



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE  
SANTANA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



**FRANCO HENRIQUE ANDRADE LEITE**

**ESTUDOS DE ACOPLAMENTO MOLECULAR ENTRE  
PERÓXIDOS OBTIDOS DE FONTES NATURAIS E O GRUPO  
HEME**

Feira de Santana, BA  
2011

**FRANCO HENRIQUE ANDRADE LEITE**

**ESTUDOS DE ACOPLAMENTO MOLECULAR ENTRE  
PERÓXIDOS OBTIDOS DE FONTES NATURAIS E O GRUPO  
HEME**

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

Orientador: Prof. Dr. Alex Gutterres Taranto

Co-orientador: Prof. Dr. Ângelo Amâncio Duarte

Feira de Santana, BA  
2011

À minha mãe que me deu o mais precioso tesouro da vida, conhecimento e valores morais essenciais para a minha formação. À minha noiva que me proporcionou momentos únicos na minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por toda a sabedoria. À minha mãe, que sempre me apoiou e que com muito carinho e perseverança acreditou que este momento seria possível e no meu sucesso. À minha noiva por todos os momentos de companheirismo e por me fazer acreditar que um sonho que se sonha junto virá realidade. Gostaria de agradecer ao meu orientador, Alex Gutterres Taranto, por toda a ajuda e pelo suporte que me proporcionou durante todos esses anos de orientação, não só no papel de orientador, mas como amigo. Agradecer ao co-orientador pelo apoio institucional, Prof. Dr. Ângelo Duarte. Gostaria também de endossar os meus agradecimentos ao Prof. Dr. Sérgio Roberto, pelo apoio na análise e elaboração dos aspectos estatísticos neste estudo. Agradecer com muito apreço aos meus amigos Manoelito Coelho Santos Junior, André Lacerda Braga Teles, Bruno Passos Sampaio, Antônio Anderson, Maíra Mercês Barreto, Michael Menezes, o grupo do Laboratório de Química Computacional da Faculdade Maria Milza (FAMAM), Carine Sampaio, Elisângela Santos e Laís Cardoso, o Diretor da FAMAM, Prof. Weligton por todo o apoio institucional e a todos os meus amigos, professores e demais pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho. Por fim gostaria de agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo suporte financeiro, à Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) pelo apoio institucional.

“Não há nada impossível, porque os sonhos de ontem são as esperanças de hoje e podem converter-se em realidade amanhã”.

Autor desconhecido.

## RESUMO

Artemisinina é uma lactona sesquiterpênica com um grupamento endoperóxido, a qual vem sendo usada contra cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes ao tratamento com cloroquina. Os compostos endoperóxidos agem supostamente no grupo heme levando a redução da ligação peróxido e produção de radicais que podem matar o parasito. Estudos recentes mostraram que a artemisinina pode inibir a enzima ATPase cálcio-dependente (PfATP6) localizada no retículo sarco/endoplasmático, ou seja, fora do vacúolo do parasito *P. falciparum*. Atualmente, a malária mata mais do que a AIDS e a crescente resistência adquirida pelo parasito aos fármacos atuais endossam a necessidade de novas alternativas terapêuticas. O presente estudo teve por objetivo geral identificar potenciais fármacos antimaláricos obtidos de fontes naturais e por objetivo específico correlacionar os estudos *in silico* com os estudos *in vitro*, no intuito de validar os estudos de Acoplamento Molecular. De posse deste conhecimento foi estudada a interação de 51 peróxidos com o grupo heme, comparando-os com os valores obtidos para a artemisinina. Estes peróxidos foram divididos em dois conjuntos. O primeiro conjunto, denominado de conjunto treino, foi composto de 10 derivados da artemisinina com atividade biológica conhecida. O segundo conjunto, denominado de conjunto teste, foi composto por 40 peróxidos presentes na natureza tendo como principal foco compostos oriundos da flora brasileira, para os quais a atividade antimalárica não foi determinada. Os estudos de Acoplamento Molecular foram realizados em três etapas. Na primeira etapa, um estudo de Acoplamento Molecular rígido entre a artemisinina, 10 análogos sintéticos e o grupo heme foi realizado com o auxílio do AutoDock Vina 1.0.2. Em seguida, o cálculo de *single-point* no vácuo e solvente implícito (PCM) seguido de otimizações de cada complexo foram realizados com o auxílio do Gaussian 09W, através do método PM6. Finalmente, as correlações entre os parâmetros energéticos e os dados experimentais (Concentração Inibitória (IC<sub>50</sub>) e/ou constante de dissociação (K<sub>d</sub>)) foram realizadas para todos os compostos do conjunto treino. Os resultados da matriz de correlação apontam relação significativa ( $\alpha=0,01$ ) entre energia do complexo e K<sub>d</sub> de -0,75 através do teste de Spearman ( $\rho$ ). O mesmo protocolo computacional foi executado para o conjunto teste. Todos os peróxidos naturais estudados apresentaram Mapa de Potencial Eletrostático Molecular (MEP) similar à artemisinina, onde a densidade de carga negativa localiza-se sobre os oxigênios do grupamento peróxido. Os resultados de energia final obtido a nível semi-empírico PM6, apontou os compostos “5” e “24” como potenciais fármacos antimaláricos. Desta forma é possível identificar que existem compostos naturais com possível atividade antimalárica, no qual a ferramenta da modelagem molecular pode guiar na identificação de compostos bioativos e por conseguinte no desenvolvimento de novos fármacos.

**Palavras-chave:** Peróxidos. Antimaláricos. Artemisinina.

## ABSTRACT

Artemisinin is a sesquiterpene lactone with an endoperoxide function currently used against strains *Plasmodium falciparum*. Endoperoxides are supposed to act on heme leading to reduction of the peroxide bond and production of radicals that can kill the parasite. In addition, recent studies have shown that artemisinin can inhibit the sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) orthologue (PfATP6) of *P. falciparum* in *Xenopus* oocytes. Nowadays, malaria kills more than AIDS and the increasing parasite resistance to current drugs endorses the search for new therapies. In this study was proposed the identification of potential antimalarial drugs obtained from natural sources by molecular modeling. The main goal is to identify potential antimalarial drugs from natural sources, as well as identify possible correlations between *in silico* studies and experimental data. Thus, were studied the interaction of 51 peroxide with heme, comparing them with the values obtained for artemisinin. These peroxides were divided into two sets. The first set, called training set was composed of 10 artemisinin derivatives with known biological activity. The second set, called test set was composed of 40 peroxides present in nature with the primary focus of the compounds from Brazilian flora, which antimalarial activity has not been evaluated. Docking studies were performed in three steps. Firstly, a docking between artemisinin, 10 synthetic analogs and heme was carried out with AutoDock Vina 1.0.2. Then, the calculation of single-point in vacuum and solvent phase (PCM) followed by each complex optimization was performed with Gaussian 09W using the PM6 method. Finally, the correlations between the energies and the experimental data (inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) and dissociation constant (Kd)) were performed for all compounds of the training set. The correlation results indicated any significant ( $\alpha = 0.01$ ) between complex energy and Kd, -0,75 using Spearman test. The same computational protocol was performed realized for the test set. All natural peroxides selected showed molecular electrostatic potential (MEP) map similar to artemisinin, where the density of negative charge is located on the oxygens of the peroxide grouping. The results of final energy obtained at semi-empirical PM6, showed the compound "5" and "24" as promising antimalarial drugs. Thus, it is possible to identify that there are natural compounds with possible antimalarial activity, in which the modeling tool can guide the molecular identification of bioactive compounds and therefore the development of new drugs.

**Keywords:** Peroxides. Antimalarials. Artemisinin.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AM1:** Modelo Austin 1

**DBNBS:** 3,5-dibromo-4-nitrosobenzeno-sulfonato de sódio

**DFT:** Teoria da Densidade Funcional

**DMPO:** 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido

**MEP:** Potencial Eletrostático Molecular

**MM3:** Mecânica Molecular 3

**MNDO:** Sobreposição diatômica modificada negligenciada

**NDDO:** Sobreposição diatômica diferencial negligenciada

**OMS:** Organização Mundial de Saúde

**PDB:** Banco de Dados de Proteínas

**PM6:** Método Paramétrico 6

**RPE:** Ressonância Paramagnética Eletrônica

**SERCA:** Ca<sup>+2</sup>ATPase reticulo sarco endoplasmático

**TCTP:** Proteína Tumoral Tradicionalmente Controlada

**UFF:** Campo de Força Universal



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura do azul de metileno	18
<b>Figura 2:</b> Estruturas da pamaquina e mepacrina	19
<b>Figura 3:</b> Distribuição global da malária	22
<b>Figura 4:</b> Estimativa de morte por malária por cada 100.000 pessoas em 2006	23
<b>Figura 5:</b> Distribuição da malária no Brasil	24
<b>Figura 6:</b> Estimativa (em percentagem) de casos de malária devido ao <i>Plasmodium falciparum</i> no ano de 2009.	25
<b>Figura 7:</b> Ciclo biológico dos parasitos que causam a malária	27
<b>Figura 8:</b> A figura “a” e “b” representa o heme e a hemozoína, respectivamente	28
<b>Figura 9:</b> Estruturas químicas dos complexos de Ru <sup>3+</sup> e Ir <sup>3+</sup> com cloroquina	29
<b>Figura 10:</b> Estrutura do ferroceno e seu respectivo cátion radical	30
<b>Figura 11:</b> Estrutura da ferroquina	30
<b>Figura 12:</b> Fármacos antimaláricos clássicos	34
<b>Figura 13:</b> Artemisinina	37
<b>Figura 14:</b> Derivados da artemisinina	38
<b>Figura 15:</b> Endoperóxidos estruturalmente mais simples do que a artemisinina	39
<b>Figura 16:</b> Deoxiartemisinina e outros sesquiterpenos extraídos da <i>A. annua</i>	41
<b>Figura 17:</b> Interação entre o heme e a artemisinina através do grupamento endoperóxido	43
<b>Figura 18:</b> Alquilação do heme pela artemisinina. (Aqui o grupo heme é simulado pelo MnTPP).	45

<b>Figura 19:</b> Representação da ação da artemisinina proposta por Meshnick	47
<b>Figura 20:</b> Mecanismo inicial proposto por Posner	48
<b>Figura 21:</b> Mecanismo proposto por Posner (migração 1,5 do H radical)	49
<b>Figura 22:</b> Evidências da formação do intermediário ferro-oxo	50
<b>Figura 23:</b> Formação do derivado oxiheme por transferência de oxigênio da artemisinina para o heme	51
<b>Figura 24:</b> Derivado epóxido destituído de atividade biológica.	52
<b>Figura 25:</b> Produtos isolados por Wu e colaboradores, como resultado da reação de decomposição da artemisinina na presença de FeSO <sub>4</sub> .	52
<b>Figura 26:</b> Ambiente de interação da tapsigargina no sitio ativo da PfATP6	55
<b>Figura 27:</b> Acurácia da predição do modo de ligação para um conjunto treino. AutoDock refere-se ao AutoDock 4 e Vina ao AutoDock Vina	63
<b>Figura 28:</b> Estruturas selecionadas para o conjunto treino	69
<b>Figura 29:</b> Estruturas selecionadas para o conjunto teste	71
<b>Figura 30:</b> Grupo heme complexado com uma molécula de água	77
<b>Figura 31:</b> Demonstração do giro entre o eixo da ligação O <sub>1</sub> -Fe	78
<b>Figura 32:</b> Semelhança estrutural entre o composto 24 e composto identificado por Rücker et al, 1997	89
<b>Figura 33:</b> Análise dos escaneamentos dos peróxidos selecionados para o estudo	97
<b>Figura 34:</b> Mapas MEP do conjunto teste	108

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Parâmetros geométricos selecionados para a estrutura do heme no estado quintuplete, por mecânica quântica e métodos experimentais	80
<b>Tabela 2:</b> Valores de atividade biológica e <i>in silico</i> (Kcal/mol), para o conjunto treino	82
<b>Tabela 3:</b> Matriz de correlação entre os valores de atividade biológica (IC <sub>50</sub> e Kd) e valores <i>in silico</i> , com o teste não paramétricos Kendall ( $\tau$ )	85
<b>Tabela 4:</b> Matriz de correlação entre os valores de atividade biológica (IC <sub>50</sub> e Kd) e valores <i>in silico</i> , com o teste não paramétricos Spearman ( $\rho$ ).	86
<b>Tabela 5:</b> Distância selecionada para a artemisinina e o conjunto teste em Å para o complexo otimizado por PM6.	90
<b>Tabela 6:</b> Energia de ligação (kcal/mol) para o conjunto teste, de acordo com o método PM6.	92

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	14
2	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	17
2.1	BIODIVERSIDADE MUNDIAL	17
2.2	ASPECTOS HISTÓRICOS DA MALÁRIA	18
2.3	CONSIDERAÇÕES SOBRE A MALÁRIA	21
2.3.1	<b>Ciclo Biológico do Parasito</b>	26
2.3.2	<b>Resistência Parasitária</b>	29
2.3.2.1	Estratégia Bioorganometálica	29
2.4	FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS CLÁSSICOS	32
2.5	ARTEMISININA E ENDOPERÓXIDOS ANTIMALÁRICOS	36
2.5.1	<b>Mecanismos de Ação dos Endoperóxidos</b>	40
2.5.1.1	Ação da artemisinina sobre o parasito	40
2.5.1.2	Importância do Grupo Peróxido	40
2.5.1.3	Interação da artemisinina com o heme	42
2.5.1.4	Ação alquilante da artemisinina	45
2.5.1.5	Hipóteses sobre o Mecanismo de ação da artemisinina	47
2.6	RECEPTOR PFATP6: NOVAS PERSPECTIVAS	53
2.7	DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS: PERSPECTIVAS E DIFICULDADES	56
3	<b>ESTUDOS COMPUTACIONAIS</b>	58

3.1	MÉTODOS DE QUÍMICA COMPUTACIONAL	58
3.2	MÉTODOS DE CÁLCULOS TEÓRICOS	58
3.2.1	<b>Modelos de Mecânica Molecular</b>	58
3.2.2	<b>Métodos Quânticos</b>	59
3.2.3	<b>Métodos Semi-Empíricos</b>	60
3.2.3.1	Método PM6	61
3.4	ACOPLAMENTO MOLECULAR (DOCKING)	62
4	<b>ANÁLISES ESTATÍSTICAS</b>	64
4.1	ANÁLISES DE CORRELAÇÃO	64
5	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	67
5.1	LEVANTAMENTO DOS COMPOSTOS	67
5.1.1	<b>Conjunto Treino</b>	67
5.1.2	<b>Conjunto Teste</b>	70
5.2	ANÁLISES DE CORRELAÇÃO: DADOS BIOLÓGICOS X DADOS <i>IN SILICO</i>	75
5.2.1	<b>Análise Estatística Clássica</b>	75
5.2.2	<b>Análise Bivariada</b>	75
5.2.2.1	Matriz de Correlação	75
5.3	ESTUDOS DE ACOPLAMENTO MOLECULAR	76
5.3.1	<b>Preparo dos Ligantes</b>	76
5.3.2	<b>Preparo do receptor</b>	76

5.3.3	<b>Acoplamento Molecular</b>	77
6	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	80
6.1	ANÁLISE DO GRUPO HEME	80
6.2	ANÁLISE DO CONJUNTO TREINO	81
6.2.1	<b>Análises Estatísticas</b>	84
6.3	ANÁLISE DO CONJUNTO TESTE	88
6.3.1	<b>Análise do escaneamento do ângulo diedro</b>	95
6.3.2	<b>Análise do Mapa de Potencial Eletrostático Molecular (MEP)</b>	107
7	<b>CONCLUSÕES</b>	116
	<b>REFERÊNCIAS</b>	118

## 1. INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa, não contagiosa, de evolução crônica, com manifestações episódicas de caráter agudo, que aflige milhões de pessoas nas zonas tropicais e subtropicais do globo. É talvez a mais antiga, a de maior distribuição e a mais conhecida das doenças parasitárias que afligem o homem (VERONESI, 1991; NEVES, 1998).

Em 1798, a decocção de *Artemisia annua* e *Carapax trionycis* foi sugerida como tratamento para a malária. Como resultado do programa iniciado em 1967, observou-se em 1971 que o extrato etéreo de *Artemisia annua*, obtido a baixa temperatura, apresenta atividade antimalárica. Em 1972 foi isolado o princípio ativo, não relatado na literatura anteriormente, sendo denominado de *qinghaosu* (QHS), que significa princípio ativo de *qing hao* (KLAYMAN, 1985). O princípio ativo da *Artemisia annua* ficou conhecido posteriormente no ocidente como artemisinina.

Em 1979, o *Qinghaosu Antimalaria Coordinating Research Group* descreveu que 2.099 casos de malária foram tratados com qinghaosu e todos os pacientes levados à cura clínica. Destes casos, 143 eram causados por parasitos resistentes a cloroquina e 141 eram casos de malária cerebral, para os quais o tratamento gerou “bons” resultados (KLAYMAN, 1985).

A artemisinina é o mais relevante avanço no tratamento da malária nos últimos 40 anos. A artemisinina é uma lactona sesquiterpênica com um grupo endoperóxido no qual tem sido usada por muitos anos na medicina chinesa para febre e malária, incluindo aquelas cepas de *Plasmodium falciparum* sensíveis e resistentes a cloroquina, principal fármaco quinolínico utilizado na terapêutica. Devido a sua potente atividade antimalárica, rápida ação e baixa toxicidade, a artemisinina e seus derivados têm se destacado como a nova geração de fármacos antimaláricos (TARANTO et al, 2006).

O desenvolvimento de novos antimaláricos é de grande importância, tendo em vista a resistência adquirida pelo parasito frente aos fármacos quinolínicos tradicionais, o que tem levado a altas taxas de mortalidade, sobretudo em crianças (TRAVASSOS; LAUFER, 2009). A distribuição da malária está limitada pela tolerância climática do mosquito vetor, e por suas restrições biológicas que limitam a sua sobrevivência e incubação no hospedeiro definitivo, porém devido ao aquecimento global, as áreas no qual a doença estava erradicada como Europa e Estados Unidos podem vir a apresentar um surto epidêmico. Alguns modelos

estatísticos apontam que em 2080, o número de indivíduos infectados por *P. falciparum* será de aproximadamente 330 milhões de pessoas (LIESHOUT et al, 2004).

A temperatura e a umidade estão entre os fatores mais importantes para a transmissão da malária, a multiplicação do parasito dentro do mosquito de sangue frio é ideal entre 20 e 27°C para se desenvolver. Futuras alterações no clima podem alterar a prevalência e incidência de malária, mas a ênfase principal é o aquecimento global. Os principais determinantes de incidência e prevalência estão também ligados a ecologia, mudança na estrutura social, a política e economia (GETHING et al, 2010).

Aproximadamente metade da população mundial vive em áreas que tem algum risco de transmissão de malária, e um quinto vive em áreas com alto risco de transmissão da doença (AREGAWI et al, 2008). Cerca de 1,5 a 2 milhões de pessoas morrem de malária, sendo que 3 mil crianças morrem por dia na África. Os países mais comprometidos são Índia, Brasil (cerca de 300 mil casos/ano), Afeganistão e outros países asiáticos, incluindo a China. Especula-se que 50% da mortalidade entre a população indígena no Brasil deve-se à malária causada por *P. falciparum* (LANASPA; RENOM; ORELLANA, 2010).

O Brasil computa 50,6% de todos os casos de malária das Américas, com 60% das infecções causadas por *P. falciparum*, correspondendo a 564.406 casos confirmados. Os estados com alto índice de infecção são: Amazonas, Roraima (ambos com 94 casos por 1000 habitantes), Mato Grosso (213 casos por 1000 habitantes), Rondônia (183 casos por 1000 habitantes), Pará (116 casos por 1000 habitantes) (SNOW et al, 2005). Porém devido ao aquecimento global e ao desmatamento estão sendo criados verdadeiros “corredores ecológicos” facilitando a migração de vetores de zonas endêmicas para outras regiões não endêmicas, como a região Nordeste (PAAIJMANS; READ; THOMAS, 2009).

Em vários países, incluindo o Brasil, a quimioterapia da malária é feita empregando-se uma combinação de derivados artemisinínicos e quinolínicos (ex.: artesunato + mefloquina, ASMQ) como tratamento padrão em casos não complicados, haja vista que a sensibilidade aos derivados quinolínicos está diminuindo e a artemisinina e seus derivados estão sendo empregados como tratamento de primeira escolha em certas áreas. (BALINT, 2001; SNOW, 2005).

A busca de novos fármacos antimaláricos a partir de produtos naturais é necessária para que se tenha uma alternativa terapêutica à crescente resistência adquirida pelo parasito (DONDORP et al, 2009). Existem compostos oriundos da flora brasileira identificados por



modelagem molecular que demonstraram serem promissores agentes antimaláricos (LEITE et al, 2005; 2010). No entanto, poucos apresentam uma eficácia suficiente e baixa toxicidade para que sejam utilizados. Desta forma, a execução deste estudo foi de suma importância haja vista que a malária mata cerca de duas vezes mais que a AIDS, além da crescente resistência adquirida pelo parasito aos fármacos atuais (AREGAWI et al, 2008).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 BIODIVERSIDADE MUNDIAL

A diversidade biológica não é uniformemente distribuída em todo o planeta. As florestas tropicais do mundo são um dos biomas mais ricos em espécies incluindo mais da metade do número de espécies na Terra. Aproximadamente 70% das espécies do mundo estão distribuídos em apenas 12 países: Austrália, Brasil, China, Colômbia, Equador, Índia, Indonésia, Madagascar, Peru, México e Zaire (CALDERON et al, 2009).

As plantas oferecem uma variedade de moléculas que apresentam efeitos diferentes na homeostasia humana. Essas moléculas chamadas de produtos naturais têm sido amplamente reconhecidas como uma fonte importante da maioria dos componentes ativos de medicamentos. Uma das razões para este sucesso é que na maioria das vezes, devido a complexidade estrutural desses componentes, torna a síntese economicamente inviável, além disso, na maioria das vezes os produtos naturais são mais facilmente absorvidos do que os fármacos sintéticos. Antes do advento da técnica de seleção de alto rendimento (*High-throughput Screening*) e tecnologias pós-genômicas, mais de 80% de substâncias de fármacos eram produtos naturais ou inspirados por um composto natural. Este fato ilustra a importância dos produtos naturais para a saúde humana (CALDEIRON et al., 2009).

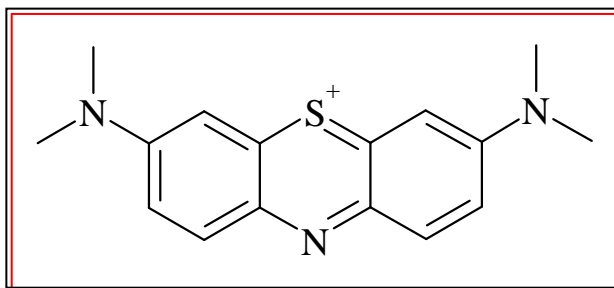
Bourdy e colaboradores (2008) relataram a sua experiência ao longo dos anos com diferentes grupos étnicos da América do Sul, mostrando que quando uma forte incidência de malária é encontrada, em seguida, metade das espécies vegetais relacionadas como "antimaláricos verdadeiros" tinham atividades *in vitro* e *in vivo*. Apesar disso, os autores também relataram que a periodicidade de coleta e diferentes protocolos de preparação da amostra acarretam em resultados diferentes nos modelos *in vitro* e *in vivo*. Possivelmente, a inatividade ou mesmo a fraca atividade relatada em vários artigos científicos em todo o mundo, usando diferentes fontes biológicas possuem provavelmente conclusões errôneas, partindo da premissa levantada por Bourdy e colaboradores (2008) quanto às variáveis de coleta e diferentes protocolos preparativo da amostra.

## 2.2 ASPECTOS HISTÓRICOS DA MALÁRIA

Alguns estudos apontam que a parasitemia da malária tenha sido a principal causa de mortalidade entre os principais precursores do *Homo sapiens*, como os *Australopithecus*. Existem várias referências na literatura antiga e das civilizações modernas que relatam febres malignas intermitentes e calafrios consistentes com os sintomas da malária. No passado o povoamento de muitas regiões do mundo havia sido limitado pela malária, como as da Campanha Romana da Grécia (REY, 2008).

Antes da Era Cristã, os chineses já tratavam a malária com Ch'ang shan, uma preparação que consistia na raiz pulverizada da planta *Dichroa febrifuga*, cujo princípio ativo é o alcalóide febrifugina. Antes da chegada dos europeus ao continente americano, os índios peruanos usavam a casca da quina para o tratamento da malária. Em 1677, a casca de quina foi incluída na Farmacopéia de Londres sob a designação *Cortex peruano*, sendo este o primeiro registro oficial, na Europa, sobre quimioterapia antimalárica (VALE; MOREIRA; GOMES, 2005).

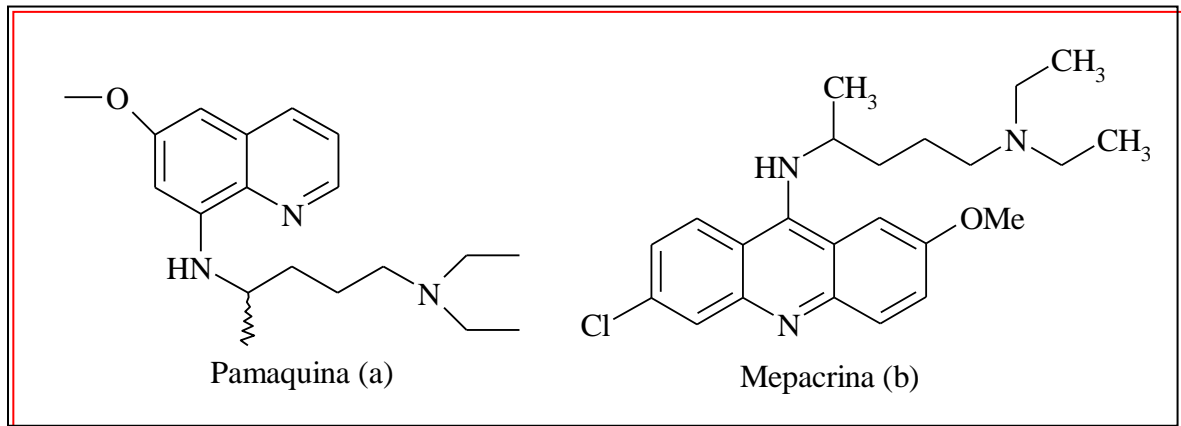
Sete décadas depois da identificação da quinina, Paul Ehrlich utilizou azul de metileno (Figura 1) para curar dois pacientes infectados com malária, após ter observado que aquele composto era eficaz contra o parasito. Esta foi a primeira vez que se utilizou, em humanos, uma substância sintética com fins terapêuticos (VALE; MOREIRA; GOMES, 2005) Atualmente está definido que o azul de metileno age inibindo a glutatona redutase do parasito.



**Figura 1:** A estrutura do azul de metileno.  
**Fonte:** VALE; MOREIRA; GOMES, 2005.

Em 1925, investigadores alemães modificaram a estrutura do azul de metileno e sintetizaram a pamaquina ou plasmoquina (Figura 2a), sendo este o primeiro fármaco capaz de prevenir recidivas da malária vivax. Sete anos depois, em 1932, foi desenvolvida a mepacrina, também designada atebrina ou quinacrina (Figura 2b), ativa contra os estágios

sanguíneos do *P. falciparum*. Estes dois fármacos foram usados extensivamente na II Grande Guerra Mundial.



**Figura 2:** As estruturas da pamaquina e mepacrina.

**Fonte:** VALE; MOREIRA; GOMES, 2005.

Muitos representantes da história padeceram da febre maligna proveniente da malária. Santo Agostinho, o primeiro arcebispo de Cantebury, faleceu de uma patologia que muito provavelmente era malária. O imperador do sacro império Romano Germânico Carlos V morreu de malária na Espanha em 1558. Durante a Primeira Guerra Mundial, os exércitos foram debilitados pela malária, na campanha da Macedônia, e na Segunda Guerra, em algumas frentes, as baixas por essa parasitose foram maiores que as de combate (ROCHA; PEREIRA; SOUZA, 2006).

A malária representa uma doença humana antiga, febres periódicas e esplenomegalia foram mencionadas desde 2700 a.C em escritos egípcios e chineses. A malária chegou a Roma em 200 a.C, se espalhou pela Europa durante o século XII, e chegou à Inglaterra no século XIV. Assume-se que os exploradores europeus, os conquistadores e colonizadores importaram *P. malariae* e *P. vivax* para as Américas. A chegada do *P. falciparum* coincidiu com a importação de escravos Africanos, e nos anos de 1800, a malária foi encontrada em todo o mundo. A malária teve um impacto maior na história mundial do que qualquer outra doença infecciosa, influenciando no resultado das guerras, movimentos de população e desenvolvimento e declínio de várias nações. Antes da Guerra Civil Americana, a malária foi encontrada do norte até o sul do Canadá. No entanto, no início dos anos 1950 já não era uma doença endêmica nos Estados Unidos devido à intensa atividade da vigilância epidemiológica, dentre outros fatores (VALE; MOREIRA; GOMES, 2005).

Em 2004, o parasito *P. knowlesi*, presente em macacos de cauda longa, foi confirmado em vários casos humanos de Bornéu da Malásia, Tailândia, Myanmar e Filipinas. Este fato já

tinha sido evidenciado há mais de 50 anos, em que sob condições de laboratório alguns parasitos responsáveis pela malária de macaco poderiam ser transmitidos aos seres humanos. Agora está bem estabelecido que *P knowlesi* está emergindo como um importante patógeno zoonótico humano. *P. Knowlesi*, assim como algumas outras malárias de macacos, podem apresentar problemas adicionais no futuro (ROCHA; PERREIRA; SOUZA, 2006).

Em áreas não endêmicas, a malária é frequentemente associada com os indivíduos que viajaram para áreas endêmicas, porém outras situações resultando em infecção incluem transfusões de sangue, uso de agulhas hipodérmicas contaminadas pelo uso anterior, o transplante de medula óssea, infecção congênita e da transmissão nos Estados Unidos por mosquitos indígenas, que adquiriu o parasito de infecções importadas. Em áreas não endêmicas, é importante que os profissionais de saúde compreendam as dificuldades relacionadas com o diagnóstico de malária, especificamente o fato de que os sintomas são geralmente inespecíficos e podem mimetizar outras condições (REY, 2008).

Os viajantes são suscetíveis à infecção da malária, quando eles retornam para uma área endêmica, e profilaxia deve ser recomendada. Além disso, devido ao aumento do número de pessoas que viajam a partir dos trópicos para regiões livres de malária, o número de casos de malária importados está aumentando. É possível que os mosquitos possam transmitir a infecção entre as pessoas que vivem ou trabalham nas proximidades dos aeroportos internacionais, esses mosquitos também podem atingir áreas muito distantes dos aeroportos. Esta situação tem sido denominada "malária de aeroporto" e testes de diagnóstico para malária deve ser considerada em pacientes que trabalham ou vivem perto de um aeroporto internacional e que apresentem uma doença febril aguda (VALE; MOREIRA; GOMES, 2005).

## 2.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE A MALÁRIA

O nome malária tem origem latina e literalmente significa “ar ruim”, pois se acreditava que a doença resultasse de emanções de pântanos. Nomes alternativos, como paludismo e impaludismo, são de origem francesa e têm o mesmo significado. Outros sinônimos, menos comuns são: batedeira, carneirada, febre intermitente e febre palustre (VERONESI, 1991; NEVES, 1998).

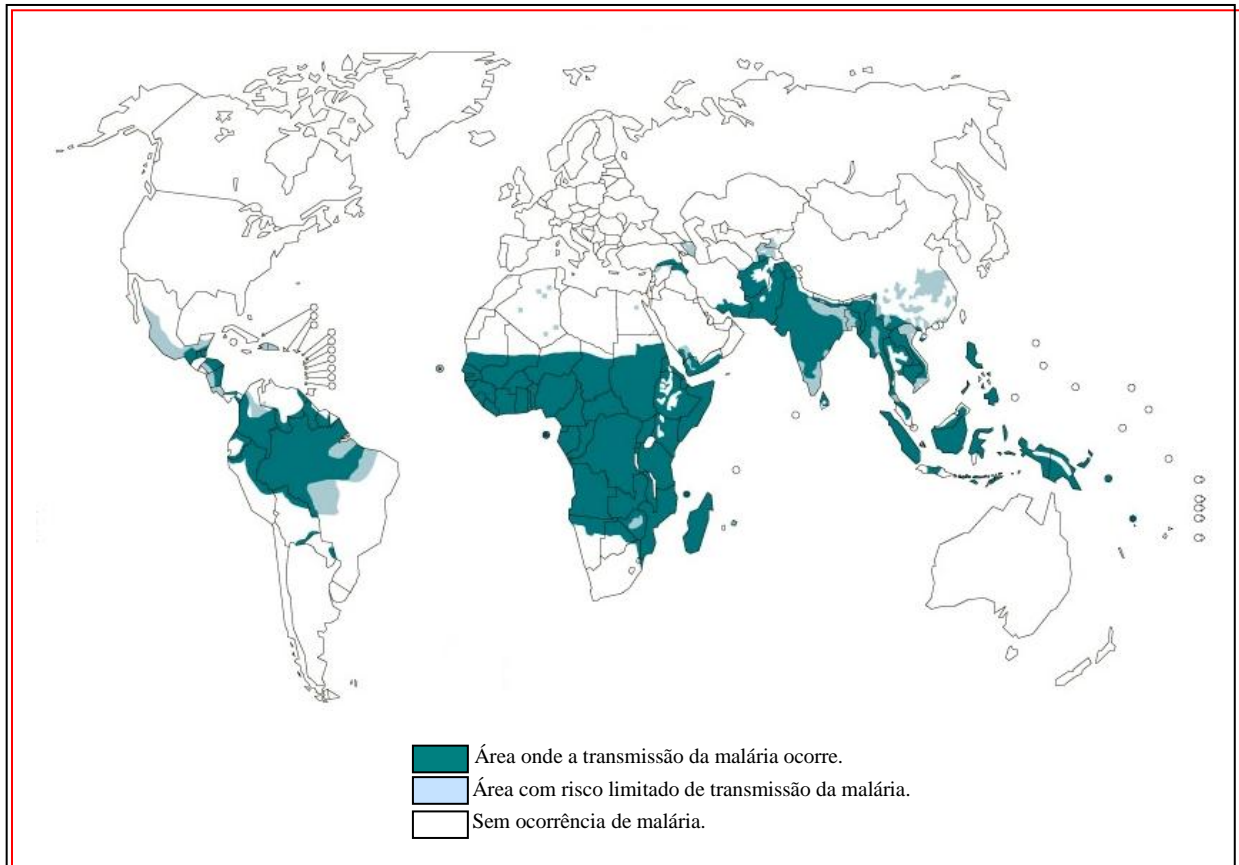
A malária manifesta-se por episódios de calafrios, seguidos de febre alta que duram de 3 a 4 horas. Esses episódios são, em geral, acompanhados de profundo mal-estar, sudorese, náuseas, cefaléias e dores articulares. Após a crise, o paciente retorna à sua vida habitual. No entanto, depois de um ou dois dias, o quadro calafrio/febre retorna e se repete por semanas até que o paciente, não tratado, melhore espontaneamente ou morra em meio a complicações renais, pulmonares ou coma cerebral, no caso da malária cerebral. Tratado a tempo, só excepcionalmente morre-se de malária (VERONESI, 1991; NEVES, 1998; CAMARGO, 2003).

As infecções malarias que ocorrem no homem são conhecidas conforme as espécies do protozoário envolvido. Deste modo, tem-se: a malária *falciparum*, também conhecida como malária grave ou maligna que ocorre principalmente na África subsaariana, mas também está presente em todas as regiões tropicais do mundo; a malária *vivax*, chamada de malária benigna, muito comum na América do Sul e que também é a forma de malária mais largamente distribuída e observada em regiões temperadas do mundo; a malária *malariae*, que tem a mesma distribuição geográfica da malária *falciparum*, embora seja muito menos prevalente e ocorra em zonas mais restritas e a malária *ovale* que ocorre quase exclusivamente na África (STANLEY et al, 1991).

Na sistemática zoológica, os parasitos da malária humana estão classificados no *phylum Protozoa*, classe *Sporozoea*, família *Plasmodiidae*, gênero *Plasmodium*, ao qual pertencem quatro espécies que afligem o homem: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*. Comparado às outras espécies, o *Plasmodium falciparum* causa maior morbidade e maior mortalidade, estando presente na África, Amazônia, Sudeste asiático e Oceania (VERONESI, 1991; NEVES, 1998).

Como referido, cerca de 1,5 a 2 milhões de pessoas morrem de malária, sendo que as principais vítimas são crianças (OMS, 2011). A doença causa por ano muito mais mortes em

valores absolutos que a AIDS e muito mais que qualquer outra doença infecciosa (FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008). Os países mais comprometidos são Índia, Brasil (cerca de 300 mil casos/ano), Afeganistão e outros países asiáticos, incluindo a China (Figura 3) (CAMARGO, 2003). Além disso, especula-se que metade dos casos de mortalidade entre a população indígena no Brasil deve-se à malária causada por *P. falciparum* (KAGER 2002, VASCONCELOS et al. 2002).



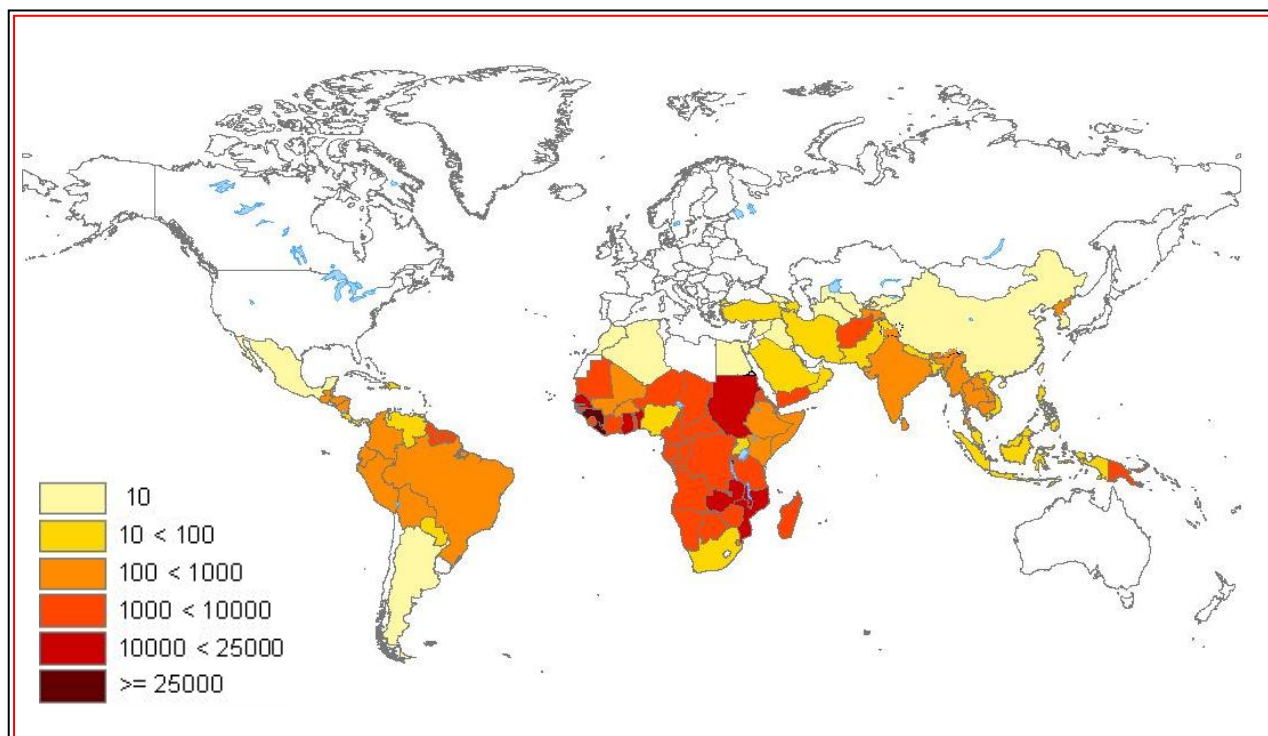
**Figura 3:** Distribuição global da malária em 2009. Em destaque os países de maior ocorrência.

**Fonte:** WHO, 2010.

Atualmente a malária é tipicamente uma doença do mundo subdesenvolvido e/ou em desenvolvimento, pois foi erradicada na Europa, América do Norte e na Austrália desde a metade do século XX, em razão do uso de Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT), tratamento dos doentes com cloroquina, medidas de saneamento básico e drenagem dos campos (KAGER, 2002, VASCONCELOS et al, 2002).

Há uma estimativa que 863.000 mortes causadas por malária ocorreram no mundo no ano de 2010, no qual 89% estavam na região da África; 4% no sudeste asiático e o restante na parte leste do mediterrâneo (LANASPA; RENOM; ORELLANA, 2010; STEKETEE; CAMPBELL, 2010). O risco de morte de malária é considerado mais alto na África do que

em outras partes do mundo (Figura 4). Uma estimativa global que 85% das mortes ocorrem em crianças menores de 5 anos, devido ao sistema imune que ainda está em formação, mas a proporção é muito maior na África, cerca de 88%. De acordo com as estimativas, aproximadamente 1 em 5 mortes reportadas no mundo no ano de 2009 foram devido à malária (WORLD MALARIA REPORT, 2010).

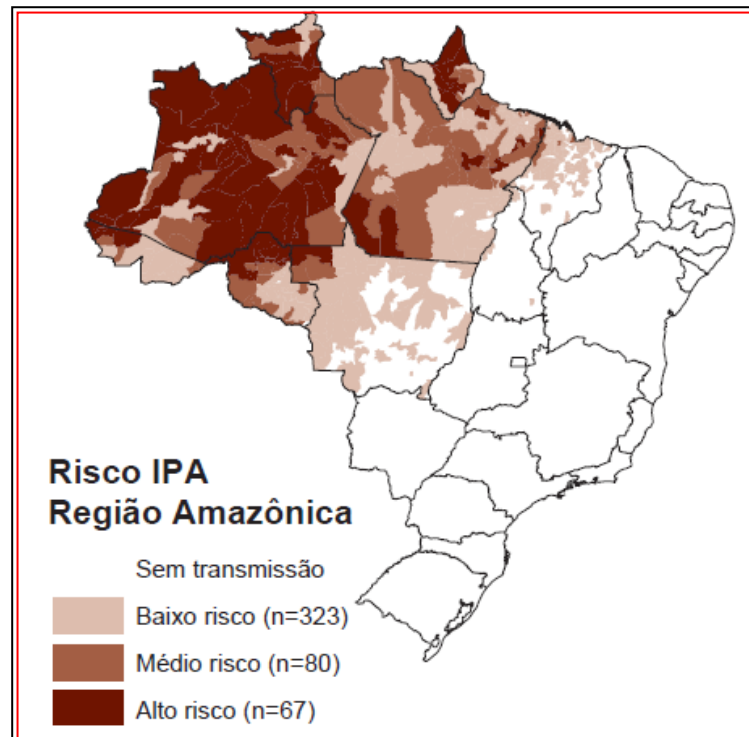


**Figura 4:** Estimativa de morte por malária por cada 100.000 pessoas em 2009.

**Fonte:** WORLD MALARIA REPORT, 2010.

O quadro epidemiológico da malária no Brasil é preocupante nos dias atuais. Embora em declínio, o número absoluto de casos no ano de 2008 foi superior a 300.000. Desses, 99,9% foram transmitidos nos Estados da Amazônia Legal, sendo o *P. vivax* a espécie causadora de quase 90% dos casos. A transmissão do *P. falciparum*, responsável pela forma grave e letal da doença, tem apresentado redução importante nos últimos anos e diminuição dos municípios de alto risco (Incidência Parasitária Anual – IPA acima de 49,9 casos/1.000 habitantes). Além disso, a frequência de internações por malária no Brasil também vem mostrando declínio, ficando em 1,3% no ano de 2008, enquanto em 2003 era de 2,6%. Porém ainda se necessita de uma política mais efetiva para o problema da malária no Brasil (BRASIL, 2010). A distribuição espacial do risco de transmissão da doença no Brasil é apresentada na Figura 5.

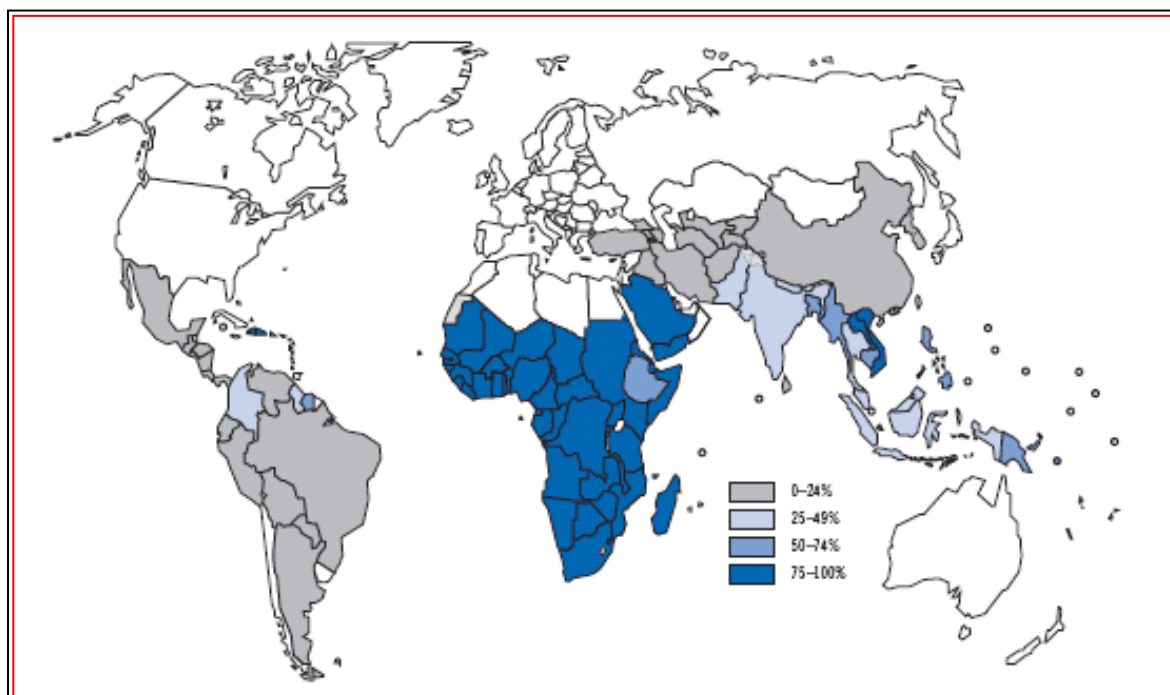




**Figura 5:** Distribuição da malária no Brasil no ano de 2008.  
**Fonte:** BRASIL, 2010.

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

Estima-se que 247 milhões de casos de malária ocorreram no mundo no ano de 2009, dos quais 91% ou 230 milhões foram devido ao *P. falciparum*. A vasta maioria dos casos, equivalente a 86%, foram na região da África, seguido pelo sudeste asiático com 9% dos casos e as regiões do Mediterrâneo, cerca de 3%. A percentagem de casos devido ao *P. falciparum* excedeu 75% na maioria dos países africanos, mas em poucos países fora da África (Figura 6) (WORLD MALARIA REPORT, 2010).



**Figura 6:** Estimativa (em percentagem) de casos de malária devido ao *Plasmodium falciparum* no ano de 2009.  
**Fonte:** WORLD MALARIA REPORT, 2010.

A malária é considerada com uma doença negligenciada devido à falta de investimentos por partes das indústrias multinacionais farmacêuticas mundiais em pesquisa e quando associada a uma co-infecção com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), se configura com um sério problema de saúde pública na maioria dos países em desenvolvimento nas regiões tropicais do mundo (CALDERON et al, 2009).

A malária humana é uma doença infecciosa causada por uma ou mais espécies de *Plasmodium* (isto é, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*). A malária continua a ser um problema global devastador com 350-500 milhões de casos registrados e uma estimativa de um milhão de mortes anualmente, em que 80% delas estão na África subsaariana. Aproximadamente 50% da população mundial vivem em áreas de risco (WORLD MALARIA REPORT, 2010).

Os tratamentos de primeira escolha para estas doenças são baseadas em um número limitado de agentes quimioterápicos caracterizado por alta toxicidade e custo, nos quais tem sido ineficientes desde 1980 em diversas áreas de alta transmissão. A quinina de *Cinchona* sp. (Rubiaceae) foi o fármaco mais utilizado para tratar a malária até a Primeira Guerra Mundial (1914-1918). Durante este conflito, novas moléculas com atividade antimalárica foram sintetizadas, como o 9-aminoacrinidina (quinacrina, mepacrina), que foi sintetizada em 1920 e comercializada em 1930 sob o nome de atabrina. Em 1944, a quinina foi sintetizada em

laboratório, incentivando o desenvolvimento de vários medicamentos, entre eles a amodiaquina, primaquina e cloroquina (FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008).

Esses fármacos são geralmente usados para tratar a malária, devido a sua tolerância, segurança no tratamento de mulheres grávidas, falta de efeitos tóxicos nas doses recomendadas e elevada eficácia na cura da doença. *P. falciparum* resistentes à cloroquina foram primeiramente detectados em 1961 no Vietnã, sendo identificados em vários soldados americanos, motivando um intenso programa de pesquisa de novos agentes antimaláricos. Nesse programa, a dapsona e pirimetamina/sulfadoxina foram introduzidos na profilaxia. A pirimetamina foi vendida também em combinação com sulfaleno e com dapsona. Mais tarde, outros dois compostos altamente eficazes contra as cepas resistentes a *P. falciparum* foram aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA): mefloquina e halofantrina. No entanto, há relatos de resistência a ambos os compostos (PIMENTEL et al, 2007).

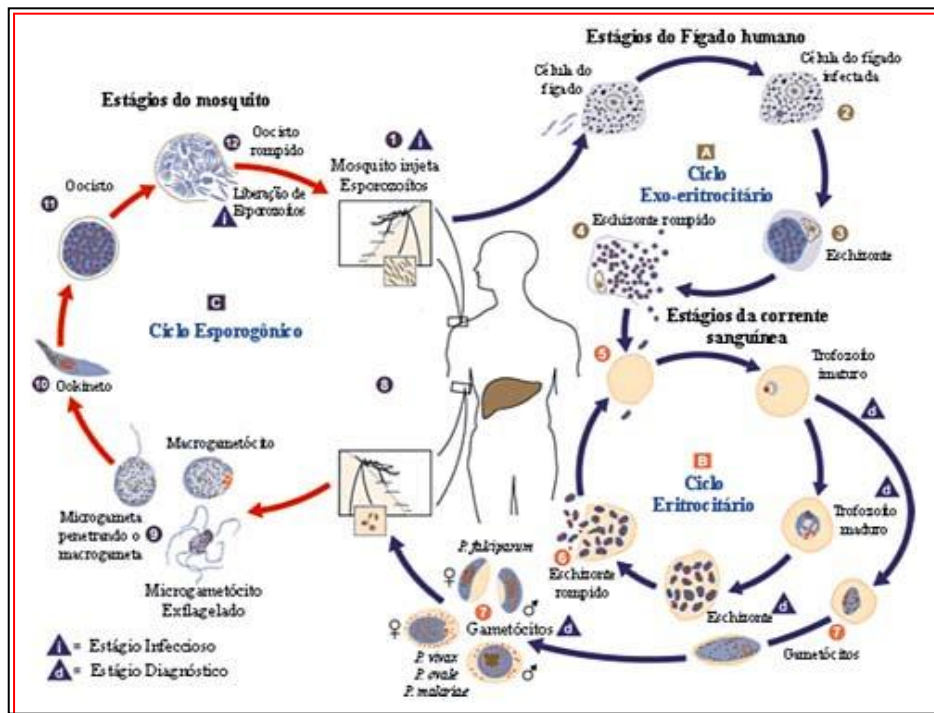
A grande complexidade do ciclo de vida do parasito explica as enormes dificuldades que têm vindo a ser experimentadas, ao longo dos tempos, para o estabelecimento de uma terapia antimalárica eficaz e segura. O desenvolvimento de um fármaco antimalárico ideal pressupõe a existência de uma atividade antiparasitária ótima com um mínimo de efeitos adversos para o hospedeiro definitivo (VALE; MOREIRA; GOMES, 2005).

### 2.3.1 Ciclo Biológico do Parasito

O ciclo de vida de todos os parasitos do gênero *Plasmodium* são complexos e envolvem três fases, a saber: ciclo exo-eritrocitário, eritrocitário e esporogônico. A malária é transmitida ao homem pela picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles*, contaminado por ingerir sangue de pessoas infectadas com gametócitos ou por transfusão sanguínea (FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008).

O parasito apresenta um ciclo sexuado que ocorre no inseto e um ciclo assexuado que ocorre no homem. Com a picada do mosquito, são injetados esporozoítos que atingem a corrente sanguínea. Após uma hora, eles desaparecem do sangue e passam para as células do fígado, onde sofrem um estágio de desenvolvimento e multiplicação, denominado fase pré-eritrocítica ou fase exoeritrocítica. Ao final desse estágio, os hepatócitos se rompem e liberam merozoítos. Estes penetram na hemácia formando parasitos móveis denominados trofozoítos

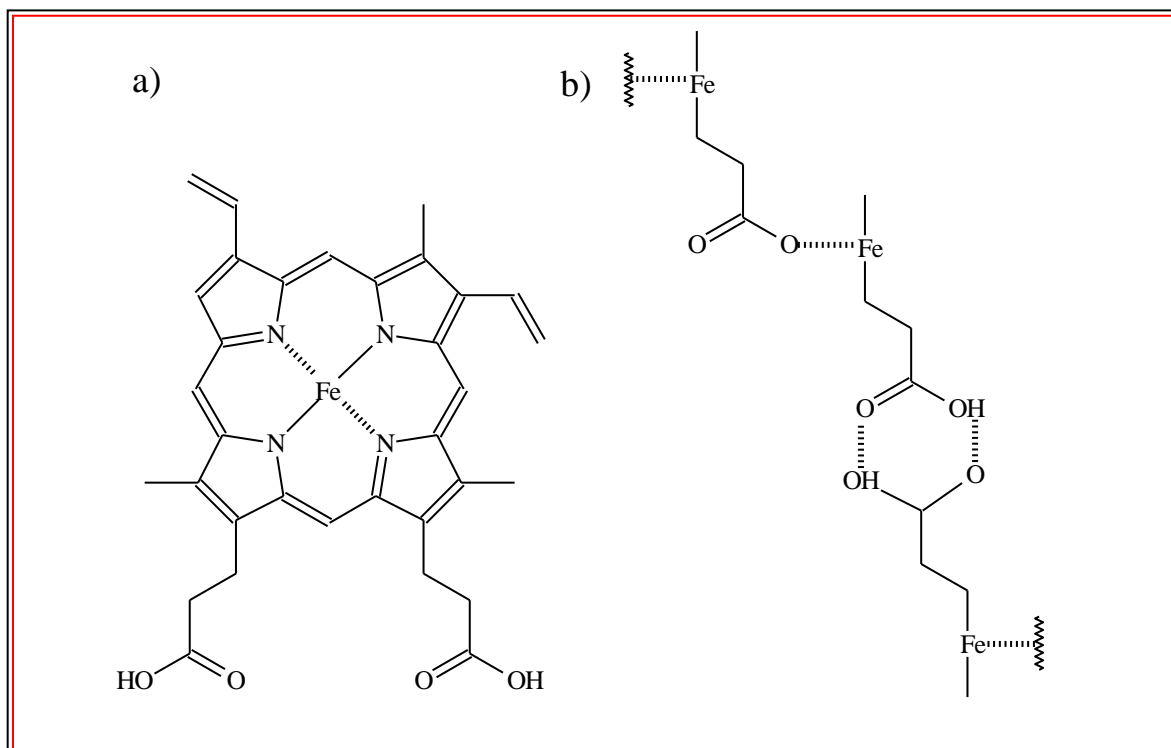
ou são fagocitados pelas células de defesa (monócitos, plasmócitos ou por polimorfonucleares) (Figura 7).



**Figura 7:** Ciclo biológico dos parasitos que causam a malária  
**Fonte:** FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008.

Recentemente, estudos têm apontado que a transmissão pode se processar sem o rompimento das células hepáticas com a consequente liberação dos merozoítos. A forma esporozoítica é depositada na derme e se diferencia no fígado. Esporozoítos movéis podem invadir células hospedeiras, desregulando a membrana plasmática e migrando através dele, ou através da formação de uma junção célula-parasito ficando dentro de um vacúolo intracelular. A travessia em células hepáticas, observada por esporozoítos *in vivo* é justificável para ativar o esporozoítos no intuito de infectar um hepatócito final (ALBUQUERQUE et al, 2010; AMINO et al, 2008).

O desenvolvimento e multiplicação destas células constituem a fase eritrocítica. Na hemácia ocorre a digestão de hemoglobina, sendo esta uma fonte nutricional para o parasito (VERONESI, 1991; NEVES, 1998). O grupo prostético heme (Figura 8a), proveniente da digestão de hemoglobina, não é catabolizado pelo parasito. Por oxidação no vacúolo digestivo o grupo heme forma um polímero insolúvel, denominado pigmento malárico ou hemozoína (Figura 8b) (SLATER, 1991; BOHLE, 1997), o qual é excretado para o citosol da hemácia (VERONESI, 1991; NEVES, 1998).



**Figura 8:** As figuras “a” e “b” representam o heme e a hemozoina, respectivamente.  
**Fonte:** TARANTO, 2003.

Após sua replicação, o parasito na hemácia é denominado esquizonte e seu crescimento e divisão, esquizogonia. Esta resulta na liberação de merozoítos quando a hemácia se rompe. Alguns merozoítos liberados penetram novamente nas hemácias e se diferenciam para formar os gametócitos que passarão para o sangue permanecendo ativos durante 30 dias (VERONESI, 1991; NEVES, 1998).

As manifestações clínicas da malária, febres e calafrios, são associadas com a ruptura sincronizada dos eritrócitos infectados. A maior parte dos merozoítos liberados na eclosão dos esquizontes invade outros eritrócitos dando origem a outros esquizontes. Alguns, todavia, se diferenciam em formas sexuadas masculinas e femininas chamadas de microgametócitos e macrogametócitos, respectivamente (FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008).

Estes gametócitos permanecem na corrente sanguínea até serem ingeridos por uma fêmea do *Anopheles* numa eventual refeição de sangue. Dentro do intestino delgado do mosquito, os gametócitos sofrem rápida divisão celular, produzindo 8 microgametas flagelados cada um, os quais fertilizarão os macrogametas formando assim os oocinetos (macrogametas fecundados). Os oocinetos atravessam a parede do intestino e formam cistos em sua parte exterior, chamados de oocistos. Em poucos dias os oocistos sofrem a esporogonia e se rompem liberando centenas de esporozoítos que, eventualmente, migrarão

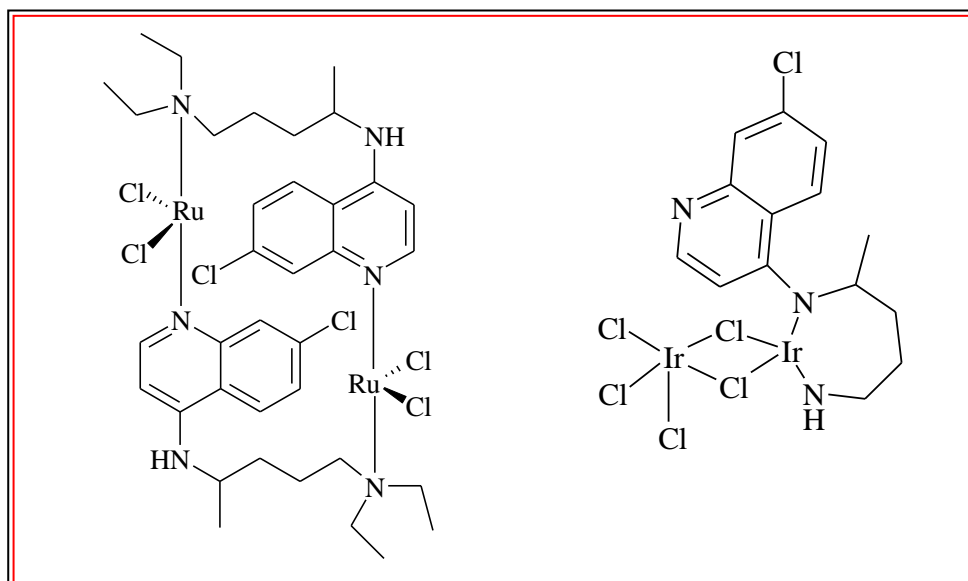
para as glândulas salivares do mosquito prontos para serem injetados em outro hospedeiro vertebrado (VERONESI, 1991; NEVES, 1998).

Uma vez injetadas no hospedeiro, todas as espécies de *Plasmodium* penetram os hepatócitos. Em algumas formas de malária, alguns esporozoítos ao entrarem nos hepatócitos formam hipnozoítos, formas de repouso do parasito, que podem ser reativadas para continuar um ciclo exoeritrocitário de multiplicação (VERONESI, 1991; NEVES, 1998).

### 2.3.2 Resistência Parasitária

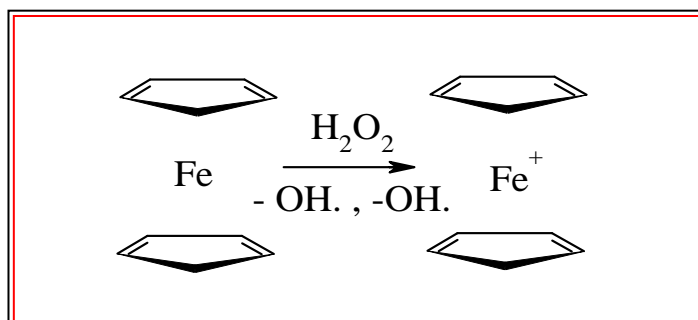
#### 2.3.2.1 Estratégia Bioorganometálica

Em vista dos problemas de resistência que os fármacos antimaláricos apresentam, pesquisadores de todo o mundo têm buscado planejar novos fármacos a partir de modificações estruturais naqueles existentes. Nesse âmbito, destaca-se a química bioorganometálica, que se encontra na interface entre a química organometálica e a biologia. Nos últimos anos esta nova área de pesquisa tem despertado interesse, uma vez que a incorporação de metais de transição à estrutura de um fármaco pode acentuar a sua atividade biológica. Por exemplo, foi descrito que a complexação da cloroquina por sais de rutênio (III) e irídio (III) deu origem a compostos mais ativos *in vitro* contra o *P. berghei* do que a cloroquina difosfato (Figura 9).



**Figura 9:** Estruturas químicas dos complexos de Ru<sup>3+</sup> e Ir<sup>3+</sup> da cloroquina.  
**Fonte:** FRANCISCO; VARGAS, 2010.

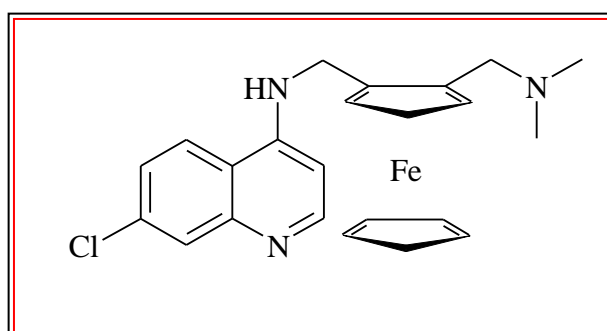
A utilização do grupo ferrocenil, derivado do ferroceno, como grupo farmacofórico, vem sendo bastante explorada. O ferroceno é um composto estável, não-tóxico, que exibe propriedades interessantes de oxi-redução, as quais se devem à sua capacidade de sofrer oxidação reversível, com a geração de espécie do tipo cátion-radical – íon ferrocênio (Figura 10).



**Figura 10:** A estrutura do ferroceno e seu respectivo cátion radical.

Fonte: FRANCISCO; VARGAS, 2010.

A estratégia bioorganometálica foi aplicada a diversos fármacos antimaláricos atualmente em uso. Em meados de 1990, foi lançado um programa de pesquisa de fármacos com o objetivo de se descobrir novos agentes antimaláricos. De uma primeira análise com 50 compostos que continham o grupo Ferroceno emergiu um candidato promissor: a 7-cloro-4-[(2-N, N'-dimetilaminometil) ferrocenilmetilamino] quinolina (SR97193), mais conhecida como ferroquina (Figura 11). Este composto mostrou uma impressionante atividade antimalárica, sendo muito mais ativo do que a cloroquina contra as linhagens de *P. falciparum* sensíveis e resistentes à cloroquina.



**Figura 11:** A estrutura da ferroquina.

Fonte: FRANCISCO; VARGAS, 2010.

Estudos mostraram também que além de não haver resistência cruzada entre a ferroquina e os demais antimaláricos quinolínicos, a atividade independe das mutações dos genes do *P. falciparum*, o que não ocorre com a cloroquina. Tal fato sugere que este composto, ora apresente modo diferente de ação, ora mecanismos diferentes de resistência.

Deve-se ressaltar que o ferroceno, propriamente dito, não apresenta atividade antimalárica. A síntese de ferroquina é relativamente simples e econômica, o que torna este composto atrativo para países em desenvolvimento. A ferroquina está sendo desenvolvida pela Sanofi-Aventis e, desde 2007, se encontra em ensaios clínicos da Fase II, em combinação com o artesunato de sódio conforme recomendado pela OMS (FRANCISCO; VARGAS, 2010).

A resistência à cloroquina e à sulfadoxina-pirimetamina tem resultado em milhões de mortes ao longo dos últimos 40 anos. O parasito da malária tem a capacidade de desenvolver resistência aos principais fármacos antimaláricos. *P. falciparum* resistentes à cloroquina foi detectado pela primeira vez na década de 1960 no Sudeste Asiático e América do Sul. Estudos apontam que a resistência à cloroquina foi o resultado de uma mutação em um ponto único no gene transportador Pfcr1 (BRAY et al, 2005).

Mais recentemente, mutações no gene Pfmdr1 que confere resistência a multi-drogas foi detectada. A resistência à cloroquina levou a uma mudança na terapia para a sulfadoxina-pirimetamina, mas a resistência foi observada em menos de cinco anos, razão pela qual essa terapia não é mais útil em várias partes do mundo. Os gametócitos são um importante mecanismo de resistência e um aumento da duração e da densidade de gametócitos após o tratamento com sulfadoxina-pirimetamina é indicativo de desenvolvimento de resistência. Os fármacos que bloqueiam a transmissão por eliminação dos gametócitos serão necessários para diminuir a resistência (WORLD MALARIA REPORT, 2010).

É inevitável que a resistência também, eventualmente venha a se desenvolver com as terapias combinadas com derivados da artemisinina e a necessidade de um suprimento contínuo de novos fármacos será necessário para prevenir mortes decorrentes da malária. A capacidade do parasito da malária para desenvolver resistência torna imprescindível que qualquer programa de desenvolvimento de fármacos leve em consideração o histórico de resistências aos fármacos atuais. Estudos de farmacocinética, que determinam a “janela” que pode selecionar resistência os fármacos antimaláricos, estão sendo usadas para projetar os fármacos combinados e retardar o desenvolvimento de resistência (FRANCISCO; VARGAS, 2010).



## 2.4 FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS CLÁSSICOS

Atualmente os fármacos antimaláricos são baseados em produtos naturais ou compostos sintéticos produzidos a partir da década de 40. Esses fármacos são específicos para cada etapa do ciclo de vida do *Plasmodium sp*, sendo assim classificados de acordo com a ação nos diferentes estágios do ciclo biológico do parasito. Desta forma, os fármacos antimaláricos podem ser classificados como (RANG; DALE, 2008; JEFFORD, 1997; FRÉDÉRICH et al, 2002):

- Agentes esquizonticidas sanguíneos;
- Agentes esquizonticidas teciduais;
- Agentes profiláticos;
- Agentes que bloqueiam a transmissão entre o homem e o mosquito.

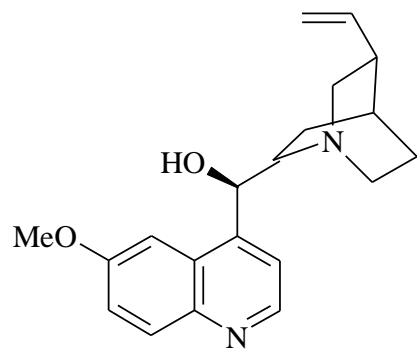
Os agentes esquizonticidas sanguíneos, também conhecidos como fármacos para a cura clínica ou supressiva, são usados no tratamento da fase aguda. São eficazes contra as formas eritrocitárias do parasito. Neste grupo estão os quinolinometanóis (quinina, mefloquina), 4-aminoquinolínicos (cloroquina), fenantreno (halofantrina), agentes que interferem na síntese ou ação do ácido fólico (sulfadoxina, dapsona, pirimetamina) e os endoperóxidos (artemisinina e derivados). Os antibióticos da classe das tetraciclina (tetraciclina e doxiciclina) são úteis quando combinados com esses agentes (RANG; DALE, 2008).

Os agentes esquizonticidas teciduais levam à cura radical e são eficazes nas formas hepáticas do parasito e em gametas. Faz parte desse grupo o agente 8-aminoquinolínicos (primaquina) (RANG; DALE, 2008). Os agentes profiláticos bloqueiam a passagem do estágio exoeritrocitário para o eritrocitário, matando o parasito quando este deixa o fígado, conseqüentemente impedindo os ataques de malária. Alguns fármacos desta classe são cloroquina, mefloquina, proguanil, pirimetamina, dapsona e doxiciclina (RANG; DALE, 2008). Os fármacos que bloqueiam a transmissão do homem para o mosquito são aqueles que têm a capacidade de destruir os gametócitos, dentre os quais se encontram primaquina, proguanil e pirimetamina (RANG; DALE, 2008). É importante mencionar que os fármacos

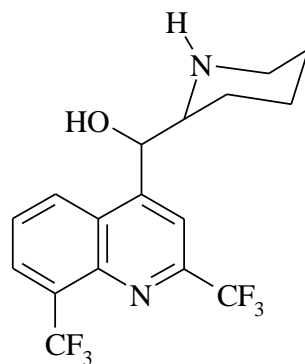
antimaláricos podem atuar contra mais de uma forma do protozoário e serem efetivos contra uma espécie, mas totalmente ineficazes contra outras (FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008).

Além do modo de classificação dos fármacos antimaláricos pelo modo de ação no ciclo biológico no parasito, existe uma classificação que descreve os fármacos em três grandes grupos. O primeiro grupo inclui os alcalóides derivados da *cinchona*, as aminoquinolinas e as acridinas. Acredita-se que esses fármacos podem interferir no metabolismo da glicose em diferentes pontos e também na habilidade do parasito de digerir a hemoglobina, impedindo, assim, que ele se alimente ou intoxicando-o com altos níveis de ferriprotoporfirina-IX (heme), que é um subproduto tóxico da digestão da hemoglobina (RANG; DALE, 2008, JEFFORD, 1997).

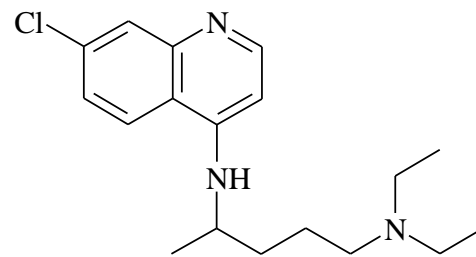
O segundo grupo inclui as pirimidinas e biguanidas e envolve a interferência na síntese do ácido tetra-hidrofólico, importante cofator no processo de síntese de DNA e de aminoácidos (FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008). O terceiro grupo inclui os derivados da artemisinina o qual o mecanismo ainda se encontra em debate, porém estudos apontam para geração de espécies radiculares, matando o parasito por estresse oxidativo. Alguns dos antimaláricos clássicos são mostrados na Figura 12.



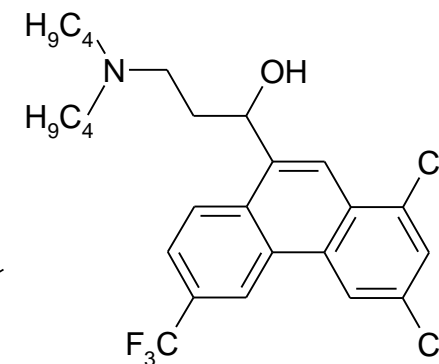
**Quinina**



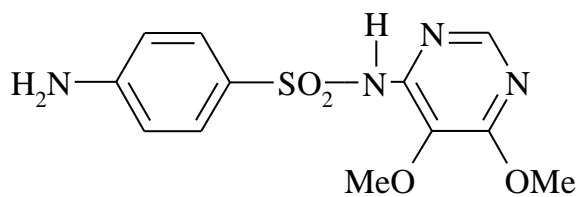
**Mefloquina**



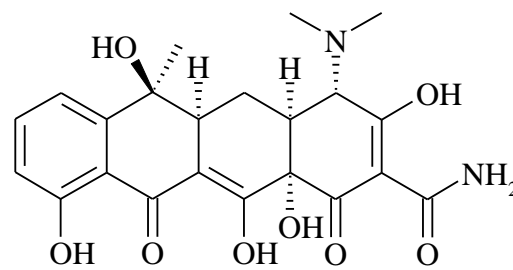
**Cloroquina**



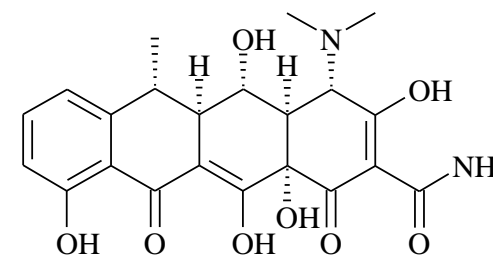
**Halofantrina**



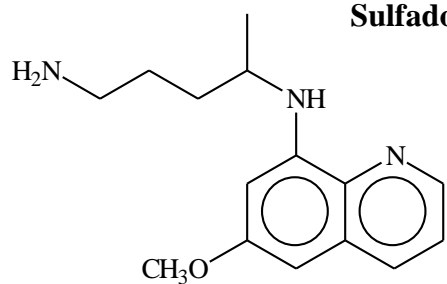
**Sulfadoxina**



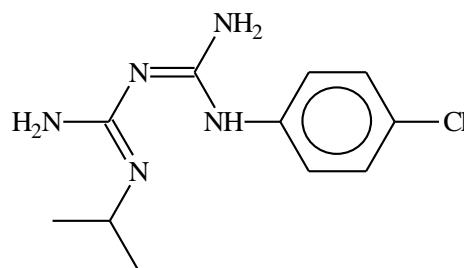
**Tetraciclina**



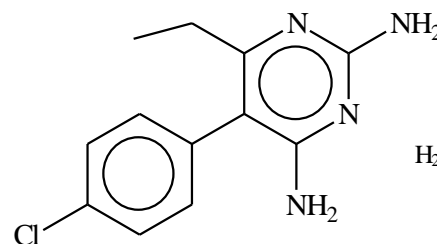
**Doxiciclina**



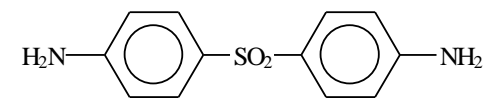
**Primaquina**



**Proguanil**



**Pirimetamina**



**Dapsona**

**Figura 12:** Fármacos antimaláricos clássicos  
**Fonte:** TARANTO, 2003.

Os antimaláricos mais difundidos pertencem ao grupo das 4-aminoquinolinas. Estes compostos que apresentam o núcleo quinolínico têm sido amplamente utilizados devido à sua eficácia no combate à doença. A cloroquina e outros fármacos baseados no núcleo quinolínico (como a quinina, mefloquina e amodiaquina) têm sido usadas na profilaxia e no tratamento da malária. Estes compostos têm a capacidade de se acumular em altas concentrações nas paredes internas do compartimento ácido do parasito denominado, vacúolo digestivo. Neste local, a hemoglobina dos eritrócitos do hospedeiro, da qual o parasito se alimenta, é quebrada em aminoácidos, sendo o resíduo livre heme ou ferriprotoporfirina IX (Fe (III) PPIX), tóxico ao parasito. O parasito então o converte ao pigmento malárico hemozoína cristalino, insolúvel, inerte e não tóxico (FRANCISCO; VARGAS, 2010).

A cloroquina e os demais fármacos quinolínicos atuam impedindo a conversão da hematina à hemozoína. Este processo inibitório causa danos severos e mortais ao parasito. Contudo, resistência à cloroquina e aos demais fármacos quinolínicos tradicionais tem se alastrado por todas as áreas endêmicas, fenômeno que se torna ainda mais complicado pelo aparecimento de linhagens multiresistentes (FRANCISCO; VARGAS, 2010).

O tratamento da malária é complexo, longo e na maioria das vezes ineficaz, devido à reinfeção do paciente que muitas das vezes não possuem informações de estratégias eficazes no combate a doença como: a educação da população de risco, a quimioterapia eficiente, o combate do vetor por meios de inseticidas e uso frequente de mosquiteiros. A quimioterapia também é um dos problemas importantes em relação à malária, a resistência do parasito aos fármacos comumente utilizados na terapia é devido à evolução das espécies, onde a presença de fármacos e ambiente propício serve como evolução natural desses parasitos (LÓPEZ et al, 2010; CRAVO et al, 2001).

O desenvolvimento de uma terapêutica antimalárica ideal é caracterizado pela existência de uma atividade antiparasitária muito eficiente, com baixos índices de efeitos adversos para o hospedeiro. Atualmente as terapias empregadas são três classes de fármacos: os Amino-álcoois (que incluem os alcalóides da quina onde a quinina é a principal aminoquinolinas sintéticas), derivados artemisínicos (artemisinina e seus derivados) e Antifolatos (onde se incluem os antibióticos, como biguanidas e sulfanomidas) (VALE; MOREIRA; GOMES, 2005).

O mecanismo de ação dos fármacos quinolínicos ainda não é totalmente compreendido, acredita-se que seu modo de ação esteja relacionado à ligação direta ao grupo heme da hemoglobina; inibição de uma ferriprotoporfina-IX polimerase não identificada;

inibição da fosfolipase vacuolar; inibição da síntese de proteínas e interação com o DNA. Enfim o mecanismo de ação aparentemente está relacionada ao acúmulo destas bases fracas no lisossomo ácido do parasito e a ligação à ferriprotoporfirina-IX (grupo heme da hemoglobina) (FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008).

## 2.5 ARTEMISININA E ENDOPERÓXIDOS ANTIMALÁRICOS

Durante as décadas de 50 e 60 a OMS tentou erradicar a malária. O programa, baseado no uso de inseticidas potentes e de fármacos antimaláricos, teve como objetivo interromper o ciclo homem-mosquito por tempo suficiente para que o reservatório da malária desaparecesse. No início do programa, haviam 250 milhões de casos por ano. Entretanto, na década de 70 verificou-se que o programa havia falhado, devido a fatores econômicos, administrativos e biológicos (DIAS; FREITAS, 1997; RANG; DALE, 2008).

Em 1988, a OMS constatou que o número de infecções havia atingido o nível original (DIAS; FREITAS, 1997; RANG; DALE, 2008) e que o parasito tinha adquirido resistência aos antimaláricos tradicionais, tornando-os ineficazes. Houve um aumento no número de cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina na Ásia, América do Sul e Central e África. Com a intensidade crescente dos casos de malária tornou-se evidente a necessidade do desenvolvimento de novos agentes antimaláricos (DIAS; FREITAS, 1997).

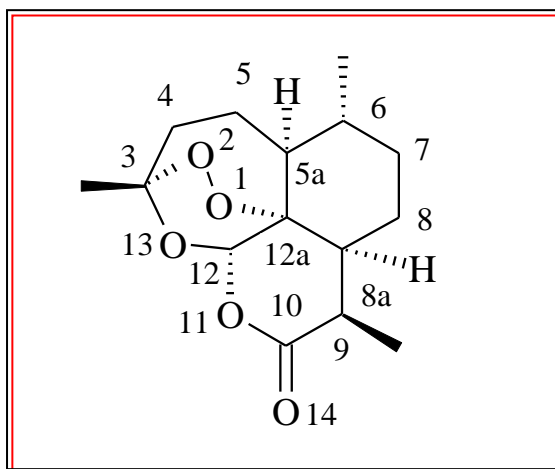
Em 1967, a República Popular da China iniciou um programa sistemático em busca de novos fármacos, empregando plantas nativas usadas como remédios em sua medicina tradicional (KLAYMAN, 1985). Uma dessas plantas, *Artemisia annua* L., já tinha uma longa história de uso. Conhecida como “*qing hao*” desde 168 a.C., foi usada inicialmente no tratamento de hemorróidas. No ano 340 d.C. ela foi descrita como antifebril no Manual de Prescrições para Emergências (*Zhou Hou Bei Ji Fang*), escrito por Ge Heng (MESHNICK, 2002). Em 1596 foi descrito no Compêndio de Matéria Médica (*Ben Cao Gang Mu*) que a febre poderia ser combatida com preparações de *qing hao* (MESHNICK, 2002).

Em 1798, a decocção de *A. annua* e *Carapax trionycis* foi sugerida como tratamento para a malária (KLAYMAN, 1985). Como resultado do programa iniciado em 1967, observou-se em 1971 que o extrato etéreo de *Artemisia annua*, obtido a baixa temperatura, apresentava atividade antimalárica. Em 1972 foi isolado o princípio ativo, não relatado na literatura anteriormente. Este foi denominado *qinghaosu* (QHS), que significa princípio ativo

de *qing hao*. Como nenhum detalhe sobre os procedimentos de isolamento foi relatado pela literatura chinesa, foi necessário que pesquisadores do *Walter Reed Army Research* investigassem o processo de extração a partir de partes aéreas da planta com vários solventes apróticos. Foi observado que o éter de petróleo era o solvente mais eficiente para a extração do princípio ativo (KLAYMAN, 1985).

O princípio ativo da *Artemisia annua* ficou conhecido no ocidente como artemisinina, sendo citada pelo *Chemical Abstracts* como “*artemisinin*” (KLAYMAN, 1985). Em 1979 o *Qinghaosu Antimalaria Coordinating Research Group* descreveu que 2.099 casos de malária foram tratados com qinghaosu e todos os pacientes levados à cura clínica. Destes casos, 143 eram causados por parasitos resistentes à cloroquina e 141 eram casos de malária cerebral, para os quais o tratamento gerou bons resultados (KLAYMAN, 1985). Neste mesmo ano a estrutura da artemisinina foi determinada por difração de raios-X (LUO; SHEN, 1987). A sua síntese total foi obtida no ano de 1983 (SCHMID; HOFHEINZ, 1983). Da sua fonte natural, *Artemisia annua*, a artemisinina pode ser obtida por extração (FRÉDÉRICH et al, 2002) das folhas e flores, com rendimento de 0,01-0,8% do peso seco (BALINT, 2001). Os maiores fornecedores são a China e o Vietnã (FRÉDÉRICH et al, 2002).

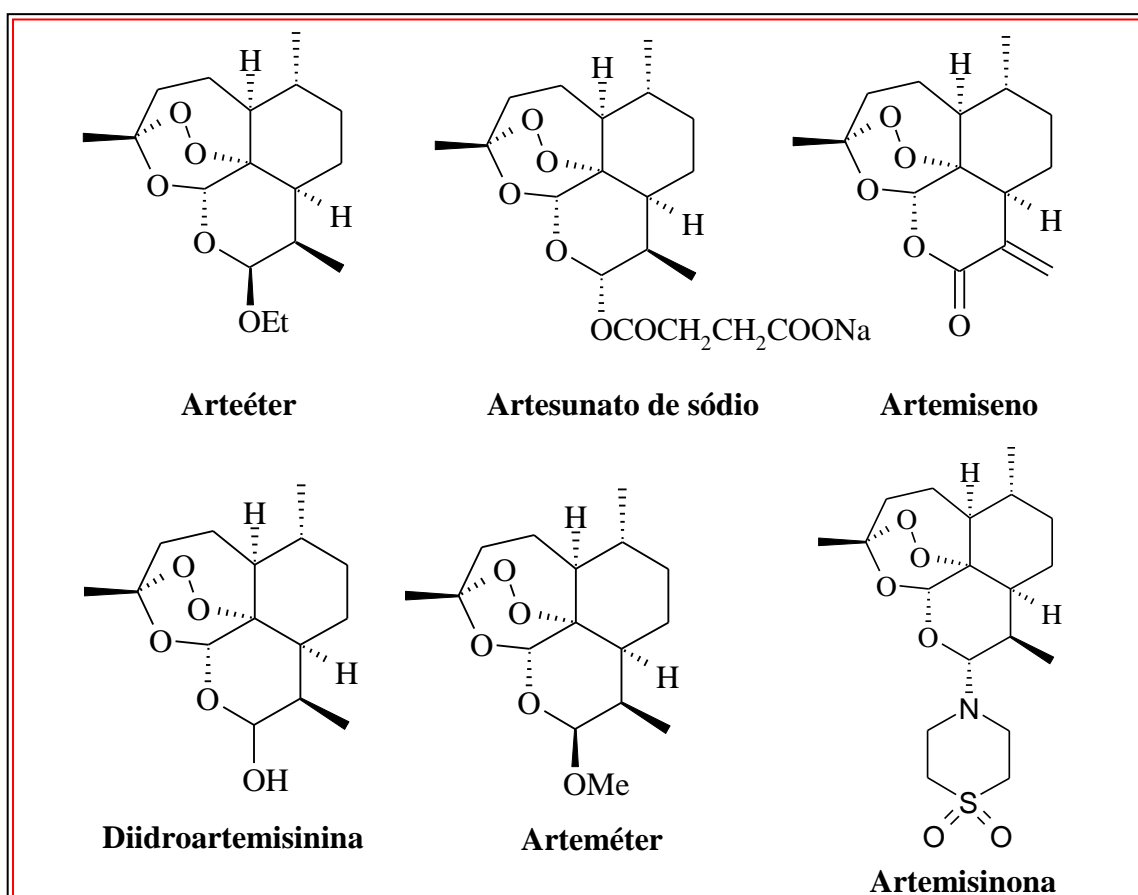
O nome artemisinina deve-se ao sabor amargo de *qing hao* e tem origem no nome de Artemísia, esposa e irmã do rei Helicarnosso que viveu no século IV. Após a morte do marido, Artemísia passou a misturar cinzas de *qing hao* a tudo aquilo que bebia para torná-lo amargo (RANG; DALE, 2008). A artemisinina é uma lactona sesquiterpênica que possui uma ligação endoperóxido (Figura 13).



**Figura 13:** Artemisinina  
**Fonte:** TARANTO, 2003.

A artemisinina apresenta baixa biodisponibilidade para formulações de uso oral, reincidivas das infecções, ação limitada na fase eritrocítica e, assim como os demais fármacos, podem vir a apresentar redução de sua atividade antimalárica devido ao desenvolvimento de resistência pelo parasito, tornando-a ineficaz como um antimalárico ideal (MESHNICK et al, 1996; BORSTNIK et al, 2002).

Desde seu isolamento, vários derivados da artemisinina foram sintetizados, obtendo-se substâncias mais ou menos ativas do que a artemisinina. Entre os derivados mais comuns estão o diidroartemisinina (DQHS), arteéter, artemisiteno e artesunato de sódio, todos contendo o grupamento peróxido (Figura 14) (BALINT, 2001; LUO; SHEN, 1987).



**Figura 14:** Derivados da artemisinina.  
**Fonte:** TARANTO, 2003.

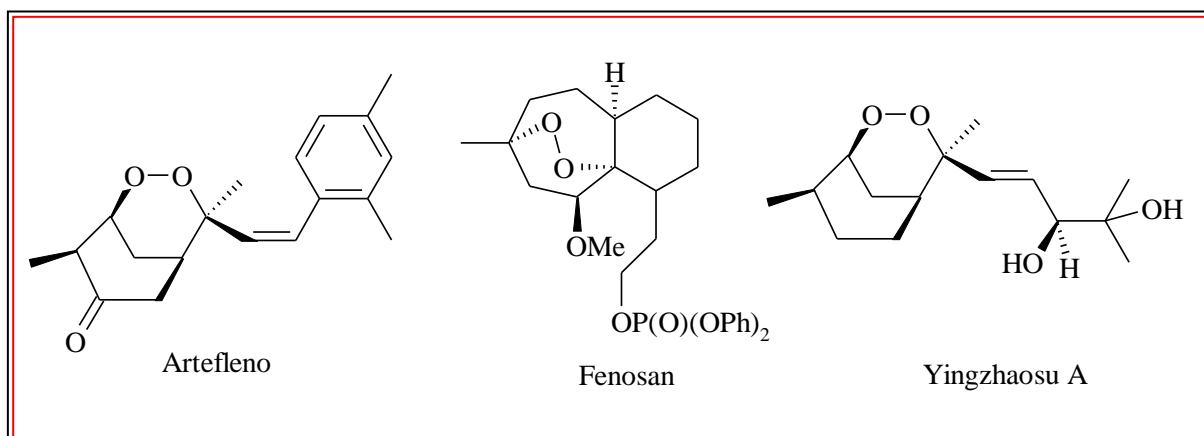
Estes compostos foram denominados de endoperóxidos de primeira geração, exceto a artemisinona, e são empregados na quimioterapia da malária na Tailândia, Vietnã, Brasil e China, onde a resistência ao parasito é comum (MESHNICK et al, 1996). A estrutura aparentemente complexa da artemisinina não é condição indispensável para a atividade antimalárica. Nos vários sistemas sintetizados e testados o grupamento fundamental é a ligação peróxido (MESHNICK; TAYLOR; KAMCHNONGPAISAN, 1996).

A artemisinona é um derivado semi-sintético da diidroartemisinina, o qual também é um derivado da artemisinina, que tem demonstrado promissora eficácia para o tratamento da malária *falciparum* não complicada, de acordo com os ensaios clínicos de fase II para este fármaco. A artemisinona é um dos principais candidatos da segunda geração de derivados semi-sintéticos da artemisinina desprovido de neurotoxicidade para o tratamento antimalárico. Este fármaco mostrou 3-5 vezes maior atividade *in vitro* do que o artesunato contra *Plasmodium falciparum* (HAYNES et al, 2006).

Em geral, os endoperóxidos possuem algumas vantagens sobre os demais fármacos antimaláricos. Entre elas pode-se citar: pouca ou nenhuma resistência cruzada com outros fármacos antimaláricos e atuação mais rápida do que os demais fármacos antimaláricos (LUO; SHEN, 1987; MESHNICK et al, 1996). Contudo, há algumas desvantagens presentes nos endoperóxidos que podem dificultar o uso e o desenvolvimento de novos protótipos (LUO; SHEN, 1987; MESHNICK et al, 1996). Entre elas tem-se:

- Tempo de meia-vida curto;
- Pobre biodisponibilidade para formulações de uso oral;
- Evidências de neurotoxicidade em estudos pré-clínicos;

Devido a estas limitações, através de um programa sistemático de síntese e busca, foi desenvolvido um grupo de análogos sintéticos com estrutura mais simples e também com alta atividade antimalárica. Entre eles destacam-se: Fenozan e o artefleno. O artefleno foi desenvolvido a partir do composto natural yingzhaosu A, um endoperóxido estruturalmente mais simples do que a artemisinina, também isolado da flora tradicional chinesa com pouca atividade antimalárica (Figura 15).



**Figura 15:** Endoperóxidos estruturalmente mais simples do que a artemisinina.

Fonte: TARANTO, 2003.



### 2.5.1 Mecanismos de Ação dos Endoperóxidos

O mecanismo de ação da artemisinina e de outros endoperóxidos ainda não está completamente esclarecido. Novas metodologias estão sendo empregadas na tentativa de elucidar mais detalhadamente o mecanismo de ação da artemisinina, bem como novas teorias para a ação da artemisinina.

#### 2.5.1.1 Ação da artemisinina sobre o parasito

A artemisinina atua na fase eritrocítica como esquizonticida sangüíneo (JEFFORD, 1997). Experimentos com camundongos mostraram que a artemisinina causa mudanças morfológicas nas membranas de organelas do parasito (KLAYMAN, 1985). Oito horas após a sua administração, os trofozoítos começam a sofrer dilatação e ocorre deformação da membrana do vacúolo digestivo.

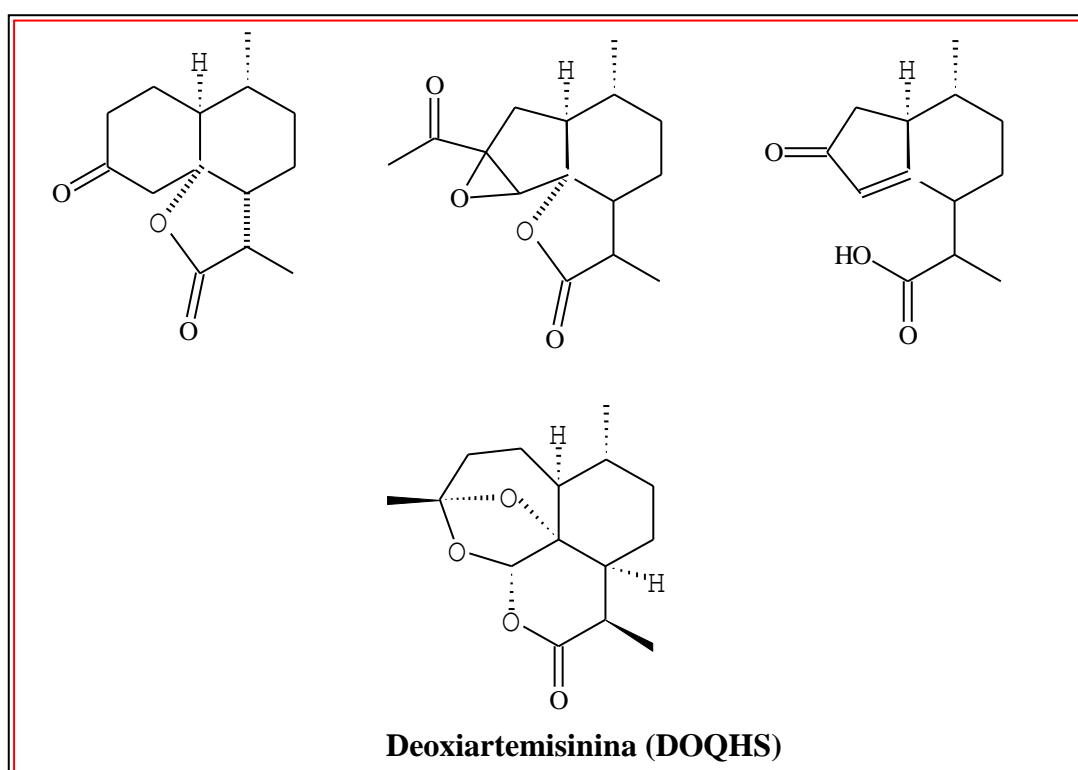
De 12 a 14 horas após a administração, a membrana do vacúolo digestivo se fragmenta e as membranas nucleares e da mitocôndria também se deformam em forma de espiral. Após 20-24 horas, as estruturas internas do parasito se degeneram (KLAYMAN, 1985). No homem, a temperatura corporal retorna ao normal 72 horas após a administração e a eliminação completa das formas assexuadas do parasito ocorre em 120 horas (KLAYMAN, 1985). A artemisinina apresenta ação seletiva, não havendo reação das proteínas de eritrócitos não infectados (MESHNICK et al, 1996).

#### 2.5.1.2 Importância do Grupo Peróxido

Vários agentes oxidantes contendo o grupamento peróxido, tais como o peróxido de hidrogênio e o hidroperóxido de tert-butila, levam a um processo biológico denominado estresse oxidativo (VENNERSTROM; EATON 1988; ABREU; FERRAZ; GOULART, 2002). Estresse oxidativo é um mecanismo de defesa químico, provocado por células sangüíneas contra patógenos. Estas células de defesa liberam peróxido de hidrogênio que ao formar o radical hidroxila lesa proteínas, açúcares, bases do DNA (ABREU; FERRAZ; GOULART, 2002) e causam peroxidação dos lipídios de membranas (adição radicalar às ligações insaturadas de fosfolipídios), levando à formação de fragmentos de ácidos graxos

tóxicos e, conseqüentemente, a lesões em membranas celulares, acarretando a morte celular (VENNERSTROM; EATON, 1988). Os organismos se protegem das espécies reativas de oxigênio através das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (ABREU; FERRAZ; GOULART, 2002).

Outras substâncias sesquiterpênicas extraídas da *A. annua*, as quais não apresentam o grupamento peróxido em sua estrutura, são destituídas de atividade biológica, inclusive a deoxiartemisinina, que é estruturalmente semelhante à artemisinina, exceto pela ausência da ligação peroxídica (O-O). A deoxiartemisinina possui atividade de 300 a 1000 vezes menor do que a artemisinina (Figura 16) (KLAYMAN, 1985).



**Figura 16:** Deoxiartemisinina e outros sesquiterpenos extraídos da *A. annua*  
**Fonte:** TARANTO, 2003.

Além do grupamento peróxido, o oxigênio 13 também é importante para a atividade da artemisinina, uma vez que derivados sintéticos em que este átomo foi substituído por um grupo metileno, formando carbaartemisinina, possuem atividade menor do que a artemisinina. Assim, o sistema 1,2,4-trioxano como um todo tem importante papel na atividade antimalárica da artemisinina (Figura 13). (AVERY et al, 1996).

### 2.5.1.3 Interação da artemisinina com o heme.

Experimentos *in vivo* mostraram que os peróxidos são antagonizados por quelantes de ferro tais como desferrioxamina, piridoxal benzoilidrazona e 1,2-dimetil-3-hidroxi-4-piridona quando administrados concomitantemente (VENNERSTROM; EATON, 1988; MESHNICK et al, 1993). Com base nesses dados, foi sugerido que o ferro presente na hemácia ou oriundo da digestão da hemoglobina seria o responsável por uma reação de oxi-redução com o grupamento peróxido (VENNERSTROM; EATON, 1988).

Nesta reação, o ferro em estado de oxidação +2 atua como agente redutor do grupamento peróxido, sendo ele próprio oxidado a  $Fe^{3+}$ . A reação entre o ferro e peróxidos é conhecida como Reação de Fenton ( $Fe^{+2} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{+3} + \cdot OH + \cdot OH$ ) (WALLING, 1975; SUTTON; WINTERBOURN, 1989). Nesta reação, de forma geral, os peróxidos são decompostos através da ação catalítica do ferro, com formação de radicais livres que levariam à oxidação de lipídios de membranas (GUTTERIDGE, 1986, BERMAN; ADANS, 1997).

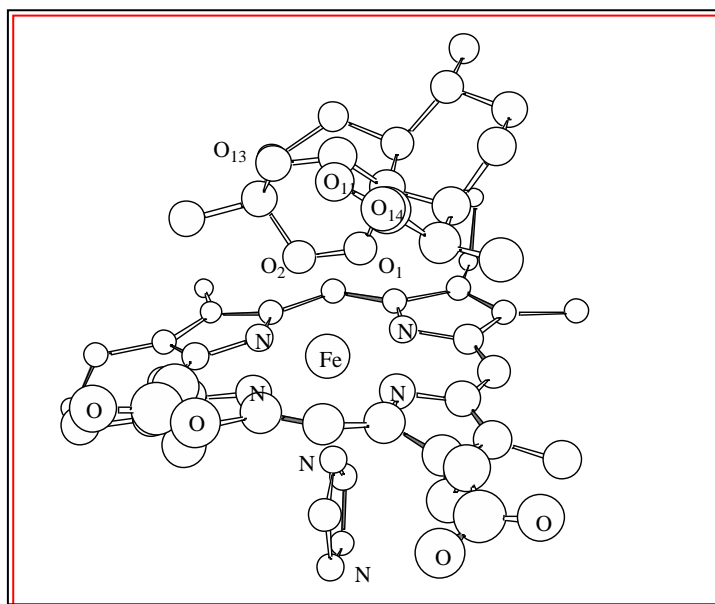
Outro elemento importante para a compreensão do mecanismo de ação dos endoperóxidos é o grupo heme, liberado na digestão da hemoglobina. Experimentos de cromatografia, eletroforese e espectrometria de massas mostraram que o heme tem um papel importante na toxicidade da artemisinina (MESHNICK; TAYLOR; KAMCHNONGPAISAN, 1996). Os produtos formados pela incubação da artemisinina em uma cultura de *Plasmodium sp* possuem as mesmas características que os produtos obtidos da reação entre a artemisinina e o heme isoladamente (MESHNICK et al, 1996)

A interação entre a artemisinina e o heme foi investigada em vários experimentos. Shukla; Gund e Meshnick (1995) empregaram a técnica de *docking* para estudar a interação entre a artemisinina e o heme. Cálculos da superfície de potencial eletrostático revelaram duas regiões com carga negativa, uma envolvendo os oxigênios do grupo peróxido e a outra sobre os três outros oxigênios da artemisinina. Estas duas regiões podem, em princípio, interagir com o ferro do heme. Cálculos da curva de isopotencial da deoxiartemisinina, derivado inativo, revelaram que a região negativa não é distribuída sobre os oxigênios do grupamento peróxido.

No processo de acoplamento entre a artemisinina e o heme, a conformação de menor energia apresenta a ligação endoperóxido próxima ao átomo de ferro do grupo heme. As conformações onde a interação da artemisinina com o heme não envolvem oxigênios do grupo

peróxido são de maior energia. Em contraste, o análogo inativo deoxiartemisinina se liga ao heme preferencialmente através dos oxigênios não peróxidos, diferentemente dos análogos da artemisinina (SHUKLA; GUND; MESHNICK, 1995).

Cálculos mais refinados (TARANTO; CARNEIRO; OLIVEIRA, 2001) revelaram que há uma única região de densidade de carga negativa, que se estende sobre todos os oxigênios. Estes cálculos mostraram ainda que, muito embora a região de densidade de carga negativa situe-se com maior intensidade sobre os oxigênios O<sub>11</sub> e O<sub>14</sub>, a interação entre a artemisinina e o heme realmente ocorre através do grupamento peróxido (O<sub>1</sub> e O<sub>2</sub>,) (Figura 17).



**Figura 17:** Interação entre o heme e a artemisinina através do grupamento endoperóxido.  
**Fonte:** TARANTO, 2003.

Yuthavong e colaboradores sintetizaram alguns derivados da artemisinina e determinaram suas afinidades de ligação com a ferroprotoporfirina IX (PAITAYATAT et al, 1997). A constante de dissociação do complexo formado entre os derivados da artemisinina e a ferroprotoporfirina IX mostra correlação estatisticamente significativa com as atividades antimaláricas dos derivados. Isto foi interpretado como indicativo de que a ligação entre a artemisinina e a ferroprotoporfirina pode ser uma etapa biologicamente importante no mecanismo de ação dos endoperóxidos (PAITAYATAT et al, 1997). Em experimentos de voltametria cíclica, a artemisinina e a diidroartemisinina foram reduzidas irreversivelmente pelo heme em concentrações catalíticas, mostrando comportamento similar ao observado para o peróxido de hidrogênio (CHEN et al, 1999; ZHANG; GOSSER; MESHNICK, 1992).

A literatura sugere várias hipóteses sobre a interação entre o heme e a artemisinina neste complexo transitório. Tonmunphean, Parasuk e Kokpol (2001) estudaram teoricamente a interação da artemisinina e derivados com o heme, no vácuo (método *ab initio* a nível HF).

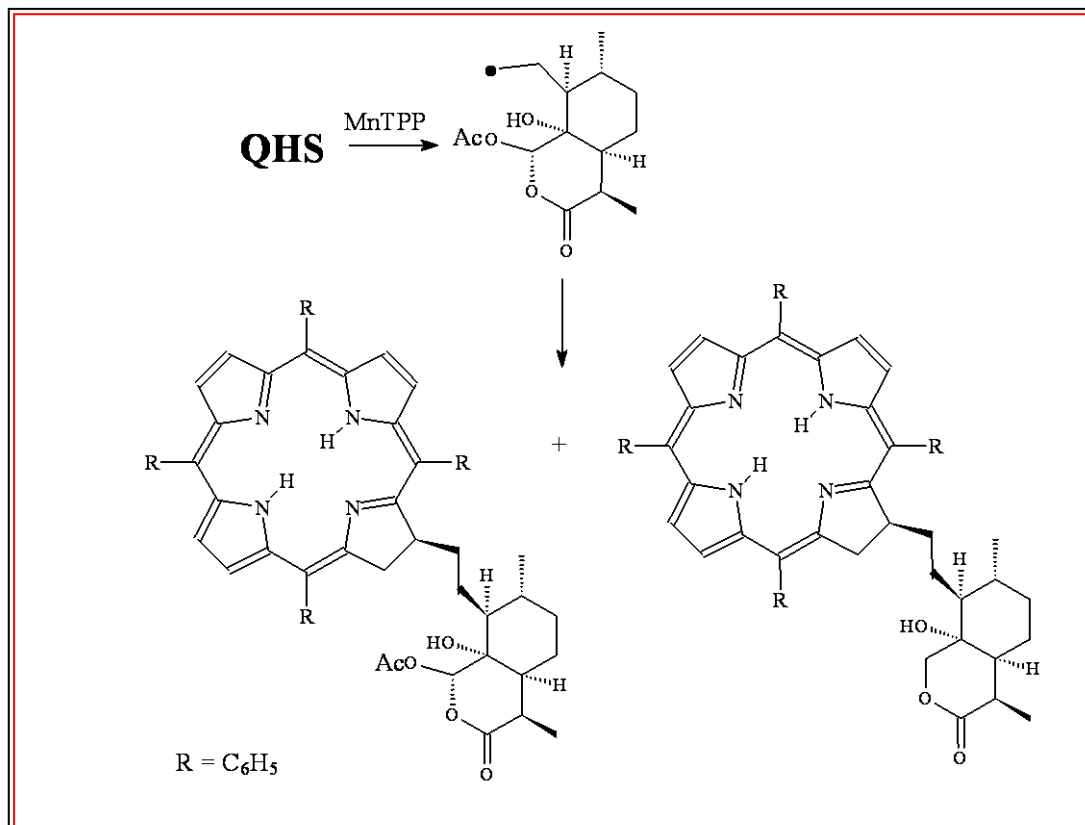
Os resultados mostraram que eles se aproximam do heme preferencialmente por intermédio do átomo de oxigênio  $O_1$  da ligação endoperóxido, em direção ao átomo de Fe do receptor heme. Este resultado difere do proposto anteriormente por Shukla, Gund e Meshnick (1995), os quais sugeriram que o átomo de oxigênio  $O_2$  da artemisinina e não  $O_1$  se liga ao ferro do grupo heme.

Tonmunphean, Parasuk e Kopol (2005), em outro estudo, utilizaram cinco tipos diferentes de estruturas do heme interagindo com a artemisinina. Estes cálculos mostraram que, em todas as interações, o átomo de oxigênio  $O_1$  da ligação endoperóxido da artemisinina se aproxima preferencialmente do átomo de Fe do heme e este mecanismo de aproximação é controlado por efeito estereoeletrônico. Ligantes próximos que aumentam o impedimento estérico na posição do átomo de ferro afetam significativamente as interações, como é o caso do desoxi-heme. Este heme possui uma estrutura na forma de “tigela”, devido à presença de um grupo histidina ligado ao Fe, fazendo com que a interação entre o endoperóxido da artemisinina e o átomo de ferro do heme seja menos favorável. Em outro estudo recente, Tonmunphean e colaboradores (2001) demonstraram novamente que o ataque da artemisinina ao ferro do grupo heme ocorre via  $O_1$ .

Pinheiro, Ferreira e Romero (2001) analisaram a interação existente entre a artemisinina e quatro análogos da mesma com o heme, utilizando o método de mecânica molecular. Diferenças significativas foram observadas na conformação do ligante e na sua orientação com relação ao heme e na conformação das cadeias livres do heme. As cadeias laterais livres do heme (as quais não foram congeladas durante os cálculos) dirigiram-se em direção aos substituintes ligados em  $C_9$  e  $C_{10}$  da artemisinina.

#### 2.5.1.4 Ação alquilante da artemisinina

A artemisinina é capaz de alquilar o heme de células infectadas, proteínas sanguíneas e, também, proteínas específicas do parasito (Figura 18) (OLLIARO et al, 2001a; MESHNICK, 2002).



**Figura 18:** Alquilação do heme pela artemisinina. (Aqui o grupo heme é simulado pelo MnTPP).  
**Fonte:** TARANTO, 2003.

A natureza alquilante da artemisinina foi demonstrada através de reações com a molécula de heme. Em solução, a artemisinina reage com o heme formando dois adutos covalentes, com relação  $m/z$  de 856 e 871, respectivamente, caracterizados por cromatografia em camada fina (CCF), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e experimentos de espectrometria de massas (MESHNICK et al, 1991; HONG; YANG; MESHNICK, 1994; KAMCHONWONGPAISAN; MESHNICK, 1996). A estrutura molecular destes adutos foi caracterizada por Robert e Meunier (1997, 1998), utilizando o manganês (II) *meso*-tetrafenilporfirina como modelo de heme. Posteriormente, estes autores determinaram o caráter alquilante do artefleno e de outros trioxanos sintéticos e observaram que compostos inativos também são capazes de gerar radicais livres, sem, contudo ter ação alquilante sobre o heme (PROVOT et al, 1999; CAZELLES et al, 2000). No entanto, ressalta-se que o aduto

formado entre o heme e a artemisinina não apresenta atividade antimalárica (HONG; YANG; MESHNICK, 1994).

A artemisinina e seus derivados marcados isotopicamente são capazes de alquilar proteínas sanguíneas como a catalase, citocromo C e hemoglobina, estas com o grupo heme em sua estrutura (YANG; LITTLE; MESHNICK, 1994), assim como a albumina,  $\alpha_1$ -glicoproteína, proteínas de membranas das células vermelhas como a  $\alpha$ - e  $\beta$ -espectrina, actina e gliceraldeído-3-fosfato deidrogenase, as quais não apresentam grupo heme em sua estrutura (KAMCHONWONGPAISAN; MESHNICK, 1996, YANG; LITTLE; MESHNICK, 1994). Foi observado que a alquilação não ocorre em células não infectadas pelo parasito e nem no DNA (KAMCHONWONGPAISAN; MESHNICK, 1996; YANG; LITTLE; MESHNICK, 1994), possivelmente devido ao impedimento estérico dos resíduos de aminoácidos complexados com o ferro.

As proteínas específicas do parasito também são alquiladas pela artemisinina e derivados, tal como o artefleno, marcados isotopicamente em concentrações fisiológicas, formando uma ligação covalente. Estas proteínas não são as proteínas mais abundantes no parasito, o que indica que esta alquilação é seletiva. Em nenhum caso a deoxiartemisinina, derivado inativo da artemisinina, foi capaz de alquilar proteína (BHISUTTHIBHAN et al, 1998).

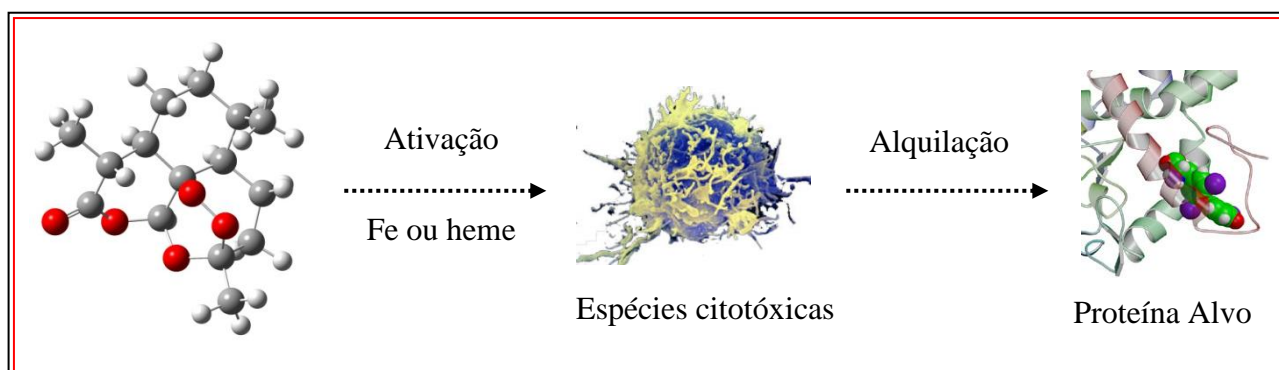
Estas proteínas apresentam peso molecular de 32, 25, 42, 50, 65 e >200 kDa (ASAWAMAHASAKDA et al, 1994; KAMCHONWONGPAISAN; MESHNICK, 1996), sendo que a proteína de 25 kDa é a proteína mais abundante. Esta foi isolada através de eletroforese, identificada, seqüenciada e posteriormente clonada, apresentando 100% de homologia com os aminoácidos 1-20 e 62-76 da família de proteínas denominadas TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*) (BHISUTTHIBHAN et al, 1998, BOWEN; SHIM, 1998). De modo interessante, esta proteína também apresenta afinidade com o heme.

Apesar da alquilação de proteínas estarem claramente associada à atividade dos endoperóxidos, não foi possível provar que este processo esteja relacionado com a atividade antimalárica e também não está claro como os radicais livres formados matam o parasito. De forma semelhante, pouco se sabe sobre a função fisiológica da TCTP (BHISUTTHIBHAN et al, 1998). Cepas de *P. yoelii*, menos sensíveis à artemisinina, acumulam cerca de 43% de  $^3\text{H}$ -diidroartemisinina e expressam 2,5 vezes mais TCTP do que cepas sensíveis. Estas duas

observações demonstram que a resistência à artemisinina pode ser devido a fatores múltiplos (WALKER et al, 2000).

### 2.5.1.5 Hipóteses sobre o Mecanismo de ação da artemisinina

Meshnick e colaboradores (1996) propuseram que o mecanismo de ação dos endoperóxidos antimaláricos deve ocorrer em duas etapas. Na primeira etapa, a artemisinina é ativada pelo heme ou pelo íon ferro (II) livre, produzindo radicais livres e espécies citotóxicas. Na segunda etapa, estas espécies reagem com uma proteína associada à membrana do parasito levando-o à morte (Figura 19)



**Figura 19:** Representação da ação da artemisinina proposto por Meshnick.  
**Fonte:** MESHNICK et al, 1996.

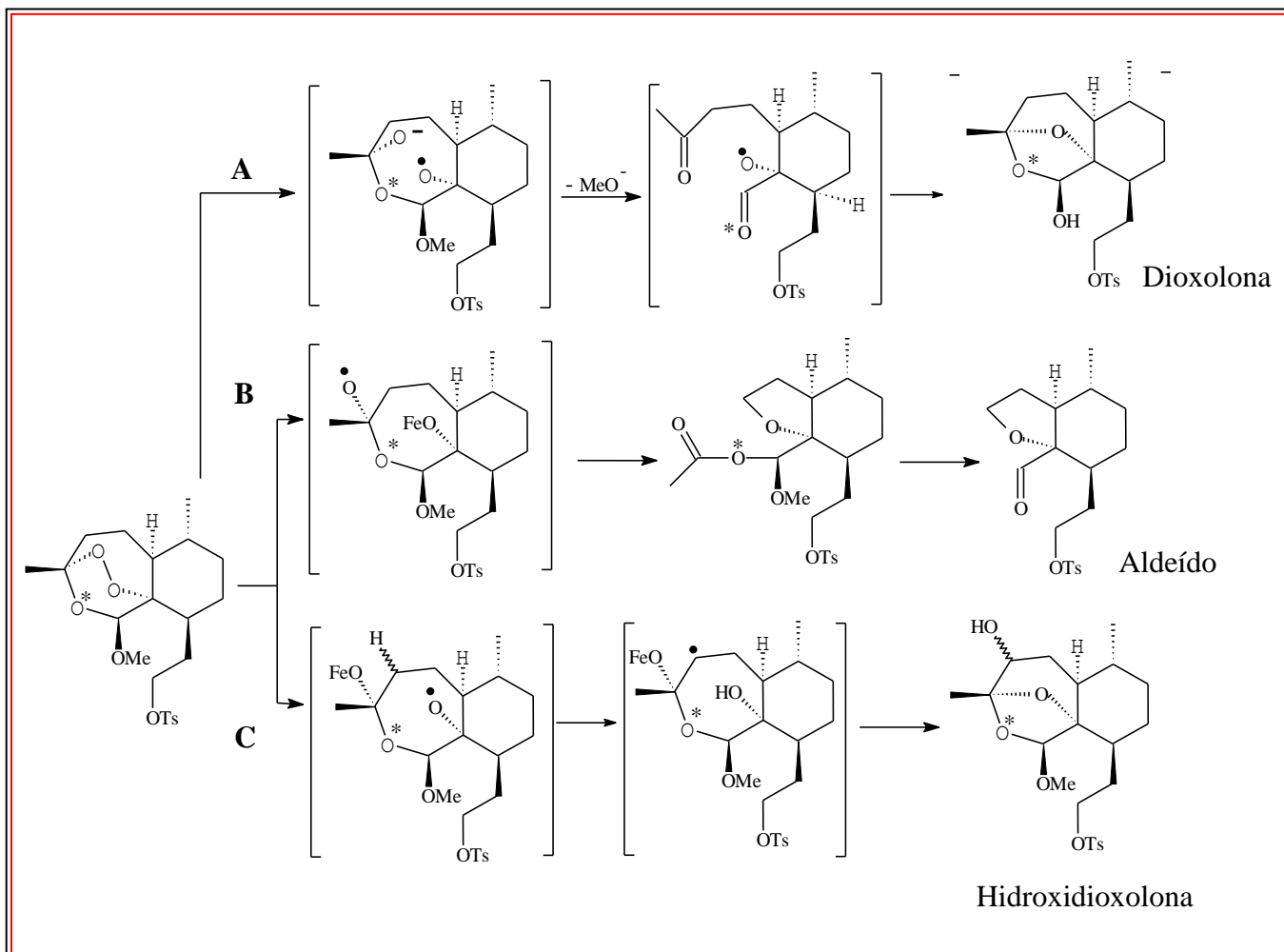
Pandey e colaboradores (1999) propuseram um possível mecanismo em três etapas, para explicar os efeitos dos endoperóxidos sobre o parasito. Estas etapas incluiriam inibição da degradação da hemoglobina, inibição da polimerização do heme e interação da artemisinina com a hemozoína, o que resultaria na quebra do pigmento malárico e formação de um complexo com as unidades de heme.

Estas sugestões explicam a formação rápida de heme livre e a consequente geração de uma fonte transitória de heme, responsável pela ação da artemisinina e dos demais endoperóxidos antimaláricos, sustentado a ação rápida destes fármacos quando comparados com os antimaláricos quinolínicos (PANDEY et al, 1999; KANNAN; SAHAL; CHAUHAN, 2002).

O mecanismo da reação entre a artemisinina e compostos contendo o íon ferro (II) foi estudado inicialmente por Posner e colaboradores (1994). Em um trabalho inicial, ele empregou um derivado 1,2,4 trioxano marcado isotopicamente e o reagiu com  $\text{FeBr}_2$  em



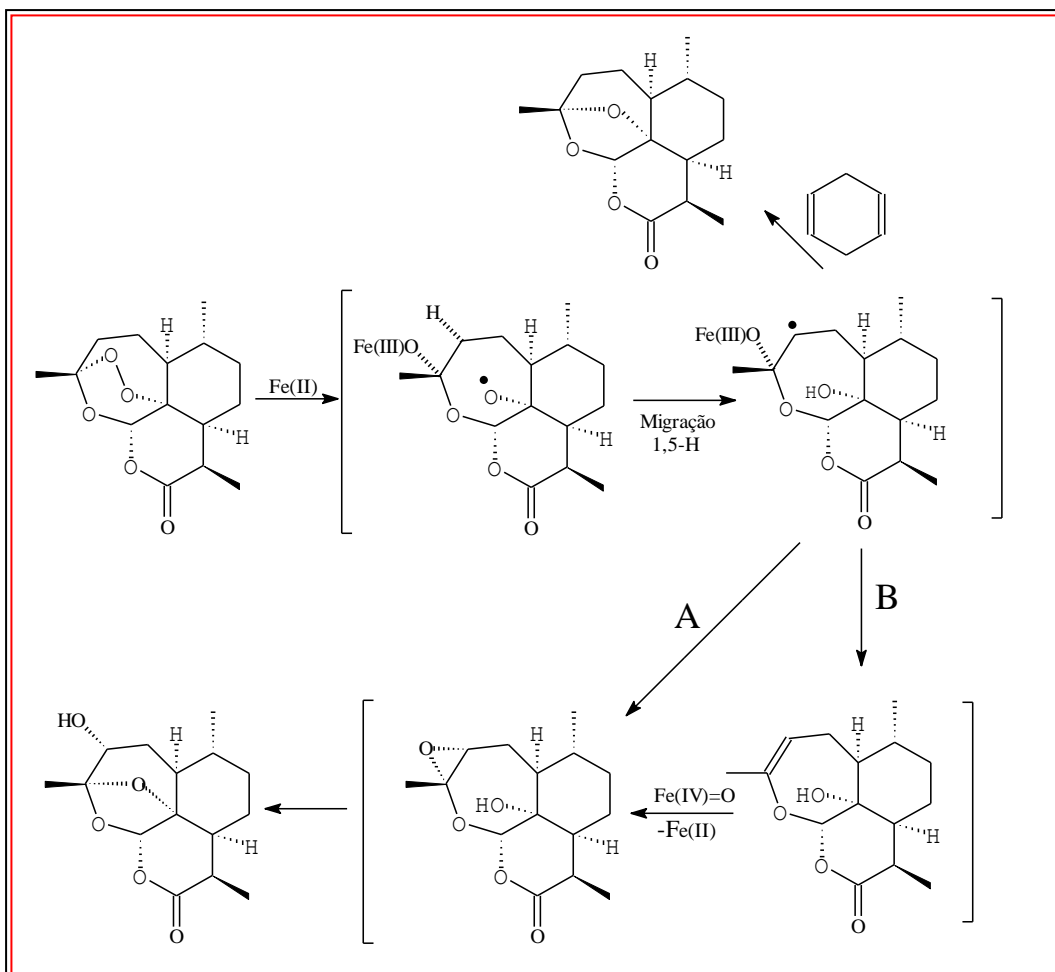
presença de Tetrahidrofurano (THF), levando à formação de três produtos: dioxolona, aldeído e hidroxidioxolona, todos produtos de metabolismo (Figura 20).



**Figura 20:** Mecanismo inicial proposto por Posner<sup>1</sup>.  
**Fonte:** TARANTO, 2003.

Em todos os casos ocorre inicialmente a quebra da ligação peróxido após transferência de um elétron do ferro (II) para a ligação O-O, seguida de deoxigenação, conforme mecanismo de ação dos endoperóxidos descrito anteriormente (POSNER; OH, 1992). Em trabalhos subseqüentes, ele avançou na interpretação do mecanismo propondo que este se passava através de migração de hidrogênio do tipo 1,5 (POSNER et al, 1994), levando à formação de um radical secundário em C<sub>4</sub> (Figura 21).

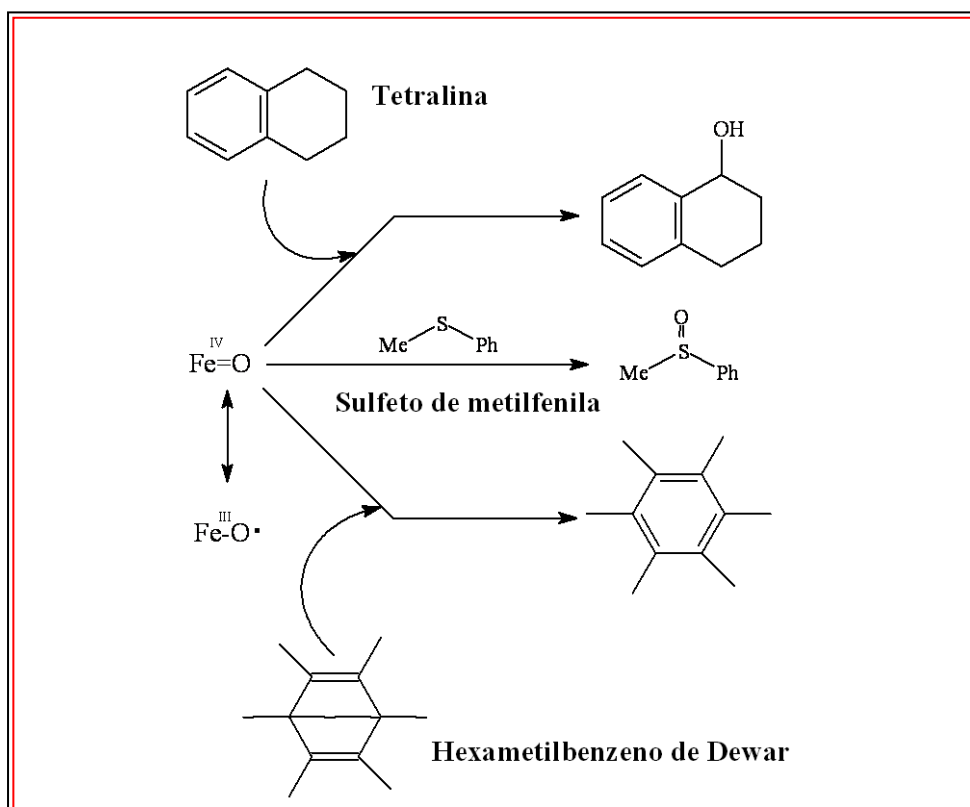
<sup>1</sup> A rota A leva à formação da dioxolona. Na rota B forma-se o aldeído, enquanto na rota C ocorre a formação do derivado hidrodioxolona.



**Figura 21:** Mecanismo proposto por Posner (migração 1,5 do H radical)<sup>2</sup>.  
**Fonte:** POSNER et al, 1994.

Esta conclusão estava relacionada à atividade de compostos substituídos na posição C<sub>4α</sub>, os quais apresentam baixa atividade biológica. Posner e colaboradores (1994) sugeriram que, além da formação de um radical secundário, a atividade antimalárica da artemisinina poderia originar-se na formação de um intermediário eletrofílico do tipo epóxi (POSNER et al, 1995), sendo este um potente agente alquilante, ou na formação de uma espécie ferro-oxo de alta valência. A presença desta última espécie foi mostrada em reações de captura com hexametilbenzeno de Dewar, que rearranja para hexametil benzeno, com sulfeto de metilfenila, sofrendo oxidação para o sulfóxido correspondente, e com tetralina, que é oxidada para hidroxitetralina (Figura 22).

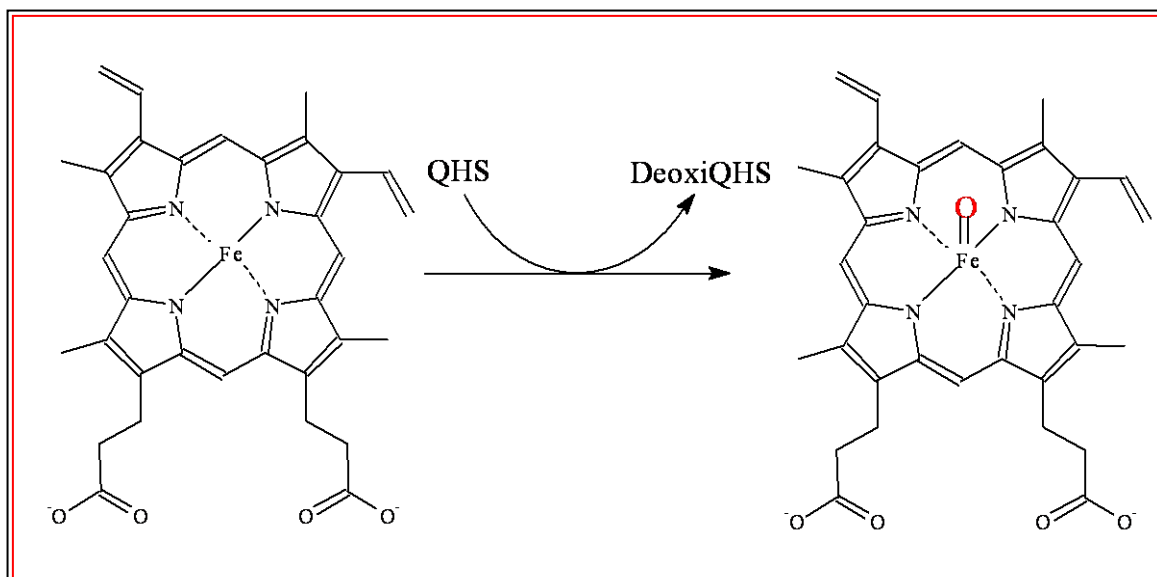
<sup>2</sup> Na rota A tem-se a saída direta de Fe(II) levando à formação do derivado epóxi e pela rota B forma-se o alceno correspondente que por oxidação origina a espécie epóxi.



**Figura 22:** Evidências da formação do intermediário ferro-oxo.  
**Fonte:** POSNER et al., 1995.

Outra observação importante está baseada no fato de que derivados da artemisinina que apresentam um bom grupo de saída na posição C<sub>4</sub> não formariam o intermediário ferro-oxo e, conseqüentemente, seriam compostos inativos. Finalmente, Posner e colaboradores propuseram que além dos fatos citados acima, ocorreria também a formação de um radical primário, oriundo da quebra homolítica da ligação C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>, com formação de dicetona e de formiato de metila, os quais também apresentam atividade antimalárica quando gerados *in situ* (CUMMING; PLOYPRADITH; POSNER, 1997).

No entanto, Posner foi duramente criticado por Jefford e colaboradores (1996) e por Avery e colaboradores (1996) tanto quanto à formação das espécies radicalares quanto à formação do produto intermediário do tipo epóxi. Jefford e colaboradores (1996) propuseram que a atividade antimalárica da artemisinina seria devido à interrupção do processo de desintoxicação do heme por transferência de um dos oxigênios do grupamento peróxido para o heme, levando à formação de um derivado oxiheme (Figura 23) (JEFFORD et al, 1995).

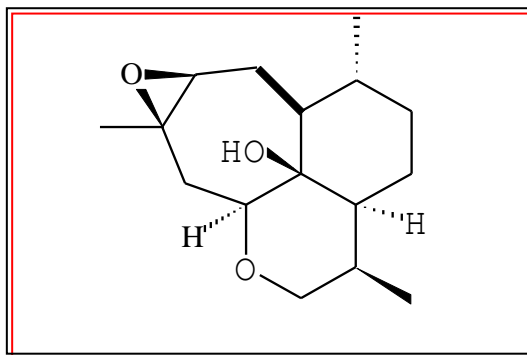


**Figura 23:** Formação do derivado oxiheme de por transferência de oxigênio da artemisinina para o heme.  
**Fonte:** JEFFORD et al, 1995.

Além disso, ele também propôs que a transferência de  $H_{4\alpha}$  não poderia ocorrer devido à grande distância entre o hidrogênio de  $C_4$  e o oxigênio  $O_2$ , acima de  $2,1 \text{ \AA}$ , não havendo portanto a formação do radical secundário em  $C_4$ . Além disso, o agente redutor no meio reacional de Posner seria o íon  $Br^-$  e não o  $Fe^{+2}$  (JEFFORD et al, 1996).

Cálculos de orbitais moleculares usando metodologias *ab initio* (GU et al, 1999, TARANTO; CARNEIRO; ARAUJO, 2005, 2006) ou semi-empíricos (TARANTO et al, 2002) mostraram que os anéis contendo o grupamento peróxido podem assumir uma conformação do tipo bote, com baixa energia de ativação, resultando em fácil migração do hidrogênio em  $C_{4\alpha}$  para o radical em  $O_2$ . Porém deve-se observar que os mesmos cálculos mostraram que a quebra homolítica da ligação  $C_3-C_4$  pode ser competitiva com a migração 1,5 de hidrogênio.

Por sua vez, Avery e colaboradores (1996) tentou isolar o epóxido através da síntese de um análogo mais estável, onde o  $O_{13}$  foi substituído por um grupo  $CH_2$ . Contudo, não houve evidências de que o epóxido havia sido formado durante o processo de rearranjo. Adicionalmente, um epóxido sintético semelhante à artemisinina apresentou-se completamente sem atividade antimalárica, talvez por questões de estereoquímica (Figura 24).

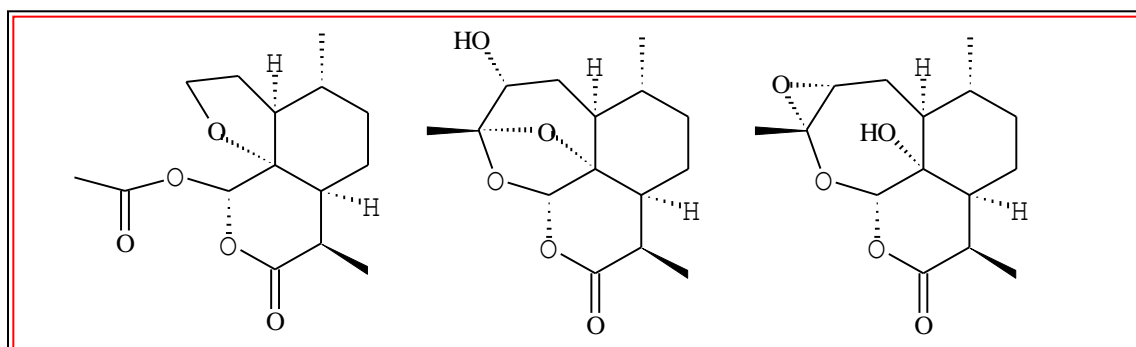


**Figura 24:** Derivado epóxido destituído de atividade biológica.

**Fonte:** AVERY et al, 1996.

Semelhantemente a Haynes e Vonwiller (1996) propuseram um mecanismo via espécies radicalares e por carbocátions as quais explicariam a formação dos produtos encontrados. Estes compostos seriam fontes de hidroperóxidos, fornecendo espécies eletrofílicas, radicais hidróxidos ou radicais alcóxidos, que potencialmente podem levar à morte do parasito (HAYNES; PAI; VOERSTE, 1999, OLLIARO et al, 2001b). Algumas observações podem ser feitas a respeito dessa hipótese. (i) Se a reação de abertura do anel endoperóxido for rápida o suficiente para competir com a reação de geração do radical livre, não haveria pequenas concentrações de ROOH e, portanto não poderia exercer um efeito fatal sobre o parasito. (ii) Ainda não foi caracterizada a biomolécula que sofreria a ação dos radicais gerados. (iii) Em princípio o parasito seria capaz de eliminar esses radicais através de enzimas contra o estresse oxidativo (WU, 2002).

Finalmente, Wu e colaboradores, 1998, propuseram um mecanismo para a reação entre a artemisinina e o heme que contempla os demais mecanismos descritos na literatura, além de explicar a formação de outros produtos identificados por eles. Estes autores estudaram o mecanismo de decomposição da artemisinina fazendo-a reagir com sulfato ferroso em acetonitrila, obtendo assim os produtos mostrados na Figura 25.



**Figura 25:** Produtos isolados por Wu e colaboradores, como resultado da reação de decomposição da artemisinina na presença de  $\text{FeSO}_4$ .

**Fonte:** WU et al, 1998

Similar ao mecanismo proposto por outros autores, a degradação da artemisinina começa com a transferência de elétrons do Fe (II) para a ligação endoperoxídeo, quebrando-a e levando à formação de dois ânions radicais (radical em O<sub>1</sub> ou radical em O<sub>2</sub>), os quais podem ser interconvertidos. Estes por sua vez, através de rotas isoladas, levam aos produtos finais.

Cabe ressaltar que durante o processo de redução com Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> não foi obtida a deoxiartemisinina, embora este composto seja predominante na reação com outros agentes redutores (POSNER; OH, 1992; POSNER et al, 1994; 1995; CUMMING; PLOYPRADITH; POSNER, 1997; CUMMING et al, 1998). Contudo, a sua formação foi proposta. Outro fato importante foi o isolamento do intermediário do tipo epóxido, obtido inicialmente por Posner em 1992 (POSNER; OH, 1992; POSNER et al, 1994; 1995; CUMMING; PLOYPRADITH; POSNER, 1997; CUMMING et al, 1998) e criticado por outros autores (AVERY et al, 2002). Entretanto o próprio Wu, 1998, descreve que este apresentou rendimento muito baixo (1 a 2%) e que foi isolado juntamente com outros produtos de alta polaridade e baixo ponto de fusão, sendo necessária uma reação de acetilação para que eles pudessem ser completamente isolados.

## 2.6 RECEPTOR PFATP6: NOVAS PERSPECTIVAS

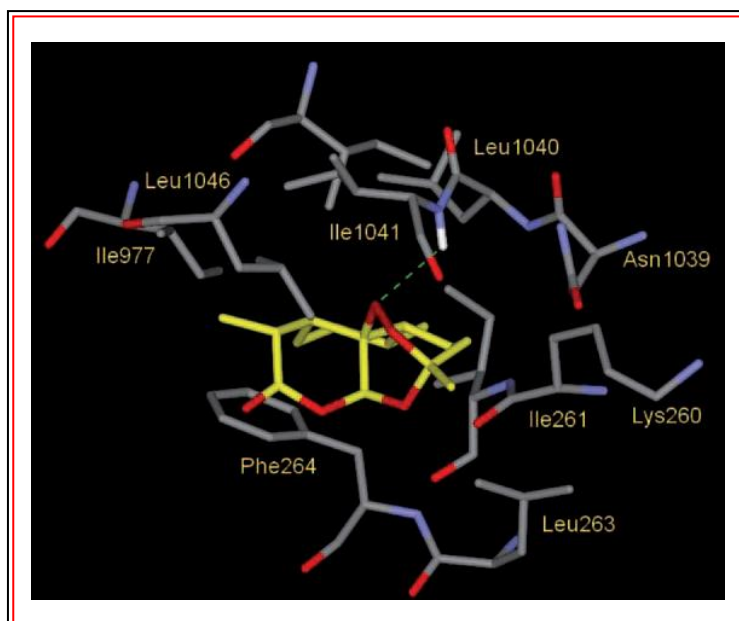
Recentemente Krishna e colaboradores (2008) apresentaram um novo alvo molecular para a artemisinina. No estudo realizado por Eckstein-Ludwing e colaboradores (2003), foi demonstrado que além da formação de radicais livres que alquilam várias proteínas, a artemisinina atua inibindo irreversivelmente a enzima ATPase cálcio-dependente (PfATP6) localizada no retículo endoplasmático ou seja, fora do vacúolo do parasito *Plasmodium falciparum* com alta especificidade, apesar de determinantes de seletividade ainda não terem sido identificados. Esta enzima trata-se de uma Ca<sup>+2</sup>-ATPase do retículo sarcoendoplasmático, homólogo a Ca<sup>+2</sup>-ATPase do retículo endoplasmático humano (SERCA).

Uma interação antagonista também foi relatada entre artemisinina e a tapsigargina, um inibidor específico da SERCA. No entanto, esses resultados não foram confirmados por uma publicação mais recente (GARAH et al, 2009). Estudos adicionais em ovócitos de *Xenopus* sugerem que mutações na posição 263 são capazes de modular a afinidade da artemisinina por PfATP6. Mutação S796N parece também estar relacionada à diminuição da sensibilidade do parasito a arteméter, um derivado da artemisinina. Em contrapartida, uma análise genética

indicou a ausência de mutação em genes ATP6 de artemisinina por *P. falciparum* e *P. chabaudi*, contrariando esta hipótese (GARAH et al, 2009).

A tapsigargina é uma lactona sesquiterpênica similar a artemisinina, que potencialmente inibe tanto as SERCA de mamíferos quanto do parasito *Plasmodium* spp. Esse composto aumenta os níveis de concentração citosólica de cálcio, bloqueando a habilidade da célula para bombear cálcio para o retículo sarco/endoplasmático, acarretando em depleção de cálcio nessas zonas de estoque (OLESEN et al, 2007; TOYOSHIMA; NOMURA, 2002). Essa depleção pode secundariamente ativar canais de cálcio na membrana plasmática, permitindo um influxo de cálcio para o citosol. Desse modo, foi hipotetizado que a artemisinina interage com uma região do PfATP6 que é semelhante ao sítio de ligação da tapsigargina. Nesse sentido, foi evidenciado que existe um inibição competitiva entre esses fármacos no receptor PfATP6, em que a tapsigargina interfere na ação da artemisinina em ensaios *in vivo* (JUNG et al, 2005).

A seqüência de aminoácidos do PfATP6 é conhecida, porém a estrutura tridimensional ainda não está disponível. Nesse sentido foi realizado um estudo por Leite e colaboradores (2008) para a construção da estrutura tridimensional (3D) de PfATP6 usando a modelagem comparativa. Durante o desenvolvimento do modelo 3D do receptor PfATP6 foi possível encontrar uma proteína molde com grau de identidade de 43,5%, permitindo a construção da proteína alvo. De posse da estrutura tridimensional foi feita o acoplamento molecular entre a tapsigargina e o modelo, no qual foi possível visualizar o ambiente de interação no sitio ativo, sendo os aminoácidos ILE<sub>816</sub>, ILE<sub>825</sub>, TYR<sub>824</sub>, SER<sub>753</sub>, ILE<sub>756</sub>, ILE<sub>752</sub>, ASN<sub>755</sub>, ALA<sub>303</sub>, LEU<sub>258</sub>, PHE<sub>254</sub> e ILE<sub>261</sub> participantes do reconhecimento molecular, muito similar ao ambiente de interação encontrado em outros estudos (GARAH et al, 2009). Dessa forma, com os resultados procurou-se entender o mecanismo de ação que ocorre entre a artemisinina e demais peróxidos com a PfATP6 (Figura 26).



**Figura 26:** Ambiente de interação da taspargina no sítio ativo da PfATP6.  
**Fonte:** GARAH et al, 2009.

Garah e colaboradores (2009), estudaram por acoplamento molecular uma série de derivados da artemisinina e outros agentes antimaláricos relacionados aos fármacos quinolínicos e peroxídicos, com o receptor PfATP6. Vale ressaltar, que os fármacos quinolínicos não interagem com a PfATP6, tendo como mecanismo de ação a interação com o receptor heme prevenindo a formação da hemozoína. A afinidade de ligação dos compostos com a PfATP6 foi avaliada através dos valores de energia de interação obtida pelo programa AutoDock 4 e esses valores foram correlacionados com os valores experimentais das estruturas selecionadas. Através desses resultados, não foi possível identificar correlação entre a atividade *in silico* e atividade experimental, além disso, a deoxiartemisinina, um derivado inativo, apresentou melhor valor de energia de interação quando comparada a artemisinona, um derivado da artemisinina de segunda geração altamente ativo, indicando que a PfATP6 provavelmente não é o alvo biológico da artemisinina e os compostos relacionados, através da metodologia empregada.

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



Adicionalmente, na busca de novos compostos que apresentem alternativas no tratamento da malária, a curcumina e metilcurcumina, que tem suas propriedades antiinflamatória, antioxidante e antitumoral comprovadas, foram testadas para atividade antimalárica em ratos infectados com cepas de *Plasmodium berghei*. No estudo, a curcumina mostrou-se ativa, sendo necessário assim identificar um possível mecanismo de interação deste composto. Estudos realizados por Costa (2010) por modelagem molecular tentaram explicar a atividade antimalárica, inibindo a PfATP6 (JI, SHEN, 2009).

Neste estudo, comparando todas as estruturas calculadas, pode-se observar que as hidroxilas do grupamento catecólico são os grupamentos farmacofóricos destes compostos. Sugere-se então que o mecanismo de ação dos ácidos fenólicos, contra cepas de *P. falciparum*, pode ser embasado no fato destes compostos possuírem hidroxilas catecólicas substituídas por grupamento metoxila ou por hidrogênio que se ligam ao receptor, mesmo que de maneira menos efetiva. Estudos também mostraram que as hidroxilas fenólicas são importantes para a ligação da curcumina e, conseqüentemente, dos ácidos fenólicos à PfATP6 (JI; SHEN, 2009).

## 2.7 DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS: PERSPECTIVAS E DIFICULDADES.

Tradicionalmente, os produtos naturais têm sido fontes insubstituíveis para novos medicamentos. Mesmo nos dias atuais, os produtos encontrados na natureza continuam a representar um papel essencial no processo de descoberta e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Entretanto, a necessidade de coleção de compostos cada vez maiores e as dificuldades da produção em escala dos insumos naturais, está fazendo com que muitas empresas farmacêuticas diminuam seus esforços em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D), o que acarreta em sérios problemas de saúde pública tendo em vista a resistência dos parasitos aos antimaláricos tradicionais (MARINHO; SEIDL; LONGO, 2008).

O desenvolvimento de novos antimaláricos é de grande importância, devido a resistência adquirida pelo parasito frente aos fármacos quinolínicos tradicionais, o que tem levado a altas taxas de mortalidade, sobretudo em crianças (HEPPENER, BALLOU, 1998; FRÉDÉRICH et al, 2002; CRAFT, 2008). A resistência à quimioterapia é um dos maiores problemas no controle da atual epidemia de malária. Ela se deve ao princípio da evolução das espécies, onde a presença de fármacos (ou “pressão” dos fármacos) serve como força de

seleção natural dos parasitos resistentes dentro do hospedeiro (ROBERT; MEUNIER, 1997). A alarmante resistência aos fármacos atualmente empregadas na quimioterapia da malária levou a Organização Mundial de Saúde a prever que, na ausência de novas estratégias para o combate à malária, o número de pessoas contaminadas duplique em todo o globo até o ano 2015 (NEWMAN, 2010).

A exemplo do desenvolvimento do Fenosan a partir do yingzhaosu A, o objetivo desse estudo é avaliar a viabilidade de endoperóxidos presentes na flora como compostos protótipos para o desenvolvimento de um novo fármaco antimalárico estruturalmente simples, de fácil obtenção, com menos reincidivas e com maior tempo de meia vida do que a artemisinina, ou seja, explorar de forma racional as espécies nativas ou endêmicas do semi-árido brasileiro, as quais têm sido pouco estudadas quanto ao seu potencial uso farmacológico (COSTA, 2010).

A busca de novos fármacos antimaláricos é necessária para que se tenha uma alternativa terapêutica a crescente resistência adquirida pelo parasito. Muitos compostos demonstraram serem promissores agentes antimaláricos. No entanto, poucos apresentam eficácia suficiente e baixa toxicidade para que sejam utilizados na terapêutica.

As dificuldades no desenvolvimento de vacinas para a malária foram destaque recentemente com experiências na pesquisa do HIV. Muitas dessas dificuldades estão presentes também no desenvolvimento de uma vacina para a malária, que é outro dos objetivos de saúde pública. Desde 1987, quando as primeiras vacinas a partir da proteína circunsporozoíta (CSP) foram testadas em seres humanos, pelo menos, 50 candidatos a vacina contra a malária entraram em ensaios clínicos (KILAMA, 2003).

No entanto, apenas um candidato (RTS, S, que é baseada na proteína CSP) progrediu significativamente e entrou em ensaios clínicos de fase III. No entanto, há valiosas lições a serem aprendidas com a realização de ensaios clínicos e comparando os resultados desses ensaios com o trabalho pré-clínico para o desenvolvimento de uma vacina candidata contra a malária (AIDE et al, 2011).

### 3. ESTUDOS COMPUTACIONAIS

Todos os pacotes de cálculo que foram utilizados estão instalados nos computadores do Laboratório de Modelagem Molecular do Departamento de Saúde da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Para a execução do referido trabalho foram utilizados computadores com processadores *Dual-core* 2Gb de RAM, HD 80 Gb em ambiente Windows.

#### 3.1 MÉTODOS DE QUÍMICA COMPUTACIONAL

A Química Computacional é um ramo da Química que usa técnicas computacionais para criar modelos de sistemas químicos reais. O modelo molecular criado é uma tentativa de simular alguns aspectos das propriedades moleculares de uma forma macroscópica, a qual é mais facilmente compreendida e manuseada. Propriedades do modelo são computadas e comparadas com dados experimentais. Se o modelo se comportar de acordo com o esperado, poderá ser usado para o estudo e futuro melhoramento do sistema químico real (FORESMAN; FRISCH, 1996).

#### 3.2 MÉTODOS DE CÁLCULOS TEÓRICOS

Os métodos de cálculos de propriedades moleculares podem ser classificados, de uma forma geral, em métodos empíricos (também chamados de mecânica molecular) e em métodos com base na teoria de orbital molecular, sendo que esses se dividem em métodos mecânico quânticos (*ab initio* e semi-empíricos) e na teoria do funcional de densidade (*Density Functional Theory – DFT*<sup>3</sup>) (FORESMAN; FRISCH, 1996).

##### 3.2.1 Modelos de Mecânica Molecular

Os métodos empíricos baseiam-se na mecânica clássica, onde a energia do sistema é descrita pelo somatório das contribuições das energias de ligação, angular, torsional e por

---

<sup>3</sup> É uma questão controversa se os métodos DFT são *ab initio* ou não, porém isso não será discutido neste estudo.

interações não ligadas, em que estes valores são previamente obtidos a partir de dados experimentais ou através de cálculos, conforme equação 1 (FORESMAN; FRISCH, 1996).

$$E_{\text{total}} = \sum E_{\text{ligação}} + \sum E_{\text{angular}} + \sum E_{\text{torcional}} + \sum E_{\text{int. não ligadas}}$$

**(Equação 1)**

Existem vários métodos de mecânica molecular, podendo destacar-se o MMX, MM2, AMBER, MM3, SYBYL, MMFF94, que estão disponíveis nos programas HyperChem, Quanta, Sybyl, Alchemy, Pmodel, Spartan, BioMedCache, Titan, etc, cada um possuindo um número e a natureza das especificações (por exemplo, comprimento de ligação entre átomos) diferentes, caracterizando assim o seu campo de força particular (ALLINGER; LII, 2004).

O campo de força consiste de um conjunto de equações que definem como a energia potencial de uma molécula varia com a posição de seus átomos, em outras palavras, um campo de força é a expressão analítica que descreve a superfície de energia potencial de uma molécula. As equações usadas são relativamente simples e são desenvolvidas a partir de dados experimentais para uma determinada classe de compostos (FRISCH; FRISCH; TRUCKS, 2003).

Os métodos de mecânica molecular não consideram explicitamente os elétrons em um sistema molecular (baseiam-se em interações entre núcleos), embora os efeitos eletrônicos estejam implicitamente incluídos nos campos de força através da parametrização (FORESMAN; FRISCH, 1996). Esta aproximação torna os cálculos de mecânica molecular computacionalmente rápidos, permitindo seu uso em sistemas muito grandes contendo até milhares de átomos, no entanto, é limitado a um certo número de sistemas. Devido à parametrização e por não considerar os elétrons, não se pode tratar de problemas químicos onde o efeito eletrônico seja importante, por exemplo, quebra e formação de ligação (FORESMAN; FRISCH, 1996).

### 3.2.2 Métodos Quânticos

Os métodos quânticos (com base na teoria de orbital molecular) estão baseados na mecânica quântica, a qual fornece uma descrição matemática da estrutura molecular em termos dos núcleos atômicos e da distribuição eletrônica em torno deles. Os seus modelos são fundamentados em várias aproximações da equação de Schrödinger,  $H\Psi = E\Psi$  onde o H é o hamiltoniano, uma expressão matemática dos termos energéticos da molécula, englobando a

energia cinética dos elétrons e potencial das partículas do sistema,  $\Psi$  é uma função de onda molecular descrita em termos das coordenadas espaciais das partículas que constituem o sistema em um determinado estado.

Soluções exatas da equação de Schrödinger não são possíveis mesmo para os sistemas mais simples, exceto para o átomo de hidrogênio. Entretanto, um número de aproximações matemáticas torna possíveis soluções aproximadas para uma grande faixa de moléculas (HEHRE et al, 1986; FORESMAN; FRISCH, 1996).

### 3.2.3 Métodos Semi-Empíricos

Os métodos semi-empíricos, tal qual os métodos *ab initio*, usam dentre outras aproximações, a aproximação NDDO (*neglect of diatomic differential overlap*) (FORESMAN; FRISCH, 1996), considerando que os orbitais atômicos de diferentes átomos não se sobrepõem. Empregam parâmetros empíricos e utilizam somente os elétrons da camada de valência (restringindo-se a uma base mínima). Com isso os cálculos são simplificados, reduzindo o custo computacional (memória e tempo).

Os prováveis erros introduzidos devido às várias aproximações inerentes ao método são muitas vezes compensados através do próprio processo de parametrização, o qual ajusta os resultados do método a resultados experimentais ou resultados *ab initio* (FORESMAN; FRISCH, 1996). Este procedimento pode produzir modelos que algumas vezes fornecem resultados mais próximos dos resultados experimentais do que os resultados obtidos com modelos mais sofisticados (FORESMAN; FRISCH, 1996).

Apesar da aparente complexidade dos métodos semi-empíricos, só existem três possíveis fontes de erro: dados de referência podem ser imprecisas ou inadequadas, o conjunto de aproximações podem incluir hipóteses irrealistas ou ser demasiadamente inflexível, e o processo de otimização de parâmetros pode ser incompleto. Para que um método possa ser exato, as três potenciais fontes de erro devem ser cuidadosamente examinadas e se falhas são encontradas, as medidas corretivas apropriadas devem ser implementadas.

Os métodos semi-empíricos mais comuns são: MNDO (*Modified Neglect Diatomic Overlap*), AM1 (*Austin Model 1*) (DEWAR et al, 1985) e PM3 (*Parametric Method 3*) (FORESMAN; FRISCH, 1996, CUNDARI; DENG; FU, 2000), implantados sobretudo nos

programas MOPAC, AMPAC, HyperChem e Gaussian (HEHRE, 1986). O método PM6 (STEWART, 2007a) está parametrizado para 70 elementos sendo implementado no pacote Gaussian 09 (FRISCH et al, 2009) e MOPAC 2007 (STEWART, 2007b).

J. P. Stewart, um dos autores do método AM1, deixou o laboratório de Dewar para trabalhar como pesquisador independente. Stewart observou que o método AM1 poderia ser aperfeiçoado do ponto de vista estatístico. Assim, Stewart adotou a mesma aproximação NDDO do AM1 limitando-se somente a duas funções Gaussianas por átomo ou invés de quatro e empregou um amplo conjunto de dados na parametrização (CRAMER, 2003).

Dessa forma, Stewart considerou o seu método como o terceiro método parametrizado (PM3) (os dois primeiros seriam MNDO e AM1). O método PM3 também foi expandido incluindo orbitais d para o uso em sistemas com metais de transição, sendo denominado de PM3(tm). No entanto o método PM3(tm) emprega resultados de cristalografia de raio-X em sua parametrização, diferentemente dos demais métodos semi-empíricos com orbitais d (TITAN 1999, YOUNG 2001, CRAMER 2003). O método PM3 possui parâmetros para H, C, N, O, F, Al, Si, P, S, Cl, Br e I, divulgados em 1989, e parâmetros para metais de transição no caso do PM3(tm) (CRAMER, 2003).

Os cálculos semi-empíricos apresentam como vantagens a velocidade de processamento, são muito mais rápidos do que os métodos *ab initio* e DFT, e fornecem bons resultados para moléculas orgânicas na predição de geometrias, energias, módulos vibracionais e estruturas de transição. Por outro lado os resultados podem se distanciar dos resultados experimentais se o sistema estudado não estiver englobado na parametrização do método. Também não fornecem bons resultados para interações intermoleculares de forças de van der Waals, devido a falta de funções difusas (YOUNG, 2001; CRAMER, 2003).

### 3.2.3.1 Método PM6

Inúmeras modificações foram feitas na aproximação NDDO resultando no parâmetro de otimização denominado *Parametrical Methods 6* (PM6), sendo que este método possui parâmetros para 70 elementos. O nome PM6 foi escolhido para evitar qualquer confusão com outros dois métodos inéditos, PM4 e PM5 (STEWART, 2004)

O PM6, sendo o mais recente membro da família NDDO de métodos semi-empíricos, é indubitavelmente o mais preciso. O desenvolvimento de cada novo método tem sido guiado

pelo conhecimento das falhas documentadas encontradas nos métodos anteriores. Isso se reflete na constante diminuição do erro médio entre constantes de compostos orgânicos, de 12,0 kcal mol<sup>-1</sup> para AM1 para 4,9 kcal mol<sup>-1</sup> para PM6. Vários fenômenos de baixa energia, são previstos mais exatamente por PM6, como a previsão das energias e geometrias envolvidas na ligação de hidrogênio (STEWART, 2007a).

A precisão do método PM6 em prever valores de formação para os compostos de interesse em bioquímica é um pouco melhor do que os métodos Hartree Fock ou DFT, B3LYP, usando o 6-31G (d) como conjunto de base. Para um conjunto representativo de compostos, PM6 apresentou erro médio de 4,4 kcal mol<sup>-1</sup>, para o mesmo conjunto HF e B3LYP tinha um erro médio de 7,4 e 5,2 kcal mol<sup>-1</sup>, respectivamente (STEWART, 2007a).

### 3.4 ACOPLAMENTO MOLECULAR (DOCKING)

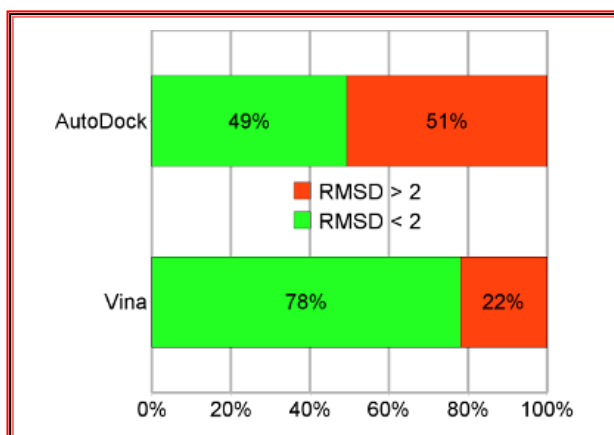
É possível realizar a predição da atividade de um ligante em pesquisa, frente a um determinado alvo protéico de interesse, por um processo computacional denominado *Docking*. Para um complexo de enzima e inibidor, o *Docking* pretende evidenciar a predição correta da conformação de ligação sob condições geométricas de equilíbrio e obter a afinidade de ligação química (PATRICK, 2009).

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

O AutoDock é uma plataforma de ferramentas de acoplamento automático. Ele é projetado para prever como moléculas pequenas, tais como substratos ou candidatos do fármaco, se ligam a um receptor de estrutura 3D conhecido. O AutoDock consiste de dois programas principais: AutoDock realiza o acoplamento do ligante a um conjunto de grids descrevendo a proteína alvo; o AutoGrid pré-calcula essas grades. Além de usá-los para o encaixe, as grades de afinidade atômica podem ser visualizadas. Isso pode auxiliar, por exemplo, químicos sintéticos orgânicos a desenhar os melhores ligantes com base em dados de afinidade eletrônica. Também foi desenvolvido uma interface gráfica chamada

AutoDockTools, que entre outras coisas, ajuda a configurar qual ligação irá ser tratada como possível de rotação no ligante e analisar os acoplamentos (SOUZA; FERNANDES; RAMOS, 2006).

O AutoDock Vina é um programa de código aberto para o desenvolvimento de novos fármacos, acoplamento molecular e triagem virtual, com capacidade de multiprocessamento, alto desempenho, alta precisão e de fácil uso. Este programa melhorou significativamente a precisão dos modos de ligação comparado ao AutoDock 4 (Figura 27) (TROTT; OLSON, 2010).



**Figura 27:** Acurácia da predição do modo de ligação para um conjunto treino. AutoDock refere-se ao AutoDock 4 e Vina ao AutoDock Vina.

**Fonte:** TROTT; OLSON, 2010.

No desenvolvimento do AutoDock Vina, uma variedade de abordagens de otimização foram exploradas, em que foi implementado o algoritmo *Iterated Local Search* que tem com objetivo melhorar a busca estocástica por amostragem usando técnicas de busca local para refinar suas soluções (TROTT; OLSON, 2010). Esse algoritmo explora uma sequência de soluções criadas como resultado de perturbações da melhor solução anteriormente selecionada, sendo por fim esta geometria refinada.

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



## 4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

### 4.1 ANÁLISES DE CORRELAÇÃO

A formulação de hipóteses tem sido muito empregada em pesquisas de diversas áreas do conhecimento. Para decidir se uma determinada hipótese é confirmada por um conjunto de dados, é necessário ter um procedimento objetivo para aceitar ou rejeitar a hipótese (SIEGEL; CASTELLAN, 2006). Segundo Shimakura, 2010, métodos estatísticos são utilizados para o planejamento e condução de um estudo, descrição dos dados e para tomada de decisões, onde se podem citar os testes de hipóteses que se baseiam nos riscos associados às mesmas.

A correlação expressa uma medida numérica do grau de relação encontrada. Esse tipo de análise é muito útil em trabalhos exploratórios, quando se procura determinar as variáveis potencialmente importantes. O resultado da análise de correlação linear é expresso na forma de um coeficiente de correlação, número que quantifica o grau de relação obtido para os pares de valores de variáveis que formam a amostra analisada (MARTINS, 2005).

A compreensão de diversos fenômenos exige que se possa avaliar quantitativamente o grau de relação entre duas ou mais variáveis. A estatística fornece algumas ferramentas para esta avaliação. Segundo Harnett e Murphy (1976), o grau de relação linear entre duas variáveis aleatórias  $x$  e  $y$ , pode ser expresso pelo coeficiente de correlação entre elas, dado por:

$$r = \text{Cov}[x,y] / \sigma_x \cdot \sigma_y$$

em que:

$r$  = coeficiente de correlação;

$\text{Cov}[x,y]$  = Covariância entre as variáveis  $x$  e  $y$ .

$\sigma$  = Desvio padrão dos valores da variável  $x$  ou  $y$ .

Desta forma, o valor de  $r$  pode assumir  $-1 \leq r \leq 1$ . Se as variáveis apresentam uma perfeita relação linear, com declividade positiva, então o coeficiente é igual ao valor um, positivo, para dados simétricos, com distribuição normal. Se a relação linear ocorre, mas a declividade é negativa, então o valor do coeficiente é também um, porém negativo. O coeficiente de correlação entre duas variáveis pode ser testado estatisticamente. O fato de ter

um valor de “r” igual a zero não significa que não exista correlação entre as variáveis; significa que elas não têm, entre si, apenas a correlação linear.

Os testes estatísticos estão divididos fundamentalmente em testes paramétricos e testes não paramétricos. Os testes paramétricos exigem que as amostras tenham uma distribuição normal, especialmente se tiverem uma dimensão inferior a 30. Os testes não paramétricos não necessitam de requisitos como a normalidade para serem usados. São também indicados quando as amostras são pequenas. Desta forma, quando não se pode pressupor a normalidade recorre-se aos testes não paramétricos.

Para testar a aderência à normalidade, ou seja, testar se a amostra se pode pressupor normal, podem-se usar dois testes: Teste de Kolmogorov-Smirnov e Teste de Shapiro-Wilks (CORDER; FOREMAN, 2009). A desvantagem desses testes é que os valores são interpretados como posições, sendo assumidos através dos dados de mediana, diferentemente dos dados paramétricos no qual as medidas de localização são feitas através dos dados da média e desvio padrão, haja vista que a distribuição é normal. Outro aspecto importante entre os testes é que nas correlações com dados em distribuição normal, utiliza-se o coeficiente de Pearson ( $r$ ) e para quantificar a associação entre duas variáveis em populações não normais utiliza-se preferencialmente a correlação de Spearman ( $\rho$ ) e Kendall ( $\tau$ ).

O coeficiente de correlação de Spearman ( $\rho$ ) é o coeficiente de correlação entre os *ranks* das variáveis em vez de entre os valores das variáveis; além de robusto, é sensível para as relações que não sejam lineares entre as variáveis, como ocorre com o coeficiente de correlação de Pearson.

Para Gonçalves e colaboradores (2001) é muito importante considerar que correlação linear não implica em relação causa-efeito. Para avaliar a relação de dependência de uma variável em relação à outra, tem-se o recurso da regressão linear. Procura-se descrever, por um modelo matemático, a relação entre as variáveis. O coeficiente de determinação,  $R^2$  expressa o quanto da variação da variável dependente pode ser explicada pela variação da variável independente e o teste “F” avalia se há relação de dependência entre as duas variáveis.

Uma análise de correlação não permite fazer previsões, porém é útil para identificar as variáveis que poderiam funcionar como preditoras. Para Andriotti (2003), só se deve utilizar a regressão se a correlação entre as variáveis for significativa. A correlação mede a força ou o

grau de relacionamento entre duas variáveis, e a regressão fornece uma equação que descreve o relacionamento entre elas em termos matemáticos.

Estudos têm sido feitos no sentido de mensurar o grau de correlação entre variáveis obtidas através de ferramentas computacionais com dados experimentais. Srivastava; Singh e Naik (2010) estudaram 144 análogos e foi possível identificar um coeficiente de correlação de 0,707 entre a energia de ligação e a distância O-Fe. Além disso, foi feita a correlação entre o valor de atividade antimalárica ( $pIC_{50}$ ) e energia livre, sendo obtido valores de correlação de 0,786, obtendo assim uma correlação positiva entre as variáveis selecionadas.

Tonmunphean; Parasuk e Kokpol, 2000, analisaram 30 derivados da artemisinina utilizando técnica de acoplamento molecular, obtendo um coeficiente de correlação significativo ( $r=-0,93$ ) quando comparado as variáveis de energia de ligação e energia de atividade biológica. Além desses, Paitayatat e colaboradores (1997) estudaram a correlação entre duas variáveis experimentais,  $IC_{50}$  e constante dissociação ( $K_d$ ), obtendo coeficiente de correlação positiva. Este estudo tem sua peculiaridade, pois os valores experimentais referentes a  $K_d$  foram feitos diretamente sobre o grupo heme, sendo assim uma literatura interessante para estudos de correlação entre atividade biológica e atividade *in silico*.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a execução deste estudo foi realizado uma pesquisa bibliográfica com o intuito de dar suporte à parte experimental. A pesquisa bibliográfica abrange a bibliografia já tornada pública em relação ao tema de estudo e tem como objetivo permitir ao cientista o reforço paralelo na análise de suas pesquisas ou manipulação de suas informações (LAKATOS; MARCONI, 2001). No que tange a parte experimental, este consiste em determinar um objeto de estudo, selecionar as variáveis que seriam capazes de influenciá-lo, definir as formas de controle e de observação dos efeitos que a variável produz no objeto (GIL, 2002).

### 5.1 LEVANTAMENTO DOS COMPOSTOS

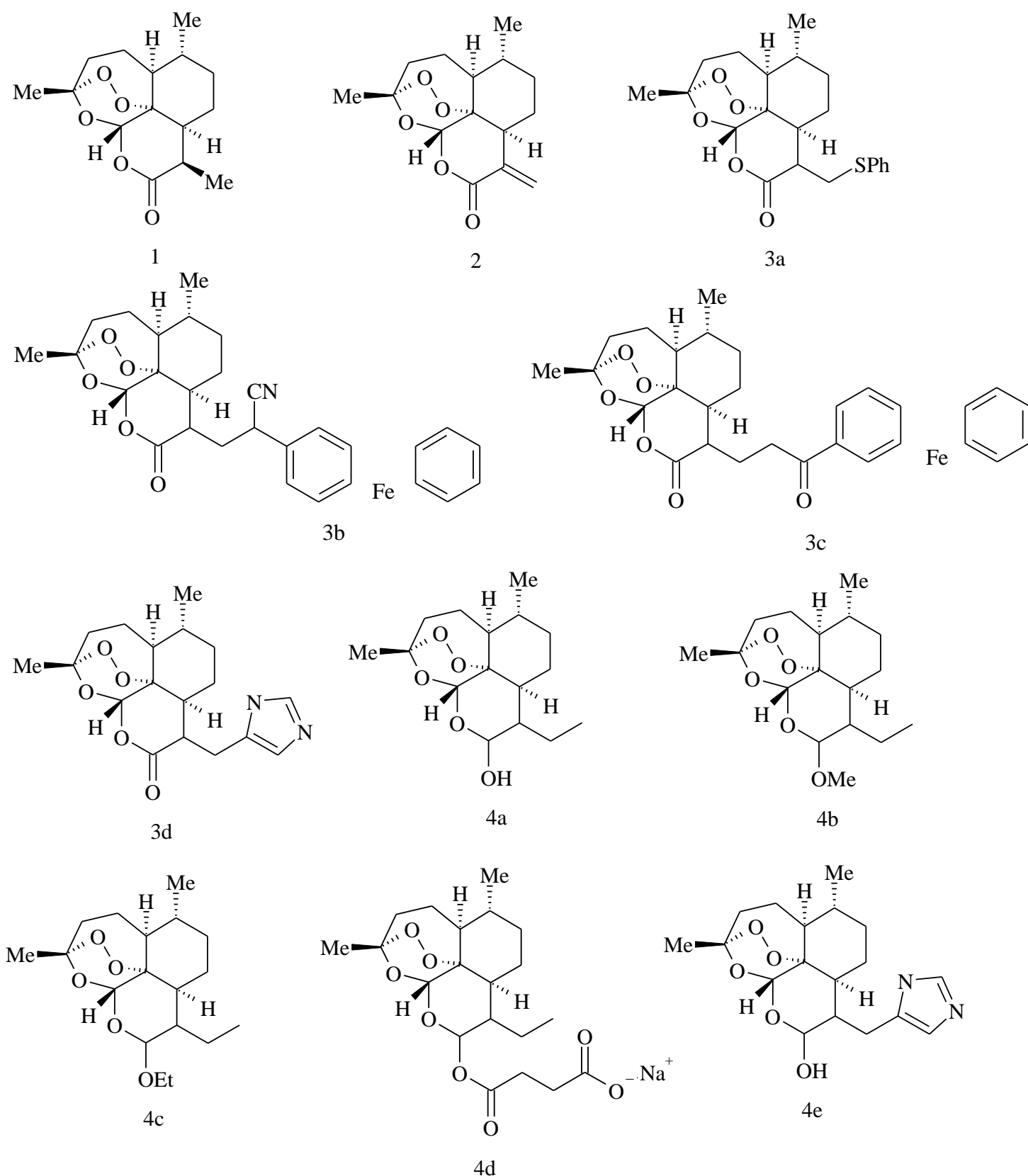
No presente estudo, cálculos de acoplamento molecular e energia de ligação foram executados entre o grupo heme e 51 peróxidos. Estes peróxidos foram divididos em dois conjuntos. O primeiro conjunto, denominado de conjunto treino, foi composto da artemisinina e 10 derivados relacionados com atividade biológica conhecida (PAITAYATAT et al, 1997). O segundo conjunto, denominado de conjunto teste, foi composto por 40 peróxidos presentes na natureza (CASTEEL, 1999) tendo como principal foco compostos oriundos da flora do semi-árido, para os quais a atividade antimalárica ainda não foi determinada.

#### 5.1.1 Conjunto Treino

No presente estudo foram selecionados 10 derivados da artemisinina (Figura 28), com atividade biológica conhecida, representada através dos parâmetros de concentração inibitória ( $IC_{50}$ ) e constante de dissociação ( $K_d$ ), os quais foram descritos por Payatayat e colaboradores (1997). Posteriormente, esses parâmetros foram utilizados como variáveis para correlação estatística com os valores de atividade *in silico*.

Apesar de vários artigos apontarem analogos da artemisinina com atividade antimalárica definida, a literatura escolhida neste estudo descreveu a constante de dissociação ( $K_d$ ), que reflete a mudança espectral do complexo formado entre ligante-receptor em um determinado comprimento de onda. Esse parâmetro fornece, melhor homogeneidade dos dados quando comparados aos valores de afinidade eletrônica obtidos através dos estudos de

acoplamento molecular que foram posteriormente correlacionados através da programa estatístico SPSS 17.0 (SPSS, 2008)



**Figura 28:** As estruturas selecionadas para o conjunto treino<sup>4</sup>.  
**Fonte:** O autor.

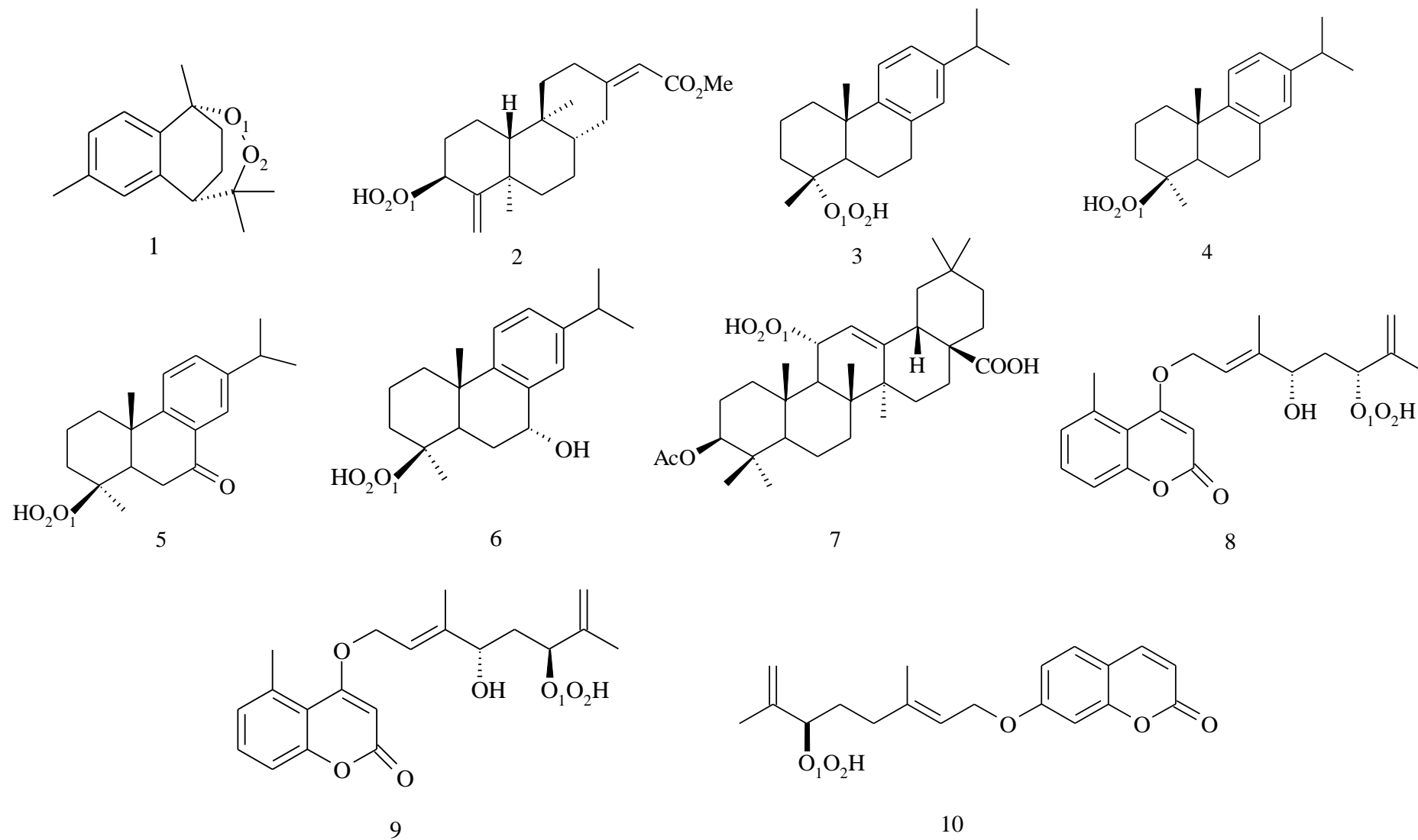
<sup>4</sup> Nas estruturas 3c e 3d, o ferro está complexoado com a nuvem eletrônica do anel aromático.

### 5.1.2 Conjunto Teste

Neste estudo foram selecionados 40 peróxidos naturais tendo como critério de escolha a sua presença em espécies ou gêneros da flora brasileira, especificamente na região do semi-árido (Figura 29). Exceto o composto 14, que é oriundo da planta da Família Asteraceae, do gênero *Xanthium sp.*, a qual é endêmica da região da Califórnia, Estados Unidos, todos os demais compostos possuem registro na flora Brasileira. A estrutura desse composto 14 é semelhante à artemisinina e por isso foi estudada nesse trabalho, além disso, é possível no campo da quimiosistemática, que plantas oriundas do semi-árido da mesma família ou gênero *Xanthium sp.*, possam biossintetizar compostos peróxidos, sendo que essa inferência foi confirmado nos estudos de Metwally, Khafagy e El-Naggar (1974) que aponta os xantanólídeos sesquiterpênicos como metabólitos marcadores desse gênero (LEITE et al, 2010; CASTEEL, 1999, COSTA, 2010).

Como referido, os peróxidos foram selecionados, posterior à verificação do endemismo da espécie ou gênero, em que esses metabólitos bem como as plantas foram identificados através do levantamento bibliográfico de Casteel (1999), o qual compilou vários peróxidos naturais oriundos de inúmeras fontes biológicas presentes em todo o globo. Através do site Flora Brasil (FORZZA et al, 2010) foi confirmado a presença da espécie ou gênero da planta o qual era identificado endemismo ou não nos biomas brasileiros, especificamente no bioma semi-árido.

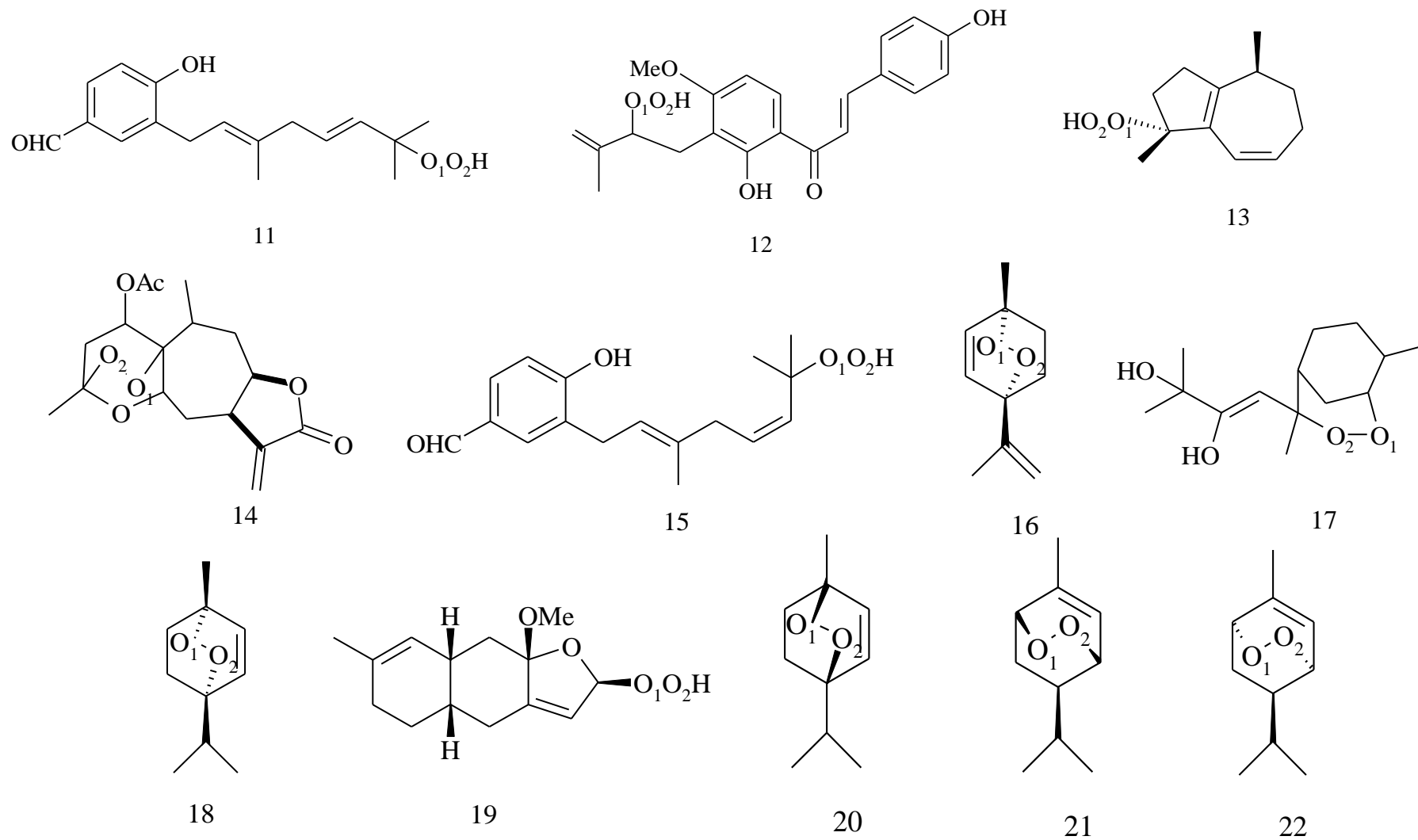
Além dessa lista funcional de plantas e outros organismos presentes nos biomas brasileiros, foi utilizado o banco de dados do Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS), através de consulta on-line do site *speciesLink*, no qual também foi verificado o endemismo das plantas selecionadas, na região Semi-Árido. A escolha da região do semi-arido brasileiro deveu-se as especificidades deste bioma visando futuros estudos de triagem fitoquímico de peróxidos, conhecido na literatura (CURRLIN, 1975), como um metabólito de “estresse” e por isso as condições climáticas do semi-árido proporcionariam a biossíntese desse composto.



**Figura 29:** Estruturas selecionadas para o conjunto teste.

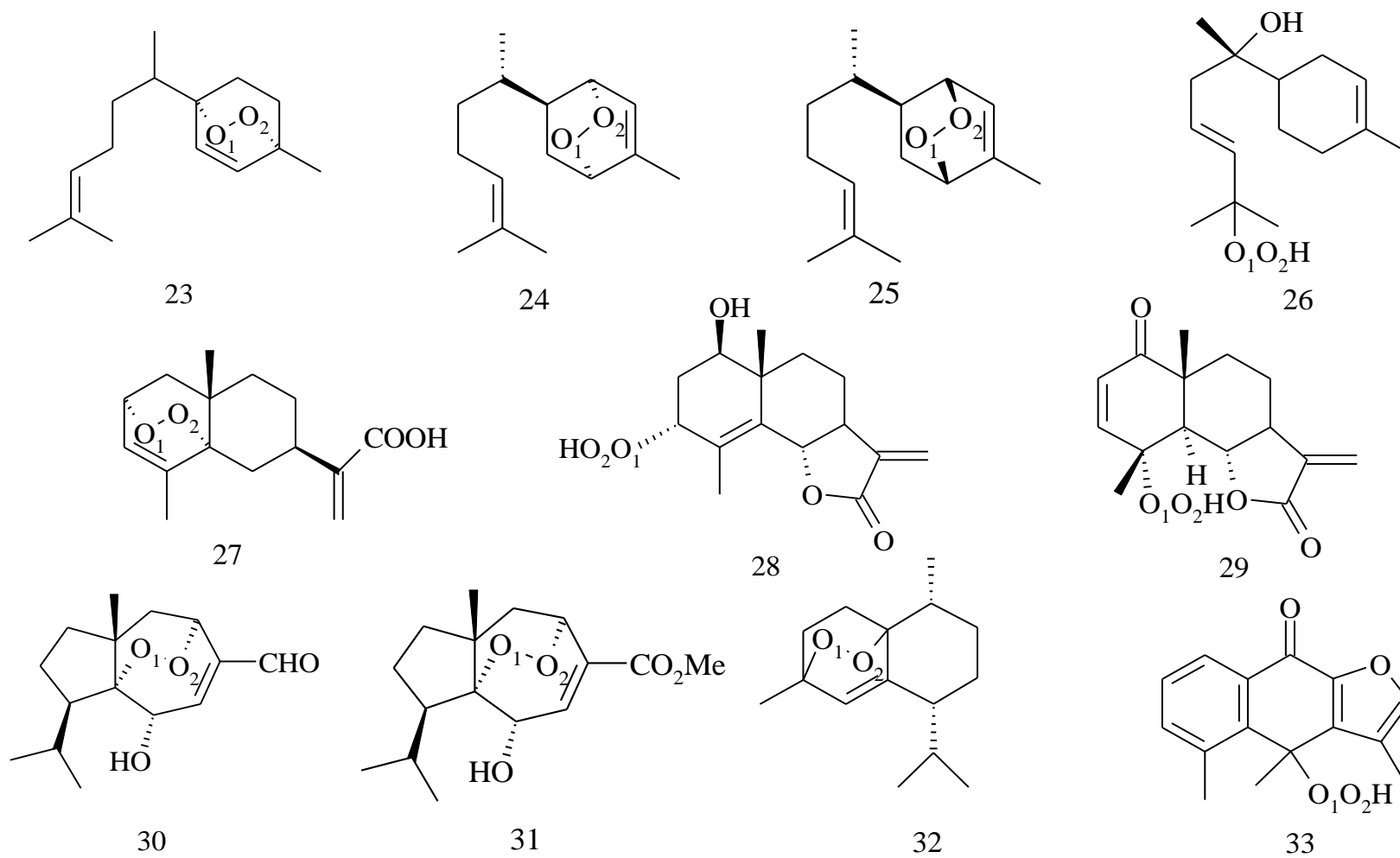
Fonte: O autor





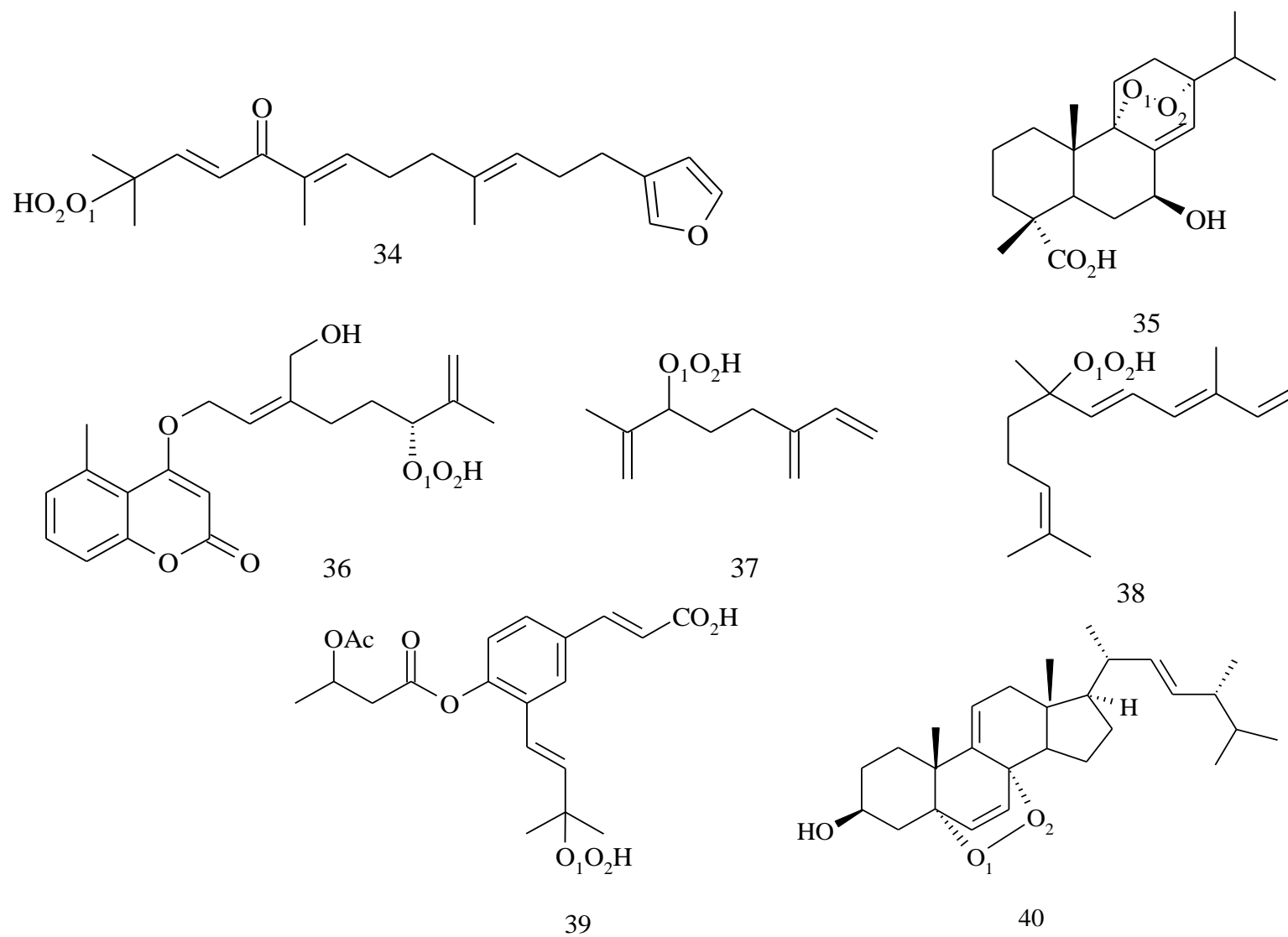
**Figura 29:** Estruturas selecionadas para o conjunto teste (Continuação).

**Fonte:** O autor



**Figura 29:** Estruturas selecionadas para o conjunto teste (Continuação).

**Fonte:** O autor



**Figura 29:** Estruturas selecionadas para o conjunto teste (Continuação).

**Fonte:** O autor

## 5.2 ANÁLISES DE CORRELAÇÃO: DADOS BIOLÓGICOS X DADOS *IN SILICO*

### 5.2.1 Análise Estatística Clássica

Os dados foram inicialmente avaliados por meio de parâmetros da estatística descritiva. Para execução dos procedimentos estatísticos foi utilizado o programa SPSS 17.0 para ambiente Windows (SPSS, 2008). O compêndio estatístico foi composto por medidas de posição (média, mediana, moda, quantis), de forma (coeficientes de assimetria e de curtose), além da análise probabilística para verificação da normalidade da distribuição dos dados, avaliada pelo Teste *Kolmogorov-Smirnov*, com correção de significância de *Lilliefors*.

Primeiramente foi analisada a distribuição dos dados para identificar se a mesma tinha uma distribuição normal ou gaussiana. O estudo da natureza das distribuições dos dados tem por finalidade verificar a viabilidade da aplicação de técnicas estatísticas paramétricas, desde que essas inferências só são indicadas se a população de onde provêm os dados seja do tipo normal ou gaussiana.

Desta forma, através do teste *Kolmogorov-Smirnov*, foram identificadas algumas variáveis cuja distribuição não se apresentou ajustada à normal, determinando, assim, que tais dados fossem tratados através de análises não paramétricas.

### 5.2.2 Análise Bivariada

A Análise Bivariada permite a análise simultânea de duas, ou mais variáveis. Permite estabelecer relações entre variáveis, ou seja, determinar se as diferenças entre a distribuição de duas variáveis são estatisticamente significativas, com o objetivo de pesquisar influências, causalidades ou coincidências.

#### 5.2.2.1 Matriz de Correlação

Com os valores de  $IC_{50}$ ,  $K_d$  e os parâmetros energéticos (energia de acoplamento, single-point vácuo e solvente, energia de complexação e energia final), foram elaboradas matrizes de correlação entre as variáveis dados biológicos e dados *in silico*.

Devido ao fato das variáveis não apresentarem seus dados ajustados à distribuição normal, foram realizadas duas correlações não-paramétricas, utilizando-se, respectivamente, a correlação ordinal de Spearman (avalia uma função monótona arbitrária que pode ser a

descrição da relação entre duas variáveis, sem fazer suposições sobre a distribuição de frequências das variáveis) e o coeficiente de concordância de Kendall. Para avaliar a significância do coeficiente de correlação, a um nível de significância de até 5% de probabilidade, foi utilizado o teste “t”. As abordagens em ambos os testes são semelhantes, porém a correlação de Spearman geralmente é usada para as variáveis medidas no nível ordinal, enquanto que nas situações em que a variável é nominal, preferencialmente utiliza-se o coeficiente de correlação de Kendall.

### 5.3 ESTUDOS DE ACOPLAMENTO MOLECULAR

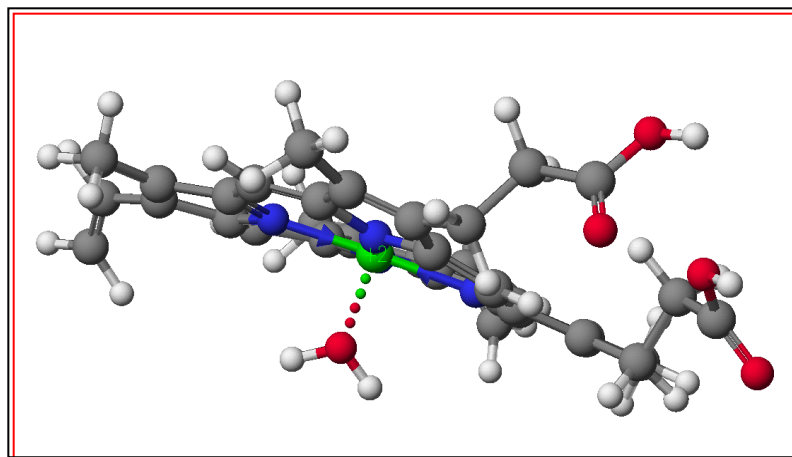
#### 5.3.1 Preparo dos Ligantes

No presente estudo, cálculos de Acoplamento Molecular e Mapa de Potencial Eletrostático Molecular (MEP) (CARLONI; ALBER, 2008) foram executados para o conjunto treino e teste empregando métodos de mecânica molecular (UFF) (RAPPÉ et al, 1992; CASEWIT; COLWELL; RAPPÉ, 1992) e semi-empírico AM1 e PM6, implementado no programa Gaussian 09W.

O desenho estrutural foi realizado através do programa ACD/ChemSketch 10.0 sendo empregado o algoritmo de otimização 3D baseado na parametrização CHARMM (BROOKS et al, 1983), sendo que este algoritmo é baseado na mecânica molecular. Posteriormente, foi executado cálculos de mecânica molecular (UFF) seguido por cálculos semi-empíricos, AM1 e PM6, utilizando a interface gráfica do GaussView 5.0.8.

#### 5.3.2 Preparo do receptor

O alvo molecular foi selecionado através do Banco de Dados de Estruturas Biológicas Macromoleculares, denominado *Protein Data Bank* (RCSB, 2010; BLUHM et al, 2011). A molécula utilizada foi a hemoglobina (ID: 1MKO) (SAFO; ABRAHAM, 2005) em que foi selecionado o grupamento prostético grupo heme de interesse, utilizando a interface do programa GaussView 5.0.8 (Figura 30). Posterior a seleção, esse grupamento foi refinado pelo método empírico UFF e semi-empírico PM6, implementando no pacote Gaussian 09W, o qual o método é parametrizado para o ferro.



**Figura 30:** Grupo heme complexado com uma molécula de água.  
**Fonte:** TARANTO et al, 2003.

### 5.3.3 Acoplamento Molecular

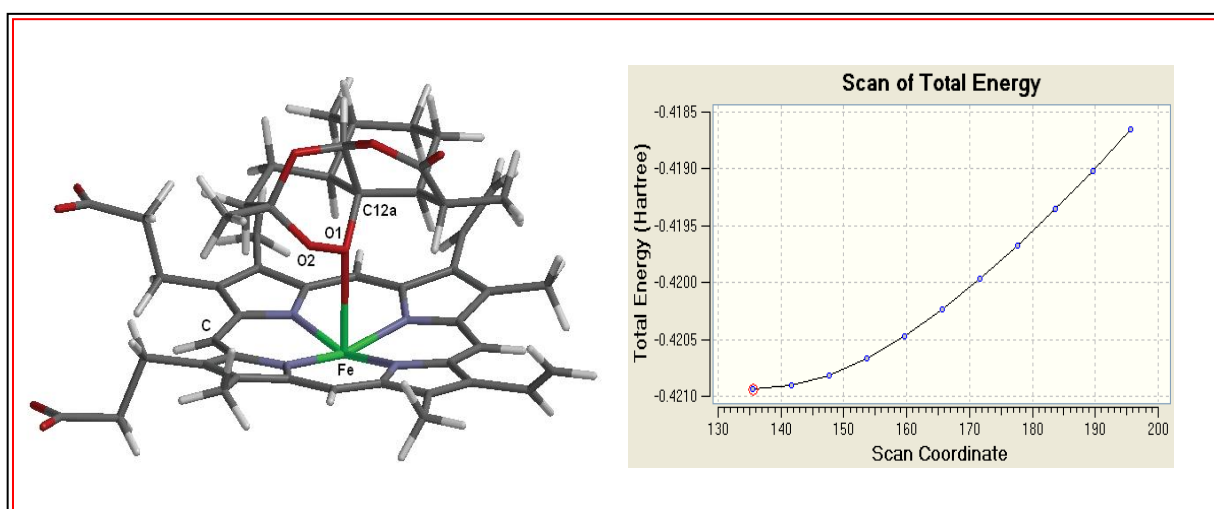
O acoplamento molecular entre o grupo heme e os peróxidos selecionados para o estudo (n=51) foi realizado através do programa de docking automático, AutoDock Vina 1.0.2 (TROTT; OLSON, 2010). As estruturas do heme e ligantes refinadas pelo método PM6, parametrizado para o ferro, foram utilizadas para o acoplamento. As coordenadas do centro da caixa simulação (*grid box*) foram  $x = -1,954$ ,  $y = -2, 178$  e  $z = -1,314$ , tendo a caixa de simulação a forma de um cubo com aresta igual a  $6\text{\AA}$

Após a elaboração do arquivo de configuração foi executado o cálculo através do programa AutoDock Vina 1.0.2 e posteriormente visualizado com o auxílio do programa Pymol 0.99rc6 (DELANO, 2005). Através da análise dos resultados é possível identificar os acoplamentos e os seus respectivos valores de interação intermolecular. O melhor acoplamento, com base nos valores de energia, foi utilizado para as análises de otimização molecular à nível semi-empírico, PM6, implementado no programa Gaussian 09W, exceto quando um conformero de maior energia possuir uma orientação melhor, que no caso deste estudo refere-se ao grupamento peróxido voltado para o ferro do sistema porfirínico do grupo heme.

No intuito de validar as orientações obtidas pelo AutoDock Vina 1.0.2, pois segundo Trott; Olson, 2010, alguns problemas referentes ao acoplamento molecular podem acontecer, podendo estar atribuído a função de escore ou até mesmo a qualidade cristalográfica do receptor, foram realizados escaneamentos visando a melhor geometria entre ligante e receptor.

O algoritmo do acoplamento molecular não é determinístico, ou seja, o docking é uma abordagem de aproximação, sendo assim o algoritmo de busca pode não encontrar a melhor geometria quando comparado com sistemas experimentais. Desta forma, foram utilizados parâmetros para validar as geometrias, sendo que para a análise do conjunto treino foram utilizados os parâmetros geométricos (distância Fe-O<sub>1</sub>, Fe-O<sub>2</sub>, Fe-N, O<sub>1</sub>-O<sub>2</sub>) para o complexo artemisinina e heme do estudo realizado por Araujo e colaboradores, 2008, o qual estudou a interação desse complexo pelo método B3LYP com a base 6-31G e outras bases de cálculo, nos estados de multiplicidade, singleto, tripleto e quintupeto e septupeto. A validação da orientação do complexo para o conjunto teste foi obtida através do módulo de cálculo *Redundant Coordinate Editor*, implementado no programa Gaussview 5.0.8

Para a realização do escaneamento flexível utilizando dados de coordenada do ângulo diedro é necessário a seleção de quatro átomos vizinhos (C - O<sub>1</sub>- Fe - N). No estudo foi feito 10 ciclos de 6° graus cada, desta forma foi feito uma análise de 0-60° entre os átomos participantes da ligação supracitados, pois devido à complexidade estrutural do sistema que acarretou em impedimentos estéricos, não foi possível a rotação em 360°, sendo estabelecida assim uma rotina de cálculo de escaneamento de até 60°. O resultado final é visualizado através de um gráfico, no qual o eixo “X” representa as coordenadas (em graus) e o eixo “Y” representam a variável de energia total (em Hartrees), conforme figura abaixo:



**Figura 31:** Demonstração do giro entre o eixo da ligação O<sub>1</sub>-Fe para o complexo artemisinina-heme. (átomos. cinza - C; branco - H; vermelho - O; violeta - N; verde - Fe)  
**Fonte:** COSTA; KIRALJ; FERREIRA, 2007.

Por fim, as estruturas após a validação, foram otimizadas no método semi-empírico PM6, obtendo assim a energia de complexação. Outros parâmetros energéticos, como a energia do sistema heme e peróxidos foram calculadas no sentido de obter o valor de energia

final para a análise estatística e para a elucidação da estabilidade termodinâmica dessas estruturas.

Desta forma, foram realizados cálculos de *single-point* com o método PM6 para o complexo, ligante e heme separadamente em vácuo e solvente implícito, com constante dielétrica de 78,35, em estado de multiplicidade singleto, implementado no método PCM, do inglês, *Polarizable Continuum Model*, em que a cavidade molecular é representada por esferas sobrepostas, uma para cada átomo, cujo raio depende da natureza do átomo. Para obtenção do potencial eletrostático gerado pelo dielétrico, é utilizado o método das cargas aparentes de superfície (COSSI et al, 1996).

Segundo Araujo e colaboradores (2008) a diferença de energia entre o estado de multiplicidade singleto e o estado quintupeto, o mais estável para o complexo artemisinina-heme é de aproximadamente 2 kcal/mol, não tendo maiores efeitos no resultado do complexo final. Vale ressaltar que os valores energéticos referentes ao cálculo *single-point* do complexo em fase vácuo e solvente foram utilizados na matriz de correlação, diferentemente dos valores de *single-point* heme e ligante que foram utilizados para o cálculo de energia final, conforme equação abaixo:

$$\text{Energia Final} = \text{Energia do complexo} - (\text{Energia do peróxido} + \text{Energia do heme}).$$

**(Equação 2)**

Os parâmetros de distribuição eletrônica foram avaliados pelo Mapa de Potencial Eletrostático Molecular (MEP) implementado no pacote Gaussview 5.0.8 (FRISCH et al., 2009), no qual se identifica através de diagrama as regiões de maior densidade eletrônica coloridas especificamente.



## 6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1 ANÁLISE DO GRUPO HEME

Após as etapas de otimização por métodos de mecânica molecular UFF, seguido do método semi-empírico PM6, a estrutura final do grupo heme, tem a disposição dos grupos propionatos ( $\text{CH}_3\text{H}_4\text{-COOH}$ ) acima do anel porfirínico assumindo uma conformação perpendicular. Esta conformação provavelmente acontece devido à ligação de hidrogênio formada entre os grupos carboxil do heme, que estão distante 2,63 Å e 2,70 Å. A geometria final é muito diferente da estrutura cristalográfica obtida no PDB, com o valor do desvio médio quadrado, do inglês *Root-Mean-Square Deviation* (RMSD), de 0,88 Å. A tabela 1 mostra os parâmetros geométricos selecionados para identificar o mínimo global para a estrutura do heme.

**Tabela 1:** Parâmetros geométricos selecionados para a estrutura do heme no estado quintupletto por mecânica quântica e métodos experimentais. As distâncias e ângulos estão em Å e graus, respectivamente.

Métodos	Parâmetros Geométricos				
	Fe-N <sub>1</sub>	Fe- N <sub>2</sub>	Fe-O/N <sub>5</sub> <sup>5</sup>	N <sub>1</sub> -Fe-N <sub>4</sub>	N <sub>2</sub> -Fe-N <sub>3</sub>
Raios-X (1MKO)	2,008	2,002	2,027	174,730	174,760
PM3 <sup>6</sup>	1,893	1,890	2,087	172,140	169,530
PM6	2,052	2,052	2,111	156,217	142,625
MNDO/d	2,146	2,114	2,114	166,200	159,900

**Fonte:** ARANTES et al, 2005;

Conforme descrito na tabela 1, apesar desses parâmetros estarem próximos da estrutura cristalográfica 1MKO, a energia mínima da estrutura otimizada do grupo heme por PM6 tem uma conformação em “sela”, similar aos cálculos realizados pelo método MNDO/d (ARANTES et al, 2005) no os pares de átomos de carbono na extremidade de cada anel pirrol

<sup>5</sup> O e N<sub>5</sub> são os átomos de oxigênio e nitrogênio do anel imidazólico e a molécula de água presente na estrutura do heme otimizada por PM6 e MNDO/d, respectivamente;

<sup>6</sup> O valor de PM3 foi obtido por Arantes e colaboradores (2005) e os dados de PM6 foram obtidos neste estudo.

estão dispostos alternadamente acima e abaixo do plano porfirínico principal, enquanto os átomos de carbono *meso* estão aproximadamente no plano do anel porfirínico.

## 6.2 ANÁLISE DO CONJUNTO TREINO

A análise do conjunto treino permitiu visualizar o acoplamento dos peróxidos relacionados à artemisinina e ao receptor heme, no qual todos os derivados sintéticos foram submetidos à mesma rotina de cálculos. Além disso, este conjunto de estruturas permitiu as análises estatísticas (correlação), por conseguinte a elaboração da matriz de correlação.

Nesse sentido, foram realizados estudos de acoplamento molecular utilizando o programa AutoDock Vina 1.0.2. Os resultados mostraram que a grande maioria dos acoplamentos não acontecia com a orientação preferida (os átomos de oxigênio voltados para o ferro), provavelmente devido às limitações dos algoritmos de busca para sistemas com elementos de transição, característico do sistema estudado. Nesse sentido os acoplamentos foram realizados utilizando o protocolo de Shukla; Gund e Meshnick (1995) que descreveu a orientação dos átomos de oxigênio sobre o grupo ferro para a artemisinina e o heme. Posteriormente a identificação da orientação, estudos de otimização molecular foram feitos usando o método empírico UFF e semi-empírico PM6, no qual foram feitas rotinas de *single-point* do complexo em fase vácuo e solvente.

Através dos estudos de acoplamento molecular, foi possível identificar os valores de energia do complexo. Cálculos de energia *single-point* foram realizados para comparar a energia final de ligação de todos os compostos, conforme descrito na tabela 2.

**Tabela 2:** Valores de atividade biológica e *in silico* (Kcal/mol), para o conjunto treino.

Compostos	IC <sub>50</sub> (nM)	K <sub>d</sub>	Energia Autodock	Single point Vácuo	Single Point Solvente	Energia Full <sup>7</sup> opt	Single-point Heme	Single-point Ligantes	Energia final
Artemisinina	5,00	2,40	-5,20	-105,42	-137,12	-365,21	-37,65	-94,13	-233,43
c2	30,00	2,60	-5,20	-110,44	-142,86	-363,95	-43,92	-87,85	-232,18
c3a	20,00	3,40	-5,50	-107,93	-166,58	-371,48	-37,65	-112,95	-220,88
c3b	1,00	1,40	-5,20	491,33	420,69	-284,88	-6,27	100,40	-379,01
c3c	2,10	2,50	-5,20	138,05	35,46	-247,86	-43,92	100,40	-304,34
c3d	32,00	2,00	-4,50	-46,43	-102,85	-318,14	-37,65	-56,48	-224,01
c4a	1,10	2,10	-3,50	-24,47	-101,55	-368,16	-21,21	-106,13	-240,82
c4b	4,10	2,70	-5,10	-92,87	-105,75	-368,06	-34,29	-108,59	-225,18
c4c	24,00	3,20	-4,90	-96,63	-112,11	-368,97	-31,37	-112,95	-224,65
c4d	0,62	3,80	-5,10	-240,33	-328,90	-505,96	-36,20	-247,086	-222,67
c4e	0,39	0,50	-4,80	-59,61	-95,01	-318,77	-31,37	-62,75	-224,65

**Fonte:** Pesquisa Experimental

<sup>7</sup> A energia descrita como “full opt” refere-se a energia de complexação.

Através dos resultados obtidos é possível identificar que as estruturas “C<sub>3b</sub>” e “C<sub>3c</sub>”, apresentaram melhor estabilidade termodinâmica quando comparados com os demais peróxidos sintéticos e da artemisinina. Após análise estrutural é possível identificar que as mesmas diferem das demais, sendo que o substituinte no C<sub>9</sub> possui cadeias laterais com anéis aromáticos, em que o ferro está complexado com a nuvem eletrônica desses anéis aromáticos, característico do grupamento ferroceno.

Segundo Francisco e Vargas, 2010, estruturas com grupamento ferroceno possuem melhor atividade antimalárica do ponto de vista biológico, devido provavelmente as suas propriedades de oxidação-redução, com a geração de espécie do tipo cátion-radical – íon ferrocênio. Além dessas estruturas, o análogo c<sub>4a</sub> (diidroartemisinina) também apresentou boa estabilidade termodinâmica quando comparados à artemisinina. A diidroartemisinina é mais potente que a artemisinina, porém apresenta o inconveniente de possuir menor meia-vida plasmática (KAMCHONWONGPAISAN, MESHNICK, 1996).

Desta forma é possível identificar que os valores de energia final para as estruturas “C<sub>3b</sub>” e “C<sub>3c</sub>” são respectivamente 145,58 e 70,91 Kcal/mol menores quando comparadas à artemisinina. Além disso, a estrutura “C<sub>4a</sub>” difere 7,39 kcal quando comparado a artemisinina.

Além disso, é possível identificar que os valores de energia de acoplamento obtido pelo AutoDock Vina 1.0.2 mostraram pouca variação energética, partindo do pressuposto que existe pouca variação estrutural entre os compostos diferindo apenas nos substituintes em C<sub>9</sub> e O<sub>14</sub>. Os valores de energia de complexação positivos comparados à artemisinina para as estruturas C<sub>3b</sub>, C<sub>3c</sub>, C<sub>3d</sub> e C<sub>4e</sub> podem refletir possível impedimento estérico com o sistema porfirínico do grupo heme e a cadeia lateral desses grupos (anel aromático para os dois primeiros e anel imidazólico para os dois últimos).

Por fim é possível identificar que houve uma concordância entre os dados de atividade biológica relatados na literatura dos peróxidos sintéticos com os valores energéticos destes peróxidos comparados à artemisinina, sendo que esta inferência foi comprovada através das análises estatísticas, descritas na matriz de correlação.

### 6.2.1 Análises Estatísticas

Através da análise estatística usando os testes não paramétricos Kendall ( $\tau$ ) e Spearman ( $\rho$ ), devido ao grau de assimetria identificado, foi possível montar a matriz de correlação (Tabela 3 e 4). Os valores obtidos foram submetidos aos níveis de significância estatística,  $\alpha= 0,05$  e  $\alpha= 0,01$ , os quais são descritos como significante e altamente significante (limite utilizado como base para afirmar que certo desvio é decorrente do acaso ou não). Vale ressaltar que o coeficiente de correlação pode assumir valores no intervalo  $[-1;+1]$ , sendo descritos como correlação positiva ou negativa, além disso, ressalta-se que o cruzamento dos dados foi feito com todas as variáveis (biológicas e *in silico*).

**Tabela 3:** Matriz de correlação entre os valores de atividade biológica (IC<sub>50</sub> e Kd) e valores *in silico*, com o teste não paramétrico Kendall ( $\tau$ ). (Os valores em destaque são aqueles que apresentam os maiores coeficientes de correlação).

Parâmetros	Coeficiente de correlação Teste não paramétrico Kendall ( $\tau$ )								
	IC <sub>50</sub>	Kd	Energia AutoDock	Single-point vácuo	Single-point solvente	Energia complexo	Single-point heme	Single-point ligante	Energia Final
IC <sub>50</sub>	1,00	0,20	-0,12	-0,24	-0,28	0,06	-0,38	-0,02	0,22
Kd	0,20	1,00	-0,20	<b>-0,53*</b>	<b>-0,64**</b>	<b>-0,60*</b>	-0,23	<b>-0,65**</b>	0,44
AutoDock Vina	-0,12	-0,20	1,00	0,27	0,23	-0,04	0,41	-0,02	0,14
Single-point vácuo	-0,24	<b>-0,53</b>	0,27	1,00	<b>0,89</b>	<b>0,56</b>	0,34	<b>0,61</b>	-0,48
Single-point solvente	-0,27	<b>-0,64</b>	0,23	<b>0,89</b>	1,00	0,60	0,31	<b>0,65</b>	<b>-0,51</b>
Energia complexo	0,06	<b>-0,60</b>	-0,04	<b>0,56</b>	<b>0,60</b>	1,00	-0,11	<b>0,95</b>	-0,40
Single-point heme	-0,38	-0,23	0,41	0,34	0,31	-0,11	1,00	-0,08	-0,15
Single-point ligante	-0,02	<b>-0,65</b>	-0,02	<b>0,61</b>	<b>0,65</b>	<b>0,95</b>	-0,08	1,00	-0,45
Energia Final	0,22	0,44	0,14	-0,48	<b>-0,51</b>	-0,40	-0,15	-0,45	1,00

**Fonte:** Pesquisa Experimental

**Tabela 4:** Matriz de correlação entre os valores de atividade biológica (IC<sub>50</sub> e Kd) e valores *in silico*, com o teste não paramétrico Spearman ( $\rho$ ). (Os valores em destaque são aqueles que apresentam os maiores coeficientes de correlação).

Parâmetros	Coeficiente de correlação Teste não paramétrico Spearman ( $\rho$ )								
	IC <sub>50</sub>	Kd	Energia AutoDock	Single-point vácuo	Single-point solvente	Energia complexo	Single-point heme	Single-point ligante	Energia Final
IC <sub>50</sub>	1,00	0,24	-0,13	-0,25	-0,35	-0,01	<b>-0,53</b>	-0,04	0,23
Kd	0,24	1,00	-0,35	<b>-0,72*</b>	<b>-0,79**</b>	<b>-0,75**</b>	-0,33	<b>-0,80**</b>	<b>0,50</b>
AutoDock Vina	-0,13	-0,35	1,00	0,27	0,27	-0,06	0,47	-0,05	0,11
Single-point vácuo	-0,25	<b>-0,72</b>	0,27	1,00	<b>0,96</b>	<b>0,71</b>	0,40	<b>0,74</b>	<b>-0,65</b>
Single-point solvente	-0,35	<b>-0,79</b>	0,27	<b>0,96</b>	1,00	<b>0,78</b>	0,40	<b>0,80</b>	<b>-0,67</b>
Energia complexo	-0,01	<b>-0,75</b>	-0,06	<b>0,71</b>	<b>0,78</b>	1,00	-0,15	<b>0,99</b>	<b>-0,62</b>
Single-point heme	<b>-0,53</b>	-0,33	0,47	0,40	0,40	-0,15	1,00	-0,10	-0,18
Single-point ligante	-0,04	<b>-0,80</b>	-0,05	<b>0,74</b>	<b>0,80</b>	<b>0,99</b>	-0,10	1,00	<b>-0,63</b>
Energia Final	0,23	<b>0,50</b>	0,11	<b>-0,65</b>	<b>-0,67</b>	<b>-0,62</b>	-0,18	<b>-0,63</b>	1,00

**Fonte:** Pesquisa Experimental.

Utilizando os dados obtidos através dos coeficientes de correlação foi possível identificar que algumas variáveis tiveram correlações significativas positivas e negativas, conforme mostrado nas tabelas 3 e 4. Contudo, o objetivo deste estudo foi investigar as correlações entre as variáveis biológicas ( $K_d$  e  $IC_{50}$ ) e as demais variáveis descritas como dados *in silico*. Nesse sentido, através do teste não paramétrico Spearman ( $\rho$ ), que é mais utilizado para variáveis medidas no nível ordinal, foi possível identificar que houve correlação entre as variáveis,  *$K_d$  e single-point vácuo*,  *$K_d$  e single-point solvente*,  *$K_d$  e Energia do complexo*,  *$IC_{50}$  e single-point heme*,  *$K_d$  e single-point ligante* e por fim  *$K_d$  e Energia final*. Vale ressaltar que a notação \* e \*\* gerada pelo programa SPSS 17.0 identifica as regiões significativas ( $\alpha=0,05$ ) e altamente significativas ( $\alpha=0,01$ ) respectivamente.

Como pode ser observado nas tabelas supracitadas, a constante de dissociação foi o parâmetro de atividade biológica com o maior número de correlações em ambos os testes não paramétricos. Este achado possibilita inferências quanto a qualidade das correlações e, por conseguinte da metodologia empregada e dos dados obtidos, pois o valor de  $K_d$  experimental foi obtido diretamente com os peróxidos sintéticos sobre o grupo heme através das mudanças espectrais entre esse sistema, o que possibilita melhor inferência aos estudos de acoplamento molecular com o mesmo sistema. Em contrapartida, os dados de atividade biológica representado por  $IC_{50}$  não representa o sistema peróxidos sintéticos e heme, pois não há determinação de alvo biológico nesses ensaios, além disso, o mecanismo de ação dos peróxidos ainda se encontra em debate.

As principais correlações obtidas do ponto de vista quali-quantitativo, referem-se à energia do complexo e  $K_d$  ou energia final e  $K_d$ , pois em todas essas variáveis há uma relação intrínseca entre a interação ligante-receptor. Vale ressaltar que o coeficiente de correlação foi menor entre os parâmetros energia final e  $K_d$  quando comparados a energia do complexo e o mesmo parâmetro experimental em ambos os testes não paramétricos, possivelmente devido ao somatório de variáveis inerente ao cálculo de energia final (Equação 2), o que pode ter acarretado em valores de correlação menores, quando comparados ao parâmetros de energia de complexação. Além disso, é importante destacar que a correlação entre energia do complexo e  $K_d$ , teve um valor de correlação altamente significativo no teste de Spearman ( $\rho$ ), pois o mesmo se encontrou na região crítica ou região de rejeição com um nível de significância de  $\alpha=0,01$ , desta



forma é improvável que este valor seja ao acaso, rejeitando-se assim a hipótese de nulidade.

Nesse sentido é possível identificar que houve uma correlação entre as variáveis supracitadas (energia do complexo e  $K_d$ , energia final e  $K_d$ ), refletindo a qualidade experimental da metodologia empregada neste estudo dando suporte para a realização dos estudos de acoplamento molecular entre o grupo heme e o conjunto teste, possibilitando inferências entre os valores obtidos a nível *in silico* e uma possível atividade antimalárica dos peróxidos com melhor estabilidade termodinâmica, possibilitando assim otimização nos ensaios de possíveis candidatos a fármacos antimaláricos, com o auxílio da modelagem molecular.

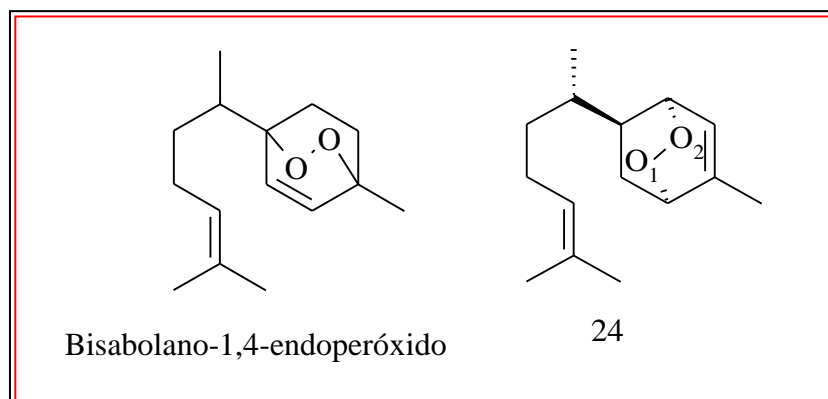
### 6.3 ANÁLISE DO CONJUNTO TESTE

As estruturas com melhores valores energéticos foram as estruturas “5” e “24”, quando comparadas à artemisinina. O composto 5 é metabólito secundário da planta do gênero *Juniperus sp*, o qual pertence à família Cupressaceae, muito frequente na zona mediterrânea, porém com registros no Brasil, principalmente na região Sul do Brasil (FORZZA et al, 2010). Este composto pertence à classe dos diterpenos (norabietanos) com grupamento endoperóxido, sendo que ainda não foram realizados estudos de atividade antimalárica.

O composto 24 é encontrada em diversas espécies como *Alpinia densibracteata*, *Senecio selloi* e *Eupatorium rufescens*, sendo que as duas últimas espécies possuem ocorrência no Brasil, segundo Teles, 2010 e Nakajima, 2010. Desta forma, a seleção desses compostos (5 e 24) possibilitariam estudos quimiosistemáticos e ensaios de atividade antimalárica de extratos ou dos compostos bioativos identificados neste estudo por modelagem molecular.

A estrutura química do composto 24 refere-se a um sesquiterpeno com esqueleto bisabolano, o qual a literatura aponta como uma família de compostos com inúmeras atividades biológicas, inclusive antimaláricas (EPIFÂNIO et al, 2007). Rucker e colaboradores (1997), identificaram pouca atividade antimalárica em um sesquiterpeno com esqueleto bisabolano (figura 32) que difere apenas na configuração isomérica da metila e na orientação da ligação endoperoxídica do composto 24, porém ainda não foi

realizado estudos de atividade antimalárica para esse composto. Vale ressaltar que ambas as estruturas que possuem melhores valores energéticos apresentam grupamento endoperóxido, similar a artemisinina.



**Figura 32:** A semelhança estrutural entre o composto 24 e composto identificado por Rücker et al, 1997.  
**Fonte:** Autor

Segundo Taranto e colaboradores (2002) a reação entre a artemisinina e o heme ocorre preferencialmente através de uma interação entre o  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{O}_2$ , com uma distância de ligação de 2,38 Å ao invés de  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{O}_1$  com uma distância de 2,60 Å. Resultados contrários foram obtidos nesse estudo, usando o método PM6 com o átomo de ferro mais próximo do átomo  $\text{O}_1$  (1,89 Å) que do  $\text{O}_2$  (1,90 Å).

Vale ressaltar que a preferência de ligação foi sustentada através de valores de distribuição eletrônica, em que o átomo  $\text{O}_1$  foi o átomo de oxigênio mais eletronegativo quando comparado ao átomo  $\text{O}_2$  (pois pequena variação de distância de ligação foi obtida entre  $\text{Fe}-\text{O}_1$  e  $\text{Fe}-\text{O}_2$  para o complexo artemisinina e heme), sendo que este parâmetro (densidade eletrônica) foi utilizado para identificar  $\text{O}_1$  e  $\text{O}_2$  nos demais peróxidos sem sistema de numeração definido.

Esses dados são suportados por estudos de Tonmunphean e colaboradores, 2000 no qual estudaram teoricamente a interação da artemisinina e 29 derivados com o heme, no vácuo. Neste estudo, os resultados mostraram que eles se aproximam do heme preferencialmente por intermédio do átomo de oxigênio  $\text{O}_1$  da ligação endoperóxido, em direção ao átomo de Fe do receptor heme.

Na Tabela 5 estão disponíveis todos os parâmetros geométricos selecionados para a artemisinina, bem como para todos os complexos estudados.

**Tabela 5:** Distância selecionada para a artemisinina e o conjunto teste em Å para o complexo otimizado por PM6.

Compostos	O <sub>1</sub> <sup>8</sup> -Fe	O <sub>2</sub> -Fe	O <sub>1</sub> -O <sub>2</sub>
Artemisinina	1,89	1,90	2,20
1	1,84	1,85	2,22
2	1,83	1,85	2,35
3	1,84	1,87	2,21
4	1,85	1,86	2,20
5	1,92	1,76	2,22
6	1,83	1,85	2,35
7	1,85	1,88	2,20
8	1,84	1,83	2,34
9	1,86	1,86	2,21
10	1,85	1,84	2,34
11	1,88	1,83	2,22
12	1,85	1,85	2,20
13	1,85	1,86	2,21
14	1,87	1,86	2,31
15	1,83	1,84	2,35
16	1,87	1,84	2,21
17	1,86	1,81	2,34
18	1,83	1,85	2,22
19	1,81	1,88	2,33
20	1,87	1,84	2,21
21	1,87	1,84	2,22
22	1,87	1,85	2,22
23	1,87	1,82	2,35
24	1,83	1,86	2,34
25	1,85	1,83	2,36
26	1,83	1,84	2,34
27	1,84	1,85	2,35
28	1,85	1,86	2,20
29	1,85	1,84	2,34
30	1,87	1,84	2,19

<sup>8</sup> O átomo O<sub>1</sub> foi o de maior densidade eletrônica.

**Tabela 5:** Distância selecionada para a artemisinina e o conjunto teste em Å para o complexo otimizado por PM6 (Continuação).

Peróxidos	O <sub>1</sub> -Fe	O <sub>2</sub> -Fe	O <sub>1</sub> -O <sub>2</sub>
31	1,89	1,85	2,17
32	1,89	1,84	2,22
33	1,85	1,87	2,21
34	1,87	1,84	2,21
35	1,87	1,83	2,38
36	1,89	1,84	2,20
37	1,85	1,82	2,34
38	1,85	1,85	2,21
39	1,86	1,85	2,20
40	1,85	1,89	2,20

**Fonte:** Pesquisa Experimental

Todos os complexos resultantes têm a ligação peróxido em direção ao íon ferro, o que está de acordo com a literatura (MESHNICK et al, 1996; KLAYMAN, 1985; MOLES; OLIVA; SAFONT, 2008). A distância entre os oxigênios da ligação peróxido variou de 2,17 a 2,22 Å, exceto em 16 peróxidos no qual a distância excedeu 2,3 Å (2, 6, 8, 10, 14, 15, 17, 19, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30 e 37). Dentre estes peróxidos é importante destacar o composto 24 o qual apresentou melhor valor energético, em que a distância de 2,34 Å entre O<sub>1</sub> e O<sub>2</sub> pode evidenciar um rompimento nessa ligação e conseqüentemente uma ligação entre O<sub>1</sub> e ferro pode ter sido feita com uma distância de 1,83 Å em um possível complexo intermediário.

Em adição, os estudos de acoplamento molecular mostraram que a interação entre o heme e todos os peróxidos ocorre principalmente com alta estabilidade termodinâmica, em que os compostos 5 e 24 apresentaram valores de energia relativa inferior à artemisinina com variações de 101,43 e 259,00 Kcal/mol, respectivamente (Tabela 6). Os demais compostos tiveram pouca variação energética em relação à artemisinina, sendo assim as estruturas supracitadas poderiam ser selecionadas para estudos de atividade biológica contra *P. falciparum*, sendo potenciais compostos protótipos.

**Tabela 6:** Energia de ligação (kcal/mol) para o conjunto teste, de acordo com o método PM6.

Energia kcal/mol							
Compostos	AutoDock Vina	Single-point vácuo	Single-point solvente	Energia full opt	Single-point heme	Single-point ligante	Energia Final
Artemisinina	-5,50	-105,42	-137,12	-365,21	-37,65	-94,13	-233,43
1	-5,40	63,56	41,73	-265,45	-36,72	3,77	-232,49
2	-5,10	-106,71	-131,78	-357,68	-37,65	-69,03	-251,00
3	-4,80	17,60	-69,03	-282,14	-36,62	1,92	-247,45
4	-5,70	625,29	602,34	-279,19	-37,42	1,85	-243,62
<b>5</b>	<b>-5,80</b>	<b>1097,33</b>	<b>1070,27</b>	<b>-312,02</b>	<b>58,32</b>	<b>-35,48</b>	<b>-334,86</b>
6	-5,30	157,37	131,78	-320,03	-43,93	-25,10	-251,00
7	-4,90	-35,04	-56,48	-445,53	-31,38	-163,15	-251,00
8	-5,20	518,98	483,18	-451,81	-37,65	-163,15	-251,00
9	-5,00	314,78	276,10	-407,88	-37,65	-175,70	-194,53
10	-4,90	302,91	269,83	-409,32	-37,65	-119,23	-252,44
11	-4,70	409,32	382,78	-382,78	-37,65	-87,85	-257,28
12	-4,80	903,36	872,24	-464,36	-37,65	-175,70	-251,00

Energia kcal/mol							
Compostos	AutoDock Vina	Single-point vácuo	Single-point solvente	Energia full opt	Single-point heme	Single-point ligante	Energia Final
13	-4,30	242,95	219,63	-244,73	-31,38	31,38	-244,73
14	-4,90	-0,97	-25,10	-423,08	-43,93	-131,78	-247,38
15	-4,70	304,86	269,83	-370,23	-37,65	-69,03	-263,55
16	-3,90	152,55	125,50	-238,45	-37,65	37,65	-238,45
17	-3,90	138,43	112,95	-345,13	-37,65	-75,30	-232,18
18	-3,80	11,22	-6,28	-238,45	-37,65	37,65	-238,45
19	-4,20	20,09	-3,77	-351,41	-43,93	-56,48	-251,00
20	-3,80	99,12	75,30	-238,45	-37,65	12,55	-213,35
21	-3,90	36,53	12,55	-232,18	-37,65	12,55	-207,08
22	-3,50	54,04	31,90	-235,81	-40,28	46,04	-241,56
23	-4,60	96,01	69,03	-263,55	-43,93	12,55	-232,18
24	-4,30	92,19	62,75	-259,62	238,45	-5,65	-492,43
25	-4,90	89,25	62,75	-257,28	-43,93	31,38	-244,73
26	-4,70	22,82	-2,51	-335,45	5,65	-43,93	-297,17
27	-4,40	191,40	163,15	-340,35	-37,65	-75,30	-227,40
28	-5,10	110,05	81,58	-391,55	-37,65	-100,40	-253,50

Energia kcal/mol							
Compostos	AutoDock Vina	Single-point vácuo	Single-point solvente	Energia full opt	Single-point heme	Single-point ligante	Energia Final
29	-4,50	132,92	94,13	-391,09	-28,98	-93,47	-268,64
30	-4,10	43,29	12,55	-332,58	-37,65	-75,30	-219,63
31	-4,00	-4,53	-25,10	-371,07	-37,65	-125,50	-207,92
32	-4,70	70,65	43,93	-252,92	-37,65	-5,02	-210,25
33	-5,40	442,61	420,43	-332,58	-33,26	-50,20	-249,12
34	-4,20	146,99	119,23	-384,74	-31,38	-156,88	-196,49
35	-4,70	202,77	169,43	-401,61	-12,55	-131,78	-257,28
36	-5,10	-54,36	-81,58	-464,36	-40,16	-169,43	-254,77
37	-3,30	229,67	145,83	-261,50	-42,66	32,11	-250,96
38	-4,30	359,39	46,39	-286,90	-35,77	-1,46	-249,66
39	-4,30	-11,17	-178,32	-350,87	-38,03	-58,79	-254,06
40	-5,90	490,79	150,67	-348,70	-38,60	-67,52	-242,58

Fonte: Pesquisa Experimental

A energia de ligação do complexo da artemisinina-heme foi de -233,43 Kcal/mol e conforme descrito a ligação endoperóxido está direcionada para o íon ferro do heme. A energia de ligação da artemisinina está muito próxima de outros valores obtidos em diversos artigos, respeitando as especificidades dos métodos teóricos (ARAÚJO; CARNEIRO; TARANTO, 2006; MOLES; OLIVA; SAFONT, 2008).

Neste estudo, o cálculo de energia *single-point* foi realizado para comparar a energia de ligação de todos os compostos. Conforme referido, os compostos 5 e 24 apresentaram valores de energia final inferior à artemisinina. Os complexos menos estáveis termodinamicamente, são os complexos com os peróxidos 9 e 34 com energia final de ligação de -194,53 e -196,49 Kcal/mol respectivamente. Esses peróxidos são sistemas muito grandes o que provavelmente pode ter gerado “choques” efetivos entre o sistema porfirínico do grupo heme e a cadeia lateral desses grupos, principalmente o peróxido 34. Este resultado sugere que os prótons axiais e os grupos metil desses compostos podem ocasionar um bloqueio estérico dificultando a interação com o heme, deixando o restante da molécula distante do grupo heme.

Por outro lado, o composto mais termodinamicamente estável é o peróxido 24 com uma energia final de -492,43 Kcal/mol. Este peróxido tem um sistema cíclico que pode estar envolvido em interações hidrofóbicas com o receptor, diminuindo assim a energia final.

### 6.3.1 Análise do escaneamento do ângulo diedro.

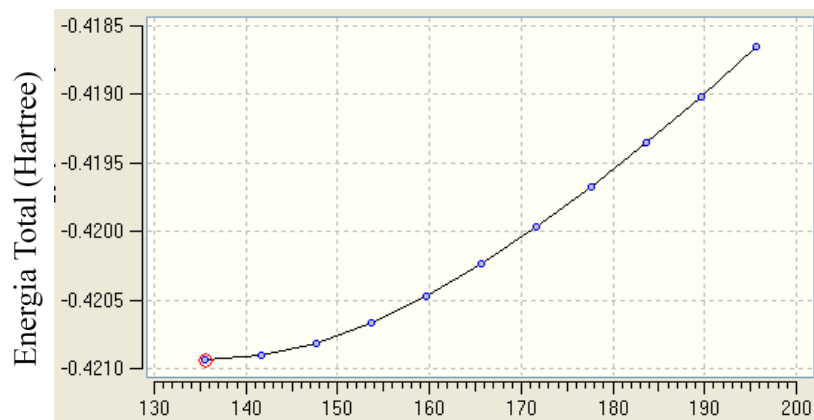
O cálculo de escaneamento flexível foi realizado no intuito de validar os acoplamentos gerados pelo AutoDock Vina 1.0.2. Nesse sentido, respeitando a liberdade de rotação entre a ligação  $O_1$  e Fe foram obtidos os gráficos que demonstram os confôrmeros em cada ciclo de rotação que neste estudo foi de 10 ciclos de 6 graus.

De acordo com os resultados (Figura 33) é possível identificar que houve um aumento energético com o aumento dos ciclos de escaneamento, exceto para os complexos 5, 12, 17 e 24, sem deflexão aparente na curva. Nesses complexos supracitados é interessante visualizar o comportamento do sistema em demais ciclos, porém houve impedimento estérico entre peróxido e heme, o que inviabilizou a continuação do processo de escaneamento com maior número de ciclos. Além disso, nos complexos 32, 34 e 40 os valores de mínimo energético, provavelmente não correspondem ao primeiro ciclo, pois o comportamento do gráfico indica

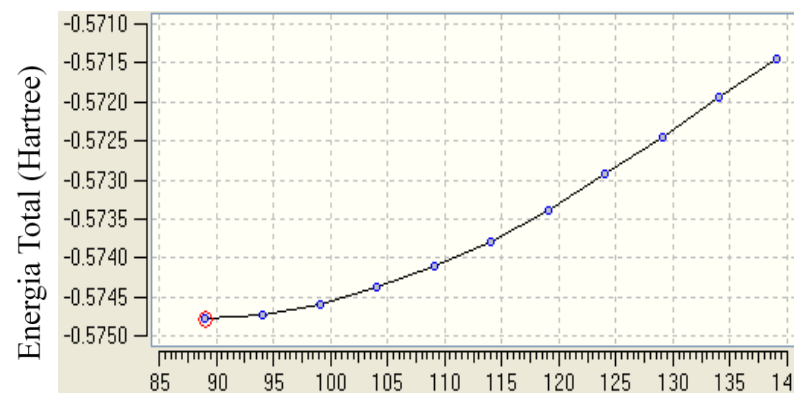


deflexão, porém como referido o impedimento estérico impossibilitou o escaneamento de 0 a 360 graus, e, por conseguinte a obtenção do mínimo energético para esses 7 complexos (5, 12, 17, 24, 32, 34 e 40), apesar de que não é possível identificar com exatidão que não haveria deflexão entre os demais complexos.

Porém como objetivo de validação, o escaneamento foi uma ferramenta útil, haja vista que a diferença de posição em relação ao eixo  $O_1$ -Fe e, por conseguinte diferença de energia foi pequena, o que pressupõe que para os complexos com comportamento de curva com deflexão, os valores energéticos devem estar próximos aos ciclos anteriores.

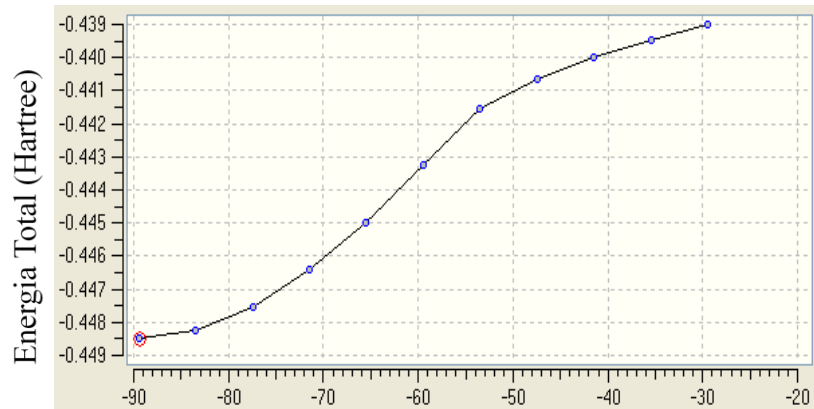


Coordenadas (em graus)

**Complexo 1**

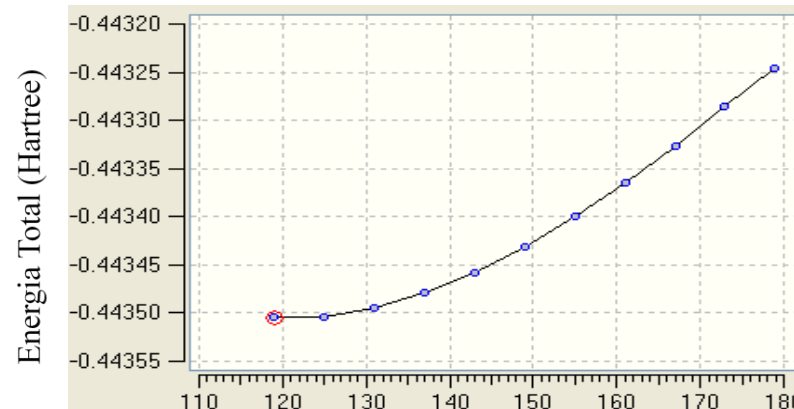
Energia Total (Hartree)

Coordenadas (em graus)

**Complexo 2**

Energia Total (Hartree)

Coordenadas (em graus)

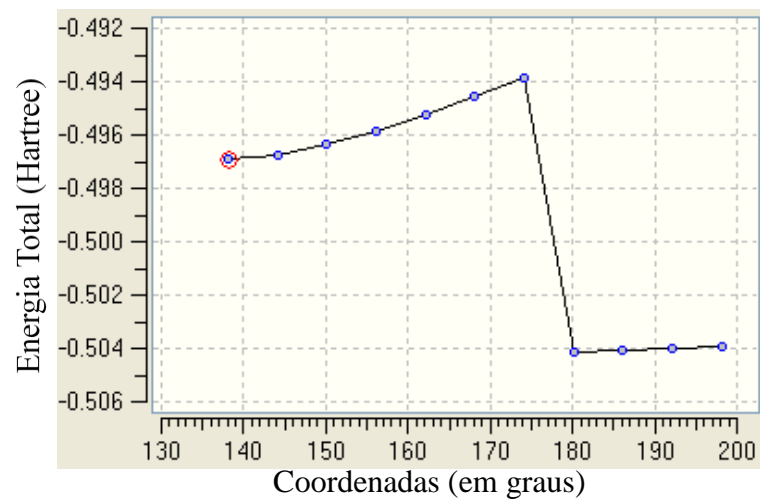
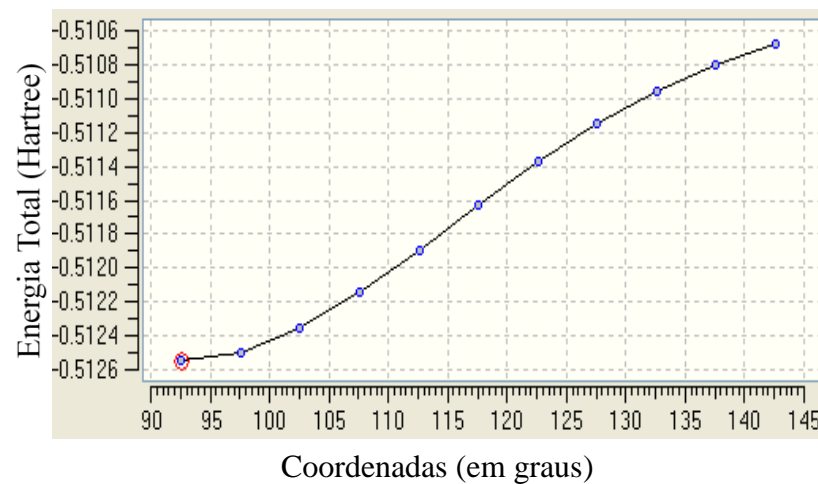
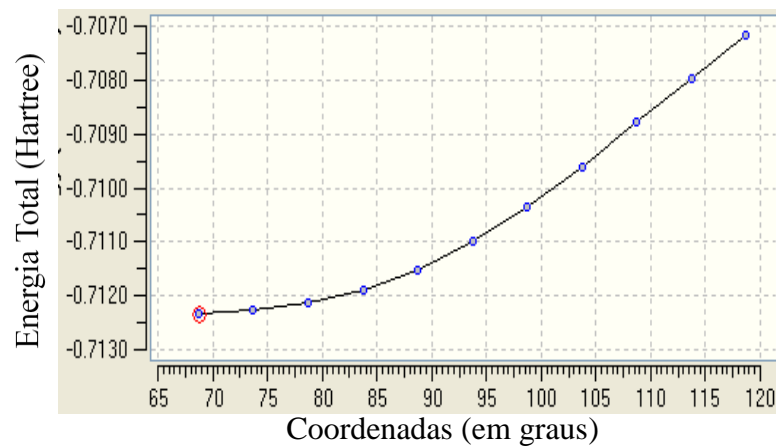
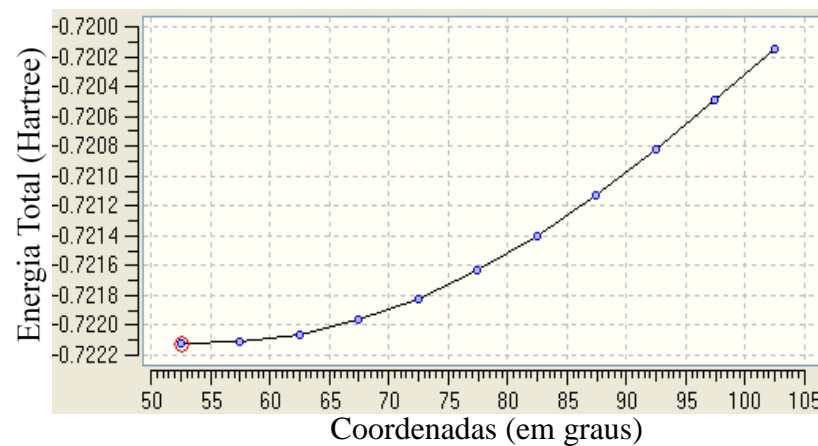
**Complexo 3**

Energia Total (Hartree)

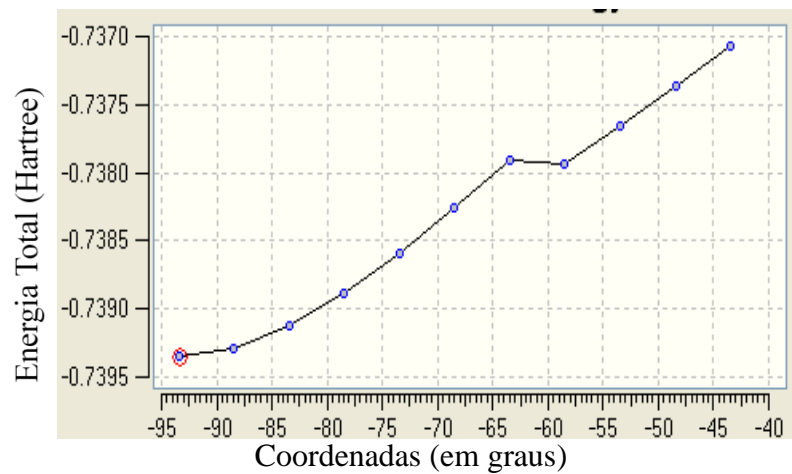
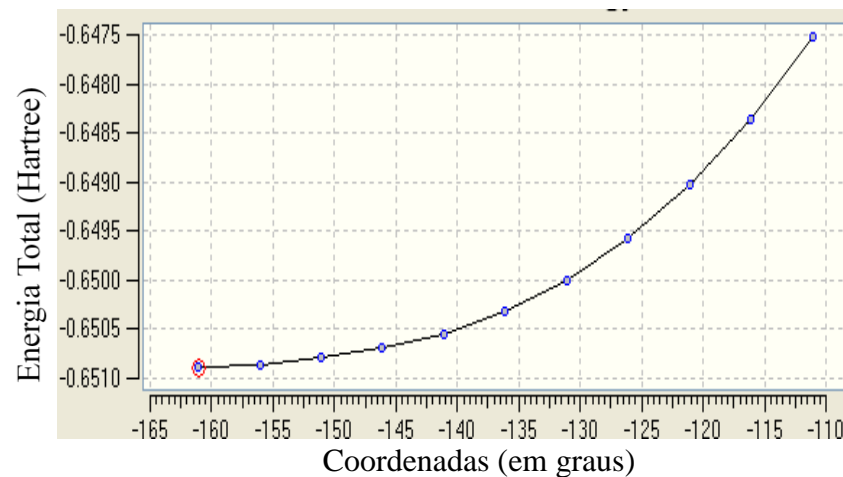
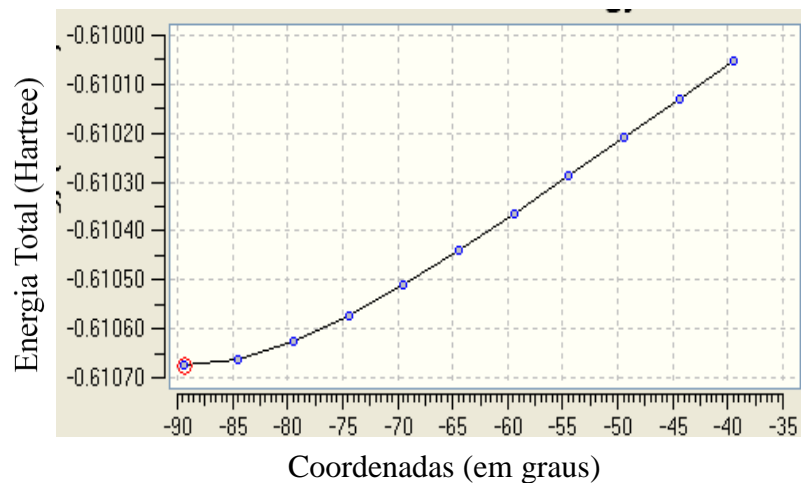
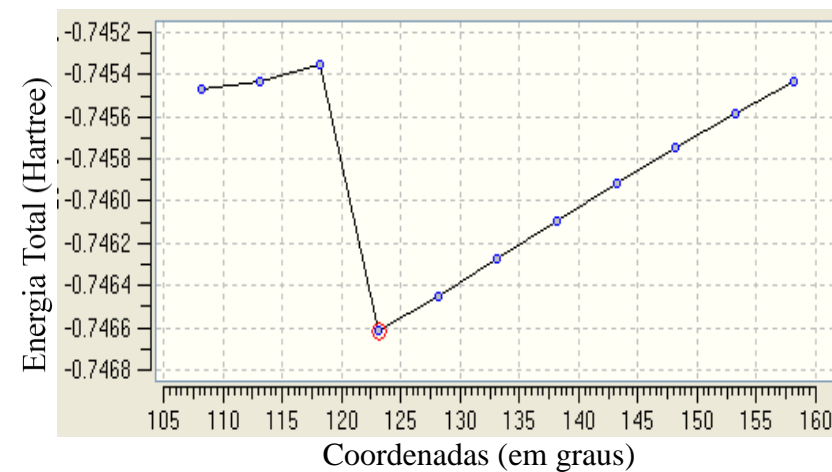
Coordenadas (em graus)

**Complexo 4****Figura 33:** Análise dos escaneamentos dos peróxidos selecionados para o estudo.

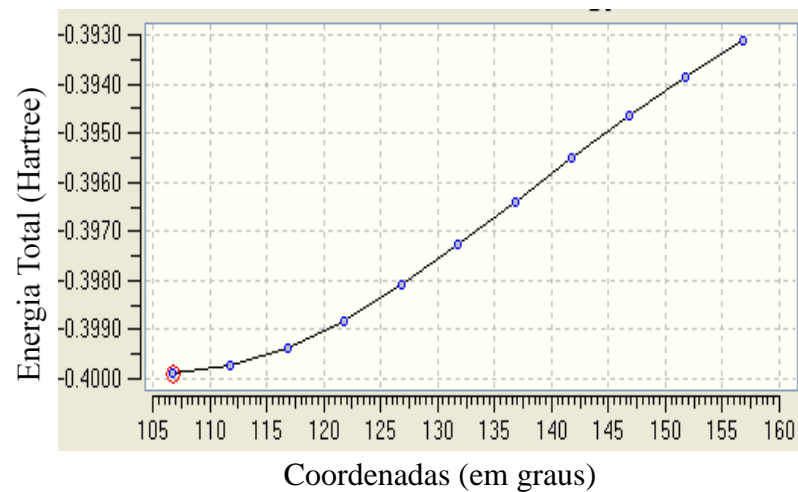
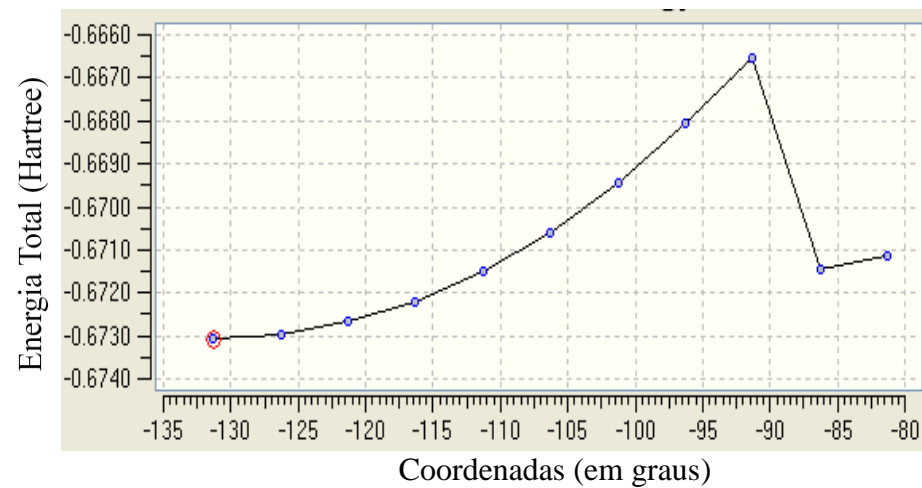
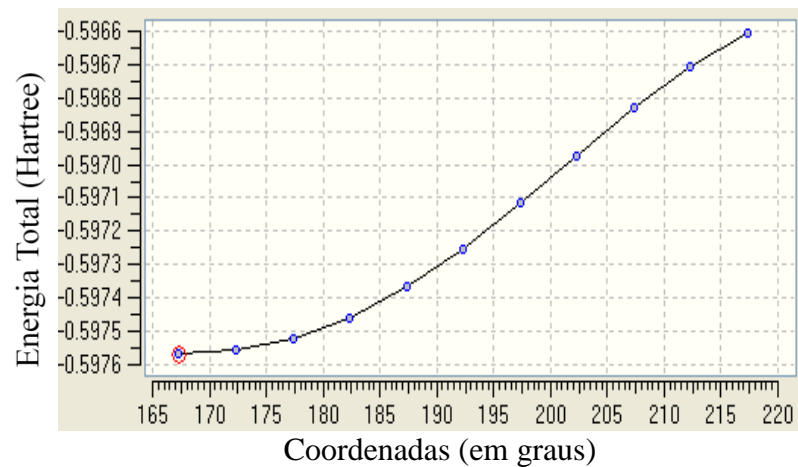
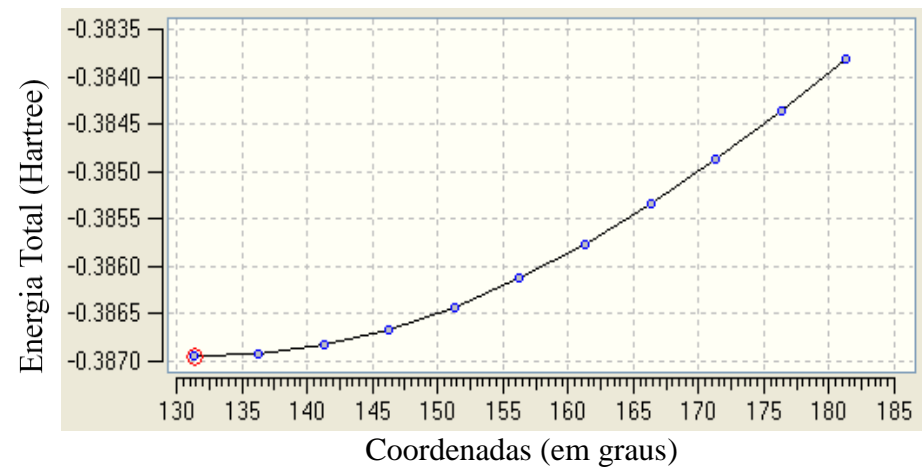
Fonte: Pesquisa Experimental.

**Complexo 5****Complexo 6****Complexo 7****Complexo 8****Figura 33:** Análise dos escaneamentos dos peróxidos selecionados para o estudo. (Continuação)

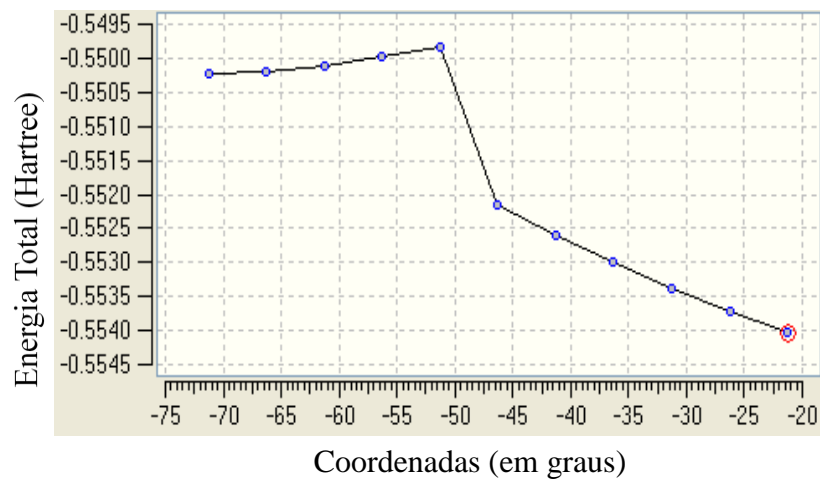
Fonte: Pesquisa Experimental.

**Complexo 9****Complexo 10****Complexo 11****Complexo 12****Figura 33:** Análise dos escaneamentos dos peróxidos selecionados para o estudo. (Continuação)

Fonte: Pesquisa Experimental.

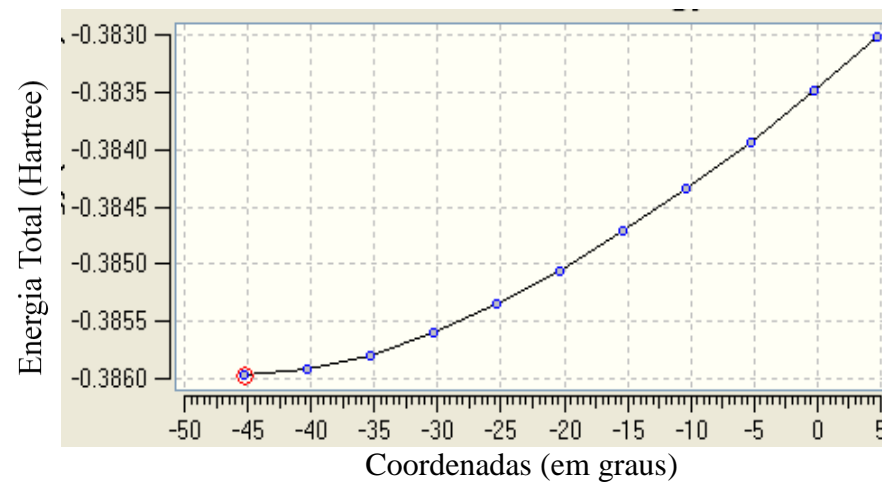
**Complexo 13****Complexo 14****Complexo 15****Complexo 16****Figura 33:** Análise dos escaneamentos dos peróxidos selecionados para o estudo. (Continuação)

Fonte: Pesquisa Experimental.



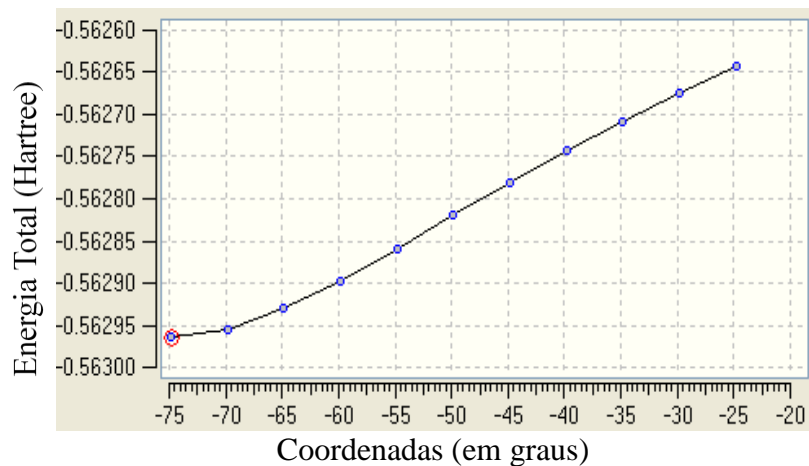
Coordenadas (em graus)

**Complexo 17**



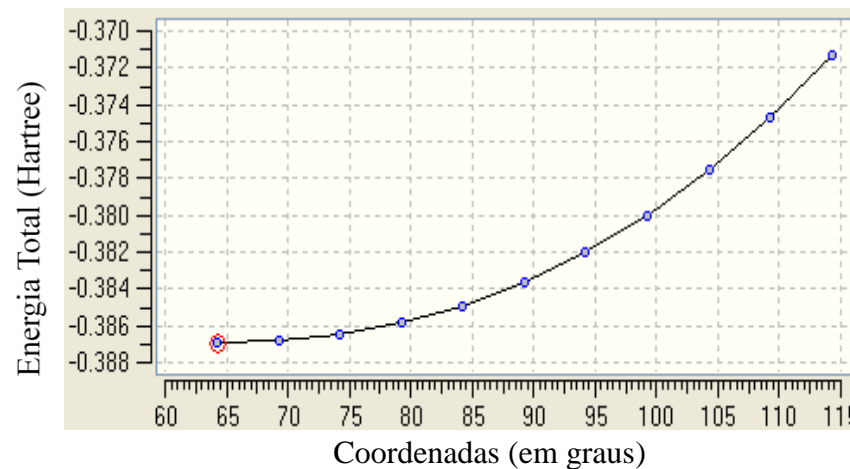
Coordenadas (em graus)

**Complexo 18**



Coordenadas (em graus)

**Complexo 19**

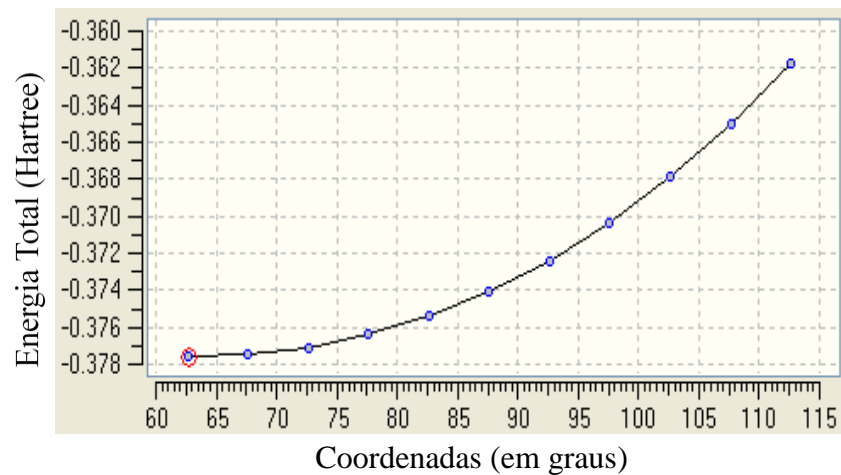
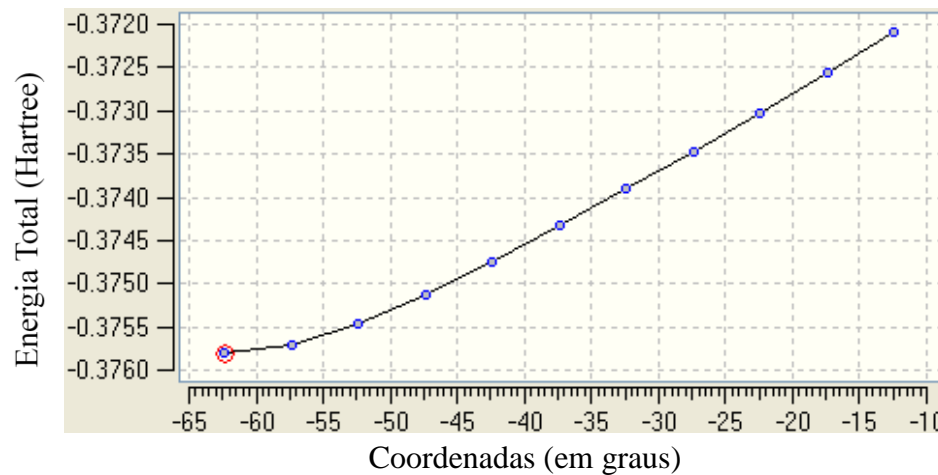
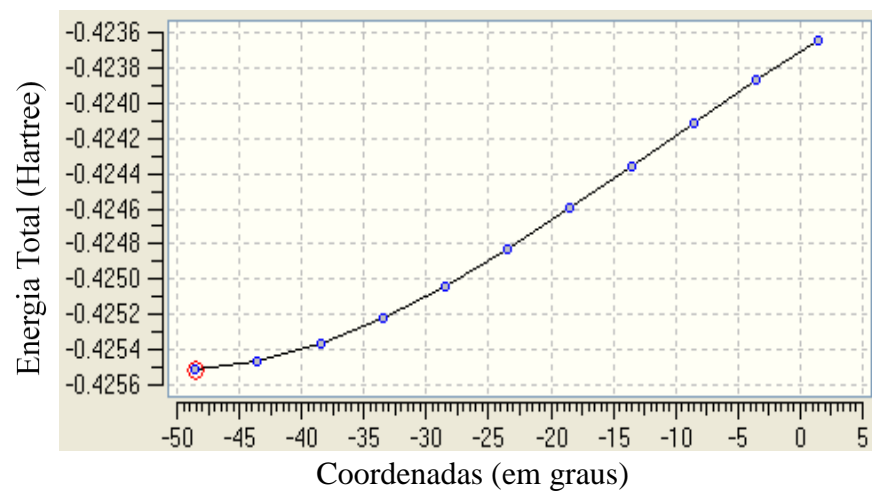
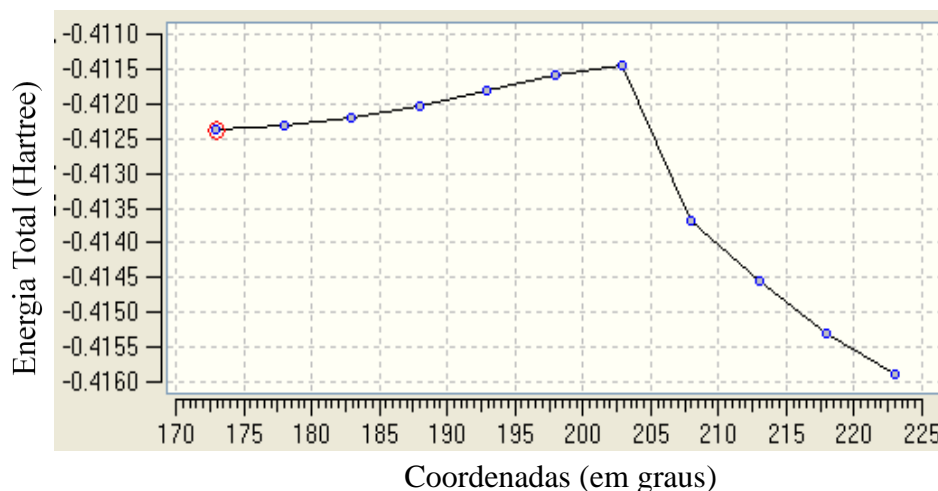


Coordenadas (em graus)

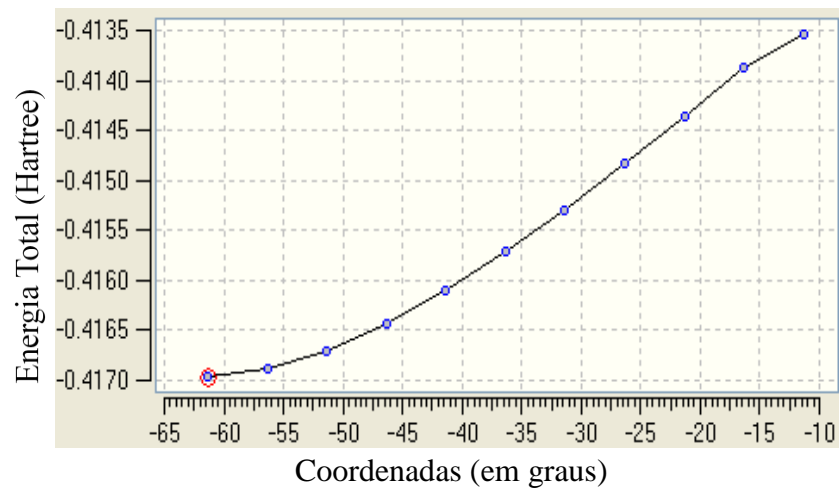
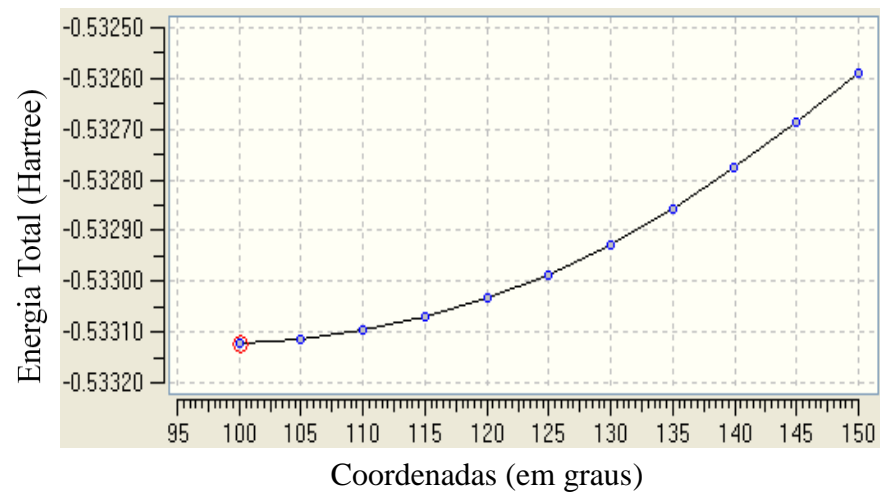
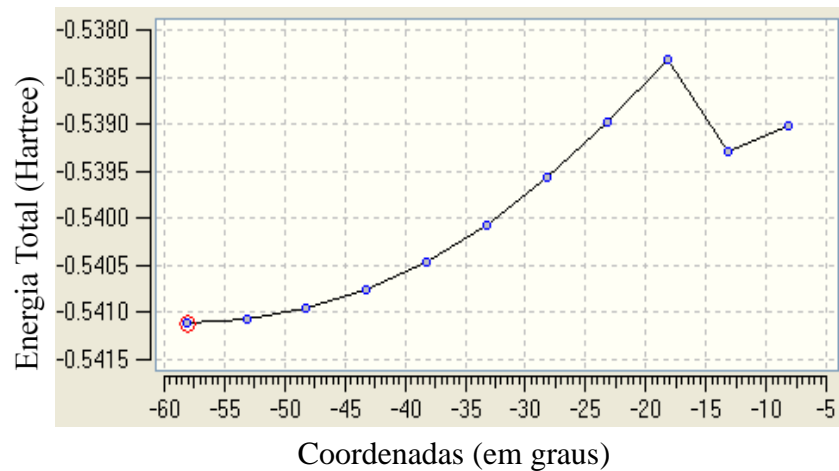
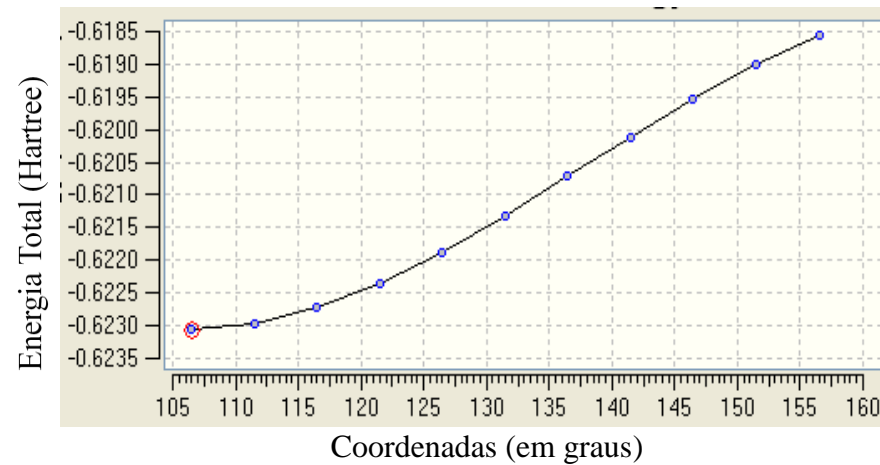
**Complexo 20**

**Figura 33:** Análise dos escaneamentos dos peróxidos selecionados para o estudo. (Continuação)

**Fonte:** Pesquisa Experimental.

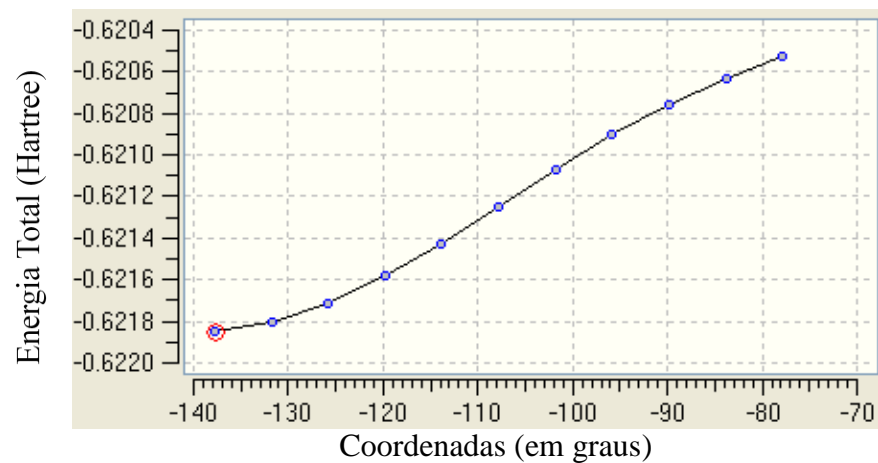
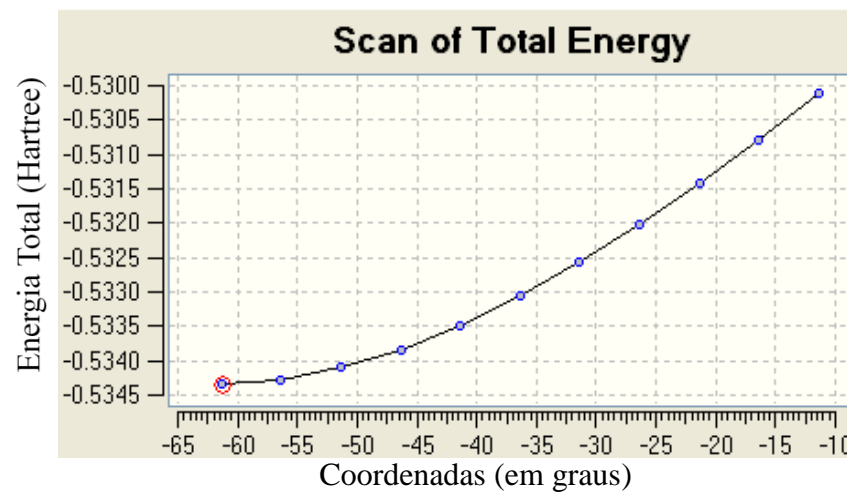
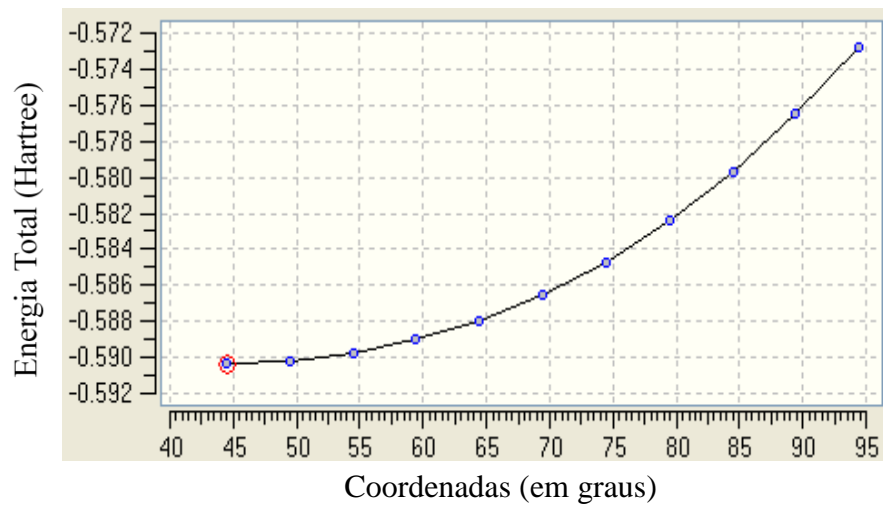
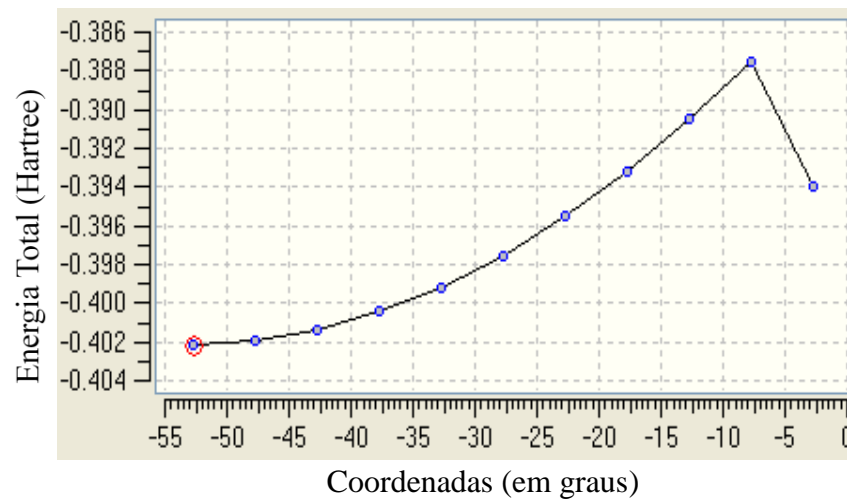
**Complexo 21****Complexo 22****Complexo 23****Complexo 24****Figura 33:** Análise dos escaneamentos dos peróxidos selecionados para o estudo. (Continuação)

Fonte: Pesquisa Experimental.

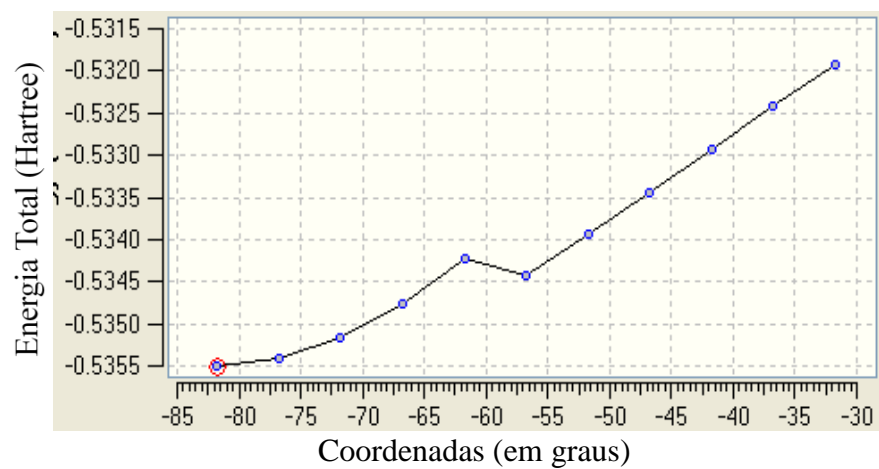
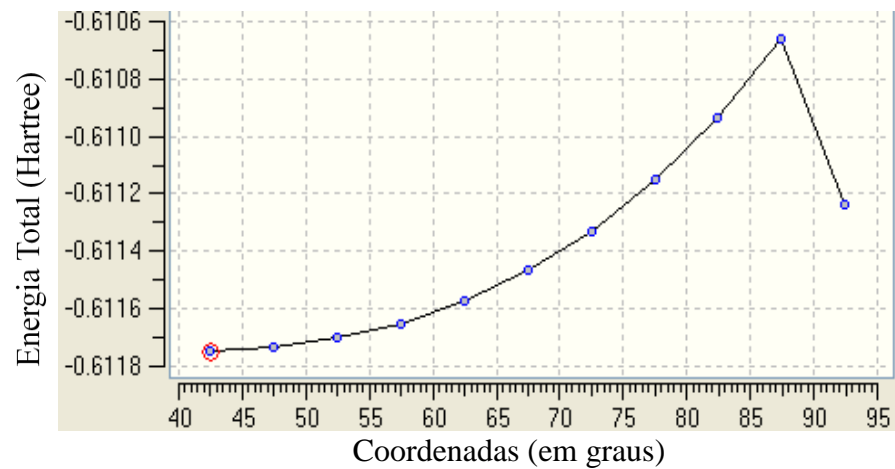
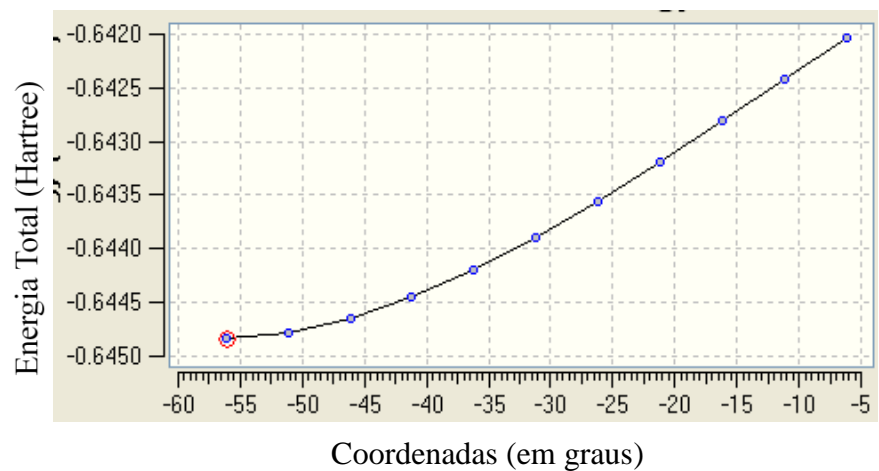
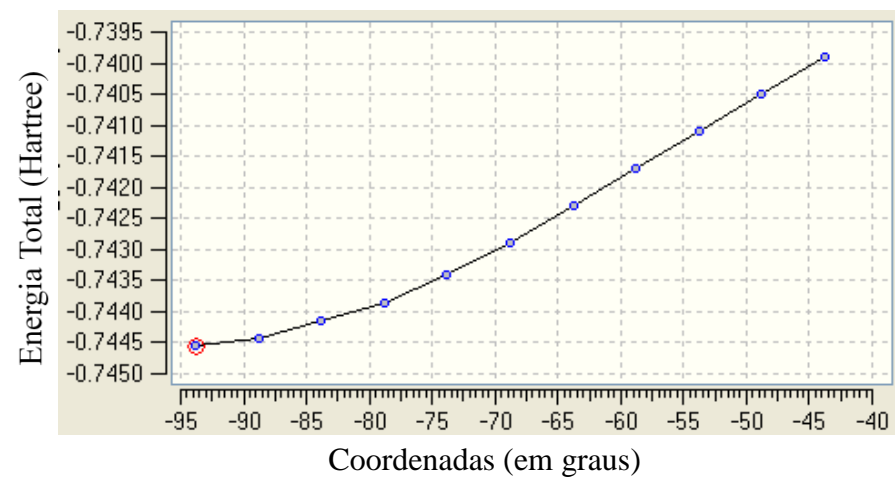
**Complexo 25****Complexo 26****Complexo 27****Complexo 28****Figura 33:** Análise dos escaneamentos dos peróxidos selecionados para o estudo. (Continuação)

Fonte: Pesquisa Experimental



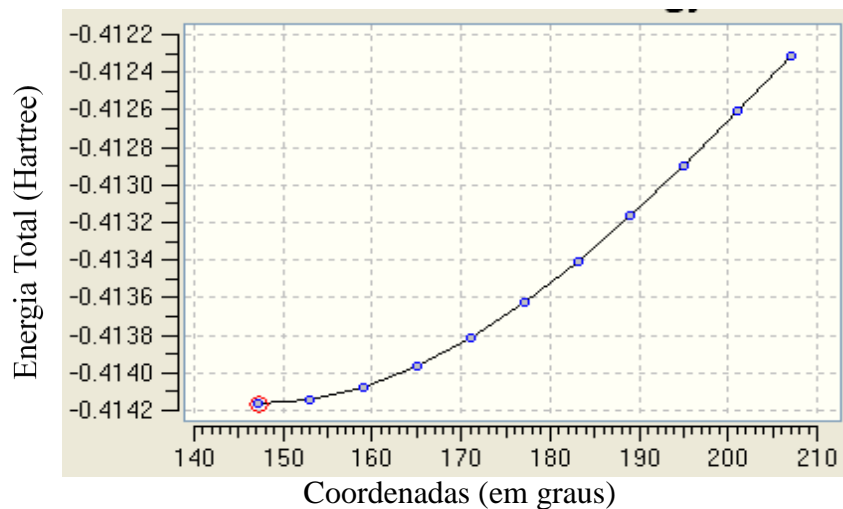
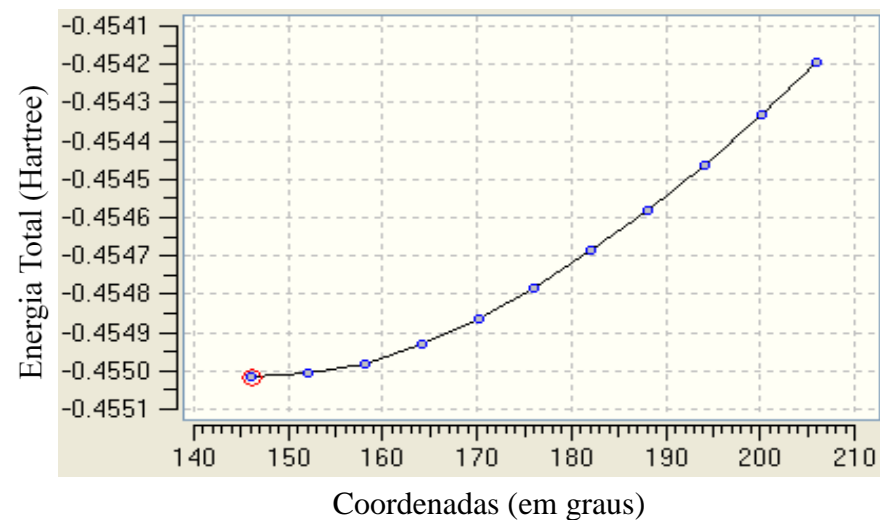
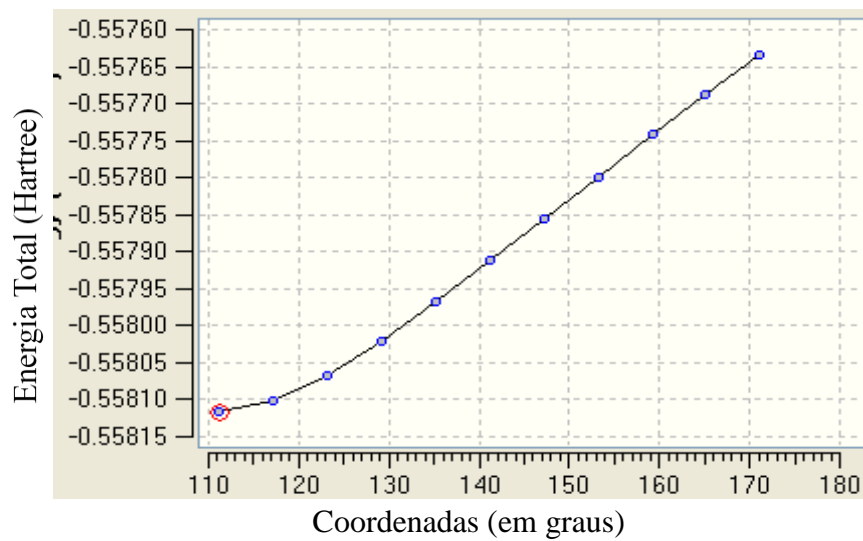
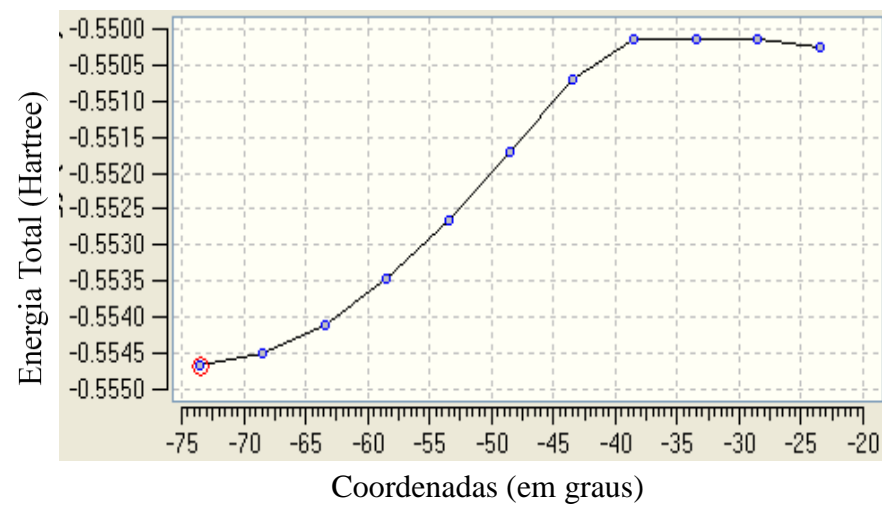
**Complexo 29****Complexo 30****Complexo 31****Complexo 32****Figura 33:** Análise dos escaneamentos dos peróxidos selecionados para o estudo. (Continuação)

Fonte: Pesquisa Experimental

**Complexo 33****Complexo 34****Complexo 35****Complexo 36**

**Figura 33:** Análise dos escaneamentos dos peróxidos selecionados para o estudo. (Continuação)

**Fonte:** Pesquisa Experimental

**Complexo 37****Complexo 38****Complexo 39****Complexo 40****Figura 33:** Análise dos escaneamentos dos peróxidos selecionados para o estudo. (Continuação)

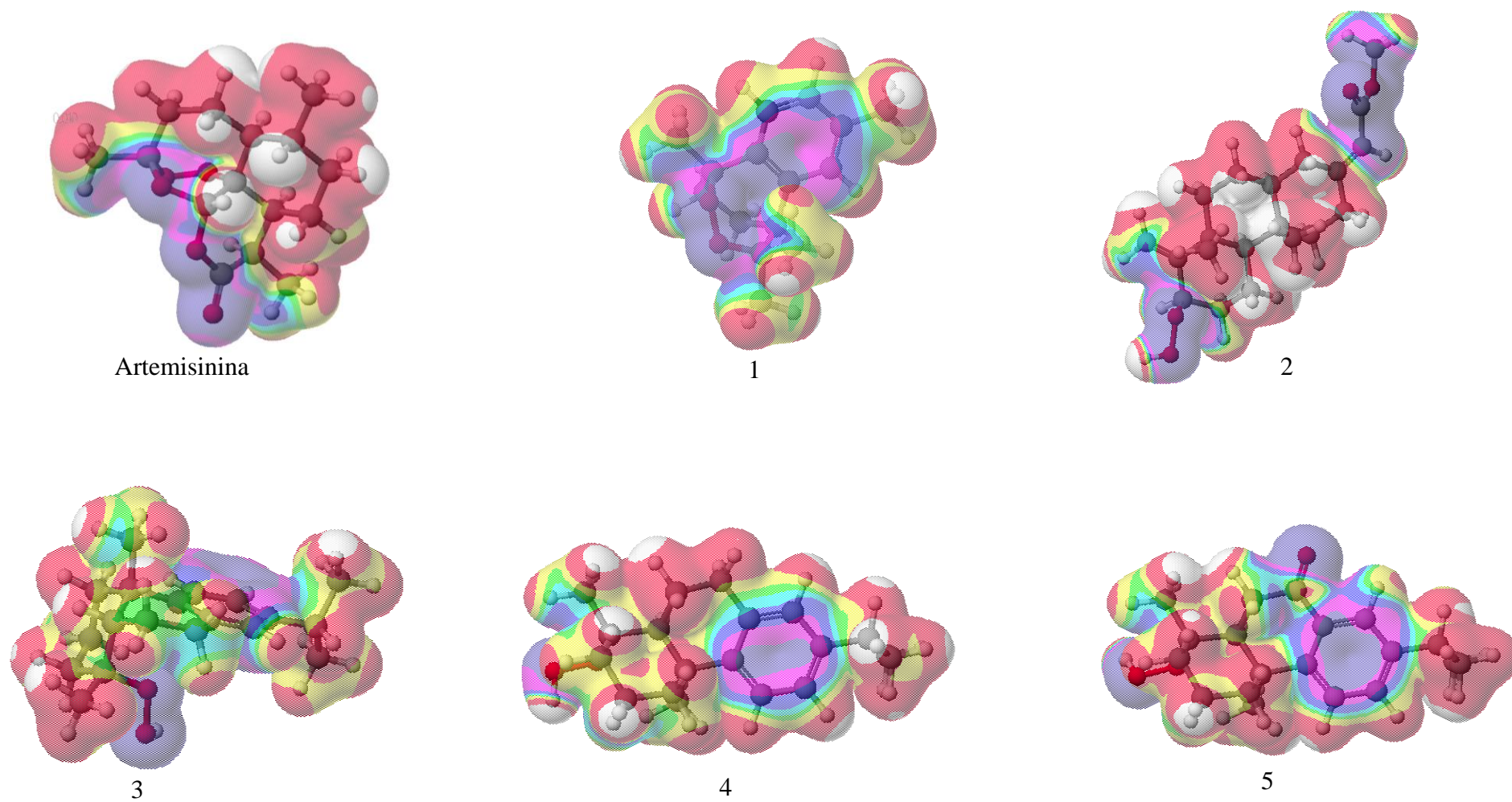
Fonte: Pesquisa Experimental.

### 6.3.2 Análise do Mapa de Potencial Eletrostático Molecular (MEP)

Estudos anteriores sobre os resultados do MEP para a artemisinina, usando método semi-empírico MNDO/d, mostraram que O<sub>13</sub> é o átomo com maior densidade eletrônica seguido por O<sub>2</sub> e O<sub>1</sub>, os quais fazem parte da ligação peróxido. A artemisinina tem uma larga região de potencial negativo que se estende da ligação peróxido ao oxigênio carbonílico, caracterizando o grupamento farmacofórico desta classe de compostos, uma vez que a substituição bioisostérica deste oxigênio por grupo metileno leva à perda da atividade (AVERY et al, 1996).

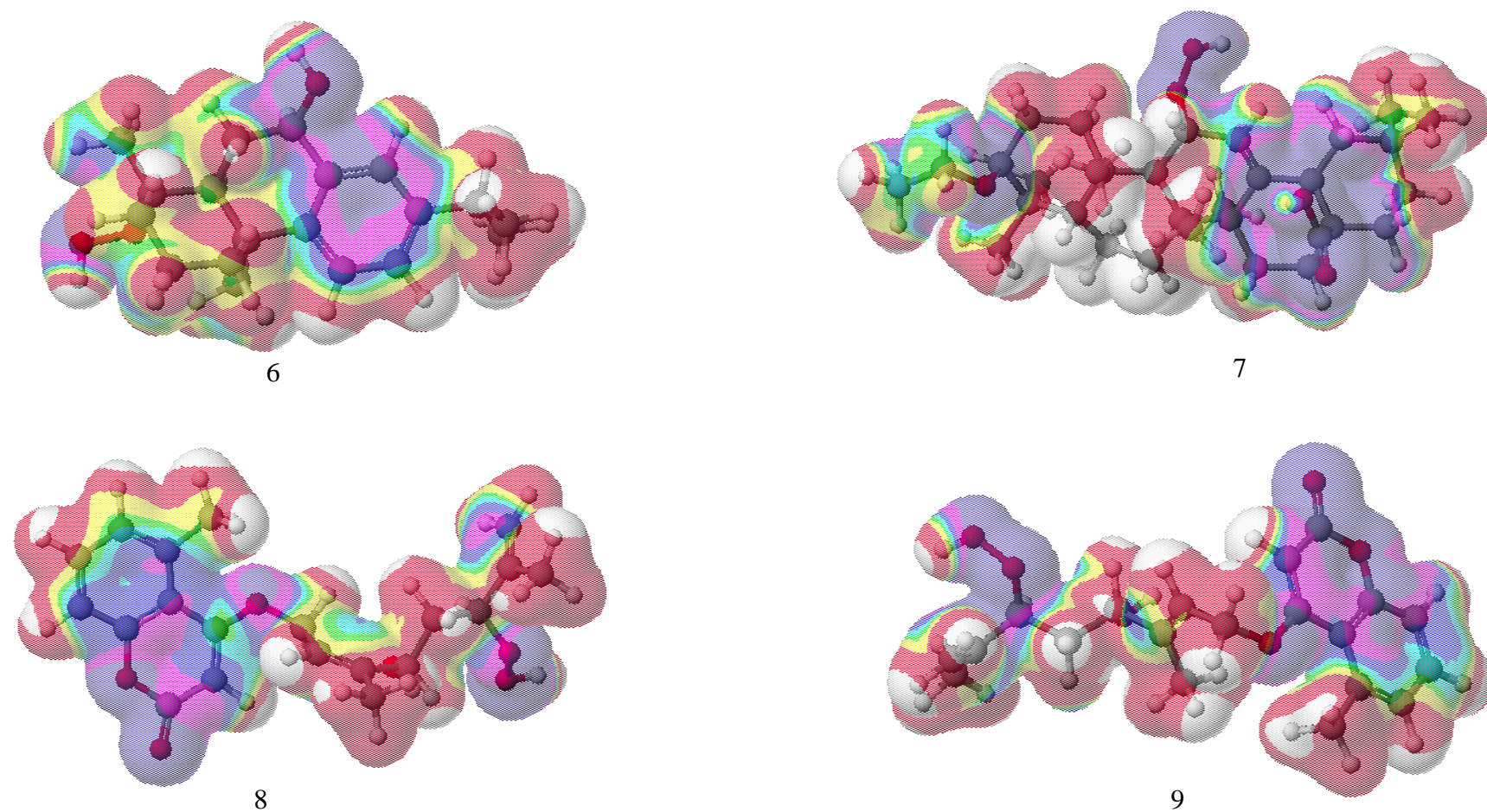
De modo semelhante, a mesma distribuição do MEP pode ser observada para a artemisinina usando o método PM6. Todos os peróxidos naturais estudados apresentam característica semelhante quanto à distribuição eletrônica, diferindo apenas na densidade eletrônica (Figura 34). Estes compostos têm uma forte densidade negativa no grupo peróxido. O peróxido 13 (Figura 29) tem uma larga região negativa formado pela ligação peróxido e um sistema conjugado. Apesar deste peróxido não ter uma função lactona, este composto tem um sistema conjugado que pode ser considerado como um bioisóstero não-clássico do O<sub>13</sub> da artemisinina (Figura 13). Esta característica estrutural pode ser importante para a atividade antimalárica. Cálculos anteriores mostraram que a substituição do átomo O<sub>13</sub> por grupo metilênico diminui a atividade antimalárica através da desestabilização do radical aniônico intermediário gerado após a interação entre a artemisinina e o heme (ARAUJO; CARNEIRO; TARANTO, 2006; AVERY et al, 1996) Em outras palavras, o efeito eletrônico do sistema conjugado do átomo de oxigênio 13 pode estabilizar as espécies radiculares aniônicas formado durante a reação com o heme.

A região com maior densidade de carga negativa dos peróxidos naturais localiza-se ao redor da parte peroxídica, enquanto a região com maior densidade de carga positiva do heme localiza-se ao redor do íon Fe<sup>+2</sup>. Provavelmente, essas duas partes interagem quando a artemisinina se liga ao heme. Este fato está de acordo com dados experimentais relacionados à ação da artemisinina, os quais mostraram que uma série de radicais O<sup>•</sup> e C<sup>•</sup> são produzidos através de uma transferência eletrônica do íon Fe<sup>+2</sup> para a ligação peróxido, quando a artemisinina reage com o heme (ARAUJO; CARNEIRO; TARANTO, 2006).

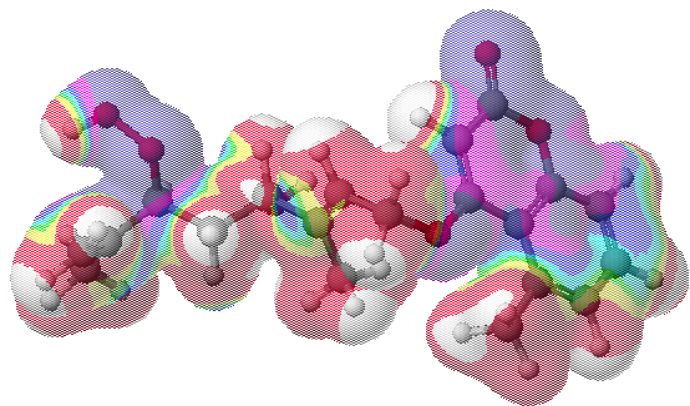


**Figura 34:** Mapas MEP do conjunto teste<sup>9</sup>.  
**Fonte:** O autor.

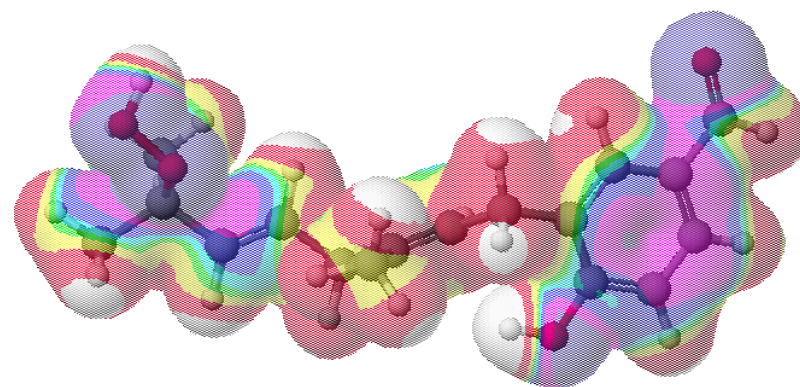
<sup>9</sup> Ordem de densidade ( $e/\text{\AA}^3$ ): Branco < Vermelho < Amarelo < Verde < Azul < Roxo.



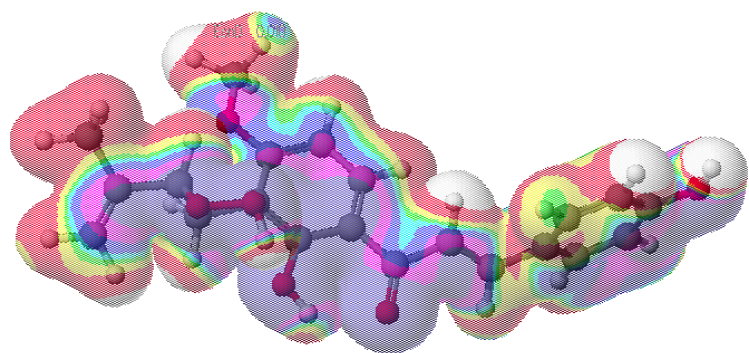
**Figura 34:** Mapas MEP do conjunto teste (continuação).  
**Fonte:** O autor.



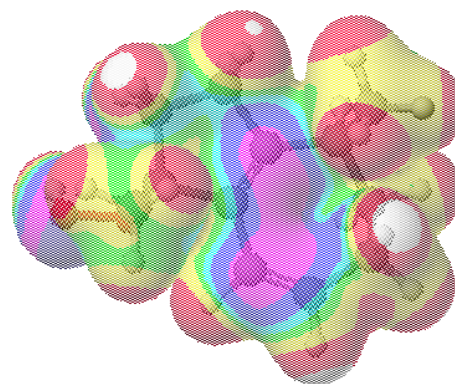
10



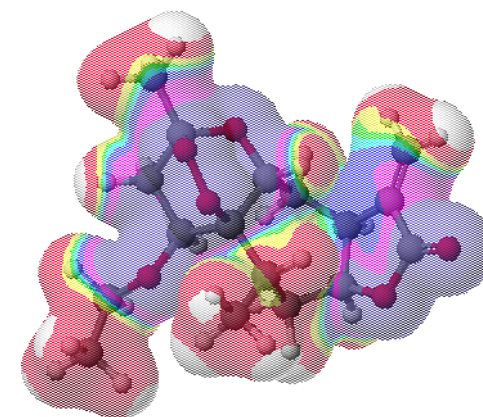
11



12

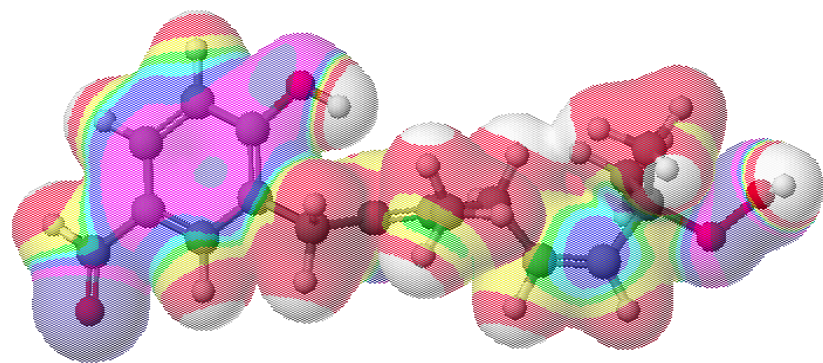


13

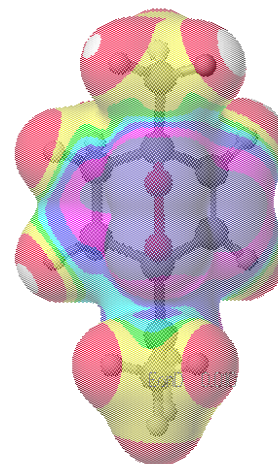


14

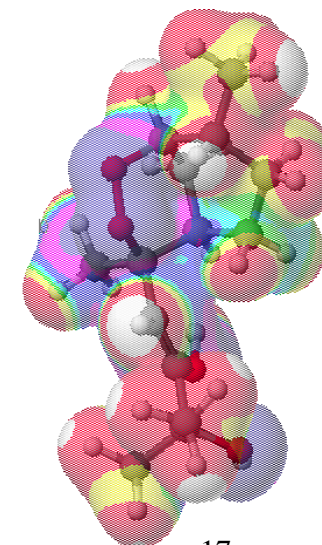
**Figura 34:** Mapas MEP do conjunto teste (continuação).  
**Fonte:** O autor.



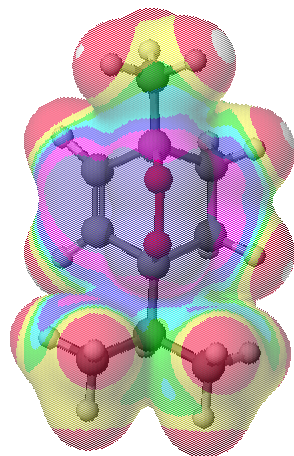
15



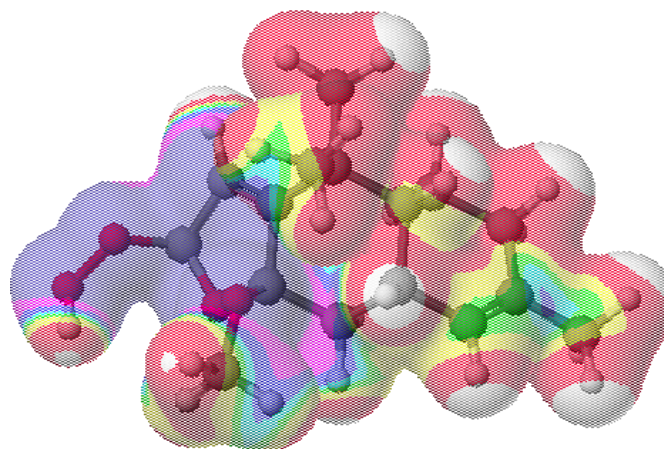
16



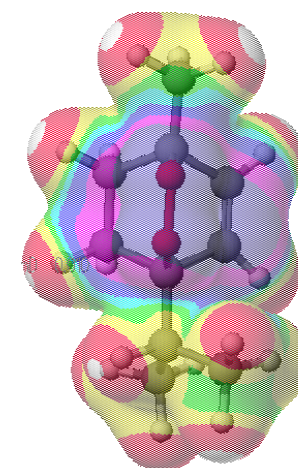
17



18



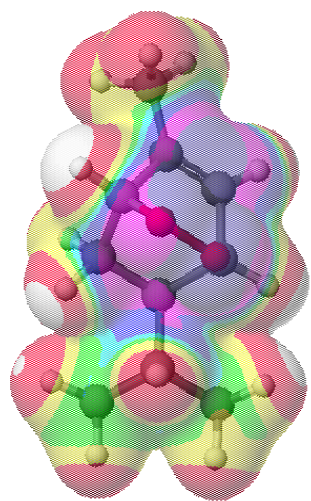
19



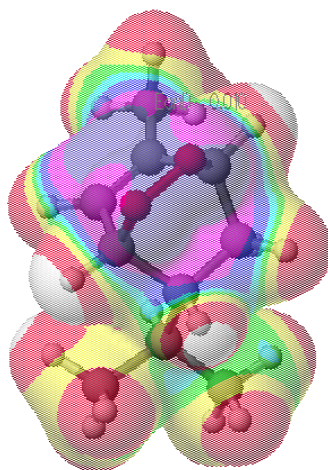
20

**Figura 34:** Mapas MEP do conjunto teste (continuação).  
**Fonte:** O autor.

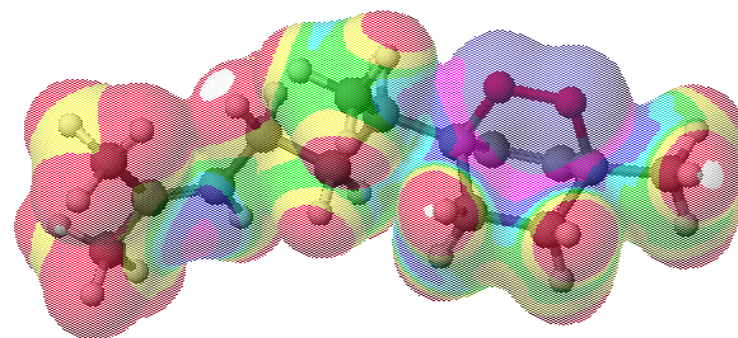




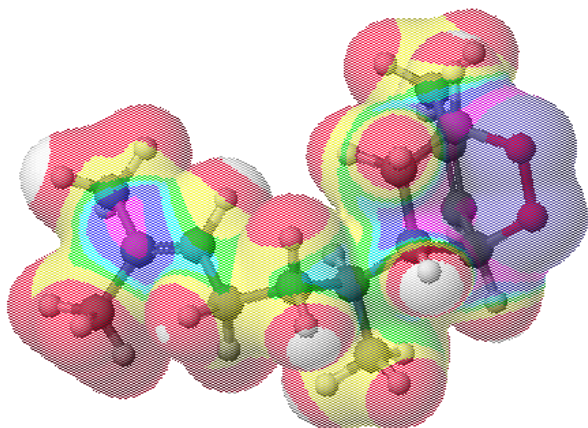
21



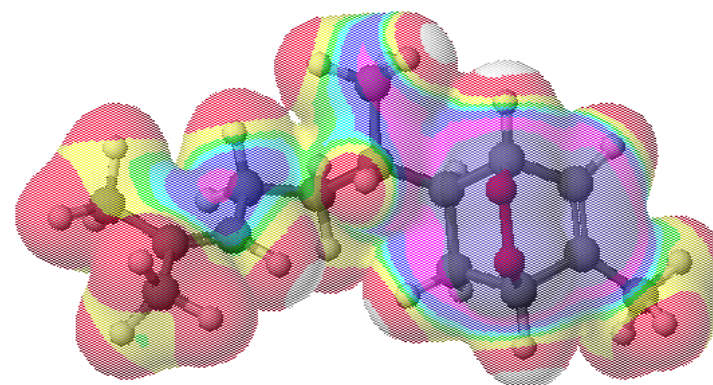
22



23

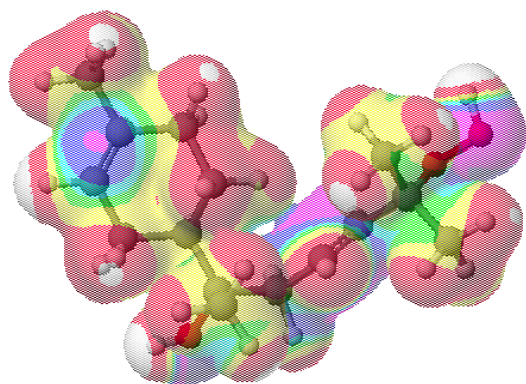


24

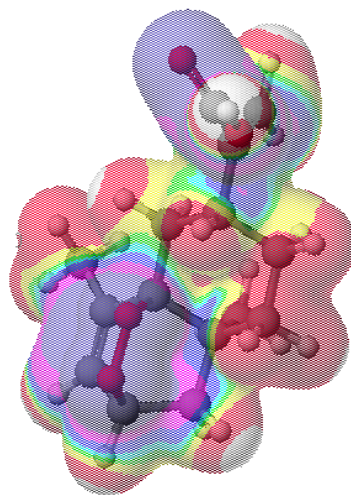


25

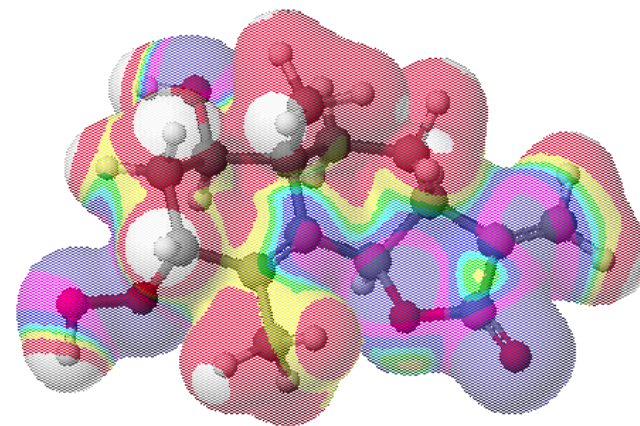
**Figura 34:** Mapas MEP do conjunto teste (continuação).  
**Fonte:** O autor.



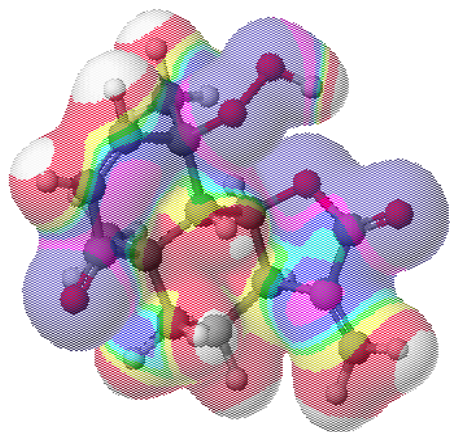
26



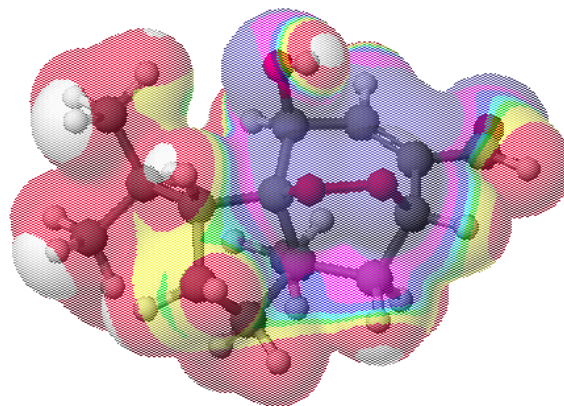
27



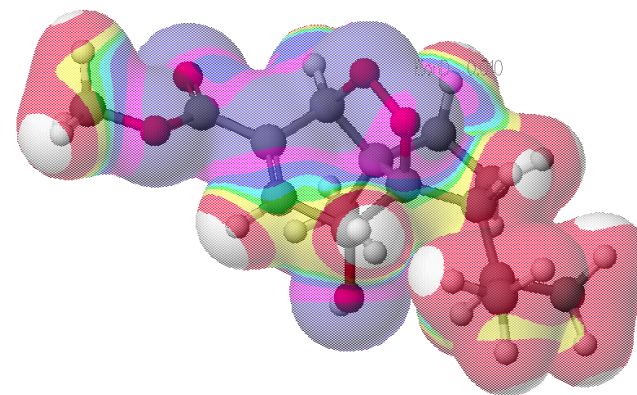
28



29

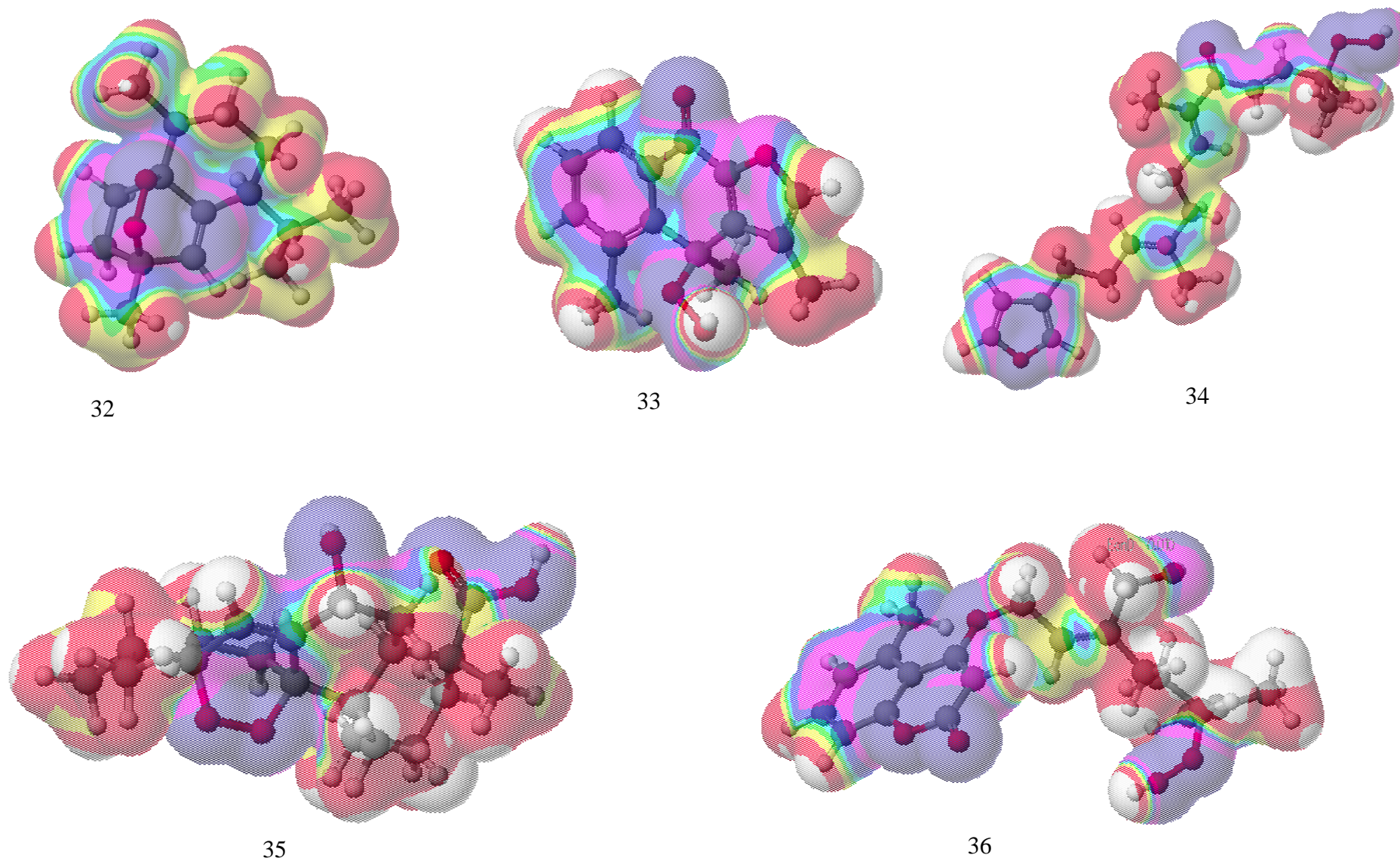


30



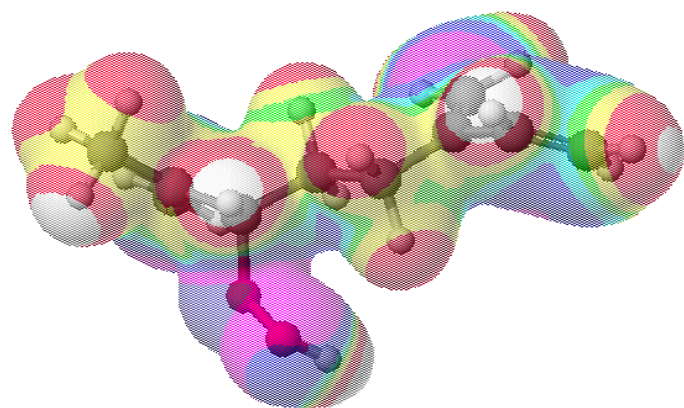
31

**Figura 34:** Mapas MEP do conjunto teste (continuação).  
**Fonte:** O autor.

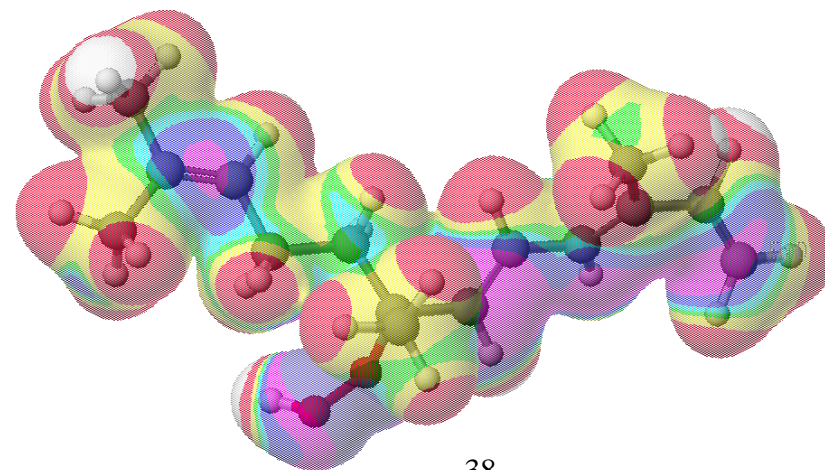


**Figura 34:** Mapas MEP do conjunto teste (continuação).

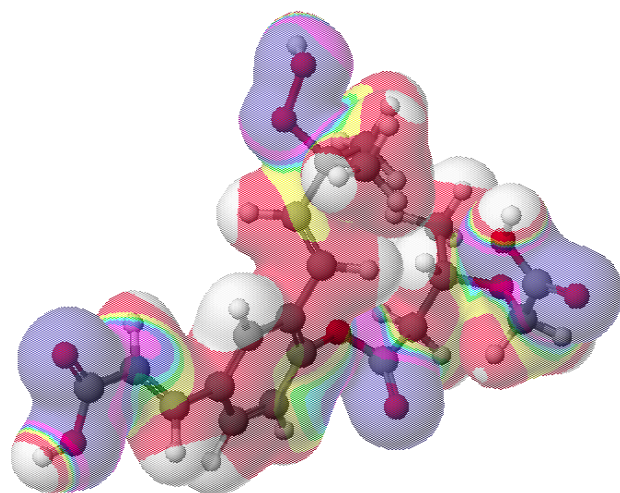
**Fonte:** O autor.



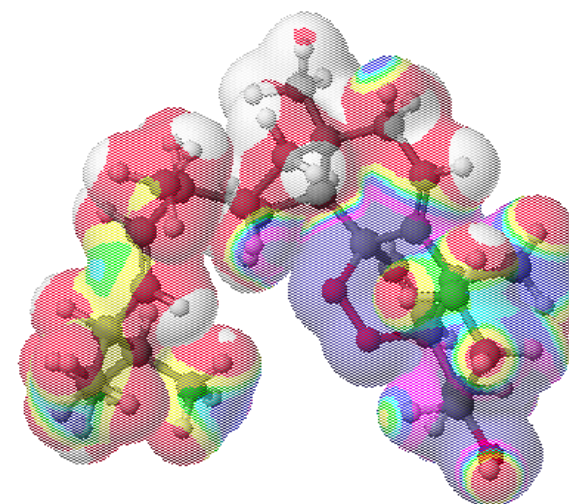
37



38



39



40

**Figura 34:** Mapas MEP do conjunto teste (continuação).  
**Fonte:** O autor.

## 7. CONCLUSÕES

Os resultados mostram que os compostos 5 e 24 poderão apresentar desejável atividade antimalárica quando estudados em fase experimental. A estrutura 24 poderá ser um composto protótipo para o desenvolvimento de novos compostos antimaláricos. Esta estrutura têm distribuição eletrônica e energia de ligação inferior à apresentada pela artemisinina, sendo assim é possível inferir que o composto 24 se liga ao grupo heme de modo mais eficiente do que todos os outros peróxidos estudados, indicando que este pode ser um potencial composto protótipo para o desenvolvimento de novos agentes antimaláricos. Outro aspecto importante para a seleção do composto 24 para estudos experimentais é a presença da fonte biológica nos biomas brasileiros, facilitando assim os estudos experimentais, isolamento e identificação do composto bioativo, bem como a síntese de análogos visando a melhoria de propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas. A estrutura 5 também poderia ser utilizada como composto protótipo com a finalidade de estudos experimentais de atividade biológica, apesar que os valores de afinidade eletrônica foram menores quando comparados a estrutura 24.

A artemisinina possui baixa disponibilidade nas folhas, sendo aproximadamente 0,01-0,8% do peso seco. Desta forma, é necessário uma grande biomassa para a obtenção desse composto. Conseqüentemente, o custo de sua produção é elevado, o que é indesejável para os países em desenvolvimento. Esta característica motiva a busca de novos compostos antimaláricos com melhores propriedades farmacocinéticas e menor custo sendo obtido diretamente de suas respectivas fontes naturais.

O desenvolvimento de novos fármacos antimaláricos e o estudo da biodiversidade brasileira é necessário para que se tenham alternativas terapêuticas oriundas de fontes naturais contra doenças que acarretam sérios problemas de saúde pública. Este estudo apresenta uma triagem de apenas 40 compostos presentes na flora do semi-árido. Embora não exista um inventário completo sobre as espécies existentes na biodiversidade brasileira, apesar dos esforços nesse sentido (FORZZA, 2010), estima-se que esta detenha o maior patrimônio em flora do mundo, cerca de 55.000 espécies de plantas sendo seguramente fonte de vantagem estratégica para o país podendo ser convertida em diferencial competitivo (MARINHO; SEIDL; LONGO, 2008).

Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi apresentar compostos de origem natural, candidatos a novos agentes antimaláricos empregando a modelagem molecular como

ferramenta no processo de triagem de moléculas potencialmente bioativas. Adicionalmente, é de bom alvitre salientar, que há boas extrapolações experimentais quando se compara os dados teóricos com os dados experimentais, de acordo com os resultados preliminares de ensaio de atividade biológica com uma cepa de *Plasmodium* sp. de uma das plantas utilizadas nesse estudo (COSTA, 2010). Outro aspecto relevante refere-se aos estudos de acoplamento molecular os quais se mostraram uma ferramenta útil na identificação de possíveis compostos bioativos, diminuindo assim os custos futuros com ensaios experimentais. Nesse sentido, a realização desse estudo pode direcionar os estudos pré-clínicos e clínicos para os compostos mais promissores, reduzindo custo operacional de ensaios de bancada e demais atividades experimentais com o intuito de realizar triagem de compostos bioativos.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, F. C.; FERRAZ, P. A. L.; GOULART, M. O. F. Some applications of Electrochemistry in Biomedical Chemistry. Emphasis on the Correlation of Electrochemical and Bioactive Properties. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 13, n. 1, 19-35, 2002.
- AIDE, P. et al. Four year immunogenicity of the RTS,S/AS02A malaria vaccine in Mozambican children during a phase IIb trial. **Vaccine**, In Press, Uncorrected Proof, 2011.
- ALLINGER, N. L.; LII, J. H. The MM3 force field for amides, polypeptides and proteins. **Journal of Computational Chemistry**, v. 12, p. 186 – 199, 2004.
- ANDRIOTTI, J. L. S. **Fundamentos de estatística e geoestatística**. São Leopoldo: Unisinos, 2003, 165 p.
- ARANTES, C.; ARAUJO, M. T.; CARNEIRO, J. W. M.; TARANTO, A. G. Relative Stability of Radicals Derived from Artemisinin. A Semi-empirical and DFT Study. **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 103, n. 5, p. 749-762, 2005.
- ARAÚJO, J. Q.; CARNEIRO, J. W. M.; ARAÚJO, M. T.; LEITE, F. H. A.; TARANTO, A. G. Interaction between artemisinin and heme. A Density Functional Theory study. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. 2008, 16, 5029.
- ARAUJO, M. T.; CARNEIRO, J. W. M.; TARANTO, A. G. Solvent Effects on the Relative Stability of Radicals Derived from Artemisinin. A DFT Study Using the PCM/COSMO Approach. **International Journal of Quantum Chemistry**, Wiley InterScience, v. 106, p. 2804-2810, 2006.
- AREGAWI et al. Who Global Malaria programme. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data**. 2008.
- ASAWAMAHASAKDA. W.; ITTARAT, I.; PU, Y. M.; ZIFFER, H.; MESHNICK, S. R. Reaction of Antimalarial Endoperoxides with Specific Parasite Proteins. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 38, p. 1854-1858, 1994.
- 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 Synthesis of (+)-13-Carbaartemisinin and related Tetra- and Tricyclic Structures. **J. Med. Chem.**, v. 39, p. 1885-1897, 1996.
- AVERY, M. A.; GASTON, M. A.; VROMAN, J. A.; WU, B.; AGER, A.; PETERS, W.; ROBINSON, B. L.; CHARMAN, W. Structure-Activity Relationships of the Antimalarial Agent Artemisinin. 7. Direct Modification of (+)-Artemisinin and In Vivo Antimalarial Screening of New, Potential Preclinical Antimalarial Candidates. **J. Med. Chem.**, v. 45, p. 4321-4335, 2002.
- BALINT, G. A. Artemisinin and its derivatives. An important new class of antimalarial agents. **Pharmacol. Therapeut.**, v. 90, p. 261-265, 2001.

BERMAN, P. A.; ADAMS, P. A. Artemisinin enhances heme-catalysed oxidation of lipid membranes. **Free Radical Bio. Med.**, v. 22, p. 1283-1288, 1997.

BHISUTTHIBHAN, J.; PAN X. Q.; HOSSLER, P. A.; WALKER, D. J.; YOWELL, C. A.; CARLTON, J.; DAME, J. B.; MESHNICK, S. R. The *Plasmodium falciparum* Translationally Controlled Tumor Protein Homolog and Its Reaction with the Antimalarial Drug Artemisinin. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 16192-16198, 1998.

BLUHM, W. F. et al. Quality assurance for the query and distribution systems of the RCSB Protein Data Bank. **The Journal of Biological Databases and Curation** (2011).

BOHLE, D. S.; DINNEBIER, R. E.; MADSEN, S. K.; STEPHENS, P. W. Characterization of the products of the heme detoxification pathway in malarial late trophozoites by X-ray diffraction. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 713-719, 1997.

BORSTNIK et al. Antimalarial chemotherapeutic peroxides: artemisinin, yingzhaosu A and related compounds. **International Journal for Parasitology**, 2002, 32, 1667.

BOURDY, G.; WILLCOX, M. L.; GINSBURG, H.; RASOANAIVO, P.; GRAZ, B.; DEHARO, E.; Ethnopharmacology and malaria: new hypothetical leads or old efficient antimalarials? **Int. J. Parasitol.** 2008, 38, 33.

BOWEN, J. P.; SHIM, J. Y. Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide. **J. Comp. Chem.**, 1998, 19, 1370.

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

BRAY, P. G et al. Defining the role of PfCRT in Plasmodium falciparum chloroquine resistance. **Mol. Microbiol.** (2005) 56: 323-33.

BROOKS, B. R. et al. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. **J. Comput. Chem.** 4, 187-217 (1983).

CALDERON, L. A.; SILVA-JARDIM, I.; ZULIANI, J.P.; SILVA, A. A.; CIANCAGLINI, P.; SILVA, L.H.P.; STABELI, R.G. Amazonian Biodiversity: A View of Drug Development for Leishmaniasis and Malaria. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 20, n. 6, 1011-1023, 2009.

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

CARLONI, P.; ALBER, F. The Use of the Molecular Electrostatic Potential in Medicinal Chemistry. **Quantum Medicinal Chemistry**, Wiley-VCH, 2003, 281.

CASEWIT, C. J.; COLWELL, K. S.; RAPPE, A. K. Application of a universal force field to organic molecules. **J. Am. Chem. Soc.**, 114, 10024, 1992.

CASTEEL, D. A. Natural Peroxides. **Nat Prod. Rep.**, 1999, 16, 55-73.



CAZELLES, J.; DEDENIS, B. C.; PROVOT, O.; ROBERT, A.; MAYRARGUE, J.; MEUNIER, B. Alkylation properties of trioxanes related to artemisinin. **J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1**, p. 1265-1270, 2000.

CHEN, Y.; ZHENG, J. M.; ZHU, S. M.; CHEN, H. Y. Evidence for hemin inducing the cleavage of peroxide bond of artemisinin (Qinghaosu): cyclic voltammetry and in situ FT IR spectroelectrochemical studies on the reduction mechanism of artemisinin in the presence of hemin. **Electrochim. Acta**, v. 44, p. 2345-2350, 1999.

CORDER, G. W.; FOREMAN, D. I. Nonparametric Statistics for Non-Statisticians: A Step-by-Step Approach. **Wiley**, 2009.

COSSI, M.; BARONE, V.; CAMMI, R.; TOMASI. Ab initio study of solvated molecules: a new implementation of the polarizable continuum model. **J. Chem. Phys. Lett.** 1996, 255, 327.

COSTA, M. S.; KIRALJ, R.; FERREIRA, M. M. C. Estudo teórico da interação existente entre a artemisinina e o heme. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 1, 25-31, 2007.

COSTA, S. C. C. **Avaliação biológica e constituintes químicos dos frutos de *Xanthium cavanillesii***. Dissertação de Mestrado. Recursos Genéticos Vegetais, 2010.

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

CRAMER, C. J. Essentials of Computational Chemistry Theories and Models. England: **John Wiley & Sons**, Inc, 2003.

CRAVO, P.; CULLETON, R.; HUNT, P.; WALLIKER, D.; MACKINNON, M. Antimalarial drugs clear resistant parasites from partially immune hosts. **Anti Microb. Agents Chem.** 45(10), 2897-2901, 2001.

CUMMING, J. N.; PLOYPRADITH, P.; POSNER, G. H. Antimalarial Activity of Artemisinin (Qinghaosu) and Related Trioxanes: Mechanism(s) of action. **Adv. Pharmacol.**, v. 37, p. 253-297, 1997.

CUMMING, J. N.; WANG, D.; PARK, S. B.; SHAPIRO, T. A.; POSNER, G. H. Design, Synthesis, Derivatization, and Structure-Activity Relationships of Simplified, Tricyclic, 1,2,4-Trioxane Alcohol Analogues of the Antimalarial Artemisinin. **J. Med. Chem.**, v. 41, p. 952-964, 1998.

CUNDARI, T. R.; DENG, J.; FU, W. PM3(tm) parameterization using genetic algorithms. **Int. J. Quant. Chem**, 2000, 77, 421.

CURRLIN, Ewaldo Nicolau. **Ecologia química marinha: as praias e o mar**. São Paulo: Ed. Resenha Universitária, 1975.

DELANO, W. L. The Pymol molecular graphics system, 0.99. San Carlos, CA: **DeLano Scientific**, 2005.

DEWAR, M. J. S.; ZOEBSCH, E. G.; HEALY, E. F.; STEWART, J. J. P. Development and use of quantum mechanical molecular models. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. **J. Am. Chem. Soc.** 1985, 107, 3902.

DIAS, L. R. S.; FREITAS, A. C. C. Malária: uma revisão. *Bio-ciência/Bio-science-Revista Científica do CCM*, v. 9, p. 39-44, 1997.

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

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

EPIFÂNIO, R. A.; BOTAS, G. S.; AMORIM, J. W.; RIBEIRO, C. M. R.; FENICAL, W.; JIMENEZ, P. C.; WILKE, D. V.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Bisabolanos aromáticos de *Pseudopterogorgia rigida* com atividade citotóxica. **Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, 2007.

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

FORZZA, R.C.; LEITMAN, P.M.; COSTA, A.F.; CARVALHO JR., A.A.; PEIXOTO, A.L.; WALTER, B.M.T.; BICUDO, C.; ZAPPI, D.; COSTA, D.P.; LLERAS, E.; MARTINELLI, G.; LIMA, H.C.; PRADO, J.; STEHMANN, J.R.; BAUMGRATZ, J.F.A.; PIRANI, J.R.; SYLVESTRE, L.; MAIA, L.C.; LOHMANN, L.G.; QUEIROZ, L.P.; SILVEIRA, M.; COELHO, M.N.; MAMEDE, M.C.; BASTOS, M.N.C.; MORIM, M.P.; BARBOSA, M.R.; MENEZES, M.; HOPKINS, M.; SECCO, R.; CAVALCANTI, T.B.; SOUZA, V.C. Introdução. *in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2010.

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

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

FRÉDÉRICH, M.; DOGNÉ, J. M.; ANGENOT, L.; MOL, P. D. New Trends in Anti-Malarial Agents. **Curr. Med. Chem.**, v. 9, p 1435-1456, 2002.

FRISCH, Æ.; FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W. **Gaussian 03: User's Reference**. Gaussian Inc: Carnegie, 2003, 327p.

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

GARAH, F. B.; STIGLIANI, J.; COSLÉDAN, F.; MEUNIER, B.; ROBERT, A. Docking Studies of Structurally Diverse Antimalarial Drugs Targeting PfATP6: No Correlation between in silico Binding Affinity and in vitro Antimalarial Activity. **ChemMedChem**, 2009, 4, 1469 – 1479.

GETHING, P. W.; SMITH, D. L.; PATIL, A. P.; TATEM, A. J.; SNOW, R. W.; HAY, S. I. Climate change and the global malaria recession. **Nature**. v. 465, 2010, 345.

GIL, A.C. **Como elaborar projetos de pesquisa**. 4. ed. São Paulo: Atlas, 2002.

GONÇALVES, A. C. A.; FOLEGATTI, M. V.; MATA, J. D. V. Análises exploratórias e geoestatísticas da variabilidade de propriedades físicas de um Argissolo Vermelho. **Acta Scientiarum**, 23: 1149-1157, 2001.

GU, J.; CHEN, K.; JIANG, H.; LESZCZYNSKY, J. The Radical Transformation in Artemisinin: A DFT Study. **J. Phys. Chem. A**, v. 103, p. 9364-9369, 1999.

GUTTERIDGE, J. M. C. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. **Febs Letters**. v. 201, p. 291-295, 1986.

HARNETT, D.L.; MURPHY, J.L. **Introductory statistical analysis**. Menlo Park, Addison-Wesley Publishing Company, 1976, 524p.

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 Lett.**, v. 40, p. 4715-4718, 1999.

HAYNES, R. K.; VONWILLER, S. C. The Behaviour of Qinghaosu (Artemisinin) in the Presence of Heme Iron (II) and (III). **Tetrahedron Lett.**, v. 37, p. 253-256, 1996.

HAYNES, R. K et al. A Highly Active Antimalarial Drug of the Artemisinin Class. **Angew. Chem. Int. Ed.** 2006, 45, 2082 –2088.

HEHRE, W. J.; et al. *Ab Initio Molecular Orbital Theory*. New York: **Wiley**, 1986.

HEPPENER, D. G.; BALLOU, W. R. Malaria in 1998: advances in diagnosis, drugs and vaccine development. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 11, p. 519-530, 1998.

HONG, Y. L.; YANG, Y. Z.; MESHNICK, S. R. The interaction of artemisinin with hemozoin. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 63, p. 121-128, 1994.

IRWIN, J. J.; RAUSHEL, F. M.; SHOICHET, B. K. Virtual Screening against Metalloenzymes for Inhibitors and Substrates. **Biochemistry**, 2005, 44, 12316-12328.

JEFFORD C. W. Peroxidic Antimalarials. In: **Advances in Drug Research**, v. 29, p. 271-325, 1997.

JEFFORD, C. H.; FAVAGER, 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. **Helv. Chim. Acta**, v. 78, p. 452-458, 1995.

JEFFORD, C. H.; VICENTE, M. G. H. JACQUIER, Y.; FAVAGER, F.; MAREDA, J.; SCHMIDT, P. M.; BRUNNER, G.; BURGER, U. The Deoxygenation and Isomerization of

Artemisinin and Artemether and Their Relevance to Antimalarial Action. **Helv. Chim. Acta**, v. 79, p. 1475-1487, 1996.

JI H-F., SHEN L. Interactions of curcumin with the PfATP6 model and the implications for its antimalarial mechanism. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 9, p. 2453-2455, 2009.

JUNG, M.; KIM, H.; NAM, K. Y.; NO, K. T. Three-dimensional structure of Plasmodium falciparum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PfATP6) and docking of artemisinin derivatives to PfATP6. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 2005.

KAGER, P. A. Malaria control: constraints and opportunities. **Trop. Med. Int. Health**, v. 7, n. 12, p. 1042-1046, 2002.

KAMCHONWONGPAISAN, S.; MESHNICK, S. R.; The Mode of Action of the Antimalarial Artemisinin and its Derivatives. **Gen. Pharmac.**, v. 27, p. 587-592, 1996.

KANNAN, R.; SAHAL, D.; CHAUHAN, V. S. Heme-Artemisinin adducts are Crucial Mediators of the Ability to Inhibit Heme Polymerization. **Chem. Biol.**, v. 9, p. 321-332, 2002.

KILAMA, W. L. Malaria vaccines in Africa. **Acta Tropica**, 88 (2003) 153–159.

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

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

KONDRACHINE, A. V.; TRIGG, P. I. Global overview of malaria. **Indian J. Med. Res.**, v. 106, p. 39-52, 1997.

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

LAKATOS, E. M.; MARCONI, M. A. **Metodologia do trabalho científico**. 6. ed. São Paulo: Atlas, 2001.

LANASPA, M.; RENOM, M.; ORELLANA, Q. B. La malaria en el mundo en 2010: ¿qué hay de nuevo acerca de esta vieja enfermedad? **Revista Pediatría de Atención Primaria**, v. 12, 48, 2010.

LEITE, F. H. A.; SANTOS JÚNIOR, M. C.; TARANTO, A. G ; BRANCO, A.; CARNEIRO, J. W. M.; ARAUJO, M. T. **Natural Peroxides from Brazilian Flora: Conformational Analysis and Complexation with Heme**. In: XIII Simpósio Brasileiro de Química Teórica, 2005.

LEITE, F. H. A.; TARANTO, A. G.; CARNEIRO, J. W. M.; ARAUJO, M. T. **Homology Modeling of  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPase (PfATP6) of Plasmodium falciparum** In: 4<sup>th</sup> Brazilian Medicinal Chemistry, 2008.

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

LIESHOUT, M.; KOVATS, R. S.; LIVERMORE, M. T. J.; MARTENS, P. Climate change and malaria: analysis of the SRES climate and socio-economic scenarios. **Global Environmental Change**, 14, 87–99, 2004.

LÓPEZ, C.; SARAVIA, C.; GOMEZ, A.; HOEBEKE, J.; PATARROYO, M. A. Mechanisms of genetically-based resistance to malaria. **Gene**, 467, 2010.

LUO, X. D.; SHEN, C. C. The Chemistry, Pharmacology, and Clinical Applications of Qinghaosu (Artemisinin) and Its Derivatives. **Med. Res. Rev.**, v. 7, p. 29-52, 1987.

MARINHO, V. M. C.; SEIDL, P. R.; LONGO, W. P. O papel governamental como ator essencial para a P&D de medicamentos – um estudo de caso. **Química Nova**, 2008, 31, 1917.

MARTINS, G. A. Estatística geral e aplicada. São Paulo: Atlas, 2005. 421p.

MATOS, A. T.; COSTA, L. M.; FONTES, M. P. F.; MARTINEZ, J. A.; FERREIRA, P. A. **Fatores de retardamento e coeficientes de dispersão-difusão dos metais zinco, cádmio, cobre e chumbo em solos do município de Viçosa – MG**: I. Curvas de eluição dos metais; II. Correlação com algumas propriedades físicas do solo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS DO SOLO. 25, Viçosa, MG, 23-29/07/1995. Resumos expandidos. Viçosa: SBCS. 1995. p.2333-2338.

MESHNICK, S. R. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. **Int. J. Parasitol.**, v. 32, p. 1655-1660, 2002.

MESHNICK, S. R.; JEFFORD, C. W.; POSNER, G. H.; AVERY, M. A.; PETERS, W. Second-generation Antimalarial Endoperoxides. **Parasitol. Today**, v. 12, p.79-82, 1996.

MESHNICK, S. R.; TAYLOR, T. E. KAMCHONWONGPAISAN, S. Artemisinin and the Antimalarial Endoperoxides; from Herbal Remedy to Targeted Chemotherapy. **Microb. Rev.**, v. 60, p. 301-315, 1996.

MESHNICK, S. R.; THOMAS, A.; RANZ, A.; XU, C. M.; PAN, H. Z. Artemisinin (qinghaosu): the role of intracellular heme in its mechanism of antimalarial action **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 49, p. 181-190, 1991.

MESHNICK, S. R.; YANG, Y. Z.; LIMA, V.; KUYPERS, F.; KAMYCHONWONGPAISAN, S.; YUTHAVONG, Y. Iron-Dependent Free Radical Generation from the Antimalarial Agent Artemisinin (Qinghaosu). **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 37, p. 1108-1114, 1993.

METWALLY, A.M., KHAFAGY, S.M., EL-NAGGAR, S.F. Phytochemical investigation of *Xanthium spinosum* L. **Pharmazie**, v. 29, n. 6, p. 415-417, 1974.

MOLES, P.; OLIVA, M.; SAFONT, V. S. Theoretical study on the decomposition mechanism of artemisinin. **Tetrahedron**, 2008, 64, 9448.

NAKAJIMA, J. *Eupatorium* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2010.

NAIK, P. K. et al. The binding modes and binding affinities of artemisinin derivatives with *Plasmodium falciparum* Ca<sup>2+</sup>-ATPase (PfATP6). **J Mol Model** (2011) 17:333–357

NEVES, P. D. **Parasitologia Humana**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1998.

NEWMAN, R. D. Malaria control beyond 2010. **BMJ**, 2010; 340:c2714.

OLESEN, C.; PICARD, M.; WINTHER, A. M.; GYRUP, C.; MORTH, J. P.; OXVIG, C.; MOLLER, J.; NISSEN, V. P. The structural basis of calcium transport by the calcium pump. **Nature**, 450: 1036-1042, 2007.

OLLIARO, P. L.; HAYNES, R. K.; MEUNIER, B.; YUTHAVONG, Y. Possible modes of action of the artemisinin-type compounds. **Trends Parasitol.**, v. 17, n. 3, p. 122-126, 2001a.

OLLIARO, P. L.; HAYNES, R. K.; MEUNIER, B.; YUTHAVONG, Y. Radical mechanism of action of the artemisinin-type compounds. **Trends Parasitol.**, v. 17, n. 6, p. 267-268, 2001b.

**Organização Mundial de Saúde (OMS)**. Disponível na página da Organização Mundial de Saúde (OMS): <http://www.who.int/inf-fs/en/fact094.html>. Acesso em: 05 fev. 2011.

PAAIJMANS, K. P.; READ, A. F.; THOMAS, M. Understanding the link between malaria risk and climate. **PNAS**, v. 106, 33, 2009.

PAITAYATAT, S.; TARNCHOMPOO, B.; THEBATARANONTH, Y.; YUTHAVONG, Y. Correlation of Antimalarial Activity of Artemisinin Derivatives with Binding Affinity with Ferroprotoporphyrin IX. **J. Med. Chem.**, v. 40, p. 633-638, 1997.

PANDEY, A. V.; TEKWANI, B. L.; SINGH, R. L.; CHAUHAN, V. S.; Artemisinin, an Endoperoxide Antimalarial, Disrupts the Hemoglobin Catabolism and Heme Detoxification Systems in Malarial Parasite, **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 19383-19388, 1999.

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

PIMENTEL, L. F et al. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 43, n. 4, out./dez., 2007.

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. **Theochem J. Mol. Struct.**, 572, 35-44 (2001).

POSNER, G. H.; CUMMING, J. N.; PLOYPRADITH, P.; OH, C. H. Evidence for Fe(IV)=O in the Molecular Mechanism of Action of the Trioxane Antimalarial Artemisinin. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 117, p. 5885-5886, 1995.

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). **J. Am. Chem. Soc.**, v. 114, p. 8328-8329, 1992.

POSNER; H. G.; 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-Methylated Trioxanes Structurally Related to Artemisinin: The Importance of a Carbon-Centered Radical for Antimalarial Activity. **J. Med. Chem.**, v. 57, p. 1256-1258, 1994.

PROVOT, O.; DEDENIS, B. C.; HAMZAOU, M.; MOSKWITZ, H.; MAYRARGUE, J.; ROBERT, A.; CAZELLES, J.; MEUNIER, B.; ZOUHIRI, F.; DESMAËLE, D.; ANGELO, J.; MAHUTEAU, J.; GAY, F.; CICÉRON, L. Structure-Activity Relationships of Synthetic Tricyclic Trioxanes Related to Artemisinin; The Unexpected Alkylative Property of a 3-(Methoxymethyl) Analog. **Eur. J. Org. Chem.**, p. 1935-1938, 1999.

RANG, H. P.; DALE, M. Maureen. **Rang & Dalle Farmacologia**. 6. ed Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2008.

RAPPÉ, A. K. et al. "UFF, a full periodic-table force-field for molecular mechanics and molecular-dynamics simulations," *J. Am. Chem. Soc.*, **114** (1992) 10024-35.

REY, L. **Parasitologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

ROBERT, A.; MEUNIER, B.; Characterization of the First Covalent Adduct between Artemisinin and a heme Model. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 119, p. 5968-5969, 1997.

ROBERT, A.; MEUNIER, B. Is alkylation the main mechanism of action of the antimalarial drug artemisinin? **Chem. Soc. Rev.**, v. 27, p. 273-279, 1998.

ROCHA, M. N. A.; FERREIRA, E. A. P.; SOUZA, J. M. Aspectos históricos da malária. **Rev. Para Med.** 20(3):81-2, 2006.

RSCB, 2010. **RSCB Protein Data Bank**. Disponível em: <http://www.rcsb.org/pdb/>. Acesso em: 14 fev 2011.

RÜCKER, G.; BREITMAIER, E.; MANNS, D.; MAIER, W.; MAREK, A.; HEINZMANN, B.; HEIDEN, K.; SEGGEWIES, S. Antimalarial activity of 1,4-Epidioxy-bisabola-2,12-diene derivatives. **Arch. Pharm. Med. Chem.** 330: 12-16. 1997.

SAFO, M. K.; ABRAHAM, D. J. The Enigma of the Liganded Hemoglobin End-State: A Novel Quaternary Structure of Human Carbonmonoxy Hemoglobin. **Biochem.** 2005, 44, 8347.

SCHMID, G.; HOFHEINZ, W. Total Synthesis of Qinghaosu. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 105, p. 624-625, 1983.

SHIMAKURA, S. E. **Interpretação do coeficiente de correlação**. [Disponível em: [www.est.ufpr.br](http://www.est.ufpr.br) acessado em 14 de fevereiro de 2011].

SIEGEL, S.; CASTELLAN JR, N. J. **Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento**. Edição, Artimed, 448p.

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. **J. Mol. Graph.**, v. 13, p. 215-222, 1995.

SLATER, A. F. G.; SWIGGARD, W. J.; ORTON, B. R.; FLITTER, W. D.; GOLDEBERG, D. E.; CERAMI, A.; HENDERSON, G. B.; **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 325-329, 1991.

SNOW, R. W; GUERRA, C. A; NOOR, A M.; MYINT, H. Y. The global distribution of clinical episodes of Plasmodium falciparum malaria. **Nature**, 2005, 434, 214-217.

SOUSA, S. F.; FERNANDES, P. A.; RAMOS, M. J. Protein-ligand docking: Current status and future challenges. **Proteins**, 2006, 65, 15-26.

SPSS 17.0 **Command Syntax Reference**, SPSS Inc., Chicago V, 2008.

SRIVASTAVA, M.; SINGH, H.; NAIK, P. K. Molecular Modeling Evaluation of the Antimalarial Activity of Artemisinin Analogues: Molecular Docking and Rescoring using Prime/MM-GBSA Approach. **Current Research Journal of Biological Sciences** 2(2): 83-102, 2010.

STANLEY, C.; OAKS, J. R.; VIOLAINE, S.; MITCHELL, G. W.; CHARLES, C. J. Malaria – Obstacles and opportunities A report of the Committee for the Study on Malarial Prevention and Control: Status Review and Alternative Strategies, Division of International Health, Institute of Medicine, **National Academy Press**: Washington D.C., 1991.

STEKETEE, R.W.; CAMPBELL, C.C. Impact of national malaria control scale-up programmes in Africa: magnitude and attribution of effects. **Malaria Journal**, 9:299. 2010.

STEWART, J. J. P. Optimization of Parameters for Semiempirical Methods V: Modification of NDDO Approximations and Application to 70 Elements. **J. Mol. Modeling**. 13, 1173-1213, 2007a.

STEWART, J. J. P. MOPAC 2007. **Stewart Computational Chemistry**, Colorado Springs, CO, USA. 2007b

STEWART, J. J. P. Comparison of the accuracy of semiempirical and some DFT methods for predicting heats of formation. **Journal of Molecular Modeling**. V. 10, 1, 6-12, 2004.

SUTTON, H. C.; WINTERBOURN, C. C. On the Participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton Reactions. **Free Radical Bio. Medi.**, v 6, p. 53-60, 1989.

TARANTO, A. G. ; CARNEIRO, J. W. M.; OLIVEIRA, F. G.; ARAÚJO, M. T.; CORREA, C. R. The role of C-centered radical on the mechanism of artemisinin. **J Mol Struct Theochem**, v. 580, p. 207-215, 2002.



TARANTO, A. G. **Estudo do mecanismo de fragmentação da artemisinina**, 2003. 150 f. Tese de doutorado. Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro.

TARANTO, A. G.; CARNEIRO, J. W. M.; OLIVEIRA, F. G. MNDO/d calculations on the interaction between artemisinin and heme. **J. Mol. Struct. (Theochem)**, v. 539, p. 267-272, 2001.

TARANTO, A. G.; CARNEIRO, J. W. M.; ARAUJO, M. T. DFT study of the reductive decomposition of artemisinin. **Bioorg. Med. Chem.** Elsevier, v. 14, n. 5, p. 1546-1557, 2006.

TARANTO, A. G.; CARNEIRO, J. W. M.; ARAUJO, M. T. The intramolecular 1,5-hydrogen transfer in artemisinin. A DFT study, **Int. J. Quantum Chem.**, 2005.

TARANTO, A. G.; CARNEIRO, J. W. M.; ARAUJO, M. T.; SILVA, B. G. M. Estudo sobre o mecanismo de ação da artemisinina e dos endoperóxidos, a mais nova classe de agentes antimaláricos. **Sitientibus**. Revista da Universidade Estadual de Feira de Santana, v. 34, p. 47-58, 2006.

TELES, A. M. *Senecio in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2010.

TITAN Tutorial and User's Guide, Wavefunction, Inc, **Schrödinger**, Inc., USA, 1999.

TONMUNPHEAN, S.; PARASUK, V.; KOKPOL, S. QSAR study of antimalarial activities and binding properties obtained from docking calculations. **Quant. Struct. Act. Relat.** 2000, 19, 475.

TONMUNPHEAN, S.; PARASUK, V.; KOKPOL, S. Automated calculation of docking of artemisinin to heme. **J. Mol. Model.** 7: 26-33, 2001.

TONMUNPHEAN, S.; PARASUK, V.; KOKPOL, S. Theoretical Investigations on Reaction Mechanisms of Artemisinin Compounds: Effect of Structure on Kinetic Energy Profile and Antimalarial Activity. **J. Mol. Struct. (THEOCHEM)**. 2005, 724, 99-105.

TOYOSHIMA, C.; NOMURA, H. Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. **Nature**, 418: 605-611, 2002.

TRAVASSOS, M. A.; LAUFER, M. K. Resistance to Antimalarial Drugs: Molecular, Pharmacologic, and Clinical Considerations. **Pediatric Research**, v. 65, 5, 2009.

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

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

VASCONCELOS, A. S.; KATÓ, M. Y. N.; MOURÃO, E. N.; SOUZA, R. T. L.; LACERDA, R. N. L.; SIBAJEV, A.; TSOURIS, P.; PÓVOA, M. M.; MOMEN, H. Biting indices, Host-seeking Activity and Natural Infection Rates of Anopheline Species in Boa Vista, Roraima, Brazil from 1996 to 1998. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 2, p. 151-161, 2002.

VENNERSTROM, J. L.; EATON, J. W.; Oxidants, Oxidant Drugs, and Malaria. **J. Med. Chem.**, v. 31, p. 1269-1277, 1988.

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

WALKER, D. J.; PITSCH, J. L.; PENG, M. M.; ROBISON, B. L.; PETERS, W.; BHISUTTHIBHAN, J.; MESHNICK, S. R.; Mechanisms of Artemisinin Resistance in the Rodent Malaria Pathogen *Plasmodium yoelii*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, p. 344-347. 2000.

WALLING, C. Fenton's Reagent Revisited. **Acc. Chem. Res.**, v. 8, p. 125-131, 1975.

World Health Organization. **World Malaria Report**. Geneva, 2010.

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. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 120, p. 3316-3325, 1998.

WU, Y. How Might Qinghaosu (Artemisinin) and Related Compounds Kill the Intraerythrocytic Malaria Parasite? A Chemist's View. **Accounts Chem. Res.**, v. 35, n. 5, p. 255-259, 2002.

YANG, Y. Z.; LITTLE, B.; MESHNICK, S. R.; Alkylation of proteins by artemisinin effects of heme, pH, and drug structure, **Biochem. Pharmacol.**, v. 48, p. 569-573, 1994.

YOUNG, D. C. Computational Chemistry: a practical guide for applying techniques to real world problems. Canada: **John Wiley & Sons**, Inc, 2001.

ZHANG, F.; GOSSER Jr, D. K.; MESHNICK, S. R. Hemin-catalyzed decomposition of artemisinin (qinghaosu). **Biochem. Pharmacol.**, v. 43, p. 1805-1809, 1992.