

# *Capítulo 01*

## 1.1 - Objetivos

Determinar as estruturas cristalinas e moleculares de compostos derivados da 1,4-benzoquinona, utilizando a difração de raios X. Utilizar os dados estruturais para a realização de cálculos de “docking”.

## 1.2 - Química e Cristalografia

A difração de raios X por cristais foi descoberta no começo do século XX e logo se tornou evidente que seria fundamental para o estudo da estrutura da matéria em nível de resolução atômica. As aplicações da difração de raios X foram se ampliando de forma a fazer possível, num primeiro instante, obter o conhecimento detalhado da distribuição atômica de substâncias orgânicas e inorgânicas, relativamente simples, até no presente em que a estrutura de proteínas com milhares de átomos são possíveis de serem determinadas.

Com os experimentos de difração de raios X é possível obter informações tais como as distâncias e ângulos entre átomos. Por exemplo, foi determinado que as distâncias carbono—carbono são tipicamente 1,54 Å para uma ligação simples, 1,39 Å para compostos aromáticos, e 1,33 e 1,20 Å para ligações duplas e triplas, respectivamente; de forma que uma variação de apenas 0,34 Å cobre uma gama fantástica de propriedades e reatividades.

Se bem que inicialmente, a principal característica desta ciência interdisciplinar foi a de possibilitar que fosse possível conhecer as estruturas dos mais diversos compostos, hoje, espera-se muito mais desta ciência e do cristalógrafo, que dada a sua formação, deve não apenas determinar a estrutura de um composto, mas tentar elucidar como o composto se comporta, de onde vem suas propriedades e como suas características podem ser úteis, nos mais diversos campos como os da química, bioquímica, física, biologia, ciência dos materiais, etc.

O número de estruturas obtidas por difração de raio X tem crescido exponencialmente nas últimas décadas. Os fatores que determinaram uma evolução rápida no campo são, científicos com o desenvolvimento de novas metodologias para a determinação e refinamento das estruturas; tecnológicos

como o aperfeiçoamento dos difratômetros e aumento da capacidade e velocidade computacionais.

Os efeitos produzidos na química por esta extraordinária profusão de informação estrutural têm sido enormes, de tal forma que uma nova área surgiu, a química estrutural. Nesta área são a natureza molecular dos cristais e suas propriedades, como os tipos de interações entre átomos e moléculas, por exemplo, forças de atração e de repulsão, London, dipolo, ligações de hidrogênio, transferência de cargas e empacotamento cristalino. Esses resultados permitiram que fosse possível estudar polimorfismos, fazer predições sobre estruturas cristalinas, estudar o efeito das forças cristalinas sobre a geometria molecular, e predizer configurações e conformações das moléculas.

### 1.3 – Tema Central

Vários fármacos antiparasitários, entre eles os principais usados contra *Trypanosoma cruzi*, produzem radicais livres. Estes radicais são importantes por sua toxicidade, tanto para o parasita como para o homem. Compostos como o Nifurtimox® e o Benznidazol® têm sido usados em pacientes chagásicos. Ambos estão longe do ideal para o tratamento da enfermidade de Chagas, já que não atingem os mais importantes requerimentos, que são: cura parasitológica dos casos agudos e crônicos, efetividade por via oral em doses pequenas, ser acessível a pacientes e livre de efeitos secundários significativos, não requerer hospitalização e finalmente, não causar resistência parasitária.

Muito esforço está sendo feito, no sentido de encontrar um fármaco ideal ou pelo menos, com menos efeitos secundários. Isto tem levado a tentar vários tipos de compostos diferentes, como os nitrofuranos (Vega-Tejjido, 2003). Pretende-se aqui, abrir uma nova linha de estudos, voltada para as **quinonas** e seus derivados, no sentido de tentar entender a sua capacidade de interagir com sistemas enzimáticos como a tripanotiona redutase (TR). Os

compostos estudados neste trabalho foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Cláudio Di Vitta.

#### 1.4 – O Problema

Os tripanossomos são os agentes parasitários causadores de diversas doenças tropicais, como a enfermidade do sono Africana (*Trypanosoma gambiense* e *Trypanosoma rhodiense*) e a doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) em humanos, e nagana (*Trypanosoma congolense* e *Trypanosoma brucei*) em gado. Estes parasitas possuem a enzima Tripanotiona redutase (TR) que catalisa a redução do substrato, NADPH-dependente, a tripanotiona ou ( $N^1, N^8$ -bis(glutacionil)spermidina T(S) $_2$ ).

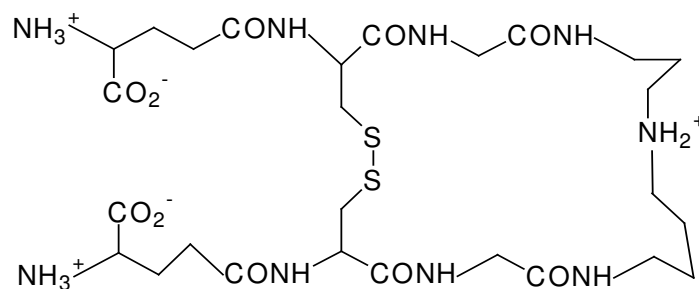


Figura 1.1 Tripanotiona (adaptado de Voet & Voet, 1995)

Esta enzima possui funções similares às da glutaciona redutase (GR), o que inclui a proteção contra o stresse oxidativo resultante de um aumento na concentração de radicais livres e outras formas reduzidas reativas do oxigênio.

O sistema de defesa redox nos mamíferos, baseado na GSSG e a glutaciona redutase (GR), é substituído nos tripanossomos, por um sistema análogo, mas diferente, baseado na tripanotiona e a tripanotiona redutase (TR). A GR, uma flavoenzima NADPH dependente, catalisa a regeneração da glutaciona reduzida (GSH) a partir da glutaciona oxidada (GSSG), como mostrado na figura 1.2; a TR, o equivalente no tripanossomo, converte a tripanotiona (TSST) no ditiol, ou seja, na forma reduzida: (HS)TT(SH) [adaptado de Vega-Teijido, 2003]:

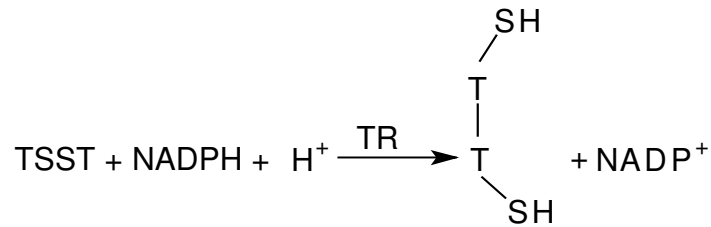
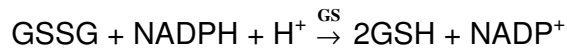
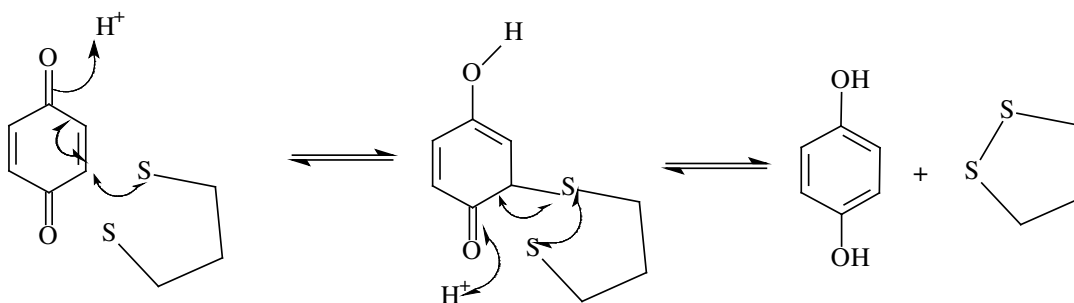


Figura 1.2 Reação de regeneração

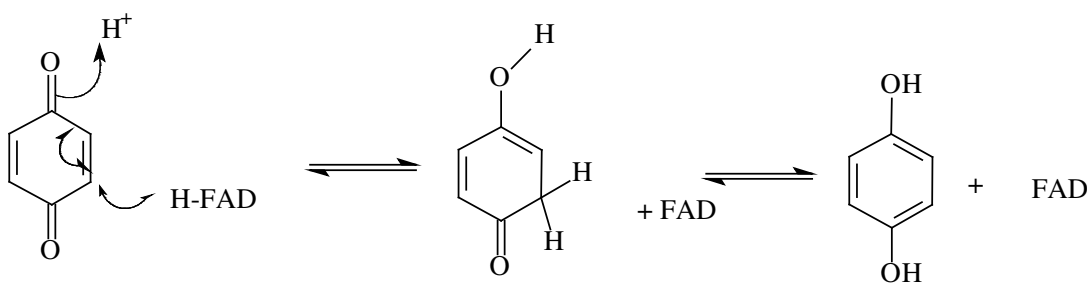
Em 1991 Walsh e colaboradores sugeriram que os tripanossomos são mais sensíveis ao stress oxidativo que os seus hospedeiros e portanto a inibição seletiva da TR poderia ser um método de combater o parasita. Nesse sentido tem sido reportado (Henderson et al., 1988; Jockers-Scherubl et al. 1989, Cenas et al., 1991; Bironaite et al., 1991; Cenas et al. 1994) que as quinonas e os nitrofuranos atuam como inibidores da tripanotona redutase. As quinonas são reduzidas pela enzima e em seguida as quinonas reduzidas reagem com oxigênio molecular para formar espécies reativas. Elas atuam como "substratos subversivos" da enzima antioxidante convertendo a função de proteção da enzima numa função de intoxicação. O mecanismo de redução destes compostos, em especial a formação da suas formas reduzidas unieletrônicas ainda é objeto de discussão na literatura (Kuriyan et al. 1991; Anusevicius & Cenas, 1993, Cenas et al. 1994).

São mostrados a seguir alguns dos mecanismos propostos para o processo de redução (adaptado de Cenas et al. 1994):

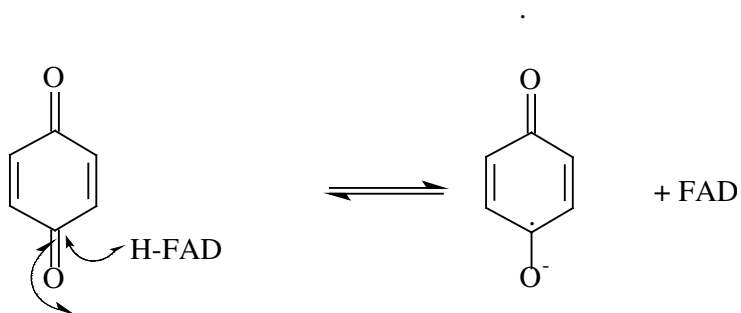
### a) redução via ditiol



### b) redução via íon hidreto



### c) redução uni-eletrônica



## 1.5 – As quinonas

### 1.5.1 - Introdução

A partir de alguns estudos o homem descobriu que há em alguns vegetais compostos com atividades terapêuticas, sejam em estado natural ou após sofrer transformações químicas.

O estudo científico da composição de algumas plantas e a elucidação das estruturas dos princípios ativos abriu novos campos de pesquisa. Tanto os compostos extraídos das plantas, bem como, seus análogos sintéticos, fabricados seguindo seu modelo, constituem uma grande oportunidade para o combate as mais diferentes doenças, através de novas moléculas que irão, no mínimo, fornecer novas informações para outras pesquisas tanto na área química como na farmacêutica.

Como fonte de matéria-prima, a flora brasileira é muito rica no que diz respeito à diversidade de plantas, mas ainda que muitas destas não possuam atividade biológica, podem conter substâncias que poderão ser usadas para a síntese de derivados farmacologicamente ativos.

Atualmente muito esforço vem sendo devotado ao entendimento, e possível explicação, para a ação de compostos químicos sobre sistemas biológicos a nível molecular, o que implica na necessidade de se ter conhecimento das estruturas dos compostos que poderão vir a serem experimentados.

### 1.5.2 – Classificação das Quinonas

As quinonas formam um grupo de compostos com dois grupamentos carbonila, adjacentes ou separados, geralmente em um anel de seis membros com insaturação máxima (Figura 1.3).

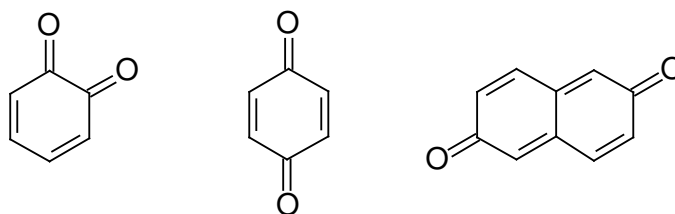


Figura 1.3. Esqueleto básico das quinonas

As quinonas são classificadas em 5 grandes grupos: (Solomons, 1995)

### a - Benzoquinonas

Muitas destas ocorrem em fungos, insetos e em raízes e frutas. As benzoquinonas ubiquinonas (coenzima Q) e a plastoquinona, estão presentes em diversos seres vivos. (Figura 1.4).

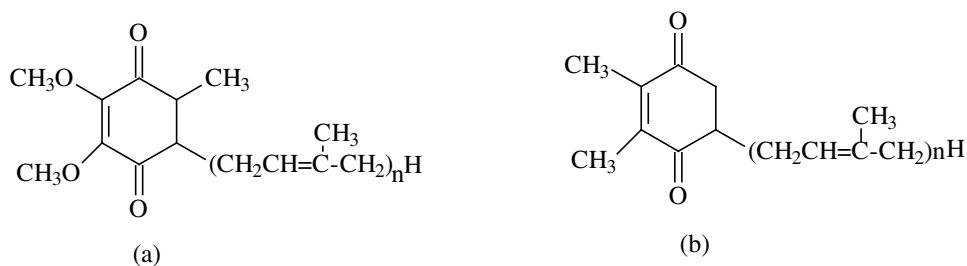


Figura 1.4. Estruturas (a) ubiquinona (n = 6-10); (b) plastoquinona (n = 9)

### b - Naftoquinonas

São quinonas derivadas do naftaleno pela condensação de dois anéis benzênicos. Estão presentes em diversas partes de vegetais superiores. Entre as naftoquinonas de importância fisiológica estão as vitaminas K (Figura 1.5).

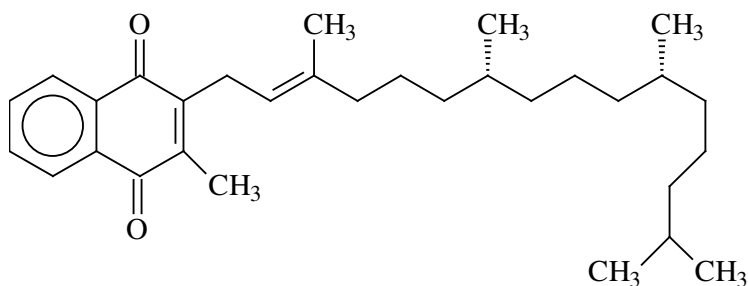


Figura 1.5. Estrutura da Vitamina K<sub>1</sub>



### c - Antraquinonas

Formam um dos grupos mais extensos de quinonas, ocorrendo largamente nas plantas. Dois exemplos de antraquinonas são mostrados na Figura 1.6.

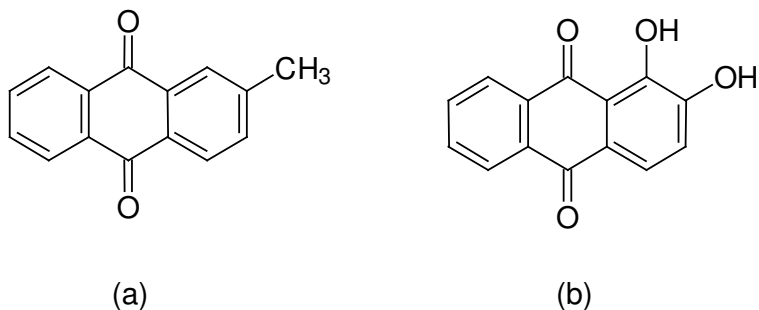


Figura 1.6. Estrutura (a) tectoquinona; (b) alizarina

### d - Quinonas estendidas

Este tipo de quinonas é encontrado em algumas bactérias e fungos. A Figura 1.7 mostra a hipericina, uma quinona do tipo estendida.

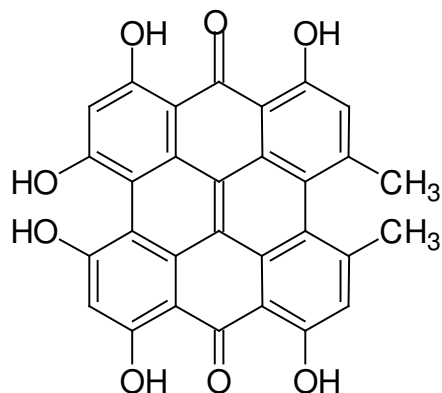


Figura 1.7. Estrutura da hipericina

## e - Antracilinas

Este tipo de quinonas é encontrado em algumas plantas. A Figura 1.8 mostra a Adriamicina, uma quinona que pertence ao tipo das antracilinas.

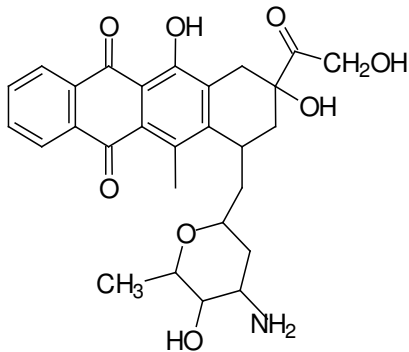


Figura 1.8. Estrutura da Adriamicina

### 1.5.3 – Reações Típicas das Quinonas

A reação típica das quinonas é a redução a compostos diidroxi aromáticos. Como exemplo, na Figura 1.9 é mostrada a redução da ubiquinona, que é a reação fundamental no processo de respiração mitocondrial.

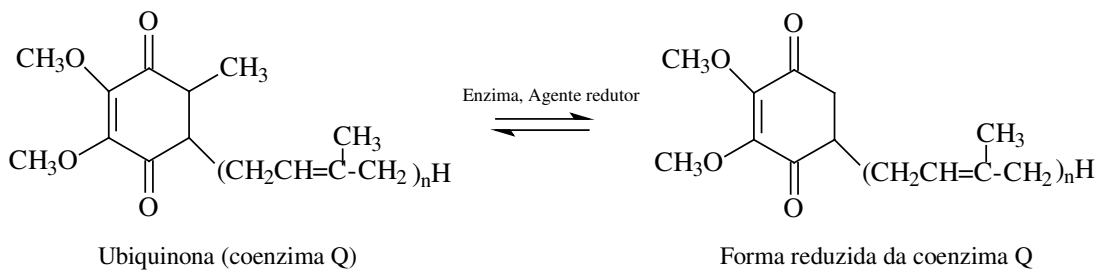


Figura 1.9 – Reação de redução da Ubiquinona

Entretanto, o aspecto mais importante deste sistema redox é o fato dele ser eletroquimicamente reversível, como mostra a semi-reação de redução da Figura 1.10.

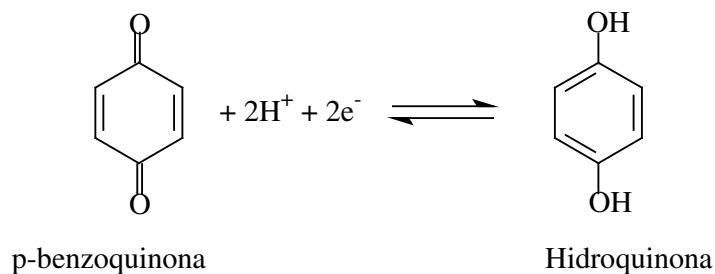


Figura 1.10 – Semi-reação de redução de uma quinona

O potencial elétrico desta cela é dado pela equação de Nernst. Quanto mais positivo o valor do potencial mais facilmente será reduzida a quinona. Na Tabela 1.1 encontram-se os potenciais padrão de redução para algumas quinonas. Vários processos fisiológicos do tipo redox são fundamentados na oxidação-redução dos derivados das quinonas e hidroquinonas (Malta, 2000).

Tabela 1.1 – Potenciais padrão de redução para algumas quinonas

Quinonas	Potencial padrão de redução (V)
1,4 – benzoquinona	0,70
1,2 – benzoquinona	0,78
1,4 – naftoquinona	0,47
1,2 – naftoquinona	0,56
9,10 – antraquinona	0,13
9,10 – fenantraquinona	0,44

## 1.6 – Quinonas e sua atividade biológica

As quinonas têm sido alvo de extensos estudos, pois, de forma geral, estão presentes em um grande número de sistemas biológicos. A atividade tripanossomicida das quinonas tem sido atribuída à formação de radicais oxigênio e conseqüentemente a um forte estresse oxidativo. Também acredita-se que a inserção de halogênios, cloro ou bromo, por, exemplo, contribui significativamente para um aumento da atividade biológica das quinonas, bem como a presença de átomos de oxigênio e nitrogênio na molécula é outro fator de grande importância. (Tapia, 2004). Na literatura são encontradas muitas referências que abordam as mais variadas atividades biológicas dos derivados quinóides, como por exemplo, atividade antitumoral (Lee, 2004; Song, 2000), antimicrobacteriana (Tran, 2004), antimalárico (dos Santos, 2004). A incorporação de átomos de enxofre, por exemplo, nos derivados da 1,4 naftoquinona resulta em atividade antifúngica, antibacteriana, antiviral e anticancerígena. (Tandon, 2005). Os derivados das quinonas são comuns em um grande número de produtos naturais e a eles são associados, em muitos casos, a habilidade de aceitar um e/ou dois elétrons, para formar as correspondentes espécies radicalares, ânion ou diânion, bem como, as propriedades ácido-base dos compostos (Silva, 2005). A capacidade variável das quinonas para aceitar elétrons é devida à atração eletrônica (ou doação) dos substituintes das quinonas que modulam as propriedades redox responsáveis pelo estresse oxidativo (Chemin, 2001).

# *Capítulo 02*

# **Doença de Chagas**

## **2.1 - Histórico**

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana foi descoberta pelo médico sanitário Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas - Carlos Chagas - em 1909. Este brasileiro descobriu a doença e descreveu praticamente todos os seus aspectos. Quando Carlos Chagas realizava uma campanha contra a malária que atingia operários na construção de um trecho da Estrada de Ferro Central do Brasil, ao norte de Minas Gerais, ao fazer exames de uma menina doente, encontrou tripanossomos em seu sangue. Ao examinar posteriormente as fezes de insetos existentes na região e o sangue de mamíferos, constatou também a presença dos mesmos parasitas. Desta forma, Carlos Chagas pode descrever o agente causador, o transmissor e o modo de transmissão da doença, como também comprovar a existência de vertebrados que são reservatórios silvestres e domésticos do parasita, esclarecendo assim os aspectos básicos da epidemiologia da doença (Rocha e Silva, 1998).

## **2.2 - Definição da doença**

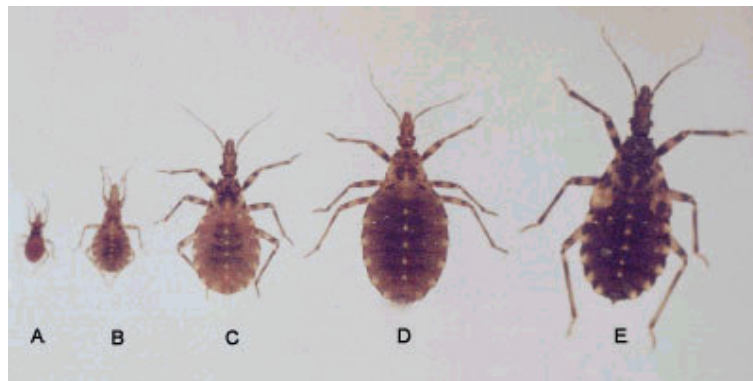
A doença de Chagas é uma infecção transmissível causada por um parasita que circula no sangue e ataca o coração, bem como órgãos do aparelho digestivo (esôfago e intestino).

Sua transmissão exige a participação de um vetor, o triatomíneo conhecido pelo nome de barbeiro, fincão, chupança, entre outros, dependendo da região. É uma doença do continente americano (sul dos Estados Unidos até a Argentina).

## 2.3 - Transmissores

Os principais insetos transmissores são artrópodes da classe Insecta, ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. Sugam sangue (hematófagos) em todas as fases de seu ciclo evolutivo (Barreto, 1979; Marsden, 1983).

Fonte: Foto cedida pelo Insetário da Sucen, Mogi-Guaçu



A = ninfa de primeiro estágio; B = ninfa de segundo estágio;  
C = ninfa de terceiro estágio; D = ninfa de quarto estágio;  
E = ninfa de quinto estágio

## 2.4 - Forma da Infecção

A existência de um ciclo do *Trypanosoma cruzi* no hospedeiro invertebrado ("barbeiro"), já havia sido descrita anteriormente por Carlos Chagas.

Os "tripomastigotas", forma do tripanossomo no sangue, são ingeridos pelo inseto e se transformam, rapidamente no estômago do inseto, em organismos arredondados ou "amastigotas" que apresentam uma tendência a se parrear ou formar massas de parasitas. Também existe a peculiar forma

evolutiva "esferomastigota", organismo arredondado com flagelo circundando o corpo.

No intestino médio processa-se a multiplicação do parasita sob a forma de "epimastigota", sendo essa fase do ciclo aparentemente a responsável pela manutenção da infecção no vetor.

Na parte terminal de seu intestino (reto) ocorre a diferenciação de formas "epimastigota" em "tripomastigotas metacíclicas", que se acumulam na ampola retal e são eliminadas nas fezes juntamente com as formas epimastigotas não transformadas. As "tripomastigotas metacíclicas" são as formas infectantes (Chagas Filho, 1993).

## **2.5 - Mecanismos de transmissão**

### **2.5.1 - Transmissão pelo vetor**

Desde a descoberta da doença de Chagas, a via vetorial - penetração, no organismo suscetível, de *Trypanosoma cruzi* presente nas fezes e na urina de triatomíneos vetores - tem sido descrita como o modo mais importante de sua transmissão.

As formas evolutivas de *T. cruzi* que passam para o tubo digestivo dos triatomíneos, quando estes se alimentam com sangue de pessoas ou animais infectados, multiplicam-se aí, produzindo formas infectantes. Ao alimentar-se, os triatomíneos injetam saliva sob a pele do indivíduo que lhes fornece o alimento, o que reduz a sensação de dor, porém tende a provocar prurido. O ato de coçar torna-se então um meio eficiente de levar fezes e urina do inseto, eliminadas durante o repasto, para o local da picada. Este é o principal mecanismo de transmissão de *T. cruzi* quando não há controle das populações de vetores.

Devido ao controle de populações de triatomíneos, a infecção por este mecanismo é atualmente um evento de difícil ocorrência, dependente de fatores relacionados com densidade populacional, domiciliação, níveis de infecção, número de repastos realizados, tempo decorridos entre a picada e a



dejeção desses insetos, etc.

É aceito, que a transmissão vetorial da doença de Chagas é muito pouco provável em localidades nas quais menos de 5% dos domicílios estejam infestados por triatomíneos. Entretanto, esse não era o quadro existente no Estado de São Paulo nos anos 50 do século XX, quando a doença de Chagas atingiu o ápice de transmissão, e houve uma distribuição generalizada de seu principal vetor, *Triatoma infestans*, na maior parte de seu território rural.

Após o controle, outras formas de transmissão que também coexistiam com a via vetorial, ganharam destaque, estabelecendo-se como mecanismos de perpetuação de *T. cruzi* na população humana, a transfusão sangüínea, a via congênita e outras (Neves, 2000).

### **2.5.2 - Transfusão sangüínea**

A transfusão de sangue total, de plasma ou de concentrado de hemácias contaminados por *T. cruzi* constitui-se na segunda via de transmissão em importância. Esta via cresce em importância nas grandes cidades com alta prevalência da infecção chagásica (Neves, 2000). Oferece um risco estimado entre 12,5 a 25,0% para uma única transfusão padrão de 500 mL de sangue total. Esse risco varia com a prevalência da doença na região em que a transfusão é feita, podendo assim chegar a níveis bem mais elevados. Com a intensa migração de populações de áreas rurais, em que a doença era mais freqüente, para as urbanas, cresceu o risco dessa modalidade de transmissão, devido ao fato de que o controle sorológico dos doadores não era adequadamente realizado (Rocha e Silva, 1998).

Entretanto varia entre 2,0 e 4,0%, na América Latina em geral. Ocasionalmente esses números podem elevar-se, dependendo da região em foco, como é o caso de algumas áreas bolivianas, em que essa prevalência chega a níveis acima de 60,0%. No Brasil o valor médio é de 0,7%, sendo o limite superior verificado no Estado de Goiás, próximo a 5,0%. Portarias do Ministério da Saúde regulamentam a triagem sorológica de doadores de sangue, sendo exigido a execução, com o material de cada doador, de pelo menos dois testes sorológicos, baseados em diferentes princípios. A

obediência à essas condições contribui para o controle da transmissão via transfusão (Rocha e Silva, 1998).

### **2.5.3 – Outros tipos de transmissão**

A terceira modalidade de transmissão, em importância, é a congênita, isto é, das mães aos seus filhos e até mesmo em segunda geração, de avós para mães e destas, para os filhos, através da placenta. As formas clínicas observadas nesses casos variam desde assintomática até grave, como nas infecções por outros meios. Outras formas de transmissão descritas na literatura são: a oral, através da ingestão de alimentos contaminados por *T. cruzi*, como por exemplo, carnes de caça cruas ou mal cozidas contaminadas, e mesmo outros alimentos que durante seu preparo possa ter ocorrido a contaminação com material dos próprios vetores infectados.

O aleitamento materno também é citado como via de transmissão, quando a mãe se apresenta na fase aguda da doença e, principalmente, se há fissuras nos mamilos (Wendel, 1992).

Em transplante de órgãos, como na transfusão sangüínea, pode ocorrer a transmissão quando se desconhece a condição de infectado chagásico do doador, por falta do indispensável diagnóstico prévio. Há também a via acidental em laboratório, de pessoal que manipula o agente etiológico desta doença.

Há outras vias, consideradas raras, como regurgitamento de material contaminado no local da picada, por insetos sugadores de sangue, via sexual e quaisquer outras que promovam o contato de sangue de um indivíduo contaminado com mucosa ou pele de outro suscetível, desde que, neste último caso, haja lesões na pele (Rocha e Silva, 1998).

## **2.6 - Formas da doença e sintomas**

Descrevem-se na literatura três fases da doença de Chagas: aguda, indeterminada e crônica.

A fase aguda é a inicial, caracterizada por febre, linfadenopatia e

hépato-esplenomegalia. Quando a porta de entrada dos tripanossomos é a conjuntiva ocular, a palpebra pode desenvolver um inchaço conhecido como sinal de Romana.

Quando o parasita penetra por outros locais da superfície corporal, a lesão produzida recebe o nome de "chagoma de inoculação". Com freqüência, a fase aguda passa despercebida, pois seus sintomas podem confundir-se com os de diversas outras infecções.

As fases subseqüentes, conhecidas como de latência ou indeterminadas, não apresentam sintomatologia importante do ponto de vista clínico e podem durar vários anos. Um paciente nessa fase pode desconhecer sua condição de portador assintomático da doença de Chagas e transmitir involuntariamente a infecção por mecanismos diversos. É aceita a idéia de que a maior parte dos chagásicos persiste nessa fase pelo resto de suas vidas.

Do conjunto dos infectados, uma proporção pequena de indivíduos evolui para a fase denominada crônica, durante a qual são identificáveis sintomas de comprometimento cardíaco (miocardite grave), com aumento do volume do coração (cardiomegalia) ou digestivo, com aumento do diâmetro de regiões do trato digestivo, os "megas": megaesôfago, megacolo, etc. Há, nesta fase, gradativa redução da qualidade de vida e da capacidade de trabalho dos doentes, que passam a necessitar de atenção médica constante.

## 2.7 - Controle da doença

Quando a fase crônica é atingida a doença é essencialmente incurável e a quimioterapia usual contra a doença de Chagas é ainda inadequada. As duas únicas drogas em uso na fase aguda inicial, como pode ser visto figura 2.1, são:

- **Nifurtimox**<sup>®</sup>, cujo mecanismo de ação envolve a produção de ânion superóxido, que é altamente tóxico ao parasita.
- **Benznidazol**<sup>®</sup>, que atua no sistema respiratório do parasita e também inibe a síntese do DNA.

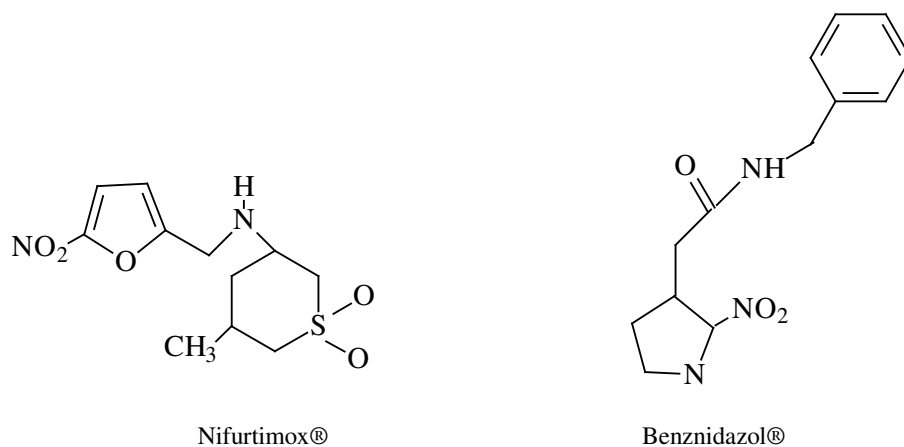


Figura 2.1 – Estrutura dos compostos usados no tratamento da fase aguda da doença de Chagas.

Ambas as drogas têm efeitos colaterais indesejáveis e são ainda ineficientes no tratamento da Doença de Chagas, que pode ser encarada, até o presente momento, como uma doença sem cura.

Para desenvolver novas drogas contra esta infecção parasitária, a pesquisa tem sido freqüentemente dirigida às diferenças-chave entre o metabolismo do hospedeiro e do parasita. Neste sentido, a enzima tripanotiona redutase (TR) tem sido encarada como alvo específico nos tripanossomatídeos (Fairlamb, 1990) e mais tarde validada como alvo quimioterápico contra as tripanossomíases (Dumas et al., 1997).

Tripanossomas e Leishmanias diferem dos hospedeiros mamíferos em um ponto importante. Os parasitas não possuem a proteína glutationa redutase (GR), ao invés disso, usam a tripanotiona redutase (TR) na proteção contra o estresse oxidativo, nome dado aos problemas de citotoxicidade que geram os radicais livres derivados da respiração celular e outras vias. GR e TR possuem substratos específicos, enquanto, GR catalisa a redução da glutationa, TR catalisa a redução da tripanotiona (vide Capítulo 1). Isto abre a possibilidade de estudar drogas antiparasitárias seletivas, em outras palavras, que atuem inibindo só a TR (Vega-Teijido, 2003).

## 2.8 – As enzimas

### 2.8.1 - Glutationa redutase (GR)

A glutationa reduzida (GSH) tem uma estrutura química formada por uma cadeia de três aminoácidos: Gly – Cys -  $\gamma$ -Glu. O nome refere-se a ligação peptídica que é feita através da carboxila na posição  $\gamma$  e não  $\alpha$ , como é normalmente visto nas proteínas. Quando a glutaciona está na forma oxidada (GSSH), as duas cisteínas centrais estão unidas por uma ligação dissulfeto, adotando assim uma forma similar à letra H. A passagem da GSSH para a GSH, dependente da NADPH, é catalisada pela flavoenzima glutaciona redutase (GR) [Figura 2.2 (adaptado de Vega-Tejido, 2003)].

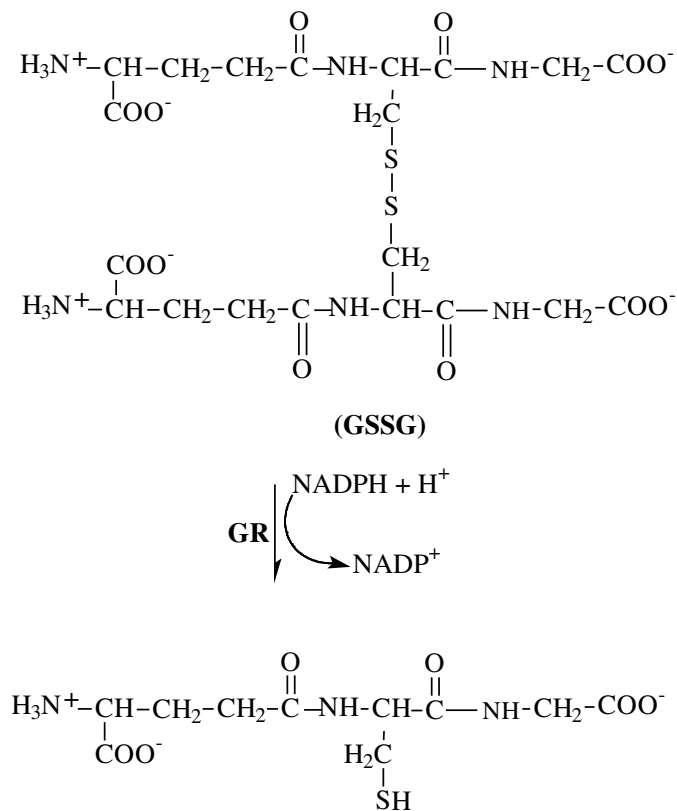
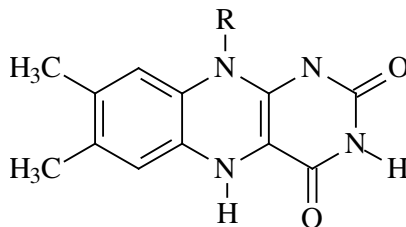


Figura 2.2 – Redução da GSSG a GSH

A GR contém um grupo prostético, a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) (Figura 2.3). O nucleotídeo que contém o anel triplo de isoaloxazina é chamado de flavina. O FAD se encontra ligado de forma permanente à enzima na região intermediária entre o sítio catalítico e o sítio de ligação do NADPH, participando da transferência de elétrons do NADPH ao sítio catalítico através da isoaloxazina.



**Figura 2.3 – FAD mostrando o anel do grupo Flavina.**

De forma resumida, podemos dizer que a GR catalisa a reação em dois estágios:



onde a flavoenzima GR contém uma ligação dissulfeto "redox-ativa" na qual ES-SE aceita um par de elétrons através da clivagem da ligação para formar um ditiol. Finalmente, esse par de elétrons, junto com dois prótons, são transferidos para formar duas unidades de glutathiona reduzida, GSH.

Nas células mamíferas a GR participa em vários ciclos metabólicos que utilizam GSH (Krauth-Siegel, 1999): na detoxificação de hidroperóxidos orgânicos, na produção de deoxiribonucleotídeos, na síntese de DNA e na reação de redução de moléculas da forma geral YSSY para formar 2YSH. A GSH também está envolvida na eliminação de várias substâncias citotóxicas (X) através da catálise da glutathione S-transferase para fornecer espécies químicas do tipo GS-X.

### 2.8.2 - Tripanotiona redutase (TR)

Os agentes causadores de muitas enfermidades tropicais tais como doença do sono, doença de Chagas, leishmaniose são protozoários parasitas da ordem dos Cinetoplastídeos. Estes protozoários não possuem a enzima glutathione redutase, como quase todos os eucariotos e procariotos, mas possuem a tripanotiona redutase.

Se comparada com a GR, a TR cumpre a mesma função, além de possuir propriedades físicas e químicas similares, exceto a sua especificidade pelo substrato. Enquanto o substrato da GR é a GSSG, o substrato da TR é a  $TS_2$ .

O substrato da TR, tripanotiona oxidada ( $TS_2$ ), é muito similar ao substrato da GR, mas apresentam pequenas diferenças que são fundamentais na seletividade que cada um tem com a sua enzima.

Devido a grande sensibilidade do protozoário ao *estresse oxidativo* faz desta enzima, TR, um excelente alvo no estudo de novos fármacos.

O conhecimento das semelhanças e diferenças entre a GR e a TR, bem como o entendimento de como as substâncias se ligam a eles, é algo de grande relevância para que se possa, quem sabe, chegar a um fármaco ideal no tratamento da doença de Chagas.

### 2.8.3 - Inibidores

Diversos trabalhos experimentais têm revelado a existência de compostos que atuam como inibidores da TR. Nenhum destes é realmente uma droga antiparasitária efetiva, pois, seu poder de inibição *in vivo* não é suficientemente alto para que sejam tóxicos ao parasita, mas estão sendo usados como base para o estudo de modelagem molecular, com o intuito de melhorar os níveis de inibição e sua seletividade (Krauth-Siegel, 1999).

Um outro tipo de composto, cuja inibição está ligada à sua capacidade de gerar radicais livres, é constituído pelos derivados de nitrofuranos e de naftoquinonas. Estes podem atuar como substratos subversivos ligando-se ao complexo NADPH-enzima. Sob a sua ação, onde são transferidos elétrons a uma molécula de oxigênio, são gerados dois radicais superóxidos, sendo disparada uma série de reações em cadeia dentro da célula, o já mencionado *estresse oxidativo* (Vega-Teijido, 2003).

Desta forma, por ação dos substratos subversivos a TR passa de uma atividade antioxidante para uma pró-oxidante, sendo essa a razão do nome substrato subversivo.



# *Capítulo 03*

## **3.1 - Parte experimental**

### **3.1.1 - Obtenção dos monocristais**

Primeiramente colocou-se uma pequena quantidade do composto em um tubo de ensaio, e em seguida adicionou-se solvente até a solubilização do material.

Os monocristais foram obtidos por evaporação lenta de soluções de etanol ou acetona, à temperatura ambiente.

### **3.1.2 - Coleta e redução dos dados experimentais**

Como o trabalho de coleta e redução dos dados experimentais é igual para todas as estruturas descritas nesta Tese, o procedimento somente será detalhado nesta seção. As particularidades de cada caso estão nas tabelas correspondentes. Uma introdução detalhada aos métodos utilizados pode ser encontrada na Dissertação de Mestrado (Trindade, 2000).

Utilizando 25 reflexões obteve-se o sistema cristalino, as dimensões da cela unitária e a matriz de orientação necessária para a coleta das intensidades dos feixes difratados. As intensidades dos feixes difratados foram medidas usando-se a técnica de varredura  $\theta$ - $2\theta$ , com radiação  $K\alpha$  do molibdênio ( $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$ ) monocromatizada por cristal de grafite. As intensidades de três reflexões, foram medidas a cada 30 minutos, permanecendo constantes ao longo das medidas.

Os módulos dos fatores de estrutura foram obtidos a partir das intensidades observadas e corrigidas pelos fatores de Lorentz-polarização. Estes cálculos foram feitos utilizando o conjunto de programas MolEN (Fair, 1990).

Todas as estruturas foram refinadas por mínimos quadrados com matriz completa utilizando  $F^2$ .

Os cálculos de refinamento foram feitos utilizando SHELXL97 (Sheldrick, 1997) e os desenhos das moléculas e empacotamentos foram feitos com o programa ZORTEP (Zsolnai, 1995). O cálculo das interações, geometrias moleculares e a preparação do material foi feito utilizando PARST95 (Nardelli, 1995) e WinGX (Farugia, 1999).