



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS – PPGRGV

ELISÂNGELA SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO DE INIBIDORES ORIUNDOS DE FONTES NATURAIS
PARA O MODELO DO RECEPTOR ATPASE- Ca^{+2} DO *Plasmodium*
falciparum (PfATP6)**

FEIRA DE SANTANA - BA

2014

ELISÂNGELA SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO DE INIBIDORES ORIUNDOS DE FONTES NATURAIS
PARA O MODELO DO RECEPTOR ATPASE-Ca⁺² DO *Plasmodium
falciparum* (PfATP6)**

FEIRA DE SANTANA - BA

2014

ELISÂNGELA SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO DE INIBIDORES ORIUNDOS DE FONTES NATURAIS
PARA O MODELO DO RECEPTOR ATPASE-Ca⁺² DO *Plasmodium
falciparum* (PfATP6)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Neves Brandão

Coorientador: Prof. Dr. Manoelito Coelho dos Santos Junior

FEIRA DE SANTANA - BA

2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. (a) . Dr (a). Angélica Maria Lucchese

Prof. (a) . Dr (a). Samuel Silva da Rocha Pita

Prof. (a) . Dr (a). Manoelito Coelho dos S. Jr.
Co-orientador

Prof. (a) . Dr (a). Hugo Neves Brandão
Orientador e Presidente da Banca

Feira de Santana - Ba

2014

Dedico esse trabalho ao amor da minha vida, Davi Lucas. Tudo foi por você e para você.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **Deus**, que está sempre presente na minha vida.

Ao meu AMOR incondicional, **Davi Lucas**. Mamãe te AMA tanto que chega a doer o coração.

À **minha mãe, Lourdes**, que com seu jeito singular, sempre me amou e conduzia os meus passos, mesmo que de longe, me abençoando.

A todos os meus **irmãos (Elisete, Janete, Janice, Reginaldo, Genivaldo)**, que sempre acreditaram na minha capacidade.

Ao meu marido (**Dila**), que com sua paciência e amor, esteve presente dedicando toda a atenção e companheirismo.

Aos meus orientadores, **Manoelito Coelho e Hugo Brandão**, pela ajuda, atenção, dedicação, e pela confiança.

Aos **amigos Carla Renata, Laís Cardoso, Carine Sampaio e Franco Henrique** pela ajuda e companheirismo durante o desenvolvimento desse trabalho.

À **Dayse Alessandra**, pela colaboração, dedicação, disponibilidade e paciência que contribuíram para a realização deste trabalho.

À Universidade Estadual de Feira de Santana, aos funcionários, professores e colegas que se dedicam a constituir uma Instituição de qualidade.

A CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo suporte financeiro.

A todos do **Laboratório de Modelagem Molecular**, por qualquer ajuda a mim prestada, além da divertida amizade.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuiu para a realização desse trabalho.

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável”.

Galileu Galilei

RESUMO

A malária é considerada como uma doença infecciosa, não contagiosa de evolução crônica com manifestações episódicas de caráter agudo, a qual aflige milhões de pessoas nas zonas tropicais e subtropicais do globo. Os vegetais representam fonte de moléculas ativas para diversas enfermidades, incluindo a malária. Através de procedimentos fitoquímicos, pode-se estudar o metabolismo secundário desses vegetais onde se esperam encontrar novas fontes de tratamento para a malária. O presente estudo teve como objetivo geral identificar moléculas oriundas de fontes naturais capazes de inibir a proteína ATPase- Ca^{+2} do *Plasmodium falciparum* (PfATP6). O alvo molecular foi o modelo do receptor PfATP6, obtido por modelagem comparativa. Foi realizado através do programa AutoDock Vina 1.1.2. uma triagem em bancos de dados com o objetivo de selecionar os 10 ligantes mais promissores, com determinação das energias de afinidade. Posteriormente, foram realizados testes com os extratos hidrometanólico e clorofórmico da espécie de *Cenostigma macrophyllum* Tul. Os padrões dos biflavonoides agatisflavona e amentoflavona foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por Detecção de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) para identificação da presença destes metabólitos na espécie. A validação do método cromatográfico levou em consideração os parâmetros seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. Os resultados de acoplamento molecular apresentaram variação energética próxima entre os 10 compostos selecionados (1 kcal/mol). De posse dos resultados do acoplamento molecular foram estudadas as interações intermoleculares da agatisflavona e amentoflavona com o receptor PfATP6 comparando-os com os valores obtidos para a taspigargina. Dado os valores de energia de afinidade, os compostos amentoflavona -10,0 Kcal/mol e agatisflavona -9,7 Kcal/mol apresentaram afinidade com o sítio ortostérico do receptor PfATP6, sendo essas interações sustentadas pela natureza das interações intermoleculares identificadas. Através da comparação dos tempos de retenção e espectros de Ultra Violeta (UV) dos padrões e amostras foi possível identificar os biflavonoides agatisflavona e amentoflavona nas folhas e casca do caule de *C. macrophyllum*. A quantificação do biflavonoide agatisflavona variou de 22,25 a 0,012 μg de agatisflavona/g de planta seca e da amentoflavona variou de 20,63 a 0,02 μg de amentoflavona/g de planta seca. A análise dos parâmetros avaliados demonstrou que o método foi adequado para a análise da agatisflavona e amentoflavona, apresentando-se em consonância com as especificações da legislação vigente. Percebe-se que os compostos amentoflavona e agatisflavona podem atuar no receptor PfATP6, direcionando novos estudos de interações nesse alvo biológico na perspectiva de controle da malária. Desta forma é possível sugerir que existem compostos naturais presente no semiárido com possível atividade antimalárica, no qual a ferramenta da modelagem molecular associada às análises fitoquímicas pode guiar na identificação de compostos bioativos e, por conseguinte no desenvolvimento de novos fármacos.

Palavras-chave: PfATP6. Triagem virtual. Quantificação. *Cenostigma macrophyllum*. Biflavonoides.

ABSTRACT

Malaria is considered a non-contagious chronic evolution with episodic manifestations of acute character infectious disease, which afflicts millions of people in tropical and subtropical areas of the world. Vegetables represent a source of active molecules for various diseases, including malaria. Through phytochemical procedures, one can study the secondary metabolism of these plants where they hope to find new sources of treatment for malaria. The present study had as main objective to identify molecules derived from natural sources can inhibit the ATPase-Ca²⁺ protein of *Plasmodium falciparum* (PfATP6). The molecular target was the model PfATP6 receiver, obtained by comparative modeling. Was performed using the program AutoDock Vina 1.1.2. screening in databases with the aim of selecting the 10 most promising ligands, with determination of the energies of affinity. Subsequently, tests with hydromethanolic and chloroform extracts of the species of *Tul Cenostigma macrophyllum* were performed. The patterns of agatisflavona and amentoflavone biflavonoids were analyzed by High Performance Liquid Chromatography for Detection Arrangement Diodes (HPLC-DAD) to identify the presence of these metabolites in the species. Validation of the chromatographic method took into account the parameters selectivity, linearity, precision, accuracy, limit of detection and limit of quantification. The results showed molecular next coupling energy variation among the 10 selected compounds (1 kcal / mol). With the results of the molecular coupling of the intermolecular interactions were studied and agatisflavona amentoflavone with PfATP6 receiver comparing them with the values obtained for thapsigargin. Since the energy values affinity the compounds amentoflavone -10.0 kcal / mol and agatisflavona -9.7 kcal / mol ortostérico showed affinity for the receptor site of PfATP6, these interactions being supported by the nature of intermolecular interactions identified. By comparing the retention times and ultraviolet spectra (UV) of the standards and samples could be identified agatisflavona amentoflavone and biflavonoids the leaves and stem bark of *C. macrophyllum*. Quantification of agatisflavona biflavonoide ranged from 22.25 to 0.012 mg of agatisflavona / g dry plant and amentoflavone ranged from 20.63 to 0.02 mg of amentoflavone / g dry plant. The analysis of the parameters evaluated showed that the method was suitable for the analysis of agatisflavona and amentoflavone, performing in line with the specifications of the current legislation. It is noticed that the amentoflavone agatisflavona compounds and can act in PfATP6 receiver, directing further studies of interactions in biological target in perspective for malaria control. Thus, it is possible to suggest that there are natural compounds present in semiarid with possible antimalarial activity, wherein the molecular modeling tool associated with the phytochemical analysis can guide the identification of bioactive compounds, and therefore the development of new drugs.

Keywords: PfATP6. Virtual screening. Quantification. *Cenostigma macrophyllum*. Biflavonoids.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detector de arranjo de diodo
EC	Eletroforese capilar
EM	Espectrometria de Massas
FDA	Food and Drug Administration
CG	Cromatografia Gasosa
ICH	Conferência Internacional de Harmonização
INMETRO	Instituto Nacional de Metodologia
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDB	Protein Data Bank
PfATP6	ATPaseCa ⁺² do retículo sarcoplasmático do <i>Plasmodium falciparum</i>
RE	Resolução
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	Raiz Média do Desvio do Quadrado
SERCA	Reticulo Sarco/Endoplasmático ATPase Ca ²⁺
TG	Tapsigargina
USP	Farmacopeia dos Estados Unidos
UV	Ultravioleta
UV-VIS	Ultravioleta visível

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição global da malária.....	21
Figura 2 - Modelo estrutural da Proteína SERCA.....	25
Figura 3- Estrutura da tapsigargina e artemisinina.....	33
Figura 4 – Folhas e casca do caule de um espécime de <i>Cenostigma macrophyllum</i>	36
Figura 5 – Estrutura tridimensional do modelo do receptor PfATP6.....	52
Figura 6 - Sobreposição entre o molde 1IWO (verde) e o modelo PfATP6 (azul) com o ligante tapsigargina	
Figura 7 - Sobreposição da tapsigargina.....	
Figura 8 – Mapa de interações da Tapsigargina frente ao sítio ativo do receptor PfATP6 antes do reacoplamento.....	53
Figura 9 – Mapa de interações da Tapsigargina frente ao sítio ativo do receptor PfATP6 após reacoplamento.....	54
.....	
Figura 10- Distribuição hidrofóbica/hidrofílica do sítio ortostérico do modelo receptor PfATP6.....	56
Figura 11 - Região de ligação de hidrogênio do sítio ortostérico do receptor PfATP6.....	58
Figura 12 - Mapa de interações do composto VE0OUA0AF frente ao sítio ativo do modelo do receptor PfATP6.....	66
Figura 13 - Mapa de interações do composto VE0NUA0AF frente ao sítio ativo do receptor PfATP6.....	67
Figura 14- Biflavonoides utilizados para análise em <i>C. macrophyllum</i>	69
Figura 15 - Cromatograma a 280 nm do padrão agatisflavona em CLAE.....	71
Figura 16 - Cromatograma a 280 nm do padrão amentoflavona em CLAE.....	71
Figura 17 - Cromatograma a 280 nm dos picos (A e B) do extrato clorofórmico das folhas de <i>C.</i>	

<i>macrophyllum</i> em CLAE.....	72
Figura 18 - Cromatograma a 280 nm dos picos (C e D) do extrato clorofórmico do caule de <i>C. macrophyllum</i> em CLAE.....	72
Figura 19 - Cromatograma a 280 nm dos picos (E e F) do extrato hidrometanólico da folha de <i>C. macrophyllum</i> em CLAE.....	73
Figura 20 - Sobreposição dos Espectros no UV do pico A, Extrato clorofórmico das folhas e Padrão Agatisflavona.....	74
Figura 21 - Sobreposição dos espectros no UV do pico B Extrato clorofórmico das folhas e Padrão Amentoflavona.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Programação do gradiente de eluição.....	45
Tabela 2 - Energia de afinidade para os dez melhores complexos além da Tapsigargina.....	54
Tabela 3 – Concentração de biflavonoides em amostras de <i>C. macrophyllum</i>	71
Tabela 4 - Desvio Padrão Relativo de soluções em triplicata dos padrões.....	72
Tabela 5 - Taxa de recuperação para determinação da exatidão.....	72
Tabela 8 - Quantificação de biflavonoides em amostras de <i>C. macrophyllum</i>	73

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva analítica clássica.....	42
Gráfico 2 - Curva de calibração da agatisflavona e parâmetros obtidos com a regressão linear.....	75
Gráfico 3 - Curva de calibração da amentoflavona e parâmetros obtidos com a regressão linear.....	76

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Cálculo do Desvio Padrão Relativo.....	43
Equação 2 - Cálculo do Limite de detecção.....	44
Equação 3 - Cálculo do Limite de quantificação.....	44
Equação 4 - Cálculo do Desvio Padrão Relativo.....	50
Equação 5 - Cálculo da exatidão através do fator de recuperação.....	51
Equação 6 - Cálculo do Limite de detecção.....	51
Equação 7 - Cálculo do Limite de quantificação.....	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1 MALÁRIA.....	20
2.2 RESISTÊNCIA PARASITÁRIA.....	22
2.3 PFATP6.....	23
2.4 QUÍMICA COMPUTACIONAL.....	26
2.5 TRIAGEM VIRTUAL.....	27
2.6 ACOPLAMENTO MOLECULAR.....	28
2.7 – PRODUTOS NATURAIS.....	30
2.7.1 CONCEITOS GERAIS.....	30
2.8 LEVANTAMENTO BOTÂNICO.....	32
2.8.1 A FAMÍLIA <i>LEGUMINOSAE</i>.....	32
2.8.2 GÊNERO <i>CENOSTIGMA</i>.....	32
2.9 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	34
2.9.1 SELETIVIDADE.....	35
2.9.2 LINEARIDADE.....	36
2.9.3 INTERVALO.....	38
2.9.4 PRECISÃO.....	38
2.9.5 LIMITE DE DETECÇÃO (LD).....	39
2.9.6 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ).....	39
2.9.7 EXATIDÃO.....	40
2.9.8 ROBUSTEZ.....	40

3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3.1 TRIAGEM VIRTUAL E ACOPLAMENTO MOLECULAR.....	41
3.1.1 Preparação dos ligantes.....	41
3.1.2 Triagem virtual dos compostos no receptor PfATP6.....	41
3.2 PARTE EXPERIMENTAL DOS PROCEDIMENTOS FITOQUÍMICOS.....	43
3.2.1 Identificação da Espécie.....	43
3.2.2 Reagentes e padrões analíticos.....	43
3.2.3 Preparo dos extratos.....	43
3.2.3.1 Extração dos constituintes de <i>C. macrophyllum</i>	43
3.2.4 Identificação e quantificação de biflavonoides presentes no extrato hidrometanólico e clorofórmico das folhas e casca de caule de <i>C. macrophyllum</i>, utilizando CLAE.	44
3.2.5 Validação do método analítico aplicado para quantificação de biflavonoides	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	47
4.1 LOCALIZAÇÃO DO SITO ORTOSTÉRICO DO RECEPTOR PFATP6.....	47
4.2 ACOPLAMENTO MOLECULAR.....	53
4.3 ANÁLISES DAS INTERAÇÕES ATRAVÉS DO PROGRAMA LIGPLOT V.1.4.5.....	61
4.4 ANÁLISES FITOQUÍMICAS.....	64
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75
6 REFERÊNCIAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

O nome malária tem origem latina e literalmente significa “ar ruim”, pois acreditava-se que a doença resultasse de emanções de pântanos. Nomes alternativos, como paludismo e impaludismo, são de origem francesa e têm o mesmo significado. Outros sinônimos, menos comuns são: bateadeira, carneirada, febre intermitente e febre palustre (CAMARGO, 2003). A malária é caracterizada como uma doença infecciosa, não contagiosa, de evolução crônica, com manifestações episódicas de caráter agudo, a qual aflige milhões de pessoas nas zonas tropicais e subtropicais do globo (GARCIA, 2010).

Aproximadamente metade da população mundial vive em áreas que tem algum risco de transmissão de malária e um quinto vive em áreas consideradas de alto risco de transmissão da doença (AREGWAI *et al.*, 2008). Especula-se que 50% da mortalidade entre a população indígena no Brasil devem-se à malária causada por *Plasmodium falciparum* (CAMARGO, 2003; FRANÇA *et al.*, 2008).

O tratamento da malária é complexo, longo e muitas vezes ineficaz devido à reinfeção do paciente, fenômeno muito comum em regiões endêmicas. Em vários países, incluindo o Brasil, a quimioterapia da malária é feita empregando-se uma combinação de derivados quinolínicos e artemisinínicos (ex.: artesunato + mefloquina, ASMQ) como tratamento padrão em casos não complicados partindo da evidência de resistência aos fármacos quinolínicos atuais em monoterapia (BALINT, 2001; MILLER, L. H. *et al.*, 2013).

Na tentativa de combater a malária, estudos têm demonstrado que outros compostos naturais podem agir na inibição da proteína PfATP6. Esta proteína é uma ATPase- Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático do *P. falciparum* (ECKSTEIN-LUDWING *et al.*, 2003), envolvida na homeostase do Ca^{+2} , controlando uma variedade de funções celulares, como também o transporte de cálcio para o retículo sarcoplasmático do parasito (PULCINI *et al.*, 2013). A sequência dos aminoácidos dessa proteína é conhecida, no entanto a estrutura tridimensional ainda não está disponível. Nesse sentido foi desenvolvido por Leite, (2008) a construção de um modelo da estrutura tridimensional (3D) do PfATP6 por modelagem comparativa.

Devido à diversidade estrutural de seus metabólitos secundários, as plantas são reconhecidas desde os primórdios da humanidade na medicina popular e, atualmente, são muito utilizadas como fonte de compostos protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos (CRAGG *et al.*, 1999; GOBO-NETO; LOPES, 2007). Estudos fitoquímicos possibilitam a identificação dos metabólitos secundários existentes em determinadas partes

das plantas, permitindo assim a realização de análise do perfil químico, bem como avaliação das variações das espécies vegetais, colaborando para obtenção ou desenvolvimento de fármacos. Como exemplo tem-se a artemisinina, utilizada no tratamento para a malária (KLAYMAN, 1985; SIMÕES, 2001; CAROLLO, 2008).

Levando em consideração o grande número de alvos biológicos promissores ao desenvolvimento de novos fármacos, técnicas de seleção biológica, como triagem virtual, tem ganhado destaque no processo de identificação e seleção de novas moléculas bioativas. Esta ferramenta tem sido utilizada para examinar, não apenas uma molécula em sua individualidade, mas também compostos presentes em uma biblioteca virtual e, desta forma, eliminar as estruturas indesejadas com a utilização dos filtros moleculares previamente determinados (SCHNEIDER; HANS-JOACHIM, 2002).

A busca de novos fármacos antimaláricos a partir de produtos naturais é necessária para que se tenha uma terapêutica complementar à crescente resistência adquirida pelo parasito (DONDORP *et al.*, 2009; TRAVASSOS; LAUFER, 2009). Alguns modelos estatísticos apontam que em 2080, o número de indivíduos infectados por *Plasmodium falciparum* será de aproximadamente 330 milhões de pessoas (LIESHOUT *et al.*, 2004). Existem compostos oriundos da flora do semiárido baiano identificados por modelagem molecular que demonstraram serem promissores agentes antimaláricos (LEITE *et al.*, 2010). Nesse sentido, o presente estudo visa identificar novos inibidores da proteína PfATP6, através das técnicas de triagem virtual e análises fitoquímicas, objetivando reduzir o tempo e os custos envolvidos no planejamento de novos fármacos.

Nesta perspectiva, a presente dissertação objetivou identificar moléculas oriundas de fontes naturais capazes de inibir a proteína PfATP6. Como objetivos específicos destacaram-se: identificação de moléculas oriundas de fontes naturais capazes de inibir o receptor PfATP6 por triagem virtual; estudar as interações intermoleculares entre as moléculas selecionadas e a proteína-alvo; analisar a espécie vegetal por CLAE-DAD quantitativamente após a investigação de acoplamento molecular; validar o método CLAE-DAD desenvolvido para a análise da espécie vegetal selecionada por meio de avaliações dos parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 MALÁRIA

A malária é caracterizada como uma doença sistêmica que provoca alterações na maioria dos órgãos, apresentando variações desde as formas benignas até as muito graves e fatais. A gravidade dessas infecções depende quase que exclusivamente de fatores pessoais, tal como a resistência ou a imunidade do paciente, bem como da influência das características genéticas presentes em determinadas cepas dos parasitos envolvidos, diferindo também com as regiões geográficas, entre outros fatores (REY, 2001).

A doença manifesta-se por episódios de calafrios, seguidos de febre alta que duram de 3 a 4 horas. Esses eventos são, em geral, acompanhados de profundo mal-estar, náuseas, cefaléias, vômitos, anorexia, fadiga, diarreia, anemia e dores articulares, sendo que o quadro clínico é passível de profundas modificações. A leucopenia também pode ser evidenciada nos casos de malária, assim como pode acontecer uma eventual elevação da contagem de células brancas do sangue. Outras alterações clínicas, como eosinofilia e trombocitopenia, podem ocorrer, embora muito menos frequentes (CAMARGO, 2003; FRANÇA *et al.*, 2008; GARCIA, 2010).

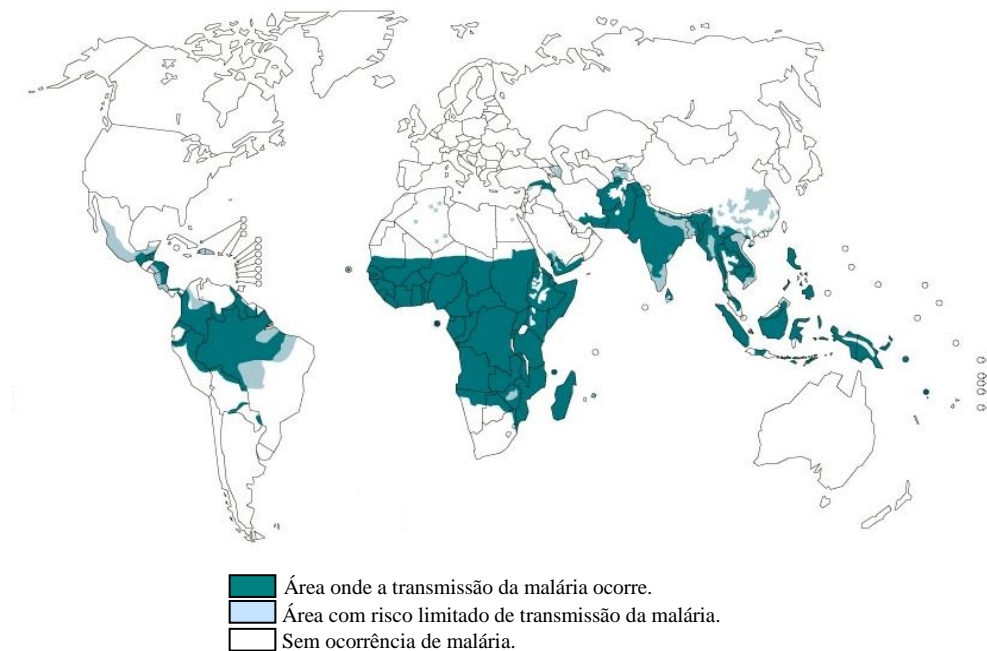
Posteriormente aos efeitos decorrentes da doença, o paciente retorna à sua vida habitual. Assim, depois de um ou dois dias, o quadro calafrio/febre retorna por semanas até que o paciente, não tratado adequadamente, melhore espontaneamente ou venha a óbito decorrente de complicações renais, pulmonares, ou coma cerebral no caso da malária cerebral. Tratado a tempo, só excepcionalmente morre-se de malária (CAMARGO, 2003; FRANÇA *et al.*, 2008; GARCIA, 2010).

Essa doença é causada por uma ou mais espécies do gênero *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*). Assim, a mesma continua a ser um problema global devastador, com 350-500 milhões de casos registrados e uma estimativa de dois milhões de mortes anualmente, em que 80% delas estão na África subsaariana. Aproximadamente metade da população mundial vive em áreas de risco de transmissão da doença (WORLD MALARIA REPORT, 2013).

A ocorrência de malária no mundo é apresentada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), que registra as áreas endêmicas ou de transmissão, bem como as áreas com riscos limitados e as áreas sem ocorrência da malária, como pode ser visualizado na figura 1. Assim, 88 países foram classificados pela OMS em 2004 como áreas naturais de transmissão pelo

mosquito, sendo que a maioria desses países está localizada na faixa tropical do planeta (FIOCRUZ, 2013).

Figura 1- Distribuição global da malária



Fonte: WHO, 2013

Nesse contexto os maiores casos de ocorrência de malária no mundo ainda são localizados no continente Africano, que conforme a FIOCRUZ:

Entre eles estão à maioria dos países africanos localizados abaixo do Deserto do Saara; os países da América Central e Caribe, do Sul e do Sudeste da Ásia, do Oriente Médio e do Extremo Oriente (China), Papua Nova Guiné, Ilhas Salomão e Vanuatu, além do Paraguai e todos os países amazônicos da América do Sul (Brasil, Bolívia, Peru, Equador, Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa). No Brasil, a sua grande área endêmica é formada por todos os estados da Amazônia Legal. São eles: Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia e Roraima, além das regiões a oeste do Estado do Maranhão, ao noroeste do Estado do Tocantins e ao norte do Estado do Mato Grosso. O Brasil tem raros registros de casos de transmissão natural de malária em áreas de Mata Atlântica na região sudeste e no Vale do Rio Paraná. (FIOCRUZ, 2013)

De acordo com dados da OMS, em 2008 no Brasil foram registrados mais de 315 mil casos de malária (FRANCISCO; VARGAS, 2010). Aproximadamente 1,0 a 2,5 milhões de pessoas morrem de malária no mundo, da qual as principais vítimas são crianças. (FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008).

Segundo Francisco e Vargas (2010) o maior índice de mortes ocorre nos países em desenvolvimento, sendo a África com o maior número de casos. Essas ocorrências são propícias à proliferação do agente transmissor devido à falta de saneamento básico em áreas de grande aglomerados e áreas isoladas sem acesso aos serviços de saúde para o controle e prevenção da malária.

2.2 RESISTÊNCIA PARASITÁRIA

A resistência à quimioterapia é um dos maiores problemas no controle da atual epidemia de malária, porém nem todas as espécies e cepas de plasmódios são igualmente sensíveis aos medicamentos (FRANÇA *et al.*, 2008). Ela se deve ao princípio da evolução das espécies, em que a presença de fármacos (ou pressão dos fármacos) serve como processo de seleção natural dos parasitos resistentes dentro do hospedeiro, bem como a grande complexidade do ciclo de vida do mesmo, o que provavelmente dificulta o estabelecimento de uma terapia antimalárica eficaz e segura (VALE; MORREIRA; GOMES, 2005; FRANÇA *et al.*, 2008).

De acordo com Barata (1995) na década de 70, foi criada, pelo campo do conhecimento científico uma proposta para erradicar a malária. Foram estabelecidos dois tipos de movimentos de pesquisa: um analisava procedimentos clínicos e biológicos para compreender e detalhar o processo infeccioso da malária e a outra vertente revisava os conceitos existentes contra a doença e o foco.

As novas descobertas e as revisões dos conhecimentos existentes chegaram a conclusões importantes como:

Os estudos entomológicos mostraram, por exemplo, que a infectividade dos esporozoítas não é constante durante o ciclo de vida do vetor, caindo significativamente a partir da terceira semana, assinalando assim a importância dos portadores nas fases iniciais da infecção. As diversas espécies de plasmódios também têm infectividade variável, decrescendo do *P. falciparum* para o *P. ovale*, conhecimento importante para a compreensão da fórmula parasitária (BARATA, 1995, p. 131).

Com isso, percebe-se através dos resultados dos estudos das pesquisas parasitológicas que algumas formas exoeritrocitárias continuam no organismo do hospedeiro, proporcionando, assim, recaídas (REY, 1991; BARATA, 1995). Entretanto, os estudos direcionaram também para a compreensão da resistência dos plasmódios aos fármacos devido à padronização dos testes *in vitro* e os critérios estabelecidos pela OMS para o controle e erradicação da malária (OMS, 1986; BARATA, 1995).

Segundo Craft (2008), a resistência adquirida pelo parasito seria, principalmente, devido às mutações espontâneas. Além disso, acredita-se que os antimaláricos utilizados na clínica exerçam alguns efeitos mutagênicos sobre os plasmódios. Porém, essa resistência também parece ser devida à pressão seletiva, a qual é desenvolvida sobre as populações de parasitos sensíveis, bem como de parasitos resistentes de uma determinada espécie, pelos medicamentos em uso, os quais acabam por eliminar os parasitos das espécies mais sensíveis.

Há indícios da ocorrência de uma adaptação do parasito em presença de cada fármaco, desta forma os plasmódios tendem a desenvolver um mecanismo fisiológico o qual estimula as células hospedeiras a compensar as carências metabólicas do próprio parasito, que foi decorrente da exposição pelos medicamentos, haja vista que a ação do fármaco consiste apenas em exercer uma pressão seletiva a qual é favorável às cepas resistentes (REY, 2001).

A ampla habilidade de adaptação que os parasitos da malária apresentam está possivelmente evidenciada na grande rapidez com que se desenvolveu, ao longo do tempo. O *P. falciparum*, apresenta maior resistência a praticamente todos os antimaláricos sintéticos desenvolvidos a partir de 1940, como os derivados da quinina. No entanto, o uso inadequado dos medicamentos, bem como a administração incorreta de fármacos que apresentam baixa qualidade, pode contribuir para um possível surgimento de resistência (FRANÇA *et al.*, 2008).

2.3 PfATP6

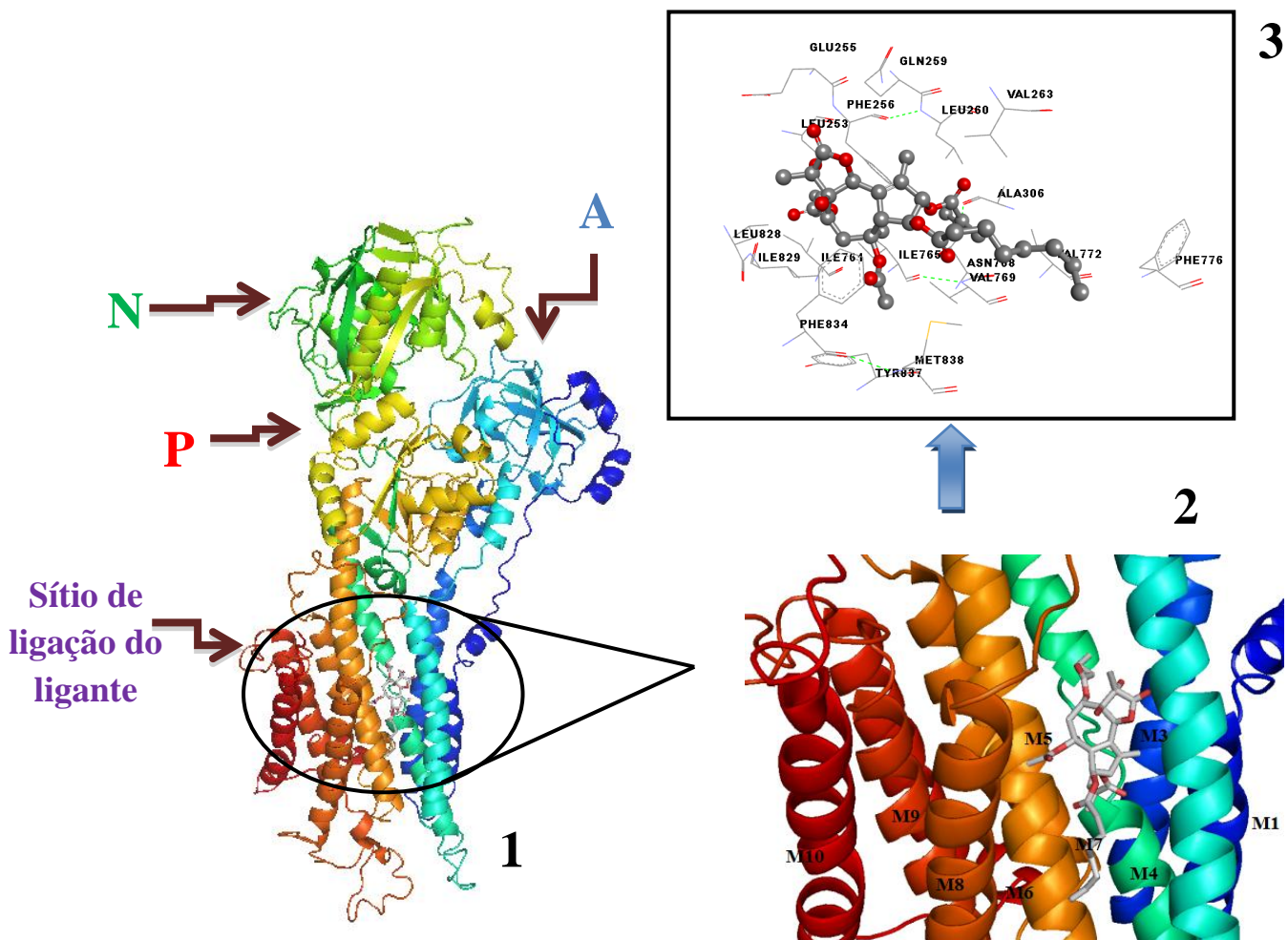
Recentemente um alvo molecular foi identificado como promissor para o desenvolvimento de novos fármacos contra a malária, a proteína (PfATP6), uma bomba de cálcio ortóloga a SERCA (ECKSTEIN-LUDWIG *et al.*, 2003).

As SERCA são proteínas de membrana envolvidas na homeostase do Ca^{+2} . Atuam na regulação do processo intracelular, controlando uma variedade de funções celulares. O gene da SERCA em *P. falciparum* codifica uma sequência de 3.684 nucleotídeos e representa uma

proteína com massa molecular de 139,4 kDa apresentando todos os “*motifs*” sequenciais para a função e estrutura das SERCA, a saber: dois sítios de ligação do Ca^{+2} , um sítio de ligação de nucleotídeo e um sítio de fosforilação, dividindo uma identidade sequencial de 39% com a SERCA humana (PULCINI *et al.*, 2013).

Esta proteína é composta de 10 hélices transmembranares (M1-M10), pequenos *loops* luminais. A parte central é ocupada pelo domínio P, que contém o resíduo de fosforilação (Asp351), o domínio N é o maior dos três, podendo ligar ao domínio A, este por sua vez, é conectado à região transmembrana por três longos *loops* e é quase isolado, conforme pode ser visualizado na figura 2.

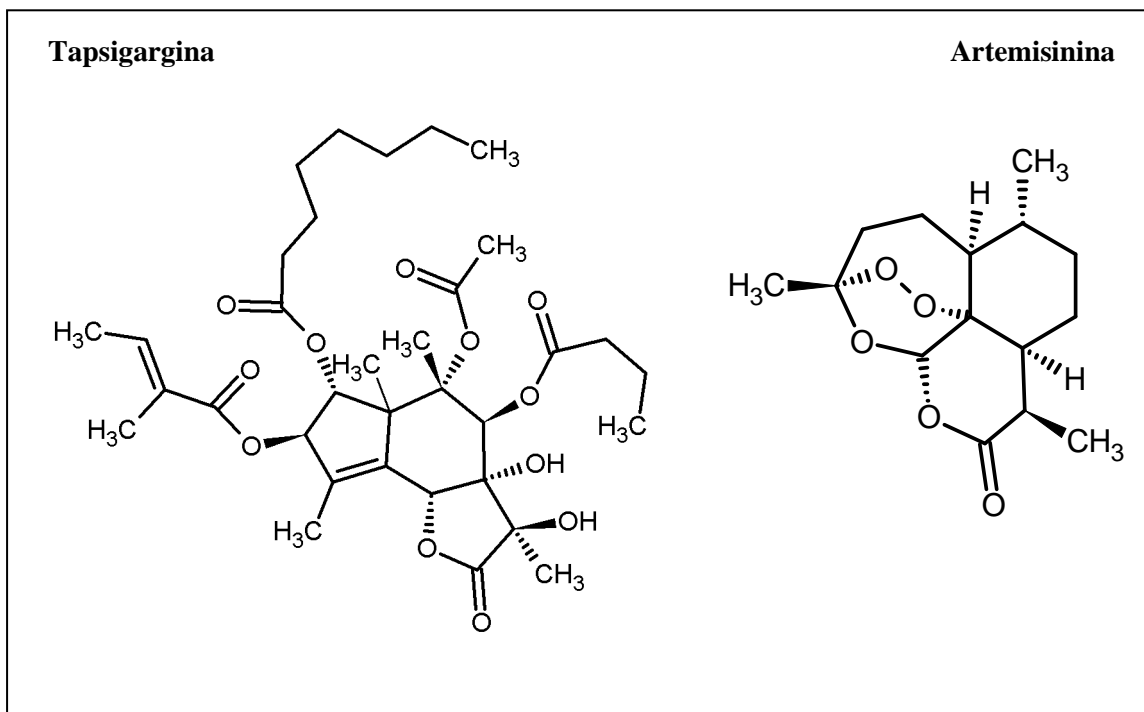
Figura 2 - Modelo estrutural de uma ATPase- Ca^{+2} (PDB ID: 1IWO). (1) Estrutura da proteína com seus domínios principais (P, N e A), (2) Região de ligação para o ligante Tapsigargina entre as hélices transmembranar (M1-M10), (3) Resíduos do reconhecimento molecular.



Os domínios descritos são o domínio de nucleotídeo (N), domínio de fosforilação (P), domínio atuador (A). Círculo marcado é a região transmembranar incluindo 10 hélices (M1-M10), sendo entre a M3, M5 e M7 o sítio de ligação do ligante.

Em estudo posterior, Krishna e colaboradores (2008) também apontaram a PfATP6 como alvo molecular para a artemisinina (KRISHNA, S. *et al.*, 2008). Nesse mesmo estudo, uma interação antagonista foi relatada entre artemisinina e a tapsigargina (Figura 3), um inibidor específico da SERCA.

Figura 3 - Estrutura da tapsigargina e artemisinina



A tapsigargina é uma lactona sesquiterpênica similar à artemisinina, que potencialmente inibe tanto as SERCA de mamíferos quanto do parasito *Plasmodium* spp. Essa molécula aumenta os níveis de concentração citosólica de cálcio, bloqueando a habilidade da célula para bombear cálcio para o retículo sarco/endoplasmático, acarretando em depleção de cálcio nessas zonas de estoque (DE PILLA VAROTTI *et al.*, 2008; OLESEN *et al.*, 2007; TOYOSHIMA; NOMURA, 2002), o que pode, secundariamente, ativar canais de cálcio na membrana plasmática, permitindo um influxo de cálcio para o citosol. Desse modo, foi sugerido que a artemisinina interage com uma região da PfATP6, que é semelhante ao sítio de ligação da tapsigargina. Nesse sentido, foi evidenciado que existe uma inibição competitiva

entre essas estruturas químicas no sítio ortostérico da PfATP6 (KRISHNA, SANJEEV *et al.*, 2010).

2.4 QUÍMICA COMPUTACIONAL

A Química Computacional é um segmento da Química que utiliza das técnicas computacionais para criar modelos de sistemas químicos reais. Seu enorme progresso nas últimas décadas foi um fator decisivo para o desenvolvimento das mais variadas áreas da ciência (LOURENÇO, 2009).

A aplicação da química computacional na obtenção de modelos moleculares, na perspectiva de realizar simulações moleculares, tem se apresentado como uma ferramenta de inegável utilidade, sendo em alguns casos mandatória. A abordagem computacional possibilita a efetivação de testes que agilizam o processo manual que conseqüentemente acarreta em uma economia considerável nos custos relativos à produção de novos fármacos (FOESMAN; FRISCH, 1996; LOURENCO, 2009).

De acordo com Almeida (2013) atualmente, a química medicinal através da química computacional tem a informática como uma importante aliada no processo de desenvolvimento de fatores farmacocinéticos e toxicológicos de substâncias para a produção de novos fármacos, onde podem ser estudados virtualmente.

Vários processos enzimáticos são analisados através de métodos de simulações computacionais, direcionando importantes mecanismos de catálise covalente, contribuição energética da estrutura proteica pré-organizada e compreensão das complexas interações nas catálises enzimáticas (HU, YANG, 2009).

Nesse sentido, os métodos computacionais modernos têm contribuído na qualidade e quantidade de diferentes e distintas subunidades das variadas estruturas dos fármacos. Assim como as de natureza eletrônica, estérica ou de reconhecimento molecular representado pelos sítios receptores (VIEGAS JUNIOR, 2006; ALMEIDA, 2013).

2.5 TRIAGEM VIRTUAL

A triagem virtual é uma metodologia que contribui no processo de descoberta de novos fármacos. De forma geral, este método é baseado em análise computacional, o qual possui ferramentas de seleção e filtragem que têm sido usadas para examinar moléculas individuais ou bibliotecas de moléculas. Essa técnica tem por objetivo reduzir grandes números de compostos a subconjuntos menores com maior chance para conter ligantes biologicamente ativos, além de eliminar as estruturas indesejadas (SCHNEIDER, *et al*, 2002). Esta técnica é uma abordagem complementar ao HTS (*High-Throughput Screening*) e apresenta elevada importância econômica para a indústria farmacêutica, sendo extremamente valiosa para a identificação de pequenas moléculas em etapas iniciais do processo de descoberta de novos fármacos (GOODNOW JUNIOR, 2006).

Existem vários critérios através dos quais estruturas podem ser filtradas em um ensaio de triagem virtual. Pode-se utilizar modelos matemáticos tais como equações de regressão linear para prever a atividade biológica de cada estrutura. Se a estrutura da proteína alvo for conhecida, programas de acoplamento molecular podem ser utilizados para identificar estruturas que possam se ligar ao sítio ortostérico (FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2011).

O primeiro passo para o desenvolvimento da triagem virtual é a seleção do alvo molecular. Após esta etapa o próximo passo é a organização de uma ou mais bases de dados de compostos. A geração de bases de dados é influenciada por vários fatores, como por exemplo, as propriedades moleculares e físico-químicas. Basicamente a triagem virtual fornece uma predição do modo de ligação de diferentes ligantes presentes em bases de dados virtuais, frente a um alvo biológico estruturalmente definido (REDDY *et al*, 2007).

Existem duas estratégias para a identificação de novos ligantes a partir de métodos de triagem virtual: uma baseada na estrutura tridimensional do alvo biológico, através de um processo de reconhecimento molecular por complementaridade e outra, baseada na estrutura dos ligantes, através de um processo de similaridade estrutural dos compostos biologicamente ativos (SEIFERT; WOLF; VITT, 2003). As técnicas baseadas na estrutura do receptor tornaram-se amplamente utilizadas com o advento de grandes quantidades de informação de alvos biológicos provenientes de técnicas cristalográficas, que terão um papel principal no processo de desenvolvimento de fármacos (PEI; WANG; LIU, 2006). Assim, o emprego de métodos de ensaios virtuais robustos, utilizando-se alvos moleculares bem definidos é muito

importante para a identificação de novas moléculas bioativas (ALVAREZ; SCHOICHET, 2005).

2.6 ACOPLAMENTO MOLECULAR

O acoplamento molecular é uma ferramenta computacional que permite a predição da atividade de um ligante frente a um determinado alvo proteico de interesse. Para um complexo de proteína e inibidor, esse mecanismo tem como objetivo demonstrar a correta predição da conformação de ligação, a qual deve estar fundamentada nas condições geométricas de equilíbrio, e, por conseguinte, obter a afinidade de ligação (PATRICK, 2009).

O processo de acoplamento molecular é subdividido em duas principais etapas: posicionamento e pontuação. A função de posição é primeiramente conduzida por algoritmos que objetivam posicionar corretamente o ligante no sítio de ligação da proteína. Para cada posicionamento é aplicada uma função de pontuação para avaliar se a conformação alcançada é a melhor possível, através dos parâmetros energéticos obtidos do sistema. O processo é complexo devido aos numerosos graus de liberdade conformacional das moléculas em estudo (KITCHEN *et al.*, 2004).

O entendimento de como ligantes se orientam em um ambiente protéico (por exemplo, proteínas, receptores nucleares, entre outros), com o intuito de estudar o perfil de inibição ou ativação é de fundamental importância para o desenvolvimento de novos fármacos e/ou produtos, sendo utilizados por indústrias farmacêuticas e alimentícias (SOUZA; FERNANDES; RAMOS, 2006).

Segundo Kitchen *et al.*, (2004) no planejamento de experimento de acoplamento molecular é de suma importância que exista a estrutura do receptor elucidada experimentalmente ou desenvolvida por modelagem comparativa. Além disso, é fundamental identificar o sítio de ação para melhor complementaridade no encaixe fármaco-receptor, sendo utilizados algoritmos de busca para predizer a orientação do ligante no sítio ortostérico do receptor. Há três subtipos de algoritmos de busca sistemática ou dirigida, a saber: métodos de busca conformacional, os métodos de construção de fragmentação ou incremental, e métodos de banco de dados. Todos eles têm em comum que os algoritmos tentam explorar todos os graus de liberdade do ligante, porém o mecanismo de busca é diferente.

Neste contexto, os algoritmos de busca conformacional tentam obter todas as conformações do ligante possíveis, submetendo todas as ligações que podem ser giradas em 360° a partir de ponto fixo. Um dos principais problemas dessa metodologia é que o número

de conformações do ligante que pode ser gerada aumenta exponencialmente com o número de ligações passíveis de rotações sendo necessárias várias restrições sobre o ligante para reduzir o problema de explosão combinatória (IRWIN; RAUSHEL; SHOICHET, 2005).

A função de ranqueamento de conformações preditas do ligante é um aspecto crucial da triagem virtual baseada na estrutura. Mesmo quando as conformações são corretamente previstas, os cálculos não farão realmente efeito caso não consigam diferenciar os falsos positivos das conformações mais estáveis. Sendo assim, a construção de funções de ranqueamento confiáveis e rápidos o suficiente para avaliarem centenas ou milhares de ligantes em poucos minutos é de suma importância. Este fato tem levado ao desenvolvimento de um grande número de funções que fazem uso de aproximações para a avaliação da constante de afinidade de um complexo receptor-ligante (KITCHEN *et al.*, 2004).

De forma geral, os comandos de acoplamento molecular são formados através da combinação dos componentes: algoritmo de busca e função de score. Assim, o algoritmo é usado na busca de prováveis modos de ligação, permitindo explorar os graus de liberdade translacional, rotacional e também conformacional do ligante, além de ligações rotacionáveis feitas na proteína. Dessa forma, a função de score é aplicada para tentar distinguir os modos de ligação explorados pelo algoritmo de busca e, dessa forma, ordenar os diferentes modos de ligação apresentados. Essas funções de score podem ser estabelecidas de acordo com campos de força de mecânica molecular e de parâmetros empíricos de cálculos de energia (TAYLOR; JEWSBURY; ESSEX, 2002).

As funções de pontuação, de modo geral, os campos de força padrões quantificam a soma de dois tipos de energia: a energia de interação entre o receptor e o ligante e a energia interna do ligante. As energias por sua vez, são avaliadas por meio de uma combinação de termos eletrostáticos e de Van der Waals (WEBER, 2008). Assim sendo, uma função de pontuação que funciona bem para moléculas de uma mesma série frente a um dado alvo biológico, pode não ser eficaz da mesma forma para compostos de séries distintas (LEACH; SHOICHET; PEISHOFF, 2006). No entanto, existem algumas limitações das funções de pontuação que incluem características próprias do complexo ligante-receptor, simplificações e aproximações de cálculos, solvatação e contribuições entrópicas em diferentes sistemas (MOITESSIER *et al.*, 2008).

Após a aplicação da função de pontuação, a pose do ligante tem sua energia total calculada e os valores de energia são armazenados em arquivos de resultados. O algoritmo propõe uma nova pose, de forma randômica e o processo é reiniciado, repetindo-se este processo até que um número elevado de poses tenha sido testado (CANTO, 2011).

Os estudos de acoplamento molecular para sistemas com metais ainda é um limitante nos ensaios virtuais. A maioria dos algoritmos implementados nos programas de acoplamento não conseguem com acurácia definir a melhor geometria de encaixe entre um ligante e metaloproteínas, provavelmente porque a maioria dos métodos não estão parametrizados devido ao comportamento eletrônico dos metais, como interações eletrostáticas e outras interações não covalentes (IRWIN; RAUSHEL; SHOICHET *et al.*, 2005).

Por outro lado, as limitações do acoplamento molecular como ferramenta de triagem têm sido amplamente discutida, uma vez que alguns resultados apresentam imprecisão, principalmente nos termos de solventes relacionados, bem como a flexibilidade da proteína (OKIMOTO *et al.*, 2009). Alguns métodos de acoplamento molecular são alternativas para resolver este problema, pois tratam ambos (proteína e ligante) de uma forma flexível, permitindo o relaxamento do sítio de ligação em torno do ligante (AQVIST *et al.*, 2002; HOU *et al.*, 2011; OKIMOTO *et al.*, 2009).

2.7 PRODUTOS NATURAIS

2.7.1 Conceitos gerais

As plantas oferecem uma variedade de moléculas que apresentam efeitos diferentes na homeostasia humana. Essas moléculas chamadas de metabólitos secundários têm sido amplamente reconhecidas como uma importante fonte da maioria dos componentes ativos de medicamentos terapeuticamente eficazes (CALDEIRON *et al.*, 2009).

A diversidade biológica não é uniformemente distribuída em todo o planeta. As florestas tropicais do mundo são um dos biomas mais ricos em espécies, e provavelmente incluem mais da metade do número de espécies na Terra, estando distribuídos em apenas 11 países: Austrália, Brasil, China, Colômbia, Equador, Índia, Indonésia, Madagascar, Peru, México e Zaire (CALDERON *et al.*, 2009).

O Brasil é detentor de uma grande diversidade, destacando-se por possuir aproximadamente 2.000.000 espécies distintas entre animais, vegetais e microrganismos, abrangendo uma enorme complexidade, difundidos no mais variados tipos de ecossistemas (SANDES; DI BLASI, 2006), possuindo enorme potencial para a descoberta de medicamentos baseados em produtos naturais.

O Semiárido baiano apresenta uma biodiversidade vegetal, dispondo de enorme potencial como fonte de novos fármacos, a qual vem despertando a cobiça de laboratórios de pesquisa das empresas farmacêuticas. Diante desta realidade, vários estudos de bioprospecção dos nossos biomas vêm sendo incrementados objetivando a busca racional de produtos de valor agregado (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

As plantas medicinais, em sua grande maioria, vêm, há milhares de anos, sendo utilizadas como forma de tratamentos tradicionais para várias doenças humanas. Ainda hoje elas são utilizadas nas zonas rurais de alguns países em desenvolvimento como fonte primária de tratamento de doenças, sendo que cerca de 80% das pessoas utilizam medicamentos tradicionais para os cuidados de saúde (FIRENZOULI *et al.*, 2005).

As mais antigas civilizações utilizavam as plantas como fonte de alimento e medicamentos, sendo que isso se perpetua aos dias atuais. No entanto, a partir do século passado, a síntese passou a ser o principal produto da indústria farmacêutica. Assim, vários fármacos são provenientes de uma molécula pura, originada de síntese, desenvolvida a partir de um protótipo estrutural obtido da extração de um produto natural. (ALVES, 2007)

As plantas medicinais embora dotadas de substâncias com agregado potencial num total de 420 mil espécies vegetais conhecidas representam uma reserva praticamente inexplorada, com menos de 5% investigadas para interesse biológico. É inegável a riqueza de novas entidades moleculares contidas na biodiversidade brasileira e que ainda podem ser descobertas (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003).

No que se refere à diversidade vegetal brasileira estima-se cerca de 350 a 550 mil espécies, das quais apenas aproximadamente 55 mil foram catalogadas (SIMÕES *et al.*, 2001). Dentro desse leque único de riquezas biológicas, o país também se destaca em outro aspecto no que diz respeito às plantas: as florestas brasileiras guardam um número significativo de espécies que têm fins terapêuticos e medicinais. Assim, o Brasil possui um imenso potencial genético a ser explorado e estima-se que esse patrimônio vegetal represente cerca de 16,5 bilhões de genes. Sendo assim, o Brasil se destaca ao considerar a perspectiva de obtenção de novas moléculas bioativas, pois este é o país com maior biodiversidade mundial possuindo 22% de todas as espécies biológicas do mundo, com elevado potencial ainda a ser explorado sob o ponto de vista químico-farmacológico (CORRÊA-JÚNIOR, 1994; QUINTAS – JUNIOR, *et al.*, 2008).

No decorrer dos últimos anos, os centros de pesquisa envolvendo plantas medicinais vêm se destacando no Brasil. Entre 2003 a 2008 foi apresentado um total de 25 pedidos de patentes de composição farmacêutica a base de plantas medicinais, a saber: *Copaifera genus*,

Cordia verbenacea, *Erythrina mulungu* e *Physalis angulata*. Existe ainda um grande número de pesquisas em desenvolvimento, sendo boa parte voltada na avaliação do potencial terapêutico de metabolitos secundários tais como: flavonoides, alcaloides, triterpenos, taninos, lignanas, entre outros (BALBANI, *et al.*, 2009).

2.8 LEVANTAMENTO BOTÂNICO

2.8.1 A família *Leguminosae*

A família *Leguminosae* (*Fabaceae*) é pertencente à divisão das Angiospermas, classe Dicotiledônea e da ordem das Rosales, sendo tradicionalmente dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Faboideae e Mimosoideae. Esta família compreende cerca de 650 gêneros e 18000 espécies distribuídas em todo o mundo, sobretudo nas regiões tropicais e subtropicais. É a terceira maior família entre as dicotiledôneas, sendo superada apenas por Asteraceae e Orchidaceae, e é a maior família dentro da ordem Rosales (WARWICK; LEWIS, 2003).

Nas análises químicas, esta família apresenta-se particularmente rica em flavonoides e compostos biossinteticamente relacionados, a exemplos os rotenoides e isoflavonoides. Além destas substâncias, também são encontradas os alcaloides, terpenoides e esteroides, sendo os taninos em baixa frequência se comparado aos flavonoides (CINTRA, *et al.*, 2005).

São plantas que apresentam hábitos variados, diversificando desde árvores das matas tropicais, a arbustos, subarbustos, ervas anuais ou perenes além de muitas trepadeiras. Estas plantas têm capacidade para desenvolverem-se nos mais variados tipos de ambientes e em diferentes latitudes e altitudes (LORENZI, 2008).

2.8.2 O gênero *Cenostigma*

A subfamília *Caesalpinioideae* compreende cerca de 150 gêneros, tendo destaque no Brasil. O gênero *Cassia* é o de maior número em espécies, popularmente suas espécies são conhecidas como: fedegoso (*C. spectabilis*), cigarreira (*C. multijuga*) mata-pasto (*C. tora*), sene (*C. angustifolia*), chuva-de-ouro (*C. ferruginea*). As *Caesalpinia*, sendo representante o Pau-Brasil (*C. echinata*); a *Bauhinia* ou pata-de-vaca (*B. bongardi*); e as *Copaifera*, copaíba (*C. duckei* Dwyer) e outras (LORENZI; ABREU, 2002; LIRA, 2010).

O gênero *Cenostigma* é constituído por duas espécies de hábitos arbóreos e arbustivos, sendo: *C. macrophyllum* Tul. (sinonímia *C. gardnerianum*), *C. tocaninum* Ducke. A espécie *C. macrophyllum* do bioma Caatinga foi classificada até recentemente como sendo outra espécie: *Cenostigma gardnerianum* Tulasne. (WARWICK; LEWIS, 2009).

Cenostigma macrophyllum Tul. é conhecida popularmente por caneleiro, canela-de-velho, maraximbé ou fava-do-campo e ocorre nos estados de Mato Grosso, Pará, Rondônia, Tocantins, Goiás, Minas Gerais, Maranhão, Ceará, Pernambuco, Bahia e Piauí (FREIRE, 1994). Representante da subfamília *Caesalpinioideae*, incluída na tribo *Sclerolobieae*, sendo uma árvore que chega a 20m, com a superfície do caule provida de sulcos, a floração acontece de agosto a fevereiro, apresentando flores amarelas e levemente perfumadas, reunidas em inflorescências, com pétala inferior mediana menor, frutífera de fevereiro a junho, sendo o fruto um legume plano e achatado (WARWICK; LEWIS, 2003).

A beleza, decorrente das flores amarelas (Figura 4), a faz ser empregada como planta ornamental. Na cidade de Teresina, capital do Piauí foi escolhida, através de decreto municipal nº 2.407, de 13.08.93, como a árvore símbolo da cidade.

Figura 4 – Folhas e caule de uma espécimen de *Cenostigma macrophyllum*



Folhas e Flores



Caule

Fonte: LORENZI, 2008

Esta espécie *C. macrophyllum* é considerada como importante fonte de recursos para os pequenos agricultores do sertão, por ser uma árvore resistente a déficits hídricos e solos salinizados. Sendo utilizada como forrageira para agregar nutrientes ao solo, na alimentação dos animais e, como madeira. Considerada de fácil propagação por sementes, porém necessita de umidade para germinação (RIBEIRO; PELACINI, 2006).

Em levantamento etnobotânico, realizado na região do semiárido piauiense, consta que as cascas do caule, folhas e flores da *C. macrophyllum* são usadas popularmente para o tratamento de doenças estomacais e intestinais. Estudos com extrato e frações das folhas desta espécie revelaram a presença de atividades diversas, dentre as quais destaca-se: antioxidante (SOUSA *et al.*, 2007), inibidora de glicação protéica (REIS; MARANHÃO; BRITO, 2002), antiinflamatória, antinociceptiva, antibacteriana e antiulcerogênica (PEREIRA *et al.*, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2002).

O estudo fitoquímico das folhas de *Cenostigma macrophyllum* possibilitou a obtenção de biflavonas e triterpenoides (SANTOS, 2001; COSTA, 2005). A avaliação química da casca do caule levou ao isolamento e identificação da dilactona do ácido valoneico, ácido elágico, colesterol, campesterol e sitosterol, mostrando uma predominância de esteroides e compostos relacionados a taninos. Outras espécies desta família são ricas em substâncias de outros grupos fitoquímicos, tais como, antraquinonas, polissacarídeos, lipídios, triterpenos, diterpenos, esteroides, taninos, além de flavonoides (ROCHA *et al.*, 2007).

2.9 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A necessidade de mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. As informações analíticas não confiáveis podem direcionar a determinações desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação (RIBANI, 2004).

As técnicas de separação, tais como cromatografia gasosa (GC), cromatografia a líquidos de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (CE), vêm se destacando na química analítica pela capacidade de realizarem análises qualitativas e quantitativas em amostras ambientais, farmacêuticas, biológicas e em alimentos. Assim, os resultados da validação do

método podem ser usados para julgar a qualidade, confiabilidade e consistência dos resultados analíticos. A validação é parte integrante de toda boa prática analítica (BURGESS, O'DONOHUE; GRIL, 2000).

No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), através da Resolução – RE Nº 899, de 29 de maio de 2003, regulamenta o guia para avaliação de métodos analíticos e bioanalíticos.

Nesse sentido, outros órgãos também estabelecem parâmetros de validação, podendo também ser consultados em processo de validação, entre estes estão: Food and Drug Administration (FDA), o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), a International Conference on Harmonisation (ICH) (em português Conferência Internacional de Harmonização) e a Farmacopeia dos Estados Unidos (USP).

De acordo com a RE nº 899, a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade e seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão e robustez adequadas à análise (BRASIL, 2003).

2.9.1 Seletividade

Refere-se à capacidade que o método possui para medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como: impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003).

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método. Algumas amostras podem sofrer degradação, gerando compostos que não foram observados inicialmente, que podem coeluir com a substância de interesse (RIBANI, 2004).

Como os métodos cromatográficos não produzem respostas apenas para um analito de interesse, mas também para outras substâncias de interesse, o termo seletividade é sempre mais apropriado neste contexto que especificidade. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão comprometidas (RIBANI *et al* 2004).

Assim, a seletividade pode ser obtida de inúmeras formas. A primeira é fazendo a comparação da matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância (padrão), nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da

substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra (SHABIR, 2003; RIBANI, *et al.*, 2004; ICH, 2005).

Outra forma de obter a seletividade é através da avaliação com detectores modernos (arranjos de diodos, espectrômetros de massas), os quais comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão e utiliza-se isto como uma indicação da presença do composto puro. Sendo assim, estas duas maneiras são as mais utilizadas (VESSMAN, *et al.*, 2001; RIBANI *et al.*, 2004).

A adição de padrão também pode ser aplicada para os estudos de seletividade, no entanto, este método é utilizado quando não é possível obter a matriz isenta da substância de interesse. Assim, é feita a curva analítica com adição da substância de interesse na amostra e comparada com uma curva analítica sem a presença da matriz. Para tanto, compara-se então as duas curvas analíticas e caso elas sejam paralelas, pode então dizer que não há interferência da matriz na determinação da substância de interesse, portanto o método é seletivo (RIBANI *et al.*, 2004).

Outro procedimento para avaliar a seletividade é através da coleta do composto de interesse e realização de nova análise por outra técnica cromatográfica, ou com métodos e técnicas que são específicos para a estrutura da substância de interesse, como por exemplo, espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear, espectroscopia no infravermelho ou bioensaios específicos (SHABIR, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

2.9.2 Linearidade

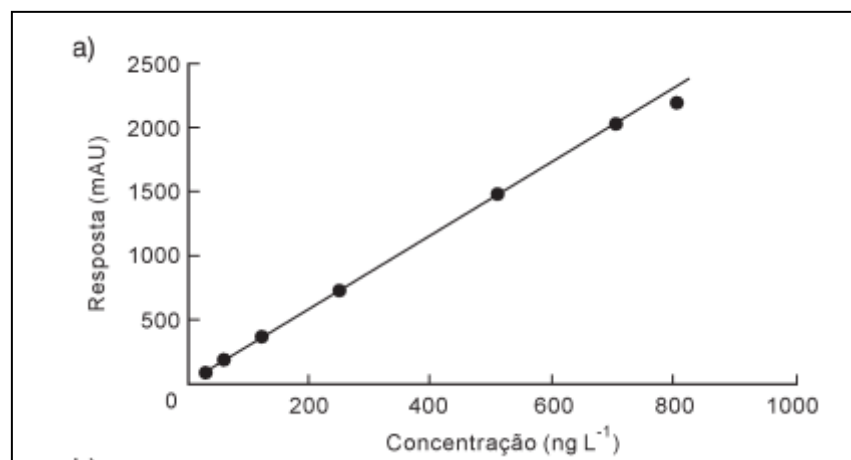
É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Neste caso, recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes (BRASIL, 2003).

Os dados podem ser tratados por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados dos pontos médios de três curvas de calibração autênticas, sendo o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação linear (R^2) deve ser igual a 0,99 para métodos analíticos (BRASIL, 2003).

A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada muito raramente é conhecida primariamente. Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações

conhecidas dessa espécie. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação da reta chamada de curva analítica. Um exemplo de curva analítica pode ser visto no Gráfico 1. Embora somente dois pontos definam uma reta, na prática as linhas devem ser definidas por no mínimo cinco pontos que não incluam o ponto zero na curva, devido aos possíveis erros associados (RIBANI *et al.*, 2004).

Gráfico 1 - Curva analítica clássica



Fonte: RIBANI *et al.*, 2004

Matematicamente, a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear. Além dos coeficientes de regressão **a** e **b**, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação **r**. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI *et al.*, 2004).

Para verificar se a equação de regressão é estatisticamente significativa podem ser efetuados os testes de ajuste do modelo linear, validade da regressão, sua eficiência e sua eficiência máxima. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 são considerados como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003).

2.9.3 Intervalo

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método. É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequadas quando aplicados às amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado.

2.9.4 Precisão

A precisão, de acordo com a ANVISA (2003), é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é dividida em três níveis:

Repetibilidade (precisão intra-corrída): concordância entre os resultados dentro de curto período de tempo com o mesmo analito e mesma instrumentação. Sendo assim, a repetibilidade do método é verificada por no mínimo nove determinações, ou seja, três concentrações: baixa, média e alta, com três replicas cada ou no mínimo de seis determinações a 100% da concentração teste.

Precisão intermediária (precisão inter-corrída): concordância entre aos resultados do mesmo laboratório, porem obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. É recomendável o mínimo de dois dias com analistas diferentes.

Reprodutibilidade: concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados a padronização de metodologia analítica. A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a equação 1. Em que DP é o desvio padrão e CMD a concentração média determinada. Não se admite valores superiores a 5% para métodos analíticos e 15% para métodos bioanalíticos.

Equação 1 - Cálculo do Desvio Padrão Relativo.

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

2.9.5 Limite de Detecção (LD)

É a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas. O limite de detecção é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável (BRASIL, 2003). Em CLAE, a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação três vezes o ruído da linha de base (BRASIL, 2003). Pode ser determinado pela equação 2. Em que DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo y e de no mínimo, três curvas de calibração construídas com as concentrações do fármaco próximas a o suposto limite de quantificação e IC é a inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2003).

Equação 2 - Cálculo do Limite de detecção.

$$LD = \frac{DPa}{IC} \times 3,3$$

2.9.6 Limite de Quantificação (LQ)

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003).

O Limite de Quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2003). Pode ser expresso pela equação 3: Em que DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo y e de, no mínimo, três curvas de calibração construídas com as concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação e IC é a inclinação da curva de calibração, Também pode ser determinado por meio do ruído, considerando a concentração que produz a relação sinal-ruído superior a 10:1 (BRASIL, 2003).

Equação 3 - Cálculo do Limite de quantificação.

$$LQ = \frac{DPa}{IC} \times 10$$

2.9.7 Exatidão

É a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003). A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescido dos intervalos de confiança (BRASIL, 2003).

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (BRASIL, 2003).

2.9.8 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Constatando-se a susceptibilidade do método às variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (BRASIL, 2003).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 TRIAGEM VIRTUAL E ACOPLAMENTO MOLECULAR

Para a busca pelas moléculas que possam atuar sobre o controle da malária foi utilizado o modelo do receptor PfATP6 construído por modelagem comparativa por Leite, (2008). Foi utilizado o banco de estruturas NatProDB, construído pelo Laboratório de Modelagem Molecular (LMM) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Este banco possui 550 estruturas depositadas, sendo todas oriundas do semiárido baiano.

3.1.1 Preparação dos ligantes

Antes da realização do acoplamento molecular, as 550 estruturas foram submetidas a um filtro molecular utilizando a regra de Lipinski, (1997) através do script Raccoon (FORLI, 2009), este filtro apresenta facilidade de aplicação, permitindo fazer avaliação da capacidade de absorção da molécula em estudo (LIPINSKI *et al*, 1997). Segundo Lipinski, (1997) existem parâmetros que podem ser usados para avaliar o potencial que uma molécula apresenta para ser absorvida por via oral. De acordo com essa regra, a ocorrência de absorção por via oral é mais provável para compostos que apresentem uma combinação de duas ou mais propriedades, tais como peso molecular menor ou igual a 500 Da, número de doadores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 5, número de aceptores de hidrogênio menor ou igual a 10, e ClogP menor ou igual a 5 (coeficiente de partição calculado para o sistema 1-octanol/água). Variações da regra de Lipinski ou de propriedades moleculares orientadas por grupos de ligantes conhecidos podem ser utilizadas para planejar bases de dados mais apropriadas para a triagem virtual (LIPINSKI *et al*, 1997).

3.1.2 Triagem virtual das moléculas no receptor PfATP6

Para iniciar a triagem virtual, foi realizada uma análise detalhada do sítio de ligação e uma compilação de todos os aspectos envolvidos na afinidade e seletividade (TOYOSHIMA; NOMURA, 2002).

Para a construção da região de acoplamento foram utilizadas as coordenadas obtidas a partir da sobreposição entre o molde 1IWO (PDB) e o modelo construído por Leite, (2008).

O molde 1IWO foi escolhido para este estudo por apresentar resolução (3,1Å) e possuir (45%) de identidade com o modelo utilizado neste estudo. Após a sobreposição das duas proteínas, com base no alinhamento entre os sítios ortostéricos, a estrutura 1IWO foi retirada e as coordenadas atômicas dos substratos da proteína permaneceram no sítio ortostérico do modelo.

A triagem virtual foi realizada pelo programa AutoDock Vina 1.1.2, que utiliza o algoritmo *Iterated Local Search Global Optimizer* para a busca global estocástica, com isso uma sucessão de passos com mutação e otimização local (pelo método *Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (BFGS)* são conduzidas, sendo que cada passo obedece ao critério Metrópolis, esse por sua vez resulta em aumento da função objetivo, visando facilitar a obtenção do ótimo global (TROTT; OLSON, 2010). No intuito de dar consistência aos resultados, a triagem foi realizada em quintuplicata e os resultados retirados de uma média.

A caixa de ancoragem foi definida como um cubo com centro geométrico na região do sítio ortostérico da proteína. Para dar início ao acoplamento molecular, foi construída as coordenadas do centro da caixa de simulação (*grid box*) para o modelo do receptor PfATP6 sendo: $x = -4,61$, $y = -48,422$, e $z = 9,659$ e dimensões $16 \times 14 \times 18$ Å, construída com base na localização espacial do complexo ligante e receptor. Com o intuito de avaliar o sistema foi realizado um reacoplamento utilizando as coordenadas acima citadas. Por fim, os dez compostos que apresentaram melhor energia de afinidade foram tabelados e organizados conforme a energia de afinidade.

Como próximo passo, o programa LigPlot v.1.4.5 foi usado para determinar as interações intermoleculares entre o receptor e os ligantes que foram selecionados a partir da viabilidade de acesso as análises fitoquímicas, além da tpsigargina. O programa LigPlot v.1.4.5 apresenta os resultados através de construção dos mapas de interações em 2D. Este por sua vez gera diagramas esquemáticos de interações receptor-ligante para um determinado arquivo em formato PDB (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1996).

3.2 PARTE EXPERIMENTAL DOS PROCEDIMENTOS FITOQUÍMICOS

3.2.1 Identificação da espécie

Os materiais vegetais (folhas e casca do caule) já secos e pulverizados de um espécime de *Cenostigma macrophyllum* Tul utilizado para o estudo foi cedido pelo Professor Doutor Clayton Queiroz Alves da Universidade Estadual de Feira de Santana. A amostra foi coletada no município de Casa Nova, na Bahia. O espécime foi identificado pelo botânico Prof. Dr. Luciano Paganucci de Queiróz, e sua exsicata depositada no Herbário do Laboratório de Biologia da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) sob o número HUEFS 78.424.

3.2.2 Reagentes e padrões analíticos

Os solventes orgânicos utilizados no preparo dos extratos foram de grau analítico ou HPLC (Merck e Vetec) e água purificada em sistema Milli-Q. O padrão do biflavonoide amentoflavona foi adquirido da Sigma Aldrich e o padrão secundário da agatisflavona foi também cedido pelo professor Dr. Clayton Queiroz Alves.

3.2.3 Preparo dos extratos

3.2.3.1 Extração dos constituintes de *C. macrophyllum*

A metodologia de extração utilizada foi proposta por Yariwake *et al.*, (2005), com adaptações. As amostras das folhas (82,492g) e casca do caule (31,160g) secos e moídos de *C. macrophyllum* foram submetidas à extração com 30mL de metanol e água (2:1, v/v) a 35°C dissolvidos sob ultrassom – lavadora ultrassônica digital (Soniclean 6) da Sanders medical, durante 30 minutos, resultando em (7,724g) de extrato bruto das folhas e (4,750g) de extrato bruto da casca de caule de *C. macrophyllum*. Após o processo de extração foi originado um rendimento de 9,3% das folhas e 15% da casca de caule.

Em seguida esses extratos foram filtrados e o extrato hidrometanólico submetido à partição, foi diluído com uma mistura de 24 mL de clorofórmio-metanol (8:2, v/v), divididos em duas partições dando origem às fases clorofórmica e hidrometanólica para cada um dos extratos. As fases obtidas foram separadas, secas a 50°C em estufa de renovação e circulação de ar, em seguida foram pesadas, rotuladas e armazenadas para análise por CLAE.

3.2.4 Identificação e quantificação de biflavonoides presentes no extrato hidrometanólico e clorofórmico das folhas e casca de caule de *C. macrophyllum*, utilizando CLAE.

A fase hidrometanólica e clorofórmica das folhas e casca de caule de *Cenostigma macrophyllum* foram solubilizados em metanol grau HPLC, transferidos para balões volumétricos de 5 ml. As soluções de concentrações conhecidas foram submetidas à filtração em cartucho C18 de Extração em Fase Sólida (SPE - Solid Phase Extraction) e, em seguida, novamente filtradas, através de membrana microporosa (0,22 μm), diretamente para *vials* identificados para a realização das análises cromatográficas.

Os experimentos cromatográficos foram realizados com sistema HPLC EZChrom Elite, consistindo de bomba VRW HITACHI L-2130, equipado com injetor e detector de arranjo de diodo (DAD) VRW HITACHI L-2455, e forno VRW HITACHI L-2300. A separação cromatográfica foi realizada por meio de coluna LiChroCART Purospher Star® RP18-e (250 mm x 4,6 mm i.d.) (5 μm) (Merck, Darmstadt, Germany) combinado com pré-coluna LiChroCART 4-4 LiChrospher 100RP18 (5 μm) da Merck, pertencente a Laboratório Central da Universidade Estadual de Feira de Santana.

As condições de análise incluíram gradiente de eluição (Tabela 1), utilizando como fases móveis, ácido acético 0,7% em água (v/v, eluente A) e acetonitrila (eluente B). A leitura do detector de arranjo de diodo foi realizada na faixa de 210 a 400 nm e a detecção cromatográfica foi definida em 280 nm.

Tabela 1 - Programação do gradiente de eluição.

Tempo (min.)	% eluente A	% eluente B	Fluxo (mL/min.)
00:00	80,0	20,0	0,8
05:00	80,0	20,0	0,8
15:00	40,0	60,0	1,0
15:10	0,0	100,0	1,0
17:00	0,0	100,0	1,0
17:10	80,0	20,0	0,8
20:00	80,0	20,0	0,8

A identificação dos biflavonoides foi realizada através da comparação dos tempos de retenção dos picos de cada amostra com os picos de retenção dos padrões de biflavonoides, nos cromatogramas obtidos por CLAE, bem como da comparação das absorvâncias dos espectros desses picos, no UV. As análises tanto das amostras quanto dos padrões foram realizadas por meio de injeções em triplicatas. Os resultados obtidos foram submetidos a tratamento estatístico para determinação do teor de cada um dos biflavonoides presentes nas folhas e casca de caule de *C. macrophyllum*.

3.2.5 Validação do método analítico aplicado para quantificação de biflavonoides

O método analítico empregando CLAE foi validado conforme os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

A seletividade foi determinada por meio da comparação de picos dos padrões de biflavonoides (amentoflavona e agatisflavona) com os picos das amostras, levando-se em consideração: tempo de retenção e absorvâncias no espectro de ultravioleta (UV).

A linearidade foi determinada pela curva de calibração, levando-se em consideração o coeficiente de correlação (R^2). A curva de calibração foi obtida por injeções em triplicatas de cinco soluções de diferentes concentrações dos padrões dos biflavonoides identificados na análise qualitativa, a faixa do padrão agatisflavona variou de 60 – 500 $\mu\text{g/mL}$ e a do padrão de amentoflavona de 86 – 344 $\mu\text{g/mL}$. A solução estoque dos padrões externos de agatisflavona e amentoflavona foram preparadas com concentração de aproximadamente 5,13 mg/ml e 10,03 mg/mL, respectivamente.

A precisão ou repetibilidade foi determinada pela injeção em triplicata de três soluções de cada um dos padrões de biflavonoides. Esse parâmetro foi avaliado a partir do cálculo do

desvio padrão relativo (DPR), expresso na Equação 4. Onde, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

Equação 4 - Cálculo do Desvio Padrão Relativo.

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

A exatidão foi verificada pelo fator de recuperação, sendo que amostra de um dos extratos foram fortificadas com três soluções para cada um dos padrões, nas concentrações de 120, 250, 500 µg/mL. As amostras fortificadas, juntamente com amostra de matriz não fortificada (branco), foram submetidas à injeção em CLAE. A exatidão foi avaliada através de valores de concentração determinados experimentalmente, comparados à concentração teórica (Equação 5).

Equação 5 - Cálculo da exatidão através do fator de recuperação.

$$Rec\% = \frac{[valor\ obtido - valor\ real]}{valor\ real} \times 100$$

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram estimados pela relação do desvio padrão e da inclinação da curva de calibração, segundo a Equação 6 e 7, respectivamente. Em que, DP_a é o desvio padrão obtido a partir da curva de calibração; IC é a inclinação da curva de calibração.

Equação 6 - Cálculo do Limite de detecção.

$$LD = \frac{DP_a}{IC} \times 3,3$$

Equação 7 - Cálculo do Limite de quantificação

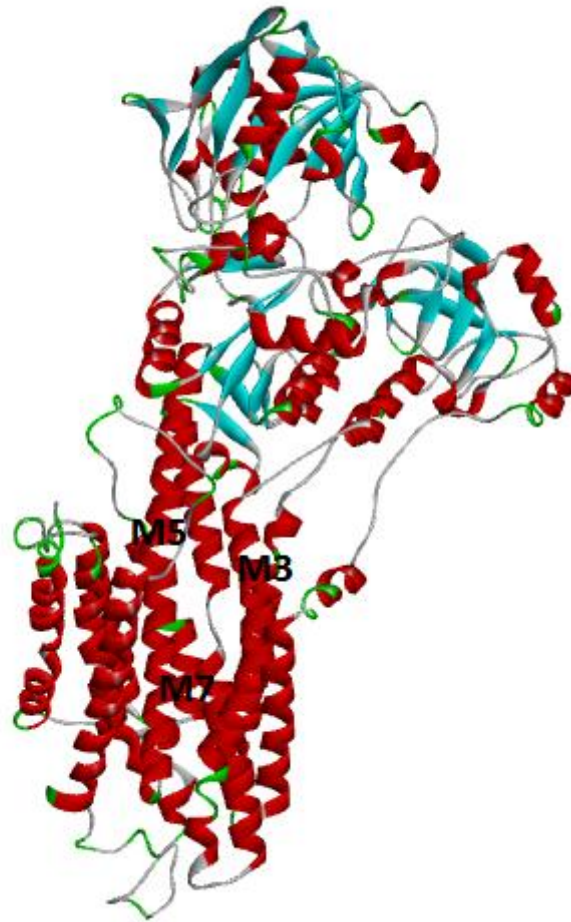
$$LQ = \frac{DP_a}{IC} \times 10$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 SÍTIO ORTOSTÉRICO DO RECEPTOR PFATP6

As informações sobre o sítio ortostérico da proteína são fundamentais para a descoberta de novos ligantes (TOYOSHIMA; NOMURA, 2002), nesse sentido é de suma importância entender os tipos de interações realizadas pelo sítio ortostérico de uma dada proteína. Em estudos realizados por Toyoshima e colaboradores (2002), foi observado o sítio ortostérico da SERCA numa cavidade rodeada pelas hélices M3, M5 e M7 perto da superfície da membrana citoplasmática, na qual resíduos hidrofóbicos sobre estas três hélices formam uma superfície complementar para a tpsigargina, com potencial ligação entre oxigênio 8 (O₈) e a Ile 829, reduz eficazmente os movimentos das hélices transmembranas, o que é essencial para o transporte de cálcio. Essa mesma região é apresentada no modelo do receptor PfATP6, como mostra a figura 5.

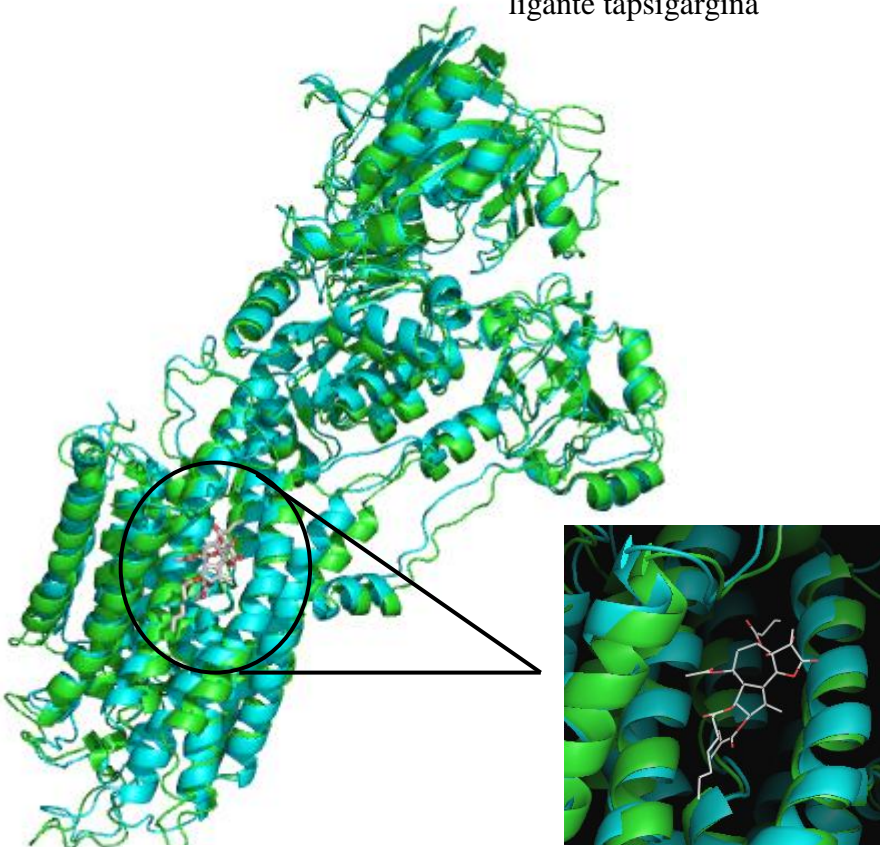
Figura 5: Estrutura tridimensional do modelo do receptor PfATP6 construído por (Leite, 2008), sendo M3, M5, M7 o sítio de ligação. Folha beta (azul), Alfa hélice (vermelho).



Diante de um número cada vez maior de estruturas de proteínas conhecidas, tornou-se mais importante ter ferramentas analíticas que identifiquem locais funcionais. Métodos computacionais para a detecção e caracterização de sítios funcionais nas proteínas têm cada vez mais interesse (CAMPBELL *et al.*, 2003). Isto é frequentemente conseguido por meio da detecção local funcional que muitas vezes utiliza informação evolutiva da proteína (ALLOY *et al.*, 2001; ARMON *et al.*, 2001; LANDGRAF *et al.*, 2001), ou comparações estruturais (STARK; RUSSELL, 2003).

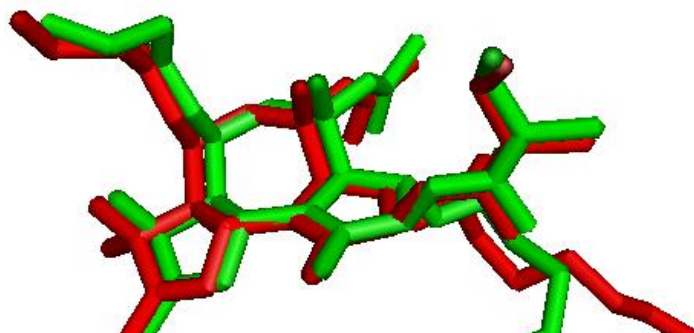
No sentido de confirmar o local do sítio ortostérico da proteína, foi realizada através do programa Discovery Studio 3.5 Visualizer, a sobreposição entre o molde (1IWO) e o modelo (PfATP6). A estrutura molde foi retirada e assim pode ser observado os aminoácidos que fazem parte do sítio ativo da proteína PfATP6, e desta forma, comprovar a existência de uma mesma cavidade localizada na região do modelo, o sítio ortostérico da proteína molde, tendo os aminoácidos conservados nesta região. Após a sobreposição foi observado que ocorreu pouca diferença estrutural entre o molde e o modelo, com valor de desvio médio quadrado (do inglês *Root-Mean-Square Deviation* (RMSD)) de 2,26 Å (Figura 6).

Figura 6 - Sobreposição entre o molde 1IWO (verde) e o modelo PfATP6 (azul) com o ligante tapsigargina



Neste estudo foi realizado um procedimento de reacoplamento para avaliar os resultados dos estudos de acoplamento com o modelo obtido em que foi realizada a sobreposição entre a taspargina acoplada e a taspargina inicial. De acordo com o método de validação citado na literatura (MARSH, 2011), a função de pontuação sucedida é aquela em que o RMSD é $\leq 2,0$ Å a partir de um experimento. Neste estudo, o valor de RMSD foi 0,6 Å. O resultado apontou pouca variação geométrica, o que permite inferir que o ambiente de acoplamento molecular é semelhante ao apresentado ao molde 1IWO (Figura 7). Este resultado indica que o método de acoplamento realizado pelo AutoDock Vina 1.1.2 é, portanto, considerado confiável para o acoplamento.

Figura 7: Sobreposição da taspargina. Vermelho ligante inicial e verde ligante acoplada.



No intuito de observar as interações que ocorrem com o ligante frente ao receptor a partir dos resultados de reacoplamento no modelo do receptor PfATP6, foi possível observar que existe pouca variação em relação às interações moleculares antes e após o reacoplamento (Figura 8 e 9). Assim nota-se que os mesmos aminoácidos que fazem interações hidrofóbicas são conservados (Ile265, Ile825, Leu821, Ile816, Leu815, Phe254, Gln257, Leu258, Ile752, Asn755, Ile756, Ile261, Ala303), além da permanência das duas ligações hidrogênio com os mesmos aminoácidos (N_1) do aminoácido Ile816 e o oxigênio (O_8) e nitrogênio (N_2) do aminoácido Gln257 e o oxigênio (O_{12}) do ligante, com distancia de ligação de 2,88Å e 2,85Å respectivamente, e após o reacoplamento: 2,97Å para a ligação hidrogênio (O_8) e o nitrogênio (N_1) e de 3,09Å entre o oxigênio (O_{12}) e o nitrogênio (N_2). Assim as interações são mais consistentes quando são menores, esses dados podem ser observados nas Figuras 8 e 9.

Figura 8 - Mapa de interações da Tapsigargina frente ao sítio ativo do receptor PfATP6 obtido por Leite, 2008 antes do reacoplamento.

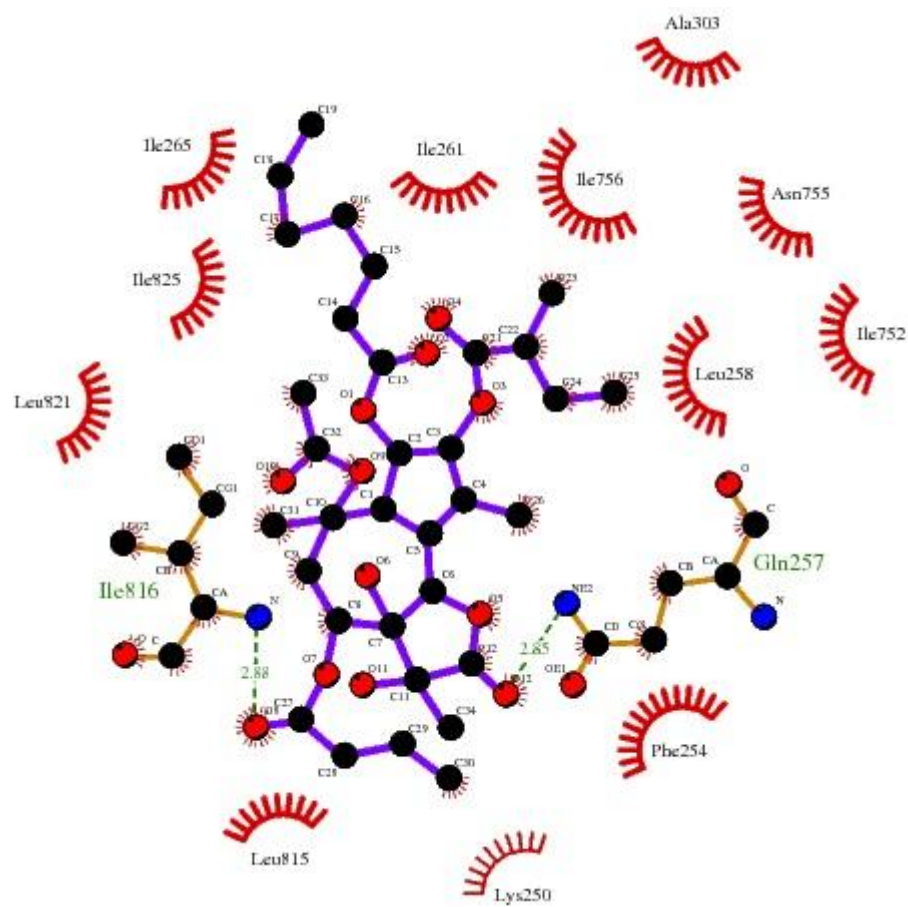
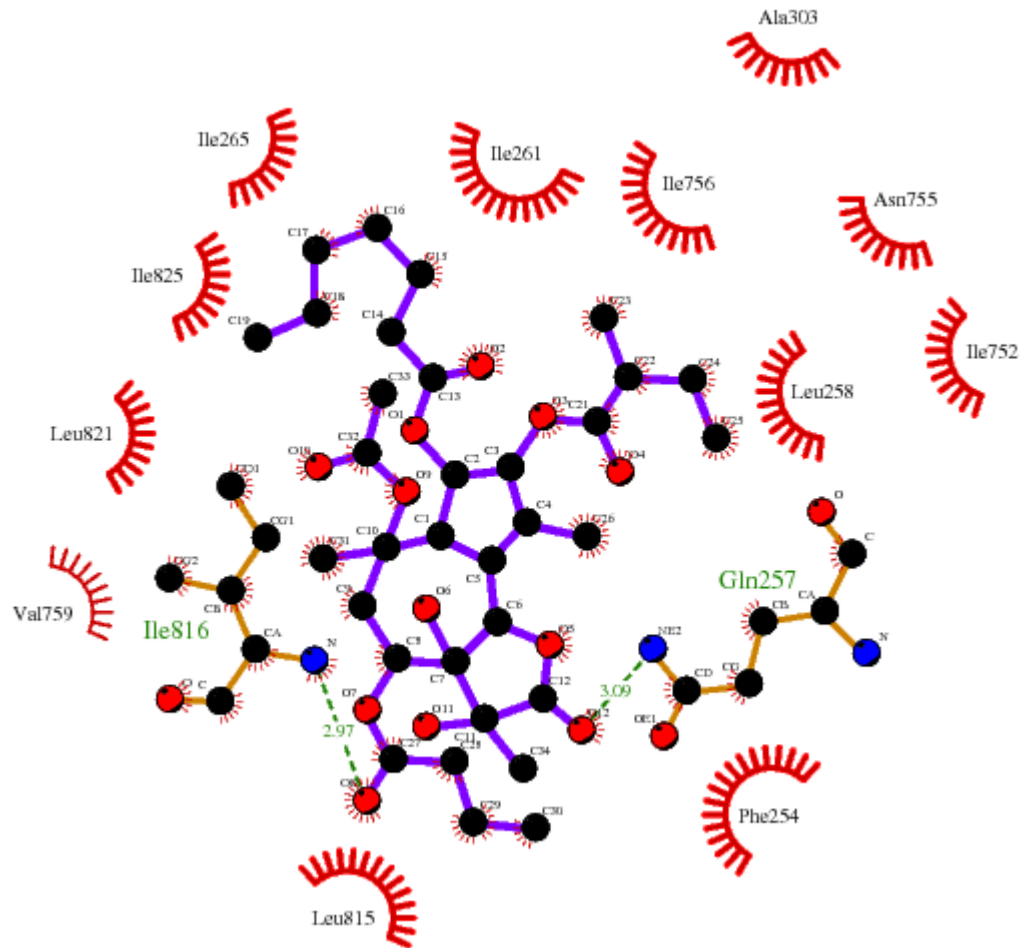


Figura 9 - Mapa de interações da Tapsigargina frente ao sítio ativo do receptor PfATP6 após reacoplamento.

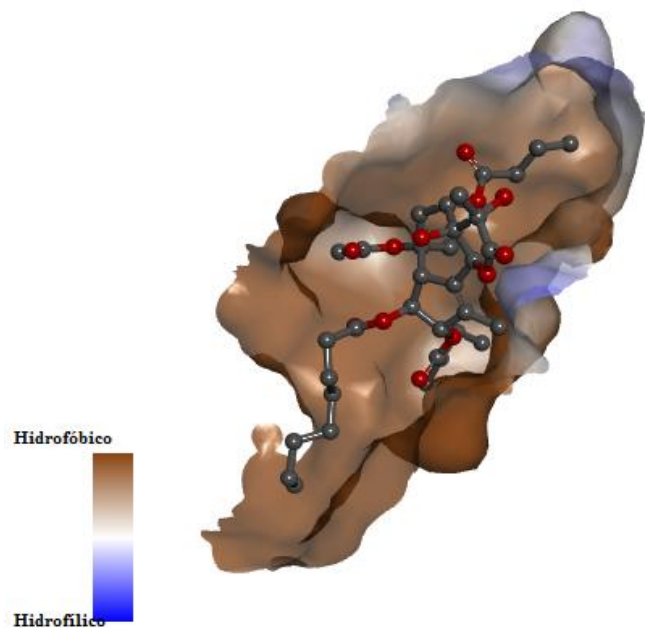


Conforme Naik e colaboradores (2011), foi identificado o padrão de ligação entre a artemisinina e seus derivados com o receptor PfATP6 utilizando estudos de acoplamento molecular. Nesse estudo, uma análise de correlação foi realizada entre parâmetros energéticos e geométricos com atividade biológica, sendo que o principal parâmetro foi a contribuição hidrofóbica, indicando que a ligação da artemisinina e seus derivados ocorre preferencialmente através de interações hidrofóbicas. Neste estudo, todos os 150 análogos da artemisinina apresentaram interação hidrofóbica com PfATP6.

A Figura 10 apresenta as características do sítio ortostérico do receptor PfATP6. A densidade hidrofóbica apresenta-se mais distribuída que a hidrofílica, sendo essa característica

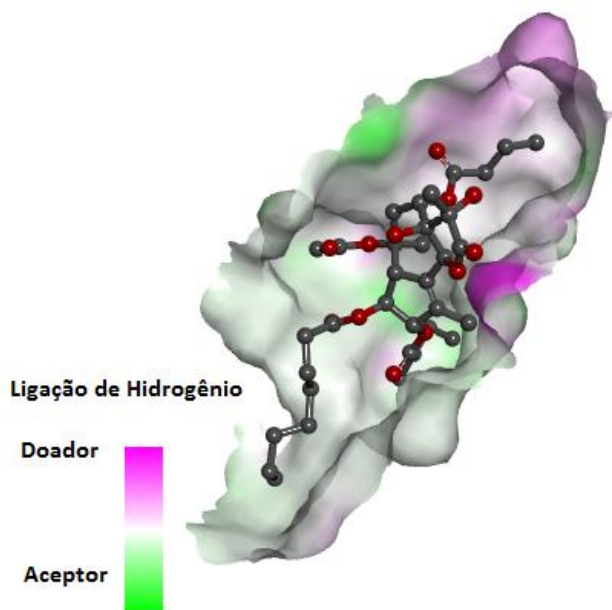
predominante na região do sítio ortostérico. Assim sendo, o sítio acomoda ligantes que sejam mais lipossolúveis do que os hidrossolúveis.

Figura 10: Distribuição hidrofóbica/hidrofílica do sítio ortostérico do modelo receptor PfATP6. Imagem gerada no programa Discovery Studio 3.5 Visualizer.



Na figura 11, pode ser observada a capacidade da proteína em formar interações de hidrogênio com prováveis ligantes que tenham esse tipo de afinidades. Comparando esse resultado aos dados anteriores apresentados na figura 10, percebe-se que o sítio ortostérico do receptor PfATP6 possui pouca habilidade para formar ligações de hidrogênio seja do tipo aceptora de hidrogênio (LHA) ou do tipo doadora de hidrogênio (LHD).

Figura 11: Regiões de ligação de hidrogênio do sítio ortostérico do receptor PfATP6.
Imagem gerada no programa Discovery Studio 3.5 Visualizer

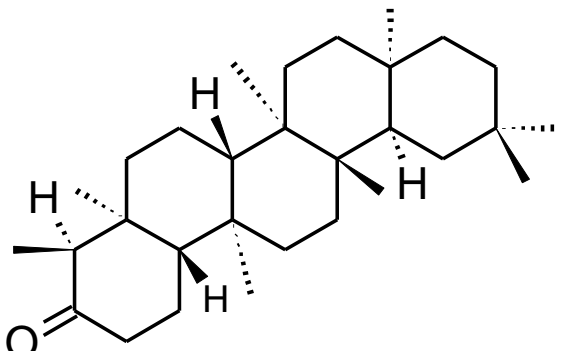
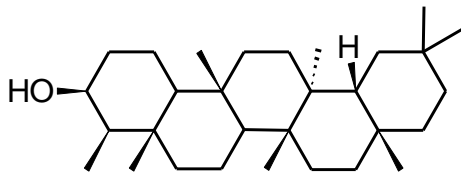


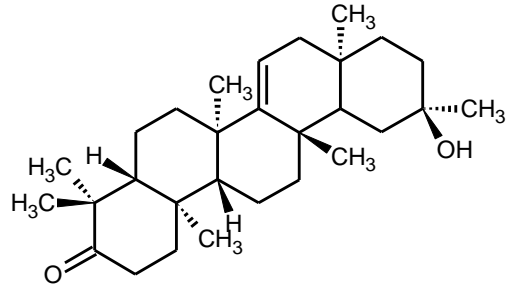
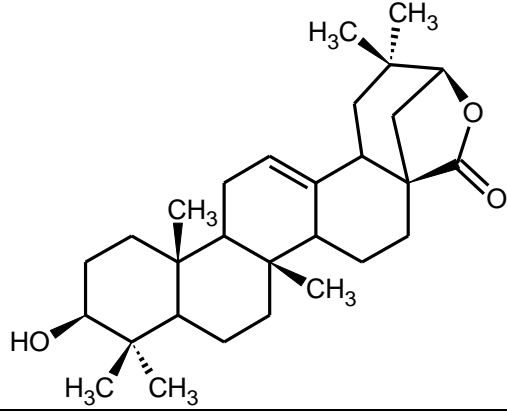
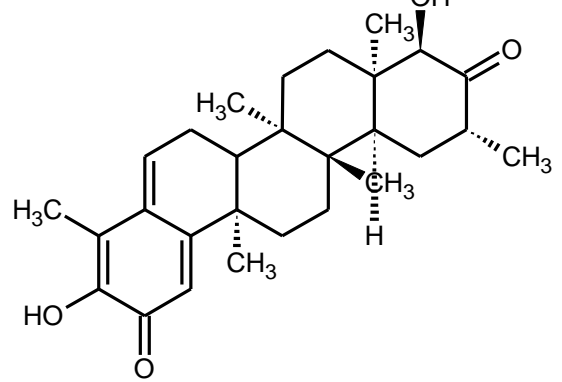
4.2 ACOPLAMENTO MOLECULAR

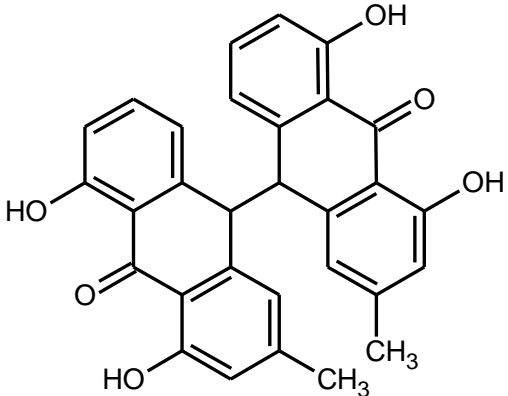
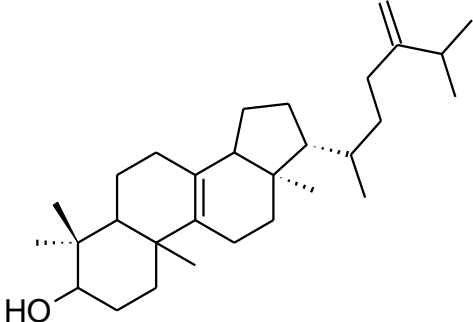
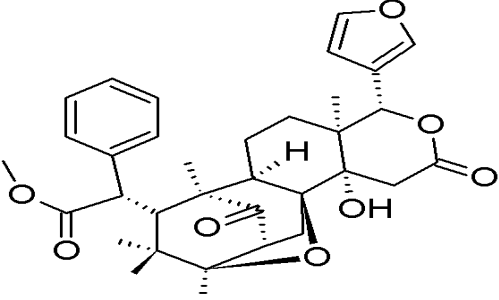
A Triagem Virtual de ligantes contra estruturas de proteínas utilizando acoplamento molecular é amplamente empregada para a identificação de compostos líderes no processo de desenvolvimento de fármacos (HONMA, 2001).

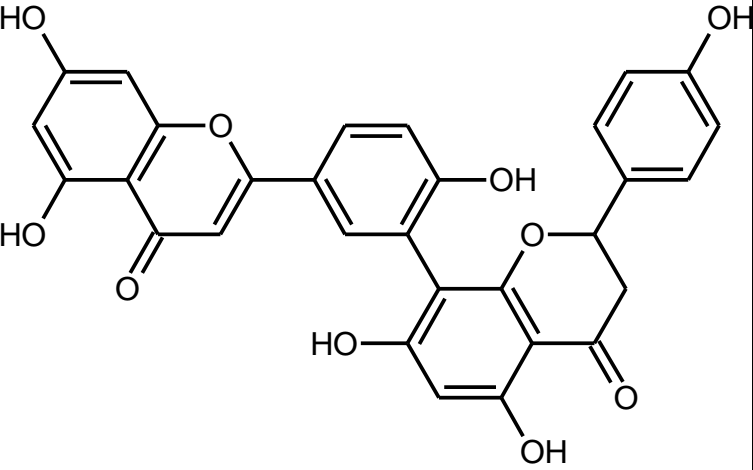
A triagem virtual entre o modelo do receptor PfATP6 e o conjunto selecionado, foi conduzida através do AutoDock Vina 1.1.2, o qual permitiu obter os valores de afinidade das moléculas triadas. Sendo assim, foram selecionadas 10 estruturas além da tapsigargina com base no valor de energia de afinidade. Estes resultados encontram-se na tabela 2.

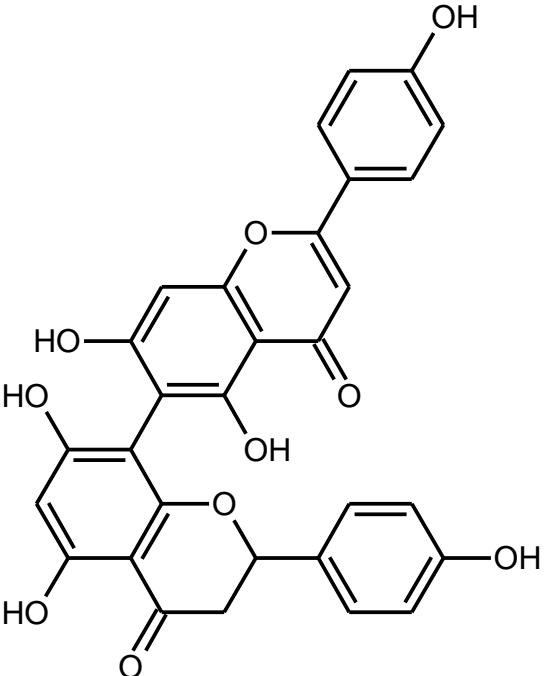
Tabela 2: Energia de afinidade para os dez melhores complexos além da

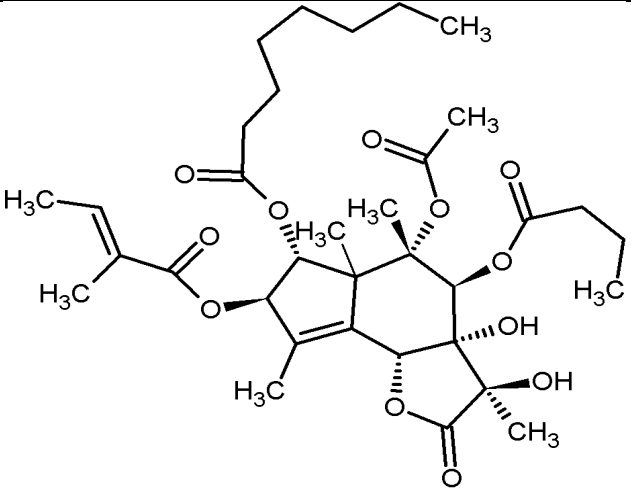
Molécula	Energia de afinidade média (Kcal/mol)	Classe química	Espécie	Tapsigargina	
				Família	Estrutura
VE0ZNA0SF	-11,3	Triterpenos	<i>Ouratea floribunda</i> (A. St. - Hil) Engl.	Ochnaceae	
VE0LTA0SI	-11,0	Terpenoides	<i>Maytenus truncata</i> Reiss.	Celastraceae	

VE0GUA0SI	-10,9	Terpenoides	<i>Croton betulaster</i> Muell. Arg	Euphorbiaceae	
VE0UUA0AF	-10,5	Terpenoides	<i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Vell.) Morong	Leguminosae	
VE0SEA0SF	-10,4	Terpenoides	<i>Maytenus obtusifolia</i> Mart.	Celastraceae	

VE0ULA0SI	-10,4	Antraquinonas	<i>Senna occidentalis</i> (L.) Link	Leguminosae	
VE0ZTA0AF	-10,2	Terpenoides	<i>Chamaesyce thymifolia</i> (L.) Millsp.	Euphorbiaceae	
VE0KNA0AF	-10,0	Terpenoides	<i>Cedrela odorata</i> L.	Meliaceae	

VE00UA0AF	-10,0	Biflavonoide	<i>Cenostigma macrophyllum</i> Tul.	Leguminosae	
-----------	-------	--------------	--	-------------	---

VE0NUA0AF	-9,7	Biflavonoide	<i>Cenostigma macrophyllum</i> Tul.	Leguminosae	
-----------	------	--------------	--	-------------	---

Tapsigargina	-8,3	Terpenoides	<i>Thapsia garganica</i> L	Apiaceae	 <p>The chemical structure of Tapsigargina is a complex polycyclic terpenoid. It features a central bicyclic core with several fused rings. The structure is highly substituted with various functional groups: multiple methyl groups (H₃C) are attached to different carbons, some with wedged or dashed bonds indicating stereochemistry. There are two hydroxyl groups (OH) also shown with stereochemistry. Several ester groups are present, including a long-chain alkyl ester (nonyl ester) and a methyl ester. A complex side chain is attached to one of the rings, containing a double bond and a methyl group. The overall structure is intricate and characteristic of a complex natural product.</p>
--------------	------	-------------	-------------------------------	----------	--

Com base nas análises dos acoplamentos foi possível identificar que os compostos VE0ZNA0SF e VE0LTA0SI tiveram valores de energia de afinidade de -11,3 e -11,0 Kcal/mol, respectivamente, sendo as moléculas mais estáveis do conjunto selecionado (Tabela 2). A molécula VE0NUA0AF teve a menor energia de afinidade -9,7 Kcal/mol dentre as 10 selecionadas, percebe-se que a diferença de energia para o de melhor afinidade foi de 1,6 Kcal/mol.

De acordo com os resultados obtidos referentes aos valores de energia de afinidade, foi possível identificar que as 10 estruturas apresentaram melhor energia de afinidade quando relacionados à tapsigargina, a qual apresentou valor de energia de afinidade -8,3 Kcal/mol (Tabela 2). Acredita-se que isso ocorra pela natureza hidrofóbica que existe entre os ligantes selecionados e a proteína, o que confirma a característica hidrofóbica do sítio ortostérico da proteína.

Após realizar as considerações das energias de afinidade as moléculas foram selecionadas para análises fitoquímicas. Nesse sentido os biflavonoides agatisflavona e amantoflavona foram selecionados frente às outras moléculas selecionadas (Tabela 2), pois, a partir de relatos na literatura constatou-se sua capacidade de serem geralmente encontrados em grande quantidade em diferentes plantas e muitos tecidos vegetais (SIMÕES *et al.*, 2001, LIN *et al.*, 1999). Essa classe de metabólitos secundário também têm demonstrado inibir a ATPase Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático/endoplasmático (SERCA) induzindo a apoptose através da via Ca^{2+} dependente que pode ser ativada por meio de uma elevação exagerada de Ca^{2+} no citoplasma, que conseqüentemente pode conduzir à morte celular por apoptose (OGUNBAYO; MICHELANGELI, 2014).

Assim, a espécie *C. macrophyllum* foi selecionada através de relatos na literatura sobre seu potencial em apresentar nas folhas e casca do caule os biflavonoides agatisflavona (VE0NUA0AF) e amentoflavona (VE0OUA0AF) (SANTOS, 2001; COSTA, 2005; SILVA, 2006), além de ser uma espécie com elevado potencial farmacológico (PEREIRA *et al.*, 200; SOUSA *et al.*, 2007). Nessa perspectiva, foi também observado relatos recentes na literatura sobre a capacidade de flavonoides em inibir a ação da SERCA presente em mamíferos (OGUNBAYO; MICHELANGELI, 2014). Nesse sentido, foi também analisado a disponibilidade das amostras do material vegetal, dos padrões, bem como das técnicas de extração e método analítico. Pois, precisaríamos de uma molécula que no final fosse possível extrair o metabólito secundário de interesse e que possíveis testes futuros fossem economicamente viáveis. Nesse sentido, a seleção dos biflavonoides supracitados para as análises fitoquímicas foram direcionados.

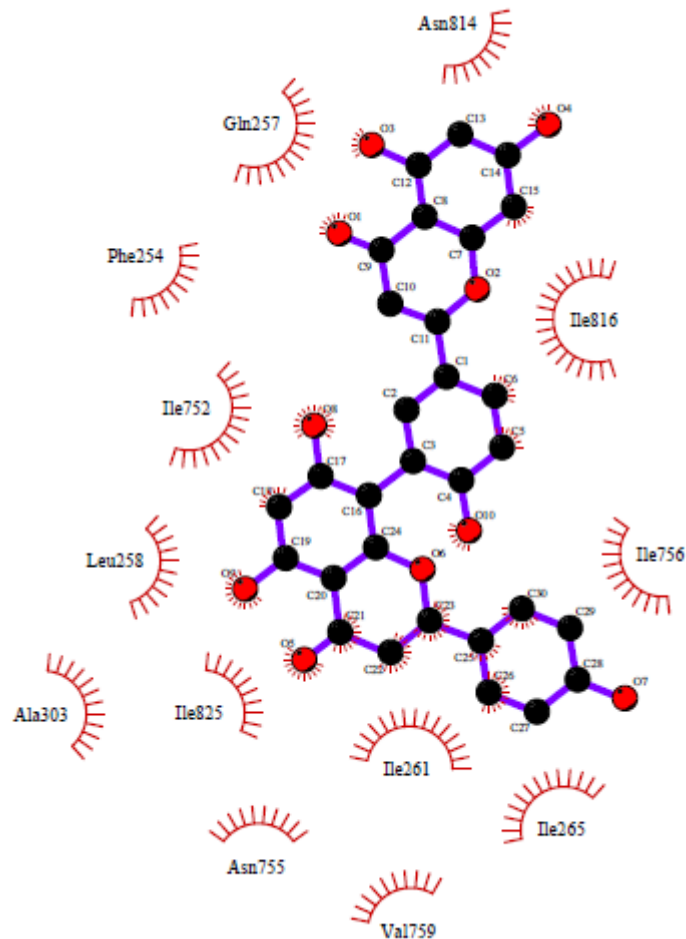
4.3 ANÁLISES DAS INTERAÇÕES ATRAVÉS DO PROGRAMA LIGPLOT V.1.4.5

Foram realizadas as considerações acerca das interações entre as moléculas VE0OUA0AF, VE0NUA0AF, tapsigargina e o receptor PfATP6, através do programa LigPlot v.1.4.5. Dessa forma foi possível compreender o comportamento das interações entre receptor e os ligantes, e assim conhecer o padrão de interação bem como os aminoácidos que estão envolvidos nas interações realizadas pelos ligantes acoplados no sítio ortostérico do receptor.

As interações que ocorrem entre a tapsigargina e o modelo do receptor PfATP6 (Figuras 8 e 9) são predominantemente hidrofóbicas, estas acontecem com os aminoácidos Leu815, Phe254, Leu258, Leu821, Ile261, Ile752, Ala303, Ile756 e Val759, o que justifica a característica hidrofóbica também predominante na região do sítio ortostérico do molde 1IWO. Foi possível observar também a existência de ligação hidrogênio com aminoácido Gln257, sendo que essa ligação hidrogênio da tapsigargina ocorre com N₂ do aminoácido Gln257 e o oxigênio O₁₂ do ligante, com distancia de ligação de 3,9 Å, além dessa ligação de hidrogênio também existe outra entre o N₁ do aminoácido Ile816 e o oxigênio O₈ do ligante com distancia de ligação de 2,97 Å. Estas análises endossam as características essenciais para um novo inibidor da PfATP6, pois é observada a predominância de características hidrofóbicas, pré-requisitos para novos candidatos a fármacos capazes de inibir essa proteína.

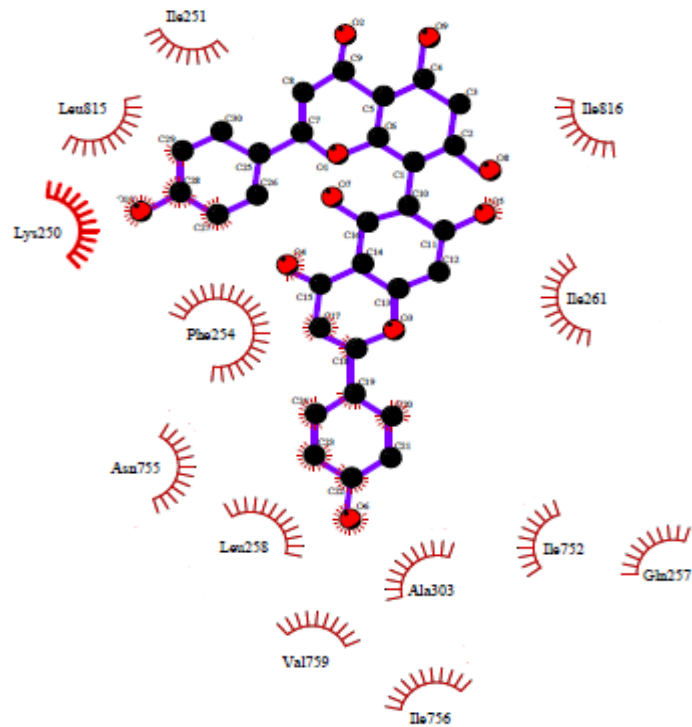
A Figura 12 representa o mapa 2D das interações do composto VE0OUA0AF frente ao sítio ativo do receptor PfATP6 com energia de afinidade -10,0 kcal/mol. Embora as interações sejam notáveis, é importante ressaltar que as interações hidrofóbicas são as que mais acontecem, sendo responsáveis pelo acoplamento do ligante no sítio ortostérico da proteína. As interações hidrofóbicas acontecem com os aminoácidos Phe254, Ile816, Ile261, Ile752 e Ile756 contribuindo para as interações não polares e assim endossando efetivamente a natureza hidrofóbica do sítio ortostérico do receptor, estando estes aminoácidos também presentes nas interações hidrofóbicas do inibidor seletivo da SERCA, a tapsigargina. Na análise desse composto não foram identificadas nenhuma interação com doadores nem aceptores de hidrogênio.

Figura 12 - Mapa de interações do composto VE00UA0AF frente ao sítio ativo do modelo do receptor PfATP6 (Leite, 2008), construído pelo LigPlot v.1.4.5.



A Figura 13 representa o mapa 2D de interações do composto VE0NUA0AF frente ao sítio ortostérico do receptor PfATP6, exibindo valor de energia de $-9,7$ Kcal/mol. É possível verificar a presença predominante dos aminoácidos com características hidrofóbicas Ile251, Leu815, Phe254, Leu258, Val759, Ile756, Ala303, Ile752, Ile261e Ile816 contribuindo significativamente para as interações hidrofóbicas. Observa a presença de 2 aminoácidos com características apolares Asn755, Gln257. No entanto, também são observadas esses mesmos aminoácidos nas interações da tapsigargina e o receptor PfATP6, endossando a natureza hidrofóbica dominante no padrão de reconhecimento no sítio catalítico do modelo do receptor PfATP6.

Figura 13 - Mapa de interações do composto VE0NUA0AF frente ao sítio ativo do receptor PfATP6 (Leite, 2008), construído pelo LigPlot v.1.4.5.



Resultados semelhantes também foram relatados por Toyoshima e Nomura, (2002), nesse estudo foi observada uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio (O₈) da tapsigargina e a amina (NH) do aminoácido Ile829, além da presença dos aminoácidos Phe254, Gln257 e Ile756. O que confirma a predominância de aminoácidos com características apolares no sítio ortostérico da proteína PfATP6.

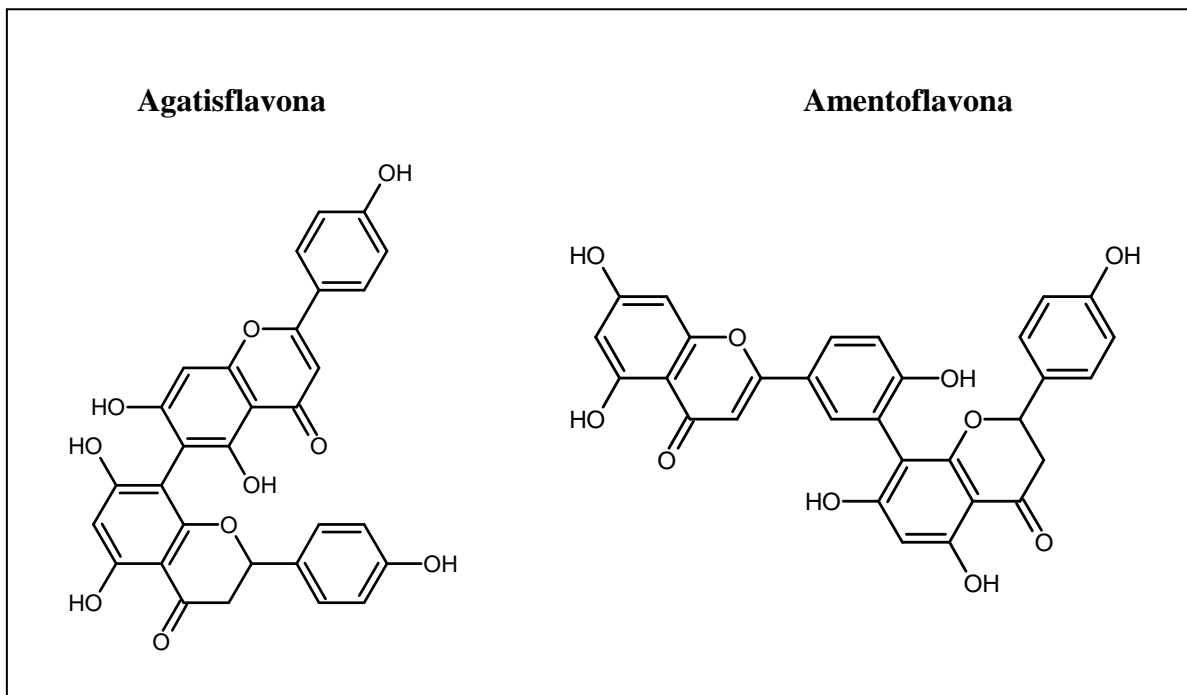
4.4 ANÁLISES FITOQUÍMICAS

Os biflavonoides são encontrados em grande quantidade nas diferentes plantas e em muitos tecidos vegetais. Outros estudos fitoquímicos envolvendo a espécie de *Cenostigma macrophyllum* Tul. possibilitaram a identificação e isolamento de alguns compostos presentes nos extratos etanólicos das folhas e da casca do caule. Entre estes destaca-se os biflavonoides agatisflavona e amentoflavona, (SANTOS, 2001; COSTA, 2003; COSTA, 2005; SILVA 2006). Sendo assim, a análise qualitativa da presença dos biflavonoides amentoflavona e agatisflavona em *C. macrophyllum* é pertinente e a escolha dos biflavonoides para análise nesse estudo se deu pela disponibilidade de padrões, bem como, por resultados encontrados em estudos anteriores que relatam a importância dessa classe de metabólitos secundários nas plantas, além de possuírem importantes propriedades farmacológicas.

As amostras de folhas e casca de caule de *C. macrophyllum* foram submetidas à extração sob ultrassom. Este é um método de maceração modificado, no qual a extração é facilitada através da utilização de pulsos de alta frequência, de 20 kHz. É considerada uma alternativa simples, rápida, de baixo custo e eficiente na extração de pequenas quantidades de matéria-prima vegetal (SARKER; LATIF; GRAY, 2005).

Após a extração procedeu-se a partição dos extratos com clorofórmio e metanol para a seleção dos biflavonoides de interesse. Geralmente utiliza-se solventes de média polaridade (clorofórmio, diclorometano, éter etílico), com o intuito de extrair flavonas e flavonóis livres (agliconas) pouco polares. Sendo assim, justifica-se a escolha do solvente utilizado para extração, visto que, os padrões de biflavonoides (amentoflavona e agatisflavona) utilizados para análise apresentam-se sob a forma de dímeros geralmente de flavonas e flavanonas, ocorrendo predominantemente como agliconas, podendo ser extraídos com solventes de menor polaridade (HARBORNE, 1989) (Figura 14).

Figura 14 - Biflavonoides utilizados para análise em *C. macrophyllum*



A análise qualitativa do extrato clorofórmico das folhas e casca do caule de um espécime de *C. macrophyllum* possibilitou a identificação dos biflavonoides agatisflavona e amentoflavona. Já no extrato hidrometanólico esses metabólitos foram identificados apenas nas folhas, o que confirma a predominância desses nas folhas das plantas, agregado a sua propriedade de proteção contra os raios ultravioleta nas folhas (SIMÕES, *et al.*, 2001).

Os picos dos biflavonoides agatisflavona e amentoflavona dos cromatogramas das análises dos extratos clorofórmicos das folhas e casca do caule, assim como os picos dos cromatogramas das análises dos extratos hidrometanólico das folhas mostraram-se com perfil químico semelhante, conforme apresentado nos cromatogramas ilustrativos (Figura 15, 16, 17 e 19).

Através dos tempos de retenção e espectros de UV-VIS dos picos A, B, C, D, E e F das amostras com os dos padrões agatisflavona e amentoflavona, respectivamente, pode-se inferir que esses picos são correspondentes aos padrões supracitados.

Figura 15 - Cromatograma a 280 nm do padrão agatisflavona em CLAE.

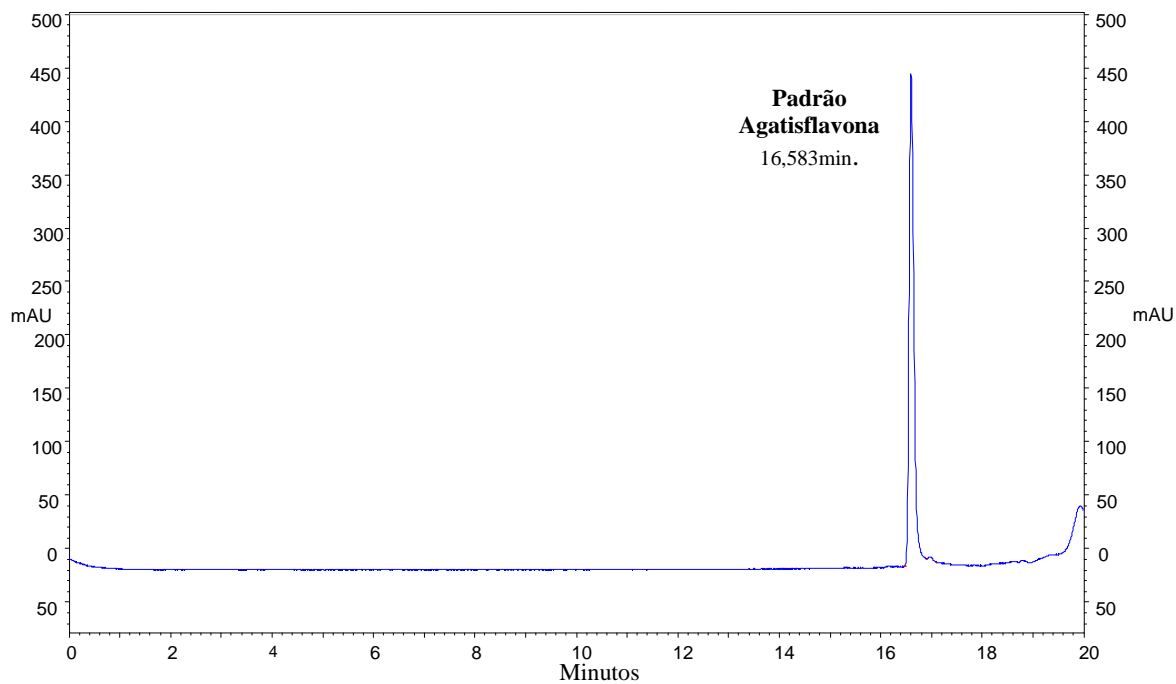


Figura 16 - Cromatograma a 280 nm do padrão amentoflavona em CLAE.

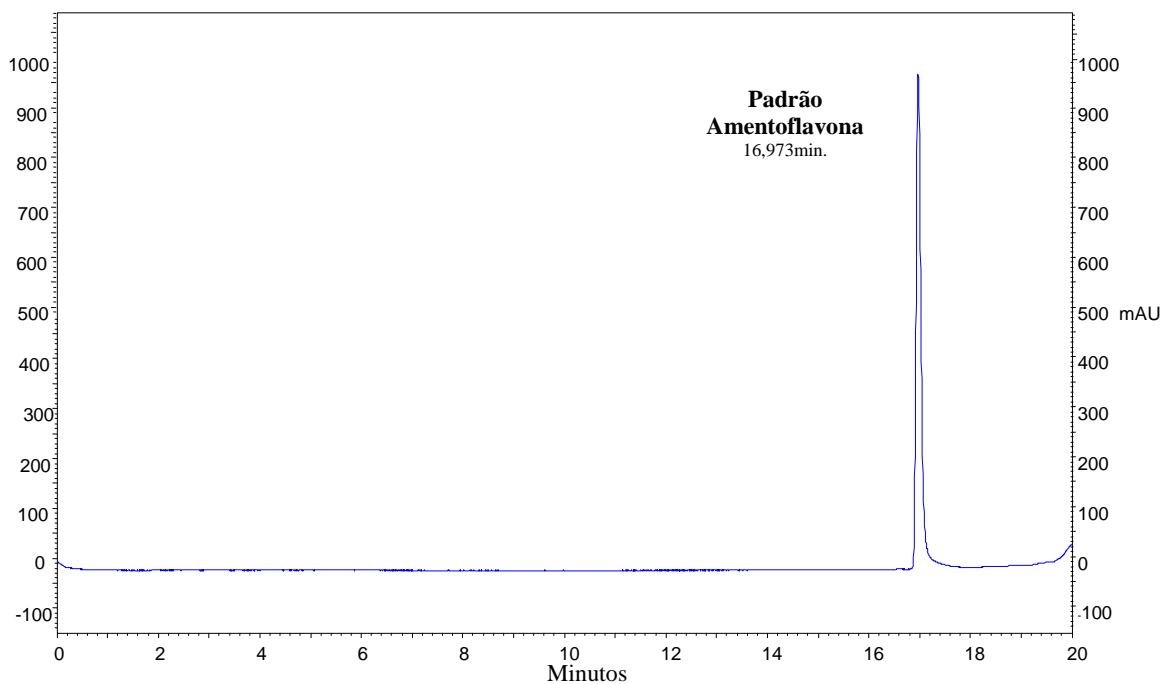


Figura 17 - Cromatograma a 280 nm dos picos (A e B) do extrato clorofórmico das folhas de *C. macrophyllum* em CLAE.

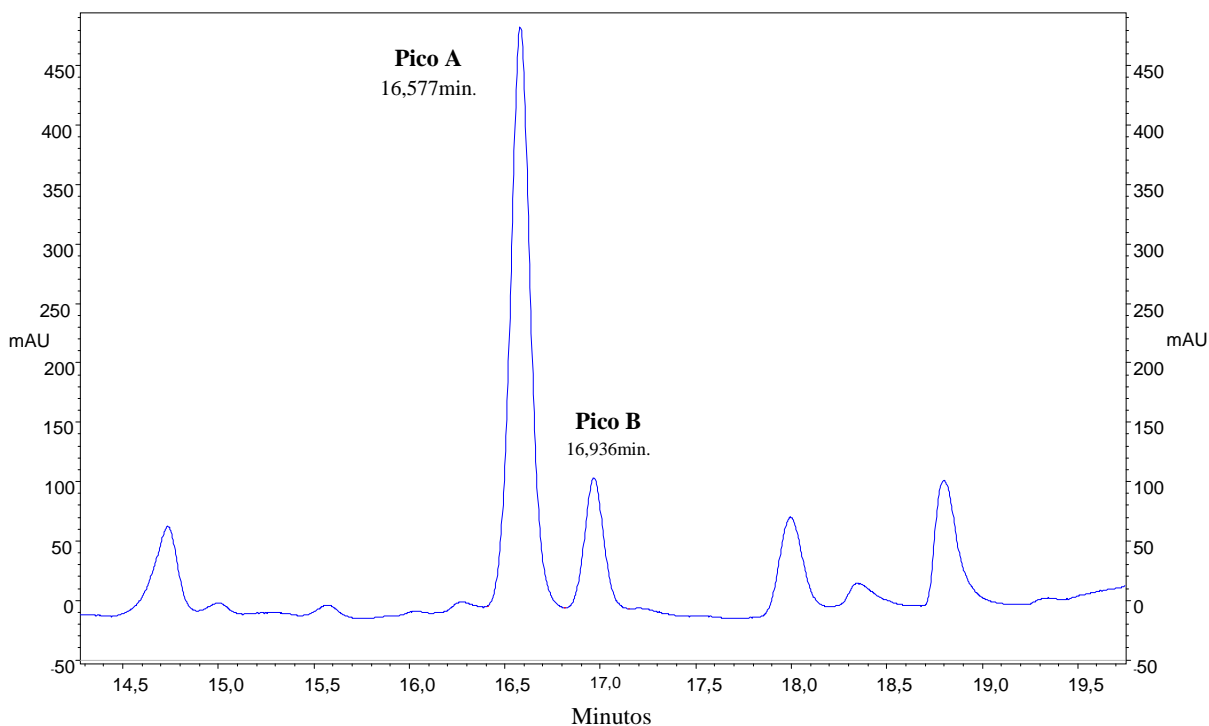


Figura 18 - Cromatograma a 280 nm dos picos (C e D) do extrato clorofórmico da casca do caule de *C. macrophyllum* em CLAE.

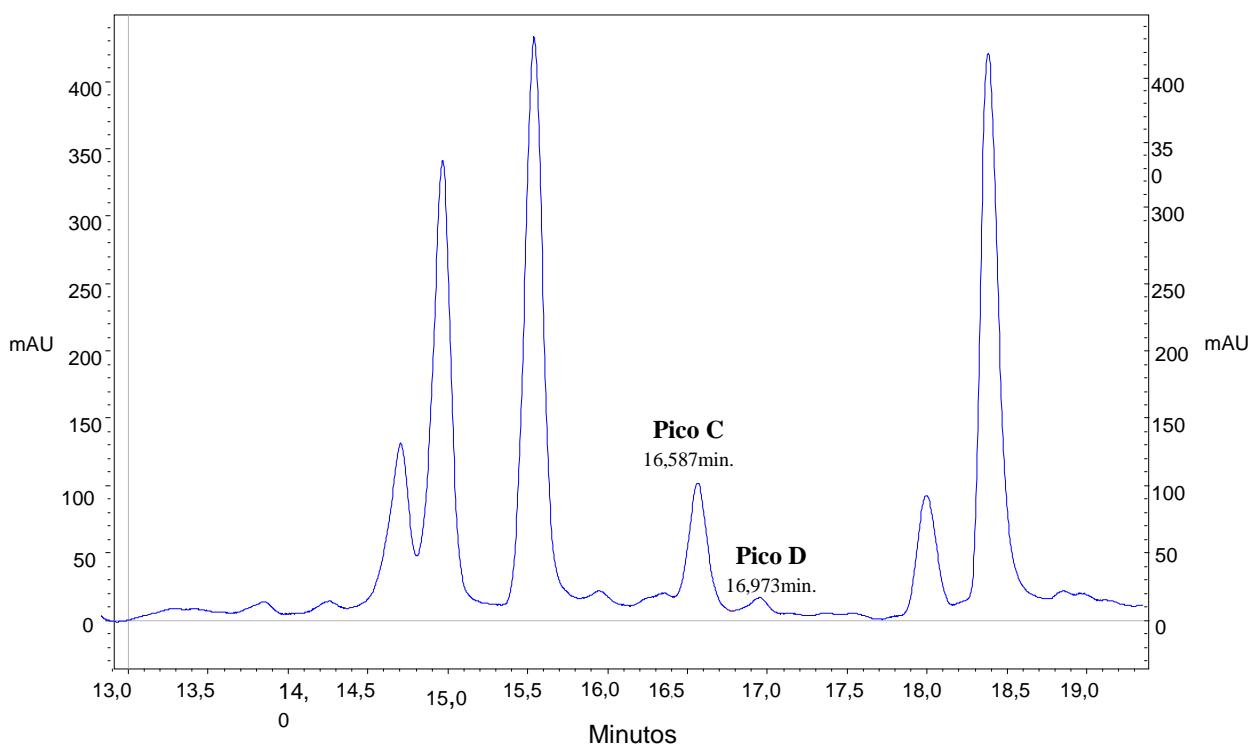
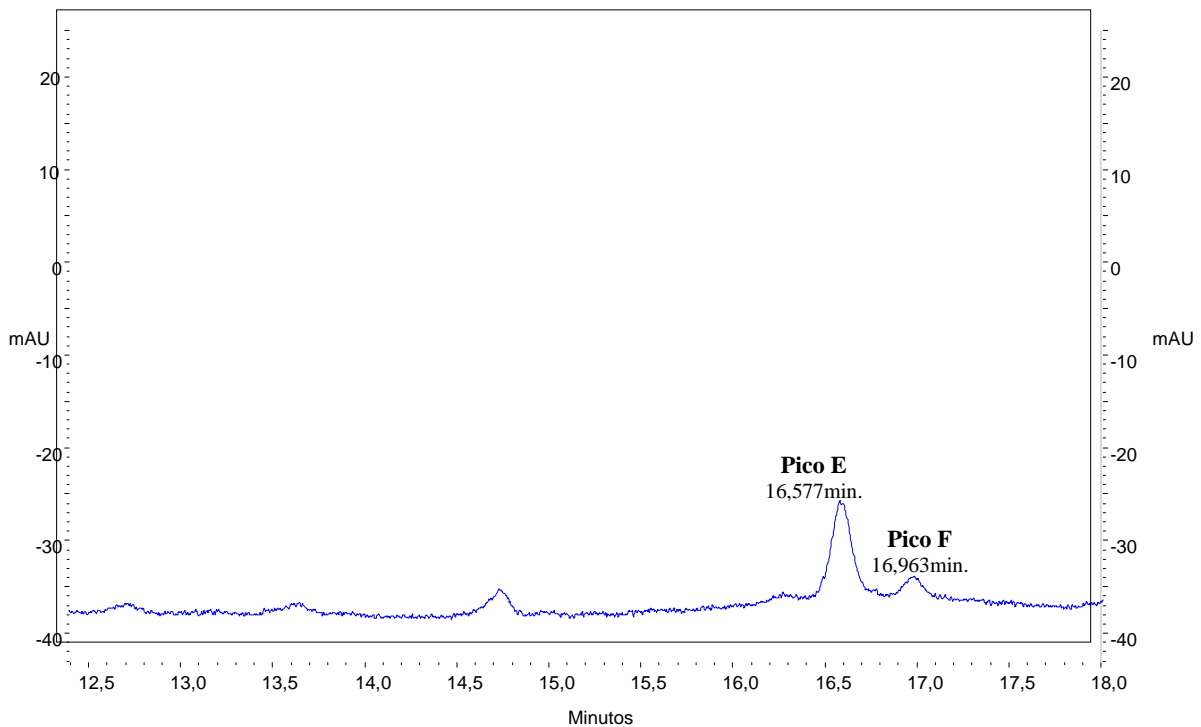


Figura 19 - Cromatograma a 280 nm dos picos (E e F) do extrato hidrometanólico da folha de *C. macrophyllum* em CLAE.



Através da comparação dos máximos de absorção dos padrões do biflavonoide amentoflavona (banda II - banda I-) e agatisflavona (banda II - banda I-) com os máximos de absorção dos picos A, B, C, D, E e F das amostras (Figuras 15 a 19) foi possível inferir que devido as absorbâncias equivalentes os picos A, C e E são correspondentes ao padrão de agatisflavona e os picos B, D e F correspondem ao padrão de amentoflavona.

Segundo Ribani *et al.* (2004) a seletividade de um método analítico pode ser determinado de duas formas: a primeira é comparando a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância (padrão). A segunda maneira é através da avaliação com detectores modernos (arranjo de diodos, espectrômetro de massas), que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão e utiliza-se isto como uma indicação da presença do composto puro.

A pureza do pico também é critério aceito como uma das condições de avaliação para o parâmetro da seletividade, sendo determinado pelo detector DAD. Dessa forma utilizou-se a comparação dos espectros do pico obtido na separação da amostra do extrato clorofórmico das folhas com o do padrão (Figuras 20 e 21). Nesse sentido foi realizada a avaliação da seletividade também por esse critério. Foi possível observar através do espectro de UV, obtido no comprimento de onda 280 nm, que o método é seletivo tanto para a amentoflavona quanto para a agatisflavona.

Figura 20 - Sobreposição dos Espectros de UV do pico A, Extrato clorofórmico das folhas e o padrão agatisflavona

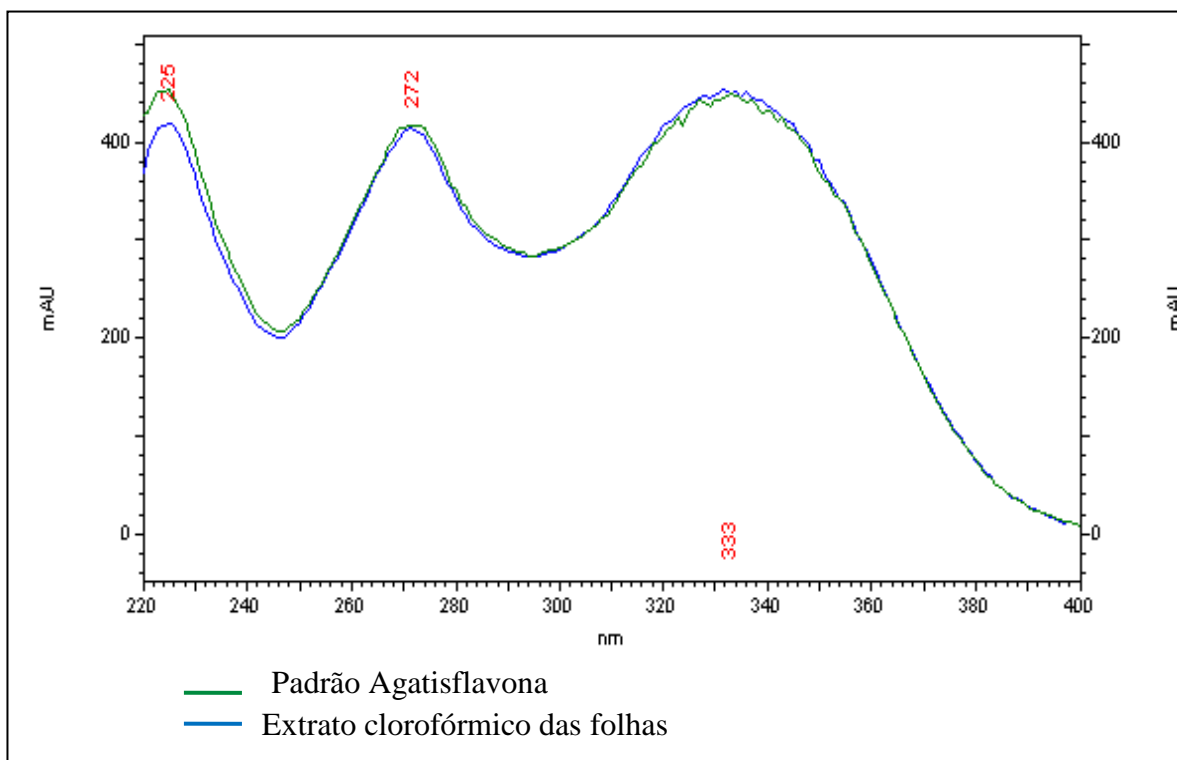
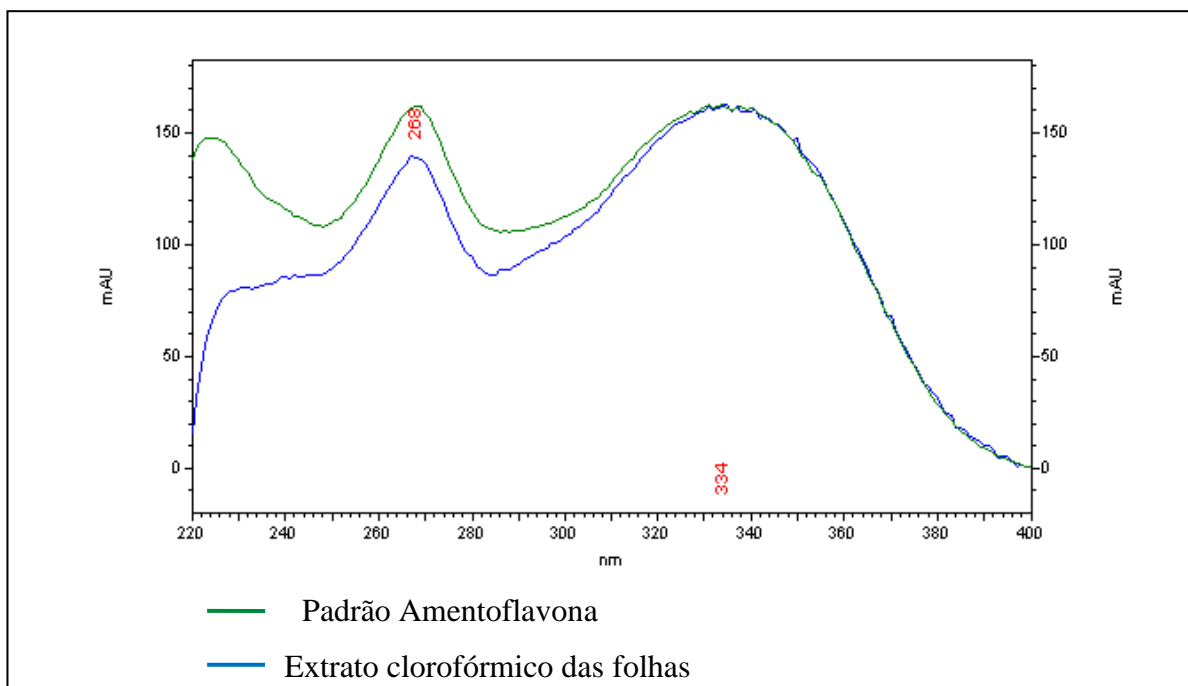


Figura 21 - Sobreposição dos espectros de UV do pico B Extrato clorofórmico das folhas e o padrão amentoflavona.



O teste de linearidade com padrão permite avaliar a concordância da resposta do sistema cromatográfico frente a diferentes concentrações do analito de interesse. O INMETRO (2007) denomina este ensaio como “escolha da faixa linear de trabalho”, e estabelece que a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho. Nesse sentido, a linearidade do método foi avaliada pelas regressões lineares da curva analítica, através de soluções com concentrações na faixa de 86-344µg/mL (padrão agatisflavona) e 60-500µg/mL (padrão amentoflavona).

As curvas de calibração foram construídas a partir da relação entre cinco concentrações de cada padrão com as áreas obtidas na separação cromatográfica. O coeficiente de correlação é um parâmetro que permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais (RIBANI *et al.*, 2004). A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,99, sendo assim, pode-se considerar que o método utilizado é linear (BRASIL, 2003).

O gráfico 2 e 3 mostram os resultados obtidos da curva de calibração da solução padrão de agatisflavona que, por regressão linear, apresentou $R^2=0,99$ e da solução padrão de amentoflavona que, por regressão linear, apresentou $R^2=0,9975$. Esta faixa de linearidade foi adequada à aplicação do método na determinação do teor de agatisflavona e amentoflavona nas amostras.

Gráfico 2 - Curva de calibração da agatisflavona e parâmetros obtidos com a regressão linear.

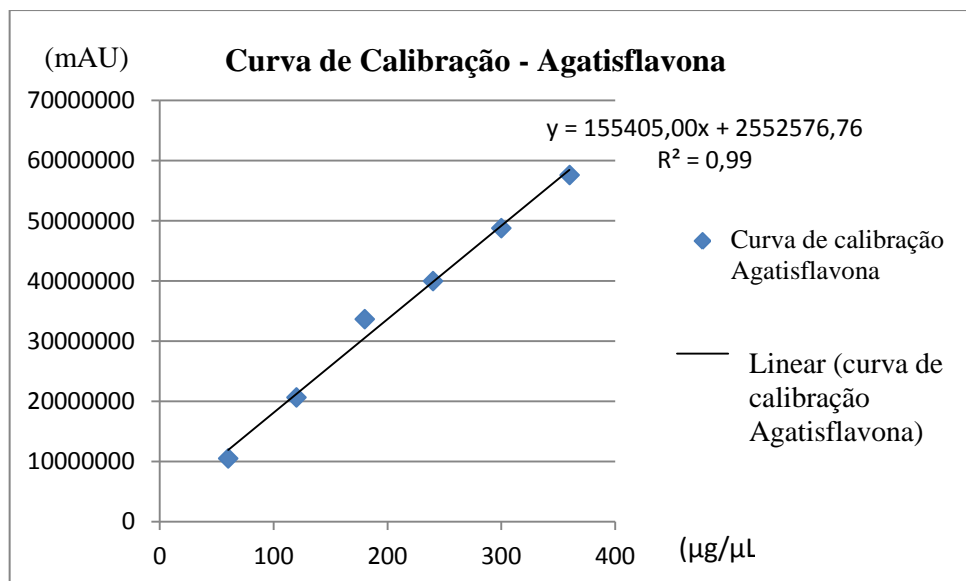
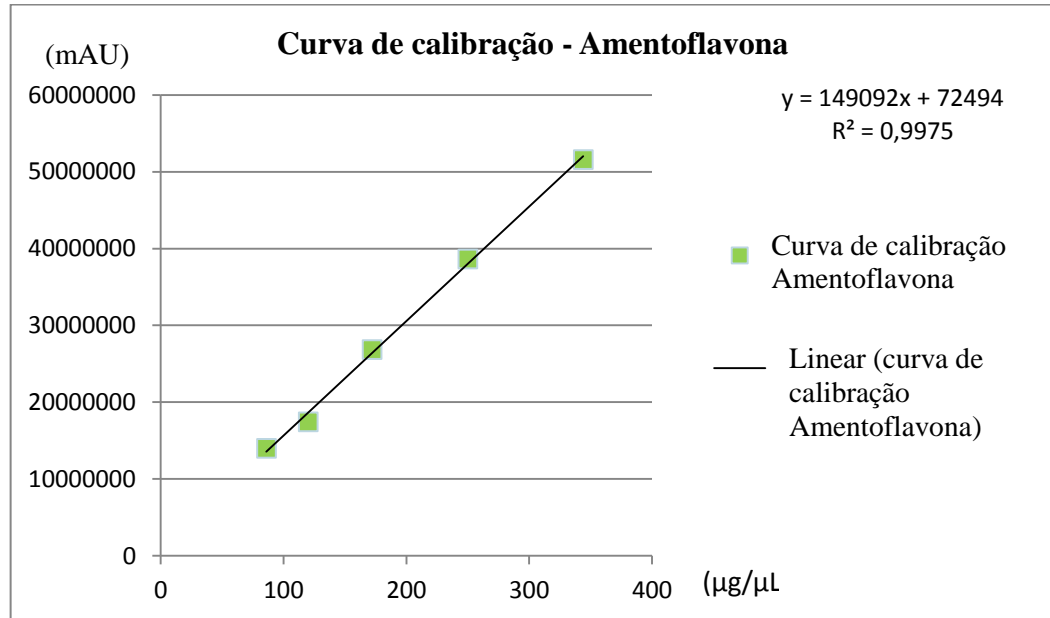


Gráfico 3 - Curva de calibração da amentoflavona e parâmetros obtidos com a regressão linear.



A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados de uma mesma amostra. O resultado da precisão do método foi determinado pelo desvio padrão relativo (DPR) obtido da injeção de três soluções de diferentes concentrações de cada padrão. Os valores de DPR foram todos dentro do preconizado pela ANVISA, que é de no máximo 5% (BRASIL, 2003), portanto o método pode ser considerado preciso, conforme apresentado na tabela 3.

Tabela 3 - Desvio Padrão Relativo de soluções em triplicata dos padrões.

Amentoflavona			Agatisflavona		
Média das áreas	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo	Média das áreas	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo
13998763,67	131477,2	0,93%	10487361	212143,3	2,02%
26858101,0	554063,3	2,06%	33647443	368373,5	1,09%
51590475,67	579575,4	1,12%	57606264	1059145,0	1,83%

A técnica de recuperação do analito adicionado foi utilizada para avaliar a exatidão do método proposto. Foram adicionadas ao extrato hidrometanólico e clorofórmio de *C. macrophyllum* soluções do padrão em três concentrações diferentes 120, 250 e 500 µg/mL, tanto para a amentoflavona quanto para agatisflavona. Os valores de recuperação calculados estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4: Taxa de recuperação para determinação da exatidão.

Agatisflavona			Amentoflavona		
Concentração adicionada	Concentração recuperada	Exatidão	Concentração adicionada	Concentração recuperada	Exatidão
120 µg/ml	143,50 µg/ml	119,58%	120 µg/ml	71,62 µg/ml	59,68%
250 µg/mL	297,50 µg/ml	119,00%	250 µg/ml	151,56 µg/ml	60,62%
500 µg/mL	450,41 µg/ml	90,08%	500 µg/ml	336,87 µg/ml	67,37%

Segundo Ribani e colaboradores (2004) os intervalos aceitáveis de recuperação para determinação da exatidão geralmente estão entre 70 e 120%. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%.

A partir das curvas de calibração dos padrões agatisflavona e amentoflavona foram estimados os limites de detecção (LD) e os limites de quantificação (LQ), segundo equação 2 e 3. Os resultados encontrados para a agatisflavona foram de LD= 1,37 µg/mL e LQ= 4,22 µg/mL, e para a amentoflavona foram de LD= 2,91 µg/mL e LQ= 8,81 µg/mL. Com esses resultados, verificou-se que o método possui boa sensibilidade para detectar e quantificar os padrões, sem sofrer alteração de fatores intrínsecos do equipamento. Contudo, os biflavonoides analisados no extrato hidrometanólico das folhas apresentaram concentrações abaixo dos limites de detecção e quantificação como mostra a tabela 5.

Tabela 5: Concentração de biflavonoides em amostras de *C. macrophyllum*

Amostras dos extratos	Agatisflavona (µg/mL)	Amentoflavona (µg/mL)
Hidrometanólico Folha	-	-
Clorofórmio Folha	20,47	91,8
Clorofórmio Caule	1,71	16,7

A quantificação dos biflavonoides, agatisflavona e amentoflavona, foi determinada pela média (n=3) das áreas dos picos das amostras de *C. macrophyllum*. A concentração dos dois biflavonoides foram obtidas através das equações das retas, geradas pela regressão linear das curvas analíticas dos padrões de biflavonoides. A tabela 6 mostra os resultados da quantificação de biflavonoides nos extratos clorofórmicos das folhas e casca do caule bem como nos extratos hidrometanólico das folhas na espécie de *C. macrophyllum*.

Tabela 6: Quantificação de biflavonoides em amostras de *C. macrophyllum*

Amostras (extratos)	µg agatisflavona /g de material seco	µg amentoflavona /g de material seco
Clorofórmio Folha	22,25	20,63
Clorofórmio Caule	1,24	0,012
Hidrometanólico Folha	0,0012	Não detectado

As folhas e casca de caule de *C. macrophyllum* apresentaram o mesmo perfil químico do extrato hidrometanólico e clorofórmico, ou seja, a separação cromatográfica mostrou a presença de picos semelhantes (figuras 17, 18 e 19). Contudo, com a quantificação dos biflavonoides foi possível perceber que o teor desses metabolitos secundários foi encontrado em maior quantidade nos extratos clorofórmico das folhas.

No que se refere ao teor de agatisflavona nos extratos clorofórmico das folhas e da casca do caule, este apresentou-se com maior rendimento no extrato clorofórmico das folhas sendo de 22,25 µg de agatisflavona/g de material seco. Esse resultado apresentou maior quantidade quando comparado ao rendimento desse mesmo metabolito secundário nos extratos clorofórmico do caule, com rendimento de 1,24 µg de agatisflavona/g de material seco e de 0,012 µg de agatisflavona/g de material seco do extrato hidrometanólico da folha (Tabela 6). Esses dados podem estar relacionados ao fato dos flavonoides estarem envolvidos na ação antioxidantes combatendo os efeitos de oxidação dos raios ultravioletas, se desenvolvendo assim em maior quantidade nas folhas (GRAF *et al.*, 2005).

Em relação ao teor do outro metabolito secundário amentoflavona, ocorreu também em maior quantidade nos extratos clorofórmico das folhas com valor de 20,63µg amentoflavona/g de material seco, quando comparados à quantidade encontrada no extrato clorofórmico da casca do caule, apresentando teor de 0,012 µg amentoflavona/g de material seco. Nestas análises não foram detectados a amentoflavona no extrato hidrometanólico das folhas de *C. macrophyllum*.

A variedade de atividades já evidenciadas nos extratos de *Cenostigma macrophyllum* Tul. como atividade antiinflamatória, antiulcerogênica, antinociceptiva e hepatoprotetora sobre diversos sistemas orgânicos direciona essa planta ao uso como medicamento (COSTA, 2005; SILVA, 2006; SOUSA *et al*, 2006).

No entanto ainda são incipientes as pesquisas de biflavonoides referentes à atividade antimalárica, porém os compostos amentoflavona e agatisflavona revelaram possuir características que futuramente possam se destacar como alternativas no tratamento da malária.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A elucidação estrutural de novos alvos moleculares tem sido uma das principais ferramentas para o desenvolvimento racional de novos fármacos. O planejamento de fármacos baseado no receptor perpassa pela sua caracterização estrutural, bem como pela determinação do seu ambiente de interação para que possa guiar a identificação de novos compostos protótipos.

De acordo com os resultados obtidos através dos parâmetros de acoplamento molecular associados aos procedimentos fitoquímicos, foi possível inferir que os compostos selecionados agatisflavona e amentoflavona aparentemente apresentam a proteína pfATP6 como sítio de ação. Outros estudos devem se voltar para a caracterização de novos representantes contra esse alvo biológico promissor. Além disso, é possível sugerir que os ligantes devem interagir nos sítios de interação hidrofóbica para se acomodar de forma estável no sítio ortostérico da proteína PfATP6, de forma semelhante à apresentada pela tapsigargina, um inibidor seletivo para as SERCAs.

O estudo da quantificação de biflavonoides em espécies de *C. macrophyllum* utilizando CLAE-DAD mostrou que a técnica é adequada para esse tipo de análise. A utilização de CLAE para determinação do teor de compostos orgânicos é de grande valia, tendo em vista, a praticidade e maior rapidez nas análises em detrimento das técnicas cromatográficas convencionais.

Outro aspecto importante para a seleção dos compostos para estudos experimentais é a presença da fonte biológica no semiárido, facilitando assim os estudos experimentais, isolamento e identificação do composto bioativo, bem como a síntese de análogos visando à melhoria de propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas.

Os resultados da quantificação dos teores dos biflavonoides agatisflavona e amentoflavona nesse trabalho foram de 22,25 µg de agatisflavona/g de material seco e 20,63 µg amentoflavona/g de material seco de *C. macrophyllum*.

Conclui-se na perspectiva da necessidade de testes para constatação do potencial inibitório destas moléculas amentoflavona e agatisflavona e na utilização dos recursos genéticos, haja vista a sua importância, seja economicamente e ecologicamente, com grande diversidade química, porém ainda pouco explorada.

REFERÊNCIAS

AFONSO, A., HUNT, P., CHEESMAN, S., ALVES, A. C., CUNHA, C. V., DO ROSARIO, V. and CRAVO, P. **Malaria parasites can develop stable resistance to artemisinin but lack mutations in candidate genes *atp6*** (Encoding the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase), *tctp*, *mdr1*, and *cg10*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **50**, 480- 489, 2006.

ALMEIDA, F. R. C., FONTAO, D. F. S., OLIVEIRA, R. C. M., CRUZ, F. J. S. M., NUNES, P. H. M. Atividade anti-ulcerogênica em extrato aquoso e etanólico das cascas de *macrophyllum*Tul. Var. *Acuminata*. In: Reunião Anual da FESBE, 2002, Salvador/Ba. **Livro de resumos da XVII Reunião Anual da FESBE**, 2002.

ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREASY. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Medical Research Reviews**, v. 26, p. 531-568, 2006.

ALVAREZ, J.; SCHOICHET, B.. **Virtual Screening in drug discovery**. New York: CRC Press, 2005.

ALVES, C. Q. **Estudos químicos e avaliação biológica de duas espécies de leguminosae: *Diocleavirgata* e *Cenostyigma macrophyllum***. Tese (Doudorado) do Programa de Pós-Graduação em Química da UFBA, 2012.

ALVES, C. Q. **Flavonoides antioxidantes e derivados de ácido gálico isolados de *Cenostyigma gardnerianum* Tul.** (Leguminosae). Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da UFBA para título de Mestre em Química Orgânica, 2007.

ALVES, C. Q. *et al.* **Flavonoides galoil e p-cumaruil glicosilados de *Cenostyigma gardnerianum* Tul.** 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2007.

AQUINO NETO, F.R. e NUNES, D.S.S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.

AQVIST, J.; LUZHKOVA, V. B.; BRANDSDAL, B. O. Ligand binding affinities from MD simulations. **Acc Chem Res**, v 35, p. 358–365, 2002.

ARAÚJO, M. E. M. Química Analítica Aplicado a Produtos Naturais. In: Curso de Mestrado em Química Analítica FCUL, 2005, Módulo B. AREGAWI *et al.* **Who Global Malaria programme**.WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2008.

ASHUTOSH SHANDILYA, SAJEEV CHACKO, B. JAYARAM & Indira Ghosh, "A plausible mechanism for the antimalarial activity of artemisinin: a computational approach" *Nature. Scientific Reports*. V. 3 : 2513 , 2013.

BALBANI, A. P. S.; SILVA, D. H. S.; MONTOVANI, J. C. PatentsofdrugsextractedfromBrazilian medicinal plants. **Expert Opinion on Therapeutic Patents.**, v.19, p.461-473, 2009.

BALINT, G. A. Artemisinin and its derivatives. An important new class of antimalarial agents. **Pharmacol. Therapeut**, v. 90, p. 261-265, 2001.

BARATA, R. C. B. Malária no Brasil: Panorama Epidemiológico na Última Década. **Cad. Saúde Públ.** Rio de Janeiro, 11 (1): 128-136, jan/mar, 1995.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. **Biodiversidade**: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n.3, p.679 – 688, 2009.

BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (spe) e micro extração em fase sólida (spme) de Piretróides em Água. **Quim. Nova**, v. 24, n. 2, p. 172-175, 2001.

BELLO, M. L. **Derivados sintéticos da chalcona inibidora do crescimento de *Leishmaniabraziliensis***: Modelagem molecular para o estudo da relação estrutura atividade (SAR) e avaliação teórica do perfil físico-químico e toxicológico (in silico). Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) UFRJ, 2010.

BOHACEK, R.S. and Mc Martin, C. Modern computational chemistry and drug discovery: structure generating programs. **Curr. Opin. Chem. Biol.** 1157–161, 1997.

BORDOLI, L.; KIEFER, F.; ARNOLD, K.; BENKERT, P.; BATTEY, J.; SCHWEDE, T. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. **Nature Protocols**, 4, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia Prático de tratamento da malária no Brasil. **Série A. Normas e Manuais Técnicos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2010.

_____.Ministério da Saúde. Resolução, Agência Nacional de Vigilância Sanitária nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

_____.INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003.

BRAZ-FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de Pacatupano. **Química Nova**, 17(5), 1994.

BURGESS, C.; O'DONOHUE, A.; GILL, M. Agony and ecstasy: a review of MDMA effects and toxicity. **European Psychiatry**, v.15, p.287-294, 2000.

CALDERON, L. A., *et al.* Amazonian Biodiversity: A View of Drug Development for Leishmaniasis and Malaria. **J. Braz. Chem. Soc.** v.20, n.6, p.1011-1023, 2009.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guide lines for herbal medicines (phytotherapeutic agent). **Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CAMARGO, E. P. Malária, Maleita, Paludismo, **Ciência e Cultura**, v.55, n.1, p.26-30, 2003.

CANTO, V. P.. **Estudo da interação da Manadiona com as aminooxidasas A e B via docking e dinâmica molecular**. 2011. f.54. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química). Instituto de Química- Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, p. 78-84, 2011.

CARDWELL, J. 2006. **Tutorial B5**. Using the *ptraj* program to analyze trajectories. Disponível em: <http://ambermd.org/tutorials/basic/tutorial5/>. Acesso em: 29 set. 2011.

CAROLLO, C. A. **Análise fitoquímica e avaliação dos efeitos dos tipos de adubação, da radiação solar e do estresse hídrico, no acúmulo de metabólitos secundários em espécies do gênero Mikania**. Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2008.

CASE, D. A. *et al.* **Amber 10**: User Manual. San Francisco: University of California, p. 320, 2008.

CINTRA, P.; MALASPINA, O.; PETTACCI, F. F. J. B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F. Oral toxicity of chemical substances found in *Dimorphandramollis* (Caesalpinaceae) against honeybees (*Apis mellifera*) (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v.45, p. 141-149, 2005.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of Nutrition and Biochemistry**, v.7, p.66-76, 1996.

CORRÊA JUNIOR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. Cultivation of medicinal, aromatic and seasoning plants. 2ªed, **Jaboticabal: Jaboticabal/FUNEP**, 162p. 1994.

COSTA, C. L. S. da. Constituintes químicos e atividades antibacteriana, antiulcerogênica e hepatoprotetora da *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata* Teles Freire (Leguminosae-Caesalpinioideae) Charlylton Luis Sena da Costa. –Teresina, 2005.

CRAFT, J. C. Challenges facing drug development for malaria. **Current Opinion in Microbiology**, 2008.

CRAGG, G. M. *et al.* International collaboration in drug discovery and development: the NCI experience. **Pure and Applied Chemistry**, v.71, p.1619-1633, 1999.

DANIEL. J.F. de S.; CARVALHO. M. G. de; CARDOSO. R. DA S.; EBERLIN. M. N. Others flavonoids from *Ouratea hexasperma* (Ochnaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, 2005.

DE PILLA VAROTTI, F.; BOTELHO, A. C. C.; ANDRADE, A. A.; DE PAULA, R. C.; FAGUNDES, E. M. S.; VALVERDE, A.; MAYER, L. M. U.; MENDONÇA, J. S.; DE SOUZA, M. V. N.; BOECHAT, N.; KRETTLI, A. U. Synthesis, Antimalarial Activity, and Intracellular Targets of MEFAS, a New Hybrid Compound Derived from Mefloquine and Artesunate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 11, p. 3868-3874, 2008.

DONDORP, A. M *et al.* Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. **N. Engl. J. Med**, v. 361; 5, 2009.

DOURADO, R. S.; LADEIRA, A. M. **Identificação de flavonoides em *Hypericum cordatum* (Vell.) N. Robson (Clusiaceae)**. Revista Brasil. Bol., v. 31, n. 4, p. 611 – 620, out. – dez. 2008.

DUAN, Y. *et al.* A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. **Journal Computational Chemistry**. v. 24, 2012 p., 2003.

ECKSTEIN-LUDWING, *et al.* Artemisinins targets the SERCA of *Plasmodium falciparum*. **Nature**, 424 p. 957–61, 2003.

FEHER, M.; SCHMIDT, J.M. Property distributions: differences between drugs, natural product, and molecules from combinatorial chemistry **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v.43, 218p. 2003.

FERREIRA, I. D., MARTINELLI, A., RODRIGUES, L. A., DO CARMO, E. L., DO ROSARIO, V. E., POVOA, M. M. and CRAVO, P. *Plasmodium falciparum* from Para state (Brazil) shows satisfactory in vitro response to artemisinin derivatives and absence of the S769N mutation in the SERCA-type PfATPase6. **Tropical Medicine & International Health**, 13, 199-207, 2008.

FERREIRA, R. S.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Integration virtual and high-throughput screening: opportunities and challenges in drug research and development. **Química Nova**. v. 34. n. 10. São Paulo, 2011.

FIOCRUZ. **Conheça a Malária**. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ioc/media/malaria%20folder.pdf>> Acesso em: 03 dez. de 2013.

FIRENZUOLI, F.; GORI, I.; NERI, D. Clinical phytotherapy: opportunities and problematics. **Annali dell Istituto Superiore de Sanita.**, v.41, n. 1, p.27-33, 2005.

FORESMAN, J. B.; FRISCH, A. E. **Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods**, 2.ed. Pittsburgh, Gaussian, Inc. 1996.

FORLI, S. **Raccoon**: autodock Vs preparation tool. [S.l.]: Virtual Books, 2009. Disponível em: <http://mgldev.scripps.edu/raccoon/Raccoon_v1.0_user_manual.pdf>. Acesso em: 10 maio 2013.

FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, M. G.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: Aspectos Históricos e Quimioterapia. **Química Nova**, v.31, 1278 p., 2008.

FRANCISCO, A. I.; VARGAS, M. D. Ferroquina: o antimalárico do futuro. **Revista Virtual de Química**. v. 2, n. 2, 2010.

FRISCH, M. J. *et al.* **Gaussian**, Inc., Wallingford CT, 2009.

GARAH, F. B. *et al.* Docking Studies of Structurally Diverse Antimalarial Drugs Targeting PfATP6: No Correlation between in silico Binding Affinity and in vitro Antimalarial Activity. **ChemMedChem**. v. 4, p. 1469 – 1479, 2009

- GARCIA, L. S. Malária. **ClinLabMed**, v.30, p.93-128, 2010
- GOBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influencia no conteúdo de metabolitos secundários. **QuímicaNova**, v. 30, p. 374-381, 2007.
- GOODFORD, P.J. Computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. **Journal of Medicinal Chemistry**. 28849–857, 1985.
- GOODNOW JUNIOR, R. A. Hit and lead identification: integrated technology-based approaches. **Drug Discov. Today Tech**, v. 3, n. 4, p. 367-375, 2006.
- HARRIS, Daniel C. **Análise Química Quantitativa**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008.
- HENDLICH, M. **Databases for protein–ligand complexes**. Acta Crystall ogr. D 541178–1182, 1998.
- HENDLICH, M., *et al.* LIGSITE: automatic and efficient detection of potential small molecule-binding sites in proteins. **J. Mol. Graph Model** 15359–363, 1997.
- HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. Tradução Celio Pasquini [Coord.]. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, cap. 28.p. 830-865, 2009.
- HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. Princípios ativos de plantas superiores. **EdUFSar.**, São Carlos, p. 54., 2003.
- HOU, T.; WANG, J.; Li, Y.; WANG, W. Assessing the performance of the molecular mechanics/Poisson Boltzmann surface area and molecular mechanics/generalized Born surface area methods II: The accuracy of ranking poses generated from docking. **J ComputChem**, 32, p. 866-77, 2011.
- HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHELLEN, K. VMD - Visual Molecular Dynamics.**Journal Molecular Graphics**. v. 33, 1996.
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH); **Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology**, Q2A (CPMP/ICH/381/95), 1995. Disponível em:<<http://www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/UCM128048.pdf>>. Acessoem: 17 nov. 2013.
- IRWIN, J. J., SHOICHET B. K., ZINC – A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening.**J. Chem. Inf. Model.**,45 (1), p. 177–182, 2005.
- JAIN, A.N. Scoring noncovalent protein–ligand interactions: a continuous differentiable function tuned to compute binding affinities. **J. Comput. Aided Mol. Des.** 10427–440, 1996.
- JARDIM,I.C.L.F.;COLLINS,C.H.;GUIMARÃES,L.F.L.CromatografiaLíquida Alta Eficiência. In: COLLINS,C.H.; BRAGA,G.L.; BONATO,P.S. **Fundamentos da Cromatografia**. Campinas,SP,EditoraUnicamp,p.273-397,2006.

JAMBOU, R., LEGRAND, E., NIANG, M., *et al.* Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet*, **366**, 1960-1963, 2005.

JUNG, M. *et al.* Three-dimensional structure of *Plasmodium falciparum* Ca²⁺-ATPase (PfATP6) and docking of artemisinin derivatives to PfATP6. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005.

KERRIGAN, J. E. Amber 9.0 Drug/DNAcomplexTutorial. **Piscataway, New Jersey**, p. 17, 2009.

KITCHEN, D. B. *et al.* Docking and Scoring in Virtual Screening for Drug Discovery: Methods and Applications. *NatureReviews*. v. 3, p. 935-949, 2004.

KLAYMAN, D. L. Qinghaosu (Artemisinin): An Antimalarial Drug from China. *Science*, v.228, p.1049-1055, 1985.

KRISHNA, S. *et al.* Artemisinins: their growing importance in medicine. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 29, n. 10, 2008.

LASKOWSKI R.A. *et al.* PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *JournalAppliedCrystallography*. v.26, p. 283-291, 2004.

LASKOWSKI, R.A., *et al.* Protein clefts in molecular recognition and function. *Protein Sci.* 52438–2452, 1996.

LEACH, A. R.; SHOICHET, B. K.; PEISHOFF, C. E..Prediction of protein-ligand interactions. Docking and scoring: successes and gaps. *J. Med. Chem.*, v. 49, n. 20, p. 5851-5855, 2006.

LEITE, F. H. A. **Estudos de acoplamento molecular entre peróxidos obtidos de fontes naturais e o grupo heme**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, 2011.

LEITE, F. H. A. *et al.* **Natural Peroxides from Brazilian Flora: Conformational Analysis and Complexation with Heme**. In: XIII Simpósio Brasileiro de Química Teórica, 2005.

LEITE, F. H. A. *et al.* **Homology Modeling of Ca⁺²-ATPase (PfATP6) of *Plasmodium falciparum*** In: 4th Brazilian Medicinal Chemistry, 2008.

LEITE, F. H.A *et al.* Search for new antimalarial compounds obtained from natural sources by molecular modeling. *International Journal of Quantum Chemistry*, v. 110, n.11, 2066p., 2010.

LEWIS, G. P. Legumes of Bahia. **Egland**: Royal Botanic Gardens Kew p. 369, 1987.

LIESHOUT, M. *et al.* Climate change and malaria: analysis of the SRES climate and socio-economic scenarios. *Global Environmental Change*, v.14, p.87–99, 2004.

LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings **Adv. Drug Deliv. Rev.** 46(1-3), 3- 6.2001.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings, **Adv. Drug Deliv. Rev.**, 23(1-3), 3-25, 1997.

LIRA, S. R. S. **Estudo farmacológico dos efeitos gastrointestinais e comportamentais do lupeol e da dilactona do ácido valonéico, isolado de *Cenostigma Macrophyllum Tul.*, em roedores.** Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza – Ce, 2010.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** 2 ed. São Paulo: Editora Onstituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2008

LOURENÇO, R. V. **A utilização da química computacional em processos químicos relacionados à ionização por *electrospray*.** Tese de Doutorado São Paulo, 2009.

MARSH L. Prediction of ligand binding using an approach designed to accommodate diversity in protein-ligand interactions. **PLoS ONE**, 6, (2011).

MILLER, L. H.; ACKERMAN, H. C.; SU, X. Z.; WELLEMS, T. E. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. **Nat Med**, v. 19, n. 2, p. 156-67, 2013.

MIRANKER, A. and KARPLUS, M. **Functionality maps of binding sites: a multiple copy simultaneous search method.** *Proteins* 1129–34, 1991.

MOLES, P.; OLIVA, M.; SAFONT, V. S. Theoretical study on the decomposition Mechanism of artemisinin. **Tetrahedron**, n.64, 944 p. 2008.

MOITESSIER, N.; ENGLEBIENNE, P.; LEE, D.; LAWANDI, J. CORBEIL, C. R.. Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: a long way to go. **Br.J. Pharmacol.**, v. 153, p. 7-26, 2008.

NAIK, P. K.; SRIVASTAVA, M.; BAJAJ, P.; JAIN, S.; DUBEY, A.; RANJAN, P.; KUMAR, R.; SINGH, H. The binding modes and binding affinities of artemisinin derivatives with *Plasmodium falciparum* Ca²⁺- ATPase (PfATP6). **Journal of Molecular Modeling**, v. 17, n. 2, p. 333-357, 2011.

NEVES, P. D. **Parasitologia Humana.** Rio de Janeiro: Atheneu, 1998. OLESEN, C. *et al.* The structural basis of calcium transport by the calcium pump. **Nature**, 450: 1036-1042, 2007.

OGUNBAYO, Oluseye A. MICHELANGELI, Francesco. Related flavonoids cause cooperative inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase by multimode mechanisms. **FEBS Journal**,v. 281, p. 766-777, 2014.

OKIMOTO, N.; FUTATSUGI, N.; FUJI, H.; SUENAGA, A.; MORIMOTO, G.; YANAI, R.; OHNO, Y.; NARUMI, T.;TAIJI, M. High-performance drug discovery: computational

screening by combining docking and molecular dynamics simulations. **PLoS Comput Biol**, 2009.

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. Oxford University Press Inc., New York, 4th ed., 2009.

PEI, J.; WANG, Q.; LIU, Z.; LI, Q.; YANG, K.; LAI, L.. PSI DOCK: towards highly efficient and accurate flexible ligand docking. **Proteins**, v. 62, n. 4, p. 934-946, 2006

PEREIRA, S. S., ALMEIDA, F. R. C., CHAVES, M.H., SILVA, L. L., SILVA, A. M. O., ALENCAR, N. L. Estudo dos Efeitos antiinflamatório e analgésico da casca de *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata* Teles Freire. In: XIV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPI, 2006, Teresina-PI. **Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da UFPI**. Teresina: EDUFPI, 2006.

PORTO GONÇALVES, C. W. **Geografia da riqueza, fome e meio ambiente**: pequena contribuição crítica ao atual modelo agrário/agrícola de uso dos recursos naturais. R. Inter. Interdisc. INTERthesis, Florianópolis (Brasil) - ISSN 1807-1384. Vol. 1, No 1, 2004. Disponível em: <http://www.periodicos.ufsc.br/index.php/interthesis/article/view/604/10751> Acesso em: 31 dez. de 2013.

PULCINI, S.; STAINES, H. M.; PITTMAN, J. K.; SLAVIC, K.; DOERIG, C.; HALBERT, J.; TEWARI, R.; SHAH, F.; AVERY, M. A.; HAYNES, R. K.; KRISHNA, S. Expression in Yeast Links Field Polymorphisms in PfATP6 to in Vitro Artemisinin Resistance and Identifies New Inhibitor Classes. **Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. 3, p. 468-478, 2013.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; AMLEIDA, J. R. G. S.; LIMA, J. T. *et al.*, Plants with anticonvulsant properties – a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia.**, v. 18 (Suplemento), p. 789-819., 2008.

RAMACHANDRAN G. N.; SASISEKHARAN, V. Conformation of polypeptides and proteins. **Advanced Protein Chemistry**, n. 23, p. 283-438, 1968.

RAREY, M., *et al.* Time-efficient docking of flexible ligands into active sites of proteins. Proc. Int. Conf. Intell. Syst. **Mol. Biol.** 3300–308, 1995.

REDDY, A. S.; PATI, S. P.; KUMAR, P.P.; PRADEEP, H.N.; SASTRY, G.N. Virtual Screening in Drug Discovery- A computational Perspective. **Current Protein and Peptide Science**, v.8. n. 4. p. 329-351, 2007.

REIS, J.C., MARANHÃO, SKS., BRITO, S. R. C. Avaliação da atividade de *Cenostigma macrophyllum* Tul na glicemia e na glicosilação de hemoglobina em ratos diabéticos. In: **XI Seminário de Iniciação Científica da UFPI**, 2002, Teresina, 2002.

REY, L. **Parasitologia**. 3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 335-385, 2001.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, R. C., PELACINI, C. R. Influência do manitol e NaCl na germinação de sementes de duas espécies de leguminosas com importância no semiárido baiano. **Sítientibus Série Ciências Biológicas**, v 6, p. 105-109, 2006.

ROCHA e SILVA, H. R.; *et al.* **Constituintes Químicos das cascas do caule de *Cenostigma macrophyllum***: Ocorrência de Colesterol. Artigo: Rev. Química Nova, vol. 30, No. 8, 1877-1881, 2007.

RODRIGUES, M. V. N.; REHDER, V. L. G.; SARTORATTO, A.; BOAVENTURA JÚNIOR, S.; SANTOS, A. S. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. **Multiciência**, v.7, p. 98-111, 2006.

RUPPERT, J., *et al.* Automatic identification and representation of protein binding sites for molecular docking. **Protein Sci.** 6524–533, 1997.

SÁ, P. G. S. *et al.*. **Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginolla Convalute* (Arn.) Spring (*Selaginellaceae*)**. Ver. Ciênc. Farm. Básica Apl., 2012; 33(4): 561-566 ISSN 1808-4532.

SANNER, M.F. Python: A Programming Language for Software Integration and Development. **J. Mol. Graphics Mod.** v. 17, 1999. p. 57-61.

SANDES, A. R. R.; DI BLASI, G. Biodiversidade e diversidade química e genética: Aspectos Relacionados com a Propriedade Intelectual no Brasil. **Biociência Ciência & Desenvolvimento**, 2006.

SANTOS, F.J.B.: Constituintes químicos da fase hidroalcoólica e atividades antiinflamatória e antinociceptiva do extrato etanólico das folhas da *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. acuminata Teles Freire (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Piauí.146f. 2001.

SBD-SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Tratamento e acompanhamento do Diabetes mellitus-Diretrizes SBD**. São Paulo, 2006.

SEIFERT, M. H. J.; WOLF, K; VITT, D. Virtual high-throughput in silico screening. **Biosilico**, v.1, n. 4, p. 143-149, 2003.

SCHNEIDER, G.; HANS-JOACHIM, B.Virtual screening and fast automated docking methods.**Reviews**, v. 7, n. 1, 2002.

SCHMITT, S., *et al.* A new method to detect related function among proteins independent of sequence and fold homology. **J. Mol. Biol.** 323387–406, 2002.

SHABIR,G.A.Validationo fhigh-performance liquid chromatograf y methods for pharmaceutical análiseis. Understanding the differences and similarities between validation requeriments of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the

- International Conference on Harmonization *Journal of Chromatography A*, v.987, p.57-66, 2003.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. (org.) **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 3ª ed. Porto Alegre: UFSC, p.13-26, 2001.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. Santa Catarina, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, n.1, 6p., 2001.
- SNOW, R. W. *et al.* The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. **Nature**, v. 434, p. 214-217, 2005.
- SOTRIFFER, C. *et al.* Docking and scoring functions. In: ABRAHAM, D. J. **Burger's Medicinal Chemistry & Drug Discovery**. Wiley-Interscience, p.282-306, 1998.
- SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR., G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais. **Química Nova**, Brasil, v. 30, p. 351-355, 2007.
- SOUSA, S. F.; FERNANDES, P. A.; RAMOS, M. J. Protein-ligand docking: Current status and future challenges. **Proteins**, 2006.
- STEWART, J. J. P. Calculation of the geometry of a small protein using semiempirical methods. **Journal of Molecular Structure**, v. 401, n. 3, p. 195-205, 1997.
- SUZART, L. R.; DANIEL, J. F. DE S.; CARVALHO, M. G. Biodiversidade Flavonoídica e Aspectos Farmacológicos em Espécies dos Gêneros *Ouratea e Luxemburgia* (OCHNACEAE) **Química Nova**, Vol. 30, No. 4, 984-987, 2007.
- SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Analytical method development and validation. **New York: Marcel Dekker**, 1998.
- TARANTO, A. G.; CARNEIRO, J. W. M.; OLIVEIRA, F. G. MNDO/d calculations on the interaction between artemisinin and heme. **J. Mol. Struct. (Theochem)**, v.539, p. 267-272, 2001.
- TAYLOR, R.D.; JEWSBURY, P.J.; ESSEX, J. W. A review of protein-small molecule docking methods. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 16, p. 151-166, 2002
- TOYOSHIMA, C.; NOMURA, H. Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. **Nature**, 418: p.605-611, 2002.
- TRAVASSOS, M. A.; LAUFER, M. K. Resistance to Antimalarial Drugs: Molecular, Pharmacologic, and Clinical Considerations. **Pediatric Research**, v.65, 5, 2009.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

UHLEMANN, A. C., CAMERON, A., ECKSTEIN-LUDWIG, U., *et al.* A single amino acid residue can determine the sensitivity of SERCAs to artemisinins. **Nature Structural & Molecular Biology**, 12, 628-629, 2005.

VALE, N.; MOREIRA, R.; GOMES, P. Quimioterapia da malária: um século no desenvolvimento de antimaláricos. **Química**. v. 099, 2005.

VERDONK, M.L.; COLE, J.C.; HARTSHORN, M.J.; MULRRAY, C.W.; TAYLOR, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins: structure, function and genetics**, v. 52, p. 603-609, 2003.

VERDONK, M.L., *et al.* SuperStar: improved knowledge-based interaction fields for protein binding sites. **J. Mol. Biol.** 307841–859, 2001.

VERONESI, R. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

VESSMAN, J.; STEFAN, R.I.; STADEN, J F.V.; DANZER, K.; LINDNER, W.; BURNS, D.T.; FAJGELJ, A.; MÜLLER, H.; Selectivity in analytical chemistry, **Internacional Union of Pure and Applied Chemistry**, v.73, p.1381-1386, 2001.

WALKER, R. 2006. **Tutorial 2, Section 3**. Using dynamics simulations to estimate binding energetic. Disponível em: [//www.rosswalker.co.uk/tutorials/amber_worshop/Tutorial two /section3.htm](http://www.rosswalker.co.uk/tutorials/amber_worshop/Tutorial_two/section3.htm). Acesso em: 29 set. 2011.

WEBER, C.K. **Modelagem Molecular de compostos arilpiperazínicos e suas interações com o receptor 5HT_{1A}**. 2008. 137 f. Tese (Doutorado em Ciências Físico-química). Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

WARWICK, M. C., LEWIS, G. P. **Revision of *Plathimena* (Leguminosae-Mimosoideae)**, *Edinburgh Journal of Botany*, 60, 111, 2003.

WARWICK, M. C., LEWIS, G. P. **A revision of *Cenostigma* (Leguminosae – Caesalpinioideae –Caesalpinieae), a genus endemic to Brazil**. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew, 2009.

World Health Organization. **World Malaria Report**. Geneva, 2013.

XAVIER, M. M. S.; REBÊLO, J. M. M. Espécies de Anopheles (Culicidae, Anophelinae), em áreas endêmicas de malária, Maranhão, Brasil. **Revista de Saúde Pública**. v. 33, n. 6, p. 535-541, 1999.

YARIWAKE, J. H.; LANÇAS, F. M.; CAPPELARO, E. A.; VASCONCELOS, E.C.; TIBERTI, L. A.; PEREIRA, A. M. S.; FRANCA, S. C. Variabilidade sazonal de constituintes químicos (triterpenos, flavonoides e polifenóis) das folhas de *Maytenus aquifolium* Mart. (Celastraceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.15, p.162-168, 2005.

ZHANG, G. Q., GUAN, Y. Y., ZHENG, B., WU, S. and TANG, L. H. No PfATPase6 S769N mutation found in *Plasmodium falciparum* isolates from China. **Malária Journal**, 7, 2008.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. 6. ed. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Org.) **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. UFRGS Florianópolis: Ed. UFSC, 2007. p. 577- 614.