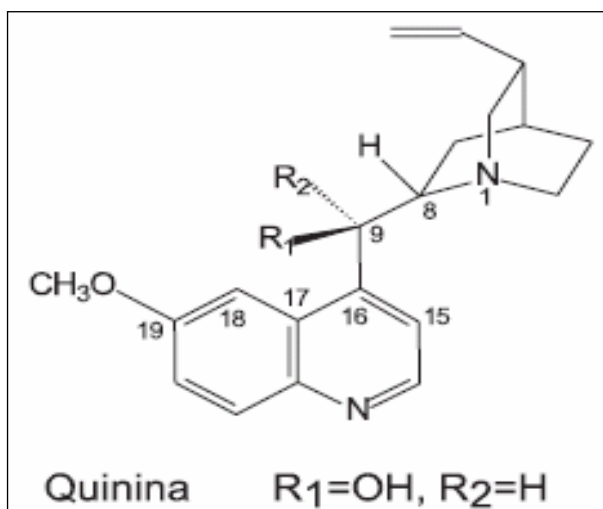
### 1.2.2 QUINOLINOMETANÓIS

A quinina foi o primeiro quinolinometanol de uso medicinal datada há mais de 350 anos contra a malária. Ela é o principal alcalóide da cinchona, a casca da árvore sul-americana também conhecida como quina, casca do jesuíta ou do cardeal. Em 1633, um monge agostiniano denominado Calancha, de Lima, Peru escreveu pela primeira vez sobre o poder da cinchona que “dada de beber cura febres e terçãs”. Em 1640, a cinchona foi utilizada para tratar febres na Europa, fato mencionado pela primeira vez na literatura médica europeia em 1643. Os padres jesuítas eram os principais importadores e distribuidores da cinchona na Europa, daí o nome de casca do jesuíta. A cinchona também era chamada de casca do cardeal porque foi subvencionada em Roma pelo eminente filósofo Cardeal de Lugo. No entanto, a comunidade médica demorou a aceitar a cinchona, retardando seu conhecimento oficial até 1677, quando foi incluída na London Pharmacopoeia como “Cortex Peruanus” (Tracy & Webster, 2003; França *et al.*, 2008).

Durante quase dois séculos a casca foi utilizada pela medicina como pó, extrato ou infusão. Em 1820, Pelletier e Caventou isolaram a quinina e a cinchonina da cinchona, e o uso dos alcalóides foi rapidamente favorecido. Até o século XX foi o único tratamento disponível contra a malária, quando então foi substituída por fármacos sintéticos derivados do anel quinolínico. Apesar de sua toxicidade, ela continua sendo utilizada no tratamento da malária cerebral, causada pelo *P. falciparum*, inclusive em crianças menores que cinco anos na África (Tracy & Webster, 2003; Nogueira, 2007; WHO, 2009).

Sua estrutura química consiste de um anel quinolínico bi-conjugado heterocíclico ligado a um anel quinuclidínico alifático bi-heterocíclico ligado por um carbono alcoólico C9, que é um dos quatro centros quirais desta molécula (**Figura 7**) (Warhurst *et al.*, 2003).





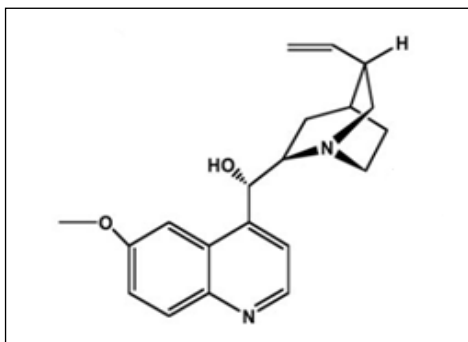
**Figura 7.** Estrutura da quinina. Fonte: Adaptado de Karle & Karle, 2002.

A farmacocinética da quinina é alterada significativamente pela infecção malárica, sendo os maiores efeitos a redução no volume aparente de distribuição e da depuração. Ela é absorvida rapidamente e quase completamente do trato gastrointestinal, e as concentrações plasmáticas máximas são atingidas em 1 a 3 horas após a administração. A ligação a proteínas plasmáticas é de aproximadamente 70% em indivíduos saudáveis, podendo aumentar para 90% em indivíduos com malária, sendo amplamente distribuída no organismo. A concentração no líquido cérebro-espinhal de pacientes com malária cerebral é de 2 a 7% daquela do plasma, aproximadamente. Metabolizada extensamente no fígado e excretada principalmente na urina. Estimativas da proporção de quinina excretada inalterada na urina variam de menos de 5% a 20%. A excreção é aumentada com a acidez da urina. A meia vida de eliminação é de aproximadamente 11 horas em indivíduos saudáveis, podendo ser aumentada em pacientes com malária. Pequenas quantidades de quinina também aparecem na bile e na saliva. E ela atravessa a barreira placentária e é distribuída para o leite materno (Sweetman, 2005; Nogueira, 2007).

Quando o regime terapêutico é corretamente empregado, a quinina é um fármaco relativamente seguro, porém, em doses altas pode causar alterações visuais, arritmias, hipotensão e convulsões. Reações de hipersensibilidade são raras e incluem *rash* cutâneo, trombocitopenia, leucopenia, coagulopatia intravascular disseminada, síndrome urêmica-hemolítica, broncoespasmo e pancitopenia. Em contraste, uma toxicidade sintomática é normal em pacientes conscientes (tinnitus, surdez, dor de cabeça, náusea e distúrbios visuais) não necessitando de redução de dose. Quando usada durante a gravidez ela parece ser um fármaco seguro (Winstanley, 2001; Nogueira, 2007).

A quinidina (**Figura 8**) é um diastereoisômero da quinina e tem propriedades farmacocinéticas comparáveis. No entanto, apresenta menor afinidade para com as proteínas plasmáticas, pelo que pode atingir níveis de concentração e de distribuição

tecidual superior aos da quinina. Em algumas regiões do planeta, como na Libéria e o Gabão, ela é um antimalárico bastante eficaz, mas o seu uso está limitado devido aos efeitos adversos que provoca ao nível do sistema cardiovascular. Por outro lado, um estudo permitiu constatar que a quinidina é mais eficaz do que a quinina contra estirpes brasileiras de *P. falciparum*, mas que tal situação se inverte no caso de algumas estirpes africanas, nomeadamente, em estirpes que circulam em Angola e no Uganda (Brocks & Mehvar, 2003; Vale *et al.*, 2005).

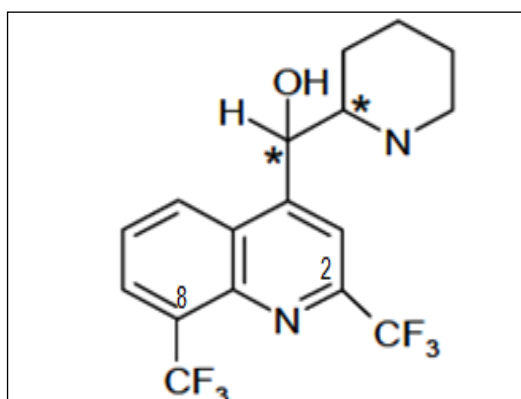


**Figura 8.** Estrutura da quinidina.

A mefloquina (MQ) é um produto do Programa de Pesquisa da Malária estabelecido em 1963 pelo *Walter Reed Institute for Medical Research* para desenvolver novos compostos promissores no combate de cepas emergentes de *P. falciparum* resistente aos medicamentos. Dentre os vários quinolinometanóis testados com base em sua semelhança estrutural com a quinina, a mefloquina apresentou grande atividade antimalárica em modelos animais e emergiu dos ensaios clínicos como segura e altamente eficaz contra cepas de *P. falciparum* resistentes aos demais medicamentos, sendo liberada comercialmente em 1984, sob o nome de Lariam<sup>®</sup>. Utilizada pela primeira vez para se tratar a malária *falciparum* resistente à cloroquina na Tailândia, onde foi formulada com pirimetamina-sulfadoxina para retardar o desenvolvimento de parasitos resistentes aos medicamentos. A estratégia falhou, em grande parte porque a eliminação lenta da mefloquina estimulou a seleção de parasitos resistentes em concentrações subterapêuticas do fármaco. Ela é atualmente recomendada para uso oral exclusivamente na profilaxia e na quimioterapia da malária *falciparum* resistente à cloroquina ou multi-resistente. Essa quinolina é mais eficaz para tratar a malária *falciparum* sem complicações com resistência aos medicamentos quando administrada 48 h após a carga parasitária ter sido significativamente reduzida pela administração de um antimalárico artemisinínico (Tracy & Webster, 2003; WHO, 2006; Nogueira, 2007).

A MQ é um composto quiral (possui dois centros assimétricos), e assim como a quinina, possui um anel conjugado bi-heterocíclico ativo, comercializada na forma racêmica da *eritro-α*-(2-piperidil)-2,8-bi(trifluorometil)4-quinolinametanol. Com relação à atividade antimalárica, há controvérsia quanto a diferenças de atividades dos enantiômeros, apesar

da (+)-MQ ter apresentado maior eficácia contra algumas cepas de *P. falciparum* em estudos *in vitro*. Sugere-se que tal resultado seja devido à interação seletiva com glicoproteínas P plasmodiais, possibilitando um sistema de transporte ativo em favor de um enantiômero. Segundo Karle *et al.* (1993), a presença de anel aromático na estrutura dos antimaláricos é importante para a diferença de atividade dos enantiômeros e a presença de um radical trifluorometil na posição 8 do anel quinolínic é necessária para a obtenção de uma alta atividade antimalárica, assim como, na posição 2 para prolongar esta atividade, **Figura 9** (Brocks & Mehvar, 2003; Warhurst *et al.*, 2003; Magalhães, 2006).



**Figura 9.** Estrutura da mefloquina (\* indica os centros quirais).

A farmacocinética da mefloquina pode estar alterada pela infecção malárica de uma maneira similar às alterações da farmacocinética da quinina, sendo os efeitos mais pronunciados as reduções no volume de distribuição e na depuração. Ela é bem absorvida pelo trato gastrointestinal, mas há uma clara variação individual no tempo necessário para alcançar a concentração plasmática máxima. A mefloquina é aproximadamente 98% ligada a proteínas plasmáticas e altas concentrações foram reportadas em células sanguíneas da série vermelha. Distribuída extensamente no organismo. Em alguns pacientes foi relatado que a meia-vida de eliminação da mefloquina é de 21 dias, embora os valores encontrados sejam variáveis em outros estudos. Concentrações subterapêuticas de mefloquina persistem na circulação por vários meses. Metabolizada no fígado, sendo uma pequena parte excretada na urina. Estudos em animais sugerem que a excreção da mefloquina seja feita principalmente na bile e nas fezes. Uma pequena quantidade de mefloquina é distribuída para o leite materno (Sweetman, 2005; Nogueira, 2007).

Reações adversas idiossincrásicas severas são raras, porém incluem reações ameaçadoras à vida como reações de pele e anemia aplásica. Em contraste, é comum o aparecimento de reações adversas dose-dependentes como distúrbios gastrointestinais e vertigem, sendo mais sérias reações como psicoses, convulsões, e encefalopatia aguda. Deve-se preocupar com o risco de cardiotoxicidade em pacientes que receberam quinina logo após o tratamento com mefloquina (como é comum no sudoeste da Ásia) (Winstanley, 2001; Nogueira, 2007).

### 1.2.3 MECANISMO DE AÇÃO

Após a invasão dos eritrócitos pelos merozoítos, a sobrevivência do parasito depende da digestão da hemoglobina, que se processa no interior do vacúolo digestivo (VD) do parasito. Esta digestão é mediada por uma série de proteases, entre elas as plasmepsinas e falcipainas. Durante o catabolismo da hemoglobina, sua porção protéica (globina) é utilizada como fonte de aminoácidos pelo parasito, e a fração heme, denominada ferriprotoporfirina IX (Fe(II)PPIX), é liberada, sendo um grupo reativo, gerador de radicais livres (ROS – *Reactive Oxygen species*) tóxicos para o parasito (Olliaro & Goldberg, 1995; Sullivan, 2002; Aguiar, 2011).

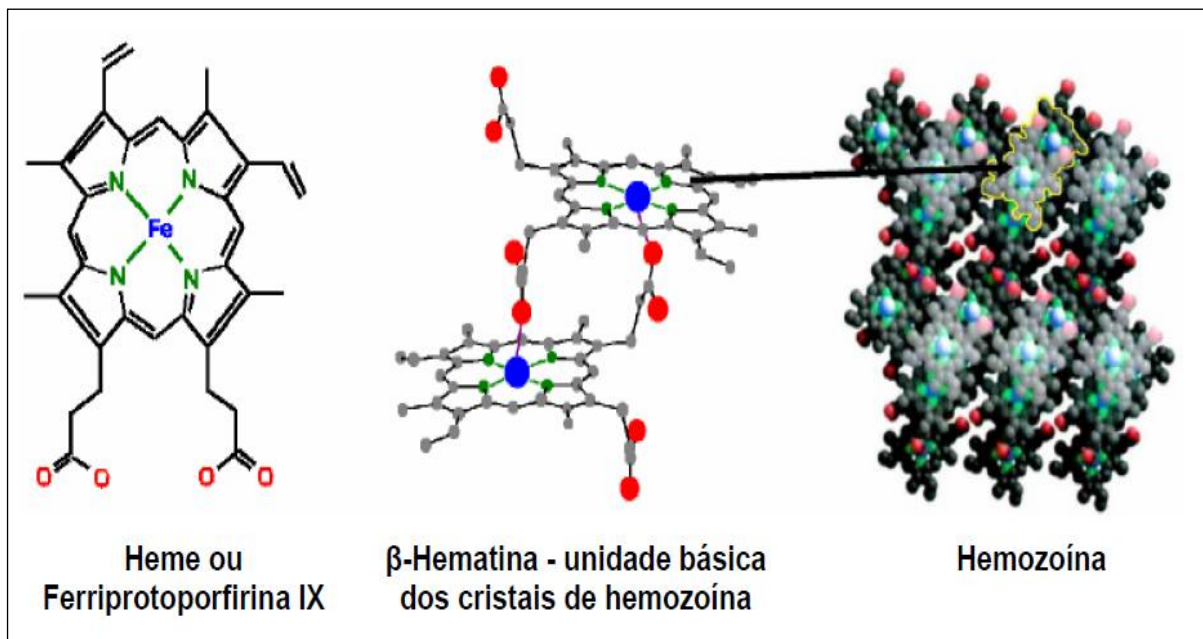
Um dos mecanismos de escape realizado pelo *Plasmodium* sp é a detoxificação, através da polimerização do heme, gerando um cristal conhecido como hemozoína. A formação de hemozoína é essencial para manter o equilíbrio e tornar disponível o espaço na hemácia para o crescimento do parasito. Esse processo, de formação de hemozoína, pode acontecer espontaneamente ou ser mediado pela enzima heme polimerase, pela proteína HRP II – *Histidine rich protein II*, ou por lipídeos. A glutatona reduzida, também auxilia na detoxificação do heme, atuando como um quelante, diminuindo a afinidade do heme pela membrana do parasito, e por consequência tendo um efeito protetor (Eckman & Eaton, 1979; Ginsburg *et al.*, 1999; Egan, 2007; Kumar *et al.*, 2007).

O mecanismo de ação dos quinolinometanóis não é bem conhecido, mas pode envolver: ligação direta ao grupo heme, inibição de uma ferriprotoporfirina IX polimerase não identificada (inibição de polimerização da heme), inibição de uma fosfolipase vacuolar, inibição da síntese de proteína, interação com o DNA (Foley & Tilley, 1998).

Apesar do mecanismo dos quinolinometanóis não está completamente esclarecido, existem evidências de que a interação entre os antimaláricos esquizotônicos sangüíneos com o grupo heme ferriprotoporfirina IX (Fe (III) PPIX) está envolvido na toxicidade destes fármacos ao parasito intra-eritrocítico. Vários experimentos *in vitro* estabeleceram que fármacos antimaláricos quinolínicos agem por interferência na cristalização da hemozoína, que tem por unidade básica a  $\beta$ -hematina, como demonstra a **Figura 10** (Sullivan Jr. *et al.*, 1998).

É consenso que estes fármacos inibem a formação da hemozoína. Persiste, entretanto, uma divergência sobre como isto ocorre (Egan & Marques, 1999).

Slater & Cerami (1992), sugeriram que a reação de formação da hemozoína no parasito é catalisada por uma enzima, que seria inibida pelos antimaláricos quinolínicos. Esta conclusão foi baseada nas condições extremas que, aparentemente, seriam requeridas para a formação por síntese da  $\beta$ -hematina e na observação que um extrato de membrana plasmoidal aparentemente catalisa esta formação (Gomes, 2006).



**Figura 10.** Estrutura da Ferritroporfirina IX,  $\beta$ -Hematina e hemozoina. Fonte: Adaptado de Pagola *et al.*, 2000; Wiser, 2003.

Entretanto, Dorn *et al.* (1995) encontraram que a formação de  $\beta$ -hematina é independente de proteínas e sugeriram que ela é autocatalítica, sendo que o agente catalítico no extrato do parasito é, de fato, a própria hemozoina. Uma outra hipótese é que os antimaláricos quinolínicos podem inibir a formação de hemozoina, pela interação direta com a Fe(III)PPIX (Gomes, 2006).

Warhurst (1981), demonstrou espectroscopicamente que antimaláricos quinolínicos formam, em solução benzênica, complexos com a Fe(III)PPIX e que o epímero inativo da quinina, a 9-epiquinina, não forma o complexo.

Egan *et al.* (1994), demonstraram que as drogas cloroquina, quinina e amodiaquina são capazes de inibir a polimerização espontânea da Fe(III)PPIX em solução de ácido acético, enquanto a 9-epiquinina e outras substâncias inativas na fase eritrocítica da malária não são inibidoras.

Dorn *et al.* (1998), também relataram que a formação de  $\beta$ -hematina é inibida por antimaláricos quinolínicos sob condições mais brandas, que se aproximam mais daquelas que são esperadas *in vivo*. Assim, o efeito primário dos fármacos antimaláricos que atuam na fase eritrocítica da doença é a ligação com a Fe(III)PPIX e a inibição da sua polimerização para formação da hemozoina. Secundariamente, a Fe(III)PPIX e o complexo Fe(III)PPIX-fármaco acumulam-se e ficam disponíveis para exercer seus efeitos tóxicos (Orjih *et al.*, 1994).

A base precisa para os efeitos tóxicos da Fe(III)PPIX livre e seus complexos com antimaláricos quinolínicos no parasito não está completamente estabelecida (Egan & Marques, 1999).

Uma das hipóteses é que esta toxicidade resulta da atividade peroxidativa da Fe(III)PPIX e dos complexos Fe(III)PPIX-fármaco sobre os lipídeos da membrana (Sugioka & Suzuki, 1991).

Outra hipótese é que a Fe(III)PPIX lisa o parasito via um mecanismo colóidoosmótico, possivelmente pela inibição da manutenção do gradiente de cátions (Egan & Marques, 1999).

Alguns autores têm sugerido que o mecanismo de ação dos quinolinimetanóis pode ser similar ao da cloroquina, entretanto, as evidências que sustentam as interações heme como modo de ação das 4-amoniquinoleínas não estão completamente esclarecidas, assim como, não está claro se o heme é o único alvo de ação dos antimaláricos quinolinometanóis (Chou *et al.*, 1980; Chevli & Fitch, 1982; Slater, 1993).

Estudos iniciais sugeriram que a quinina assim como a cloroquina pode inibir a replicação do DNA e a síntese do RNA do *Plasmodium*, ainda que, através de elevadas concentrações de droga (Thelu *et al.*, 1994; Foley & Tilley, 1998).

Estudos ultra-estruturais indicam que a mefloquina causa mudanças morfológicas no vacúolo do *P. falciparum*. As mudanças se assemelham às alterações observadas após tratamento com a cloroquina, exceto que a mefloquina parece causar mais degranulação da hemozoína do que as alterações morfológicas causadas pela cloroquina (Peters *et al.*, 1977; Jacobs *et al.*, 1987; Olliaro *et al.*, 1989).

A mefloquina mostrou inibir a heme polimerização *in vitro* com similar ou menor eficiência que a cloroquina (Slater & Cerami, 1992; Chou & Fitch, 1993; Slater, 1993; Raynes *et al.*, 1996).

Os dados disponíveis sugerem que, a mefloquina interfere em diferentes passos no processo de alimentação do parasito quando em comparação com a cloroquina (Geary *et al.*, 1986).

Os efeitos morfológicos no parasito seguidos ao tratamento com quinina e mefloquina são similares aos efeitos observados pelo tratamento com a cloroquina, por exemplo, há uma expansão inicial do vacúolo alimentar (Jacob *et al.*, 1987; Olliaro *et al.*, 1989; Peters *et al.*, 1977).

É largamente aceito que a cloroquina exerce seu efeito antimalárico pela interação com o processo de degradação da hemoglobina dentro do parasito, provavelmente por meio de uma interação com a hematina (Dorn, *et al.*, 1998; Ridley, 1997a; Ridley *et al.*, 1997b), embora o completo mecanismo de ação, seja até hoje debatido (Asawamahasakda *et al.*, 1994; Ward *et al.*, 1997), a inibição da polimerização da hematina tem sido usada como marcante representante do tipo de atividade antimalarial das 4-aminoquinolinas (Slater *et al.*, 1992; Raynes *et al.*, 1996; Hawley *et al.*, 1998).

Embora a quinina e a mefloquina interaja com a hematina livre, a interação é relativamente fraca, com redução correspondente da inibição da polimerização de hematina (Chevli & Fitsch 1982; Dom, *et al.*, 1998).

A quinina e mefloquina, assim como, as 4-aminoquinolinas, podem inibir este processo *in vitro* (Dom, *et al.*, 1998; Hawley *et al.*, 1998; Slater *et al.*, 1993). Entretanto, existem sugestões de que a interação com a polimerização da hematina pode não ser em si, suficiente para explicar a atividade de drogas como a mefloquina (Foley & Tilley, 1997).

A quinina interage fracamente com a fração heme da hemoglobina, mas tem sido mostrada por inibir a heme polimerização e a atividade de heme catálise. Na ausência de um transportador específico, a quinina é acumulada menos eficientemente no vacúolo alimentar que a cloroquina (Chou *et al.*, 1980; Slater, 1992; Chou & Fitch, 1993; Ribeiro *et al.*, 1997).

A mefloquina é uma base fraca monoprotéica que deve se acumular no vacúolo alimentar menos que a cloroquina. Apesar disso, ela mostrou valores similares na concentração de inibição (IC<sub>50</sub>) *in vitro*. Essas evidências tem sido a base para o questionamento, se esta droga interage em diferentes pontos com o processo de degradação da hemoglobina ou se a mefloquina tem um mecanismo de ação adicional, independente ou distinto da cloroquina (Desneves *et al.*, 1996; Foley & Tilley, 1997).

#### **1.2.4 A RESISTÊNCIA DO *PLASMODIUM FALCIPARUM***

Nas últimas duas décadas, a mortalidade e a morbidade pela malária têm aumentado, em função da resistência aos fármacos antimaláricos comumente utilizados, tais como quinolinícos, preferidos até o surgimento da resistência do parasito, que se deve ao princípio da evolução das espécies, onde a presença de fármacos (ou pressão dos fármacos) serve como processo de seleção natural dos parasitas resistentes dentro do hospedeiro, e pode ocorrer pelo decréscimo da concentração de droga no vacúolo digestivo, por mecanismos de extrusão na membrana vacuolar, ou mutação no sítio de ligação da droga com a proteína alvo. Logo, a diminuição do pH intracelular e aumento do pH vacuolar é um fator relevante (Bray *et al.*, 1992; Foote & Cowman, 1994; Bloland, 2001; França *et al.*, 2008).

Historicamente, a resistência do *P. falciparum* aos antimaláricos é conhecida desde o início do século passado quando Neiva (1910) e Nocht e Werner (1910) assinalaram no Brasil os primeiros insucessos no tratamento da malária com quinino. Em 1947, começaram a surgir referências ao aparecimento de plasmódios resistentes de regiões tratadas com antimaláricos sintéticos (Melo, 2005).

Peters (1970) descreveu, a primeira evidência da diminuição da sensibilidade do *P. falciparum* à cloroquina em 1957 na Tailândia. Em 1958, Bustamante referiu que o

aparecimento da resistência do *P. falciparum* ao quinino se tornou um sério problema à terapêutica da malária.

Moore e Lanier (1961) notificaram o primeiro caso de *P. falciparum* cloroquina-resistente em dois pacientes procedentes de Bogotá. No mesmo ano, Young e Moore, em estudo posterior, comprovaram a resistência da cepa à cloroquina.

No Brasil, no início da década de 60, foram descritos os primeiros casos de resistência à cloroquina, em pacientes com malária *falciparum* procedentes da região Amazônica e do Nordeste (Rodrigues, 1961; Silva, 1961a; 1961b; Silva *et al.*, 1961).

Ferraroni e Hayes (1979) descreveram resistência à cloroquina em índios do Estado do Amazonas. Na década de 80, Alecrim (1981, 1986), em estudos *in vivo* e *in vitro* sobre a resistência às drogas antimaláricas na Amazônia, demonstra 100% de resistência *in vitro* à cloroquina.

Santos *et al.*, (1987), em estudo *in vitro*, no período de 1983 a 1986, com cepas da Amazônia Brasileira, mostraram 83% de resistência à cloroquina, 56% e 51% ao quinino e à amodiaquina, respectivamente, e 2,3% à mefloquina.

Kremsner *et al.*, (1989a; 1989b), no Estado do Acre, em área de colonização, verificaram através de testes *in vitro* cepas resistentes à cloroquina (84%), amodiaquina (73%) e quinino (2,3%) e 100% de sensibilidade à mefloquina.

Couto *et al.*, (1993), avaliando a resposta de cepas de *P. falciparum* em testes *in vitro* em sete municípios do sul do Estado do Pará em diferentes períodos, observaram resistência elevada para cloroquina (71%), relativamente baixa para amodiaquina (25,8%) e para o quinino apenas 8,2%. Para a mefloquina, apesar de não ter sido evidenciada resistência em nenhum dos isolados, os resultados demonstraram perda da sensibilidade, quando comparada a resistência em dois períodos distintos. Evidenciaram também cepas multi-resistentes em dois dos municípios estudados.

Wongsrichanalai *et al.*, (1992a, 1992b), na Tailândia, no período de 1980 a 1990, identificaram a modificação do padrão de resistência do *P. falciparum* às drogas antimaláricas, em um estudo epidemiológico onde os dados demonstravam claramente a expansão e o aparecimento da resistência a mefloquina.

Couto *et al.*, (1995), ao verificarem os resultados de análise temporal do perfil de resistência no período de 1983 a 1991, com cepas isoladas de Paragominas (PA) e Lourenço (AP), revelaram nas duas áreas uma aparente semelhança no padrão de resposta do *P. falciparum*, com alta prevalência de resistência à cloroquina (68,4% e 79,8%, respectivamente), flutuação, dependendo do período, para amodiaquina e quinino, e sensibilidade para mefloquina, embora descreva discreta perda de sensibilidade nas amostras coletadas no Amapá quando comparadas com as do Pará.



Alin e Bjorkman (1997), na Tanzânia, em estudos *in vitro* com isolados de *P. falciparum*, mostraram alta sensibilidade à mefloquina e artemisinina. Cerutti et al., (1999), testando a suscetibilidade do *P. falciparum* às drogas antimaláricas *in vivo* e *in vitro*, no Estado do Mato Grosso, constataram *in vivo* uma elevada sensibilidade ao quinino e à mefloquina e reportaram *in vitro* a resistência de 96,6% à cloroquina, 3,3% ao quinino, enquanto 100% dos isolados foram sensíveis à mefloquina.

Segundo FUNASA – Fundação Nacional de Saúde - (Brasil, 2000), a migração na Amazônia é um importante fator para o aumento da transmissão e disseminação de cepas multi-resistentes entre localidades e Couto (2001), observou esta forte influência no estudo de caracterização das cepas de *P. falciparum* e monitoramento longitudinal da resistência às drogas em duas áreas da Amazônia Brasileira.

Calvosa et al., (2001) relataram pela primeira vez resistência à mefloquina *in vitro* em cepas isoladas na parte oriental da Amazônia Brasileira, no município de Marabá, no Estado do Pará.

Noeld et al., (2003), em um estudo *in vitro* com cepas de *P. falciparum* de Bangladesh e da Tailândia, observaram altos níveis de resistência à cloroquina e acentuada para mefloquina. Os resultados demonstraram também, na maioria dos isolados, alta sensibilidade para quinino e 100% para artemisinina. Os autores concluíram que a alta prevalência da resistência do parasito à mefloquina em Bangladesh sugere a necessidade de uma ação de vigilância para verificar problemas de difusão de cepas multi-resistentes na área.

O gene *pfmdr1* o qual confere resistência a múltiplas drogas foi descrito como um transportador responsável pela resistência a Cloroquina, apresentando um polimorfismo resultante da substituição do aminoácido asparagina para um tirosina no *P. falciparum* (Pova et al., 1998; Volkman & Wirth, 1998; Holmgren et al., 2006).

A OMS considera, que entre os maiores desafios para o controle mundial da malária, estão à expansão e intensificação da resistência do parasito às drogas antimaláricas, razão pela qual vem implementando um arrojado projeto de vigilância denominado Rede Amazônica de Vigilância da Resistência às Drogas Antimaláricas (RAVREDA) (WHO, 2000; Gomes, 2006).

Entre as linhas de pesquisa da RAVREDA, inclui-se a avaliação do uso de medicamentos antimaláricos pela comunidade (automedicação, acesso aos medicamentos, conhecimentos, atitudes e práticas) que podem levar ao desenvolvimento da resistência (Gomes, 2006).

### 1.2.5 PLANEJAMENTO E DESENVOLVIMENTO DE ANTIMALÁRICOS

Para a descoberta e o desenvolvimento de moléculas antimaláricas com melhor atividade, é necessário compreender a estrutura química molecular, e identificar as características dos grupos funcionais da molécula. É fundamental a determinação de parâmetros moleculares e propriedades físico-químicos, além do estudo químico-computacional teórico das propriedades estereo-eletrônicas de moléculas e receptores pertencentes a esta classe de compostos, em especial os que atuam sobre o processo de detoxificação do heme (Acharya *et al.*, 2008).

Segundo Thomas (2003), a atividade biológica ocorre pelas interações químicas entre o ligante e seu receptor, e os grupamentos químicos contribuem para a formação do complexo fármaco-receptor, portanto, é possível combinar os grupos funcionais responsáveis pela ação biológica e retirar os fragmentos responsáveis pela toxicidade.

O planejamento de compostos biologicamente ativos por métodos teóricos de modelagem molecular, através de programas computacionais de química, técnicas de visualização gráfica, representação tridimensional e bancos de dados, auxiliam na investigação das interações ligante-receptor, na seleção de grupamentos, parâmetros eletrônicos, conformacionais e de solubilidade, para elucidação dos fatores estruturais relacionados ao efeito biológico. Como conseqüência, os mecanismos de ação molecular dos fármacos podem ser compreendidos pela integração dos conhecimentos fundamentais de química orgânica, bioquímica, biologia molecular e farmacologia (Wermuth, 1996; Scalercio, 2010).

O desenvolvimento de novos fármacos busca estruturas com atividade e aplicação definidas, reduzindo a toxicidade, tempo e custos financeiros. Os métodos computacionais são ferramentas que tem por objetivo entender e prever o comportamento dos sistemas reais, usados para desenhar, descrever e prever estruturas moleculares, propriedades do estado de transição e equilíbrio de reações, propriedades termodinâmicas, eletrônicas, conformacionais e de solubilidade. Estes métodos abrangem estudos de minimização de energia, análise conformacional, extração das propriedades geométricas e estruturais, de reatividade e simulações de dinâmica molecular, cujos parâmetros podem ser aperfeiçoados por métodos estatísticos (Borges, 2007).

### 1.3 A QUÍMICA MEDICINAL

A Química Medicinal é tipicamente interdisciplinar e está voltada para racionalizar a ação dos fármacos em nível molecular. Ela transita entre as subáreas da Química e da Biologia. Através da aproximação destas duas grandes áreas do conhecimento, aparentemente distintas e distantes, as condições necessárias e essenciais à interação dos químicos medicinais e dos farmacologistas foram criadas, conduzindo à descoberta de

novos fármacos, inovações terapêuticas autênticas e com padrões moleculares originais, atuando, em muitos casos, por mecanismos farmacológicos de ação inéditos (Barreiro, 2009).

Recentemente, ela teve uma definição atualizada por um comitê de renomados especialistas reunidos pela divisão de Química Medicinal da IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*) publicado em sua revista *Pure and Applied Chemistry*, onde se afirma que “A Química Medicinal é uma disciplina química de base, que envolve também aspectos biológicos, das ciências médicas e farmacêuticas. Ela está relacionada com a invenção, a descoberta, o desenho, a identificação e a preparação de compostos biologicamente ativos, a interpretação do seu modo de interação a nível molecular, a construção das suas relações estrutura-atividade, e o estudo do seu metabolismo” (Adaptado de Wermuth *et al.*, 1998; Barreiro, 2009).

Dessa forma, o pesquisador da área de Química Medicinal tenta desenvolver e sintetizar agentes medicinais ou farmacológicos que irão beneficiar o ser humano e define como o fármaco ou “droga” a substância química que exerce um efeito observável e reproduzível em um sistema biológico. Este efeito pode ser denominado de atividade biológica ou resposta biológica, e é usualmente dependente da dosagem do fármaco (quantidade ou concentração do composto administrado). A observação da resposta biológica pode ser baseada na verificação do percentual de inibição de uma reação enzimática ou a alteração dos batimentos cardíacos e do comportamento ou postura do animal de teste (Redl *et al.*, 1974; Oliveira, 2001).

### 1.3.1 A INTERAÇÃO FÁRMACO-RECEPTOR

A forma como determinado fármaco é capaz de gerar uma reação em um sistema biológico é muito importante em química medicinal. Fundamentalmente deseja-se obter a resposta para a seguinte pergunta: Como é o mecanismo de ação dos fármacos nos sistemas biológicos? A resposta para esta questão se encontra em como esses sistemas operam em nível molecular. Isto nos conduz ao estudo de um grande número de reações bioquímicas as quais os fármacos serão submetidos nos sistemas biológicos (Oliveira, 2001).

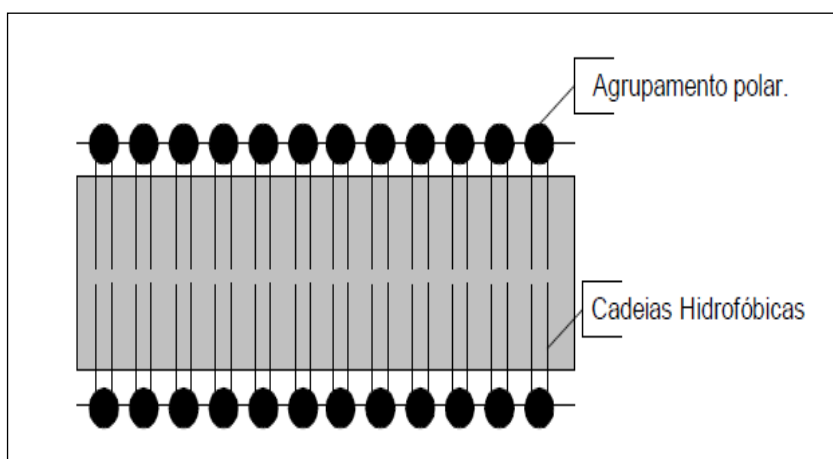
Os fatores que influenciam a ação de um fármaco são divididos em dois grupos: fatores diretos e fatores indiretos. Os fatores diretos são aqueles ligados intrinsecamente à constituição química e geométrica do fármaco e do receptor:

- a) Lipofilicidade: transporte do fármaco e sua solvatação;
- b) Geometria molecular: complementaridade fármaco-receptor;
- c) Forças intermoleculares: potência do fármaco.

Os fatores indiretos são relacionados ao sistema biológico:

- a) Absorção;
- b) Transporte;
- c) Metabolização;
- d) Excreção.

Sendo a célula a unidade básica do corpo humano é evidente que o fármaco deverá interagir necessariamente em nível celular. Inicialmente o fármaco irá interagir com a membrana celular, que é formada por duas camadas. Estas camadas são formadas por moléculas que apresentam um pequeno grupo polar em uma de suas extremidades (glicerol) e duas longas cadeias hidrofóbicas (fosfolípídeo) na outra (**Figura 11**). Os grupos polares estão orientados para o exterior e para o interior da célula. Esta é uma estrutura estável, uma vez que os grupos polares interagem com o meio aquoso do exterior e do interior da célula, enquanto que as cadeias hidrofóbicas interagem entre si através de forças de Van der Waals. Isto constitui em uma eficiente barreira entre o meio intracelular e o meio extracelular (Martin, 1978; Oliveira, 2001).



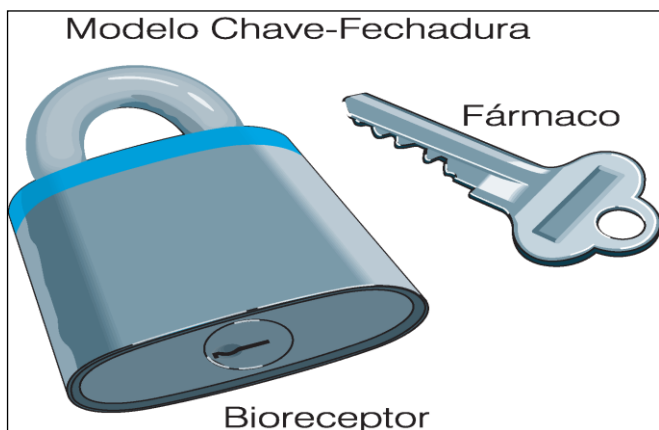
**Figura 11.** Organização molecular da membrana celular.

No entanto, a membrana celular também é constituída por uma grande variedade de proteínas. Algumas proteínas localizam-se na superfície. Outras se localizam entre as camadas da membrana e há outras que vão desde o exterior da célula até seu interior, atravessando toda a membrana. A localização dessas proteínas depende de sua constituição. As partes proteicas localizadas no interior da membrana apresentam um grande número de aminoácidos hidrofóbicos em sua superfície, enquanto que as partes localizadas no exterior da membrana são constituídas por aminoácidos hidrofílicos. Muitas das proteínas localizadas na superfície da membrana celular apresentam pequenas cadeias de carboidratos ligadas e são denominadas glicoproteínas (Oliveira, 2001).

Para entender a interação fármaco-receptor é necessário ir até o nível molecular onde serão encontrados três tipos principais de biomoléculas: lipídeos, proteínas

(glicoproteínas), ácidos nucleicos. Os fármacos que interagem com os lipídeos, como por exemplo, os antibióticos bactericidas em sua maioria agem modificando a estrutura da membrana celular. Os fármacos anestésicos reagem com os lipídeos da membrana celular e alteram suas propriedades elétricas (Oliveira, 2001).

Assim, a ação biológica das substâncias exógenas no organismo intriga inúmeros pesquisadores desde há muito tempo. Entretanto, Emil Fisher formulou um modelo pioneiro, capaz de permitir uma racionalização dos efeitos das substâncias, exógenas ou não, no organismo. Este modelo, conhecido como “chave-fechadura”, contém um conceito fundamental que até hoje vigora (**Figura 12**). Ele define que as moléculas dos compostos ativos no organismo são chaves, que interagem com macromoléculas do próprio organismo (bioreceptores) que são as fechaduras. Desta interação chave-fechadura temos a resposta farmacológica de substâncias endógenas. Representando o conceito de complementaridade molecular que existe entre o fármaco e seu receptor (Barreiro, 2001).



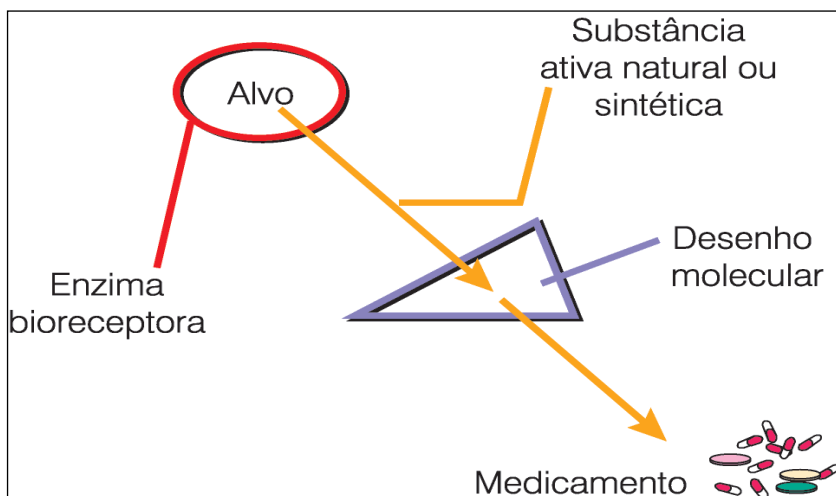
**Figura 12.** Modelo chave-fechadura.

Desta forma, conhecendo, como se conhece, em quase todos os casos, a estrutura do fármaco (*a chave*) e sabendo-se quais grupos funcionais estão presentes em sua molécula (*os “dentes” da chave*) poder-se-ia “compor” a topografia provável, aproximada, do bioreceptor (*a fechadura*). Portanto, onde na chave temos uma reentrância, na fechadura teremos uma protuberância, complementar, e assim por diante (Barreiro, 2001).

Esse modelo chave-fechadura sugere ainda que, conhecendo-se a estrutura do bioreceptor, eleito como alvo terapêutico adequado para o tratamento de uma patologia pode-se, por complementaridade molecular, “desenhar” uma molécula capaz de interagir eficazmente com este receptor, permitindo seu planejamento estrutural (**Figura 13**). Esta estratégia de desenho planejado de bioligantes, geralmente emprega técnicas de química computacional (*Computer Assisted Drug Design*, CADD), onde a modelagem molecular é ferramenta extremamente útil (Barreiro, 2001).

Entretanto, quando a estrutura do bioreceptor não é conhecida, pode-se utilizar como “modelo” molecular seu agonista ou substrato natural, que adequadamente modificado pode

permitir a construção molecular de novos inibidores enzimáticos, novos antagonistas ou agonistas de receptores, dependendo da necessidade, definida pela escolha do alvo terapêutico (Barreiro, 2001).



**Figura 13.** Concepção esquemática do planejamento racional de fármacos.

Esta árdua tarefa é realizada pela química medicinal, sub-área que têm observado significativo desenvolvimento no país.

#### 1.4 QSAR

Estudos de relações estrutura-atividade (SAR: *Structure-Activity Relationships*) são utilizados para definir os parâmetros importantes para a ação de uma classe de compostos análogos contra certa patologia, pois parte da premissa geral de que uma droga age em um sítio de ação específico localizado em uma enzima ou receptor, sendo que compostos com estruturas semelhantes tendem então a possuir a mesma atividade farmacológica e/ou toxicológica, ou seja, interagem nesse mesmo sítio (Thomas, 2003; Neto, 2006).

O sucesso da abordagem SAR no desenho de fármacos depende não somente do conhecimento e da experiência da equipe de desenho, mas também de uma boa dose de sorte. O estudo de relações quantitativas estrutura-atividade (QSAR: *Quantitative Structure-Activity Relationships*) procura remover o elemento sorte ao estabelecer uma relação matemática, sob a forma de uma equação, entre a atividade biológica e os parâmetros (ou propriedades) físico-químicos mensuráveis que possuam influência sobre a atividade terapêutica de uma classe de compostos (Thomas, 2003; Neto, 2006).

Ele propõe que a ação de uma droga pode ser dividida em dois estágios: o transporte para seu sítio de ação e a ligação ao mesmo. Assim, a atividade biológica está associada às mudanças de energia livre que ocorrem nos processos de absorção, distribuição e biotransformação ou à própria interação droga-receptor, sendo esse o paradigma que fundamenta o estudo de QSAR (Thomas, 2003; Neto, 2006).

Historicamente, Crum-Brown e Fraser desenvolveram o primeiro trabalho na área de relações estrutura-atividade que se tem notícia. Nesse trabalho de 1868, descreveram o resultado obtido após sucessivas injeções de derivados de morfina, estricnina e atropina em cobaias. Chegando à conclusão que a ação fisiológica ( $\theta$ ) de determinada molécula era função de sua constituição química (C), isto é:

$$\theta = f(C) \quad (\text{Eq. 1.0})$$

De fato, a Eq. 1.0 não era aplicável, pois através dela ainda não era possível relacionar matematicamente a estrutura química de uma molécula à sua atividade biológica. Na realidade, o que se fazia era relacionar o efeito de pequenas variações da estrutura química às respectivas variações na atividade biológica (Gaudio, 1996).

Em 1893, Richet demonstrou que a toxicidade de compostos simples (alcoóis, éteres e acetonas) era inversamente proporcional à solubilidade em água. No mesmo período Overton (1897) e Meyer (1899), trabalhando de forma independente, demonstraram que a toxicidade de certos compostos orgânicos era dependente de sua lipofilicidade. Hammett, em 1937, demonstrou que a reatividade química de substituintes meta e para derivados de benzeno se relacionava com suas propriedades eletrônicas (Tute, 1971; Rekker, 1992).

Mas, o grande avanço nessa área ocorreu a partir da década de 60 com os trabalhos de Hansch e Fujita e Free e Wilson. Seus respectivos ficaram conhecidos como análise de Hansch e análise de Free-Wilson (Crum-brown & Fraser, 1868; Kubinyi, 1993; Oliveira, 2009).

Na análise de Hansch, a atividade biológica de uma série de compostos é correlacionada com propriedades físico-químicas de substituintes ou parâmetros globais que representam efeitos hidrofóbicos e eletrônicos. Matematicamente, o modelo é descrito por:

$$\log\left(\frac{1}{C}\right) = -a\pi^2 + b\pi + \rho\sigma + c \quad (\text{Eq. 1.1})$$

onde C é a concentração molar que causa uma determinada resposta biológica,  $\pi$  é o valor relativo de lipofilicidade do substituinte,  $\sigma$  corresponde a constante eletrônica relativa ao substituinte e a, b,  $\rho$  e c são coeficientes de regressão. O valor de  $\pi$  é definido por:

$$\pi = \log P_X - \log P_H \quad (\text{Eq. 1.2})$$

O termo  $P_X$  é o coeficiente de partição,  $\log P$ , para o composto com um substituinte X e  $P_H$  é o coeficiente de partição para a molécula sem o substituinte, ou seja,  $X = H$  (Oliveira, 2009).

Na análise de Free-Wilson, adota-se como premissa que a introdução de um substituinte em qualquer posição da molécula sempre muda a potência relativa da mesma quantidade independente dos outros substituintes. Neste modelo são utilizadas variáveis indicadoras que assumem valores nulos ou unitários para representar, respectivamente, a ausência ou presença de um dado substituinte, X. A equação correspondente é dada por:

$$\log\left(\frac{1}{C}\right) = \sum_i a_i X_i + \mu \quad (\text{Eq. 1.3})$$

onde  $X_i$  é uma variável indicadora,  $a_i$  é coeficiente de regressão e  $\mu$  é atividade geral média do composto de referência (Oliveira, 2009).

Há ainda o modelo misto que combina as variáveis da análise Hansch e de Free-Wilson bem como outras variações em torno destes modelos. Os modelos apresentados permitem a descrição da atividade biológica em termos de variáveis que fornecem interpretações claras. No entanto, o número de descritores disponíveis atualmente aumentou consideravelmente e, por vezes, são difíceis de interpretar, mas em compensação, podem contribuir com o poder de previsão do modelo (Kubinyi, 1997). A equação correspondente que descreve a atividade biológica foi generalizada para:

$$\log\left(\frac{1}{C}\right) = \sum_i \beta_i V_i + \beta_0 \quad (\text{Eq. 1.4})$$

onde  $\beta_i$  e  $\beta_0$  são coeficientes de regressão e  $V_i$  são os descritores moleculares (Oliveira, 2009).

É importante salientar que dados biológicos confiáveis são necessários para a construção de modelos com boa capacidade de previsão. Isto significa que os dados devem ser obtidos de uma forma consistente através de um único protocolo, de preferência, pelo mesmo grupo de pesquisa (Cronin & Schultz, 2003).

Além da concentração molar,  $C$ , outros parâmetros podem ser utilizados em análises QSAR tais como:  $IC_{50}$  (concentração inibitória média, ou seja, concentração que reduz o efeito em 50%),  $ED_{50}$  (concentração molar correspondente a 50% da dose efetiva),  $LD_{50}$  (dose letal média, isto é, concentração letal para 50% da população de animais de teste em um tempo prescrito),  $K_i$  (constante de dissociação de um inibidor), atividades biológicas *in vitro*, parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos. Porém, a percentagem de inibição não é uma forma apropriada de expressar a atividade biológica nestes estudos devido à natureza não linear das relações dose-resposta (Kubinyi, 1993; Oliveira, 2009).

Outro aspecto importante sobre estudos QSAR se refere aos requerimentos de representatividade e homogeneidade para aplicabilidade das análises. Para que um modelo QSAR seja aplicado, os compostos devem apresentar variações em torno de uma estrutura básica, ou seja, devem ser congêneros e apresentar o mesmo modo ou mecanismo de ação (homogeneidade) (Eriksson *et al.*, 2003).

Simultaneamente, estes compostos devem cobrir adequadamente o espaço químico (representatividade). Vighi (1998) questiona a severidade com o requerimento de congenericidade argumentando que é viável o tratamento de séries heterólogas, pois se



todas as características estruturais de uma molécula podem ser descritas então todos os padrões de comportamento podem ser descritos por meio de um modelo adequado. O desafio é desenvolver sistemas de descritores capazes de expressar, de maneira quantitativa, todas as características estruturais das substâncias químicas (Oliveira, 2009).

Finalmente, as condições para avaliar a validade dos modelos QSAR foram reunidas na forma de princípios os quais foram denominados originalmente Princípios de Setubal, cidade portuguesa onde ocorreu a conferência organizada pelo ICCA (*International Council of Chemical Associations*) e CEFIC (*European Chemical Industry Council*). Atualmente, estes princípios são conhecidos por Princípios OECD (*Organisation for Economic Cooperation and Development*). De acordo com eles modelos QSAR deveriam (idealmente):

**1º Princípio:** Estar associados com uma finalidade definida. Entende-se por finalidade qualquer propriedade físico-química, efeito biológico ou parâmetro ambiental relacionado à estrutura química que pode ser medido e modelado.

**2º Princípio:** Tomar a forma de um algoritmo compreensível;

**3º Princípio:** Ter domínio de aplicabilidade definido;

**4º Princípio:** Estar associados com medidas apropriadas para os índices de confiabilidade, robustez e previsibilidade;

**5º Princípio:** Estar associados, se possível, com uma interpretação mecanística.

#### 1.4.1 DIMENSÕES EM QSAR

De acordo com as dimensões dos descritores moleculares, a metodologia de QSAR pode ser classificada em:

- a) QSAR-1D – onde a estrutura do ligante é representada por suas propriedades moleculares globais (por exemplo, Log P e pKa);
- b) QSAR-2D – onde a estrutura do ligante é representada por padrões estruturais 2D, sem considerar a representação 3D (por exemplo, conectividade e farmacóforo 2D);
- c) QSAR-3D – onde a estrutura do ligante é representada por sua estrutura 3D;
- d) QSAR-4D – em que os ligantes são representados por um conjunto de conformações ou estados de protonação;
- e) QSAR-5D semelhante ao 4D mas com a representação de diferentes modelos de encaixe induzido (ligante-receptor);
- f) QSAR-6D, semelhante ao 5D, mas com a representação de diferentes cenários de solvatação (Lill, 2007).

#### 1.4.2 QSAR-2D

O modelo clássico de Hansch-Fujita ou QSAR-2D é o mais utilizado no estudo das relações entre a estrutura química e a atividade biológica. A aplicação deste modelo baseia-se no estudo de séries de compostos que possuem estrutura química semelhante, mas diferem entre si por um ou mais grupos substituintes em posições definidas da molécula (Hansch & Fujita, 1964; Tute, 1971; Martin, 1978; Kubinyi, 1993; Hansch & Leo, 1995).

Esse modelo tenta isolar e caracterizar cada um dos fatores responsáveis pela atividade farmacológica do fármaco. Baseando-se na utilização de parâmetros físico-químicos e estruturais linearmente relacionados com energia livre para a construção de modelos multidimensionais do tipo

$$AB = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + \dots + a_kX_k \quad (\text{Eq. 2.0})$$

em que AB é a resposta biológica, medida em escala apropriada,  $X_i$  são parâmetros físico-químicos e estruturais que descrevem as propriedades dos grupos químicos substituintes e  $a_n$  são coeficientes obtidos por análise de regressão linear múltipla. Modelos desse tipo correlacionam a atividade biológica às propriedades moleculares, representadas pelos parâmetros físico-químicos e estruturais. Estes parâmetros, chamados clássicos, são propriedades moleculares aditivas e constitutivas e são normalmente classificados como sendo do tipo lipofílico, eletrônico e estéreo (Martin, 1978; Kubinyi, 1993). Os parâmetros mais utilizados em QSAR clássico são:

- a)  $\sigma$  – constante eletrônica de Hammett (Hammett, 1937);
- b)  $\pi$  – constante lipofílica de Hansch-Fujita (Fujita *et al.*, 1964);
- c)  $E_s$  – constante estérea de Taft (Taft, 1952).

Essas constantes são constantes de substituintes presentes numa série de compostos que exercem atividade biológica através do mesmo mecanismo de ação. Reescrevendo a Eq. 1.1 em função dos parâmetros físico-químicos obtém-se as Eqs. 3.0 e 4.0:

$$\log (1/C) = a\pi + b\sigma + cE_s + d \quad (\text{Eq. 3.0})$$

$$\log (1/C) = -a\pi^2 + b\pi + c\sigma + dE_s + e \quad (\text{Eq. 4.0})$$

Na Eq. 4.0 a dependência da atividade em relação à lipofilicidade obedece ao chamado modelo parabólico ou quadrático. O modelo definido pela Eq. 3.0 é obtido baseado na hipótese de que a atividade biológica depende de fatores (parâmetros) independentes entre si ou ortogonais. A aplicabilidade deste modelo é limitada aos sistemas biológicos mais simples *in vitro*. Para o caso da atividade *in vivo* deve-se utilizar o modelo expresso pela Eq. 4.0, ou modelo bilinear de Kubinyi (Eq. 5) (Kubinyi, 1977):

$$\log 1/C = -a\pi + b \log(\beta 10^\pi + 1) + c\sigma + dE_s + e \quad (\text{Eq. 5.0})$$

onde  $\beta$  é um parâmetro de ajuste.

Hansch propôs cinco regras para a construção de modelos matemáticos de relação estrutura atividade (Unger & Hansch, 1973):

- a) *Seleção de variáveis independentes*: deve-se testar um grande número de variáveis, incluindo as propriedades de natureza lipofílica, eletrônica, estérea e de polarização. Também devem ser testadas variáveis oriundas de cálculos de mecânica quântica e variáveis indicadoras. As variáveis selecionadas na *melhor equação* devem ser essencialmente independentes (ortogonais);

b) *Validação estatística das variáveis selecionadas*: cada variável incluída na melhor equação deve ser validada por testes estatísticos;

c) *Princípio da Parcimônia (Navalha de Occam)*: quando ocorre dúvida na escolha de vários modelos aproximadamente equivalentes, deve-se escolher o mais simples;

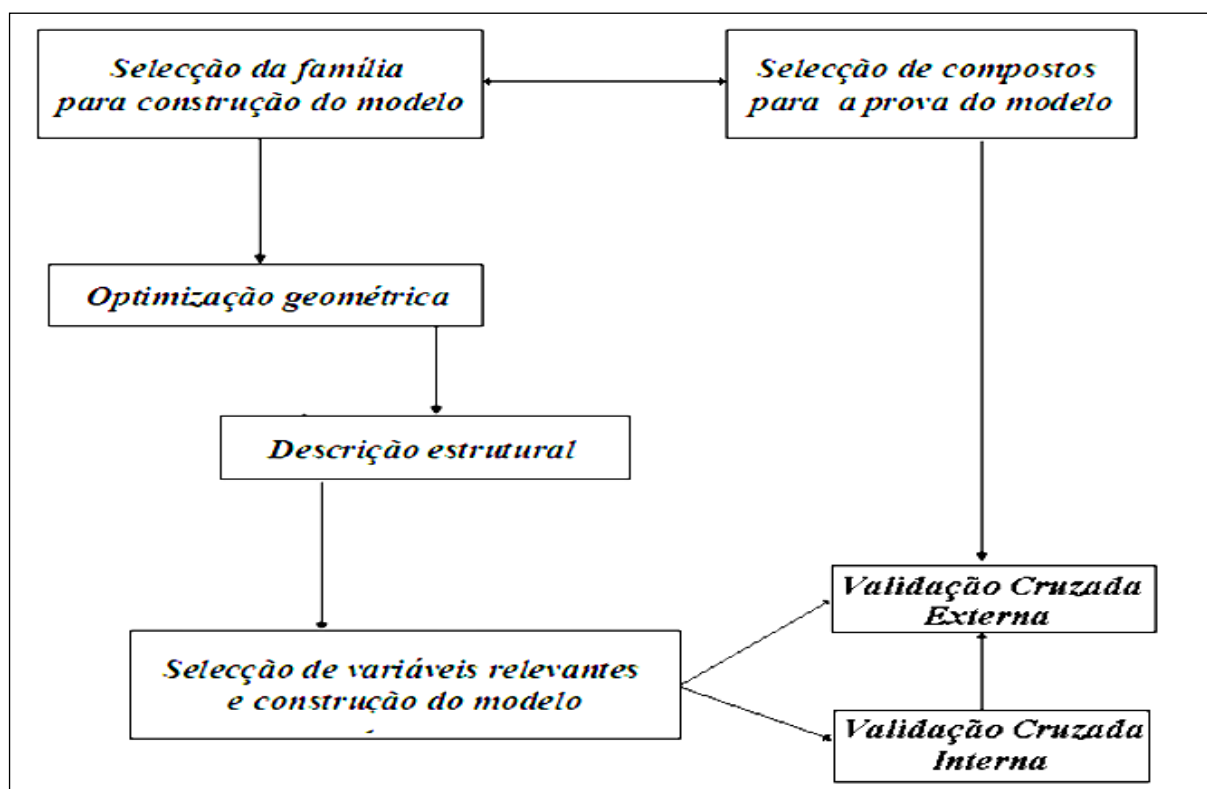
d) *Número de Variáveis*: para minimizar a correlação por coincidência deve-se ter no mínimo cinco ou seis compostos para cada variável incluída no modelo;

e) *Modelo Qualitativo para o mecanismo de ação dos compostos*: é essencial que o modelo obtido seja consistente com o mecanismo de ação, em nível molecular, dos compostos testados.

A validade do método de Hansch pode ser comprovada a partir das dezenas de milhares de modelos publicados desde que o método foi formulado, em 1964 (Hansch & Fujita, 1964).

### 1.4.3 METODOLOGIA GERAL PARA O ESTUDO QSAR

A metodologia QSAR adota um conjunto de procedimentos que podem seguir vias de análise computacional distintas, consoante a informação inicial disponível, apresentando, contudo, passos obrigatoriamente comuns. A **Figura 14** apresenta o esquema dos passos essenciais para a elaboração do estudo QSAR (Barnett *et al.*, 1978; Bajorath, 2004; Machado, 2008).



**Figura 14.** Esquema ilustrativo dos passos na elaboração de um estudo QSAR e construção do modelo preditivo.

#### 1.4.3.1 SELEÇÃO DE LIGANDOS E OTIMIZAÇÃO ESTRUTURAL

A seleção de ligandos é o primeiro passo a realizar em estudos QSAR efetuando-se uma base de dados de determinada família ou conjunto de compostos. É obrigatório que esta recolha de dados seja criteriosa e elaborada, apresentando uma série de moléculas quimicamente similares ou com características semelhantes, como a atividade biológica, a constante de ionização ( $K_i$ ) e as cargas parciais (Hagadone, 1992; Bajorath, 2004).

As moléculas devem então apresentar similaridade, para que o estudo seja válido e eficiente, pois uma série de moléculas pouco similares origina modelos não produtivos (Nikolova & Jaworska, 2003; Bajorath, 2004).

Dado que os modelos QSAR das moléculas da série em estudo são criados através dos descritores extraídos da estrutura tridimensional dos compostos selecionados, a obtenção de uma geometria correta é de grande importância (Hagadone, 1992; Thorne *et al.*, 1997).

O cálculo computacional da geometria molecular é uma das funções mais essenciais dos programas de química computacional, embora não seja um processo trivial. O uso destes programas permite descrever a geometria da molécula em estudo, analisando as energias de interação e os seus respectivos gradientes para determinar a geometria molecular correspondente ao estado de mínima energia (Hurst & Heritage, 1997; Young, 2001).

A utilização de programas com representação e construção gráfica de compostos é bastante frequente, possibilitando assim o desenho gráfico das moléculas pretendidas. A existência de diversos programas permite este tipo de operação, já que alguns deles facultam o desenho da estrutura bidimensional e transmutam-na para uma estrutura tridimensional, enquanto que outros programas, por seu lado, já permitem um desenho tridimensional adicionando, posteriormente, os hidrogênios necessários à estrutura final. Existem ainda outros programas que constroem a molécula tridimensional a partir de uma lista de elementos e de hibridações (Young, 2001; Popp *et al.*, 2002).

Alguns exemplos de programas usados para editar e desenhar as moléculas são: Gaussview, HyperChem, Spartan, Titan, Molden, Ghemical, ChemsSketch, Marvin, WxMacMolPlt. Sendo que, os quatro primeiros são pagos, enquanto que os últimos são gratuitos (Martins, 2010).

Independente da eficiência do método utilizado, a geometria final obtida corresponde à energia do nível teórico usado pelo computador. De uma forma geral, há uma tendência para se utilizar métodos rápidos e estimativos ou métodos precisos, mas computacionalmente intensivos e morosos. No entanto, existem métodos rápidos e precisos,

todavia apenas aplicáveis a uma classe limitada de moléculas (Young, 2001; Popp *et al.*, 2002).

Com o intuito de se obter resultados precisos o mais rápido possível, são frequentemente utilizadas com bastante êxito duas otimizações geométricas. Uma vez finalizada uma geometria correta com um reduzido nível teórico, esta é novamente utilizada para uma segunda otimização a um nível teórico muito mais rigoroso (Young, 2001; Popp *et al.*, 2002).

A escolha do algoritmo de otimização é amplamente influenciada pelo tempo necessário que o computador leva a otimizar a geometria molecular. Métodos como o *AM1* (Modelo de Austin 1, *Austin Model 1*) e o *RM1* (Modelo Recife 1, *Recife Model 1*) utilizam meios semi-empíricos para obter resultados em moléculas orgânicas (Young, 2001; Popp *et al.* 2002; Machado, 2008).

O *AM1* é um método semi-empírico muito popular para modelagem de compostos orgânicos. Nele foram parametrizadas as integrais dos seguintes átomos: H, B, C, Si, N, O, S, F, Cl, Br, I, Hg e Zn. Ele calcula melhor a repulsão entre núcleos e proporciona melhores resultados de moléculas envolvidas em processos biológicos. Funções Gaussianas foram incluídas nas integrais de repulsão *core-core*. Com isto, tornou-se possível melhorar a descrição de ligações de hidrogênio, para alguns casos (Young, 2001; Leach, 2001; Albuquerque, 2008).

O *RM1*, *Recife Model 1*, é um novo método semi-empírico para cálculos de orbital molecular que possui a mesma estrutura algébrica e o mesmo número de parâmetros do método *AM1*, porém foi parametrizado de uma forma muito mais elaborada (Rocha *et al.*, 2006; Oliveira, 2008).

A vantagem do *RM1* ser uma reparametrização do *AM1* é que o método pode ser implementado trivialmente em qualquer software que já contenha o *AM1*, bastando para isso a troca dos parâmetros sem que sequer uma única linha de código adicional tenha que ser introduzida (Oliveira, 2008).

A ampla maioria das moléculas importantes para a vida é formada por átomos de apenas seis elementos diferentes: H, C, N, O, P e S. Acrescentando-se os halogênios, pode-se então construir a maioria das moléculas de importância para a pesquisa em fármacos. Por isto, a parametrização inicial do *RM1* foi para os átomos de H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br e I, para um total de 191 parâmetros (Oliveira, 2008).

Assim como o *AM1*, as propriedades utilizadas no conjunto de parametrização foram: calor de formação, momento de dipolo, potencial de ionização e variáveis geométricas (distâncias e ângulos de ligação) (Oliveira, 2008).

### 1.4.3.2 DESCRITORES MOLECULARES

As estruturas químicas não contém a informação relacionada à atividade biológica de maneira explícita. Esta informação deve ser extraída das estruturas na forma de descritores moleculares que acentuem diferentes propriedades químicas implícitas na estrutura da molécula. Tais propriedades, que vão desde parâmetros físico-químicos, eletrônicos ou mecânico-quânticos a características geométricas e topológicas das moléculas, podem ser então correlacionadas diretamente com a atividade (Weber, 2008; Martins, 2010).

Deste modo, os descritores moleculares são as variáveis independentes que serão utilizadas na formulação do modelo QSAR. Eles contém a informação química das moléculas ou conforme a definição de Consonni e Todeschini (2000):

“Descritor molecular é o resultado final de um procedimento matemático e lógico o qual transforma informação química codificada dentro de uma representação simbólica de uma molécula em um número útil ou resultado de algum experimento padronizado”.

Eles podem ser oriundos de dados experimentais ou calculados (*in silico*). Os descritores *in silico* dividem-se de acordo com a dimensionalidade da molécula usada para calculá-los, ou seja, unidimensional (1D), bidimensional (2D) e tridimensional (3D) (Oliveira, 2009).

Os descritores 1D são obtidos a partir da informação molecular, não requerendo o conhecimento prévio da topologia ou estrutura tridimensional e classificam-se em:

- Constitucionais;
- Grupos funcionais;
- Fragmentos átomo-centrado;
- Empíricos;
- Propriedades.

Os descritores constitucionais são baseados nos constituintes dos compostos, como por exemplo, número de átomos, número de ligações, número de anéis, peso molecular, etc. Eles são, provavelmente, os descritores mais utilizados nesta categoria, apesar da existência dos outros (Bajorath, 2004; Tetko, 2005; Tetko *et al.*, 2005).

Por sua vez, os descritores 2D são constituídos com base na conectividade molecular dos compostos. Os primeiros índices de conectividade molecular foram descritos por Randic e intensivamente investigados por Kier, Hall e outros colaboradores (Kier *et al.*, 1975; Kier *et al.*, 1975; Bonchev, 2000; Randic *et al.*, 2004; Vukicevic & Trinajstic, 2003; Hall & Henry, 2006).

Estes descritores vão de simples medidas das entidades constituintes da estrutura química, de suas propriedades geométricas e topológicas, métodos de contagens de fragmentos, até descritores eletrônicos calculados por métodos mecânico-quânticos. E podem ser classificados como:

- Descritores topológicos;
- Contagens de caminhos moleculares;
- BCUT;
- Índices topológicos de cargas de Gálvez;
- Autocorrelações 2D.

Os 3D são gerados a partir da estrutura tridimensional dos compostos cujas propriedades podem ser globais. Exemplos disso são o momento dipolar ou as energias HOMO e LUMO, as densidades de carga, volume e outros, na sua maioria obtida por *softwares* específicos, como por exemplo, o *software Dragon* (Tetko *et al.*, 2001; Tetko *et al.*, 2005).

Eles apresentam uma invariante translacional e rotacional, ou seja, não necessita de uma superimposição estrutural dos compostos estudados, para poder logo compará-los entre as diferentes moléculas (Tetko *et al.*, 2001; Young, 2001; Kubinyi *et al.*, 2002).

Estes descritores podem ser obtidos de diversas formas e metodologias, e são classificados como:

- Índices de aromaticidade;
- Perfis moleculares de Randic;
- Descritores Geométricos;
- Descritores 3D-MoRSE;
- Descritores RDF;
- Descritores WHIM;
- Descritores GETAWAY;
- Descritores eletrônicos.

Os descritores 1D e 2D são preferíveis em geral, pois independem da conformação, ao contrário dos descritores 3D. Este tipo de dependência acarreta a necessidade de amostragens conformacionais e seleção da conformação que será usada na construção do modelo (Oliveira, 2009).

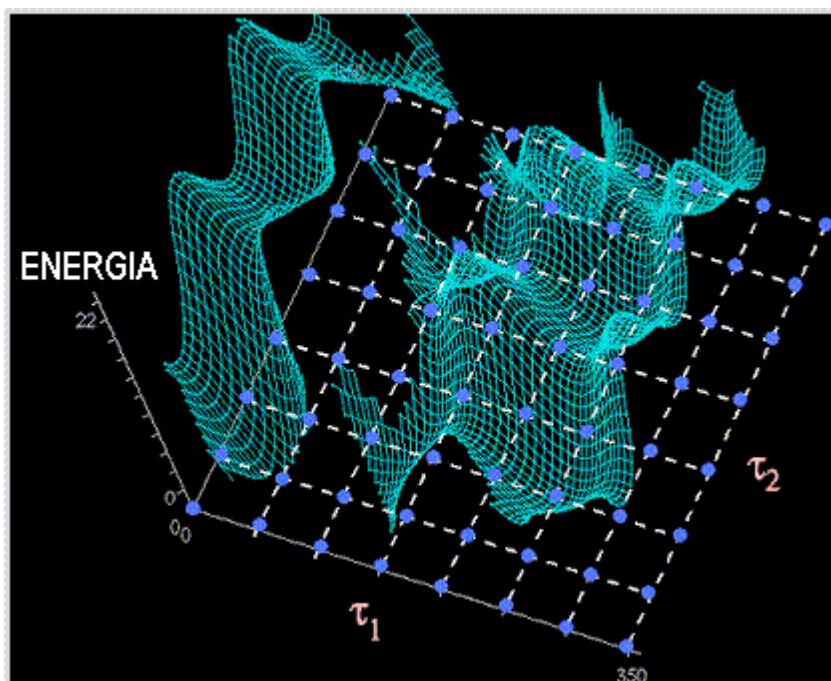
#### **1.4.3.3 SELEÇÃO DE VARIÁVEIS**

A seleção de variáveis é um conjunto de técnicas que têm por objetivo eliminar atributos (ou variáveis) considerados redundantes ou irrelevantes durante a modelagem matemática dos dados. Devido ao elevado número de variáveis, o processo é normalmente conduzido de forma automatizada e os critérios adotados para julgar a relevância dos atributos podem potencialmente eliminar variáveis importantes. Por esta razão é recomendável confrontar o modelo resultante com a noção intuitiva sobre o mecanismo de ação ou modo de ação (Oliveira, 2009).

Kubinyi (1993) e, posteriormente, Guyon e Elisseeff (2003) demonstraram por meio de exemplos que certas variáveis individualmente podem se mostrar irrelevantes, porém, quando combinadas, podem produzir modelos com boa capacidade de previsão. Esta constatação amplia as possibilidades a serem exploradas gerando um enorme desafio a concepção de metodologias eficientes de busca.

As estratégias mais populares utilizadas na proposição de subconjuntos de variáveis são: a busca sistemática, o algoritmo genético, a seleção prospectiva (forward stepwise selection) e a eliminação retrospectiva (backward elimination) (Oliveira, 2009).

A busca sistemática é um método determinístico que explora o espaço conformacional em intervalos regulares (**Figura 15**). Neste tipo de abordagem, o sistema de coordenadas internas é o mais apropriado na exploração do espaço conformacional, pois é possível reduzir o número de graus de liberdade identificados no sistema cartesiano aos ângulos torsionais independentes da molécula. Por exemplo, um sistema linear com  $N$  átomos possui  $3N-5$  graus de liberdade no sistema cartesiano (para sistemas cíclicos, este valor é de  $3N-6$ ) e, no sistema de coordenadas internas, este número se reduz a  $N'$  ( $N' < N$ ) ângulos torsionais independentes porque o comprimento das ligações entre átomos e os ângulos entre ligações consecutivas não variam drasticamente a conformação molecular (Goodman & Still, 1991; Oliveira 2009).

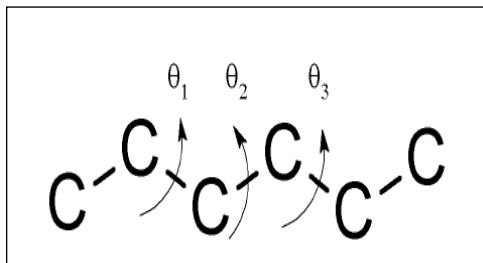


**Figura 15.** Mapeamento do espaço conformacional em espaços regulares. Fonte: Oliveira, 2009.

Diferentemente dos métodos aleatórios, os métodos determinísticos, como o da busca sistemática, são uma garantia de que o espaço conformacional será inteiramente explorado. Cada ponto desta superfície corresponde a uma conformação que é formada a partir da combinação de ângulos torsionais (**Figura 16**). No entanto, um fator limitante



inerente ao método é um fenômeno conhecido como explosão combinatória. Esta expressão é utilizada para enfatizar o crescimento vertiginoso do número de conformações geradas em função do aumento do número de ângulos torsionais (Oliveira, 2009).



**Figura 16.** A combinação de ângulos torsionais gera novas conformações. Fonte: Oliveira, 2009.

Os algoritmos genéticos (*Genetic Algorithm*, GA) foram concebidos na década de 60 por John Holland. Os princípios envolvidos são inspirados na teoria de Darwin sobre a evolução das espécies (Oliveira, 2009).

O GA concretiza seu objetivo pela geração de populações de modelos preditivos, através de um processo reprodutivo, bem como através da respectiva otimização da função relacionada com a qualidade do modelo construído (Machado, 2008).

Na terminologia algorítmica genética, cada indivíduo da população inicial é denominado cromossoma, consistindo num vetor binário em que cada posição (gene) corresponde a uma variável. Por sua vez, cada gene apresenta o número 1 ou 0, caso esteja incluído ou ausente no modelo construído, respectivamente. Por fim, cada cromossoma representa um possível modelo com determinadas variáveis (**Figura 17**).



**Figura 17.** Ilustração de um cromossomo. Cada cor representa um gene diferente que por sua vez está associado a presença (1) ou ausência (0) de determinada variável. Fonte: Oliveira, 2009.

Uma vez estabelecidos os parâmetros anteriores, a evolução do algoritmo genético é constituído por quatro passos gerais:

### I. Iniciação da população

A população inicial é constituída, em primeira instância, por modelos aleatórios com um número de variáveis entre 1 e L, sendo L o número máximo determinado pelo investigador. O valor da função selecionada para cada modelo é calculado no processo denominado “avaliação” (Machado, 2008).

Os modelos calculados são ordenados por ordem decrescente e de acordo com a qualidade do respectivo modelo.

### II. Crossover

Os pares de modelos são selecionados a partir do conjunto de cromossomas anteriormente calculado. Seguidamente, os respectivos pares permitem a geração de um novo modelo, o qual preserva as características comuns dos modelos ascendentes (os

progenitores) e incorpora características diferentes de acordo com a probabilidade de cruzamento genético. Se o “modelo-filho” coincide com algum já existente na população atual ou se a sua qualidade é inferior a qualquer um deles, então será rejeitado. Caso contrário, será avaliado e ordenado na restante população, segundo o nível de qualidade (Machado, 2008).

Este conjunto de passo é repetido inúmeras vezes até à obtenção do máximo valor da função que descreve a qualidade do modelo construído.

### III. Mutação

Após o procedimento de *crossover*, a população encaminha-se para um processo de mutação em que cada um dos seus modelos sofre alterações aleatórias nos seus respectivos genes. Os modelos comutados são, então, avaliados e ordenados na população de forma semelhantes ao *crossover* (Machado, 2008).

Este processo é controlado por probabilidade mutagênica, a qual permite um movimento dos mínimos estabelecidos por *crossover*.

### IV. Nova Geração

A nova geração de uma população é obtida através da supressão no cromossoma de uma percentagem pré-estabelecida e pela sua recriação aleatória. Por norma, a supressão cromossômica empregue ronda aproximadamente os 50% dos modelos totais criados, sendo que os excluídos correspondem aos modelos com menor qualidade (Machado, 2008).

Resumidamente, uma população inicial com  $N$  componentes é escolhida aleatoriamente. Cada indivíduo é caracterizado por seus cromossomos e ordenado em ordem decrescente de aptidão. No processo de reprodução, novos indivíduos são gerados através de recombinação (*crossover*) e eventuais mutações (*mutation*). Em processos ditos elitistas, os melhores classificados são escolhidos para reprodução. A aptidão dos indivíduos é avaliada de acordo com uma função característica do problema. O processo continua até um número preestabelecido de gerações ou de cópias de um mesmo cromossomo (Oliveira, 2009).

É importante ressaltar que o método GA proporciona um conjunto de modelos de regressão eficazes, bem como, uma caracterização pormenorizada das variáveis utilizadas em cada modelo construído e sua influência no mesmo. O caráter de avaliação ou qualidade dos modelos criados é quantificado por um ou mais critérios estatísticos, tais como, o coeficiente de correlação ( $R$ ), o fator  $F$  e o nível de preditividade ( $Q^2$ ).

Esta metodologia permite uma melhor exploração das combinações de variáveis e, por conseguinte, um melhor estudo dos descritores estruturais.

É importante que o método GA proporciona um conjunto de modelos de regressão eficazes, bem como, uma caracterização pormenorizada das variáveis utilizadas em cada modelo construído e sua influência no mesmo. O caráter de avaliação ou qualidade dos

modelos criados é quantificado por um ou mais critérios estatísticos, tais como, o coeficiente de correlação ( $R$ ), o fator  $F$  e o nível de preditividade ( $Q^2$ ).

A seleção prospectiva (forward stepwise selection) incorpora progressivamente as variáveis iniciando o processo a partir de um conjunto vazio enquanto que a eliminação progressiva (backward elimination) trabalha no sentido inverso, ou seja, a partir do conjunto total de variáveis eliminam-se progressivamente as menos promissoras.

A etapa final consiste na aplicação de métodos de regressão.

#### 1.4.3.4 ANÁLISE DE REGRESSÃO E VALIDAÇÃO

A análise de regressão compreende técnicas estatísticas utilizadas para encontrar relações entre variáveis descrevendo-as por meio de uma equação matemática com o propósito de efetuar previsões futuras.

O presente trabalho faz uso do modelo de regressão linear seguindo os princípios gerais na proposição, validação e análise de modelos QSAR discutidos por Gaudio e Zandonade (2001).

#### Regressão Linear Simples

A regressão linear simples é uma ferramenta estatística utilizada para estabelecer uma relação entre uma única variável explanatória,  $x$ , e uma única variável de resposta,  $y$ . Esta relação é expressa através de uma equação linear que irá fornecer um valor estimado,  $\hat{y}$ , para a variável de resposta:

$$\hat{y} = b_0 + b_1 x_1 + Err \quad (\text{Eq. 6.0})$$

onde  $b_0$  é coeficiente linear,  $b_1$  é o coeficiente angular e  $Err$  é o resíduo. O objetivo da regressão é encontrar os coeficientes  $b_0$  e  $b_1$  que minimizam a diferença entre  $y$  e  $\hat{y}$ .

O método utilizado para encontrar os coeficientes  $b_j$  ( $j = 0,1$ ) é denominado método dos mínimos quadrados. Neste método a soma quadrática da diferença entre  $y$  e  $\hat{y}$ , ou seja, a soma quadrática dos erros para todas as  $n$  amostras do conjunto de dados deve ser mínima. O uso da soma quadrática ao invés da soma simples reside na premissa assumida de que os erros seguem uma distribuição aleatória com média zero acarretando, conseqüentemente, um valor nulo para a soma simples desde que diferenças negativas e positivas se cancelariam mutuamente.

Em notação simbólica tem-se:

$$SSE = \sum_{k=1}^n (y_k - \hat{y}_k)^2$$

ou

$$SSE = \sum_{k=1}^n (y_k - b_0 - b_1 x_{1k})^2 \quad (\text{Eq. 7.0})$$

onde SSE é a sigla inglesa para Soma dos Erros Quadráticos (*Sum of Squared Errors*).

O mínimo desta função é dado pela primeira derivada em relação aos coeficientes  $b_j$  ( $j = 0, 1$ ):

$$\frac{\partial SSE}{\partial b_0} = 0 \text{ e } \frac{\partial SSE}{\partial b_1} = 0 \quad (\text{Eq. 8.0})$$

Os coeficientes que satisfazem as condições descritas na Eq. 7.0 são definidos como:

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \text{ e } b_0 = \bar{y} - b_1 \bar{x} \quad (\text{Eq. 9.0})$$

A avaliação de qualidade do modelo obtido é realizada através de diagnósticos definidos pela análise de variância, estatística F e análise dos resíduos.

A avaliação do ajuste do modelo é feita por meio de índices que agregam conceitos diferentes na mensuração de qualidade do modelo. Os índices comumente utilizados são:  $R$  (coeficiente de correlação),  $R^2$  (coeficiente de determinação),  $S_e$  (desvio padrão ou erro padrão da estimativa), teste F e teste t.

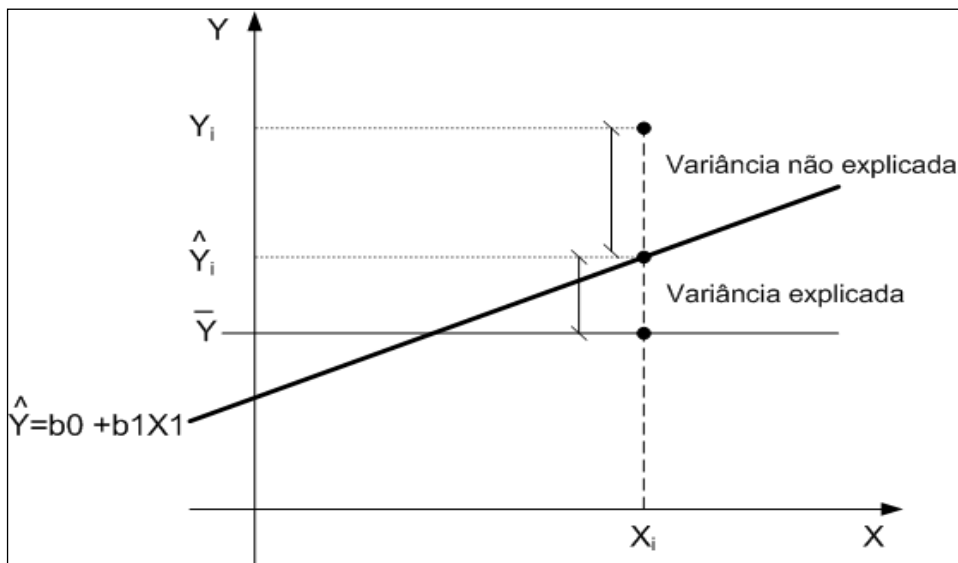
O coeficiente de correlação mede a intensidade e a direção da relação linear entre duas variáveis, mas não, necessariamente, implica relação de causa-efeito. Matematicamente, é definido por:

$$R = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})(y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{Y})^2}} \quad (\text{Eq. 10.0})$$

De acordo com a Eq. 10.0,  $R$  assume valores no intervalo  $[-1,1]$  e quanto mais próximos dos extremos estiverem estes valores, maior será a correlação entre as variáveis independente e dependente.

Os demais índices são derivados da decomposição da variância total em variância explicada e não explicada pelo modelo (**Figura 18**):

$$\begin{array}{ccc} \overbrace{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}^{\text{Variância Total}} & = & \overbrace{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}^{\text{Variância explicada}} + \overbrace{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}^{\text{Variância não explicada}} \\ \downarrow & & \downarrow \qquad \qquad \downarrow \\ \text{SST} & = & \text{SSR} \quad + \quad \text{SSE} \end{array} \quad (\text{Eq. 11.0})$$



**Figura 18.** Explicação gráfica para a decomposição da variância total. Fonte: Oliveira, 2009.

O coeficiente de determinação  $R^2$  mede a proporção da variância explicada pelo modelo e é definido por:

$$R^2 = \frac{SSR}{SST} \quad (\text{Eq. 12.0})$$

Da Eq. 12.0 observa-se que  $R^2$  pertence ao intervalo  $[0,1]$  e quanto mais próximo do valor unitário, melhor é o ajuste da reta de regressão aos dados. É necessário cautela na interpretação de  $R^2$ , pois este índice indica o quanto à linha de regressão ( $\hat{y}$ ) se aproxima dos dados reais, porém, não expressa:

- Se há relação de causalidade entre  $x$  e  $y$ ;
- Se existe influência sobre o modelo de possíveis variáveis omitidas;
- Se a regressão correta foi utilizada;
- Se o conjunto de variáveis independentes utilizado é o mais apropriado;
- Se há colinearidade no conjunto de dados;
- Se o modelo pode ser melhorado pelo uso de variáveis independentes que sejam transformações das variáveis originais.

O desvio padrão dos dados ao redor da reta de regressão é denominado erro padrão da estimativa,  $S_e$ . Este índice mede a variância não explicada pela regressão e é definido por:

$$S_e = \sqrt{\frac{(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} = \sqrt{\frac{SSE}{n-2}} \quad (\text{Eq. 13.0})$$

Quanto menor o valor de  $S_e$  melhor será o ajuste do modelo de regressão.

Os testes de significância para o modelo de regressão e os coeficientes individuais da regressão demonstram que os valores encontrados para os índices de confiabilidade não ocorreram ao acaso. Significância estatística é obtida através da rejeição da hipótese nula,  $H_0$ .

O teste  $F$  é utilizado para avaliar a significância estatística de  $R^2$  e é definido matematicamente por:

$$F_0 = \frac{SSR}{SSE/n-2} \quad (\text{Eq. 14.0})$$

O teste  $F$  mede a razão entre a variância explicada e a não explicada. Se, para um dado nível de significância  $\alpha$ ,  $F_0 > F_{\text{crítico}} = F_{\alpha, 1, n-2}$  então se rejeita a hipótese nula de que o modelo de regressão não é significativo. O teste  $t$  avalia a hipótese nula de que não há relação linear entre a variável independente e a dependente. Esta afirmação é equivalente à premissa de que os coeficientes  $b_j$  ( $j = 0, 1$ ) são nulos. O teste  $t$  é definido por:

$$t_0 = \frac{b_j}{\sqrt{\left(\frac{SSE}{n-2}\right) \sum (X_i - \bar{x})^2}} \quad (i=0,1) \quad (\text{Eq. 15.0})$$

Similarmente ao teste  $F$ , se  $t_0 > t_{\alpha, n-2}$  existe relação linear entre a variável dependente e independente.

A análise de variância, cuja sigla inglesa é ANOVA, é frequentemente apresentada na forma de uma tabela como mostrado na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Tabela ANOVA para o modelo de regressão linear.

Fonte de Variação	Nº Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Média da Soma dos quadrados	$F_0$	Probabilidade P
Modelo	1	SSR	MSR=SSR	MSR/MSE	=P( $H_0: F_0 \leq F_{\text{crítico}}$ )
Resíduo	n-2	SSE	SSE/(n-2)		
Total	n-1	SST	SST/(n-1)		

A melhor forma de avaliar a capacidade de previsão de um modelo é através de validação externa, ou seja, fazer previsões para um grupo de dados que não foram utilizados na construção do modelo. No entanto, nem sempre é possível dispor de um conjunto externo de validação de forma que o método da validação cruzada torna-se uma alternativa para a análise de previsibilidade do modelo.

Neste método, certo grupo de dados é separado do conjunto de dados inicial e em seguida reconstrói-se o modelo com os dados remanescentes. Com o modelo obtido fazem-

se previsões acerca dos dados separados e mensura-se o desvio entre os valores observados,  $Y_i$ , e os estimados,  $\hat{Y}_i$ . Este processo é repetido variando-se o grupo de dados separados. Normalmente, retira-se um objeto do conjunto de dados ao que se chama validação *leave-one-out*.

Os indicadores utilizados no método são:

$$PRESS = \sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2 \quad (\text{Eq. 16.0})$$

$$Q^2 = 1 - \frac{PRESS}{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2} \quad (\text{Eq. 17.0})$$

$$SPRESS = \frac{\sqrt{PRESS}}{n-2} \quad (\text{Eq. 18.0})$$

Um modelo com boa capacidade de previsão apresenta valores para o coeficiente de correlação da validação cruzada,  $Q^2$ , próximos de 1 e valores para o desvio padrão da validação,  $SPRESS$ , que tendem a zero.

Finalmente, modelos de regressão linear podem ser utilizados desde que quatro premissas principais sejam respeitadas:

1. Existência de linearidade entre as variáveis dependente e independente;
2. Os resíduos são independentes;
3. Os resíduos apresentam variância constante (homocedasticidade);
4. Os resíduos seguem uma distribuição normal  $N(0, \sigma^2)$ .

### Regressão Linear Múltipla

A regressão linear múltipla, RLM, é uma extensão da regressão linear simples para mais de uma dimensão. Neste caso, a melhor forma de expressar a relação entre as variáveis dependentes e independentes é através de matrizes:

$$\begin{bmatrix} Y_1 \\ Y_2 \\ \vdots \\ Y_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & X_{11} & X_{12} & \cdots & X_{1l} \\ 1 & X_{21} & X_{22} & \cdots & X_{2l} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & X_{n1} & X_{n2} & \cdots & X_{nl} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} b_0 \\ b_1 \\ \vdots \\ b_l \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e_1 \\ e_2 \\ \vdots \\ e_n \end{bmatrix} \quad (\text{Eq. 19.0})$$

A Eq. 19.0 pode ser reescrita como:

$$\mathbf{y} = \mathbf{Xb} + \mathbf{e} \quad (\text{Eq. 20.0})$$

Aplicando o método dos mínimos quadrados na Eq. 20.0 para obter a estimativa dos coeficientes  $\mathbf{b}$  significa resolver a equação matricial abaixo:

$$\mathbf{b} = (\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}'\mathbf{y} \quad (\text{Eq. 21.0})$$

onde  $\mathbf{X}'$  corresponde a matriz transposta de  $\mathbf{X}$ ,  $\mathbf{X}^{-1}$  é a matriz inversa de  $\mathbf{X}$  e a matriz resultante do produto  $\mathbf{X}'\mathbf{X}$  é denominada matriz de correlação.

Idealmente, as variáveis independentes  $\mathbf{X}$  em um modelo de regressão devem ser ortogonais, ou seja, não correlacionadas. A razão para esta condição pode ser compreendida a partir da Eq. 21.0. Se o determinante de uma matriz for nulo, então esta matriz é singular e não possui inversa. Logo, se houver um alto grau de colinearidade entre as variáveis  $\mathbf{X}$  não é possível calcular a matriz inversa da matriz de correlação, pois seu determinante é nulo.

O valor estimado para a variável dependente é calculado pela expressão:

$$\hat{\mathbf{y}} = \underbrace{\mathbf{X}(\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}'\mathbf{y}}_{\mathbf{b}} \quad (\text{Eq. 22.0})$$

A avaliação do ajuste do modelo é feita com os mesmos índices de confiabilidade apresentados para a regressão linear. A análise de variância correspondente é mostrada na **Tabela 4**.

**Tabela 4.** Tabela ANOVA para o modelo de regressão linear múltipla.

Fonte de Variação	Nº Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Média da Soma dos quadrados	F <sub>0</sub>	Probabilidade P
Modelo	k	SSR	MSR=SSR/k	MSR/MSE	=P(H <sub>0</sub> :F <sub>0</sub> ≤F <sub>crítico</sub> )
Resíduo	n-k-1	SSE	SSE/(n-k-1)		
Total	n-1	SST	SST/(n-1)		

Outro indicador importante para o modelo de regressão linear múltipla é o coeficiente de determinação ajustado,  $R_{ajust}^2$ . Este índice é uma modificação de  $R^2$  que leva em consideração o número de coeficientes utilizados no modelo. É útil para avaliar se a inserção de novas variáveis contribui para a melhora do modelo.

Ao contrário de  $R^2$ , que no mínimo permanece constante ou aumenta quando novos termos são adicionados ao modelo,  $R_{ajust}^2$  pode até diminuir tornando explícita a contribuição de cada novo termo adicionado ao modelo. Matematicamente, este parâmetro é definido por:

$$R_{ajust}^2 = 1 - \frac{(n-1)}{(n-k-1)} (1 - R^2) \quad (\text{Eq. 23.0})$$

A capacidade de previsão do modelo é avaliada através dos mesmos indicadores *PRESS*,  $Q^2$  e *SPRESS* utilizados na regressão linear simples.



Entretanto, a expressão para o desvio padrão da validação é dependente do número de graus de liberdade do resíduo:

$$SPRESS = \frac{\sqrt{PRESS}}{n - k - 1} \quad (\text{Eq. 24.0})$$

A utilização de modelos de regressão linear múltipla está condicionada às mesmas quatro premissas apresentadas no final da seção anterior e a ausência de multicolinearidade entre as variáveis explicativas.

#### 1.4.3.5 ANÁLISE DO DOMÍNIO DE APLICABILIDADE DO MODELO

Previsão de atividade por um modelo QSAR é limitada pelo espaço químico definido pelo conjunto de dados (também denominado conjunto de trabalho) utilizado na proposição do modelo. Quando o conjunto de trabalho é analisado no espaço de descritores do modelo, os compostos são representados como pontos no espaço multidimensional. Previsões feitas neste espaço correspondem a interpolações no domínio definido pelo modelo. O conhecimento deste domínio propicia a qualificação da confiabilidade do modelo na previsão de novos compostos (Jaworska *et al.*, 2005; Oliveira, 2009).

Durante a conferência ocorrida na cidade de Setúbal, mencionada no final da seção 1.4 deste capítulo, foi formulada uma definição para o domínio de aplicabilidade do modelo (Jaworska *et al.*, 2005):

“O domínio de aplicabilidade de um modelo (Q)SAR é o espaço (físico-químico, estrutural ou biológico), conhecimento ou informação sobre o qual o conjunto de trabalho do modelo foi desenvolvido e para o qual é aplicável fazer previsões para novos compostos. É recomendável que o domínio de aplicabilidade de um modelo (Q)SAR seja descrito em termos dos parâmetros mais relevantes, ou seja, usualmente os descritores utilizados no modelo. Idealmente, o modelo (Q)SAR deveria ser usado para fazer previsões dentro do domínio por meio de interpolação e não extrapolação.”

Em termos práticos, esta definição deve ser traduzida em procedimentos quantitativos para se determinar o domínio de aplicabilidade do modelo. Neste caso, existem diversos métodos para definir regiões de interpolação bem como para avaliar similaridade. Como consequência da falta de harmonização, diferentes métodos produzem diferentes domínios de aplicabilidade para o mesmo conjunto de dados (Oliveira, 2009).

Jaworska e colaboradores (2005) recomendam que o método eleito seja aquele cuja distribuição associada ao conjunto de dados satisfaça as premissas do método.

Para modelos de regressão e classificação os métodos mais apropriados para estimar o domínio de aplicabilidade são aqueles baseados (Jaworska *et al.*, 2005; Schroeter *et al.*, 2007):

- No intervalo dos descritores (*range based*);
- Em definições geométricas (*geometrical based*);
- Em distâncias (*distance based*);
- Na distribuição da densidade de probabilidade (*probability density distribution based*).

Cada uma destas abordagens determina a região de interpolação através da construção de envelopes convexos ao redor do conjunto de dados no espaço multidimensional. Para modelos onde o espaço descritor é unidimensional a região de interpolação é definida pelo mínimo e o máximo valor do conjunto de trabalho (Oliveira, 2009).

Métodos baseados no intervalo dos descritores consideram a diferença entre os valores máximos e mínimos de cada descritor para definir a aresta do envelope convexo. No espaço multidimensional, o resultado será a formação de um hipercubo. Neste caso, assume-se como premissa que a distribuição dos dados é uniforme, caso contrário, haverá espaços vazios dentro da região de interpolação. Nos espaços vazios a previsão não é confiável, pois estas regiões não são cobertas pelo conjunto de dados. O pré-processamento dos dados através da análise de componentes principais (PCA) tende a reduzir o volume vazio dos dados originais (Oliveira, 2009).

Métodos baseados em definições geométricas são elaborados para calcular diretamente o envelope convexo analisando os limites do conjunto de dados. Entretanto, existem algoritmos eficientes apenas para duas e três dimensões. Nenhuma consideração sobre a distribuição dos dados é feita neste método, portanto, a região de interpolação pode ainda conter espaços vazios (Oliveira, 2009).

Métodos baseados em distância identificam a região de interpolação usando o conceito de distância entre pontos no espaço multidimensional. Há que se considerar a forma de coletar os valores de distância, a métrica que será utilizada no cálculo da distância (Euclideana, Mahalanobis, Manhattan, etc), e o critério de corte para considerar se um ponto pertence ou não ao domínio (Oliveira, 2009).

A forma de coletar os valores de distância significa definir o que será mensurado, ou seja, se a distância será calculada entre o ponto em avaliação e o centro de massa do conjunto de dados, ou se será a distância média ou a máxima entre o ponto em avaliação e todos os pontos do conjunto de dados, por exemplo (Oliveira, 2009).

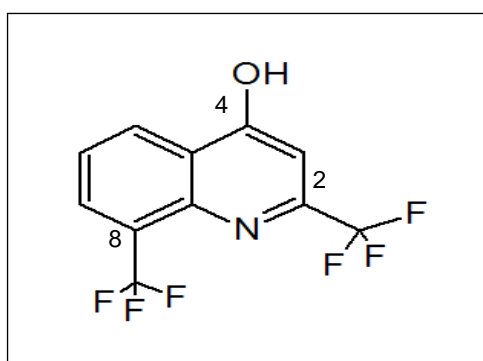
A métrica utilizada determina como a distância será mensurada. Os métodos que utilizam a métrica Euclideana e Mahalanobis assumem que a distribuição dos dados é uniforme enquanto que na métrica de Manhattan (também conhecida por City-block) assume-se distribuição triangular (Oliveira, 2009).

Finalmente, métodos fundamentados na distribuição da densidade de probabilidade procuram identificar as regiões de alta densidade do conjunto de dados onde serão feitas as previsões. Os métodos se dividem em paramétricos e não-paramétricos. Os métodos paramétricos assumem que a função de densidade tem a forma de uma distribuição padrão como Gaussiana, Poisson, etc. Os métodos não-paramétricos estimam a densidade de probabilidade a partir do conjunto de dados. A semelhança dos métodos baseados em distâncias geométricas, a estimativa de densidade restringe-se a no máximo três dimensões devido à demanda computacional envolvida para dimensões superiores (Oliveira, 2009).

### 1.5 ESTUDO DA RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DE QUINOLINA METANÓIS

Milner *et al* (2010) utilizando a mefloquina como um andaime, construiu uma biblioteca da nova geração de quinolina metanol (NGQM), substituídas na posição-4, para identificar precocemente, através de estudos da Relação Estrutura-Atividade (SAR), compostos líderes que possuem propriedades biológicas consistentes com o perfil do produto alvo para quimioprofilaxia da malária, reduzindo a permeabilidade através da barreira sangue-cérebro.

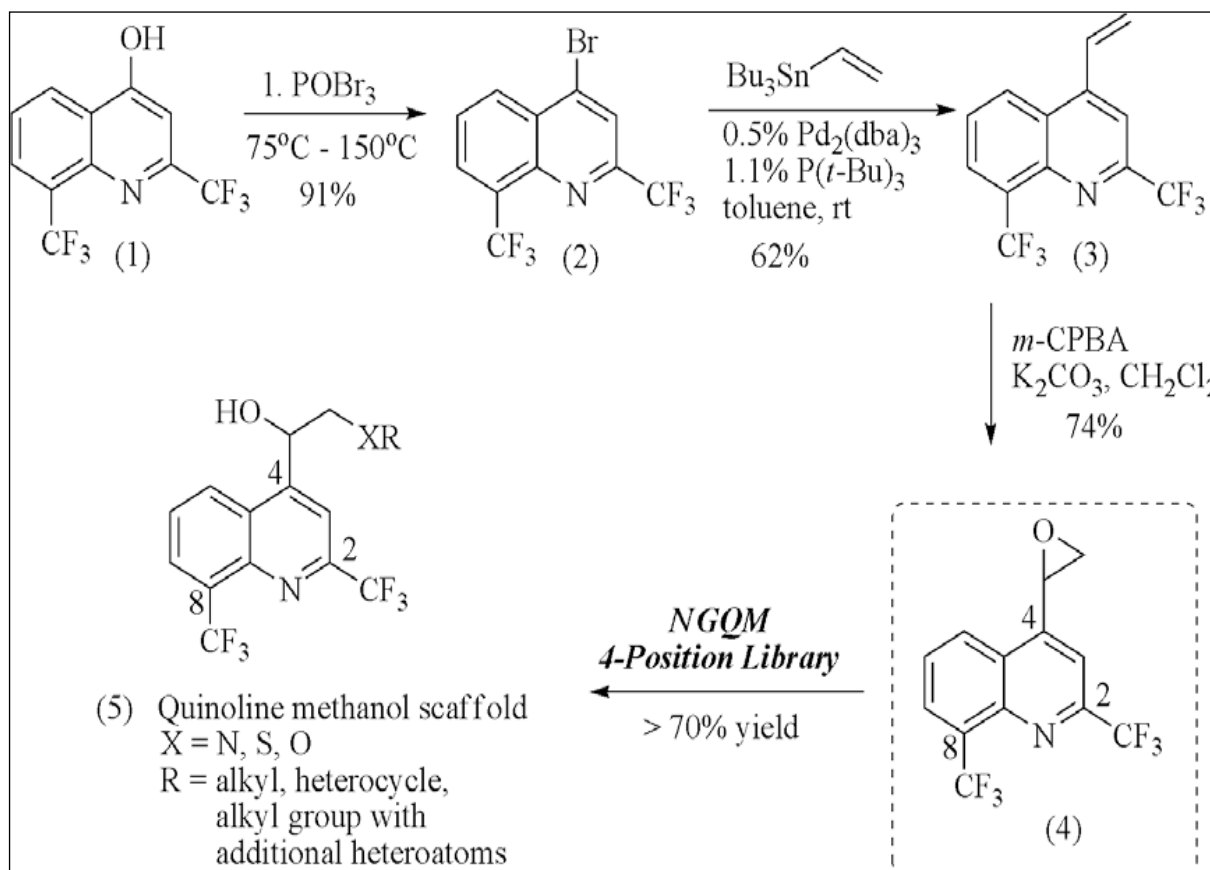
Como já foi relatado a mefloquina é a droga do Exército dos EUA de escolha para profilaxia da malária, mas como a sua associação causa efeitos adversos ao sistema nervoso (SNC). A justificativa atual para o seu uso é a meia-vida longa (dosagem por semana) e atividade contra a malária resistente à cloroquina. Optando pelo andaime quinolina metanol devido à relativa segurança da mefloquina na gravidez e seu perfil clínico bem caracterizado eles procuraram evitar a penetrabilidade no SNC desde o início através da reengenharia do andaime quinolina metanol (**Figura 19**) para dar os derivados que apresentam menos efeitos adversos sobre o SNC, mantendo a eficácia antimalárica (Milner *et al*, 2010).



**Figura 19.** Andaime quinolina metanol.

A preparação dos análogos consistiu na permanência do núcleo quinolina com o 2,8-trifluorometil e a grande maioria dos derivados foi construída de acordo com os procedimentos delineados na **Figura 20**. O Bis(trifluorometil)quinolin-4-ol (**1**) foi fundido juntamente com oxibrometo de fósforo para proporcionar 4-bromo-2,8-bis(trifluorometil)

quinolina (**2**), o qual foi submetido a uma reação Stille a fim de produzir vinil intermediário (**3**). A oxidação simples levou ao epóxido (**4**), que foi diversificado na posição 4 através de um mecanismo de abertura regioseletiva S<sub>N</sub>2 nucleofílica do anel. Uma vez que esta era uma biblioteca exploratória ela pretendia fornecer de início compostos-líderes, eles optaram então por construir e selecionar compostos racêmicos (**5**) (Milner *et al.*, 2010).



**Figura 20.** Síntese da nova geração do andaime quinolina metanol.

A partir desse andaime quinolina metanol substituído na posição-4, a biblioteca foi construída, gerando 200 análogos, os quais foram avaliados quanto a sua seletividade, gerando valores de IC90 (Concentração inibitória que reduz o efeito em 90%) *in vitro* contra quatro espécies diferentes de *Plasmodium falciparum*, W2, D6, C235 e C2A.

Os compostos representativos dessa biblioteca avaliados foram as quinolinas metanóis (QMs) com: sítios homobenzílicos, fenil, benzil, fenetilamino, amino heterocíclicas, alquilamino, alquilamino contendo heteroátomos adicionais na cadeia lateral e diaminas.

O álcool da posição 4 e pelo menos uma diamina encontrou o requisito mínimo para a potência equivalente à mefloquina. A menor densidade de elétrons ao redor da amina homobenzílica da cadeia lateral apresentou uma potência muito reduzida. A potência moderadamente aumentada, seletividade alta e alterações dos padrões de suscetibilidade cruzada foram alcançados com imidazol contendo análogos. Dez vezes maior potência e selectividade do que mefloquina sem alterações dos padrões de suscetibilidade cruzada

foram observados em análogos com cadeias laterais de alquilo. A introdução de heteroátomos nestes últimos análogos geralmente reduziu a potência, embora os análogos exibissem uma potência equivalente à mefloquina.

Tomados em conjunto, estas observações a biblioteca de nova geração de quinolina metanol apresenta compostos que inibem o crescimento de estirpes de *Plasmodium falciparum* sensíveis e resistentes às drogas antimaláricas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Determinar quantitativamente a influência de descritores físico-químicos na atividade antimalárica do andaime quinolina metanol (QM) substituído na posição 4, aplicando estudos de QSAR-2D, correlacionando a potência de 12 análogos com os descritores que regem o desencadeamento de seu desempenho como antimalárico frente ao *Plasmodium falciparum*.

### 2.2 ESPECÍFICOS

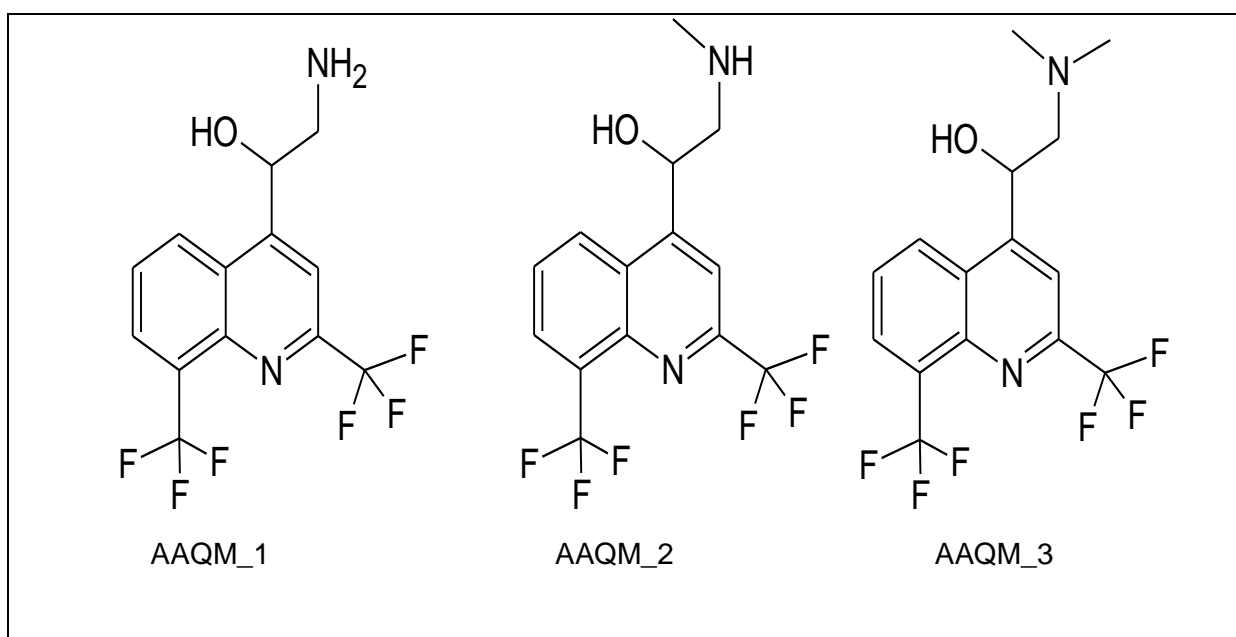
- Calcular a geometria molecular e otimizar cada composto do estudo através de métodos semi-empíricos;
- Capturar informações moleculares através do cálculo de descritores moleculares;
- Selecionar variáveis para reduzir o conjunto inicial de descritores moleculares, para um subconjunto de descritores que sejam relevantes para o propósito do modelo;
- Estabelecer relações quantitativas entre a estrutura química e a atividade biológica observada para estes compostos;
- Verificar a consistência entre os descritores eleitos e o conjunto de dados;
- Analisar o domínio de aplicabilidade do modelo.
- Validar o modelo efetuando o descarte de compostos usados no modelo para a geração de um modelo mais preditivo.

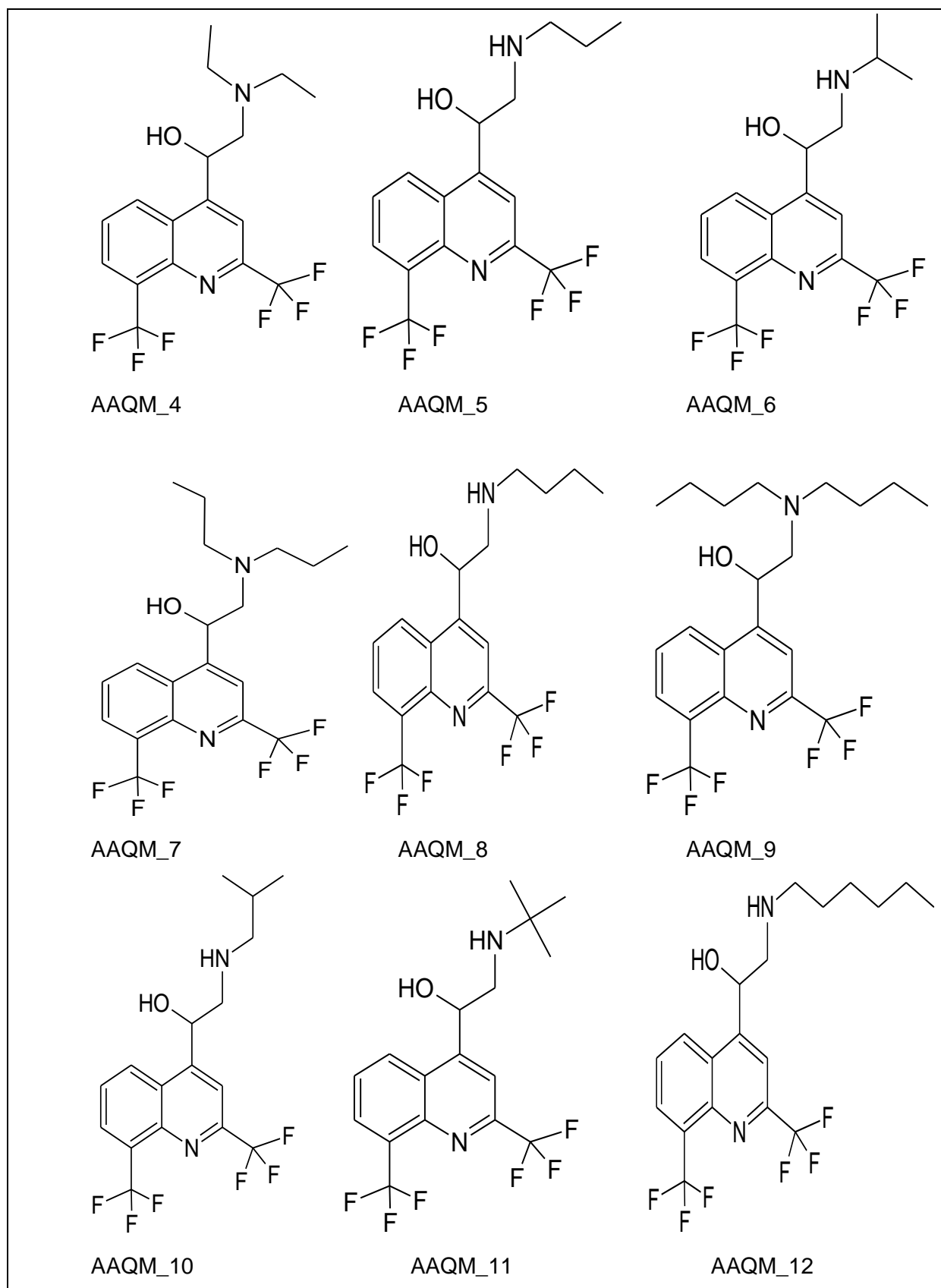
### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 SELEÇÃO DE LIGANDOS

A seleção de ligandos é o primeiro passo a realizar em estudos de QSAR, procedendo-se à elaboração de uma base de dados de determinada família ou conjunto de compostos.

Neste trabalho foram selecionados 12 compostos alquilamino quinolina metanol (AAQM) substituídos na posição 4 (**Figura 21**), obtidos da literatura (Milner *et al.*, 2010) com os valores quantitativos de IC90 (ng/mL) *in vitro* contra a espécie de *Plasmodium falciparum*, C235. Estes valores foram convertidos para mol/L através do cálculo da concentração, e a atividade biológica ( $\log 1/IC90$ ) foram calculadas computacionalmente, fornecendo uma ideia da potência total de cada composto, sem considerar o meio em que podem ser encontrados (**Tabela 5**).

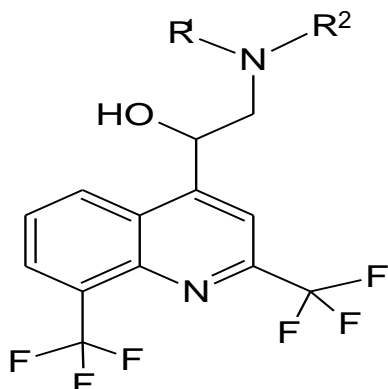




**Figura 21.** Compostos alquilamino quinolina metanol (AAQM) estudados.



**Tabela 5.** Valores de IC<sub>90</sub> (ng/mL), IC<sub>90</sub> (mol/L) e Log 1/IC<sub>90</sub> contra o *Plasmodium falciparum* a partir da seletividade de alquil amino quinolina metanol (AAQMs).



Compostos	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	IC <sub>90</sub> <sup>a</sup> (ng/mL)	IC <sub>90</sub> <sup>a</sup> (mol/L)	LOG 1/IC <sub>90</sub>
AAQM_1	H	H	> 500	1,54x10 <sup>-06</sup>	5,81
AAQM_2	H	Me	58	1,71 x10 <sup>-07</sup>	6,76
AAQM_3	Me	Me	79	2,24 x10 <sup>-07</sup>	6,64
AAQM_4	Et	Et	37	9,72 x10 <sup>-08</sup>	7,01
AAQM_5	H	n-Pr	14	3,82 x10 <sup>-08</sup>	7,41
AAQM_6	H	i-Pr	23	6,27 x10 <sup>-08</sup>	7,20
AAQM_7	n-Pr	n-Pr	20	4,89 x10 <sup>-08</sup>	7,31
AAQM_8	H	n-Bu	9	2,36 x10 <sup>-08</sup>	7,62
AAQM_9	n-Bu	n-Bu	27	6,18 x10 <sup>-08</sup>	7,20
AAQM_10	H	i-Bu	15	3,94 x10 <sup>-08</sup>	7,40
AAQM_11	H	t-Bu	137	3,60 x10 <sup>-07</sup>	6,44
AAQM_12	H	n-hex	409	1,00 x10 <sup>-06</sup>	5,99

<sup>a</sup> Valores de IC<sub>90</sub> *in vitro* contra a espécie de *Plasmodium falciparum*, C235.

### 3.2 GEOMETRIA MOLECULAR E OTIMIZAÇÃO

Escolhido o conjunto para o estudo, obteve-se a geometria molecular e a otimização de cada composto. Neste passo computacional, foram utilizados dois programas, mais propriamente, o Gaussian G03W e o HyperChem Professional 8 (Frisch *et al.*, 2003; Hypercube, 2008), embora existam ainda vários outros que permitam o estudo estrutural pretendido. O uso destes programas possibilita a descrição da geometria de cada composto em estudo, analisando as energias de interação e os seus respectivos gradientes de concentração para determinar a geometria molecular correspondente ao estado de mínima energia.

Após o desenho computacional de cada uma das alquilamino quinolina metanol da série em estudo, obtidos graças ao Gaussian G03W, foi possível obter uma pré-otimização com o método semi-empírico AM1 (*Austin Model 1*). Seguidamente e não obstante dos resultados antes alcançados, esses mesmos compostos sofreram uma otimização mais rigorosa através da utilização do método semi-empírico RM1 (*Modelo Recife 1*), implementado no HyperChem Professional 8. Utilizados os seguintes critérios: algoritmo, Polak-Ribiere; gradiente RMS: 0,1 kcal mol<sup>-1</sup>; número máximo de ciclos: 795; solventes: no vácuo (*in vácuo*).

### 3.3 CÁLCULO DOS DESCRITORES

Inicialmente, um total de 1.664 descritores foi calculado através do programa DRAGON (Talete, 2006), que dispõe de um pacote com vinte blocos de descritores em 0D a 3D (**Figura 22**).



**Figura 22.** Interface do programa DRAGON com os blocos de descritores.

Os descritores que apresentaram valores de intercorrelação superiores a 0,9 foram eliminados. Isso reduziu o número de descritores para 1226 para cada composto.

### 3.4 SELEÇÃO DAS VARIÁVEIS E CONSTRUÇÃO DO MODELO

Para a seleção das variáveis e construção de modelos de QSAR foram adotados dois aplicativos, que operam de forma similar, empregam regressão linear múltipla (RLM), mas têm características próprias de seleção de variáveis e proposição de modelos de

QSAR. Além disto, cada programa apresenta valores de parâmetros estatísticos de forma diferente, mas que se completam. Descrição dos aplicativos:

a) MobyDigs (Talete, 2009): se utiliza de um algoritmo genético (GA-VSS – *Genetic Algorithm – Variables Subset Selection*) para a seleção de variáveis e permite ao usuário pré-fixar valores para parâmetros específicos de funções de ajuste RQK implementadas como *QUICK Rule* (Todeschini *et al.*, 2004). São basicamente cinco critérios que precisam ser atendidos simultaneamente para que o modelo selecionado seja considerado válido:

1.  $Q^2_{LOO} > Q^0$ , caso contrário rejeitar o modelo.  $Q^0$  é um valor limítrofe entre 0 e 0,5 associado à capacidade de predição.

2.  $K_{xy} - K_x > \delta K$ , caso contrário há alta colinearidade.  $K_x$  corresponde ao índice de correlação calculado no conjunto de dados  $p_x$  variáveis, e  $K_{xy}$  o índice de correlação obtido no mesmo conjunto acrescido da resposta  $y$ , isto é, da matriz com  $n$  elementos e  $p_x+1$  variáveis.  $K_{xy} < K_x$  caracteriza um modelo com multicolinearidade sem poder de predição.

3.  $Q^2_{LOO} - Q^2_{ASYM} > \delta Q$ , caso contrário a capacidade de predição do modelo é duvidosa. Segundo Todeschini *et al.* (2004) existe um comportamento assintótico de  $Q^2_{LOO}$  relacionado a  $R^2$  dado por:

$$Q^2_{ASYM} = 1 - (1 - R^2) \left( \frac{n}{n - p'} \right)^2 \quad (\text{Eq. 25.0})$$

onde  $n$  é o número de compostos e  $p'$  o número de variáveis do modelo.

4.  $R^P > t^P$ , caso contrário há redundância nas variáveis explanatórias. O valor de  $t^P$  é definido pelo usuário do programa variando de 0,01 a 0,1. Avalia-se o quanto duas (ou mais) variáveis explicam a mesma coisa. Se nenhum dos valores  $t^P$  satisfizer a condição o modelo contém redundância nas variáveis.

5.  $R^N > t^N$ , caso contrário há sobreajuste devido às variáveis com ruído.  $t^N$  é modulado pelo usuário por um parâmetro  $\varepsilon$  do programa que varia de 0 a 0,1 em intervalos de 0,01. Como no caso anterior, se nenhum valor satisfizer a desigualdade, o modelo deve ser rejeitado. Os detalhes dos critérios 4 e 5 são extensos e podem ser encontrados em Todeschini *et al.* (2004).

b) BuildQSAR (Oliveira, 2001): utiliza-se de seleção de variáveis através de um algoritmo genético e busca sistemática com até cinco variáveis, apresentando uma listagem de todos os modelos que pode ser ordenada pela correlação de Pearson  $R$  ou  $Q^2$ .

O MobyDigs foi usado para a seleção do descritor e construção do modelo de QSAR e o BuildQSAR forneceu a equação matemática para o modelo. Para minimizar a ocorrência de correlação por coincidência, selecionaram-se apenas dois descritores no modelo QSAR, pois requer pelo menos cinco compostos para cada variável incluída no modelo.

Valores padrão foram usados do Algoritmo Genético (GA) e houve a seleção das melhores combinações de variáveis.

As características da aplicação computacional desenvolvida para a execução do GA, bem como os parâmetros de cálculos, são as seguintes:

- Utilização do coeficiente de preditividade (*leave-one-out*),  $Q^2_{LOO}$ , como função de otimização;

- A população inicial consistiu 50 cromossomas obtidos de forma probabilística. A probabilidade de cada variável é proporcional ao seu coeficiente de correlação parcial com o respectivo valor de afinidade;

- O cruzamento (*crossover*) é uniforme e com uma probabilidade de 0,5, ou seja, aproximadamente 50% das características de cada um dos pais são acopladas para a obtenção dos cromossomas-filhos, conservando-se os aspectos comuns dos progenitores;

- O número de ciclos nos cruzamentos efetuados, antes da mutação, é de 1000 iterações, e depois na nova geração da população foi de 2000 ciclos;

- A probabilidade de mutação é também de 50%, incrementando-se assim a possibilidade de explorar um espaço amplo de combinações entre variáveis selecionadas;

- O critério de paragem baseia-se no limite de 100.000 interações.

- O método de regressão implementado para a construção dos modelos foi o de RLM, com o número máximo de duas variáveis.

Com a determinação das combinações de variáveis mais promissoras, construíram-se modelos, os quais foram avaliados para verificar se a sua especificação adapta-se convenientemente aos dados observados. Essa avaliação foi dividida em três partes:

(a) *Avaliação do grau de ajuste*: é feita através do cálculo do coeficiente de correlação  $r$  e do desvio-padrão  $s$  para cada modelo, além da análise dos resíduos, calculado a partir da diferença de  $Y$  observado experimentalmente e  $Y$  previsto pelo modelo. O que se espera de um modelo em relação ao grau de ajuste é que ele apresente  $r$  o mais próximo possível de 1 (ou -1, no caso de uma regressão inversa), que o valor de  $s$  seja o mais próximo possível de zero e que os resíduos apresentem distribuição normal em torno de zero. Também relacionado ao grau de ajuste do modelo, tem-se o quadrado do coeficiente de correlação  $r^2$ , o qual corresponde à fração da variabilidade total que é explicada pelo modelo. Por exemplo, um modelo de QSAR em que  $r^2 = 0,9$  é dito capaz de explicar 90% da variabilidade total dos valores observados da atividade biológica, em torno de sua média (Gaudio & Zandonade, 2001).

(b) *Avaliação do grau de significância*: é medido através da execução de testes de validação (teste estatístico de hipótese). Para testar a significância estatística do  $r^2$ , aplica-se um teste de hipótese conhecido como teste F. Esse verifica o quanto da variabilidade da atividade observada experimentalmente,  $Y_{exp}$ , pode ser explicada pelas variáveis  $X_1$  e  $X_2$ .

Para validar  $r^2$  através do teste F, é preciso comparar o valor de F obtido no modelo com o valor de referência. Esse, em geral, se refere ao nível de confiança de 95% e pode ser obtido em tabelas apropriadas (Francisco, 1993; Gaudio & Zandonade, 2001).

(c) *Avaliação do grau de previsibilidade*: é testado através da validação cruzada. Um modelo, com elevado grau de previsibilidade, para objetos não incluídos no mesmo, apresentará  $q^2$  (quadrado do coeficiente de correlação da validação cruzada) próximo de 1 e SPRESS (desvio padrão da validação cruzada) próximo de zero. Muitos autores consideram valores acima de 0,5 para o  $q^2$  como um bom indicador, ou mesmo a prova final de que o modelo é altamente preditivo (Cramer *et al.*, 1988; Cruciani *et al.*, 1990; Baroni *et al.*, 1992; Cruciani *et al.*, 1992; Gaudio & Zandonade, 2001).

### 3.5 VALIDAÇÃO DO MODELO

As funções de ajuste RQK implementadas como *QUICK Rule* (Todeschini *et al.*, 2004), já citadas anteriormente, foram utilizadas para validar o modelo de QSAR. Considerando válido o modelo que obedece simultaneamente seus cinco critérios. Além destes são utilizados critérios adicionais, tais como:

#### *Bootstrap*

Uma vez escolhido o modelo, segue-se uma validação pelo método *bootstrap* onde o conjunto de dados é dividido radomicamente em conjunto de treinamento e teste, onde se obtém o valor  $Q^2_{boot}$  que é então comparado ao valor real  $Q^2_{LOO}$ , esperando-se proximidade entre os dois valores. Esta avaliação é feita com o programa MobyDigs que realiza 5000 ciclos pelo processo randômico (Wehrens *et al.*, 2000; Cramer, 2011).

#### *Y-randomization*

Outro teste realizado é chamado *Y-randomization* onde a variável dependente Y (atividade biológica) é randomicamente redistribuída no conjunto mantendo inalterada a posição dos descritores. Esse tipo de validação avalia se o modelo foi obtido casualmente, ou seja, se existem outros modelos cujos valores dos coeficientes de determinação  $R^2$  e a capacidade preditiva  $Q^2_{LOO}$  estão próximos aos valores do modelo original. Se este for o caso, pode-se afirmar que o modelo original é casual. Para esta avaliação o programa MobyDigs (Talet, 2009) se utiliza de valores do *intercept*  $a(R^2)$  e  $a(Q^2)$ , respectivamente das equações de regressão  $R^2_{yrand} = a_R + b_{Rr}$  e  $Q^2_{yrand} = a_Q + b_{Qr}$ . Segundo Eriksson *et al.* (2003), se forem atendidos os valores  $a(R^2) < 0,3$  e  $a(Q^2) < 0,05$  o modelo de QSAR pode ser considerado robusto. Este estudo se utiliza de dez ciclos com 300 randomizações por ciclo para a validação, perfazendo 3000 randomizações (Cramer, 2011).

### *Leave-one-out (LOO-CV) e Leave-N-out (LNO-CV) – Validação Cruzada*

A validação cruzada é um método para se avaliar a acurácia de um modelo de regressão ou classificação. Todo o conjunto de dados será utilizado em teste e treinamento, mas não ao mesmo tempo. Um conjunto de dados é dividido em uma série de conjuntos de teste e treinamento. Um modelo é construído com cada um dos conjuntos de treinamento validado com o conjunto de teste. O método LOO-CV elimina uma amostra de conjunto com M amostras, gerando n conjuntos de treinamento com M-1 amostras e realiza a predição para cada uma das amostras excluídas. A prática tem demonstrado que este processo sozinho não assegura a robustez do modelo na validação interna, o que é obtido pelo método LNO-CV, onde se eliminam n amostras por vez. Num conjunto com poucas amostras, recomenda-se fixar n entre 20% - 30% do total. A robustez do modelo é atestada se ocorrer diferença entre  $Q^2 - Q^2_{LNO} < 0,1$  (Myatt, 2007; Cramer, 2011).

Em estudos QSAR o valor mínimo aceitável de  $Q^2$  é maior que 0,5 sendo 0,9 considerado excelente.  $R^2$  em geral deve ser maior que 0,6. A diferença entre  $R^2 - Q^2$  maior que 0,2 - 0,3 indica termos irrelevantes no modelo, sobre-ajuste (*overfitting*) ou presença de alguns *outliers* (Eriksson *et al.*, 2003; Cramer, 2011).

### Domínio de Aplicabilidade – *Outliers – Leverage*

O domínio de aplicabilidade (*Applicability Domain - AD*), como já foi mencionado neste trabalho (secção 1.4.3.5), de um modelo de QSAR é definido como a informação, o conhecimento ou espaço físico-químico, estrutural, ou biológico, utilizado para desenvolver o conjunto de treinamento, que deve ser aplicável em predições para novos compostos. A forma ideal é utilizar o modelo de QSAR somente para predições dentro do domínio por interpolação e não por extrapolação (Jaworska *et al.*, 2005).

A representação gráfica conhecida por *Williams plot* implementada no programa MobyDigs é utilizada para avaliar *outliers* e *leverage*, ambos parâmetros associados ao domínio de aplicabilidade. *Outliers* e *leverage* são indicadores de compostos situados fora do domínio e estão acima do limite crítico dado por três vezes o desvio padrão ( $\pm 3\sigma$ ). Um composto assim classificado precisa ter sua manutenção ou eliminação do conjunto de treinamento, justificada (Talete, 2009; Cramer, 2011).

### Validação Externa

A validação externa é feita neste estudo pelo método sugerido por Golbraikh e Tropsha. O método se aplica apenas ao conjunto de compostos selecionados para validação externa (conjunto teste), com a recomendação que o conjunto tenha pelo menos cinco integrantes (Golbraikh & Tropsha, 2002).

As equações utilizadas para se fazer esta avaliação e os principais parâmetros propostos pelo método são dados a seguir:

1.)  $Q_{LOO}^2$  com validação cruzada de todos os compostos.

$$Q_{LOO}^2 = 1 - \frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum (y_i - \bar{y})^2} \quad (\text{Eq. 26.0})$$

onde  $y_i$  é o valor experimental,  $\hat{y}_i$  o valor predito, e  $\bar{y}$  o valor médio experimental.

2.) Cálculo dos coeficientes  $a, b$  e  $a', b'$  das retas de regressão do conjunto de teste com  $n$  integrantes. A linha de regressão será bissetriz do ângulo formado pelas direções positivas dos eixos ortogonais  $\tilde{y}$  e  $y$  que são as atividades preditas e calculadas, respectivamente, e podem ser descritas pelas respectivas retas  $y' = a\tilde{y} + b$  e  $\tilde{y}' = a'y + b'$  onde

$$a = \frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)(\tilde{y}_i - \bar{\tilde{y}})}{\sum (\tilde{y}_i - \bar{\tilde{y}})^2}, \quad b = \bar{\tilde{y}} - a\bar{y} \quad (\text{Eq. 27.a})$$

$$a' = \frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)(\tilde{y}_i - \bar{\tilde{y}})}{\sum (y_i - \bar{y})^2}, \quad b' = \bar{y} - a'\bar{\tilde{y}} \quad (\text{Eq. 27.b})$$

onde  $\tilde{y}_i$  e  $y_i$  correspondem ao valor predito e observado, respectivamente.  $\bar{\tilde{y}}$  e  $\bar{y}$  são os valores médios preditos e observados, respectivamente.

3.) Coeficiente de correlação do conjunto de teste

$$R = \frac{\sum (y_i - \bar{y})(\tilde{y}_i - \bar{\tilde{y}})}{\sqrt{\sum (y_i - \bar{y})^2 \sum (\tilde{y}_i - \bar{\tilde{y}})^2}} \quad (\text{Eq. 28.a})$$

Em um modelo ideal,  $a, a'$  são iguais a 1, o *intercept*  $b, b'$  igual a zero, e o coeficiente de correlação para a regressão de  $\tilde{y}$  versus  $y$  é igual a 1. Um modelo de QSAR é considerado altamente preditivo se tiver valores próximos aos valores ideais. Isto pode implicar em que o coeficiente de correlação  $R$  entre o valor observado  $y$  e a atividade predita  $\tilde{y}$  devem estar próximos a 1 e as regressões de  $y$  contra  $\tilde{y}$  ou de  $\tilde{y}$  contra  $y$  através da origem deveriam ser caracterizadas pelo menos por  $k$  ou  $k'$  próximo a 1, isto é,  $y^0 = k\tilde{y}$  e  $\tilde{y}^0 = k'y$ . As inclinações  $k$  e  $k'$  as retas são dadas por

$$k = \frac{\sum y_i \tilde{y}_i}{\sum \tilde{y}_i^2}, \quad (\text{Eq. 28.b})$$

$$k' = \frac{\sum y_i \tilde{y}_i}{\sum y_i^2}, \quad (\text{Eq. 28.c})$$

4.) Coeficiente de correlação  $R_0^2$  e  $R_0'^2$

$$R_0^2 = 1 - \frac{\sum (\tilde{y}_i - y_i^{r0})^2}{\sum (\tilde{y}_i - \bar{\tilde{y}})^2}, \quad (\text{Eq. 29.a})$$

$$R_0'^2 = 1 - \frac{\sum (y_i - \tilde{y}_i^{r0})^2}{\sum (y_i - \bar{y})^2}, \quad (\text{Eq. 29.b})$$

onde  $y_i^{r0} = k\tilde{y}_i$  e  $\tilde{y}_i^{r0} = k'y_i$

Para que o modelo de QSAR seja qualificado como modelo preditivo é necessário que sejam atendidas as seguintes condições:

a) Pelo menos um dos coeficientes de correlação  $R_0^2$  ou  $R_0'^2$  (melhor seria ambos) deverá estar próximo a  $R^2$ . O coeficiente  $R_0^2$  mede a correlação  $Y_{\text{Observado}}$  VS.  $Y_{\text{Predito}}$ . O coeficiente  $R_0'^2$  mede a correlação  $Y_{\text{Predito}}$  VS.  $Y_{\text{Observado}}$ . Apesar de parecer redundante, Golbraikh e Tropsha mostram que os respectivos coeficientes de inclinação das retas  $k$  e  $k'$  e os coeficientes das retas  $(a, a')$  e  $(b, b')$  podem ser muito diferentes.

b) Pelo menos um dos valores de  $k$  ou  $k'$  deve estar próximo a 1. O intervalo de referência para aprovação segue:  $0,85 \leq k \leq 1,15$  ou  $0,85 \leq k' \leq 1,15$ .

c)  $[(R^2 - R_0^2) / R^2] < 0,3$  ou  $[(R^2 - R_0'^2) / R^2] < 0,3$

Estes critérios foram empregados em todos os estudos de caso deste estudo QSAR e os resultados são apresentados graficamente.



## 4. RESULTADOS

### 4.1 MODELO QSAR E DESCRITORES

O melhor modelo QSAR obtido com os 12 compostos usados como conjunto de treinamento contém dois descritores calculados pelo programa DRAGON (G3v e R2e), e é representado pela equação 30:

$$\log 1/IC90 = +21,74 (\pm 8,31) G3v + 17,26 (\pm 4,26) R2e - 37,42 (\pm 10,71)$$

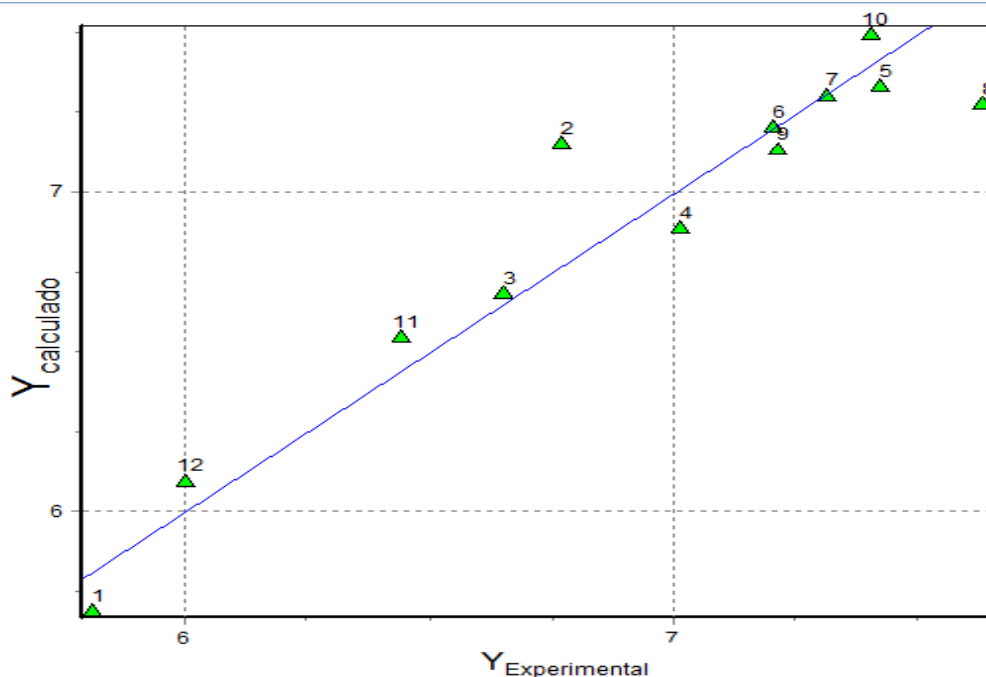
$n = 12$ ;  $r = 0,95$ ;  $s = 0,19$ ;  $F = 42,84$ ;  $p < 0,0001$ ;  $q^2 = 0,79$ ;  $q^2_{boot} = 0,72$ ;  $S_{PRESS} = 0,28$ ;  $SDEP = 0,24$ ;  $SDEC = 0,17$ ;  $K_{xx} = 43,93$ ;  $K_{xy} = 48,18$ ;  $\Delta K = 4,25$  **(Eq.30)**

Os parâmetros estatísticos da equação **30** são:  $n$  é o número de compostos incluídos no modelo;  $r$  é o coeficiente de correlação;  $s$  é o desvio-padrão;  $F$  é o parâmetro de significância de Fisher ou teste F (95% de confiança);  $p$  é o p-valor das probabilidades associadas aos valores de  $F$ ;  $q^2$  é o quadrado do coeficiente de correlação da validação cruzada;  $q^2_{boot}$  o quadrado do coeficiente de correlação da validação cruzada pelo método *bootstrap*;  $S_{PRESS}$  é o desvio-padrão da validação cruzada;  $SDEP$  é o desvio padrão do erro de predição;  $SDEC$  desvio padrão do erro de cálculo, enquanto  $K_{xx}$  é a correlação total do modelo predito ( $x$ ) e  $K_{xy}$  correlação total do conjunto dado pelo modelo predito  $X$  além da resposta  $Y$ .  $\Delta K$  é a diferença entre  $K_{xy}$  e  $K_{xx}$ .

O modelo de regressão representado pela equação 30 é capaz de explicar cerca de 90,25% da variabilidade dos valores observados da atividade ( $r^2 \times 100$ ). Com nível de ajuste excelente, comprovado pelo baixo valor do desvio-padrão ( $s = 0,19$ ).

O coeficiente de correlação, entre os dois descritores G3v/R2e é 0,193, inferior a 0,3. O coeficiente de correlação ( $r$ ) entre o valor de  $Y$  e de um descritor da equação 30 é de 0,85 para o descritor R2e e para G3v não foi encontrado, pois está abaixo dos valores de correlação estabelecidos pelo software DRAGON.

Os índices de confiabilidade são bons e há uma boa correlação (~90%) entre os valores da atividade biológica calculada ( $Y_{cal}$ ) e experimental ( $Y_{exp}$ ), como mostra o gráfico da **Figura 23**. Onde é importante observar o alinhamento dos pontos em relação à reta ajustada, bem como a distribuição deles ao longo do intervalo de atividade estudado. Os compostos **AAQM\_101**, **AAQM\_102** e **AAQM\_108** apresentam-se mais distantes da reta



**Figura 23.** Gráfico da atividade biológica experimental ( $Y_{exp}$ ) em função da atividade calculada ( $Y_{cal}$ ). ajustada, ou seja, fora da área do gráfico onde existe 95% de probabilidade de passar a verdadeira reta de  $Y_{exp}$ . em função de  $Y_{cal}$ . Entretanto, os outros sete compostos restantes encontram-se bem próximos a ela.

A **Tabela 6** mostra os valores numéricos para os descritores G3v e R2e bem como a atividade observada, a atividade prevista e os resíduos de cada composto. Pode-se verificar que os resíduos estão aleatoriamente em torno de zero.

**Tabela 6.** Valores da atividade biológica observada, prevista, dos resíduos e os valores de G3v e R2 de cada alquilamino quinolina metanol (AAQM).

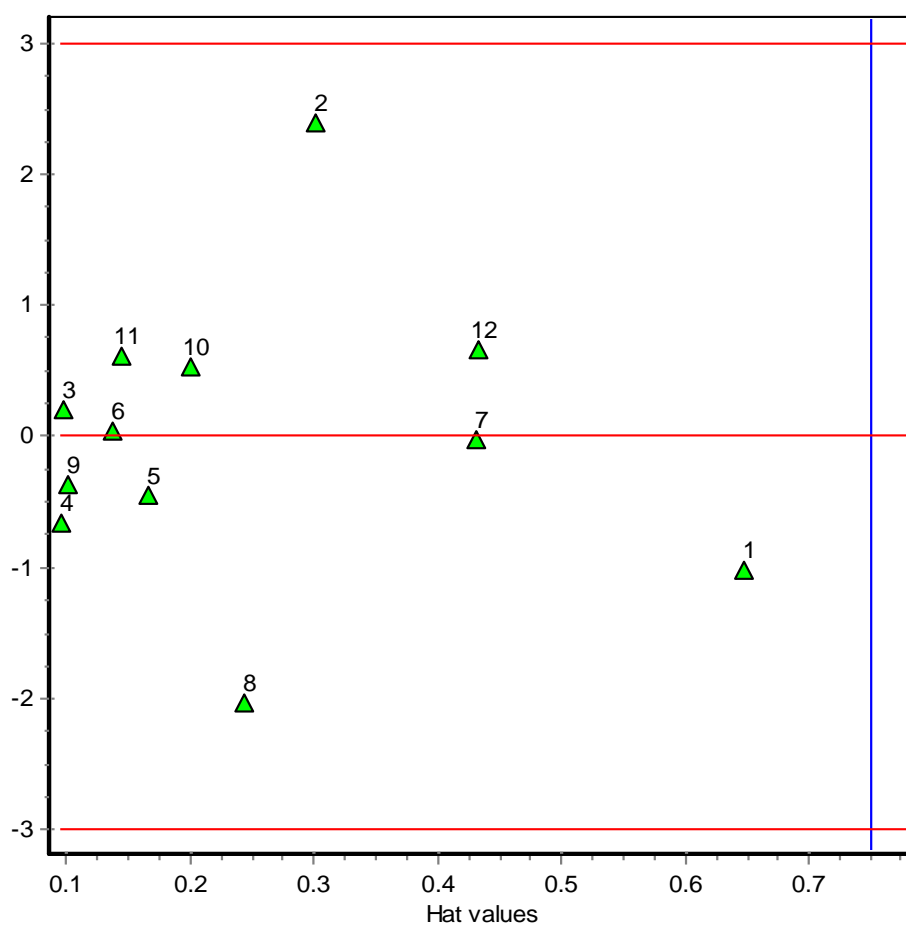
Compostos	Atividade observada	Atividade Prevista	Resíduos	G3v	R2e
AAQM_1	5,811	5,690	0,121	0,200	2,245
AAQM_2	6,765	7,161	-0,396	0,216	2,310
AAQM_3	6,649	6,685	-0,036	0,187	2,319
AAQM_4	7,011	6,888	0,123	0,182	2,337
AAQM_5	7,417	7,337	0,080	0,182	2,363
AAQM_6	7,202	7,210	-0,008	0,200	2,333
AAQM_7	7,310	7,307	0,003	0,160	2,389
AAQM_8	7,625	7,276	0,349	0,211	2,323
AAQM_9	7,208	7,139	0,069	0,188	2,344
AAQM_10	7,404	7,499	-0,095	0,199	2,351
AAQM_11	6,443	6,554	-0,111	0,177	2,324
AAQM_12	5,999	6,098	-0,099	0,160	2,319

A avaliação do ajuste do modelo também pode ser acompanhada pela **Tabela 7** que apresenta os dados da análise da variância.

**Tabela 7.** Tabela ANOVA para o modelo de regressão linear múltipla representado pela Eq. 30.

Fonte de Variação	Nº de liberdade	Graus	Soma dos Quadrados	Média da Soma dos quadrados	F <sub>0</sub>	Probabilidade P
Modelo	2		484,901	242,451	62,02	0,001
Resíduo	9		0,352	0,039		
Total	12		485,253	40,438		

O Diagrama de Williams (**Figura 24**) construído através do programa MobyDigs para avaliar o domínio de aplicabilidade do conjunto de treinamento contém as previsões do conjunto, onde se constata que nenhum dos compostos encontra-se fora do intervalo  $3\sigma$ , representando o peso da influência do domínio de aplicabilidade de cada composto no modelo.



**Figura 24.** Diagrama de Williams – Domínio de Aplicabilidade do conjunto de treinamento.

A validação do modelo QSAR da equação 30 é expressa, respectivamente, através das funções RQK de ajuste (RQK *Fitness Functions*) implementadas como QUICK Rule do programa MobyDigs (**Tabela 8**):

**Tabela 8.** Validação do QSAR (n = 12) pelos parâmetros RQK.

Critérios de Aprovação (*)				
1. Colinearidade entre variáveis	$K_{xy}$	$K_x$	$K_{xy} - K_x$	DK
$K_{xy} - K_x > DK$	48,18	43,93	4,25	0,042
2. Capacidade de Predição				
$Q^2_{LOO} > Q^0$ (Referência $Q^0 > 0,5$ )	0,79	>0,5		
3. Capacidade de predição do modelo	$Q^2_{LOO}$	$Q^2_{ASYM}$	$Q^2_{LOO} - Q^2_{ASYM}$	DQ
$Q^2_{LOO} - Q^2_{ASYM} > DQ$	0,79	-0,85	1,64	-0,033
4. Redundância nas variáveis	$R^P$	$t^P$		
$R^P > t^P$	0,447	0,1		
5. Sobre-ajuste (overfitting)	$R^N$	$t^N$		
$R^N > t^N$	-0,275	-0,39		

(\*) Caso contrário rejeitar modelo. Critérios devem ser atendidos simultaneamente.

Todos os critérios foram atendidos simultaneamente, dessa forma o modelo é considerado válido.

A validação externa descartou os compostos **AAQM\_4**, **AAQM\_7** e **AAQM\_11**, selecionando-os de forma aleatória de acordo com os valores de sua atividade biológica (**LOG 1/IC90**), resultando em um modelo QSAR melhorado com apenas 9 compostos (conjunto teste), equação 31:

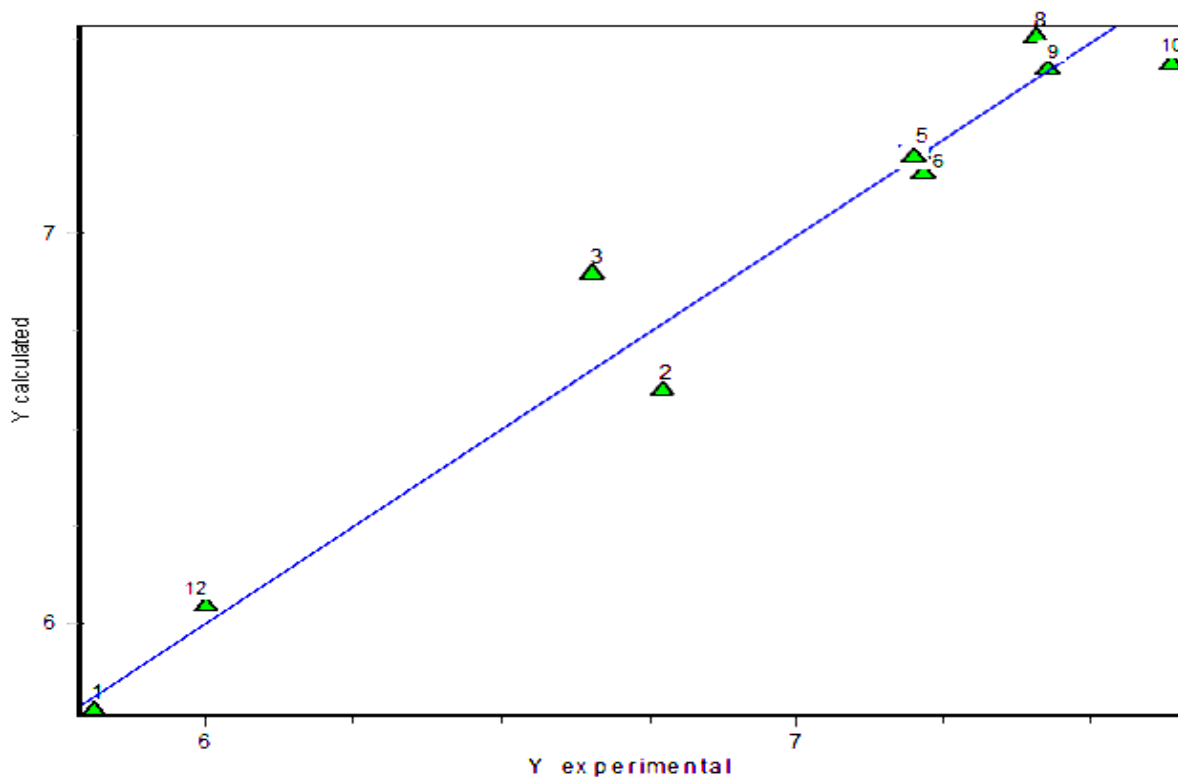
$$\log 1/IC90 = -0,29 (\pm 0,06) UNIP - 518,10 (\pm 109,59) VEE2 + 131,47 (\pm 26,52)$$

$$n = 9; r = 0,97; s = 0,15; F = 66,21; p < 0,0001; q^2 = 0,92; q^2_{boot} = 0,87; S_{PRESS} = 0,20; SDEP = 0,16; SDEC = 0,12; K_{xx} = 99,20; K_{xy} = 57,02; \Delta K = -0,42 \quad \text{(Eq. 31)}$$

Os parâmetros estatísticos são os mesmos da equação 30. O modelo de regressão representado pela equação 31 é capaz de explicar cerca de 94,09% da variabilidade dos valores observados da atividade ( $r^2 \times 100$ ). Com nível de ajuste excelente, comprovado pelo baixo valor do desvio-padrão ( $s = 0,15$ ).

O gráfico de  $Y_{exp}$  em função de  $Y_{cal}$  (**Figura 25**) mostra que os 9 compostos estudados estão mais próximos da área do gráfico onde existe 95% de probabilidade de passar a reta ajustada do gráfico  $Y_{exp}$  em função  $Y_{cal}$ , e os pontos estão dispostos aleatoriamente ao longo da reta ajustada.

A **tabela 9** mostra os valores da atividade biológica observada, da atividade biológica prevista, resíduos e de UNIP e VEE2, de cada composto. Onde se verifica que os resíduos estão mais próximos de zero, o que indica um melhor grau de ajuste para a equação.



**Figura 25.** Gráfico da atividade biológica experimental ( $Y_{exp}$ ) em função da atividade calculada ( $Y_{cal}$ ) da validação externa.

**Tabela 9.** Valores da atividade biológica observada, prevista e dos resíduos, e de UNIP e VEE2 de cada alquil amino quinolina metanol (AAQM) da validação externa.

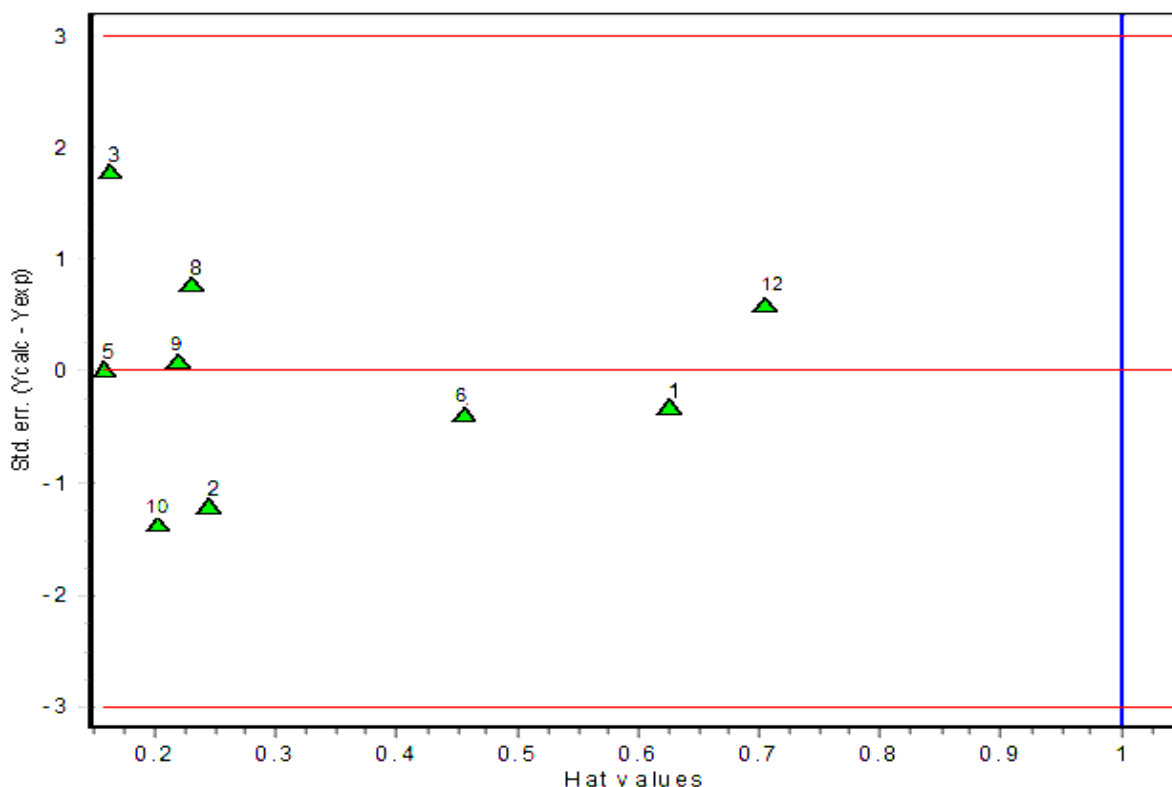
Compostos	Atividade observada	Atividade Prevista	Resíduos	UNIP	VEE2
<b>Nove compostos de treinamento.</b>					
AAQM_1	5,811	5,781	0,030	59	0,209
AAQM_2	6,765	6,602	0,163	65	0,204
AAQM_3	6,649	6,904	-0,255	71	0,200
AAQM_5	7,417	7,429	-0,012	78	0,195
AAQM_6	7,202	7,206	-0,004	77	0,196
AAQM_8	7,625	7,437	0,188	85	0,191
AAQM_9	7,208	7,164	0,044	107	0,179
AAQM_10	7,404	7,509	-0,105	83	0,192
AAQM_12	5,999			102	0,184
		6,048	-0,049		
<b>Três compostos de validação externa.</b>					
AAQM_4	7,011	8,098	-1,087	81	0,192
AAQM_7	7,310	8,184	-0,874	93	0,185
AAQM_11	6,443	7,803	-1,36	82	0,192

A avaliação do ajuste do modelo da validação externa também pode ser acompanhada pela **Tabela 10** que apresenta os dados da análise da variância.

**Tabela 10.** Tabela ANOVA para o modelo de regressão linear múltipla representado pela Eq. 31.

Fonte de Variação	Nº de liberdade	Graus	Soma dos Quadrados	Média da Soma dos quadrados	F <sub>0</sub>	Probabilidade P
Modelo	2		361,542	180,771	75,55	0,001
Resíduo	6		0,144	0,024		
Total	9		361,686	40,187		

No Diagrama de Williams para os compostos teste (**Figura 26**) estão representadas as predições do conjunto de treinamento onde se constata que nenhum dos compostos encontra-se fora do intervalo  $3\sigma$ , com o peso da influência do domínio de aplicabilidade de cada composto.



**Figura 26.** Diagrama de Williams – Domínio de Aplicabilidade do conjunto teste.

Este novo modelo também foi validado através das funções RQK de ajuste (RQK *Fitness Functions*) implementadas como QUICK Rule do programa MobyDigs. Ele também segue todos os critérios simultaneamente, sendo considerado válido (**Tabela 11**).

**Tabela 11.** Validação do QSAR (n = 9) pelos parâmetros RQK.

Critérios de Aprovação (*)				
1. Colinearidade entre variáveis	$K_{xy}$	$K_x$	$K_{xy} - K_x$	DK
$K_{xy} - K_x > DK$	57,02	99,20	-42,18	-0,42
2. Capacidade de Predição				
$Q^2_{LOO} > Q^0$ (Referência $Q^0 > 0,5$ )	0,92	>0,5		
3. Capacidade de predição do modelo	$Q^2_{LOO}$	$Q^2_{ASYM}$	$Q^2_{LOO} - Q^2_{ASYM}$	DQ
$Q^2_{LOO} - Q^2_{ASYM} > DQ$	0,92	0,67	0,25	0,021
4. Redundância nas variáveis	$R^P$	$t^P$		
$R^P > t^P$	0,100	0,01		
5. Sobre-ajuste (overfitting)	$R^N$	$t^N$		
$R^N > t^N$	-0,40	-0,39		

(\*) Caso contrário rejeitar modelo. Critérios devem ser atendidos simultaneamente.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 MODELO QSAR E DESCRITORES

O melhor modelo QSAR obtido correlaciona a atividade antimalárica dos 12 compostos alquilamino quinolina metanol (AAQM) com dois descritores (G3v e R2e), segundo a equação 30, citada novamente abaixo:

$$\log 1/IC_{90} = +21,74 (\pm 8,31) G3v + 17,26 (\pm 4,26) R2e - 37,42 (\pm 10,71)$$

$n = 12$ ;  $r = 0,95$ ;  $s = 0,19$ ;  $F = 42,84$ ;  $p < 0,0001$ ;  $q^2 = 0,79$ ;  $q^2_{boot} = 0,72$ ;  $S_{PRESS} = 0,28$ ;  $SDEP = 0,24$ ;  $SDEC = 0,17$ ;  $K_{xx} = 43,93$ ;  $K_{xy} = 48,18$ ;  $\Delta K = 4,25$  **(Eq.30)**

Segundo Gaudio e Zandonade (2001) este modelo pode ser avaliado por seu grau de ajuste, de significância e de previsibilidade. Em relação ao grau de ajuste de um modelo QSAR o que se espera é que ele apresente coeficiente de correlação ( $r$ ) o mais próximo possível de 1 (ou -1, no caso de uma regressão inversa), que o valor de desvio-padrão ( $s$ ) seja o mais próximo possível de zero e que os resíduos apresentem distribuição normal em torno de zero.

O modelo representado pela equação 30 apresenta  $r = 0,95$  bem próximo a 1,  $s = 0,19$  próximo a 0 e os resíduos (**Tabela 6**) todos em torno de zero, apresentando então um excelente grau de ajuste.

O grau de significância é medido através da execução de testes de validação (teste estatístico de hipótese ou teste F), que verifica o quanto da variabilidade dos valores observados da atividade ( $Y$ ) pode ser explicado pelas variáveis  $X_1$  e  $X_2$ , aqui neste caso, por G3v e R2e. Para um nível de confiança de 95%, o valor de referência é  $F_{[K,n-1]} = F_{[2,12]} = 62,02$  (**Tabela 7**). Como o teste F da equação 30 ( $F = 42,84$ ), é menor do que  $F_{[2,9]}$ , então o valor de  $r^2$  não é significativo, grau de significância razoável.

O grau de previsibilidade do modelo requer que o valor do coeficiente de correlação da validação cruzada ( $q^2$ ) esteja próximo de 1 e o desvio padrão da validação cruzada ( $S_{PRESS}$ ) próximo de zero. O  $q^2$  da equação 30 é 0,79 e  $S_{PRESS} = 0,28$ . Para Golbraikh e Tropsha (2002) valores acima de 0,5 para o  $q^2$  é um bom indicador, ou mesmo a prova final de que o modelo é altamente preditivo.



Como ambos os descritores (G3v e R2e) aparecem com sinal positivo na equação; isto significa, que a cada acréscimo nos seus valores aumenta a probabilidade de que a molécula seja ativa.

O descritor G3v do modelo corresponde ao símbolo da terceira componente do índice de simetria direcional WHIM/ponderado pelo volume atômico de Van der Waals. Os descritores WHIM (*Weighted Holistic Invariant Molecular descriptors*) são descritores geométricos baseados em índices estatísticos calculados com as projeções dos átomos ao longo dos eixos principais, ou seja, na decomposição da matriz de covariância em eixos de componentes principais. A matriz de covariância é calculada a partir das coordenadas geométricas da molécula e, pode ou não, ser ponderada por diferentes fatores como massa atômica, polarizabilidade atômica, volume de Van der Waals, eletronegatividade atômica e estado eletrotológico atômico. Eles são construídos de forma a captar informações relevantes da molécula em 3D em relação ao tamanho molecular, forma, simetria e distribuição do átomo no que diz respeito à estrutura invariante de referência (Consonni & Todeschini, 2000).

O R2e pertence à categoria GETAWAY (*Geometry, Topology and Atom-Weights Assembly*) que codifica informações estruturais e estereoquímicas. A representação estrutural da molécula é definida pela matriz de influência molecular (MIM) denotada por H na equação 31. Onde M é a matriz molecular e o sobrescrito T se refere à matriz transposta. O R2e pertence à classe R-GETAWAY e é calculado segundo a equação 32. Onde R2e representa uma autocorrelação codificada no segundo intervalo pela eletronegatividade atômica de Sanderson da molécula (autocorrelation of lag 2 / weighted by atomic Sanderson electronegativities). N é o número de átomos na molécula,  $d_{ij}$  é a distância topológica entre os átomos i e j,  $r_{ij}$  é a distância geométrica entre os átomos i e j, e  $\delta(K;d_{ij})$  é a função delta de Dirac.  $h_{ii}$  e  $h_{jj}$  são os elementos diagonais da matriz da influência (MIM), codificando informações atômicas e representando a influência de cada átomo na molécula na determinação de sua forma geométrica (Consonni & Todeschini, 2000).

$$H = M \cdot (M^T \cdot M)^{-1} \cdot M^T \quad (\text{Eq. 32})$$

$$Rkw = \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j>i}^N \frac{\sqrt{h_{ii} h_{jj}}}{r_{ij}} w_i w_j \delta(k; d_{ij}) \quad (\text{Eq. 33})$$

$$K = 1, 2, \dots$$

Através das funções RQK de ajuste (RQK “*Fitness Functions*”) implementadas como “QUICK Rule” o modelo QSAR da equação 30 foi validado (**Tabela 8**). Ele seguiu

simultaneamente todos os cinco critérios propostos pela validação: baixa colinearidade, boa capacidade de predição, sem redundância nas variáveis explanatórias e sem sobreajuste.

Para previsão da atividade biológica de um ou mais compostos cuja atividade é desconhecida à validação externa foi realizada. Os três compostos de validação externa estão listados nas últimas três linhas da **Tabela 9**. Um novo modelo QSAR foi gerado com apenas 9 compostos (eq. **31**, também citada abaixo), que também segue os mesmos critérios de avaliação do primeiro modelo com doze compostos, eq. **30**.

No procedimento Golbraikh-Tropsha (2002) para validação externa é sugerido que o conjunto de teste não participe do conjunto de treinamento. Este aspecto não é obedecido no presente estudo. A experiência acumulada com diversos modelos de QSAR mostra que mesmo treinando os compostos de teste a validação pode não ser obtida.

$$\log 1/IC_{90} = -0,29 (\pm 0,06) UNIP - 518,10 (\pm 109,59) VEE_2 + 131,47 (\pm 26,52)$$

$$n = 9; r = 0,97; s = 0,15; F = 66,21; p < 0,0001; q^2 = 0,92; q^2_{boot} = 0,87; S_{PRESS} = 0,20; SDEP = 0,16; SDEC = 0,12; K_{xx} = 57,02; K_{xy} = 99,20; \Delta K = 0,42 \quad \text{(Eq. 31)}$$

O grau de ajuste dele foi excelente também. Com  $r = 0,97$  bem próximo a 1,  $s = 0,15$  mais próximo a 0 e os resíduos (**Tabela 9**) todos em torno de zero.

O grau de significância para um nível de confiança de 95%, o valor de referência é  $F_{[K,n-1]} = F_{[2,9]} = 75,55$  (**Tabela 10**). Como o teste F da equação 31 ( $F = 66,21$ ), é menor do que  $F_{[2,9]}$ , então o valor de  $r^2$  não é significativo, grau de significância razoável.

O grau de previsibilidade  $q^2$  da equação 31 é 0,92 e  $S_{PRESS} = 0,20$ . Um bom indicador para um modelo altamente preditivo.

Como ambos os descritores (UNIP e VEE<sub>2</sub>) aparecem com sinal negativo na equação 31. Isto significa que a cada decréscimo nos seus valores aumenta a probabilidade de que a molécula seja ativa.

O descritor UNIP é um índice topológico que representa a unipolaridade da molécula. Este tipo de descritor caracteriza a distribuição de cargas das moléculas a partir da matriz de adjacência e o inverso quadrático da matriz de distâncias entre vértices.

O VEE<sub>2</sub> é um descritor topológico que representa a soma do coeficiente médio do autovetor de eletronegatividade da distância ponderada da matriz.

As funções RQK de ajuste (RQK “*Fitness Functions*”) implementadas como “QUICK Rule” também foram usadas para validar este modelo (**Tabela 11**), o qual não seguiu simultaneamente todos os cinco critérios propostos pela validação: alta colinearidade, boa capacidade de predição, sem redundância nas variáveis explanatórias e com sobreajuste, modelo inválido.

## 6. CONCLUSÃO

O primeiro modelo de QSAR foi obtido usando regressão linear múltipla (MLR), tendo como descritores, G3v - símbolo da terceira componente do índice de simetria direcional WHIM/ponderado pelo volume atômico de Van der Waals, à categoria GETAWAY (*Geometry, Topology and Atom-Weights Assembly*) que codifica informações estruturais e estereoquímicas; e R2e - representa uma autocorrelação codificada no segundo intervalo pela eletronegatividade atômica de Sanderson da molécula (autocorrelation of lag 2 / weighted by atomic Sanderson electronegativities). O que resultou em  $r^2 = 0,90$ ,  $q^2 = 0,79$  e  $q^2_{boot} = 0,72$ . A validação feita com funções de aptidão RQK mostrou que este modelo QSAR satisfaz a todos os critérios requeridos para validação, indicando que o modelo de regressão é aceitável.

O segundo modelo de QSAR obtido teve como descritores, UNIP - representa a unipolaridade da molécula; e VEE2 - é um descritor topológico que indica a soma do coeficiente médio do autovetor de eletronegatividade da distância ponderada da matriz de autocorrelação. Com  $r^2 = 0,94$ ,  $q^2 = 0,92$  e  $q^2_{boot} = 0,87$ . Avaliado também pelas funções RQK de ajuste ele não é considerado válido, devido ter alta colinearidade e sobre-ajuste, que pode ser atribuído ao fato do número de compostos de treinamento ser pequeno, apenas 9 compostos. Dessa forma os descritores UNIP e R2e não exercem tanta influência na atividade das alquilamino quinolinas metanol estudadas.

Apesar de não poder ser dada uma interpretabilidade do QSAR no sentido de propor uma hipótese do mecanismo de interação ligante-receptor, considerando inclusive que o receptor é desconhecido, os descritores do modelo da equação 30 mostram o aumento da atividade antimalárica de acordo com o aumento dos valores de G3v e de R2e, ou seja, quanto maior o volume atômico, a simetria e a eletronegatividade da molécula maior a atividade antimalárica.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, N.B.; SARASWAT, D.; KAUSHIK, M.P. Pharmacophore based discovery of potential antimalarial agent targeting haem detoxification pathway. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 43, n.12, p. 2840-2852. 2008.

AGUIAR, A. C. C. Avaliação da atividade citotóxica e antimalárica de análogos da cloroquina. Dissertação – Farmacologia Bioquímica e Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 61 f., 2011.

ALBUQUERQUE, C. A. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de sistemas nanoscópicos bioativos. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia, Universidade Federal de Itajubá, Minas Gerais, 133 f., 2008.

ALECRIM, M.G.C. *Estudo da resistência do P. falciparum às drogas antimaláricas in vivo e in vitro na Amazônia*. 121p. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, DF, 1981.

ALECRIM, M.G.C. Resistance to *in vivo* and *in vitro* chemotherapies in the Brazilian Amazon. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 81(Supl II): 153-57, 1986.

ALIN, M. H.; BJORKMAN, A. Concentration and time dependency of artemisinin efficacy against *Plasmodium falciparum in vitro*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 50(6): 771-76, 1997.

ANDRADE, B. B.; REIS-FILHO, A.; BARROS, A. M.; SOUZA-NETO, S. M.; NOGUEIRA, L. L.; FUKUTANI, K. F. Towards a precise test for malaria diagnosis in the Brazilian Amazon: comparison among field microscopy, a rapid diagnostic test, nested PCR, and a computational expert system based on artificial neural networks. **Malar. J.**, 9:117, 2010.

ASAWAMAHASAKDA, W.; ITTARAT, S.; CHANG, C. C.; MCELROY, P.; MESHNICK, S. R. Effects of antimalarials and proteinase inhibitors on plasmodial haemozoin production. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 67: 183–191, 1994.

BAJORATH, J. **Chemoinformatics Concepts, Methods, and Tools for Drug Discovery**. Humana Press Totowa, New Jersey, 2004.

BARNETT, G.; TRSIC, M.; WILLETTE, R. E. **QuaSAR Quantitative Structure Activity Relationships of Analgesics, Narcotic Antagonists, and Hallucinogens**. NIDA Research Monograph 22, 1978.

BARONI, M.; CLEMENTI, S.; CRUCIANI, G.; CONSTANTINO, G.; RIGANELLI, D.; OBERRAUCH, E. **J. Chemom.**, 6, 347, 1992.

BARREIRO, E. L. A Química Medicinal e o paradigma do composto-protótipo. **Rev. Virtual Quím.**, v. 01, n. 01, p. 26-34, 2009.

BARREIRO, E. L. Sobre a química dos remédios, dos fármacos e dos medicamentos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 03, p. 04-09, 2001.

BLOLAND, P.B. Drug resistance in malaria. *In: WHO/CDS/CSR/DRS.4*, WHO, Geneva, p. 1–27. 2001.

BOARETO, A. C. Efeitos da Artemisinina (*Artemisia annua L.*) na gestação de ratas wistar. Dissertação – Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 114 f., 2007.

BONCHEV, D. Overall Connectivities/Topological Complexities: A New Powerful Tool for QSPR/QSAR. **J. Chem. Inf. Comput. Sci.**, 40: 934-941, 2000.

BORGES, R.S. Planejamento, síntese e avaliação antioxidante de inibidores fenólicos da PGES. Derivados da associação p-aminofenol e Salicilatos. 2007. 140f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)- Universidade Federal do Pará, Belém. 2007.

BRAGA, E. M.; FONTES, C. J. F. *Plasmodium*-malária. In: NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 10 ed., São Paulo: Atheneu, p. 128-146, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 7 ed. Brasília - DF, 2009.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária**. Secretaria de Vigilância em Saúde . 2 ed. Brasília – DF, 2009.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília – DF, 2005.

\_\_\_\_\_. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE FUNASA/ GERÊNCIA TÉCNICA DE MALÁRIA. **Avaliação epidemiológica de malária, segundo o local de diagnóstico. Brasil 1998 e 1999**, 2000.

BRAY, P.G.; HOWELLS, R.E.; RITCHIE, G.Y.; WARD, S.A. Rapid chloroquine efflux phenotype in both chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. A correlation of chloroquine sensitivity with energy-dependent drug accumulation. **Biochem Pharmacol.** n.44, p.1317-24. 1992.

BROCKS, D.; MEHVAR, R. Stereoselectivity in the pharmacodynamics and pharmacokinetics of the chiral antimalarial drugs. **Clin. Pharmacokinet**, New York, v. 42, n. 15, p. 1359-82, 2003.

BUSTAMANTE, F. M. Estado atual da malária. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 10: 75-100, 1958.

CALVOSA, V. S. P.; ADAGU, I. S.; PÓVOA, M. M. *Plasmodium falciparum*: emerging *in vitro* mefloquina resistance in Para State North East Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 95: 330-31, 2001.

CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Life Cycle, 2006. Disponível em: [http://www.cdc.gov/malaria/biology/life\\_cycle.htm](http://www.cdc.gov/malaria/biology/life_cycle.htm). Acessado em: 12/12/2010.

CERUTTI, Jr.C. Avaliação *in vivo* e *in vitro* da sensibilidade do *P. falciparum* a quinino e mefloquina em área endêmica de malária na Amazônia brasileira (Peixoto de Azevedo, Estado do Mato Grosso). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 32 (2):203-04, 1999.

CHEVLI, R.; FITCH, C. D. The antimalarial drug mefloquine binds to membrane phospholipids. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 21: 581–586, 1982.

CHOU, A. C.; CHEVLI, R.; FITCH, C. D. Ferriprotoporphyrin IX fulfills the criteria for identification as the chloroquine receptor of malaria parasites. **Biochemistry**, 19: 1543–1549, 1980.

CHOU, A. C., FITCH, C. D. Control of heme polymerase by chloroquine and other quinoline derivatives. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 195: 422–427, 1993.

COATNEY, G. R.; COLLINS, W. E.; WARREN, M.; CONTACOS, P. G. The Primate Malaria. Bethesda: U. S. Department of Health, Education and Welfare, 1971.

CONSONNI, V.; TODESCHINI, R. Methods and Principles of Medicinal Chemistry. In: Mannhold, R., Kubibyi, H. e Timmerman, H. **Handbook of molecular descriptors**, Wiley-VCH publishers, 2000.

COUTO, A. A. Caracterização de cepas de *Plasmodium Falciparum* e Monitorização Longitudinal da Resistência a Drogas em Duas Áreas da Amazônia Brasileira. 114p. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Pará e do Museu Paraense Emílio Goeldi ,2001.

COUTO, A. A.; CALVOSA, V. S.; SANTOS, M. A.; SOUZA, J. M. Evolução temporal da resistência *in vitro* do *Plasmodium falciparum* às drogas antimaláricas em duas áreas da Amazônia brasileira com distintas características sócio-econômicas e geográficas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 28(4): 357-65, 1995.

COUTO, A. A.; CALVOSA, V. S.; SANTOS, M. A.; SOUZA, J. M. Resistência *in vitro* de cepas do *Plasmodium falciparum* isoladas no sul do Estado do Pará, em diferentes períodos: Emergência de casos de multiresistência. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 26(1): 5-9, 1993.

COX-SINGH, J.; HIU, J.; LUCAS, S. B.; DIVIS, P. C.; ZULKARNAEN, M.; CHANDRAN, P.; WONG, K. T.; ADEM, P.; ZAKI, S. R.; SINGH, B.; KRISHNA, S. Severe malaria - a case of fatal *Plasmodium knowlesi* infection with post-mortem findings: a case report. **Malar. J.**, 9:10, 2010.

COX-SINGH, J.; SINGH, B. *Knowlesi* malaria: newly emergent and of public health importance? **Trends Parasitol.**, 24:406-410, 2008.

CRAMER, B. Estudos de QSAR-2D aplicados a diterpenóides clerodanos e dibenzoilidrazinas. 316 f. Tese de Doutorado – Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2011.

CRAMER, R. D.; BUNCE, J. D.; PATTERSON, D. E.; FRANK, I. E. **Quant. Struct-Act. Relat.**, 7, 18, 1988.

CRUCIANI, G.; BARONI, M.; CLEMENTI, S.; CONSTANTINO, G.; RIGANELLI, D.; SKAGERBERG, B. **J. Chemom.**, 6, 335, 1992.

CRUCIANI, G.; BARONI, M.; BONELLI, D.; CLEMENTI, S.; EBERT, C.; SKAGERBERG, B. **Quant. Struct.-Act. Relat.**, 9, 101, 1990.

CRONIN, M. T. D.; SCHULTZ, T. W., Pitfalls in QSAR. **J. Mol. Struct. (Theochem)**, v. 622, p. 39-51, 2003.

CRUM-BROWN, A.; FRASER, T.R. On the connection between chemical constitution and physiological action. Part 1. On the physiological action of the ammonium bases, derived

from Strychia, Brucia, Thebaia, Codeia, Morphia and Nicotia. **Trans. Roy. Soc. Edinburgh**, v. 25, p. 151-203, 1868.

DELFINO, R. T.; SANTOS-FILHO, O. A.; FIGUEIROA-VILLAR, J. D. J. **Braz. Chem. Soc.**, 13, 727, 2002.

DESNEVES, J. G.; THORN, A.; BERMAN, D.; GALATIS, N.; LA GRECA, J.; SINDING, M.; FOLEY, L. W.; DEADY, A. F. Cowman, and L. Tilley. Photoaffinity labelling of mefloquine-binding proteins in human serum, uninfected erythrocytes and *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 82: 181–194, 1996.

DORN, A.; STOFFEL, R.; MATILE, H.; BUBENDORF, A.; RIDLEY, R.G. Malarial haemozoin/beta-haematin supports haem polymerization in the absence of protein. **Nature**, 374: 269-271, 1995.

DORN, A., VIPPAGUNTA, S.R., MATILE, H., JAQUET, C., VENNERTSTROM, J.L., RIDLEY, R.G. An assessment of drug-haematin binding as a mechanism for inhibition of haematin polymerisation by quinoline antimalarials. **Biochemical Pharmacology**, 55: 727–736, 1998.

DUTRA, A. P. Malária – Profissionais de saúde, 2001. Disponível em: < [http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/malaria/texto\\_malaria\\_pro.htm](http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/malaria/texto_malaria_pro.htm) >. Acesso em: 11/04/2010.

ECKMAN, J. R; EATON, J.W. Dependence of plasmodial glutathione metabolism on the host cell. **Nature**, 278:754-756, 1979.

EGAN, T. J. Hemozoin formation. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 157:127-136, 2007.

EGAN, T. J.; MARQUES, H .M. The role of haem in the activity of chloroquine and related antimalarial drugs. **Coordination Chemistry Revs**, 493: 190-192, 1999.

EGAN, T. J., ROSS, D. C., ADAMS, P. A., Quinoline anti-malarial drugs inhibit spontaneous formation of beta-haematin (malaria pigment). **Federation of European Biochemical Societies Letters**, 352 – 354, 1994.

ERIKSSON, L.; JAWORSKA, J.; WORTH, P. A.; CRONIN, M. T. D.; MACDOWELL, R. M.; GRAMATICA, P. Methods for Reliability and Uncertainty Assessment and for Applicability Evaluations of Classification – and Regression – Based QSARs. **Environmental Health Perspectives**, 111, 1361-1375, 2003.

FERRARONI, J.J.; HAYES, J. Drug resistant *falciparum* malaria among the Mayongong in the Brazilian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 18: 909-11, 1979.

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

FOLEY, M.; TILLEY, L. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance. **International Journal for Parasitology** , 27: 231–240, 1997.

FOOTE, S. J.; COWMAN, A. F. The mode of action and the mechanism of resistance to antimalarial drugs. **Acta. Trop.**, v. 56, n. 2, p. 157-171. 1994.

FOYE, W. O.; LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. **Principles of Medicinal Chemistry**, 4<sup>th</sup> ed., Williams & Wilkins: Philadelphia, 1995.

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

FRANCISCO, W. **Estatística básica**. 2nd ed. Campinas: Editora Unicamp; 1993.

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHELGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; MONTGOMERY, J. A., VREVEN, Jr. T.; KUDIN, K. N.; BURANT, J. C.; MILLAM, J. M.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; COSSI, M.; SCALMANI, G.; REGA, N.; PETERSSON, G. A.; NKATSUJI, H.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; KLENE, M.; LI, X.; KNOX, J. E.; HRATCHIAN, H. P.; CROSS, J. B.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; AYALA, P.Y.; MOROKUMA, K.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J.J.; ZAKRZEWSKI, V. G.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; STRAIN, M. C.; FARKAS, O.; MALICK, D. K.; RABUCK, A. D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CUI, Q.; BABOUL, A. G.; CLIFFORD, S.; CIOSLOWSKI, J.; STEFANOV, B. B.; LIU, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; MARTIN, R. L.; FOX, D. J.; KEITH, T.; AL-LAHAM, M. A.; PENG, C. Y.; NANAYAKKARA, A.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P. M. W.; JOHNSON, B.; CHEN, W.; WONG, M. W.; GONZALEZ, C.; POPLE, J. A. Gaussian 03, Revision B.05. Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2003.

FUJITA, T.; HANSCH, C.; IWASA, J. A. A New Substituent Constant,  $\pi$ , Derived from Partition Coefficients. **Journal of the American Chemical Society**, v. 86, n. 23, p. 5175-80, 1964.

GAUDIO, A. C. Modelos clássicos de estudo quantitativo das relações entre estrutura química e atividade biológica. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 278-289, 1996.

GAUDIO, A. C.; ZANDONADE, E. Proposição, validação e análise dos modelos que correlacionam estrutura química e atividade biológica. **Quim. Nova**, v. 24, n. 5, p. 658-671, 2001.

GEARY, T. G.; BONANNI, L. C.; JENSEN, J. B.; GINSBURG, H. Effects of combinations of quinoline-containing antimalarials on *Plasmodium falciparum* in culture. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, 80: 285–291, 1986.

GOLBRAIKH, A.; TROPSHA, A. Beware of Q2! **J. Mol. Graphics Modell.**, 20, 269-276, 2002.

GINSBURG, H.; WARD, S. A.; BRAY, P. G. 1999. An integrated model of chloroquine action. **Parasitol Today**, 15:357-360, 1999.

GOMES, A. P.; VITORINO, R. R.; COSTA, A. P.; MENDONÇA, E. G.; OLIVEIRA, M. G. A.; SIQUEIRA-BATISTA, R. Malária grave por *P. falciparum*. **Rev. Bras. Ter. Intensiva**, 23 (3): 358-369, 2011.

GOMES, M. S. M. Monitoramento da concentração plasmática da quinina e da mefloquina em pacientes com malária por *Plasmodium falciparum* no Estado do Amapá – Brasil. Dissertação – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 128 f., 2006.

GOODMAN, J. M.; STILL, W. C. An unbounded systematic search of conformational space. **J. Comput. Chem.**, v. 12, n. 9, p. 1110-1117, 1991.



GUEIRARD, P. J.; TAVARES, S.; THIBERGE, F.; BERNEX, T.; ISHINO, G.; MILON, B.; FRANKE-FAYARD, C. J.; JANSE, R.; MÉNARD, R.; AMINO, R. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, 107:18640-18645, 2010.

GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; NOSTEN, F.; DRUILHE, P.; LAXMINARAYAN, R.; BINKA, F.; KILAMA, W. L.; FORD, N.; WHITE, N. J. Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. **The Lancet Infectious Diseases**, London, v.2, p.564-573, 2002.

GUYON, I.; ELISSEEFF, A. An introduction to variable and feature selection. **J. Mach. Learn. Res.**, v.3, p. 1157-1182, 2003.

HAGADONE, T. R. Molecular substructure similarity searching: Efficient retrieval in two-dimensional structure databases. **J. Chem. Inf. Comput. Sci.**, 32:515-521, 1992.

HALL, A.; HENRY, J. Acute toxic effects of 'Ecstasy' (MDMA) and related compounds: overview of pathophysiology and clinical management. **Br. J. Anaesth**, 96 (6): 678-85, 2006.

HAMMETT, L. P. The Effect of structure upon the Reactions of Organic compounds. Benzene Derivatives. **Journal of the American Chemical Society**, v. 59, p. 96-103, 1937.

HANSCH, C.; LEO, A. **Exploring QSAR: Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology**. Washington D. C.: American Chemical Society, 1995.

HANSCH, C.; FUJITA, T.  $\rho$ - $\sigma$ - $\pi$  Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure. **Journal of the American Chemical Society**, v. 86, n. 8, p. 1616-26, 1964.

HAWLEY, S. R.; BRAY, P. G.; MUNGTHIN, M.; ATKINSON, J. D.; O'NEILL, P. M.; WARD, S. A. Relationship between antimalarial drug activity, accumulation, and inhibition of heme polymerization in *Plasmodium falciparum* in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 42: 682-686, 1998.

HOLMGREN, G; GIL, J. P; FERREIRA, P. M; VEIGA, M. I; OBONYO, C. O; BJORKMAN, A. Amodiaquine resistant *Plasmodium falciparum* malaria in vivo is associated with selection of *pfcr* 76T and *pfmdr1* 86Y. **Infect Genet Evol.** n.6, p.309-314, 2006.

HURST, T.; HERITAGE, T. HQSAR – A highly predictive QSAR technique based on molecular holograms. **213<sup>th</sup> ACS Natl. Meeting**, San Francisco, CA, CINF 019, 1997.

HYPERCUBE, Inc., 1115 NW 4<sup>th</sup> st., Gainesville, FL, 32608, USA, 2008.

JACOBS, G. H.; AIKAWA, M.; MILHOUS, W. K.; RABBEGE, J. R. An ultrastructural study of the effects of mefloquine on malaria parasites. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, 36: 9-14, 1987.

JAWORSKA, J.; NIKOLOVA-JELIAZKOVA, N.; ALDENBERG, T., QSAR applicability domain estimation by projection of the training set descriptor space: a review. **Altern. Lab. Anim.**, v. 33, n. 5, p. 445-459, 2005.

KARLE, J. M.; KARLE, I. L. Crystal Structure of (–)-Mefloquine Hydrochloride Reveals Consistency of Configuration with Biological Activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 46: 1529-1534, 2002.

KARLE, J. M.; OLMEDA, R.; GERENA, L.; MILHOUS, W. K. *Plasmodium falciparum*: role of absolute stereochemistry in the antimalarial activity of synthetic amino alcohol anti-malarial agents. **Exp. Parasit.**, New York, v. 76, p. 345-51, 1993.

KAYUMBA, P. C.; RISHA, P. G.; SHEWIYO, D.; MSAMI, A.; MASUKI, G.; AMEYE, D.; VERGOTE, G.; NTAWUKULIRYAYO, J. D.; REMOM, J. P.; VERVAET, C. The quality of essential antimicrobial and antimalarial drugs marketed in Rwanda and Tanzania: influence of tropical storage conditions on *in vitro* dissolution. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics, Edinburgh**, v.29, p.331-338, 2004.

KIER, L. B.; HALL, L. H., MURRAY, W. J.; RANDIC, M. Molecular connectivity. I: Relationship to nonspecific local anesthesia. **J. Pharm. Sci.**, 64(12): 1971-4, 1975.

KIER, L. B., MURRAY, W. J.; HALL, L. H. Molecular connectivity. 4. Relationship to biological activities. **J. Med. Chem.**, 18(12): 1272-4, 1975a.

KREMSNER, P.G.; ZOTTER, G.M.; FELDMEIR, H.; GRANINGER, W.; KOLLARISTSCH, G.; ROCHA, R.M.; WERNSDORFER, W.H. *In vitro* drug sensitivity of *Plasmodium falciparum* in Acre, Brazil. **Bulletin World Health Organization**, 67(3): 289-93, 1989a.

KREMSNER, P.G.; ZOTTER, G.M.; FELDMEIR, H.; BIENZLE, U.; JANSEN-ROSSECK, R.; GRANINGER, W.; KOLLARISTSCH, G.; ROCHA, R.M.; WERNSDORFER, W.H. Differences in drug response of *Plasmodium falciparum* within an area of the Amazon region. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 83: 158-61, 1989b.

KRETTLI, A.U.; MILLER, L. Malaria: a sporozoite runs through it. **Curr. Biol.**, 11:409-412, 2001.

KROTOSKI, W. A.; GARNHAM, P. C. C.; BRAY, R. S.; KROTOSKI, D. M.; KIILLICK-KENDRICK, R.; DRAPER, C. C.; TARGETT, G. A. T.; GUY, M. W. Observations on early and late postsporozoite tissue stages in primate malaria. I. Discovery of a new latent form of *Plasmodium cynomolgi* (the hypnozoite), and failure to detect hepatic forms within the first 24 hours after infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 31:24-35, 1982.

KUBINYI, H.; FOLKERS, G.; MARTIN, Y. C. 3D QSAR in Drug Design Volume 2, Ligand-Protein Interactions and Molecular Similarity. **Kluwer Academic Publishers**, 2002.

KUBINYI, H. QSAR and 3D QSAR in drug design Part 1: Methodology. **Drug Design**, v. 2, n. 11, p. 457-467, 1997.

KUBINYI, H. Statistical Methods. In: Mannhold, R., Krosgaard-Larsen, P. e Timmerman, H. **QSAR: Hansch analysis and related approaches**, VCH Publishers, New York, NY (USA) 1993.

KUBINYI, H. Quantitative Structure-Activity Relationships.7. The Bilinear Model, a New Model for Nonlinear Dependence of Biological Activity on Hydrophobic Character. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 5, p. 625-9, 1977.

KUMAR, S.; GUHAA, M.; CHOUBEYA, V.; MAITYA, P.; BANDYOPADHYAY, U. Antimalarial drugs inhibiting hemozoin ( $\beta$ -hematin) formation: A mechanistic update. **Life Sciences**, 80:813-828, 2007.

LEACH, A. R. **Molecular modelling PRINCIPLES AND APPLICATIONS**. New York: Pearson Education, 2001.

LILL, M. A. Multi-dimensional QSAR in drug discovery. **Drug Discov. Today**, 12(23-24):1013-1017, 2007.

MACHADO, A. Estudo *in silico* da relação estrutura-atividade de piperazinas nos receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5HT<sub>2A</sub>. Dissertação de Mestrado em Toxicologia Analítica Clínica e Forense – Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, 106 f., 2008.

MACUFA, M. M. M.; BASSANEZI, R. C. Modelo epidemiológico alternativo para a malária. **Biomatemática**, 21, 13-22, ISSN 1679-365X, 2011.

MAGALHÃES, I. R. S. Análise enantiosseletiva da mefloquina em plasma: avaliação da técnica de microextração em fase líquida. Dissertação de Mestrado em Toxicologia – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 121 f., 2006.

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

MARTINS, J. P. A. Química Computacional Aplicada a QSAR. **Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho de São Paulo – CENAPAD-SP**, 52 f., 2010.

MELO, Y. F. C. Avaliação *in vitro* da sensibilidade do *Plasmodium falciparum* aos antimaláricos, pelo ELISA com captação da proteína 2 rica em histidina. Dissertação de Mestrado em Doenças Tropicais e Infecciosas – Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 74 f., 2005.

MEYER, H. On the theory of alcohol narcosis. I. Which property of anesthetics gives them their narcotic activity? **Arch. Exper. Pathol. Pharmacol.**, 42:109-18, 1899.

MILNER, E.; MCCALMONT, W.; BHONSLE, J.; CARIDHA, D.; CARROLL, D. W.; GARDINER, S.; GERENA, L.; GETTAYACAMIN, M.; LANTERI, C.; LUONG, T.; MELENDEZ, V.; MOON, J. K.; RONCAL, N. E.; SOUSA, J. C.; TANGTEUNG, A.; WIPF, P.; DOW, G. S. Structure-activity relationships amongst 4-position quinoline methanol antimalarials that inhibit the growth of drug sensitive and resistant strains of *Plasmodium falciparum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Elsevier, v. 20, n. 4, p. 1347-1351, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010a. **Dados epidemiológicos de malária, por estado. Amazônia Legal, janeiro a maio de 2009 e 2010**. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/avaliacao\\_malaria\\_jan\\_maio\\_19\\_07\\_2010.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/avaliacao_malaria_jan_maio_19_07_2010.pdf). Acessado em: 03/nov/2010.

MINISTÉRIO D A SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS. **Guia Prático de Tratamento da Malária no Brasil**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 1ª ed., 2010b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria Técnica de Gestão, Série A. Normas e Manuais Técnicos; **Guia prático de tratamento da malária no Brasil 2009**, Brasília - DF, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde – FUNASA. **Manual de Terapêutica da Malária**. Brasília, 2001.

MOORE, D.V.; LANIER, S.R. Observations on two *Plasmodium falciparum* infections with abnormal response to chloroquine . **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 10: 5-9, 1961.

MOTA, M.; PRADEL, G.; VANDERBERG, J.; HAFALLA, J.; FREVERT, U.; NUSSENZWEIG, R.; NUSSENZWEIG, V.; RODRÍGUEZ, A. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. **Science**, 291:141-144, 2001.

MOUCHET, J. Agriculture and vector resistance. **Insect Sci Applic**, 9: 297-302, 1988.

MURRAY, C. J. L.; ROSENFELD, L. C.; LIM, S. S.; ANDREWS, K.G.; FOREMAN, K. J.; HARING, D.; FULLMAN, N.; NAGHAVI, M.; LOZANO, R.; LOPEZ, A. L. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 379, n. 9814, p. 413-431, 2012.

MYATT, G. **Making Sense of Data. A Practical Guide to Exploratory Analysis and Data Mining**. John Wiley & Sons Inc., New Jersey, p. 167, 280 p., 2007.

NEIVA, A. Ueber die Bildung einer chinin resistenten Rasse des Malaria parasiten. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2: 131-40, 1910.

NETO, Q. A. L.; NOGUEIRA, M. A.; REIS, R. R.; MELO, E. B. Estudo da relação estrutura-atividade quantitativa de dibenzoilmetanos  $\alpha$ -substituídos quanto à atividade anticâncer da mama (linhagem celular MCF7). **Revista Brasileira de Cancerologia**, 52 (4):345-347, 2006.

NIKOLOVA, N.; JAWORSKA, J. Approaches to Measure Chemical Similarity  $\pm$  a Review. **QSAR Comb. Sci.** 22, 2003.

NOCHT, T.; WERNER, H. Beobachtungen ueber eine relative Chininresistenz bei Malaria aus Brasilien. **Deutsche Medizinische Wochenschrift**, 36: 1557-60, 1910.

NOELD, H.; FAIZ, M. A.; YUNUS, E. B.; RAIMAN, M. R.; HOSSAIN, M. A.; SAMAD, R.; MILLER, R. S.; PANG, I. W.; WONGSRICHANALAI, C. Drug-resistant malaria in Bangladesh: an *in vitro* assessment. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 68(2): 140-42, 2003.

NOGUEIRA, F. H. A. Avaliação pontual da qualidade de antimaláricos no Sistema Único de Saúde – SUS. Dissertação – Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 169 f., 2007.

OLIVEIRA, K. M. G. Estudos QSAR de compostos com atividade leishmanicida. Tese – Instituto de Química, Departamento de Físico-Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Campinas, 172 f., 2009.

OLIVEIRA, M. W. P. Estudos conformacionais em compstos contendo íons lantanídeos. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 145 f., 2008.

OLIVEIRA, D. B. Programa de computador para a análise de relações entre a estrutura química e atividade biológica. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Física, Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal do Espírito Santo, 118 f., 2001.

OLLIARO, P. L.; GOLDBERG, D. E. The *Plasmodium* digestive vacuole: metabolic headquarters and choice drug target. **Parasitol Today**, 11: 294-297, 1995.

OLLIARO, P. L.; CASTELLI, F.; CALIGARIS, S.; DRUILHE, P.; CAROSI, G. Ultrastructure of *Plasmodium falciparum* in vitro. II. Morphological patterns of different quinolines effects. **Microbiológica**, 12: 15–28, 1989.

ORJIH, A.U.; RYERSE, J.S.; FITCH, C.D. Hemoglobin catabolism and the killing of intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* by chloroquine. **Experientia**, 50: 34–39, 1994.

OVERTON, E. Osmotic properties of cells in the bearing on toxicology and pharmacology. **Z. Physik. Chem.**, 22:189-209, 1897.

PAGOLA, S.; STEPHENS, P.W.; BOHLE, D. S.; KOSAR, A. D.; MADSEN, S. K. The structure of malaria pigment  $\beta$ -haematin. **Nature**, 404: 307-310, 2000.

PETERS, W.; HOWELLS, R. E.; PORTUS, J.; ROBINSON, B. L.; THOMAS, S.; WARHURST, D. C. The chemotherapy of rodent malaria, XXVII. Studies on mefloquine (WR 142,490). **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, 71: 407–418, 1977.

PETERS, W. Drug resistance in human malaria II. Quinine, mepacrine, 8-aminoquinoleines and hidroxynaphthalenes. In: **Chemotherapy and Drug resistance in Malaria**, 426-55, 1970.

POPP, H.; MÄNNER, R.; SMITH, J. Protein Structure Prediction: Improving and Automating Knowledge-based Approaches. **Tag der mündlinchen Prüfung**, 2002.

POVOA, M.M.; ADAGU, I.S.; OLIVEIRA, S.G.; MACHADO, R.L.; MILES, M.A.; WARHURST, D.C. pfm<sub>1</sub> Asn1042Asp and Asp1246Tyr polymorphisms, thought to be associated with chloroquine resistance, are present in chloroquine-resistant and - sensitive Brazilian field isolates of *Plasmodium falciparum*. **Exp Parasitol.** n.88. p.64-68,1998.

RANDIC, M.; BASAK, N.; PLAVSIC, D. Novel Graphical Matrix and Distance-based Molecular Descriptors. **Croatica Chemica Acta CCACAA**, 77(1-2): 251-257, 2004.

RAYNES, K.; FOLEY, M.; TILLEY, L.; DEADY, L. Novel bisquinoline antimalarials: synthesis, antimalarial activity na The *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* confers cellular resistance to antimalarial drugs in yeast cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, 93: 9942–9947, 1996.

REDL, G.; CRAMER, R. D.; BERKOFF, C. E. Quantitative Drug Design. **Chemical Society Reviews**, v. 3, p. 273-292, 1974.

REKKER, E. R. The history of drug research: from Overton to Hansch. **Quantitative Structure-Activity Relationships**, n. 11, p. 195-199, 1992.

REY, L. **Parasitologia**, Guanabara-Koogan, Ed.: Rio de Janeiro, 2001.

RIBEIRO, M. C. de A.; AUGUSTO, O.; FERREIRA, A. M. da C. Influence of quinoline-containing antimalarials in the catalase activity of ferriprotoporphyrin IX. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 65: 15–23, 1997.

RICHET, C. On the relationship between the toxicity and the physical properties of substances. **Compt. Rend. Soc. Biol.**, (9)5:775-6, 1893.

RIDLEY, R. G. Haemoglobin degradation and haem polymerization as antimalarial drug targets. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 49: 43–48, 1997a.

RIDLEY, R. G.; DORN, A.; VIPPAGUNTA, S. R.; VANNERSTROM, J. L. Haematin (haem) polymerization and its inhibition by quinoline antimalarials. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, 91: 559–566, 1997b.

ROBERT, A.; BENOIT-VICAL, F.; DECHY-CABARET, O.; MEUNIER, B.; **Pure Appl. Chem.**, 73, 1173, 2001.

ROCHA, G. B.; FREIRE, R. O.; SIMAS, A. M.; STEWART, J. J. P. **J. Comput. Chem.**, 27: 1101, 2006.

RODRIGUES, D.P. Casos de malária por *Plasmodium falciparum* resistentes ao tratamento pela cloroquina. **Arquivos de Higiene e Saúde Pública**, 26: 231-35, 1961.

SANTOS, M. A. V.; COUTO, A. A.; OLIVEIRA, S. G.; ROSÁRIO, V. E. Estudos *in vitro* dos níveis de resistência do *Plasmodium falciparum* a drogas, de 1983 a 1986. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 29:346-53, 1987.

SCALERCIO, S. R. R. A. Estudo teórico do mecanismo redox de derivados quinolínicos na atividade antimalárica. Dissertação – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 69 f., 2010.

SCHROETER, T. S. et al. Estimating the domain of applicability for machine learning QSAR models: a study on aqueous solubility of drug discovery molecules. **J. Comput. Aided Mol. Des.**, v. 21, p. 485-498, 2007.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - SVS. 2009. Malária no Brasil. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/situacao\\_da\\_malaria\\_site\\_svs\\_28\\_12.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/situacao_da_malaria_site_svs_28_12.pdf) Acessado em: 11/mai/2011.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - SVS. 2008. Situação Epidemiológica. Disponível em: [http://dw.saude.gov.br/portal/page/portal/sivep\\_malaria?Ano\\_n=2008](http://dw.saude.gov.br/portal/page/portal/sivep_malaria?Ano_n=2008). Acessado em: 11/mai/2011.

SILVA, A. D., PINTO, W. H. A.; SOARES, C. B. S. S. Espaço e malária no Amazonas (2005-2009): Abordagens preliminares. **Anais do I Seminário Internacional de Ciências do Ambiente e Sustentabilidade na Amazônia**, p. 2, 2009.

SILVA, T. H. A.; OLIVEIRA, M. T.; SANTOS, H. F.; OLIVEIRA, A. B.; ALMEIDA, W. B. Estudo de modelagem molecular de complexos ferriprotoporfirina-IX e quinolinocarbinolaminas antimaláricas: proposta de um farmacóforo. **Quim. Nova**, v. 28, n. 2, 244-49, 2005.

SILVA, J.R. Terça maligna cloroquina-resistente uma séria ameaça ao Hinterland brasileiro. **Tribuna médica**, 4:2-6, 1961a.

SILVA, J.R. Resistência do *Plasmodium falciparum* à ação da cloroquina. **O Hospital**, 60:43-58, 1961b.

SILVA, J.R.; LOPES, P.F.A.; FERREIRA, L.F.F.; MORTEL, R.; NAVEIRA, J.B. Resistência do *Plasmodium falciparum* à ação da cloroquina. **O Hospital**, 60(5): 581-94, 1961.

SLATER, A. F. G. Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. **Pharmacology and Therapeutics**, 57: 203–235, 1993.

SLATER, A. F. G.; CERAMI, A. Inhibition by chloroquine of a novel heme polymerase

enzyme activity in malaria trophozoites. **Nature**, 355: 167–169, 1992.

SPEERS, D. J.; RYAN, S.; HARNETT, G.; CHIDLOW, G. Diagnosis of malaria aided by polymerase chain reaction in two cases with low-level parasitaemia. **Intern Med J.**, 33(12):613-5, 2003.

STURM, A.; AMINO, R.; VAN DE SAND, C.; REGEN, T.; RETZLAFF, S.; RENNENBERG, A.; KRUEGER, A.; POLLOK, J.M.; MENARD, R.; HEUSSLER, V.T. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*. 313:1287-1290, 2006.

SUGIOKA Y, SUZUKI M. The chemical basis for the ferriprotoporphyrin IX-chloroquine complex induced lipid peroxidation. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1074:19-24, 1991.

SULLIVAN, D. J. Theories on malarial pigment formation and quinoline action. **Int. J. Parasitol.**, 32:1645-1653, 2002.

SULLIVAN JR, D. J.; MATILE, H.; RIDLEY, R. G.; GOLDBERG, D. E. A common mechanism for blockade of heme polymerization by antimalarial quinilines. **Journal of Biological Chemistry**, 273: 3103-3107, 1998.

SWEETMAN, S.C. (ED.). Martindale: The complete drug reference. 34 ed., London: **Pharmaceutical Press**, p. 444-463, 2005.

TAFT JR., R. W. Polar and Steric Substituent Constants for Aliphatic and o-Benzoate Groups from Rates of Esterification and Hydrolysis of Esters. **Journal of the American Chemical Society**, v. 74, p. 3120-8, 1952.

TALETE, S. R. L. MobyDigs Professional, v. 1.1, 2009.

TALETE, S. R. L. DRAGON for windows and Linux. V. 5.4, Milano, Italy, 2006.

TAUIL, P.L. Perspectives of vector borne diseases control in Brazil. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 29:275-277, 2006.

TAYLOR, R. B.; SHAKOOR, O.; BEHRENS, R. H. Drug quality, a contributor to drug resistance? **The Lancet**, London, v.346, n.8967, p.122, 1995.

TETKO, I. V. Computing chemistry on the web. **Drug Discov. Today**; 10:1497-500, 2005.

TETKO, I. V.; GASTEIGER, J.; TODESCHINI, R.; MAURI, A.; LIVINGSTONE, D.; ERTL, P.; PALYULIN, V. A.; RADCHENKO, E. V.; ZEFIROV, N. S.; MAKARENKO, A. S.; TANCHUK, V. Y.; POKOPENKO, V. V. Virtual computational chemistry laboratory – design and description. **J. Comput. Aid. Mol. Des.**, 19:453-63, 2005.

TETKO, I. V.; KOVALISHYN, V. V.; LIVINGSTONE, D. J. Volume learning algorithm artificial neural networks for 3D QSAR studies. **J. Med. Chem.**, 44: 2411-20, 2001.

THE UNITED States Pharmacopeia. USP 30, 30 ed. Rockville: **United States Pharmacopeial Convention**, 2006.

THELU, J.; BURNOD, J.; BRACCHI, V.; AMBROISE-THOMAS, P. Identification of differentially transcribed RNA and DNA helicase-related genes of *Plasmodium falciparum*. **DNA and Cell Biology**, 13: 1109–1115, 1994.

THOMAS, G. Descoberta de fármacos por modelagem. In: **Química medicinal: uma introdução**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 23-72, 2003.

THORNER, D. A.; WILLETT, P.; WRIGHT, P. M.; TAYLOR, R. Similarity searching in files of three-dimensional chemical structures: Representation and searching of molecular electrostatic potentials using field-graphs. **J. Comput. Aided Mol. Design**, 11:163-174, 1997.

TODESCHINI, R.; CONSONNI, V.; MAURI, A.; PAVAN, M. Detecting "bad" regression models: multi criteria fitness functions in regression analysis. **Anal. Chim. Acta**, 515, 199-208, 2004.

TORRES, K. L.; FIGUEIREDO, D.V.; ZALIS, M. G.; DANIEL-RIBEIRO, C. T.; ALECRIM, W.; FERREIRA-DA-CRUZ, M. de F. Standardization of a very specific and sensitive single PCR for detection of *Plasmodium vivax* in low parasitized individuals and its usefulness for screening blood donors. **Parasitol Res.**, 98(6):519-24, 2006.

TRACY, J. W., WEBSTER JR., L. T. Fármacos usados na quimioterapia das infecções por protozoários Malária. In: HARDMAN, J.G.; LIMBRID, L.E.(ED.) **Goodman e Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Mac GrawHill, p. 803-822, 2003.

TUTE, M. S. Principles and practice of Hansch analysis: a guide to structure-activity correlation for the medicinal chemist. **Advances in Drug Research**, v. 6, p. 1-77, 1971.

UNGER, S. H.; HANSCH, C. On Model Building in Structure-Activity Relationships. A Reexamination of Adrenergic Blocking Activity of b-Halo-b-arylalkylamines. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 7, p. 745-9, 1973.

VALE, N.; MOREIRA, R.; GOMES, P. Quimioterapia da malária um século no desenvolvimento de antimaláricos. **Química**, n. 099, p. 61-73, 2005.

VIGHI, M. The use of QSARs for heterogeneous chemical substances: meaning, predictive capability, and practical applications. **Biotherapy**, v. 11, p. 97-104, 1998.

VILLALÓN, J.M. Overview of Malaria: A First Step to a Cure. 2004. disponível em <http://ecology.cwru.edu/malaria/Malaria%20Tutorial.htm>. Acesso em: 11/04/2010.

VOLKMAN, S.; WIRTH, D. Functional analysis of *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum*. **Methods Enzymol.**, n.292, p.174-181, 1998.

VUKICEVIC, D.; TRINAJSTIC, N. Modified Zagreb M2 Index – Comparison with the Randić Connectivity Index for Benzenoid Systems. **Croatica Chemica Acta CCACAA**, 76 (2): 183-187, 2003.

YOUNG, D. C. Computational Chemistry: A Practical Guide for Applying Techniques to Real-World Problems. John Wiley & Sons, Inc, 2001.

YOUNG, Martin D. Exploração científica e conquista no campo da malária. **Folhas de atualidades em saúde pública**, n. 7/8, p. 1-9, 1967.

YOUNG, M.D.; MOORE, D.V. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**; 10: 317-20, 1961.



WARD, S. A.; BRAY, P. G.; HAWLEY, S. R. Quinoline resistance mechanisms in *Plasmodium falciparum*: the debate goes on. **Parasitology**, 114: S125–S136, 1997.

WARHURST, D.C.; CRAIG, J.C.; ADAGU, I.S.; LEE, S.Y. The relationship of physico-chemical properties and structure to the differential antiplasmodial activity of the cinchona alkaloids. **Malaria Journal**, 2: 26, 2003.

WARHURST, D.C. The quinine-haemin interaction and its relationship to antimalarial activity. **Biochemical Pharmacology**, 30: 3323-3327. 1981.

WEBER, K. C. Modelagem molecular de compostos arilpiperazínicos e suas interações com o receptor 5 – HT<sub>1a</sub>. PhD thesis, **IQSC-USP**, São Carlos – SP, 2008.

WEHRENS, R.; PUTTER, H.; BUYDENS, L. M. C. The bootstrap: a tutorial. **Chemom. Intell. Lab. Syst.**, 54, 35-52, 2000.

WERMUTH, C. G.; GANELLIN, C. R.; LINDBERG, P.; MITSCHER, L. A. *Pure & Appl. Chem.*, 70, 1129, 1998.

WERMUTH, C.G. **The practice of medicinal chemistry**. London: Academic Press. 1996.

WERNSDORFER, W.H. The development and spread of drug-resistant malaria. **Parasitologia Today**, 07:11, 1991.

WHO. 2011. World malaria report: 2011. Disponível em: [http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2011/9789241564403\\_eng.pdf](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/9789241564403_eng.pdf). Acessado em: 03/02/2012.

WHO. 2010. Key malaria facts. Disponível em: <http://rbm.who.int/keyfacts.html>. Acessado em: 27/nov/2010.

WHO. 2009. Guidelines for the treatment of malaria, second edition. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547925\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547925_eng.pdf). Acessado em: 04/nov/2010.

WHO. 2006. Guidelines for the treatment of malaria. World Health Organization. Disponível em: <http://apps.who.int/malaria/docs/TreatmentGuidelines2006.pdf>. Acessado em: 21/fev/2011.

WHO. **Expert Committee On Malaria 20 Reporter**. Geneva, 2000.

WINSTANLEY, P. Modern chemotherapeutic options for malaria. **The Lancet Infectious Diseases**, London, v.1., p. 242-250, 2001.

WISER, M.F. **Mechanisms of Drug Action and Resistance (Focus on Antimalarials), 2003**. Disponível em < <http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/drugs/.html#action>. Acesso em 16/05/2011.

WONGSRICHANALAI, C.; WEBSTER, H. K.; WIMONWATTRAWATEE, T.; SOOKTO, P.; CHUANAK, N.; THIMASARN, K.; WERNSDORFER, W.H. Emergence of multidrug resistant *Plasmodium falciparum* in Thailand: *In vitro* tracking. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 47: 112-16, 1992a.

WONGSRICHANALAI, C.; WEBSTER, H. K.; WIMONWATTRAWATEE, T.; SOOKTO, P.;

CHUANAK, N.; THIMASARN, K.; WERNSDORFER, W.H. *In vitro* sensitivity of *Plasmodium falciparum* isolates in Thailand to Quinine and Chloroquine, 1984-1990. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, 23: 533-36, 1992b.