

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Instituto de Química
Departamento de Físico-Química



Mírian da Silva Costa

***ESTUDO TEÓRICO DE ALGUNS INTERMEDIÁRIOS
RADICALARES E NEUTROS DA ARTEMISININA E DA
INTERAÇÃO EXISTENTE ENTRE O HEME E A
ARTEMISININA***

Dissertação apresentada ao Instituto de Química
como parte dos requisitos para a obtenção
do título de Mestre em Química

Orientadora: Profa. Dra. Márcia M. C. Ferreira

Campinas/2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA
DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Márcia Miguel Castro Ferreira (Orientadora)

Prof. Dr. Albérico Borges Ferreira da Silva (IQSC-USP)

Prof. Dr. Nelson Henrique Morgon (IQ-UNICAMP)

Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder (CPQBA-UNICAMP)

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pela aluna **MÍRIAN DA SILVA COSTA**, aprovada pela Comissão Julgadora em 06 de agosto de 2004.

Profa. Dra. Márcia Miguel Castro Ferreira
(Presidente da Banca)

“TUDO POSSO NAQUELE (DEUS) QUE ME FORTALECE”

Fp 4:13

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Márcia Miguel, pela ótima orientação e amizade.

Ao Prof. Rogério Custódio, por todos os auxílios neste trabalho.

Aos colegas de grupo, Rudolf, Muftah, Aline e Atualpa, obrigada por toda a ajuda.

Aos funcionários da pós-graduação e biblioteca pelo trabalho prestado com tanto carinho e dedicação.

Ao CENAPAD-SP, pelos ótimos recursos computacionais.

Aos amigos da minha república Beraca: Aida, Aninha, Carol, Clara, Débora, Juliana, Kelly, Kezia, Lucimar, Marcos, Mariana, Miriam, Natália, Regiane e Silvana, obrigada pelos momentos em que passamos juntos.

Aos amigos das repúblicas ABU, Caverna de Adulão e La Maison, obrigada pelo companheirismo e amizade sincera.

A uma família secreta, mandada por Deus, que me incentivou financeiramente durante meu mestrado.

Ao Heitor, pelo amor, companheirismo, paciência e incentivo, mesmo na distância.

Aos meus irmãos Denio e Marina, pois mesmo na distância sei que torciam pelo meu sucesso.

Aos meus pais Wilfe e Maria, pois sem eles meu mestrado não teria se concluído.

A DEUS, pois nada poderia ter sido feito sem o cuidado Dele.

CURRICULUM VITAE

DADOS PESSOAIS:

Nome: Mírian da Silva Costa

Nascimento: 29/03/1979 Nacionalidade: brasileira Naturalidade: Unaí-MG

Estado civil: solteira Sexo: feminino E-mail: mirianscosta@hotmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA:

Mestrado: 2002-2004

Título da Dissertação: “ESTUDOS TEÓRICOS DE ALGUNS INTERMEDIÁRIOS RADICALARES E NEUTROS DA ARTEMISININA E DA INTERAÇÃO EXISTENTE ENTRE O HEME E A ARTEMISININA”, Instituto de Química, UNICAMP.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Miguel Castro Ferreira.

Graduação: 1997-2001

Bacharelado e Licenciatura em Química.

Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

OUTROS CURSOS:

- Treinamento “Introdução a Química Computacional II: Dinâmica Molecular” realizado no CENAPAD – S.P. (Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho em São Paulo).

(Período: 08/04 – 12/04/2002 - Carga horária: 15 horas)

- Treinamento “Introdução a Química Computacional I: Método Quânticos” realizado no CENAPAD – S.P. (Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho em São Paulo).

(Período: 01/04 – 05/04/2002 - Carga horária: 15 horas)

- Treinamento “Introdução a Química Computacional” realizado no CENAPAD – S.P. (Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho em São Paulo).

(Período: 29/10 – 01/11/2001 - Carga horária: 12 horas)

- XIV Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química – Minas Gerais.
Mini-curso: *“A Química dos Odores e Sabores”*.
(Período: 12/10 – 14/10/2000 – Uberlândia/MG – Carga horária: 3 horas)
- I Jornada Científica de Química da Universidade Federal de Uberlândia.
Mini-curso: *“Aspectos Gerais da Bioinorgânica”*.
(Período: 16/06 – 18/06/1999 – Uberlândia/MG - Carga horária: 6 horas)

PRINCIPAIS ATIVIDADES ACADÊMICAS:

- Docente da Faculdade de Ciências e Tecnologia de Unai (FACTU) nas seguintes disciplinas: Química Geral, Química Orgânica e Bioquímica.
(Período: 02/2004 – até o presente momento)
- Docente da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES) na disciplina de Química Geral.
(Período: 12/2004 – até o presente momento)
- Participação no “Programa de Estágio Docente na Atividade Supervisionada de Apoio a Docência” (PED/Unicamp - Programa de Estágio Docente) na disciplina “Processamento de Polímeros”.
(Período: 05/08 – 07/12/2002)
- Iniciação Científica nos laboratórios de Química Computacional, Fotoquímica e Síntese Orgânica da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).
(Período: 08/1999 – 11/2000)

DISCIPLINAS CURSADAS NO MESTRADO:

- Planejamento e Otimização de Experimentos (A)*, Química Orgânica Avançada (B)*, Quimiometria - Análise Multivariada e Dados Experimentais em Química (A)*, Química Quântica I (A)*, Métodos para Estudos de Correlação Eletrônica em Moléculas (B)*.

Obs: *- Conceito obtido.

PUBLICAÇÕES EM REVISTAS CIENTÍFICAS:

- Costa, M. S; Ferreira, M. M. C. “Theoretical study of some radical and neutral intermediates of artemisinin” – escrevendo.
- Costa, M. S; Ferreira, M. M. C. “Theoretical study of the interaction between the artemisinin and the heme receptor” – escrevendo.

APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS:

- XII Simpósio Brasileiro de Química Teórica – SBQT
“Estudo teórico de alguns intermediários radicalares e neutros da artemisinina”
(Período: 23/11 – 26/11/2003 – Caxambu/MG)

- “V Seminário de Iniciação Científica” promovido pela Universidade Federal de Uberlândia
*“Design” de moléculas visando sua aplicação em Terapia Fotodinâmica:
Desenvolvimento de derivados da Rodamina b, usando Modelagem Molecular.*
(Período: 27/06 – 29/06/2001 – Uberlândia/MG)

- 23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - SBQ
*“Desenvolvimento de derivados da Rodamina B, usando Modelagem Molecular,
visando sua aplicação em Terapia Fotodinâmica”.*
(Período: 23/05 – 26/05/2000 - Poços de Caldas/MG)

RESUMO

O mecanismo de ação de qualquer fármaco é de suma importância para o desenvolvimento do mesmo e de novas drogas similares. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar teoricamente mecanismos de ação da artemisinina, a qual possui atividade antimalárica contra *Plasmodium falciparum*.

Primeiramente foram feitos estudos computacionais das estruturas da artemisinina e de alguns prováveis intermediários do mecanismo de ação desta droga. O método *ab initio* HF/6-31G** foi utilizado para a otimização das geometrias destas estruturas e posteriormente foram calculadas as Energias Livres de Gibbs destas espécies químicas com o intuito de verificar a espontaneidade de quatro rotas de reações propostas. Entre os radicais calculados ao longo do caminho de decomposição redutiva da artemisinina, a diferença de energia livre entre o radical centrado no átomo de oxigênio **1/2** e o radical secundário **3** é de $-12,06 \text{ kcal mol}^{-1}$ e entre o radical primário **6** é de $-15,92 \text{ kcal mol}^{-1}$. Isto indica que a cisão homolítica da ligação C₃-C₄ é preferencial do ponto de vista energético, o que concorda com resultados da literatura. Observou-se, através da análise das energias eletrônicas e energias livres, que o intermediário **20** é o mais estável. Através da análise de ambas as energias (eletrônicas e livres) destas quatro rotas de estudo chega-se à conclusão de que a formação do intermediário **20** (rota B) é preferencial.

A segunda parte deste trabalho constou de alguns estudos sobre a interação existente entre a artemisinina e o receptor **heme**. Através de cálculos semi-empíricos usando o método PM3 estudou-se a barreira de energia de rotação da artemisinina sobre o **heme**. Na interação de menor energia entre o **heme** e a artemisinina observou-se várias interações C-H... π entre átomos de H da artemisinina e os orbitais π do **heme**. Estas interações são importantes, pois conferem estabilidade ao complexo formado.

ABSTRACT

Elucidating the mechanism of action of any drug is very important for new drugs development. Thus, the purpose of this work is to study theoretically the probable mechanisms of action of artemisinin, which is essential for the antimalarial activity against *Plasmodium falciparum*.

Firstly, the computational studies of artemisinin structure and some intermediates of the mechanism of action of this drug were performed. The HF/6-31G** *ab initio* method was used to optimize the geometries of these structures and after that the electronic and free energies of the chemical species were calculated to verify the spontaneity of some proposed routes of reactions. Among the radicals calculated along the pathway for reductive decomposition of artemisinin, the free energy difference between the O-centered radical **1/2** and the secondary radical **3** is of $-12,06 \text{ kcal mol}^{-1}$ and between the primary radical **6** is of $-15,92 \text{ kcal mol}^{-1}$. This indicates that the C₃-C₄ bond cleavage process is preferential from an energetic viewpoint, which it is in accord with the literature. By analysis of the electronic energies and free energies, the intermediate **20** is the most stable. Through the analysis of both energies (electronic and free) of these routes we concluded that the formation of intermediate **20** (route B) is preferential.

The second part of this work was focused in the study of the interaction between the artemisinin and the **heme** receptor. Through semi-empirical calculations using the PM3 method, we studied the rotational energy barrier of artemisinin complexed to **heme**. At the smaller energy interaction between the **heme** and the artemisinin it was observed several C-H... π interactions between the hydrogen atoms from artemisinin and the π orbitals of **heme**. These interactions are important because they give stability to the complex.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL.....	xvii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xxi
ÍNDICE DE TABELAS.....	xxv

CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO / OBJETIVOS

I.1-INTRODUÇÃO.....	3
I.1.1-MALÁRIA: A DOENÇA.....	4
<i>I.1.1.1. Evolução dos Plasmódios.....</i>	<i>4</i>
<i>I.1.1.2. Morfologia dos Plasmódios.....</i>	<i>7</i>
<i>I.1.1.3. Fisiologia dos Plasmódios.....</i>	<i>9</i>
<i>I.1.1.4. Alterações Patológicas.....</i>	<i>11</i>
<i>I.1.1.5. Drogas Antimaláricas.....</i>	<i>11</i>
I.1.2-INTERMEDIÁRIOS RADICALARES E NEUTROS DA ARTEMISININA.....	15
<i>I.1.2.1. Resultados de Estudos Experimentais.....</i>	<i>15</i>
<i>I.1.2.1.1. Reações de Alquilação.....</i>	<i>15</i>
<i>I.1.2.1.2. Reações com Radicais de Oxigênio Derivados do Hidroperóxido (Formado pela Abertura do Anel da Artemisinina.....</i>	<i>18</i>
<i>I.1.2.2. Resultados de Estudos Teóricos.....</i>	<i>19</i>
I.1.3-INTERAÇÃO EXISTENTE ENTRE O HEME E A ARTEMISININA.....	22
<i>I.1.3.1. Resultados de Estudos Teóricos.....</i>	<i>23</i>
<i>I.1.3.1.1. Cálculos de Interação Feitos para a Artemisinina e 29 Derivados.....</i>	<i>23</i>

<i>I.1.3.1.2. Interações entre a Artemisinina e Vários Tipos do Receptor Heme.....</i>	24
<i>I.1.3.1.3. Interação entre 23 Análogos da Artemisinina e o Receptor Heme.....</i>	25
<i>I.1.3.1.4. Interação entre a Artemisinina e 4 Análogos com o Receptor Heme.....</i>	27
I.2-OBJETIVOS.....	29

CAPÍTULO II. MÉTODOS DE CÁLCULOS / MÉTODOS COMPUTACIONAIS

II.1-MÉTODOS DE CÁLCULOS.....	33
II.1.1-MÉTODOS QUÂNTICOS.....	33
<i>II.1.1.1. A Teoria Hartree-Fock.....</i>	33
<i>II.1.1.1.1. Efeitos do Conjunto de Base.....</i>	35
<i>II.1.1.2. O Método de Roothaan-Hall.....</i>	36
<i>II.1.1.3. Teoria do Funcional de Densidade.....</i>	37
<i>II.1.1.4. Métodos Ab Initio.....</i>	38
<i>II.1.1.5. Métodos Semi-Empíricos.....</i>	38
II.1.2-MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS.....	40
II.2-MÉTODOS COMPUTACIONAIS.....	42

CAPÍTULO III. RESULTADOS E DISCUSSÕES / CONCLUSÕES

III.1-RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	51
III.1.1. Efeito da Estrutura da Artemisinina e de Alguns Intermediários.....	51
III.1.2. Rotas de Reação da Artemisinina.....	58
III.1.3. Análise das Energias Livres de Gibbs da Artemisinina e de Alguns Intermediários (25°C).....	69
III.1.4. Análise da Energia da Barreira de Rotação entre o Heme e a Artemisinina.....	73
III.2-CONCLUSÕES.....	81

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
--	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO / OBJETIVOS

Figura I.1.	Áreas de incidência da malária.....	4
Figura I.2.	Visão microscópica do <i>Plasmodium falciparum</i>	5
Figura I.3.	Mosquito de gênero <i>Anopheles</i>	5
Figura I.4.	Ciclo do <i>Plasmodium falciparum</i> em humanos.....	7
Figura I.5.	Esporozoítos.....	7
Figura I.6.	Merozoíto saindo de esquizonte exo-eritrocítico.....	8
Figura I.7.	Gametócito imaturo.....	9
Figura I.8.	Hemoglobina.....	10
Figura I.9.	Modelo da cadeia beta globina onde o grupo heme está em vermelho.....	10
Figura I.10.	Estruturas da artemisinina.....	12
Figura I.11.	Planta <i>Artemisia annua</i> , conhecida como qinghao.....	13
Figura I.12.	Reatividade geral da artemisinina depois da ativação redutiva da função endoperóxido (reações também observadas com trioxanos sintéticos).....	16
Figura I.13.	Mecanismo de formação de um aduto covalente ativado por Mn ^{II} TPP.....	17
Figura I.14.	Proposta de abertura da ligação peróxido para gerar hidroperóxidos e subseqüentes caminhos de decomposição.....	18
Figura I.15.	Estruturas da artemisinina, 6,7,8-trioxibiciclo [3,2,2] nonano e os correspondentes radicais de oxigênio e carbono.....	19
Figura I.16.	Rotas de reatividade da artemisinina.....	21

Figura I.17.	Interação entre a artemisinina e o heme (os átomos de hidrogênio não estão representados). Átomos de carbono – cinza, átomos de oxigênio – vermelho, átomos de nitrogênio – roxo e átomo de ferro – verde.....	22
Figura I.18.	Estrutura do heme.....	26
Figura I.19.	Quatro análogos da artemisinina.....	27

CAPÍTULO II. MÉTODOS DE CÁLCULOS / MÉTODOS COMPUTACIONAIS

Figura II.1.	Valores plotados em um sistema de duas medidas, com os eixos das duas primeiras componentes principais representados em negrito.....	41
Figura II.2.	Mecanismos de ação da artemisinina propostos por Posner (rota A), por Jefford (rota B, levando ao intermediário 7) e por Wu (rota B, levando aos intermediários 18 e 20).....	43
Figura II.3.	Intermediário 1/2.....	45
Figura II.4.	Disposição trigonal entre a artemisinina e o heme (os átomos de hidrogênio foram omitidos).....	46
Figura II.5.	Interação entre a artemisinina e o heme (somente um átomo de hidrogênio está representado; os átomos congelados são aqueles marcados com a cor rosa).....	47

CAPÍTULO III. RESULTADOS E DISCUSSÕES / CONCLUSÕES

Figura III.1.	Dendrograma: Conexão simples.....	53
Figura III.2.	Visualização 3D do resultado da PCA.....	54
Figura III.3.	Visualização 2D do resultado da PCA. “Scores” de PC1 X PC2.....	55

Figura III.4.	Comprimentos de ligação da artemisinina (QHS) e do intermediário 1/2.....	59
Figura III.5.	Ângulos de ligação ao redor do átomo radicalar C4 dos intermediários 3 e 6.....	62
Figura III.6.	Conversão do intermediário epóxido 4 para o intermediário 5.....	63
Figura III.7.	Rota B: oxidação do radical 6 transformando-se no intermediário 7.....	65
Figura III.8.	Caminhos de reação da rota B.....	66
Figura III.9.	Diagrama de energia de Gibbs correspondente às quatro rotas em estudo.....	71
Figura III.10.	Interação entre a artemisinina e o heme (ângulo diedro: marcado em amarelo; átomos congelados: marcados em rosa).....	74
Figura III.11.	Barreira rotacional calculada para a interação entre a artemisinina e o heme, partindo da estrutura anterior.....	75
Figura III.12.	Barreira rotacional calculada para a interação entre a artemisinina e o heme, partindo da estrutura inicial.....	75
Figura III.13.	Barreira rotacional calculada para o intervalo de menor energia de interação existente entre o complexo QHS-heme.....	76
Figura III.14.	Interação de menor energia existente entre a artemisinina e o heme.....	77
Figura III.15.	Representação do potencial eletrostático para a interação de menor energia existente entre a artemisinina e o heme..	78
Figura III.16.	Potencial eletrostático para a interação de menor energia existente entre a artemisinina e o heme. Esquerda: potencial eletrostático obtido por nosso grupo de pesquisa [20]. Direita: potencial eletrostático obtido por este estudo.....	80

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO III. RESULTADOS E DISCUSSÕES / CONCLUSÕES

Tabela III.1.	Geometrias da artemisinina otimizada com métodos semi-empíricos e <i>ab initio</i> . Comparação com os resultados experimentais. Comprimento de ligação (R) em Å, ângulos de ligação (A) e diedros (D) em graus.....	52
Tabela III.2.	Diferença de energia entre os intermediários 1/2 e 3. (Cálculos “single point”).....	56
Tabela III.3.	Diferença de energia entre os intermediários 1/2 e 3.....	57
Tabela III.4.	Parâmetros estruturais mais importantes para a artemisinina (HF/6-31G**) e o radical 1a/1b (HF/6-31+G**). Comprimento de ligação (R) em Å, ângulos de ligação (A) e diedros (D) em graus.	60
Tabela III.5.	Cargas atômicas derivadas do Potencial Eletrostático (método CHELPG) e de Mulliken (entre parêntese) calculadas pelo método HF/6-31G** (unidades atômicas).....	61
Tabela III.6.	Densidades de spin (HF/6-31G**) nos átomos selecionados calculados para os ânions radicalares.....	61
Tabela III.7.	Diferença de energia (kcal mol ⁻¹) entre as estruturas em questão calculada pelo método HF/6-31G**.....	64
Tabela III.8.	Energias (hartrees) da artemisinina e dos intermediários em estudo usando o método HF/6-31G**.....	67
Tabela III.9.	Energia Livre de Gibbs (hartrees) da artemisinina e dos intermediários em estudo usando o método HF/6-31G**.....	69
Tabela III.10.	Diferença de energia livre entre as estruturas.....	70
Tabela III.11.	Diferença de energia livre total de cada rota em estudo.....	70

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO / OBJETIVOS

I.1-INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, hoje em dia, a malária é de longe a doença tropical e parasitária que mais causa problemas sociais e econômicos no mundo e só é superada em número de mortes pela AIDS. A malária ainda é uma das doenças que mais crescem no mundo. ***Plasmodium falciparum***, responsável pela malária mais grave, afeta severamente a população mundial, causando de 1-1,5 milhões de mortes a cada ano. Cerca de 1 milhão de pessoas morrem de malária na África por ano, sendo a maioria crianças de até 5 anos de idade [1]. A malária ocorre principalmente na África, Ásia e América Latina (Figura I.1). Os problemas de controle da malária nestes países são agravados por inadequadas estruturas na área da saúde e baixas condições socioeconômicas. Cerca de 90% das mortes causadas pela malária ocorre na África porque a infecção majoritária nesta região é causada pelo ***Plasmodium falciparum***, o mais perigoso dos quatro parasitas que causam malária em humanos.

Na década de 40, ocorriam cerca de 6 milhões de casos de malária ao ano no Brasil, número que foi reduzido a 52 mil casos em 1970, graças a campanhas federais e estaduais de combate à doença. Mas o aumento de obras e da presença humana na Amazônia, em cidades, assentamentos e garimpos, fizeram com que a malária voltasse a crescer na região. Em 1980, houve 169 mil casos e em 1999 a doença atingiu um pico de 637 mil casos, dos quais mais de 99% na região amazônica, o que levou o Ministério da Saúde a implantar o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal (PIACM). O número estabilizou-se em 615.245 casos, em 2000 e caiu, em 2001, para 388.807 casos. Os dados da Fundação Nacional de Saúde (Funasa) do ano de 2002, até abril, indicam que o número de casos de malária caiu 14% em relação ao mesmo período de 2001. Desde 1999, as ações de controle e o combate à doença estão sendo municipalizados, com repasse de verbas e treinamento dos agentes de saúde [Fonte: Ministério da Saúde/Funasa/Cenepi] [2].

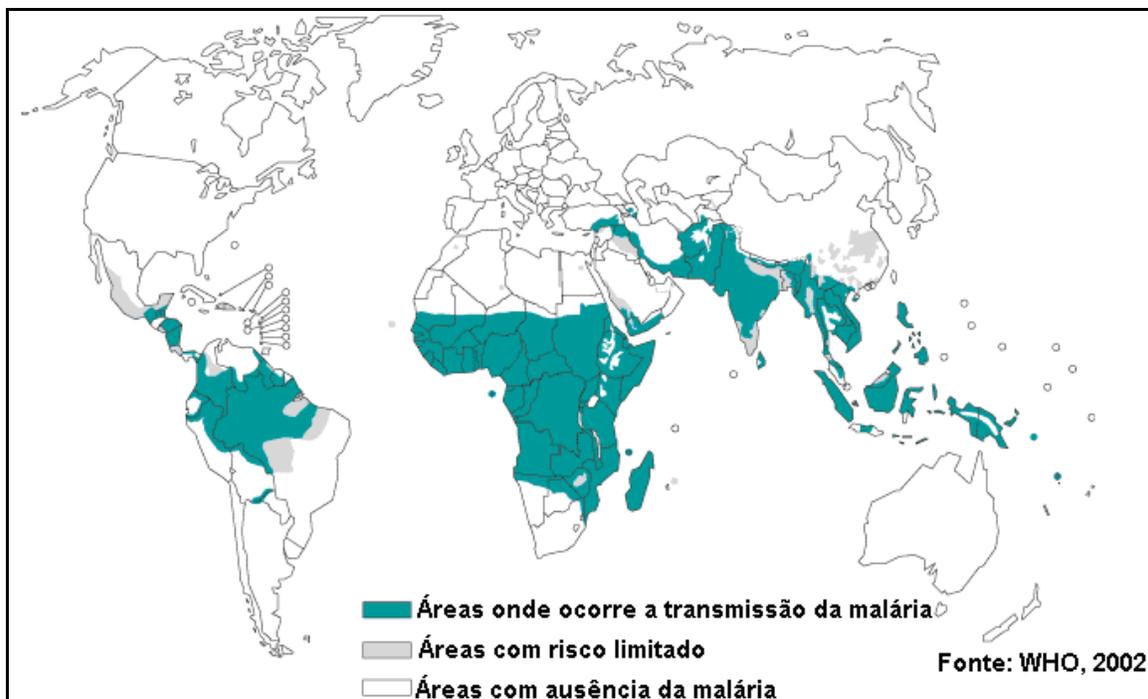


Figura I.1: Áreas de incidência da malária [1].

I.1.1-MALÁRIA: A DOENÇA

I.1.1.1. EVOLUÇÃO DOS PLASMÓDIOS

Existem quatro membros do gênero *Plasmodium*: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium falciparum* (Figura I.2), os quais afetam os seres humanos. A malária é transmitida através da picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* (Figura I.3) infectado [3]. É de grande importância lembrar que, ao nascer, estes mosquitos fêmeas são incapazes de transmitir qualquer doença. Esta transmissão somente ocorrerá após alguns dias, quando ao alimentar-se do sangue de algum animal ou ser humano infectado, estes mosquitos fêmeas ingerirem formas viáveis do parasita, ou seja, ingerirem gametócitos. O ciclo parasitário inicia-se quando o anofelino infectado, ao picar uma pessoa para chupar-lhe o sangue, inocula diretamente na circulação, com sua saliva, as formas infectantes do *Plasmodium* que se haviam acumulado nas

Capítulo I: Introdução

glândulas salivares do inseto [4]. Antes de decorrida uma hora, essas formas, que são esporozoítos, não se encontram mais no sangue, pois já alcançaram o fígado e invadiram as células hepáticas. Os esporozoítos transformam-se, então, em estruturas arredondadas, denominadas criptozoítos, pois é com dificuldade que podem ser descobertos nessa fase. Além de crescer, os criptozoítos iniciam um ciclo de reprodução assexuada, conhecido como ciclo pré-eritrocítico ou esquizogonia pré-eritrocítica, em vista de preceder obrigatoriamente à fase de parasitismo sanguíneo. Assim que começam as divisões nucleares, os parasitas passam a ser chamados de esquizontes e, no fim da esquizogonia, dão lugar à formação de milhares de elementos-filhos, os merozoítos [4].

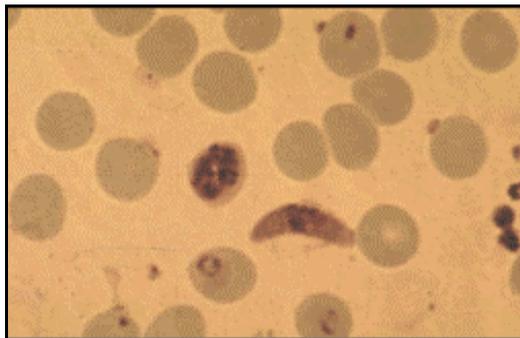


Figura I.2: Visão microscópica do *Plasmodium falciparum* [5].



Figura I.3: Mosquito do gênero *Anopheles* [6].

Capítulo I: Introdução

A esquizogonia pré-eritrocítica dura de 6 a 16 dias, segundo a espécie de *Plasmodium*. A célula hepática parasitada, muito distendida e degenerada, acaba por romper-se, liberando os merozoítos. Estes invadem as hemácias, ou eritrócitos, e dão início ao segundo ciclo de reprodução assexuada dos plasmódios, o ciclo esquizogônico hemático ou ciclo eritrocítico [4]. Neste estágio os merozoítos desenvolvem-se tornando-se trofozoítos maduros (forma anelar) e em seguida tornam-se esquizontes. Após alguns dias, as células vermelhas infectadas arrebentam-se e os merozoítos são liberados, causando febres periódicas da malária. Cada esquizonte libera de 8-24 merozoítos e estes infectam novos eritrócitos, dando seqüência a um ciclo [7] (Figura I.4).

Depois de algum tempo de evolução da infecção malárica, aparecem no interior das hemácias algumas formas que já não se dividem, conhecidos como gametócitos. Estes também crescem no sangue, porém mais lentamente que os trofozoítos, e logo aparecem na circulação geral. Possuem morfologia característica e devem assegurar a continuidade da espécie quando os parasitas forem retirados da circulação sanguínea por outro anofelino que venha alimentar-se sobre o paciente. O parasita da malária se reproduz assexuadamente no organismo do homem, já dentro do mosquito esta reprodução ocorre de forma sexuada [4].

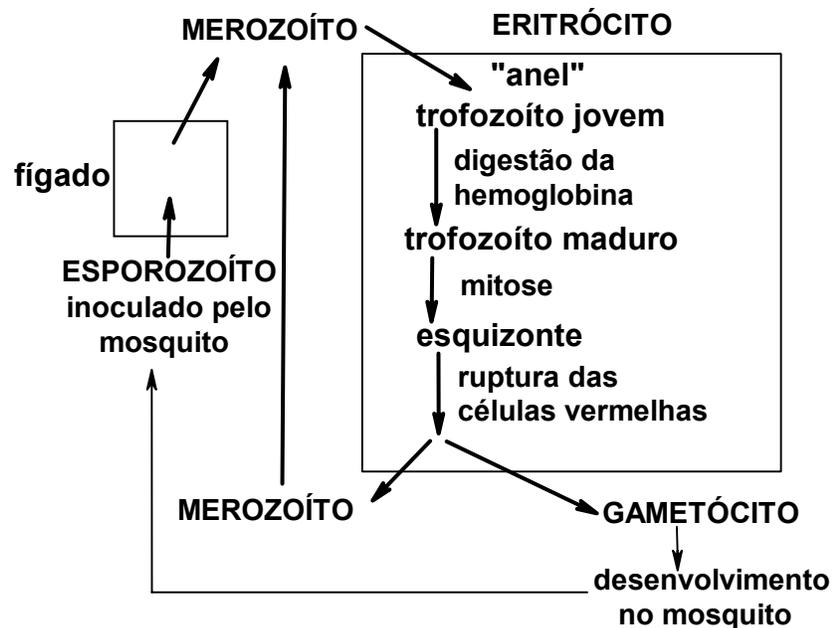


Figura I.4: Ciclo do *Plasmodium falciparum* em humanos [8].

I.1.1.2. MORFOLOGIA DOS PLASMÓDIOS

Os esporozoítos (Figura I.5) são organismos alongados e com extremidades afiladas, que medem 11 μ m de comprimento por 1 μ m de diâmetro, em média. Nas glândulas salivares do inseto, onde se concentram em grande número, os esporozoítos podem permanecer por quase dois meses, até que sejam inoculados pelo mosquito na circulação de um paciente [4].

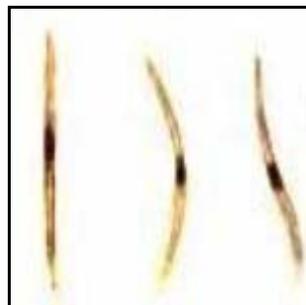


Figura I.5: Esporozoítos [9].

Capítulo I: Introdução

Os criptozoítos, que são formas infectantes presentes no interior de células do fígado, sofrem profundas transformações morfológicas para dar lugar à fase esquizogônica de crescimento e multiplicação dos plasmódios. As modificações compreendem uma grande simplificação estrutural, tornando-se agora em formas arredondadas. No interior da célula hospedeira o parasita cresce rapidamente e logo se produzem numerosas divisões nucleares, passando a constituir um esquizonte. Em dois ou três dias, centenas de núcleos-filho podem ser contadas, bem como outras tantas mitocôndrias. No fim da esquizogonia, os núcleos e respectivas mitocôndrias migram para expansões digitiformes (em forma de dedos) que se formam na superfície do parasita e, desprendendo-se do corpo desse esquizonte, tornam-se merozoítos (Figura I.6). O ciclo esquizogônico caracteriza-se por um duplo processo de desdiferenciação e nova diferenciação celular, com uma fase de multiplicação nuclear intercalada. Reprodução e diferenciação celular alternam-se no tempo, já que o destino dos merozoítos é invadir novas células do hospedeiro, as hemácias, e repetir o mesmo fenômeno [4].



Figura I.6: Merozoíto saindo de esquizonte exo-eritrocítico [9].

Tanto os merozoítos que são produzidos na fase pré-eritrocítica, como os resultantes das esquizogonias sanguíneas, são similares e não podem invadir senão hemácias. Os do ciclo pré-eritrocítico distinguem-se, porém, por terem dimensões um pouco maiores que os sanguíneos. Estruturalmente, parecem-se com os esporozoítos, sendo entretanto muito mais curtos e grossos. No interior

Capítulo I: Introdução

das hemácias observa-se o mesmo processo de desdiferenciação do merozoíto, conduzindo à produção de trofozoítos [4].

A formação dos gametócitos (Figura I.7) tem início a partir dos trofozoítos sanguíneos. Os gametócitos jovens gastam o dobro do tempo de um trofozoíto para amadurecer completamente, mas alcançam tamanhos maiores e vivem no sangue por tempo consideravelmente mais longo [4].



Figura I.7: Gametócito imaturo [9].

I.1.1.3. FISILOGIA DOS PLASMÓDIOS

Os trofozoítos e esquizontes sanguíneos alimentam-se basicamente da **hemoglobina** (Figura I.8), contida nas hemácias parasitadas, que vai sendo ingerida pouco a pouco. Em humanos, os parasitas da malária digerem mais de 70% da hemoglobina dentro das células vermelhas infectadas do sangue [10], formando como produtos uma porção protéica chamada globina (Figura I.8 e Figura I.9) e um complexo de ferro-porfirina chamado **heme** (Figura I.8 e Figura I.9), onde o átomo de Fe da unidade **heme** está no estado de oxidação +2. A globina é hidrolisada dando aminoácidos, os quais são usados pelo parasita para sintetizar proteínas. O **heme** formado é tóxico e simultaneamente sofre processo de detoxificação pelo parasita da malária através de um mecanismo específico de polimerização do **heme**, onde a enzima heme polimerase do parasita é usada neste processo de polimerização [11]. Comumente, refere-se ao **heme** polimerizado como **hemozoína** ou “pigmento da malária”. São ainda poucas as

Capítulo I: Introdução

informações sobre o metabolismo protéico dos plasmódios. Sabe-se que após a digestão da hemoglobina pelo parasita, o **heme** é separado e depois transformado em **hemozoína**. Esta acumula-se no próprio citoplasma sob a forma de um pigmento cristalino, insolúvel e de coloração marrom escuro, no interior dos vacúolos digestivos residuais [4].

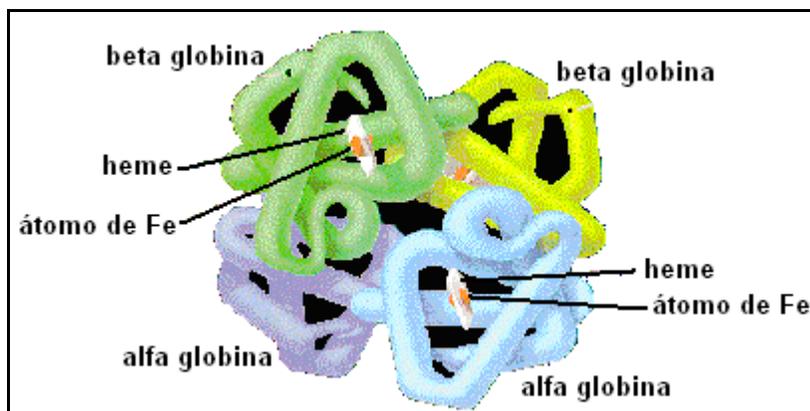


Figura I.8: Hemoglobina [12].

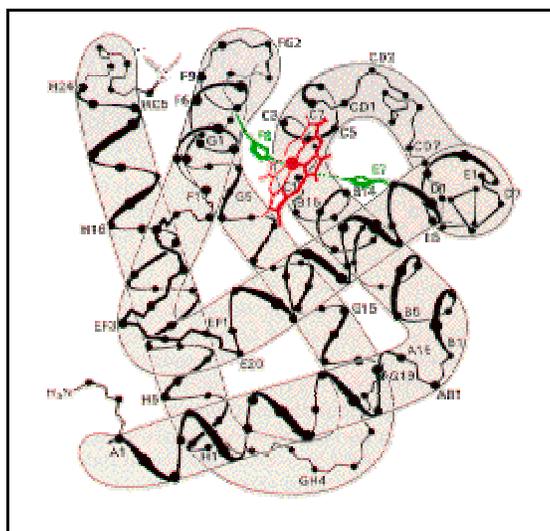


Figura I.9: Modelo da cadeia beta globina onde o grupo **heme** está em vermelho [12].

I.1.1.4. ALTERAÇÕES PATOLÓGICAS

Observou-se em alguns pacientes que adquiriram a malária mais grave que o fígado, baço e cérebro destes indivíduos apresentavam uma coloração marrom escuro, sendo esta coloração causada pela substância cristalina chamada **hemozoína** [13]. Durante a fase aguda, o **fígado** apresenta-se congesto, ligeiramente aumentado de tamanho, porém mole e liso. Encontra-se no **cérebro** congestão, que é a afluência anormal do sangue aos vasos do cérebro; edema, sendo o acúmulo anormal de líquido; fenômenos de anóxia, que é falta de oxigênio; e por fim encontram-se trombozes capilares [4].

Em conseqüência das infecções agudas, o **baço** torna-se dilatado, congesto e de tonalidade escura. A cápsula fica tensa, sujeita a ruptura traumática. Não há alterações histológicas específicas, mas os capilares e seios venosos estão cheios de hemácias parasitadas, com os parasitas em todas as fases evolutivas. Após os surtos agudos, o baço volta ao tamanho e condições normais [4].

Mesmo nas infecções benignas, o número de glóbulos vermelhos destruídos é considerável e tende a levar, caso a doença se prolongue, a certo grau de anemia. Já nas infecções mais graves, a anemia instala-se rapidamente. Com a diminuição do número de eritrócitos surgem fenômenos de anóxia, que é a falta de oxigênio decorrente da destruição intra e extravascular de elevado número de hemácias parasitadas ou não [4].

I.1.1.5. DROGAS ANTIMALÁRICAS

Os parasitas estão se tornando resistentes contra as drogas já existentes, como por exemplo, a cloroquina, a quinina e a mefloquina [14,15]. A artemisinina (Figura I.10), também conhecida como Qinghaosu (QHS), proveniente da *Artemisia annua* (Figura I.11), é um potente agente antimalárico contra ***Plasmodium falciparum*** e foi isolada pela primeira vez em 1972 por pesquisadores chineses [16]. A artemisinina é um sesquiterpeno que possui uma

função endoperóxido, a qual tem se demonstrado essencial para a atividade antimalárica [17]. Esta droga é um composto com uma estrutura química peculiar, alta estabilidade térmica [16], baixa toxicidade e alta eficiência contra *Plasmodium falciparum* resistentes a cloroquina. Ao contrário de drogas antimaláricas atuais, as quais têm um sistema anelar heterocíclico contendo nitrogênio, a artemisinina é uma lactona sesquiterpênica com uma ligação endoperóxido. Esta tem se mostrado uma potente droga na fase esquizonte do plasmódio, tanto nos testes realizados *in vitro* quanto *in vivo*. No entanto, nenhum efeito prático foi detectado contra a fase exo-eritrocítica, os esporozoítos e os gametócitos [16].

Desde então, vários derivados da artemisinina têm sido sintetizados e suas atividades biológicas têm sido testadas. Como exemplo tem-se os derivados artemether, o qual é solúvel em lipídios, e artesunato, hidrossolúvel, os quais apresentam maior atividade que o composto original. Também, estudos computacionais e quantitativos que correlacionam estrutura-atividade de algumas destas drogas tem apontado para os mecanismos de ação e tem dado diretrizes para a síntese de novos derivados mais eficientes [18-24].

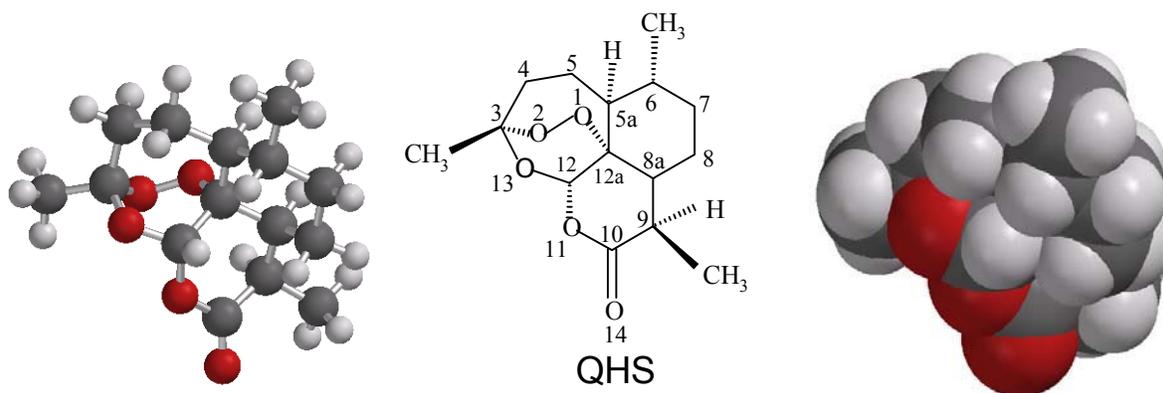


Figura I.10: Estruturas da artemisinina.

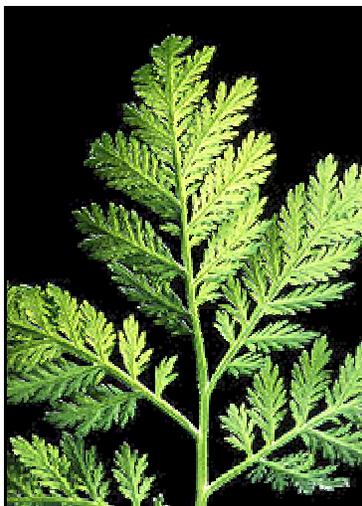


Figura I.11: Planta *Artemisia annua*, conhecida como qinghao [25].

Estudos recentes têm mostrado a importância do grupo endoperóxido para a atividade biológica e esta evidência é clara quando se realizam estudos com análogos da desoxiartemisinina, compostos nos quais falta a função endoperóxido e não possuem atividade biológica. Provavelmente o mecanismo de ação envolve a redução da função endoperóxido, levando à formação de radicais de oxigênio responsáveis por um stress oxidativo [26] dentro dos eritrócitos infectados ou radicais de carbono derivados da artemisinina, agindo como agentes alquilantes de proteínas específicas dos parasitas da malária [27,28].

Acredita-se que a ligação endoperóxido da artemisinina e de seus derivados é a chave para o modo de ação destas drogas. O íon ferro (Fe^{2+}) catalisa a quebra desta ligação, formando radicais livres altamente reativos [29]. Assim, a teoria para o mecanismo de ação destas drogas tem sido que estes radicais livres formados modificam quimicamente uma variedade de moléculas do parasita, resultando na morte do mesmo [29,30]. Uma rica fonte de Fe^{2+} intracelular é proveniente do **heme**, um componente essencial da hemoglobina. Suspeita-se que este íon ferro é responsável por ativar a artemisinina/derivados dentro do parasita. Para sustentar esta idéia, estudos experimentais mostraram que o íon Fe^{2+} do **heme** ativa a artemisinina/derivados durante testes *in vitro* e que complexos **heme**-artemisinina são formados [30-33]. Esta teoria atraiu a atenção

Capítulo I: Introdução

dos malariologistas porque pareceu explicar a especificidade da droga dentro do contexto de um único aspecto do metabolismo do parasita.

Durante o crescimento e replicação dentro das células vermelhas do sangue, os parasitas digerem e degradam a hemoglobina, como dito anteriormente, em um compartimento celular chamado vacúolo digestivo [10]. Assim, ocorre a liberação do complexo **heme-Fe²⁺**, o qual é oxidado para hematin-Fe³⁺ e então, agrega-se dentro do vacúolo digestivo formando o pigmento cristalino **hemozoína**, já citado. Desenvolveu-se uma teoria de que o efeito antimalárico específico da artemisinina foi devido este fármaco entrar dentro do vacúolo digestivo do parasita e sua interação com o complexo **heme-Fe²⁺**. Com isso, radicais livres seriam formados, inibindo vários componentes essenciais do parasita e eventualmente resultando na morte deste [29,30].

Esta teoria tem sido mudada após alguns estudos. Eckstein-Ludwig e colaboradores [34] realizaram alguns experimentos com um derivado da artemisinina fluorescente e observaram que esta droga não se acumula no vacúolo digestivo e, ao invés disso, o derivado se espalha ao redor do parasita. Estes cientistas mostraram também que alguns inibidores da degradação da hemoglobina, e conseqüente liberação do **heme**, não interfere na ação da artemisinina e de seus derivados. Eles concluíram, apoiados também por outros autores [35], que a atividade da artemisinina/derivados não requer a presença do **heme**.

Foi feita uma extensa pesquisa bibliográfica com o objetivo de investigar o que se sabe sobre o mecanismo de ação da artemisinina. A literatura sugere várias hipóteses do mecanismo de ação desta droga. Segue-se abaixo algumas destas hipóteses:

I.1.2-INTERMEDIÁRIOS RADICALARES E NEUTROS DA ARTEMISININA

I.1.2.1-RESULTADOS DE ESTUDOS EXPERIMENTAIS

I.1.2.1.1. Reações de Alquilação

Posner e colaboradores (1995) [36] propuseram que o ferro do **heme** ataca a ligação endoperóxido da artemisinina na posição O2 enquanto que Jefford e colaboradores (1996) [27] propuseram que o ataque ocorra na posição O1 (Figura I.12). Quando o ferro do **heme** ataca a artemisinina ou seus derivados na posição O2 (rota A), ocorre a produção de um radical na posição O1 (intermediário **1**). Em seguida ocorre um rearranjo para formar o radical livre na posição C4 (intermediário **3**). Entretanto, quando o ataque ocorre na posição O1 (rota B) forma-se radical livre na posição O2 (intermediário **2**) e subsequente ocorre a quebra da ligação C3-C4 dando um carbono radical na posição C4 (intermediário **6**). Assim, foi sugerido que o radical livre em C4, proveniente de ambos os mecanismos propostos, é de suma importância na atividade antimalárica [37].

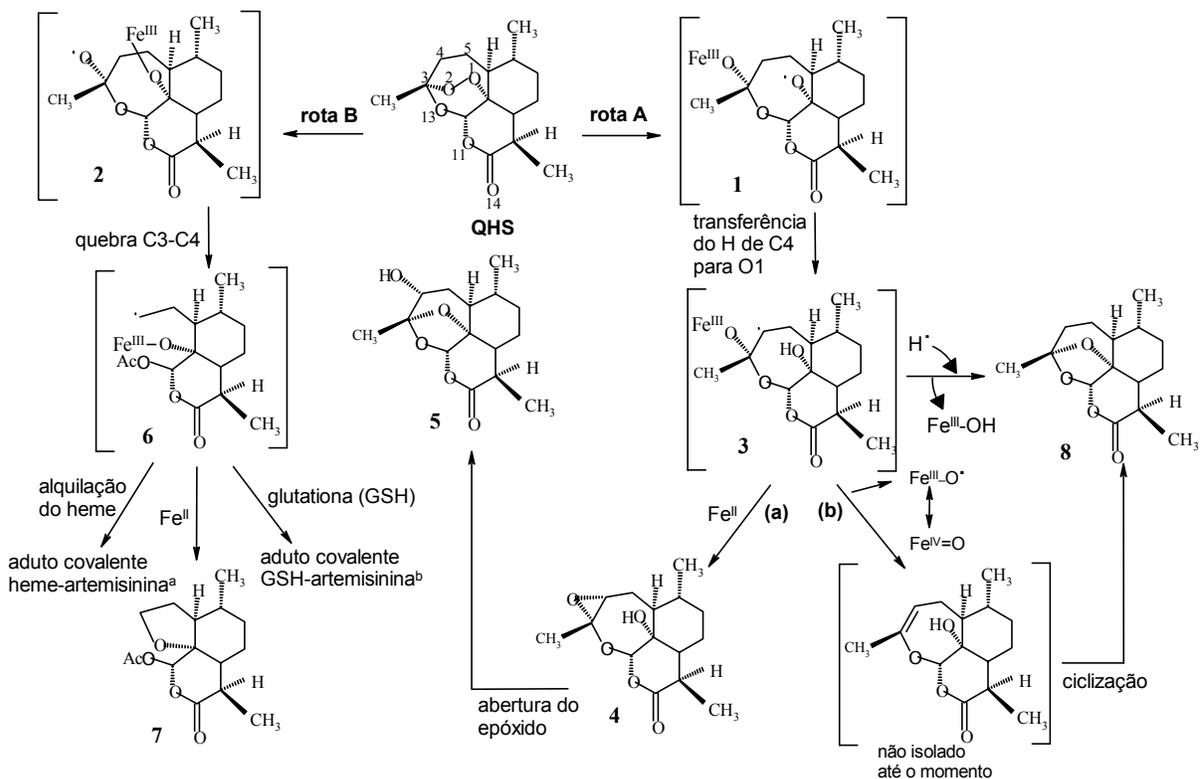


Figura I.12: Reatividade geral da artemisinina depois da ativação redutiva da função endoperoxido (reações também observadas com trioxanos sintéticos).

^aRef. [31]. ^bRef. [38].

Dando seqüência a estas rotas de reação da Figura I.12, a perda de Fe^{II} do radical **3** produz o intermediário **4** 3,4-epóxido primeiramente postulado por Posner *et al.* (1995) [36] e mais tarde isolado por Wu e colaboradores (1998) [39]. O ataque intramolecular da hidroxila do composto **4** no carbono C3 induz a abertura do anel epóxido, dando o **5** 3 α -hidroxi-desoxyartemisinina. A desoxyartemisinina **8** deve ser produzida a partir do radical **3** pela abstração de um átomo de hidrogênio e perda de Fe^{III}OH. De acordo com Jefford e colaboradores (1995) [40] e Robert e colaboradores (1998) [41], este composto, produzido durante o metabolismo da artemisinina [42], é provavelmente o resultado de uma desoxigenação enzimática não relatada para a atividade antimalárica. A rota B,

chamada de evolução do radical alquil **6**, deve ser interpretada como a perda de M^{II} ($M=Fe$ ou Mn), gerando o derivado tetrahidrofurano **7**. No entanto, o radical **6** também exibe propriedades alquilantes, as quais tem sido evidenciadas pelo isolamento de adutos covalentes com metaloporfirinas sintéticas usadas como modelos de **heme** [43,44], com **heme** [30-33], ou com cisteína ou glutationa [38] via uma ligação tioéter.

Segundo Cazelles e colaboradores (2002) [33], o aduto **14** (Figura I.13) foi o resultado da ligação covalente entre o ciclo porfirina e um fragmento derivado da artemisinina. Investigou-se a possibilidade de formação de um aduto covalente entre alguns trioxanos sintéticos e o **heme**, com o objetivo de encontrar uma possível correlação entre a capacidade alquilante e a atividade antimalárica. Este estudo de Cazelles *et al.* consistiu na ativação da ligação peróxido do trioxano **9** (derivado da artemisinina) por um complexo manganês (II)-porfirina (modelo de **heme**) e a partir daí a alquilação do macrociclo porfirina.

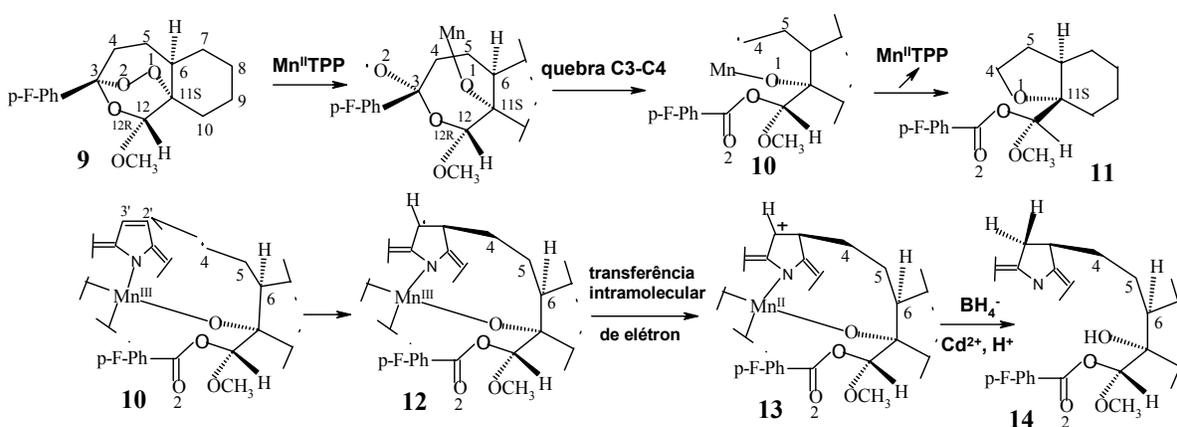


Figura I.13: Mecanismo de formação de um aduto covalente ativado por $Mn^{II}TPP$.

O passo inicial é a ativação redutiva da ligação peróxido da droga **9** através de uma transferência de elétron do complexo $Mn(II)$ -porfirina. A subsequente quebra da ligação O-O é seguida por uma rápida clivagem homolítica da ligação C3-C4 adjacente, formando o radical alquil **10**. A partir daí existem dois mecanismos competitivos. Primeiramente este radical **10** pode gerar o composto

11 através da liberação de $Mn^{II}TPP$ para o meio ou este alquila radical alquila a posição C2' (β -pirrólica) gerando um radical no carbono adjacente (C3') **12**. Após a transferência intramolecular de elétron do C3' para o Mn(III), o cátion **13** reage com a mistura reacional presente (BH_4^- , Cd^{2+} , H^+) gerando o composto **14**.

1.1.2.1.2. Reações com Radicais de Oxigênio Derivados do Hidroperóxido (Formado pela Abertura do Anel da Artemisinina)

White (1997) [45] sugeriu que a ligação O-O do peróxido das drogas antimaláricas sofre abertura via protonação (H^+), ou formação de um complexo com o metal ferro (Fe^{2+}), e quebra da ligação C-O (O_2-C_3) para gerar um hidroperóxido aberto ou um peróxido metálico, o qual converte-se em um radical peróxido ou transfere oxigênio para substratos oxidáveis (Figura I.14). O cátion gerado após a abertura do anel deve sofrer neutralização intermolecular por espécies nucleofílicas (como água, tióis e aminas) ou intramolecular pela perda de um próton do carbono C4. Estas espécies podem hidroxilar biomoléculas ou abstrair átomos de hidrogênio.

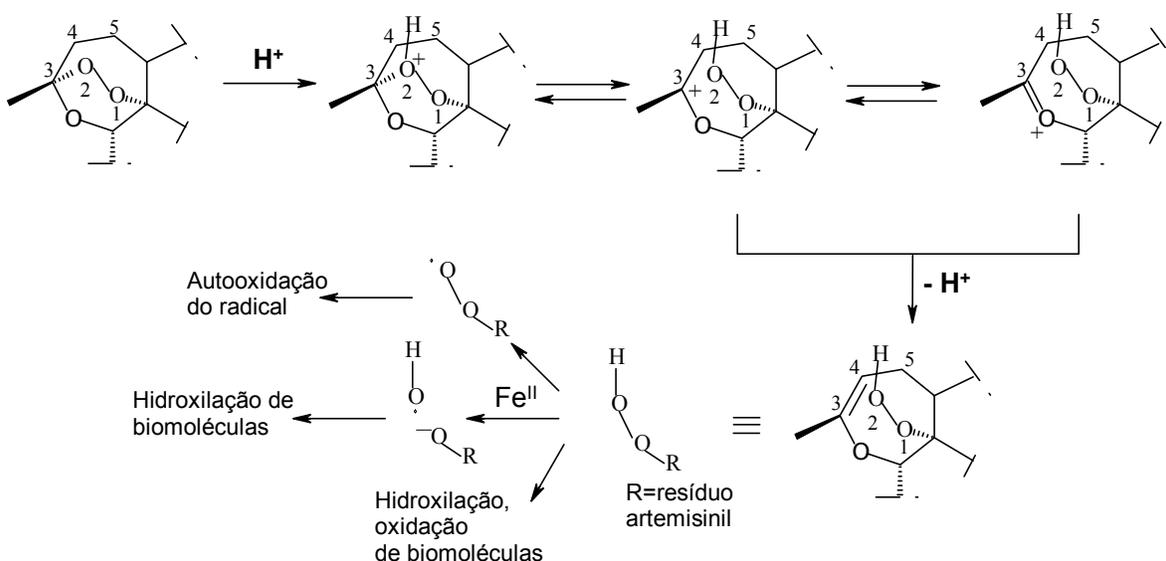


Figura I.14: Proposta de abertura da ligação peróxido para gerar hidroperóxidos e subsequentes caminhos de decomposição.

I.1.2.2-RESULTADOS DE ESTUDOS TEÓRICOS

A primeira investigação teórica do mecanismo de decomposição de trioxanos foi feita por Gu e colaboradores (1999) [46], os quais estudaram o rearranjo de apenas uma parte da artemisinina, o 6,7,8-trioxibiciclo[3,2,2] nonano, usando a teoria do funcional de densidade (DFT) a nível B3LYP/6-31G (d,p) (Figura I.15).

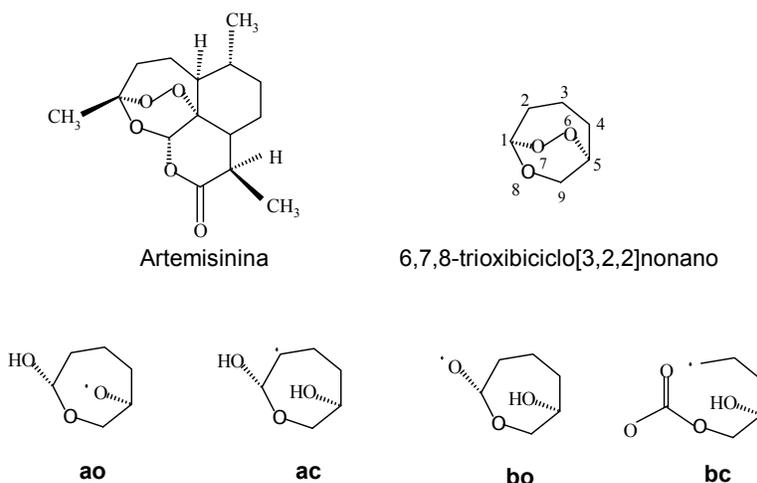


Figura I.15: Estruturas da artemisinina, 6,7,8-trioxibiciclo[3,2,2]nonano e os correspondentes radicais de oxigênio e carbono.

A justificativa para a simplificação da molécula de artemisinina está baseada em resultados de estudos anteriores da correlação entre a estrutura e a atividade de vários trioxanos tricíclicos, os quais revelam que certos anéis na artemisinina e seus derivados são redundantes e que suas atividades podem ser representadas por trioxanos bicíclicos [47,48]. A confiabilidade deste modelo simples também pode ser justificada pela boa concordância entre os parâmetros geométricos e comportamentos vibracionais para o 6,7,8-trioxibiciclo[3,2,2] nonano e a artemisinina [46,49,50]. Estes cálculos mostraram que as energias livres de ativação para o deslocamento intramolecular do átomo de H de C2 para O6, bem

Capítulo I: Introdução

como para a quebra homolítica da ligação C1-C2 (Figura I.15) são relativamente baixas, revelando assim um importante detalhe estrutural para este processo.

Taranto e colaboradores (**2002**) [51] estudaram teoricamente o mecanismo de decomposição redutiva da artemisinina usando os métodos semi-empíricos AM1 e PM3. Os autores calcularam e caracterizaram alguns ânions radicalares e espécies neutras, os quais foram propostos por Posner *et al.* [36], por Jefford *et al.* [27] e por Wu *et al.* [39]. Mais especificamente calculou-se as energias relativas dos intermediários (**1-7**, **15-17**) e os estados de transição (TS1 e TS2) ao longo dos caminhos A e B mostrados na Figura I.16 abaixo.

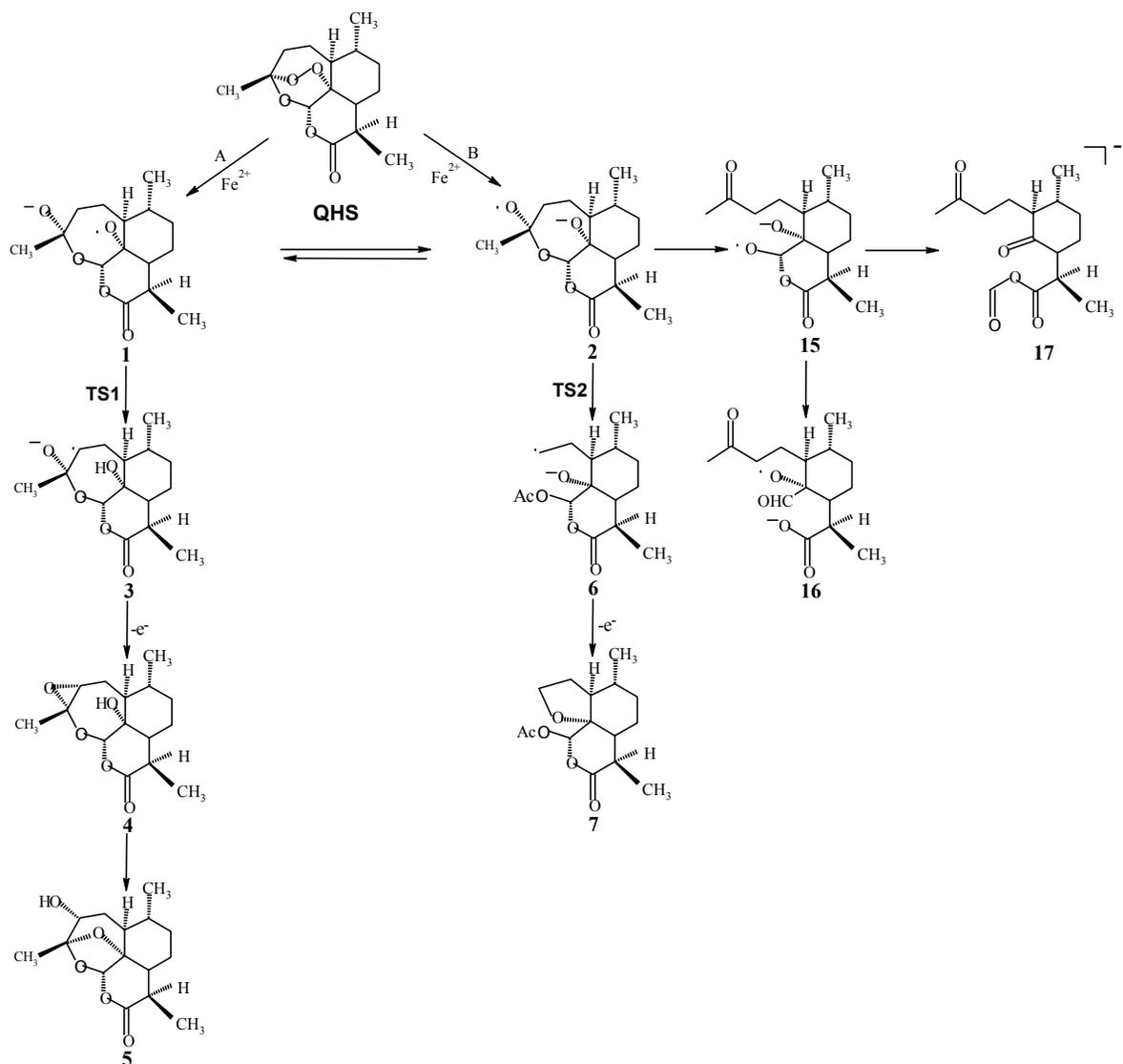


Figura I.16: Rotas de reatividade da artemisinina.

Os autores concluíram, pelos resultados obtidos através dos métodos AM1 e PM3, que a decomposição redutiva da artemisinina pelo íon $\text{Fe}(\text{II})$ é altamente exotérmica, levando a espécies que são muito mais estáveis que os materiais de partida. Observa-se neste estudo teórico de Taranto *et al.* que os compostos 1-7 (Figura I.16) correspondem aos compostos representados na Figura I.12 (exceto que na Figura I.12 o átomo de Fe está representado enquanto que na Figura I.16 está representado apenas o elétron doado pelo Fe), os quais foram estudados experimentalmente e alguns foram caracterizados [27,36].

I.1.3-INTERAÇÃO EXISTENTE ENTRE O HEME E A ARTEMISININA

No desenvolvimento e descobrimento de uma droga é de suma importância conhecer seu mecanismo de ação, pois auxilia no desenvolvimento de novas drogas mais efetivas. Normalmente a droga tem seu efeito mediado por um alvo específico, um receptor. Caso a estrutura do complexo droga–receptor (Figura I.17) seja conhecida, as interações entre a droga, que no estudo em questão é a artemisinina, e o receptor (**heme**) podem ser investigadas com mais detalhes.

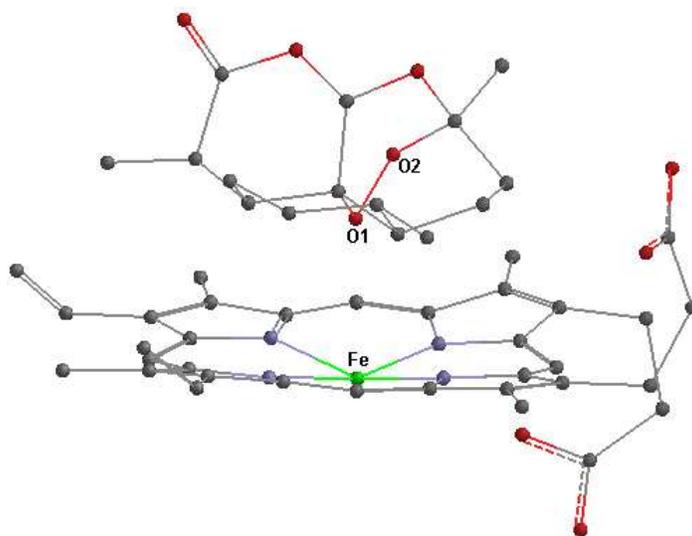


Figura I.17: Interação entre a artemisinina e o **heme** (os átomos de hidrogênio não estão representados). Átomos de carbono – cinza, átomos de oxigênio – vermelho, átomos de nitrogênio – roxo e átomo de ferro – verde.

Foi feita uma pesquisa bibliográfica com o intuito de investigar alguns estudos sobre a interação existente entre a artemisinina e o **heme** (Figura I.17).

I.1.3.1-RESULTADOS DE ESTUDOS TEÓRICOS

I.1.3.1.1. Cálculos de Interação Feitos para a Artemisinina e 29 Derivados

Tonmunphean e colaboradores (2000) [21] estudaram teoricamente a interação entre a artemisinina e 29 derivados e o **heme**. Os cálculos de interação foram feitos usando o programa AutoDock 2.4. Cálculos mecânico-quânticos foram usados para determinar a geometria da artemisinina e destes 29 derivados. Estes derivados são estruturas neutras, semelhantes à geometria da artemisinina, diferenciando-se um do outro apenas em alguns grupos substituintes. A geometria da artemisinina foi otimizada usando vários métodos, tanto *ab initio* quanto semi-empíricos, e os valores de comprimentos de ligação, ângulos e diedros foram comparados com a estrutura cristalográfica de raio-X. O método HF/3-21G foi o que forneceu melhor resultado e assim ele foi utilizado para otimizar a geometria de todos os derivados da artemisinina em estudo.

A molécula receptora (**heme**) foi retirada da estrutura de raio-X modificada do **clorohemin** do Banco de Dados Cristalográficos. O **hemin** é o **heme** com o átomo de Fe no estado de oxidação +3. O **clorohemin** tem uma estrutura piramidal com o Fe no topo.

As interações entre a artemisinina e os derivados em questão com o **heme** mostraram que estes se aproximam do **heme** preferencialmente através do oxigênio O1 da ligação endoperóxido (Figura I.10) em direção ao átomo de Fe do receptor **heme**. Este resultado difere do proposto por Shukla e colaboradores [52], os quais sugeriram que o **heme** se liga a artemisinina na posição O2. Quase todas as interações entre o **heme** e os derivados da artemisinina mostraram que o átomo de Fe do **heme** aproxima-se da ligação endoperóxido da droga, com distâncias de 1,93 a 2,73 Å entre O1-Fe e de 2,41 a 3,76 Å entre O2-Fe. Isto mostra a importância da interação entre o Fe do **heme** e o grupo endoperóxido de derivados da artemisinina. As distâncias obtidas entre O1-Fe foram comparadas com o comprimento de ligação experimental entre o ferro do **heme** e um átomo de

oxigênio na oxihemoglobina A (1,86 Å), retirada do Banco de Dados Cristalográficos.

1.1.3.1.2. Interação entre a Artemisinina e Vários Tipos do Receptor Heme

Tonmunphean e colaboradores (2001) [18] realizaram estudos de interação entre a artemisinina (Figura I.10) e cinco tipos diferentes de estruturas do **heme** retirados da literatura, isto é, **heme-pdb**, **modelo-heme**, **heme-hemin**, **desoxi-heme** e **oxi-heme**. Estas estruturas são todas diferentes devido a fonte do **heme** e o estado de oxidação do ferro. Utilizou-se o programa AutoDock 2.4 para os cálculos de interação entre a droga e o receptor. Para investigar o efeito das cargas atômicas tanto da artemisinina quanto do **heme** durante a interação, estas foram obtidas usando vários níveis de teoria, desde métodos semi-empíricos até *ab initio*.

Com exceção das cargas calculadas pelo método ZINDO/S, todos os outros cálculos de interação mostraram que a artemisinina aproxima-se do **heme** no sentido de interagir o átomo O1 da ligação endoperóxido com o átomo de Fe do **heme**, onde este mecanismo de aproximação é controlado por efeito estérico. As interações entre a droga e o receptor, baseado nas cargas calculadas pelos métodos *ab initio* (HF/3-21G, HF/D95, HF/6-31G* e HF/6-311**), deram resultados semelhantes. Já os resultados das interações obtidas através dos métodos semi-empíricos AM1 e PM3 deram distâncias maiores entre os oxigênios da ligação endoperóxido da artemisinina e o átomo de Fe do **heme** (O-Fe).

Embora não seja observada semelhanças nas distâncias O-Fe, todos os cálculos de interação com diferentes estruturas de **heme** sugeriram que a artemisinina prefere se ligar ao átomo de Fe do **heme** através dos oxigênios da ligação endoperóxido (O1 e O2) que com os demais átomos de oxigênio da droga. Para o **desoxi-heme**, que possui uma estrutura diferente das demais estruturas do **heme**, a interação com a ligação endoperóxido da artemisinina é menos favorável e uma maior atração ocorre entre o átomo de Fe do **desoxi-heme** e o

átomo de oxigênio O1 da **QHS** (Figura I.10). As distâncias entre os oxigênios da ligação endoperóxido da artemisinina e o átomo de Fe do **heme-hemin** são as que apresentaram menores valores que as interações com os outros tipos de heme. No caso do **heme-hemin** as distâncias entre O1-Fe e O2-Fe apresentaram valores de 2,00 Å e 2,65 Å respectivamente, com energia de ligação de $-33,13 \text{ kcal mol}^{-1}$, sendo este o menor valor de energia para todas as interações realizadas. A distância de O1-Fe de 2,00 Å foi semelhante ao comprimento de ligação experimental entre o ferro do **heme** e o átomo de oxigênio na oxihemoglobina A (1,86 Å) [53].

Os resultados das interações entre as cinco estruturas do **heme** e a artemisinina forneceram resultados semelhantes, onde o ferro do **heme** aproxima-se preferencialmente da posição O1 que da posição O2 da ligação endoperóxido da artemisinina. As interações dependem das estruturas e das cargas atômicas de ambos, tanto da artemisinina quanto do **heme**. A interações de configurações foram significativamente afetadas pelas cargas atômicas do **heme** e em menor extensão, pelas cargas atômicas da artemisinina. A alta qualidade das cargas atômicas calculadas pelo método HF/6-311G** são recomendadas para o potencial eletrostático do **heme**. As estruturas do **heme** que possuem nenhum ou pouco efeito estérico na posição do Fe facilita a ligação entre o **heme** e os oxigênios da ligação endoperóxido como no **heme-pdb**, **heme-hemin** e **oxi-heme**.

1.1.3.1.3. Interação entre 23 Análogos da Artemisinina e o Receptor Heme

Estudos teóricos realizados por Cheng e colaboradores (2002) [22] para analisar a interação existente entre o **heme** e 23 análogos da artemisinina foram feitos usando o programa FlexiDock no SYBYL 6.5. As cargas atômicas foram calculadas usando o protocolo Gasteiger-Hückel. A maior região de carga negativa da artemisinina e seus análogos localiza-se ao redor da metade da ligação endoperóxido e a maior região de carga positiva do **heme** localiza-se ao redor do íon Fe^{2+} . A intuição química indica que estas duas partes devem interagir quando

Capítulo I: Introdução

a artemisinina ou seus análogos se ligam ao **heme**. Isto está de acordo com relatos experimentais para a atividade antimalárica da artemisinina, a qual mostra uma série de radicais centrados nos átomos de oxigênio e carbono, os quais são produzidos através da transferência de elétron do íon Fe^{2+} para a ligação endoperóxido quando a artemisinina reage com o **heme** [39]. A distância inicial entre o ponto médio da ligação endoperóxido (M) e o átomo de Fe foi de 3 Å.

Durante os cálculos de interação entre a droga e o receptor, o ângulo de torção de O1-M-Fe-N1 (Figura I.18) variou de 0 a 359° , com variação de 10° , para encontrar a configuração mais estável do complexo. Como o programa SYBYL 6.5 não está completamente parametrizado para o íon Fe, este então foi substituído pelo íon Ca^{2+} nos cálculos de interação. Shukla e colaboradores (1995) [52] provaram que o íon Fe^{2+} , durante rotinas de interações do SYBYL, pode ser substituído por outros átomos similares durante a interação molecular e isto tem apenas uma pequena influência na estrutura do **heme**.

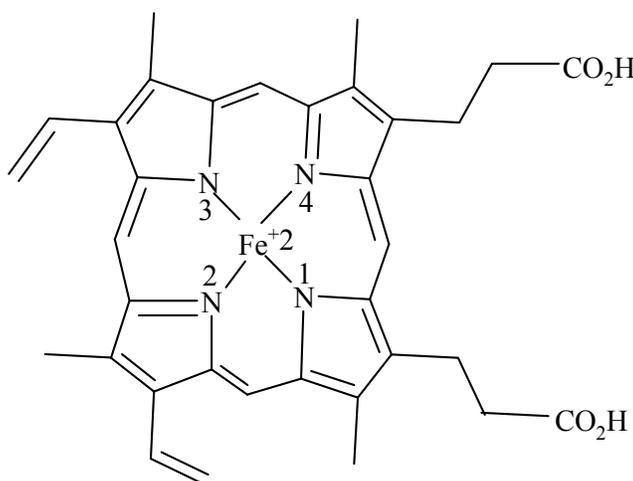


Figura I.18: Estrutura do heme.

Configurações do mínimo de energia global dos complexos entre os análogos da artemisinina e o **heme** indicam que a ligação endoperóxido aponta em direção ao íon Fe, o que está de acordo com hipóteses derivadas de estudos

experimentais [54]. A distância otimizada M---Fe variou de 2,6 a 2,7 Å e o ângulo de torção O1-M-Fe-N1 variou de 114 a 124°.

I.1.3.1.4. Interação entre a Artemisinina e 4 Análogos com o Receptor Heme

Pinheiro e colaboradores (2003) [20], pertencentes ao nosso grupo de pesquisa, analisaram a interação existente entre a artemisinina e quatro análogos da mesma (Figura I.19) com o **heme**, usando o programa Titan. Estas interações foram baseadas na orientação preferencial para os ligantes observados em estudos conformacionais usando MMFF94. Todos os compostos foram modelados usando o programa GaussView e as geometrias foram completamente otimizadas utilizando o método *ab initio* HF/6-31G**. As cargas atômicas foram calculadas usando a palavra-chave CHELPG através do potencial eletrostático.

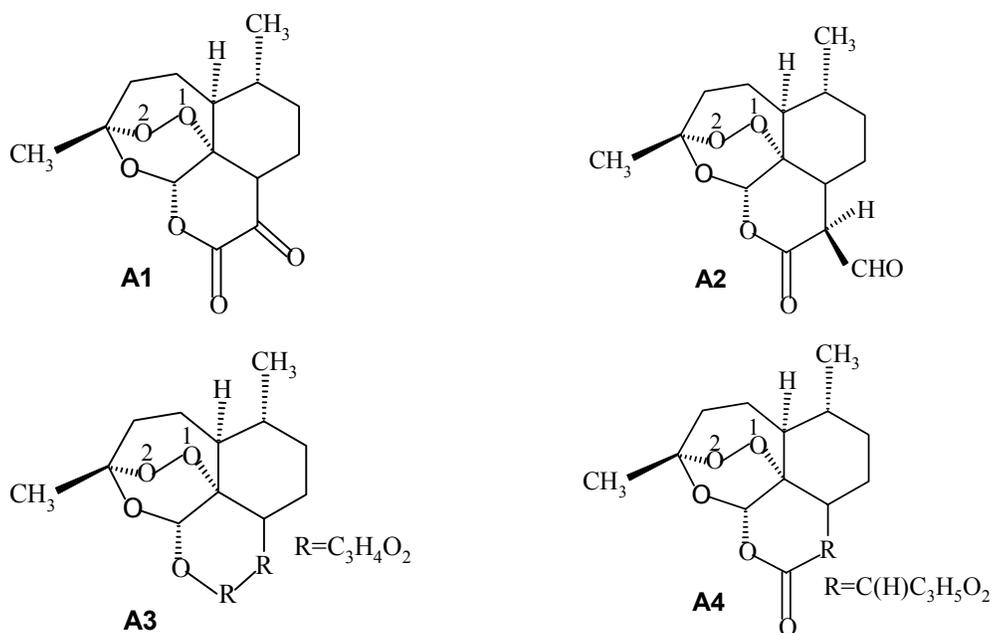


Figura I.19: Quatro análogos da artemisinina.

Capítulo I: Introdução

As conformações ao redor da ligação Fe-O para os quatro complexos **heme**-ligante (ligantes = 4 análogos – A1, A2, A3, A4) revelaram praticamente a mesma geometria de coordenação do átomo de Fe. Diferenças significativas foram observadas na conformação do ligante e na sua orientação com relação ao **heme** e na conformação das cadeias livres do **heme**. A artemisinina possui seis átomos de hidrogênio que podem interagir efetivamente com o anel porfirínico do **heme** através de interações C-H... π . As cadeias laterais livres do **heme** (as quais não foram congeladas durante os cálculos) dirigiram-se em direção aos substituintes ligados em C9 e C10 da **QHS** (Figura I.10) via interações polar-polar.

I.2-OBJETIVOS

A malária, doença causada pelo parasita do gênero *Plasmodium*, ainda é uma das doenças tropicais e parasitárias que mais se desenvolvem no mundo. O número de mortes causadas por esta doença só é superado pela AIDS. Existem quatro membros do gênero *Plasmodium*, onde o *Plasmodium falciparum* é o responsável pela malária mais grave.

Um dos graves problemas no combate a malária é que os parasitas estão se tornando resistentes contra as drogas utilizadas. A artemisinina, também conhecida como Qinghaosu (**QHS**), é um agente antimalárico eficiente contra o parasita *Plasmodium falciparum*, o qual é responsável pela malária mais grave. A artemisinina tem se mostrado essencial para a atividade antimalárica [17] e, desde então, vários derivados desta droga têm sido sintetizados e suas atividades biológicas têm sido testadas.

A literatura sugere várias hipóteses do mecanismo de ação da artemisinina como (1) reações de alquilação [27,30,32,33,36-44], (2) reações com radicais de oxigênio derivados do hidroperóxido (formado pela abertura do anel da artemisinina) [45], dentre outros. Também se encontram na literatura vários estudos realizados teoricamente [46,49-51] com o intuito de investigar o mecanismo de ação da **QHS** e de vários derivados da mesma.

Ainda no desenvolvimento de uma droga, é de grande importância conhecer com detalhes o seu mecanismo de ação para auxiliar no descobrimento de novas drogas mais efetivas. Geralmente a droga tem um alvo específico, um receptor. Caso se conheça a estrutura do aduto droga-receptor, as interações entre ambos podem ser investigadas com mais detalhes. Neste estudo em questão a droga é a artemisinina e o receptor é o **heme**. Na literatura encontram-se alguns estudos sobre a interação existente entre a artemisinina e o **heme** [18,20-22,52]. Grande parte destes estudos mostra que a interação preferencial ocorre entre o átomo de Fe do **heme** e a ligação endoperóxido da **QHS**, com a ocorrência de algumas outras interações importantes.

Capítulo I: Objetivos

A primeira parte deste trabalho consistiu em estudar teoricamente algumas rotas de reação da artemisinina (Figura II.2), segundo os mecanismos propostos por Posner e colaboradores [36], Jefford e colaboradores [27] e por Wu e colaboradores [39]. O objetivo é encontrar, através da análise das energias livres de Gibbs da artemisinina e de seus intermediários, qual é a rota preferencial do ponto de vista energético, pois ainda não se sabe realmente qual é a rota preferencial seguida pela droga em questão.

A segunda etapa deste estudo foi investigar teoricamente a interação existente entre a artemisinina e o **heme**. O objetivo de estudar esta interação é investigar com mais detalhes como a droga interage com o receptor de maneira mais intensa. Teve-se o intuito de confirmar se há algum novo tipo de interação droga-receptor que ainda não foi descoberta. Vários estudos presentes na literatura mostraram que a interação mais efetiva ocorre entre o átomo de Fe do **heme** e a ligação endoperóxido da **QHS**, além de outras interações dos átomos de H da **QHS** com o anel porfirínico do **heme**. Este tipo de estudo de interação pode auxiliar na descoberta de novas drogas mais eficientes contra a malária, já que para a descoberta de novas drogas torna-se necessário saber como estas interagem com os respectivos receptores.

CAPÍTULO II

***MÉTODOS DE CÁLCULOS /
MÉTODOS COMPUTACIONAIS***

II.1-MÉTODOS DE CÁLCULOS

II.1.1-MÉTODOS QUÂNTICOS

II.1.1.1. A TEORIA HARTREE-FOCK

Para estudar quanticamente um sistema qualquer, a equação de Schrödinger [56] deve ser resolvida para todas as partículas do sistema, sendo a Equação 1 sua forma independente do tempo:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (1)$$

onde \hat{H} é o operador hamiltoniano, e consiste na forma dos operadores de energia cinética e potencial relativo a todas as partículas do sistema e às interações entre elas.

Os métodos *ab initio* [55-58] usam orbitais de base do tipo gaussianas (ou melhor, combinação linear de gaussianas “primitivas”) e calculam explicitamente todas as integrais necessárias. Um cálculo *ab initio* caracteriza-se assim pelo método (RHF,UHF ou ROHF) e pela base usada. A dificuldade de cálculo dos métodos Hartree-Fock (HF) é de calcular as integrais. A idéia deste método é reduzir o problema de N elétrons para um problema de um elétron, que interage com os núcleos e a nuvem eletrônica dos demais elétrons. A interação elétron-elétron é introduzida de uma forma média e nesta aproximação, a função de onda é representada por um único determinante de Slater. Esta forma de representação satisfaz o princípio de anti-simetria e de indistinguibilidade (princípio da exclusão de Pauli) em relação à permutação eletrônica. De acordo com o modelo de Hartree, a movimentação de cada elétron em um campo efetivo dos outros $N-1$ elétrons é governada pela equação de Schrödinger de uma partícula sujeita a esse campo; ou seja, a autoconsistência da distribuição de carga no campo produz uma série de equações acopladas (Equações de Hartree) para N funções

de onda de uma partícula. Assim, a equação de Schrödinger para N partículas é substituída pelo método autoconsistente. Desta forma, precisa-se resolver as N equações até que a distribuição de carga não varie significativamente; quando isso ocorre, diz-se que o campo atingiu a autoconsistência SCF (*Self-Consistent Field*) [55-58].

Já nos cálculos semi-empíricos [55-58] o problema de cálculo das integrais de repulsões eletrônicas é simplificado. Estudam-se só os elétrons da camada externa dos átomos (elétrons de valência). Essas aproximações fortes são compensadas pela estimativa empírica das integrais e das repulsões internucleares. Todos os métodos semi-empíricos dependem assim de um conjunto de parâmetros atômicos que foram otimizados para reproduzir bem um certo conjunto de propriedades de moléculas testes. A base de funções usada é parte integrante do método (ou deveria ser). Os cálculos semi-empíricos são bem mais rápidos que os cálculos *ab initio* e podem-se estudar moléculas maiores.

Um dos principais problemas do método Hartree-Fock é negligenciar efeitos de correlação eletrônica. Assim, a energia de correlação pode ser expressa como:

$$E_{\text{exata}} \equiv E_{\text{HF}} - E_{\text{correlação}} \quad (2)$$

Este problema é causado pela troca da equação para N partículas por N equações de uma partícula. Com essa aproximação, cada elétron só sente um campo médio causado pelos outros $N - 1$ elétrons, não sendo possível escrever interações instantâneas. Uma função Hartree-Fock pode ser responsável por 99% da energia total; no entanto, o 1% restante é importante para descrever fenômenos químicos. Para ilustrar esta importância, veja a seguir o exemplo do átomo de carbono. A energia total do átomo de carbono é aproximadamente 1000 eV, onde 0,5% deste valor equivale a 5 eV. O valor de uma ligação simples é 5 eV por molécula, de modo que, sem a energia de correlação não se pode calcular energias de ligação corretamente.

II.1.1.1.1. Efeitos do Conjunto de Base

Um conjunto de base é uma descrição matemática dos orbitais do sistema. Dentro do quadro da mecânica quântica, os elétrons possuem uma probabilidade finita de existir em qualquer região do espaço. Este limite corresponde a expansão de um conjunto de base infinito. Os conjuntos de base para cálculos de estrutura eletrônica usam combinação de funções gaussianas para formar os orbitais [55-58].

Os conjuntos de base são nomeados conforme o número de funções de base para cada orbital atômico. Uma base com apenas uma função para cada orbital atômico é denominada de base mínima. Uma base com duas funções para cada orbital atômico é denominada *double zeta*, uma base com três funções é denominada *triple zeta*.

Em um ambiente molecular, a nuvem eletrônica dos átomos apresenta uma deformação. Para que esta deformação seja bem descrita, são introduzidas bases com um momento angular mais alto do que as já existentes. Por exemplo, o conjunto de base 6-31G(d) ou 6-31G* indica que uma função do tipo *d* será acrescida ao conjunto 6-31G nos átomos pesados. A base 6-31G(d,p) ou 6-31G** indica que será acrescentada uma função do tipo *p* nos átomos de hidrogênio e funções *d* nos átomos pesados.

Quando os átomos são carregados negativamente, eles aumentam o volume atômico. Para descrever adequadamente estes sistemas, introduzem-se funções primitivas do tipo *s* para o átomo de hidrogênio e do tipo *sp* para os demais átomos. Estes tipos de funções são denominados de difusas. Como exemplo tem-se que: o conjunto de base 6-31+G indica que uma função difusa será adicionada aos átomos pesados e a base 6-31++G indica que serão adicionadas funções difusas tanto ao átomo de hidrogênio quanto aos demais átomos.

O conjunto de bases 6-31G* (definida para os átomos de H ao Ar) é um conjunto de valências “divididas” (*split-valence*) com algumas funções de polarização adicionadas. Assim, usa-se uma combinação linear de seis funções

primitivas em cada camada fechada de orbitais atômicos e adiciona um conjunto simples de seis funções de polarização Gaussianas do tipo d para cada átomo, exceto o hidrogênio. O conjunto de bases 6-31G** adiciona na série 6-31G* uma série de funções de polarização Gaussianas do tipo p em cada átomo de H. Os expoentes orbitais das funções de polarização nestes dois conjuntos de bases foram determinados como a média dos valores ótimos encontrados em cálculos de moléculas pequenas [55-58].

Algumas simplificações, com pequena perda de precisão, são possíveis através da limitação do tratamento dos elétrons para o sistema eletrônico de valência. Este tratamento se dá pela introdução de um Potencial do Núcleo Efetivo (ECP – *Effective Core Potential*) para representar todos os elétrons do núcleo [56]. Estes elétrons do núcleo são modelados por uma função apropriada e somente os elétrons de valência são tratados explicitamente. Assim, como os elétrons internos são substituídos, conseqüentemente não são necessárias funções gaussianas para representar a distribuição eletrônica nesta região. Em muitos casos este método fornece bons resultados a um custo bem menor de um cálculo envolvendo todos os elétrons. Parte dos efeitos relativísticos são deixados de lado, principalmente os efeitos escalares, não levando em consideração todos os efeitos relativísticos durante o cálculo.

II.1.1.2. O MÉTODO DE ROOHTAAN-HALL

Com o método Hartree-Fock, os cálculos de orbitais moleculares tornaram-se equivalentes ao problema de resolver a equação:

$$\hat{F}(\mathbf{1})\Psi_i(\mathbf{1}) = \varepsilon_i\Psi_i(\mathbf{1}) \quad (3)$$

a qual é uma equação de autovalor-autovetor, a exemplo da equação de Schrödinger (Equação 1), só que trocando o operador Hamiltoniano pelo operador Fock. Ela pode ser interpretada como a equação de Schrödinger de uma partícula submetida a um campo efetivo.

Uma maneira de resolver a equação de Fock é através do método proposto por C. C. J. Roothaan em 1951 [59]. Neste método, os orbitais Ψ_i são escritos como uma combinação linear de um conjunto de funções atômicas ϕ . Este procedimento é comumente conhecido como o método da combinação linear dos orbitais atômicos (LCAO).

$$\Psi_i = \sum_k^b C_{ki} \phi_k \quad (4)$$

Substituindo (4) em (3), multiplicando posteriormente por ϕ_i^* e integrando têm-se:

$$\sum_k^b F_{ik} C_{ki} = \varepsilon_i \sum_k^b S_{ik} C_{ki} \quad (5)$$

A equação (5) é conhecida como equação de Roothaan-Hall, a qual é a forma matricial, com base na expansão em orbitais atômicos, da equação de Hartree-Fock. As grandes vantagens desta formulação são a maior facilidade na resolução por técnicas matriciais e na implementação computacional.

II.1.1.3. TEORIA DO FUNCIONAL DE DENSIDADE

Os métodos baseados na Teoria do Funcional de Densidade (DFT – *Density Functional Theory*) [56] têm grande vantagem sobre os métodos baseados nas equações de Hartree-Fock, devido ao menor custo computacional. Como não utilizam parâmetros, além de constantes universais da física, ele pode ser considerado um método do tipo *ab initio*. Os métodos HF empregam o operador Hamiltoniano exato e faz aproximações para a função de onda, enquanto que os métodos baseados na DFT fazem aproximações no operador Hamiltoniano. Para melhorar a descrição da função de onda tem-se que as aproximações para esta função envolvem cálculos mais simples, isto é, com menor tempo computacional,

que adicionar correções para o operador. Assim, os resultados provenientes destes cálculos convergem em direção a um valor certo na medida que a série de bases é implementada, mas a teoria não permite uma avaliação dos erros inerentes neste limite.

Os modelos baseados na Teoria de Funcional Densidade (DFT) fornecem uma aproximação alternativa para o tratamento da correlação eletrônica. O conceito de função de onda é substituído pelo de densidade eletrônica. Desta forma, os termos de energia do sistema são todos expressos como um funcional único (uma função de uma função) da densidade eletrônica.

II.1.1.4. MÉTODOS AB INITIO

Os métodos *ab initio* resolvem a equação de Schrödinger sem a inclusão de dados experimentais. Os cálculos *ab initio* mais comuns são os cálculos Hartree-Fock (HF), cuja função de onda é descrita por funções matemáticas que são conhecidas exatamente para poucos sistemas monoelétrônicos. As funções são geralmente combinações lineares de orbitais do tipo Slater ou do tipo gaussiana, abreviadas como STO e GTO, respectivamente. Logo, a função de onda é formada por uma combinação linear de orbitais atômicos. Uma vantagem dos métodos *ab initio* é que eles usualmente convergem para uma solução exata, geralmente obtendo bons resultados para determinadas propriedades. Uma desvantagem destes métodos é que eles são muito caros. Estes métodos geralmente necessitam de grande tempo de *cpu*, grande quantidade de memória e de espaço em disco [55-58].

II.1.1.5. MÉTODOS SEMI-EMPÍRICOS

Métodos de estrutura eletrônica são classificados como *ab initio* ou semi-empíricos. Métodos semi-empíricos usam um Hamiltoniano simples ao invés do Hamiltoniano molecular correto e usam parâmetros cujos valores são ajustados de modo a se aproximarem de valores experimentais ou de resultados provenientes

Capítulo II: Métodos de Cálculos

de cálculos *ab initio*. Os cálculos semi-empíricos apresentam a mesma estrutura do cálculo HF, com algumas modificações, tais como as integrais de dois elétrons que são aproximadas ou completamente desprezadas. Para corrigir os erros introduzidos por esta omissão, o método é parametrizado para reproduzir da melhor forma os resultados experimentais [55-58].

II.1.2-MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

Ainda para este trabalho, foram utilizadas as técnicas quimiométricas de Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA – Hierarchical Clustering Analysis) [60,61] e Análise de Componentes Principais (PCA – *Principal Component Analysis*) [60-63].

A Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA) é uma técnica não supervisionada que examina a distância pontual entre todos os objetos e representa esta informação na forma de um diagrama bidimensional conhecido como dendrograma. Estes dendrogramas apresentam os resultados de uma forma que facilita o uso das habilidades humanas de reconhecimento-padrão. Para gerar o dendrograma trata-se inicialmente cada amostra como um agrupamento e então une-se os agrupamentos baseado na proximidade entre os mesmos, no espaço das variáveis. Este processo é repetido até restar somente um único grupo. As variações de HCA usam diferentes aproximações para medir a distância entre os agrupamentos. Como exemplo de formas de agrupamento tem-se conexão simples versus conexão por meio de centróides. No caso de distância tem-se distância Euclidiana versus distância de Mahalanobis, dentre outros [61]. A medida mais comum de distância é a Euclidiana: (para dois pontos) que normalmente é utilizada sobre dados padronizados, já que ela é sensível às escalas de medidas utilizadas pelo analista. A distância de Mahalanobis é uma medida euclidiana padronizada que leva em conta a variância-covariância das variáveis, sendo bastante eficiente e recomendada.

A Análise de Componentes Principais (PCA) é uma manipulação matemática de uma matriz de dados onde a meta é representar a variação presente em muitas variáveis usando o menor número de “fatores” [61,62]. Pode ser melhor entendida usando um exemplo de duas variáveis, de acordo com a Figura II.1. A matriz original é representada por novas variáveis, chamadas de “componentes principais” (PC) ou “fatores”. Uma componente principal é uma combinação linear das variáveis originais V_1 e V_2 . A primeira componente principal de um conjunto de dados, PC_1 , tem a direção que explica a máxima quantidade de

variações possíveis dos dados. Esta é a direção que descreve o maior espalhamento dos objetos. Além disso, a quantidade de informação descrita por uma componente principal pode ser precisamente calculada.

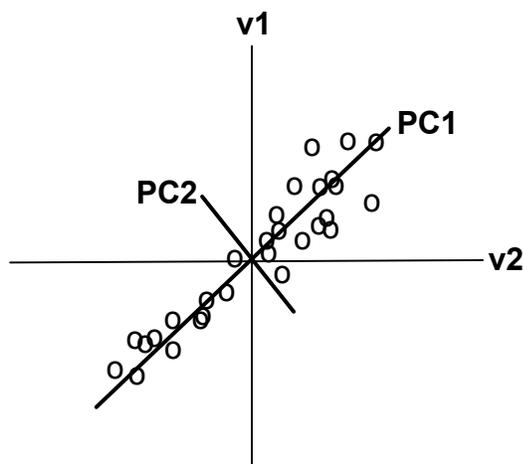


Figura II.1: Valores plotados em um sistema de duas medidas, com os eixos das duas primeiras componentes principais representados em negrito.

A segunda componente principal e todas as subseqüentes são definidas em função da máxima variância dos dados ainda não quantificados pela componente principal anterior. Todas as componentes principais são ortogonais entre si. As distâncias entre as amostras são usadas para definir similaridades e diferenças. É também útil conhecer quais as variáveis contribuem mais para cada componente principal. As coordenadas das amostras em relação às componentes principais são os escores, enquanto que as contribuições de cada variável para as componentes principais são os pesos [64].

II.2-MÉTODOS COMPUTACIONAIS

Inicialmente utilizou-se a estrutura da artemisinina disponível no banco de dados CSD [65] por ser uma estrutura que possui a geometria precisa, já que a mesma foi obtida através de dados cristalográficos. A seguir otimizou-se a geometria da artemisinina primeiramente com o método semi-empírico e depois com o método *ab initio* a nível Hartree-Fock (HF) [55-58]. Fez-se uma análise conformacional e obteve-se a estrutura otimizada da artemisinina com o método HF/6-31G**.

Cálculos mecânico-quânticos empregando os programas Gaussian 98 [66], SPARTAN [67] e TITAN [68] foram usados para determinar a geometria da artemisinina e de todos os seus intermediários de reação presentes na Figura II.2. Para estes cálculos utilizou-se um computador Pentium IV 1500 MHz e computadores localizados no ambiente CENAPAD (Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho em São Paulo). Assim, as geometrias otimizadas da artemisinina foram obtidas através de vários métodos, desde semi-empírico AM1 [69] e PM3 [70] até *ab initio* HF/CEP-31G, HF/CEP-31G**, HF/CEP-31++G** e HF/6-31G** [55-58]. Estes resultados foram comparados com a estrutura experimental determinada por cristalografia de raio-X [65], com fator cristalográfico R=5,72% (Tabela III.1). O fator cristalográfico R (fator-R) é a medida do nível de desordem entre os fatores da estrutura observada (F_{obs}), isto é, estrutura experimental, e os fatores da estrutura calculada (F_{cal}). O tradicional fator cristalográfico R é definido como:

$$R = \frac{\sum |F_{(obs)} - F_{(calc)}|}{\sum F_{(obs)}} \quad (6)$$

Este fator-R é geralmente descrito em %, isto é, um fator-R de 0,05, por exemplo, é apresentado como 5%. Os autores geralmente atribuem pesos ao fator-R onde, quanto menor o valor de R melhor será a resolução da estrutura [71]. Um guia aproximado para qualificar as estruturas cristalográficas é: 0,01 – 0,03

(muito excelente); 0,03 – 0,04 (excelente); 0,04 - 0,05 (muito bom); 0,05 - 0,07 (bom); 0,07 – 0,09 (médio); 0,09 – 0,10 (razoável); 0,10 – 0,15 (pobre); > 0,15 (ruim). Para esta estrutura cristalográfica da artemisinina a média de variação da ligação sigma C-C é de 0,001 Å a 0,005 Å.

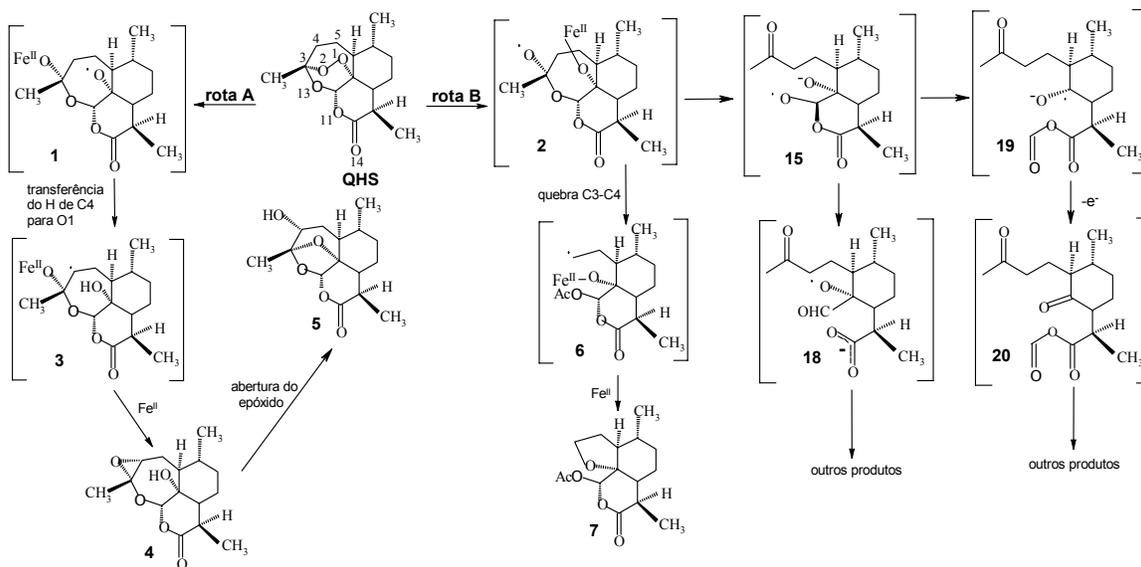


Figura II.2: Mecanismos de ação da artemisinina propostos por Posner *et al.* [36] (rota A), por Jefford *et al.* [27] (rota B, levando ao intermediário 7) e por Wu *et al.* [39] (rota B, levando aos intermediários 18 e 20).

Após a comparação dos resultados teóricos com o experimental, observou-se que os cálculos *ab initio* foram os que apresentaram menores desvios com relação à geometria da molécula, o que pode ser observado pela Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA – Hierarchical Cluster Analysis) [60,61] conduzida pelo programa PIROUETTE [72]. O método HF/CEP-31G forneceu melhor resultado e para comprovar isto utilizou-se a técnica de Análise de Componentes Principais (PCA – *Principal Component Analysis*) [60-62] com o auxílio do programa PIROUETTE.

Para realizar os cálculos das propriedades de interesse, como energias eletrônicas e energias de Gibbs, consideraram-se inicialmente aspectos teóricos

envolvendo pseudopotenciais (CEP – *Compact Effective Potentials*). Uma avaliação teórica das propriedades de interesse inicia-se pela definição da metodologia de cálculo apropriada. Esta escolha é norteada pelos recursos computacionais disponíveis e pela qualidade das propriedades a serem calculadas. Assim, foi proposta a utilização de cálculos usando pseudopotenciais para produzir conjuntos de base a fim de serem utilizados nos cálculos de energias eletrônicas e livres empregando a Teoria do Funcional de Densidade (DFT). Neste sentido, fizeram-se a princípio cálculos de otimização de geometria da artemisinina envolvendo métodos HF e pseudopotenciais. Para estes cálculos gastou-se menor tempo computacional que para a otimização com o método HF/6-31G**, exceto para a otimização usando o método HF/CEP-31++G**. Já para a otimização de geometria do radical **1/2** (Figura II.3) o mesmo não ocorreu, isto é, os cálculos de otimização usando pseudopotencial gastaram maior tempo computacional. Assim, tomando como referência o radical **1/2**, decidiu-se não otimizar as geometrias dos demais radicais em estudo usando CEP, devido ao alto tempo computacional. Caso estes cálculos de otimização de geometria do radical **1/2** usando pseudopotencial fossem rápidos então, as geometrias dos demais intermediários seriam otimizadas utilizando cálculos que levam em consideração a correlação eletrônica e somente os elétrons de valência como, por exemplo, B3LYP/CEP-31G** [56,72-74]. Tinha-se o interesse de realizar este tipo de cálculo, levando em consideração a correlação eletrônica e apenas os elétrons de valência, pois assim, os cálculos de otimização de geometria dos intermediários em estudo seriam realizados com um método mais preciso, no caso B3LYP, mas ao mesmo tempo com um menor tempo computacional, ao levar em consideração apenas os elétrons de valência.

A fim de verificar se existem efeitos de correlação eletrônica nas estruturas em estudo, foram feitos cálculos em um único ponto (“single point”) utilizando os métodos HF/6-31G** e B3LYP/6-31G**. Estes cálculos “single point” foram realizados para os intermediários **1/2** e **3** e em seguida calculou-se a diferença de energia entre ambos os ânions radicalares. Obtiveram-se valores próximos para a

variação de energia eletrônica em ambos os métodos, e, portanto, observa-se que os mesmos resultados são reproduzidos nos diferentes tipos de cálculos.

Assim, como foi observado que o efeito de correlação eletrônica não afeta significativamente os cálculos em questão, selecionou-se o método HF/6-31G** para a otimização dos intermediários. Com o intuito de verificar o efeito da inclusão de funções difusas nos cálculos de otimização de geometria dos intermediários aniônicos, fez-se um teste qualitativo. Durante este teste foram feitos cálculos “single point” para os ânions **1/2** e **3** usando os métodos HF/6-31G** e HF/6-31+G**. Calculou-se a diferença de energia de ambos os ânions para os dois métodos e observou-se praticamente o mesmo valor nos dois casos. Assim, os cálculos de otimização para todos os intermediários foram executados usando o método HF/6-31G**, sem a inclusão de funções difusa. Como a redução da artemisinina leva a ânions radicalares com um elétron desemparelhado, empregou-se o método UHF para a otimização das geometrias destes ânions. As cargas atômicas usadas neste trabalho foram obtidas com a palavra-chave CHELPG através do potencial eletrostático [76] e através das cargas de Mulliken [77].

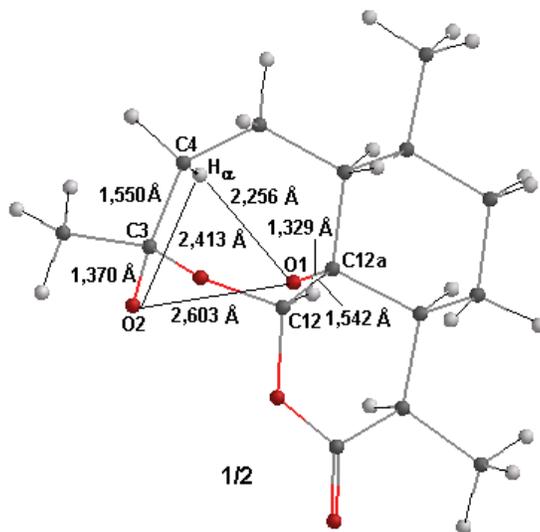


Figura II.3: Intermediário 1/2.

A segunda etapa deste estudo foi a investigação teórica da interação existente entre a artemisinina e o **heme**, estudando a barreira de rotação entre ambos. Durante esta etapa utilizou-se os programas SPARTAN [67] e TITAN [68] com o método semi-empírico PM3 [70] para fazer os cálculos da energia da barreira rotacional entre a droga (**QHS**) e o receptor (**heme**). A estrutura do **heme** (1THB) foi retirada do Banco de Dados Cristalográficos [53]. A estrutura da artemisinina disponível no banco de dados CSD [65] foi utilizada para estes cálculos de barreira rotacional.

A molécula de oxigênio coordenada ao átomo de ferro do **heme**, proveniente da estrutura experimental da oxi-hemoglobina [53] (PDB: 1THB, resolução 1,50 Å, R=19,6%), foi usada para construir o complexo **heme**-artemisinina (Figura II.4). A molécula de oxigênio serviu para ligar o **heme** à artemisinina. O **heme** e a artemisinina foram orientados, isto é, colocados no mesmo eixo com o auxílio do programa MATLAB [78]. Para cada ângulo de rotação otimizava-se as geometrias do **heme** e da artemisinina, isto é, a interação existente entre ambos.

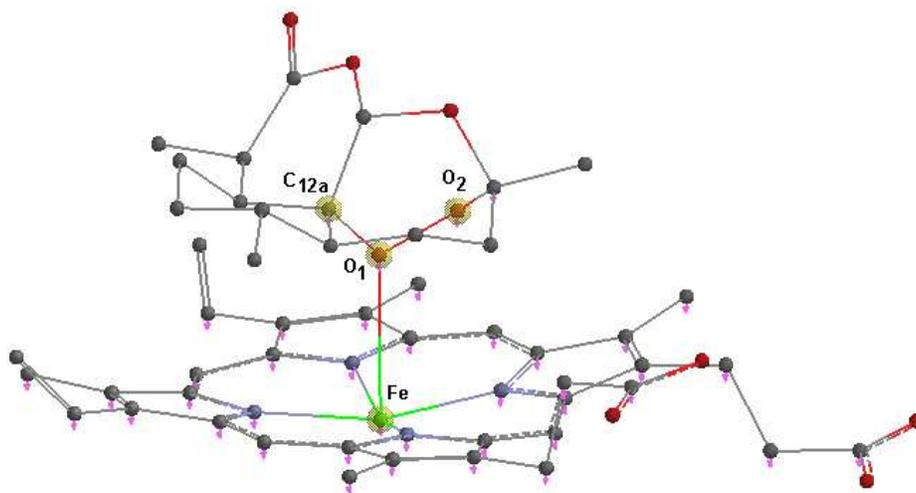


Figura II.4: Disposição trigonal entre a artemisinina e o **heme** (os átomos de hidrogênio foram omitidos).

A distância O1-Fe foi fixada em 2,7 Å (Figura II.4), a qual já foi encontrada em outros estudos teóricos realizados por Tonmuphean e colaboradores [18,21] e por Cheng e colaboradores [22]. Porém, após fixar esta distância, verificou-se que a molécula de artemisinina não estava em boa posição, uma vez que as distâncias de alguns átomos da região hidrofílica da artemisinina estavam muito próximos dos átomos do **heme**. Sendo assim, fez-se uma correção na orientação da artemisinina, fixando o ângulo O2-O1-Fe que era de aproximadamente 130°, em 115°. Este ângulo de 115° foi escolhido com base no ângulo Fe-O1-C12a que era desta ordem de grandeza e, assim, a molécula de artemisinina ficou numa posição mais horizontal, onde a ligação do átomo de ferro com a molécula de artemisinina é aproximadamente trigonal (Figura II.4).

Durante os cálculos alguns átomos tanto da artemisinina quanto do **heme** estavam fixados (congelados), conforme a Figura II.5. Da molécula de **heme** foram fixados o átomo de ferro, o anel da porfirina, quatro carbonos metilênicos, dois carbonos etilênicos, três carbonos de cada grupo propionato e o átomo de hidrogênio do carbono que está entre os grupos propionatos. Da artemisinina foram fixados somente quatro átomos: O1, O2 e dois carbonos adjacentes a estes átomos. Para o início das rotações foi escolhido o seguinte ângulo diedro: C-Fe-O1-O2 (Figura II.5), onde C é o átomo de carbono do grupo heme, que está entre os dois grupos propionatos.

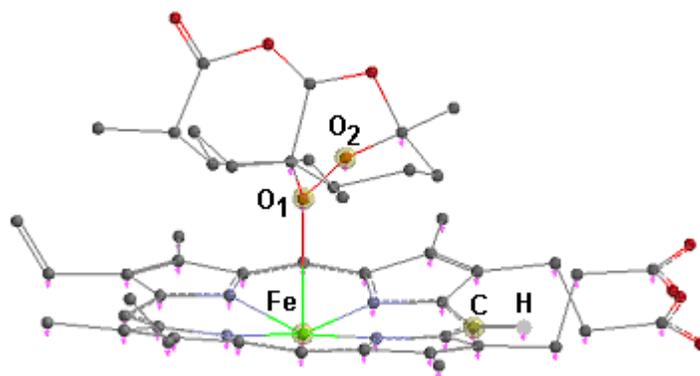


Figura II.5: Interação entre a artemisinina e o **heme** (somente um átomo de hidrogênio está representado; os átomos congelados são aqueles marcados com a cor rosa).

Os ângulos de rotação entre a artemisinina e o **heme** foram realizados de 10 em 10° entre os átomos C-Fe-O1-O2 (Figura II.5) com o intuito de investigar qual a posição favorável para ambas as estruturas se interagirem. Antes de iniciar a otimização da interação entre a droga e o receptor realizou-se um cálculo de mecânica-molecular, baseado no campo de força MMFF94 [55-58] para haver uma melhor acomodação dos átomos livres tanto de uma estrutura quanto da outra.

Primeiramente realizaram-se as rotações com intervalos de 10° partindo sempre da estrutura anterior e fazendo cálculo de mecânica-molecular antes da minimização com o método semi-empírico PM3. A segunda etapa foi realizada girando de 10 em 10° os ângulos de rotação entre a artemisinina e o **heme**, porém utilizando sempre a estrutura inicial, otimizando primeiramente com mecânica-molecular e posteriormente com o método PM3.

CAPÍTULO III

RESULTADOS E DISCUSSÕES / CONCLUSÕES

III.1-RESULTADOS E DISCUSSÕES

III.1.1-EFEITO DA ESTRUTURA DA ARTEMISININA E DE ALGUNS INTERMEDIÁRIOS

Os parâmetros geométricos da artemisinina otimizada com o método *ab initio* HF/6-31G** bem como os resultados experimentais estão listados para efeito de comparação, onde se observa que existe boa concordância entre ambos. No entanto, percebe-se claramente ao analisar a Tabela III.1, que as distâncias da ligação peróxido e das ligações C-O a nível HF são um pouco menores quando comparadas com os valores experimentais. Estas mesmas ligações menores já foram relatadas em estudos recentes da artemisinina [49,50,79,80]. Assim, os menores valores previstos para os comprimentos de ligação C-O e O-O são justificados pelo fato de que o método HF superestima a força de ligação do oxigênio.

Tabela III.1: Geometrias da artemisinina otimizada com métodos semi-empíricos e *ab initio*. Comparação com os resultados experimentais. Comprimento de ligação (R) em Å, ângulos de ligação (A) e diedros (D) em graus.

Geometria	Exper. ^a	PM3	AM1	HF/ CEP-31G	HF/CEP- 31G**	HF/CEP- 31++G**	HF/ 6-31G**
R							
O1-O2	1,469(2)	1,544	1,289	1,439 [#]	1,395	1,395	1,390
O2-C3	1,416(3)	1,403	1,447	1,447	1,405 [#]	1,405	1,396
C3-O13	1,445(2)	1,428	1,427	1,449 [#]	1,418	1,417	1,409
O13-C12	1,379(2)	1,403	1,416	1,413	1,384 [#]	1,384 [#]	1,376
C12-C12a	1,523(2)	1,555	1,537	1,549	1,542	1,541	1,532 [#]
C12a-O1	1,461(2)	1,426	1,468 [#]	1,479	1,438	1,438	1,430
A							
O1-O2-C3	108,1(1)	110,34	112,54	109,39 [#]	109,47	109,40	109,45
O2-C3-O13	106,6(2)	104,81	103,60	106,77 [#]	107,97	107,88	107,82
C3-O13-C12	114,2(2)	116,01	115,48	116,78	114,82 [#]	115,00	115,31
O13-C12-C12a	114,5(2)	115,21 [#]	113,51	112,45	112,49	112,50	112,26
C12-C12a-O1	110,7(2)	113,18	111,06	110,58	110,54	110,65 [#]	110,55
C12a-O1-O2	111,2(2)	112,30 [#]	113,73	113,39	112,51	112,53	112,70
D							
O1-O2-C3-O13	-75,5(2)	-73,31	-77,80	-71,97	-73,80	-73,86 [#]	-73,39
O2-C3-O13-C12	36,0(2)	52,75	42,05	32,93 [#]	31,12	31,31	31,08
C3-O13-C12-C12a	25,3(2)	2,74	11,43	25,46 [#]	27,43	27,08	27,38
O13-C12-C12a-O1	-51,3(2)	-40,47	-41,79	-49,72	-50,30 [#]	-49,81	-50,13
C12-C12a-O1-O2	12,7(2)	19,95	12,05	12,72 [#]	10,77	10,43	10,91
C12a-O1-O2-C3	47,8(2)	35,60	47,05 [#]	46,61	48,85	49,09	48,68

^a Ref. [65]. [#]Melhores resultados. Obs: Numeração entre parêntese é o desvio padrão experimental.

Com o objetivo de verificar quais os métodos de otimização de geometria da artemisinina se aproximam mais dos resultados experimentais, foi feita uma Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA) [60,61]. Esta análise foi conduzida através da matriz de dados que contém 7 linhas e 18 colunas. As amostras são as linhas, as quais são representadas pelos seis métodos utilizados na otimização da QHS e pelo método experimental. As colunas são as variáveis, isto é, são os valores correspondentes aos comprimentos de ligação, ângulos de ligação e diedros. Foram feitas quatro Análises de Agrupamentos Hierárquicos, utilizando-se para isso quatro diferentes métodos de conexão. Os métodos incremental, simples, centróide e completo forneceram o mesmo resultado de agrupamento e praticamente o mesmo índice de similaridade. As unidades do índice de similaridade variam de 0 a 1, onde agrupamentos idênticos tem este valor igual a

Capítulo III: Resultados e Discussões

1. Assim, selecionou-se o método de conexão simples para demonstrar a HCA. Através da análise do dendrograma (Figura III.1) chegou-se à conclusão de que os métodos *ab initio* forneceram os melhores resultados quando comparados com os valores experimentais. Os valores de comprimentos de ligação, ângulos e diedros da geometria da artemisinina otimizada com os métodos *ab initio* aproximaram-se mais dos resultados experimentais que os valores fornecidos pelos métodos semi-empíricos. Isto pode ser observado ao analisar a Figura abaixo, onde a conexão entre os resultados dos métodos *ab initio* e o resultado experimental fornecem alto índice de similaridade, no valor de 0,68.

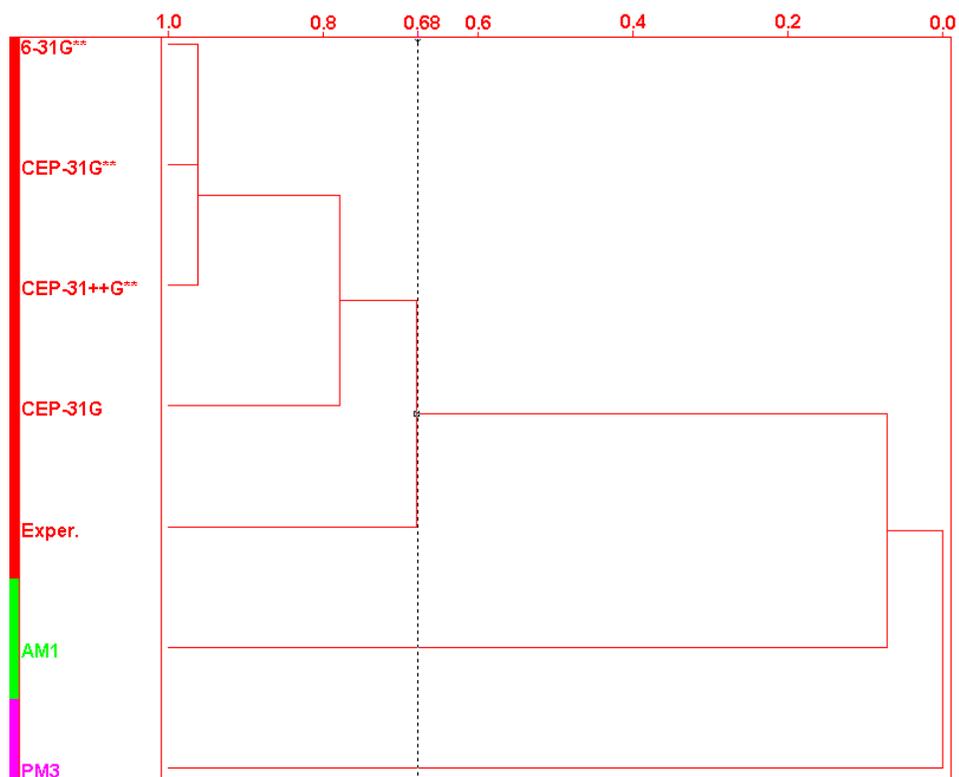


Figura III.1: Dendrograma: Conexão simples.

Ainda analisando o dendrograma acima se percebe que os métodos de otimização que mais se assemelham entre si são os métodos HF/6-31G**, HF/CEP-31G** e HF/CEP-31++G**, possuindo índice de similaridade próximo a 1.

Ainda com o objetivo de extrair o máximo de informações da matriz de dados 7X18, já citada anteriormente, fez-se a Análise de Componentes Principais (PCA) [60-62] e este resultado está apresentado na Figura III.2. Esta análise foi realizada com nenhum pré-processamento e 4 números máximos de fatores. Através da Análise de Componentes Principais observou-se que o método *ab initio* CEP-31G foi o método que forneceu melhor resultado de comprimentos de ligação, ângulos e diedros para a geometria da artemisinina. Através de uma visão tridimensional dos escores (amostras) observa-se que o método CEP-31G é o que está mais próximo do resultado experimental (Figura III.2).

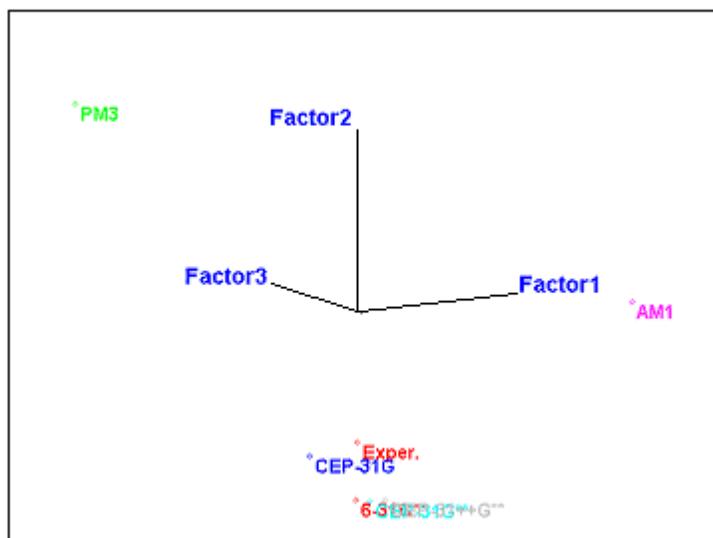


Figura III.2: Visualização 3D do resultado da PCA.

A Figura III.3 apresenta a Análise de Componentes Principais dos dados correspondentes à matriz. Há aproximadamente 99% de informação acumulada nas duas primeiras componentes principais. A primeira componente principal (Fator 1 ou PC1) não separa nenhuma classe enquanto que a segunda componente principal (Fator 2 ou PC2) separa os métodos *ab initio* dos semi-empíricos. Na PC2 observa-se que os resultados semi-empíricos estão localizados na parte superior do diagrama. Encontra-se na parte inferior do mesmo diagrama os resultados dos métodos *ab initio* e o experimental. Após a análise da Figura

III.3 chega-se a conclusão que realmente os métodos *ab initio* fornecem resultados mais próximos do experimental, como já observado pela Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA). Além do mais, percebe-se que método HF/CEP-31G é o que mais se assemelha aos resultados experimentais, conforme a proximidade observada entre ambos.

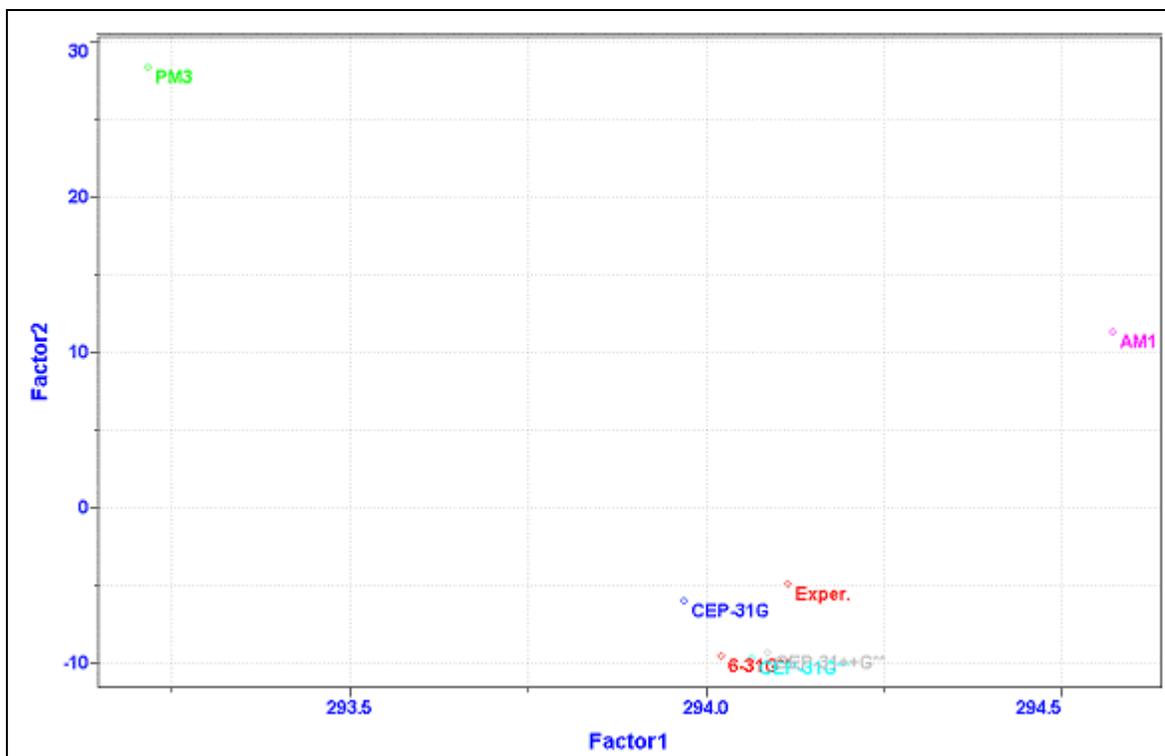


Figura III.3: Visualização 2D do resultado da PCA. Escores de PC1 X PC2.

Após esta análise utilizando técnicas quimiométricas observou-se que o melhor método computacional para a otimização da geometria da artemisinina seria o HF/CEP-31G. Com o intuito de verificar se o mesmo é válido para a otimização dos intermediários em estudo (Figura II.2) fizeram-se alguns cálculos. Primeiramente otimizou-se a geometria do radical **1/2** usando os métodos HF/6-31G** e HF/CEP-31G**. Observou-se, em ambos os cálculos de otimização, que o tempo computacional gasto pelo método HF/CEP-31G** foi ligeiramente menor que o do método HF/6-31G**. Sendo assim, optou-se por não utilizar métodos

Capítulo III: Resultados e Discussões

usando pseudopotencial para a otimização das geometrias dos intermediários já que não houve ganho considerável no tempo de cálculo.

Para verificar o efeito da correlação eletrônica nos cálculos de otimização de geometria dos intermediários em estudo, fez-se um teste qualitativo com cálculos “single point” para os intermediários **1/2** e **3**. A Tabela III.2 mostra os resultados obtidos para o cálculo “single point” realizado com os métodos HF/6-31G** e B3LYP/6-31G**. Observa-se que os resultados da variação de energia eletrônica usando ambos os métodos são semelhantes, com diferença de apenas 1,47 kcal mol⁻¹. Isto indica que o efeito de correlação eletrônica é praticamente nulo e, portanto, pode ser desprezado.

Tabela III.2: Diferença de energia entre os intermediários **1/2** e **3**. (Cálculo “single point”).

Método	$\Delta E_e / \text{kcal mol}^{-1}$
HF/6-31G**	11,15
B3LYP/6-31G**	12,62

ΔE_e =variação de energia eletrônica

Na otimização de geometria dos intermediários aniônicos fez-se também alguns cálculos para verificar o efeito da inclusão de funções difusas, as quais descrevem adequadamente sistemas carregados negativamente. Cálculos de otimização de geometria para os ânions **1/2** e **3** foram feitos usando os métodos HF/6-31G** e HF/6-31+G**. Calculou-se a diferença de energia de ambos os ânions para estes métodos (Tabela III.3) e observou-se praticamente o mesmo valor nos dois casos. Assim, conclui-se que a inclusão de funções difusas na otimização de geometria não afeta significativamente o valor da energia eletrônica dos ânions em estudo.

Tabela III.3: Diferença de energia entre os intermediários **1/2** e **3**.

Método	$\Delta E_e / \text{kcal mol}^{-1}$
HF/6-31G**	11,11
HF/6-31+G**	11,51

ΔE_e =variação de energia eletrônica

Após estes testes realizados, usando como referência os ânions **1/2** e **3**, observou-se que para a otimização dos intermediários da Figura II.2 não serão necessários a inclusão de correlação eletrônica e nem de funções difusas. Com isso, os cálculos de otimização de geometria de todas as estruturas em estudo serão executados usando o método HF/6-31G**.

Como a redução da artemisinina leva a ânions radicalares com um elétron desemparelhado, empregou-se o método UHF para a otimização das geometrias destes ânions. O estado dublete dos radicais calculados foi confirmado pelo valor esperado para o operador S^2 , onde para um estado dublete verdadeiro o valor esperado de S^2 é exatamente 0,75. Todos os ânions radicalares calculados com o método HF/6-31G** mostraram valores de S^2 entre 0,758 e 0,763, caracterizando o estado dublete para estas estruturas.

III.1.2-ROTAS DE REAÇÃO DA ARTEMISININA

Conforme sugerido por Posner e colaboradores [36] e por Jefford e colaboradores [27], a reação entre a artemisinina e o íon Fe(II) começa com a transferência de um único elétron do íon para a ligação peróxido da artemisinina. Em seguida, são formados dois possíveis ânions radicais de oxigênio (**1** e **2**) (Figura II.2), onde cada um segue rotas diferentes dando diferentes produtos finais. O primeiro radical tem o elétron desemparelhado em O1 (**1**, rota A) e o segundo radical tem o elétron desemparelhado em O2 (**2**, rota B). **1** e **2** diferem somente na localização do elétron desemparelhado e da carga negativa formal, assim, somente uma estrutura pode ser calculada para estas espécies, com o elétron desemparelhado e a carga negativa distribuída entre os dois átomos de oxigênio, como calculado por Taranto *et al* [51].

A geometria otimizada para o radical **1/2** pelo método HF/6-31G** mostra a grande separação entre os átomos O1 e O2 em 2,603 Å (Figura I.25 e Tabela I.4). Na **QHS** esta mesma distância é de 1,390 Å (Figura I.25 e Tabela I.4), havendo aí um afastamento entre estes átomos de 1,213 Å. Ainda analisando o radical **1/2**, observa-se várias alterações na geometria da molécula quando a artemisinina passa de sua forma neutra para as formas radicalares **1/2**. As ligações C-O1 e C-O2 são respectivamente 0,101 Å e 0,026 Å menores. Alongamentos de comprimentos de ligações são visivelmente percebidos para as ligações C3-C4 e C12-C12a, com aumento de 0,013 Å e 0,010 Å respectivamente (Figura III.4 e Tabela III.4). Mudanças nos ângulos durante a passagem da artemisinina para as formas **1/2** também são observadas. Grandes mudanças nos ângulos de torção mostram o rearranjo da geometria da molécula como um todo após a quebra da ligação O1-O2.

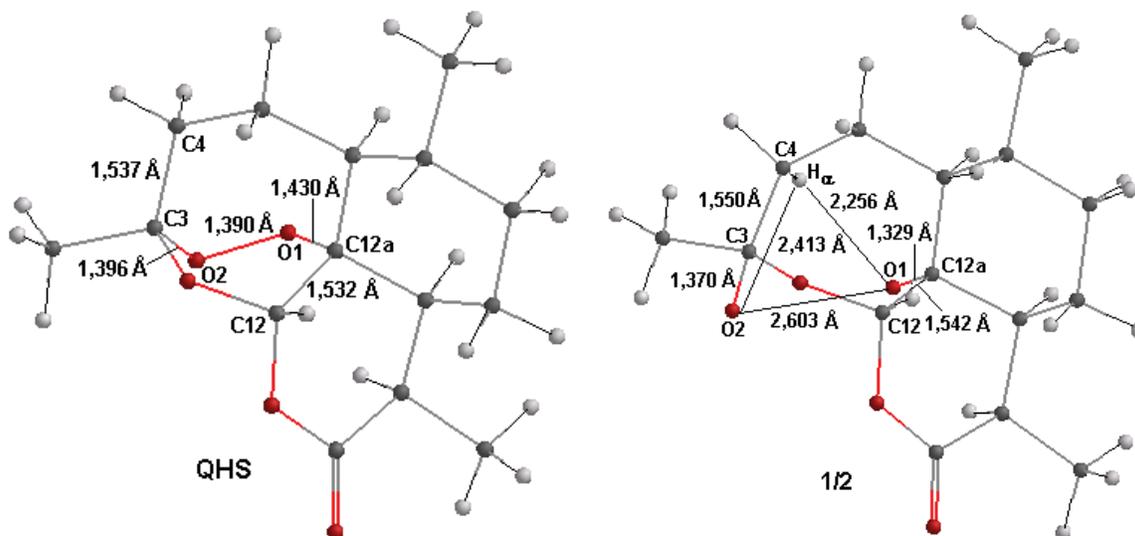


Figura III.4: Comprimentos de ligação da artemisinina (**QHS**) e do intermediário **1/2**.

Seguindo a rota A, o comprimento da ligação C12a-O1 do radical **1** é de 1,329 Å (Figura III.4 e Tabela III.4) e ao mesmo tempo a distância interatômica entre O1 e o hidrogênio α ligado em C4 é de 2,256 Å (Figura III.4). Isto indica que o passo seguinte é o rearranjo sofrido por **1**, através do deslocamento intramolecular do átomo de H de C4 para O1, dando o radical secundário **3** centrado no átomo de carbono. A distância interatômica entre O2 e este mesmo hidrogênio é de 2,413 Å (Figura III.4), sendo portanto desfavorável para um provável deslocamento intramolecular. A densidade de spin em C4 neste radical secundário é 1,241 (Tabela III.6), indicando que o elétron desemparelhado está essencialmente localizado neste átomo de carbono.

Tabela III.4: Parâmetros estruturais mais importantes para a artemisinina (HF/6-31G**) e o radical **1/2** (HF/6-31G**). Comprimento de ligação (R) em Å, ângulos de ligação (A) e diedros (D) em graus.

Geometria	QHS	1/2
R (Å)		
O1-O2	1,390	2,603
O2-C3	1,396	1,370
C3-O13	1,409	1,406
C12-C12a	1,532	1,542
C12a-O1	1,430	1,329
C3-C4	1,537	1,550
A (graus)		
O1-O2-C3	109,45	81,62
O2-C3-O13	107,82	113,42
C3-O13-C12	115,31	124,40
O13-C12-C12a	112,26	115,85
C12-C12a-O1	110,55	111,71
C12a-O1-O2	112,70	107,92
D (graus)		
O1-O2-C3-O13	-73,39	-60,00
O2-C3-O13-C12	31,08	61,88
C3-O13-C12-C12a	27,38	27,27
O13-C12-C12a-O1	-50,13	-58,54
C12-C12a-O1-O2	10,91	23,98
C12a-O1-O2-C3	48,68	34,96

Ao analisar as cargas (Tabela III.5) e densidades de spin (Tabela III.6) do radical **1/2** observa-se que a carga negativa está preferencialmente localizada no átomo O1 e o elétron radicalar está principalmente sobre o átomo O2, o que pode ser confirmado por estudos experimentais de Posner e Oh [81], os quais comprovaram que a quebra da ligação peróxido em trioxanos induzida por Fe(II) leva aos radicais livres **1** e **2** na proporção de 1:2.

Tabela III.5: Cargas atômicas derivadas do Potencial Eletrostático (método CHELPG) [76] e de Mulliken (entre parêntese) [77] calculadas pelo método HF/6-31G** (em unidades atômicas).

Átomo	1/2	3	6	18
O1	-0,795 (-0,911)	-0,856 (-0,781)	-0,905 (-0,917)	-0,410 (-0,398)
O2	-0,467 (-0,354)	-0,978 (-0,876)	-0,666 (-0,588)	-0,617 (-0,548)
O11	-0,597 (-0,667)	-0,517 (-0,653)	-0,615 (-0,686)	-0,787 (-0,765)
O13	-0,746 (-0,736)	-0,684 (-0,755)	-0,643 (-0,669)	-0,585 (-0,562)
O14	-0,664 (-0,616)	-0,645 (-0,604)	-0,642 (-0,603)	-0,776 (-0,728)
C4	-0,529 (-0,238)	-0,479 (-0,152)	-0,422 (-0,350)	-0,334 (-0,291)

Tabela III.6: Densidades de spin (HF/6-31G**) nos átomos selecionados calculados para os ânions radicalares.

Átomo	1/2	3	6	18
O1	0,019	0,003	0,000	1,012
O2	1,010	0,021	0,001	0,000
O11	0,000	0,000	0,000	0,000
O13	0,000	0,006	0,000	-0,011
O14	0,000	0,000	0,000	0,000
C4	0,033	1,241	1,254	0,005

Seguindo a rota B, um possível passo é a quebra da ligação C3-C4 levando ao radical primário **6**, com o elétron desemparelhado localizado em C4, cuja densidade de spin é 1,254 (Tabela III.6), comprovando assim a presença do elétron neste átomo. Em ambos os radicais **3** e **6**, radicais secundário e primário respectivamente, o radical livre centrado no átomo de carbono C está quase no plano formado pelos três átomos diretamente vizinhos, sugerindo que C4 radicalar esteja no estado de hibridização sp^2 . Isto é comprovado pelos valores dos três ângulos de ligação ao redor do átomo de carbono radicalar em **3** ($122,26^\circ$, $119,11^\circ$ e $115,09^\circ$) e em **6** ($118,73^\circ$, $118,21^\circ$ e $118,75^\circ$) conforme a Figura III.5.

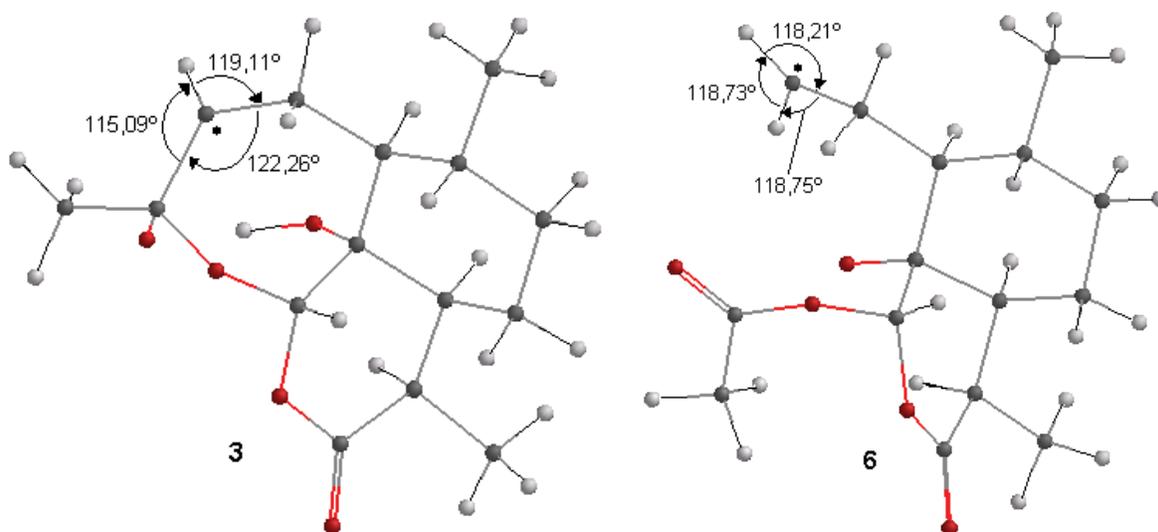


Figura III.5: Ângulos de ligação ao redor do átomo radicalar C4 dos intermediários **3** e **6**.

O comprimento de 1,8 Å é considerado uma ligação hidrogênio forte e isto pode ser percebido no radical secundário **3**, onde a distância entre o hidrogênio ligado a O1 e o átomo O2 é de 1,469 Å de comprimento a nível HF. Considerando que o átomo de H ligado a C4, do radical **1**, é transferido de C4 para O1 através do processo de deslocamento intramolecular do átomo de H, acredita-se que o átomo O2 tenha importante papel durante este processo. A ligação hidrogênio entre o átomo de H ligado a C4 e O2 é frágil no radical primário **6**, com base na distância obtida, pois tem comprimento de ligação de 3,446 Å.

Continuando a rota A, o intermediário epóxido **4** foi proposto por Posner e colaboradores [36,82] como responsável pela atividade parasiticida da artemisinina, devido sua acentuada propriedade de agente alquilante. O anel epóxido do intermediário **4** (Figura III.6) mostra distâncias (HF/6-31G**) de 1,438 Å e 1,386 Å para as ligações C-O, concordando com resultados experimentais onde ligações simples C-O são da ordem de 1,43 Å [83]. O comprimento de ligação C3-C4 é reduzido quando ocorre a passagem do intermediário **3** para o intermediário **4**, com distâncias de 1,532 Å e 1,453 Å respectivamente. O íon Fe, que foi oxidado na primeira etapa do processo, recebe o elétron proveniente do intermediário **3** e é

regenerado neste passo. Este intermediário **4** é formado após a oxidação do radical secundário **3**, o qual perde um elétron. A diferença de energia entre o intermediário radicalar **3** e o intermediário epóxido **4** é de $+3,76 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Tabela III.7). Assim, devido à alta energia, esta espécie **4** provavelmente tem estabilidade intrínseca baixa, o que deve impedir sua participação como um intermediário chave, visto que o epóxido **4** se converte rapidamente para produtos secundários, como por exemplo o intermediário **5** (Figura III.6), através de rearranjos catalisados por ácido.

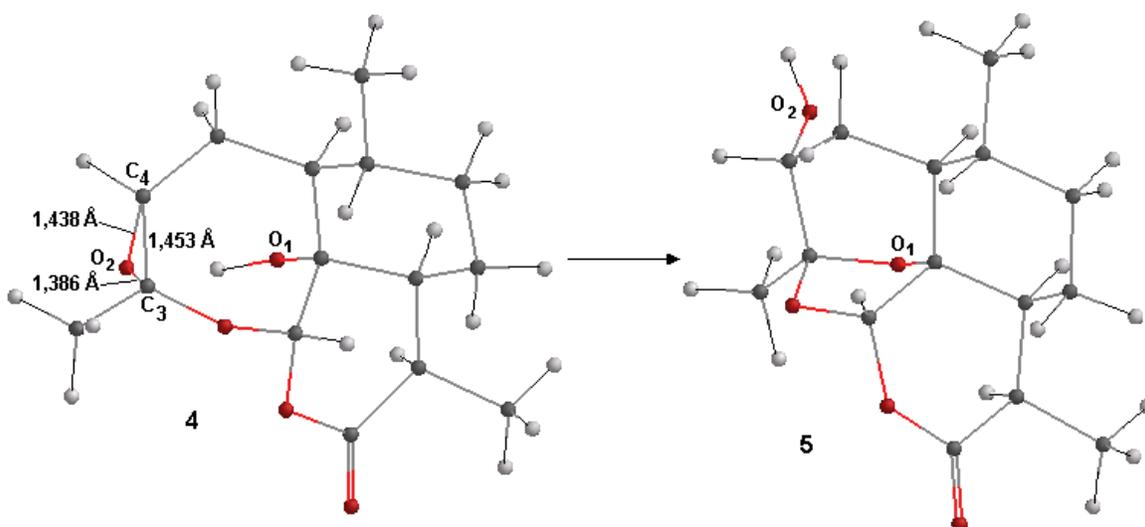


Figura III.6: Conversão do intermediário epóxido **4** para o intermediário **5**.

O intermediário **5**, última estrutura da rota A, é formado pela quebra da ligação O2-C3 do intermediário **4** (Figura III.6), seguida pelo ataque do O1 [39]. O epóxido **4** provavelmente deve ter menor tempo de vida que o intermediário **5**, o que pode ser observado claramente pela análise da Tabela III.7, onde percebe-se que a passagem de **4** para **5** libera $-40,20 \text{ kcal mol}^{-1}$, sendo energeticamente favorável. Avery e colaboradores [84] realizaram uma série de experimentos na tentativa de estabilizar especificamente a forma epóxido, no entanto, não se obteve nenhuma evidência da formação do epóxido durante o processo de rearranjo. Além disso, um epóxido sintético semelhante à estrutura da artemisinina foi encontrado como sendo completamente desprovido de atividade antimalárica,

concluindo assim que compostos sintéticos semelhantes à artemisinina expressam seu efeito antimalárico via os intermediários radicalares de carbono.

Tabela III.7: Diferença de energia (kcal mol^{-1}) entre as estruturas em questão calculada pelo método HF/6-31G**.

Estrutura	Diferença de energia
QHS – 1/2	-22,76
1 – 3	-11,11
3 – 4	+3,76
4 – 5	-40,20
2 – 6	+11,49
6 – 7	-55,67
2 – 7	-44,18
2 – 18	-26,93
2 – 20	-49,42

Continuando a rota B, conforme a Figura III.7, o radical **6**, por oxidação, pode rearranjar-se ao intermediário **7**, o qual possui um anel de tetrahydrofurano, regenerando assim o íon Fe (II). Esta passagem parece ser favorável devido a baixa energia de **7** quando comparada com o intermediário de origem **6**, onde a diferença de energia entre ambos é de $-55,67 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Tabela III.7). Ainda na rota B, conforme a Figura III.8, outra possibilidade para o rearranjo de **2** é a quebra da ligação C3-O13 levando ao ânion radicalar **15**, como proposto por Wu *et al.* [39]. No entanto, após uma série de tentativas para otimizar a geometria do intermediário **15**, primeiramente com o método semi-empírico AM1, este sempre convergia para a forma aberta **19** (Figura III.8). Resultado semelhante foi obtido por Taranto *et al.* [51], onde a carga negativa ($-0,585$) e o elétron radicalar estão preferencialmente localizados em O1 e C12a (densidade de spin no valor de $0,777$), respectivamente.

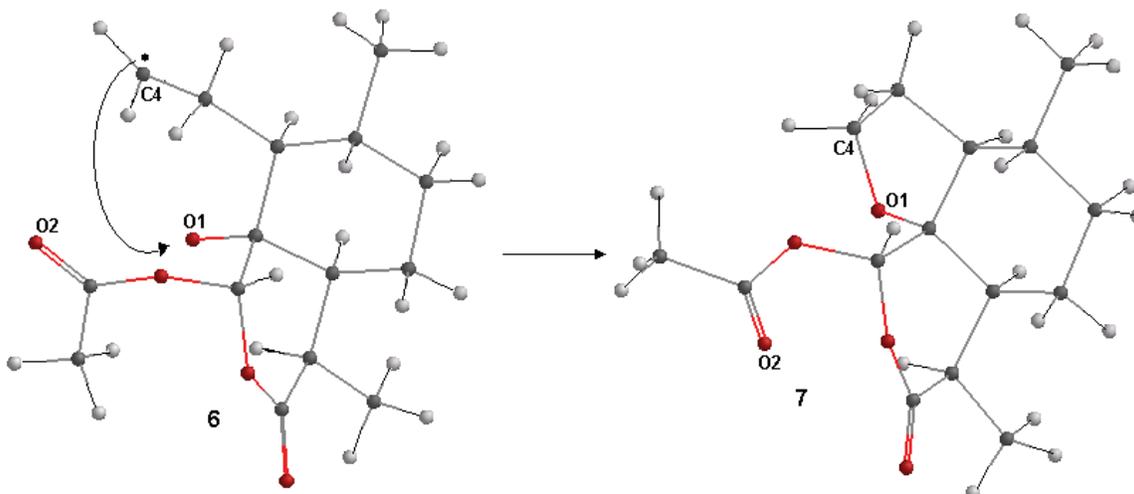


Figura III.7: Rota B: oxidação do radical **6** transformando-se no intermediário **7**.

Este intermediário **15** foi otimizado diretamente com o método HF/6-31G** onde se observou algo diferente, pois foi convertido para a forma **18** com carga negativa de $-0,776$ e $-0,725$ sobre os átomos O11 e O14, respectivamente; já o elétron radicalar está preferencialmente localizado sobre O1, com densidade de spin de 1,030. Sendo assim, a formação do intermediário **20** (Figura III.8) ocorre diretamente de **2** pela quebra sincronizada da ligação C3-O13 e C12-C12a. Observa-se uma diferença de energia entre o radical **2** e o intermediário neutro **20** de $-49,42 \text{ kcal mol}^{-1}$, apresentando ser uma passagem energeticamente favorável. Já outra possibilidade de rearranjo é a conversão do intermediário **15** para **18**, o qual é formado pela quebra da ligação O11-C12.

A diferença de energia entre **2** e o intermediário **18** é de $-26,93 \text{ kcal mol}^{-1}$, sendo menos favorável energeticamente que durante a formação do intermediário **20**, já citado anteriormente. O intermediário **18** não tem as distribuições de carga e densidade de spin como proposto previamente por Wu e colaboradores [39]. De fato, a carga (Tabela III.5) e densidades de spin (Tabela III.6) estão localizadas preferencialmente em O11 (O14) e O1, respectivamente, como proposto por Taranto e colaboradores [51]. Neste intermediário **18** observa-se uma deslocalização da carga negativa entre os átomos O11 e O14, pois a carga

atômica negativa é respectivamente de $-0,787$ e $-0,776$ (Tabela III.5), observando assim que há uma distribuição de carga negativa entre estes dois átomos. Além disto, os comprimentos das ligações C-O11 e C-O14 são $1,242 \text{ \AA}$ e $1,226 \text{ \AA}$ respectivamente, onde ambas as ligações possuem comprimentos intermediários entre uma ligação dupla (cerca de $1,180 \text{ \AA}$) e uma ligação simples (cerca de $1,430 \text{ \AA}$), sendo esta uma característica de deslocalização de carga entre átomos. A ordem de ligação entre C-O11 e C-O14 é de $+0,283$ e $+0,446$ respectivamente, sendo estes valores positivos um indicativo de que estes átomos estão realmente ligados entre si.

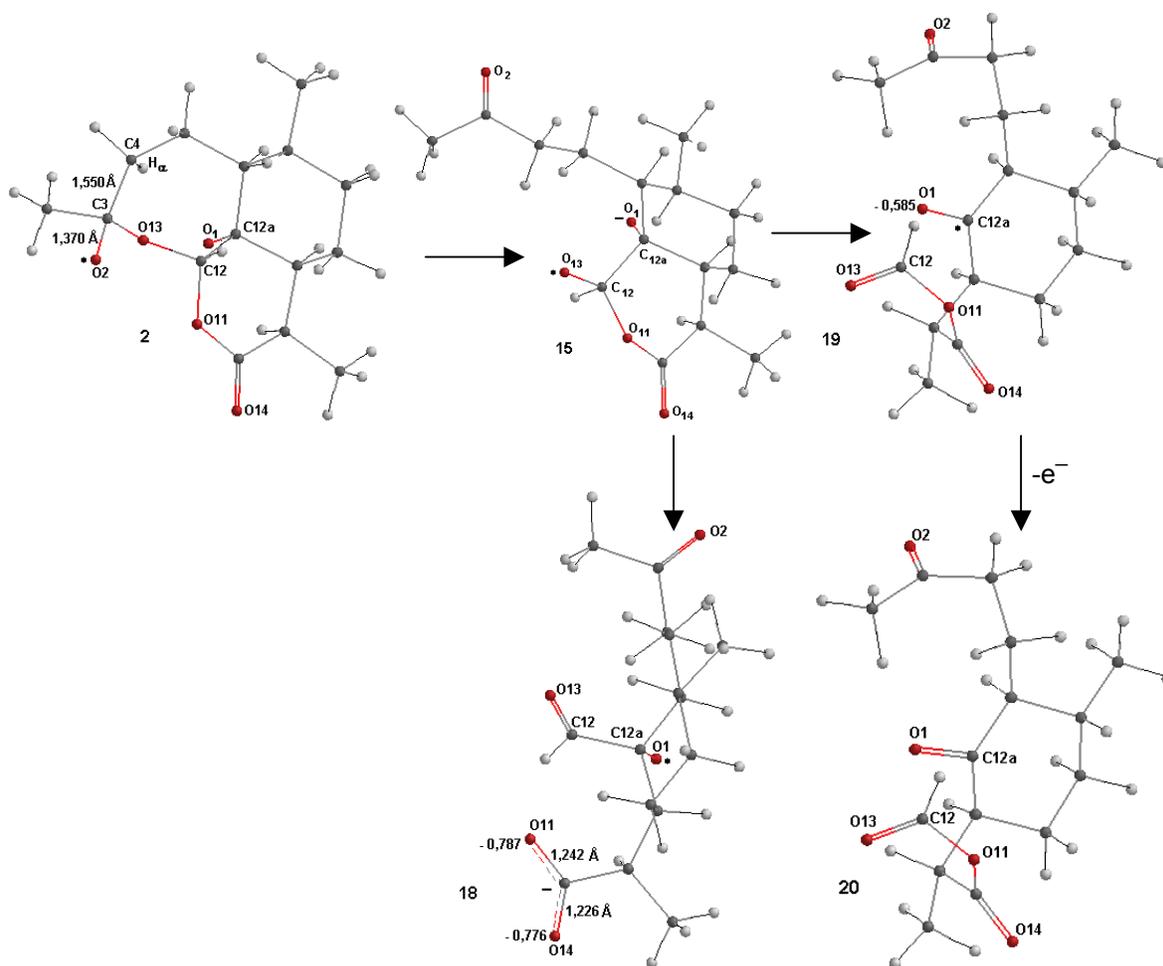


Figura III.8: Caminhos de reação da rota B.

As geometrias dos intermediários neutros e aniônicos foram completamente otimizadas com o método HF/6-31G** e suas energias estão listadas na Tabela III.8. A diferença de energia entre os intermediários **1** e **3** é de $-11,11 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Tabela III.7) e a diferença entre **2** e **6** é de $+11,49 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Tabela III.7). Isto indica que a transferência intramolecular do átomo de H da posição C4 para O1 é preferencial do ponto de vista energético.

Tabela III.8: Energias (hartrees) da artemisinina e dos intermediários em estudo usando o método HF/6-31G**.

Estrutura	Energia
QHS	-955,1028068
1/2	-955,1390839
3	-955,1567920
4	-955,1508010
5	-955,2148682
6	-955,1207691
7	-955,2094819
18	-955,1820043
20	-955,2178437

Entre os ânions radicalares calculados, o intermediário **3** é o mais estável, seguido dos intermediários **1/2** e **6**. A formação do intermediário **3** se deu pela transferência intramolecular do átomo de H ligado a C4 para o átomo O1, no intermediário **1**. Há algumas questões sobre o papel do radical **3** no mecanismo da artemisinina e esta transferência intramolecular do átomo de hidrogênio [39]. Os principais argumentos foram em relação à distância entre o hidrogênio ligado a C4 e o átomo de oxigênio O1 e a conformação do radical **1/2** [39]. A distância interatômica entre o H ligado a C4 e O1 (Figura III.4), usando o conjunto de base 6-31G** a nível HF, é relativamente grande ($2,256 \text{ \AA}$), $0,156 \text{ \AA}$ maior que o valor crítico de $2,1 \text{ \AA}$ sugerido por Jefford e colaboradores [47]. No entanto, a orientação deste átomo de hidrogênio em C4 é favorável para a transferência intramolecular do átomo de H ligado a C4 para o átomo O1 visto que os sete átomos do anel de **1/2** podem assumir a conformação barco. O papel desta transferência

intramolecular foi fortalecido por Cumming e colaboradores, os quais mostraram que esta substituição em C4 modula a atividade antimalárica *in vitro* dos análogos da artemisinina [85]. Grupos alquil substituídos em C4 β , os quais proporcionam a formação do radical em C4, aumentam a atividade antimalárica quando comparado com trioxanos não substituídos em C4, enquanto que substituições em C4 α , as quais impedem a formação do radical em C4, diminuem a eficácia relativa da atividade antimalárica.

A energia do radical secundário **3** é menor que a do radical primário **6**, onde a diferença de energia entre ambos os radicais é de 22,60 kcal mol⁻¹ a nível HF/6-31G**. Esta diferença implica dizer que **3** é mais estável e libera mais energia que **6** durante o processo de formação dos radicais centrados no átomo de carbono. Estudos realizados por Gu e colaboradores [46,86] mostraram que a barreira da energia de ativação para a transferência do átomo de H ligado a C4 para o átomo O1, no intermediário **1**, é menor que o processo de quebra da ligação C-C; no entanto, o radical **6** é mais estável que o **3**. Assim, a velocidade de produção do radical resultante da quebra da ligação C-C deve ser menor.

Quando se analisa as diferenças de energia entre o intermediário **2** e o radical **6** (+11,49 kcal mol⁻¹), observa-se que o radical centrado no átomo de oxigênio **2** é mais estável que o radical centrado no átomo de carbono **6**. Assim, provavelmente ocorre um rearranjo sincronizado do intermediário **2** para o **7**, já que a diferença entre ambos os intermediários é de -44,18 kcal mol⁻¹, sendo portanto uma passagem favorável.

III.1.3-ANÁLISE DAS ENERGIAS LIVRES DE GIBBS DA ARTEMISININA E DE ALGUNS INTERMEDIÁRIOS (25°C)

Na Tabela III.9 estão representadas as energias livres da **QHS** e dos intermediários em estudo (Figura II.2). Como pode ser observado pelos resultados apresentados na Tabela I.10, seguindo a rota A, observa-se que a energia livre cai bruscamente da artemisinina para o intermediário **1/2** (-27,32 kcal mol⁻¹) e de **1** para o radical secundário centrado no átomo de carbono (-12,06 kcal mol⁻¹). Em seguida a energia sobe até o intermediário **4** e, por último, cai novamente para o intermediário **5**. O valor total de energia livre para a rota A (Tabela III.11) mostra que esta passagem é extremamente favorável no sentido de formação do intermediário **5**, já que foi obtido um valor de -70,59 kcal mol⁻¹.

Tabela III.9: Energia Livre de Gibbs (hartrees) da artemisinina e dos intermediários em estudo usando o método HF/6-31G**.

Estrutura	Energia
QHS	-954,756814
1/2	-954,800358
3	-954,819570
4	-954,805431
5	-954,869302
6	-954,825726
7	-954,867501
18	-954,855017
20	-954,887872

Tabela III.10: Diferença de energia livre entre as estruturas.

Estruturas	$\Delta G/\text{kcal mol}^{-1}$
QHS – 1/2	-27,32
1 - 3	-12,06
3 - 4	+8,87
4 - 5	-40,08
2 - 6	-15,92
6 - 7	-26,21
2 - 18	-34,30
2 - 20	-54,92

Analisando a energia livre da rota B para a formação do intermediário **7** observa-se três decaimentos de energia consecutivos, sendo o primeiro da artemisinina para o intermediário **1/2**, como já foi dito anteriormente, o segundo decréscimo de energia ocorre de **2** para o radical primário **6** ($-15,92 \text{ kcal mol}^{-1}$) e por último a energia cai novamente para o intermediário **7**, totalizando para esta rota B um valor de energia livre de $-69,45 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Tabela III.11).

Tabela III.11: Diferença de energia livre total de cada rota em estudo.

Rotas	$\Delta G \text{ Total}/\text{kcal mol}^{-1}$
Rota A	-70,59
Rota B → 7	-69,45
Rota B → 18	-61,62
Rota B → 20	-82,24

Ainda seguindo a rota B no sentido de formação do intermediário **18**, observa-se que esta rota é extremamente favorável com energia livre total de $-61,62 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Tabela III.11). A passagem da artemisinina para o intermediário **20** é extremamente favorável, já que o valor obtido para a energia livre foi de $-82,24 \text{ kcal mol}^{-1}$, onde a energia livre cai de **QHS** para **1/2** e novamente cai bruscamente de **2** para **20**. Nossos resultados, através da análise do diagrama da energia de Gibbs das quatro rotas em estudo (Figura III.9), mostra que as quatro

rotas são termodinamicamente favoráveis, sendo que a rota B que leva ao intermediário 20 é a que possui maior estabilidade.

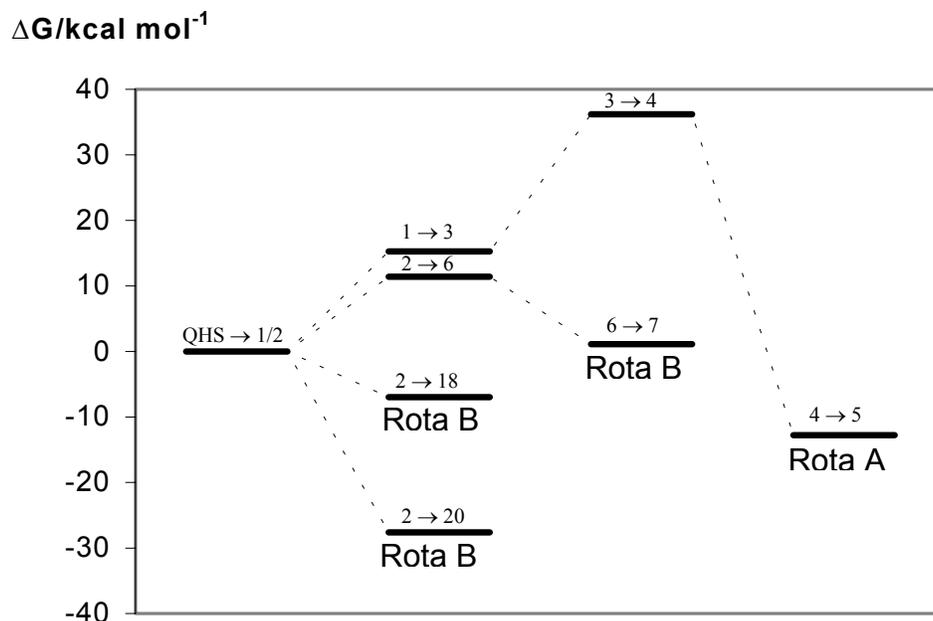


Figura III.9: Diagrama de energia de Gibbs correspondente às quatro rotas em estudo.

Ao analisar as variações de energias livres entre os intermediários **1/2** e **3** e entre **1/2** e **6**, observa-se que a formação do radical primário **6** é preferencial do ponto de vista energético (Tabela III.10). Isto indica que a quebra da ligação C3-C4 no radical **1/2** (Figura III.4) é mais favorável que a transferência intramolecular do átomo de hidrogênio de C4 para O1.

Todos os radicais descritos neste trabalho apresentam estabilidades relativas. Uma ou mais destas espécies devem ser responsáveis pela inibição da degradação da hemoglobina e/ou polimerização do **heme** [87]. Ainda neste trabalho, não se levou em consideração o efeito do íon Fe(II), embora este possa ocupar um papel importante uma vez que tem-se sugerido que no último passo da fragmentação da artemisinina é possível formar espécies de alta valência como

Capítulo III: Resultados e Discussões

O=Fe(IV) [36,88]. Isto tem atraído muita a atenção como uma possível base para a ação parasiticida [28,29,85].

III.1.4-ANÁLISE DA ENERGIA DA BARREIRA DE ROTAÇÃO ENTRE O HEME E A ARTEMISININA

A maior região de carga negativa da artemisinina e seus análogos localiza-se ao redor da ligação peróxido e a maior região de carga positiva do **heme** localiza-se ao redor do íon Fe^{2+} . A intuição química indica que estas duas partes devem interagir quando a artemisinina e derivados se ligam ao **heme**. Isto está de acordo com experimentos relacionados à ação antimalárica da artemisinina, o que revelou que uma série de radicais de oxigênio e carbono foram produzidos através da transferência de elétrons de Fe^{2+} para a ligação peróxido quando a artemisinina interage com o **heme** [39]. Estudos realizados por Tonmunphean e colaboradores [18] mostraram que a interação existente entre a artemisinina e o **heme** ocorre no sentido de interagir o átomo O1 da ligação endoperóxido com o átomo de Fe do **heme**, onde este mecanismo de aproximação é controlado por efeito estérico.

Estudou-se teoricamente a barreira de rotação existente entre a artemisinina e o **heme**. No presente estudo a ligação peróxido da artemisinina foi colocada sobre o átomo de ferro do **heme**. Empregou-se o método semi-empírico PM3 [70], com o auxílio do programa SPARTAN [67], para fazer os cálculos da energia da barreira rotacional entre a droga (**QHS**) e o receptor (**heme**) (Figura III.10). A molécula de oxigênio serviu para ligar o **heme** à artemisinina, a qual foi retirada do banco de dados cristalográficos [88] (QNGHSU03). Para cada ângulo de rotação otimizava-se as geometrias do **heme** e da artemisinina, isto é, a interação existente entre ambos.

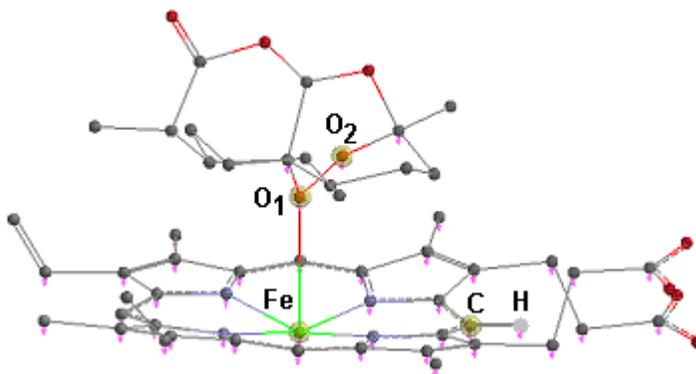


Figura III.10: Interação entre a artemisinina e o **heme**

(ângulo diedro: marcado em amarelo; átomos congelados: marcados em rosa).

Durante os cálculos alguns átomos tanto da artemisinina quanto do **heme** estavam fixados (congelados), conforme a Figura III.10. Para o início das rotações foi escolhido o seguinte ângulo diedro: C-Fe-O1-O2, onde C é o átomo de carbono do grupo **heme**, que está entre os dois grupos propionatos.

Os ângulos de rotação entre a artemisinina e o **heme** foram realizados de 10 em 10° entre os átomos C-Fe-O1-O2 (Figura III.10) com o intuito de investigar qual a posição favorável para ambas as estruturas interagirem. Primeiramente realizaram-se as rotações com intervalos de 10° partindo sempre da estrutura anterior e fazendo cálculo de mecânica-molecular antes da minimização com o método semi-empírico PM3 (Figura III.11).

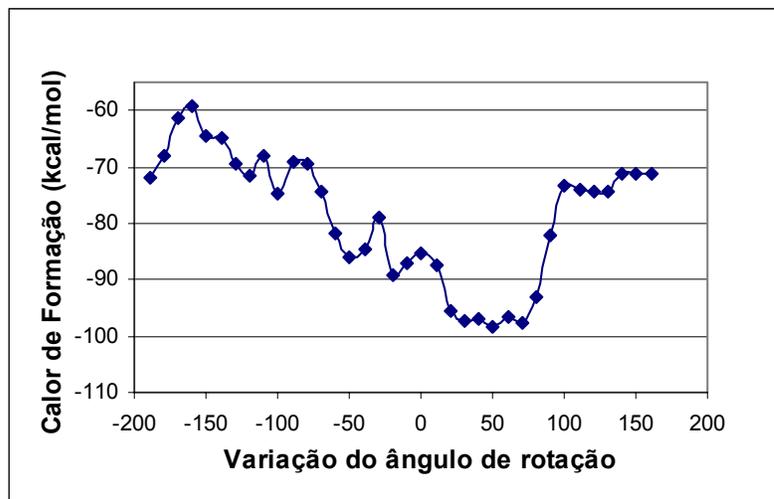


Figura III.11: Barreira rotacional calculada para a interação entre a artemisinina e o **heme**, partindo da estrutura anterior.

A segunda etapa foi realizada girando de 10 em 10° os ângulos de rotação entre a artemisinina e o **heme**, porém utilizando sempre a estrutura inicial, otimizando primeiramente com mecânica-molecular e posteriormente com o método PM3 (Figura III.12).

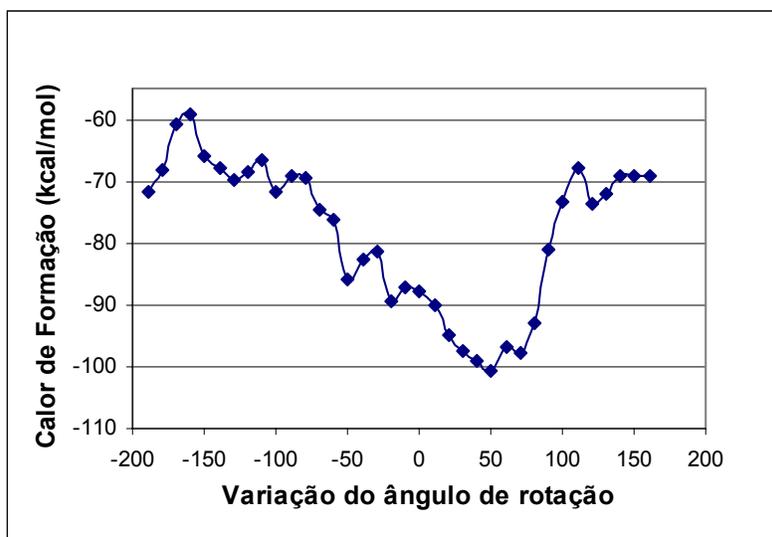


Figura III.12: Barreira rotacional calculada para a interação entre a artemisinina e o **heme**, partindo da estrutura inicial.

Ao comparar ambos os resultados obtidos (Figuras III.11 e III.12) para os diferentes tipos de cálculos observa-se que os mesmos apresentaram resultados semelhantes. Ambas as rotações totalizaram um valor de 36 cálculos para cada, onde todos convergiram normalmente. Entretanto, ao analisar detalhadamente, percebe-se que os resultados do cálculo da barreira rotacional partindo sempre da estrutura inicial (Figura III.12) forneceu menores calor de formação. Esta região de menor energia compreende os ângulos de rotação entre 20,00 a 80,59°. Sendo assim, o segundo procedimento foi adotado para realizar o refinamento da barreira rotacional neste intervalo de rotação, com incrementos em torno de 2,50° (Figura III.13).

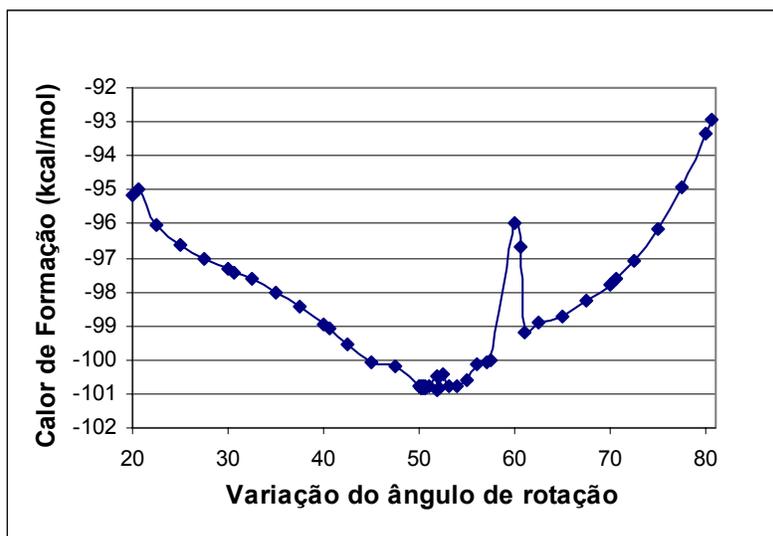


Figura III.13: Barreira rotacional calculada para o intervalo de menor energia de interação existente entre o complexo QHS-**heme**.

Ao analisar os resultados do calor de formação da Figura III.13 observa-se que a interação de menor energia ($\Delta H_f = -100,86 \text{ kcal mol}^{-1}$) existente no complexo QHS-**heme** (Figura III.14) corresponde ao ângulo de rotação de 51,90°.

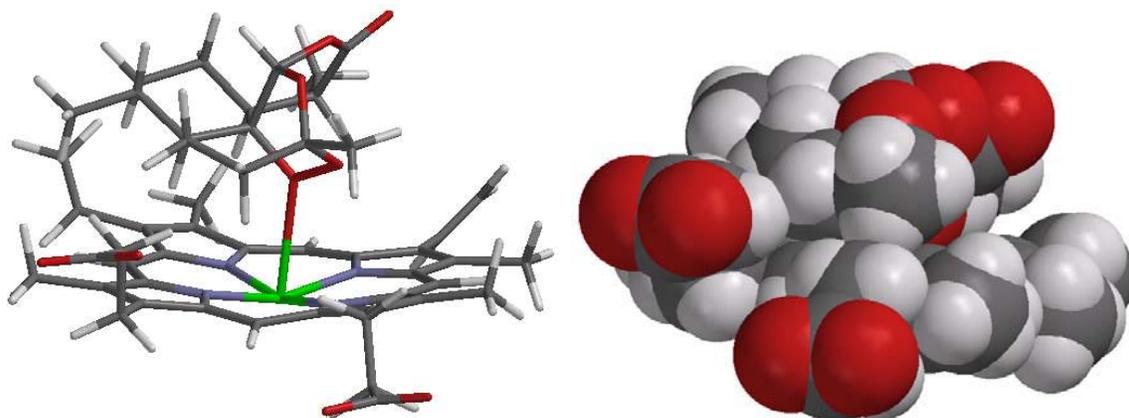


Figura III.14: Interação de menor energia existente entre a artemisinina e o **heme**.

Para que as interações entre um átomo de H de uma ligação C-H e orbitais π sejam efetivas, a distância C-H... π tem que ser no máximo de 3,1 Å [89]. Isto porque uma ligação C-H está em torno de 1,1 Å a 1,2 Å e os raios de van der Waals do átomo de carbono medem aproximadamente de 1,7 Å a 1,8 Å. Com isso, a distância destas interações C-H... π deve ser bem próxima da soma do comprimento de ligação C-H com este raio do átomo de C, ficando entre 2,8 Å a 3,0 Å, com erros de $\pm 0,1$ Å [89]. Estes tipos de interações são importantes em sínteses orgânicas, empacotamentos cristalinos e eventos de caráter biológico, especialmente na hemoglobina onde ocorrem interações entre os aminoácidos e o **heme**. A importância destas interações está relacionada com a estabilidade conferida à hemoglobina.

Na interação de menor energia entre o **heme** e a artemisinina (Figura III.14) observada no estudo em questão, a qual forneceu calor de formação de $-100,86$ kcal mol⁻¹, encontram-se algumas interações C-H... π que estão de acordo com os valores permitidos de 2,0 Å a 3,0 Å (erros de $\pm 0,1$ Å). Foram identificadas 22 interações efetivas entre átomos de H da artemisinina e o anel porfirínico do **heme**. Estas interações ocorreram principalmente entre o átomos de H ligados aos átomos de carbono C9, C8a, C5a, C4 e C7 da **QHS**, além de hidrogênios pertencentes aos grupos metila ligados a C3 e C6 (Figura III.14). Estas interações variam de 2,126 Å a 2,931 Å sendo, portanto, interações efetivas. A interação mais

efetiva ocorre entre o átomo de H ligado ao átomo de carbono C4 da artemisinina (Figura III.14) e um átomo de carbono do anel porfirínico do **heme**, com distância de 2,126 Å. Outra interação mais efetiva ocorre entre o átomo de H da QHS ligado a C5a (Figura III.14) com o anel porfirínico, a uma distância de 2,205 Å. Dados semelhantes foram encontrados em estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa [20], onde se observou que seis átomos de H da artemisinina interagiram com a estrutura planar do **heme** através de interações C-H... π .

Analisando o potencial eletrostático da interação mais estável existente no complexo QHS-**heme** (Figura III.15) dá para se ter uma idéia da distribuição das regiões polares (em vermelho), a qual encontra-se ao redor da ligação peróxido. Esta região, onde possui maior densidade eletrônica (carga negativa parcial ou total), exerce um importante papel na atividade biológica. Isto indica a importância da carga negativa associada com o peróxido para a atividade da artemisinina e análogos, onde o mesmo foi observado em estudos realizados por Woolfrey e colaboradores [90]. Esta região polar na artemisinina é de extrema importância no mecanismo de ação da droga: um impedimento estérico da ligação peróxido influenciaria negativamente a atividade biológica deste fármaco [36,37,81].

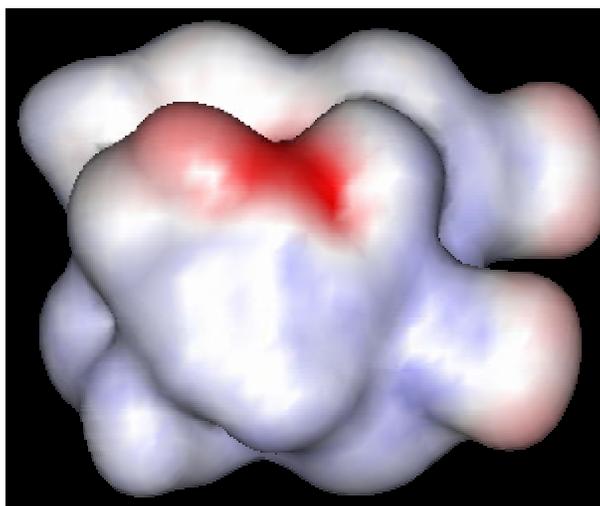


Figura III.15: Representação do potencial eletrostático para a interação de menor energia existente entre a artemisinina e o **heme**.

Os dois grupos propionatos do **heme** são perpendiculares ao anel porfirínico, onde um grupo posicionou-se para cima enquanto que o outro posicionou-se para baixo (Figura III.14). Este resultado difere do estudo feito por Cheng e colaboradores [22], os quais consideraram a flexibilidade destes grupos, onde ambos os grupos se posicionaram para cima. Entretanto, Shukla e colaboradores [52] não consideraram a flexibilidade das cadeias laterais do **heme** durante a simulação da interação QHS-**heme**, semelhante ao estudo em questão.

Ainda neste trabalho de estudo da interação QHS-**heme** considerou-se a flexibilidade das cadeias de éster e éter da artemisinina, o que favorece melhor interação entre a droga e o receptor **heme**. A orientação da artemisinina com relação ao **heme** exibe boa regularidade quando observada no estudo conformacional usando o método semi-empírico PM3: as partes polares e hidrofóbicas (grupos metil) da droga estão respectivamente direcionadas para as partes polares (área central Fe-N) e hidrofóbicas (grupos metil e etil) do receptor **heme** (Figura III.16). Os resultados obtidos por este estudo em questão forneceram resultados confiáveis devido, durante os cálculos de otimização de geometria, somente alguns átomos tanto da artemisinina quanto do **heme** estarem fixados (congelados), conforme a Figura II.5. Basicamente somente o anel da porfirina e quatro átomos da artemisinina foram fixados.

Estudos da interação **heme**-QHS realizados por nosso grupo de pesquisa [20] forneceram resultados diferentes, isto é, a região polar da artemisinina (ligação peróxido) interage com um dos grupos propionatos do **heme** (parte polar) (Figura III.16). Esta diferença de resultados está relacionada com a diferença dos métodos de cálculos, onde o anel porfirínico do **heme** permaneceu fixo; os grupos metil e vinil, um dos grupos propionato do **heme**, bem como a artemisinina, permaneceram livres durante a otimização de geometria utilizando mecânica molecular.

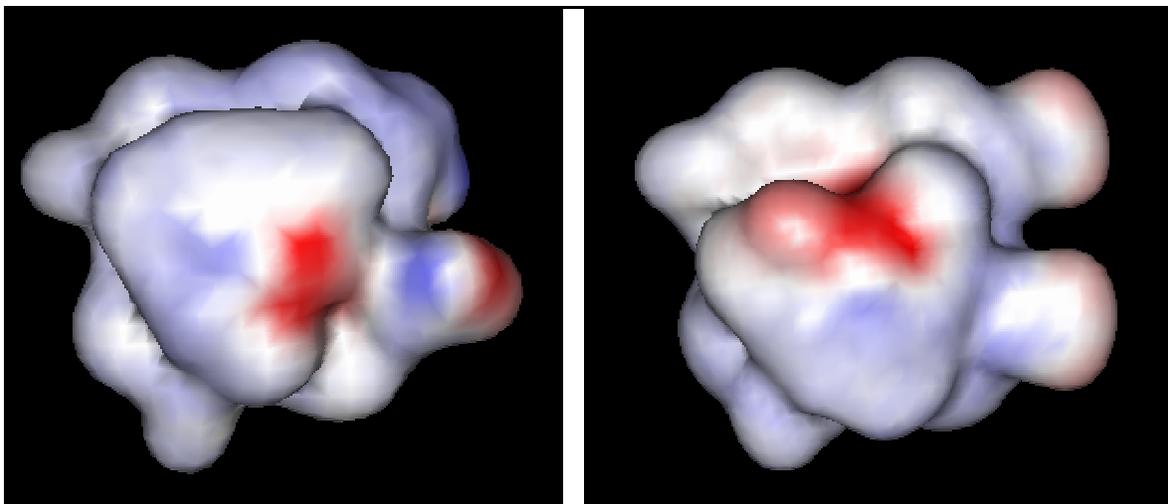


Figura III.16: Potencial eletrostático para a interação de menor energia existente entre a artemisinina e o **heme**. Esquerda: potencial eletrostático obtido por nosso grupo de pesquisa [20]. Direita: potencial eletrostático obtido por este estudo.

Devido os grupos propionatos do **heme** estarem fixados durante os cálculos em questão, não se observou interações efetivas entre os átomos de oxigênio destes grupos com os átomos de hidrogênio da artemisinina. Este resultado é semelhante ao obtido por Shukla e colaboradores [52], os quais também não consideraram a flexibilidade dos grupos laterais do **heme**. Estes resultados diferiram daqueles observados por Cheng e colaboradores [22], os quais levaram em consideração a flexibilidade das cadeias laterais do **heme**. Cheng *et al.* [22] obtiveram interação hidrogênio entre o átomo de H ligado a C4 da **QHS** e um átomo de oxigênio do **heme**.

III.2-CONCLUSÕES

Baseado nas energias eletrônicas dos intermediários da artemisinina observa-se que a transferência do átomo de hidrogênio de C4 para o oxigênio O1 no radical **1** para produzir o intermediário **3** é mais favorável que aquele produzido pela quebra da ligação C3-C4 para produzir o radical primário **6**, conforme estudos feitos por Gu e colaboradores [86]. Estes estudos realizados por Gu *et al* foram feitos utilizando o método B3LYP/6-31G** e o 6,7,8-trioxibiciclo[3,2,2]nonano, que é um modelo parcial dos intermediários radicalares da artemisinina. Os cálculos deste trabalho em questão foram conduzidos utilizando o método HF/6-31G**. Isto mostra que, mesmo não usando correlação eletrônica neste trabalho, os cálculos foram eficientes para prever estas rotas de reação da artemisinina, quando comparados com aqueles apresentados por Gu *et al* [86], os quais usaram correlação eletrônica.

Ainda analisando a decomposição da **QHS** observa-se que a formação do radical secundário centrado no átomo de carbono libera $-11,11 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Tabela III.7), enquanto que ocorre absorção de $+11,49 \text{ kcal mol}^{-1}$ para a formação do radical primário **6**. Quando analisa-se a Energia Livre de Gibbs dos intermediários observa-se o contrário, onde a quebra da ligação C3-C4 para a formação do radical primário **6** é preferencial energeticamente, com liberação de $-15,92 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Tabela III.10). Já a transferência intramolecular do átomo de H de C4 para O1, para a formação do radical secundário **3**, ocorre com a liberação de $-12,06 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Tabela III.10).

Fazendo uma análise da estabilidade energética dos intermediários das quatro rotas em estudo observa-se, através da análise das energias eletrônicas e livres, que os intermediários finais de cada rota são os mais estáveis. Analisando ambas as energias, eletrônicas (Tabela III.8) e livres (Tabela III.9), tem-se que o intermediário **20** é o mais estável, seguido dos intermediários **5**, **7** e **18** respectivamente.

Através da análise das energias eletrônicas observa-se que o saldo energético final da rota A é de $-70,31 \text{ kcal mol}^{-1}$, pois nesta rota ocorre a

Capítulo III: Conclusões

passagem de **QHS** para **1**, liberando $-22,76 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Tabela III.7), deste para **3**, liberando $-11,11 \text{ kcal mol}^{-1}$, do intermediário **3** para o **4** ocorre absorção de $+3,76 \text{ kcal mol}^{-1}$ e na última etapa desta rota, com a transformação do intermediário **4** para o **5**, ocorre liberação de $-40,20 \text{ kcal mol}^{-1}$, totalizando $-70,31 \text{ kcal mol}^{-1}$. Analisando a rota B, o saldo energético final para a formação do intermediário **7** é de $-66,94 \text{ kcal mol}^{-1}$, pois de **QHS** para **2** libera $-22,76 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Tabela III.7), de **2** para **6** ocorre absorção de $+11,49 \text{ kcal mol}^{-1}$ e durante a passagem de **6** para **7** tem-se uma etapa energeticamente favorável, com a liberação de $-55,67 \text{ kcal mol}^{-1}$. A formação do intermediário **18** libera $-49,69 \text{ kcal mol}^{-1}$, pois tem liberação de $-22,76 \text{ kcal mol}^{-1}$ durante a passagem de **QHS** para **2**, e deste para o **18** libera mais $-26,93 \text{ kcal mol}^{-1}$, totalizando $-49,69 \text{ kcal mol}^{-1}$. O último caminho da rota B é a formação do intermediário **20**, onde o saldo energético final para a formação deste é de $-72,18 \text{ kcal mol}^{-1}$, levando em consideração a passagem de **QHS** para **2** e deste para o **20**. Assim, após a análise energética destas rotas, conclui-se que a rota que leva à formação do intermediário **20** é a preferencial do ponto de vista energético, com a liberação de $-72,18 \text{ kcal mol}^{-1}$, além de gerar o intermediário mais estável.

Analisando a energia livre total de todas as rotas observa-se que esta energia cai bruscamente principalmente na rota B, para a formação do intermediário **20**, com ΔG_T de $-82,24 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Tabela III.11). Assim, através da análise das energias livres conclui-se que a formação do intermediário **20** também é o mais energeticamente favorável, como observado na análise das energias eletrônicas. Isto leva-nos a concluir que a decomposição redutiva da artemisinina segue preferencialmente, do ponto de vista energético, a rota B \rightarrow **20**. Não há na literatura estudos dando ênfase a esta rota reacional, porém com certeza é um importante caminho a ser seguido pela **QHS**. A clara elucidação da decomposição da artemisinina facilitará a descoberta de novas drogas antimaláricas similares mais eficientes.

A segunda etapa deste estudo foi investigar a interação entre a droga (artemisinina) e o receptor(**heme**). Após o estudo teórico da interação existente entre a artemisinina e o **heme**, usando o método semi-empírico PM3, chegou-se a

Capítulo III: Conclusões

conclusão de que as interações mais efetivas entre átomos de H da artemisinina e o anel porfirínico do **heme** ocorrem entre o átomos de H ligados aos átomos de carbono C9, C8a, C5a, C4 e C7 da **QHS** (Figura III.14). Estas interações variam de 2,126 Å a 2,931 Å sendo, portanto, interações efetivas. Dados semelhantes foram encontrados em estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa [20], onde se observou que seis átomos de H da artemisinina interagiram com a estrutura planar do **heme** através de interações C-H... π . Esta interações são importantes, especialmente no **heme** onde ocorre interações aminoácidos na hemoglobina, pois está relacionada com a estabilidade conferida aos complexos. Assim, todas estas interações existentes estabilizam a estrutura do complexo droga–receptor (Figura III.10) fazendo com que a atividade da droga seja mais efetiva durante sua ação no meio biológico.

A parte polar da artemisinina, que compreende a região na qual se encontram os átomos de oxigênio da mesma, está do lado oposto do grupo propionato do **heme**, o que está de acordo com os conhecimentos químicos. O mesmo foi encontrado em estudos realizados por Cheng e colaboradores [22], onde ambos os grupos carregados eletronegativamente ficaram em lados opostos.

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. The World Health Report 2002: reducing risks, promoting healthy life. Geneva, World Health Organization (WHO), **2002**.
2. www.estadao.com.br/ciencia/noticias/2002/jul/12/16.htm
(Acessado em 25/09/2003).
3. Bowman, S.; Lawson, D.; Brown, D.; Chillingworth, T.; Churcher, C. M.; Craig, A.; Davies, R. M.; Devlin, K.; Squares, R.; Squares, S.; Sulston, J. E.; Whitehead, S.; Woodward, J. R.; Newbold, C.; Barrell, B. G. The Complete Nucleotide Sequence of Chromosome 3 of *Plasmodium falciparum*, *Nature*, 400, 532-538, **1999**.
4. Rey, L. *Bases da Parasitologia Médica*, Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro-R.J., **1992**.
5. http://www.rbm.who.int/cmc_upload/0/000/015/372/RBMInfosheet_1.htm
(Acessado em 29/09/2003).
6. <http://whyfiles.org/016skeeter/3.html> (Acessado em 29/09/2003).
7. O'Neill, P. M.; Bray, P. G.; Hawley, S. R.; Ward, S. A.; Park, B. K. 4-Aminoquinolines – Past, Present, and Future: A Chemical Perspective, *Pharmacology & Therapeutics*, 77, 29-58, **1998**.
8. Robert, A.; Dechy-Cabaret, O.; Cazelles, J.; Meunier, B. From Mechanistic Studies on Artemisinin Derivatives to New Modular Antimalarial Drugs, *Accounts of Chemical Research*, 35, 167-174, **2002**.
9. www.malarianet.hpg.ig.com.br (Acessado em 25/09/2003).

Referências Bibliográficas

10. Francis, S. E.; Sullivan, D. J.; Goldberg, D. E. Hemoglobin Metabolism in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*, *Annual Review of Microbiology*, 51, 97-123, **1997**.
11. Slater, A. F. G. Chloroquine Mechanism of Drug Action and Resistance in *Plasmodium falciparum*, *Pharmacology & Therapeutics*, 57, 203-235, **1993**.
12. <http://www.people.virginia.edu/~rjh9u/hemoglob.html>
(Acessado em 25/09/2003).
13. Slater, A. F. G.; Swiggard, W. J.; Orton, B. R.; Flitter, W. D.; Goldberg, D. E.; Cerami, A.; Henderson, G. B. An Iron-Carboxylate Bond Links the Heme Units of Malaria Pigment, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88, 325-329, **1991**.
14. Moore, D. V.; Lanier, J. E. Observations on Two *Plasmodium falciparum* Infections with an Abnormal Response to Chloroquine, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 10, 5-9, **1961**.
15. Mockenhaupt, F. P. Mefloquine Resistance in *Plasmodium falciparum*, *Parasitology Today*, 11, 248-254, **1995**.
16. Klayman, D. L. Qinghaosu (Artemisinin): an Antimalarial Drug from China, *Science*, 228, 1049-1055, **1985**.
17. China Cooperative Research Group on Qinghaosu and Its Derivatives as Antimalarials, Chemical Studies on Qinghaosu (Artemisinin), *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2, 3-8, **1982**.
18. Tonmunpuean, S.; Parasuk, V.; Kokpol, S. Automated Calculation of Docking of Artemisinin to Heme, *Journal of Molecular Modeling*, 7, 26-33, **2001**.

Referências Bibliográficas

19. Pinheiro, J. C.; Ferreira, M. M. C., Romero, O. A. S. Antimalarial activity of dihydroartemisinin derivatives against *P. falciparum* resistant to mefloquine: a quantum chemical and multivariate study, *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, 572, 35-44, **2001**.
20. Pinheiro, J. C.; Kiralj, R.; Ferreira, M. M. C. Artemisinin Derivatives with Antimalarial Activity against *Plasmodium falciparum* Designed with the aid of Quantum Chemical and Partial Least Squares Methods, *QSAR & Combinatorial Science*, 22, 830-842, **2003**.
21. Tonmunphean, S.; Parasuk, V.; Kokpol, S. QSAR Study of Antimalarial Activities and Artemisinin-Heme Binding Properties Obtained from Docking Calculations, *Quantitative Structure Activity Relationships*, 19, 475-483, **2000**.
22. Cheng, F.; Shen, J.; Luo, X.; Zhu, W.; Gu, J.; Ji, R.; Jiang, H.; Chen, K. Molecular Docking and 3-D-QSAR Studies on the Possible Antimalarial Mechanism of Artemisinin Analogues, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10, 2883-2891, **2002**.
23. Avery, M. A.; Alvim-Gaston, M.; Rodrigues, C. R.; Barreiro, E. J.; Cohen, F. E.; Sabnis, Y. A.; Woolfrey, J. R. Structure-Activity Relationships of the Antimalarial Agent Artemisinin. 6. The Development of Predictive In Vitro Potency Models Using CoMFA and HQSAR Methodologies, *Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 292-303, **2002**.
24. Grigorov, M.; Weber, J.; Tronchet, J. M. J.; Jefford, C. W.; Milhous, W. K.; Maric, D. A QSAR Study of the Antimalarial Activity of Some Synthetic 1,2,4-Trioxanes, *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 37, 124-130, **1997**.

Referências Bibliográficas

25. http://www.cpqba.unicamp.br/plmed/imagsemana/imagem_do_mes.htm
(Acessado em 29/09/2003).
26. Krungkrai, S. R.; Yuthavong, Y. The Antimalarial Action on *Plasmodium falciparum* of Qinghaosu and Artesunate in Combination with Agents wich Modulate Oxidant Stress, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81, 710-714, **1987**.
27. Jefford, C. W.; Vicente, M. G. H.; Jacquier, Y. Favarger, F.; Mareda, J.; Millasson-Schmidt, P.; Brunner, G.; Burger, U. The Deoxygenation and Isomerization of Artemisinin and Artemether and Their Relevance to Antimalarial Action, *Helvetica Chimica Acta*, 79, 1475-1487, **1996**.
28. Cumming, J. N.; Ploypradith, P.; Posner, G. H. Antimalarial Activity of Artemisinin (Qinghaosu) and Related Trioxanes: Mechanism(s) of Action, *Advances in Pharmacology*, 37, 253-297, **1997**.
29. Meshinik, S. R.; Taylor, T. E.; Kamchonwongpaisan, S. Artemisinin and the Antimalarial Endoperoxides: from Herbal Remedy to Targeted Chemotherapy, *Microbiological Reviews*, 60, 301-315, **1996**.
30. Robert, A.; Cazelles, J.; Meunier, B. Characterization of the Alkylation Product of Heme by the Antimalarial Drug Artemisinin, *Angewandte Chemie - International Edition*, 40, 1954-1957, **2001**.
31. Haynes, R. K.; Pai, H. H.-O.; Voerste, A. Ring Opening of Artemisinin (Qinghaosu) and Dihydroartemisinin and Interception of the Open Hydroperoxides with Formation of N-Oxides - A Chemical Model for Antimalarial Mode of Action, *Tetrahedron Letters*, 40, 4715-4718, **1999**.

Referências Bibliográficas

32. Cazelles, J.; Robert, A.; Meunier, B. Alkylation of Heme by Artemisinin, an Antimalarial Drug, *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie II Fascicule C - Chimie*, 4, 85-89, **2001**.
33. Cazelles, J.; Robert, A.; Meunier, B. Alkylating Capacity and Reaction Products of Antimalarial Trioxanes after Activation by a Heme Model, *Journal of Organic Chemistry*, 67, 609-619, **2002**.
34. Eckstein-Ludwig, U.; Webb, R. J.; van Goethem, I. D. A.; East, J. M.; Lee, A. G.; Kimura, M.; O'Neill, P. M.; Bray, P. G.; Ward, S. A.; Krishna, S. Artemisinins Target the SERCA of *Plasmodium falciparum*, *Nature*, 424, 957-961, **2003**.
35. Haynes, R. K.; Monti, D.; Taramelli, D.; Basilico, N.; Parapini, S.; Olliaro, P. Artemisinin Antimalarials Do Not Inhibit Hemozoin Formation, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 1175, **2003**.
36. Posner, G. H.; Cummings, J. N.; Ploypradith, P.; Oh, C. H. Evidence for Fe(IV)=O in the Molecular Mechanism of Action of the Trioxane Antimalarial Artemisinin, *Journal of the American Chemical Society*, 117, 5885-5886, **1995**.
37. Posner, G. H.; Oh, C. H.; Wang, D.; Gerena, L.; Milhous, W. K.; Meshnick, S. R.; Asawamahasadka, W. Mechanism-Based Design, Synthesis, and in *Vitro* Antimalarial Testing of New 4-Met hy lated Trioxanes Structurally Related to Artemisinin: The Importance of a Carbon-Centered Radical for Antimalarial Activity, *Journal of Medicinal Chemistry*, 37, 1256-1258, **1994**.
38. Wang, D.-Y.; Wu, Y.-L. A Possible Antimalarial Action Mode of Qinghaosu (Artemisinin) Series Compound. Alkylation of Reduced Glutathione by C-Centered Primary Radicals Produced from Antimalarial Compound Qinghaosu and 12-(2,4-Dimethoxyphenyl)-12-Deoxoqinghaosu, *Chemical Communications*, 2193-2194, **2000**.

Referências Bibliográficas

39. Wu, W.-M.; Wu, Y.; Wu, Y.-L.; Yao, Z.-J.; Zhou, C.-M.; Li, Y.; Shan, F. Unified Mechanistic Framework for the Fe(II)-Induced Cleavage of Qinghaosu and Derivatives/Analogues. The First Spin-Trapping Evidence for the Previously Postulated Secondary C-4 Radical, *Journal of the American Chemical Society*, 120, 3316-3325, **1998**.
40. Jefford, C. W.; Favarger, F.; Vicente, M. G. H.; Jacquier, Y. The Decomposition of *Cis*-Fused Cyclopenteno-1,2,4-Trioxanes Induced by Ferrous Salts and Some Oxophilic Reagents, *Helvetica Chimica Acta*, 78, 452-458, **1995**.
41. Robert, A.; Meunier, B. Is Alkylation the Main Mechanism of Action of the Antimalarial Drug Artemisinin, *Chemical Society Reviews*, 27, 273-279, **1998**.
42. Lee, I.-S.; Hufford, C. D. Metabolism of Antimalarial Sesquiterpene Lactones, *Pharmacology & Therapeutics*, 48, 345-355, **1990**.
43. Robert, A.; Meunier, B. Characterization of the First Covalent Adduct between Artemisinin and a Heme Model, *Journal of the American Chemical Society*, 119, 5968-5969, **1997**.
44. Robert, A.; Meunier, B. Alkylating Properties of Antimalarial Artemisinin Derivatives and Synthetic Trioxanes when Activated by a Reduced Heme Model, *Chemistry – A European Journal*, 4, 1287-1296, **1998**.
45. White, N. J. Assessment of the Pharmacodynamic Properties of Antimalarial Drugs *In Vivo*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41, 1413-1422, **1997**.
46. Gu, J. D.; Chen, K. X.; Jiang, H. L.; Leszczynski, J. A Model Molecule Study of the O-Centered and the C-Centered Free Radical Intermediates of Artemisinin, *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, 491, 57-66, **1999**.

Referências Bibliográficas

47. Jefford, C. W.; Kohmoto, S.; Jaggi, D.; Timari, G.; Rossier, J. C.; Rudaz, M.; Barbuzzi, O.; Gerard, D.; Burger, U.; Kamalaprija, P.; Mareda, J.; Bernardinelli, G.; Manzanares, I.; Canfield, C. J.; Fleck, S. L.; Robinson, R. L.; Peters, W. Synthesis, Structure, and Antimalarial Activity of Some Enantiomerically Pure, Cis-Fused Cyclopenteno-1,2,4-Trioxanes, *Helvetica Chimica Acta*, 78, 647-662, **1995**.
48. Jefford, C. W.; Velarde, J. A.; Bernardinelli, G.; Bray, D. H.; Warhurst, D. C.; Milhous, W. K. Synthesis, Structure, and Antimalarial Activity of Tricyclic 1,2,4-Trioxanes Related to Artemisinin, *Helvetica Chimica Acta*, 76, 2775, **1993**.
49. Thomson, C.; Cory, M.; Zerner, M. Theoretical Studies of Some New Anti-Malarial Drugs, *International Journal of Quantum Chemistry: Quantum Biology Symposium*, 18, 231-245, **1991**.
50. Bernardinelli, G.; Jefford, C. W.; Maric, D.; Thomson, C.; Weber, J. Computational Studies of the Structures and Properties of Potential Antimalarial Compounds Based on the 1,2,4-Trioxane Ring Structure. I. Artemisinin-like Molecules, *International Journal of Quantum Chemistry: Quantum Biology Symposium*, 21, 117-131, **1994**.
51. Taranto, A. G.; Carneiro, J. W. M.; Oliveira, F. G.; Araújo, M. T.; Correa, C. R. The Role of C-Centered Radicals on the Mechanism of Action of Artemisinin, *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, 580, 207-215, **2002**.
52. Shukla, K. L.; Gund, T. M.; Meshnick, S. R. Molecular Modeling Studies of the Artemisinin (Qinghaosu)-Hemin Interaction: Docking between the Antimalarial Agent and its Putative Receptor, *Journal of Molecular Graphics*, 13, 215-222, **1995**.

Referências Bibliográficas

53. Protein Data Bank, The Rutgers State University, Piscataway, NJ.
<http://www.rcsb.org/pdb/>
54. Chen, H. Y.; Chen, Y.; Zhu, S. M.; Bian, N. S.; Shan, F.; Li, Y. Decomposition Mechanism of an Artemisinin-Type Compound via Hemin-Electrocatalysis, *Talanta*, 48, 143-150, **1999**.
55. Szabo, A.; Ostlund, N. S. *Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*, McGraw-Hill, New York, **1989**.
56. Jensen, F. *Introduction to Computational Chemistry*, John Wiley & Sons, New York, **1999**.
57. Clark, T. *A Handbook of Computational Chemistry*, John Wiley & Sons, New York, **1985**.
58. Levine, I. N. *Quantum Chemistry*, Prentice-Hall, New Jersey, **1991**.
59. Roothaan, C. C. J. New Development in Molecular Orbital Theory, *Reviews of Modern Physics*, 23, 69-89, **1951**.
60. Kowalski, B. R. *Chemometrics Mathematics and Statistics in Chemistry*, D. Publishing Company, Dordrecht, Holland, **1984**.
61. Beebe, K. R.; Pell, R. J.; Seasholtz, M. B. *Chemometrics: A Practical Guide*, John Wiley & Sons, New York, **1998**.
62. Wold, S.; Esbensen, K.; Geladi, P. "Principal Component Analysis". *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2, 37-52, **1987**.

Referências Bibliográficas

63. Golub, G. H.; Van Loan, C. F. *Matrix Computations*, The Johns Hopkins University Press, London, **1989**.
64. Ferreira, M. M. C.; Antunes, A. M.; Melgo, M. S.; Volpe, P. L. O. Quimiometria I: Calibração Multivariada, Um Tutorial, *Química Nova*, **22**, 724-731, **1999**.
65. Lisgarten, J. N.; Potter, B. S.; Bantuzeko, C.; Palmer, R. A. Structure, Absolute Configuration, and Conformation of the Antimalarial Compound, Artemisinin, *Journal of Chemical Crystallography*, **28**, 539-543, **1998**.
66. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, Jr., J. A.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clliford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Baboul, A. G.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nakayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Gonzalez, C.; Head- Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A. GAUSSIAN 98 - Revision A.11; Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, **2001**.
67. A) Hehre, W. J.; Burke, L. D.; Shusterman, A. J.; Huang, W. W.; Pietro, W. J. *Spartan 4.0*, Wavefunction, Inc., **1995**. B) Hehre, W. J.; Deppmeier, B. J.; Klunzinger, P. H.; Yu, J.; Lou, L. *PC Spartan Pro*, Wavefunction, Inc., **1999**. C) Hehre, W. J.; Klunzinger, P. H.; Yu, J.; Lou, L. *TITAN*, Wavefunction, Inc. and Shrodinger, Inc., **1999**.
68. Titan; version 1; Wavefunction; Inc.; Irvine, **2000**.

Referências Bibliográficas

69. Dewar, M. J. S.; Zoebish, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. P. P. Development and Use of Quantum-Mechanical Molecular-Models. 76. AM1 – A New General Purpose Quantum Mechanical Molecular Model, *Journal of the American Chemical Society*, 107, 3902-3909, **1985**.
70. Stewart, J. J. P. Optimization of Parameters for Semiempirical Methods .I. Method, *Journal of Computational Chemistry*, 10, 209-220, **1989**.
71. Glusker, J. P.; Lewis, M.; Rossi, M. *Crystal Structure Analysis for Chemists and Biologists*, VCH Plublishers, New York, **1994**.
72. Infometrix, Inc.; Pirouette 3.01, Woodinville, WA, **2001**.
73. Stevens, W. J.; Basch, H.; Krauss, M. Compact Effective Potentials and Efficient Shared-Exponent Basis Sets for the First- and Second-Row Atoms, *Journal of Chemical Physics*, 81, 6026-6033, **1984**.
74. Stevens, W. J.; Krauss, M.; Basch, H.; Jasien, P. G. Relativistic Compact Effective Potentials and Efficient, Shared-Exponent Basis Sets for the Third-, Fourth-, and Fifth-Row Atoms, *Canadian Journal of Chemistry*, 70, 612-630, **1992**.
75. Cundari, T. R.; Stevens, W. J. Effective Core Potential Methods for the Lanthanides, *Journal of Chemical Physics*, 98, 5555-5565, **1993**.
76. Breneman, C. M.; Wiberg, K. B. Determining Atom-Centered Monopoles from Molecular Electrostatic Potentials. The Need for High Sampling Density in Formamide Conformational Analysis, *Journal of Computational Chemistry*, 11, 361-373, **1990**.

Referências Bibliográficas

77. Mulliken, R. S. Electronic Population Analysis on LCAO-MO Molecular Wave Functions. I, *Journal of Chemical Physics*, 23, 1833-1840, **1955**.
78. Matlab, Mathworks Inc., Natick, M. A., **1998**.
79. Gu, J.; Chen, K.; Jiang, H.; Chen, J. Z.; Ji, R. A DFT Study of Artemisinin and 1,2,4-Trioxane, *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, 459, 103-111, **1999**.
80. Gu, J.; Chen, K.; Jiang, H.; Zhu, W. L.; Chen, J. Z.; Ji, R. A Quantum Chemistry Study of Qinghaosu, *Chemical Physics Letters*, 277, 234-238, **1997**.
81. Posner, G. H.; Oh, C. H. A Regiospecifically Oxygen-18 Labeled 1,2,4-Trioxane: A Simple Chemical Model System to Probe the Mechanism(s) for the Antimalarial Activity of Artemisinin (Qinghaosu), *Journal of the American Chemical Society*, 114, 8328-8329, **1992**.
82. Posner, G. H.; Park, S. B.; González, L.; Wang, D.; Cumming, J. N.; Klinedinst, D.; Shapiro, T. A.; Bachi, M. D. Evidence for the Importance of High-Valent Fe=O and of a Diketone in the Molecular Mechanism of Action of Antimalarial Trioxane Analogs of Artemisinin, *Journal of the American Chemical Society*, 118, 3537-3538, **1996**.
83. Orpen, A. G.; Brammer, L.; Allen, F. H.; Kennard, O.; Watson, D. G.; Taylor, R. Tables of Bond Lengths determined by X-Ray and Neutron Diffraction. Part 2. Organometallic Compounds and Co-ordination Complexes of the d- and f-Block Metals, *Journal of the Chemical Society - Dalton Transactions*, 12, S1-S83, **1989**.
84. Avery, M. A.; Fan, P.; Karle, J. M.; Bonk, J. D.; Miller, R.; Goins, D. K. Structure-Activity Relationships of the Antimalarial Agent Artemisinin. 3. Total

Referências Bibliográficas

- Synthesis of (+)-13-Carbaartemisinin and Related Tetra- and Tricyclic Structures, *Journal of Medicinal Chemistry*, 39, 1885-1897, **1996**.
85. Cumming, J. N.; Wang, D.; Park, S. B.; Shapiro, T. A. A.; Posner, G. H. Desing, Synthesis, Derivatization, and Structure –Activity Relationships of Simplified, Tricyclic, 1,2,4-Trioxane Alcohol Analogues of the Antimalarial Artemisinin, *Journal of Medicinal Chemistry*, 41, 952-964, **1998**.
86. Gu, J.; Chen, K.; Jiang, H.; Leszczynski, J. The Radical Transformation in Artemisinin: A DFT Study, *Journal of Physical Chemistry A*, 103, 9364-9369, **1999**.
87. Pandey, A. V.; Tekwani, B. L.; Singh, R. L.; Chauhan, V. S. Artemisinin, an Endoperoxide Antimalarial, Disrupts the Hemoglobin Catabolism and Heme Detoxification System in Malarial Parasite, *Journal of Biological Chemistry*, 274, 19383-19388, **1999**.
88. <http://chemviz.ncsa.uiuc.edu/>
89. Nishio, M.; Hirota, M.; Umezawa, Y. *The CH/ π Interaction*, Wiley-VCH, New York, **1998**.
90. Woolfrey, J. R.; Avery, M. A.; Doweyko, A. M. Comparison of 3D quantitative structure-activity relationship methods: Analysis of the in vitro antimalarial activity of 154 artemisinin analogues by hypothetical active-site lattice and comparative molecular field analysis, *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 12, 165-181, **1998**.

FIM