UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

***Estudo de compostos quinônicos com potencial atividade
contra a doença de Chagas***

Janaina Gomes Ferreira

**Tese apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos - USP como
requisito para a obtenção do título
de Doutor em Ciências (Físico-
Química)**

Orientador: Prof. Dr. Regina Helena de Almeida Santos

**São Carlos
2008**

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob a exclusiva responsabilidade do autor.

São Carlos, 01/07/2008

Janaina Gomes Ferreira

*Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao
Usuário do SBI/IQSC*

Ferreira, Janaina Gomes

Estudo de compostos quinônicos com potencial atividade contra a doença de Chagas. / Janaina Gomes Ferreira. -- São Carlos, IQSC, 2008.
97p.

Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos /
Universidade de São Paulo, 2008.
Edição revisada

Orientadora: Profa. Dra. Regina Helena de Almeida Santos

1. Quininas. 2. PLS. 3. Docking. I. Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Regina Santos, pelos valiosos ensinamentos, pela amizade, orientação, incentivo e confiança.

À profa. Ignez Caracelli, pela co-orientação neste trabalho e amizade.

À profa. Teca, pelo auxílio em diversos momentos e pela amizade.

A todos os professores, funcionários e amigos da Química Estrutural, em especial à Shirlei, Vânia e Albérico, pelos bons momentos de convívio, auxílio, sugestões e amizade.

À Karen, Manu, Josmar, Fábio e Valéria, pelas imprescindíveis contribuições feitas no decorrer deste trabalho.

À Sílvia e a Andréia, por sua gentileza e competência.

Às bibliotecárias, pela atenção e ajuda.

Ao pessoal da seção de Informática, por todos os serviços prestados.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Aos amigos Karina, Elisângela, Samantha, Emmanuela, Karen, Sandra Moraes, Rodrigo, Diógenes, Luciana e Sandra Ananias.

Aos meus pais, Antonio e Claudia, e às minhas irmãs, Sheila e Mariana, pelo apoio e amor recebido incondicionalmente.

Ao Yoshiaki, pelo apoio e amor.

E a todos que colaboraram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

	<i>ÍNDICE DE FIGURAS.....</i>	<i>i</i>
	<i>ÍNDICE DE TABELAS.....</i>	<i>ii</i>
	<i>RESUMO.....</i>	<i>iii</i>
	<i>ABSTRACT.....</i>	<i>iv</i>
<i>I</i>	<i>INTRODUÇÃO.....</i>	<i>1</i>
<i>I.1</i>	<i>Motivação do trabalho.....</i>	<i>1</i>
<i>I.2</i>	<i>A doença de Chagas.....</i>	<i>2</i>
<i>I.3</i>	<i>O Ciclo de vida do T. cruzi.....</i>	<i>3</i>
<i>I.3.1</i>	<i>O ciclo de vida nos invertebrados.....</i>	<i>3</i>
<i>I.3.2</i>	<i>O ciclo de vida nos vertebrados.....</i>	<i>4</i>
<i>I.4</i>	<i>Fases e sintomas da doença de Chagas.....</i>	<i>5</i>
<i>I.5</i>	<i>Medicação disponível.....</i>	<i>7</i>
<i>I.6</i>	<i>Um alvo molecular específico contra o T. cruzi.....</i>	<i>9</i>
<i>I.7</i>	<i>Tripanotiona Redutase.....</i>	<i>9</i>
<i>I.7.1</i>	<i>Análise do sítio de ligação da tripanotiona na TR.....</i>	<i>10</i>
<i>I.8</i>	<i>Glutationa Redutase.....</i>	<i>13</i>
<i>I.8.1</i>	<i>Análise no sítio ativo da GR.....</i>	<i>14</i>
<i>I.9</i>	<i>Outros possíveis sítios de interação existentes na TR e na GR.....</i>	<i>17</i>
<i>I.10</i>	<i>O desenvolvimento de novos fármacos contra a doença de Chagas.....</i>	<i>19</i>
<i>I.11</i>	<i>As naftoquinonas.....</i>	<i>20</i>
<i>II</i>	<i>DETERMINAÇÃO DAS ESTRUTURAS POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X.....</i>	<i>23</i>
<i>II.1</i>	<i>Redeterminação da estrutura cristalina e molecular da β-lapachona.....</i>	<i>24</i>
<i>II.2</i>	<i>Determinação da estrutura cristalina e molecular da 2,6-dimetil-1,4-naftoquinona (naftoq-01).....</i>	<i>30</i>
<i>II.3</i>	<i>Considerações finais sobre a determinação das estruturas.....</i>	<i>35</i>
<i>III</i>	<i>MODELO DE PREVISÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS COMPOSTOS NAFTOIMIDAZÓLICOS.....</i>	<i>37</i>
<i>III.1</i>	<i>Introdução.....</i>	<i>37</i>
<i>III.2</i>	<i>Modelagem molecular dos compostos e cálculo das propriedades.....</i>	<i>39</i>

<i>III.3</i>	<i>Descrição de algumas propriedades físico-químicas calculadas.....</i>	<i>40</i>
<i>III.4</i>	<i>Métodos utilizados para a análise dos dados.....</i>	<i>46</i>
<i>III.5</i>	<i>Seleção das propriedades calculadas.....</i>	<i>47</i>
<i>III.6</i>	<i>Seleção dos compostos para a série de tratamento e de teste.....</i>	<i>57</i>
<i>III.7</i>	<i>Modelo PLS.....</i>	<i>58</i>
<i>III.7.1</i>	<i>Validação externa do modelo PLS.....</i>	<i>60</i>
<i>III.8</i>	<i>Considerações finais.....</i>	<i>61</i>
<i>IV</i>	<i>DOCKING.....</i>	<i>64</i>
<i>IV.1</i>	<i>Metodologia.....</i>	<i>65</i>
<i>IV.1.1</i>	<i>Preparação do receptor.....</i>	<i>65</i>
<i>IV.1.2</i>	<i>Preparação dos ligantes.....</i>	<i>66</i>
<i>IV.1.3</i>	<i>Docking e análise dos resultados em tela gráfica.....</i>	<i>68</i>
<i>IV.2</i>	<i>Análise dos complexos nos sítios de interação da TR e da GR.....</i>	<i>68</i>
<i>IV.2.1</i>	<i>Análise dos complexos formados com os compostos naftoquinônicos.....</i>	<i>69</i>
<i>IV.2.1.1</i>	<i>Sítio ativo da TR.....</i>	<i>70</i>
<i>IV.2.1.2</i>	<i>Sítio ativo da GR.....</i>	<i>71</i>
<i>IV.2.1.3</i>	<i>Sítio da interface da TR.....</i>	<i>73</i>
<i>IV.2.1.4</i>	<i>Sítio da interface da GR.....</i>	<i>74</i>
<i>IV.2.1.5</i>	<i>Comparação dos complexos naftoquinônicos formados nos possíveis sítios de interação da GR e da TR.....</i>	<i>75</i>
<i>IV.2.2</i>	<i>Análise dos complexos formados com compostos naftoimidazólicos.....</i>	<i>76</i>
<i>IV.2.2.1</i>	<i>Sítio ativo da TR.....</i>	<i>77</i>
<i>IV.2.2.2</i>	<i>Sítio ativo da GR.....</i>	<i>78</i>
<i>IV.2.2.3</i>	<i>Sítio da interface da TR.....</i>	<i>80</i>
<i>IV.2.2.4</i>	<i>Sítio da interface da GR.....</i>	<i>82</i>
<i>IV.2.2.5</i>	<i>Comparação dos complexos naftoquinônicos formados nos possíveis sítios de interação da GR e da TR.....</i>	<i>83</i>
<i>IV.3</i>	<i>Considerações finais.....</i>	<i>83</i>
<i>V</i>	<i>CONCLUSÃO.....</i>	<i>85</i>
<i>VI</i>	<i>Sugestões para trabalhos futuros.....</i>	<i>86</i>
	<i>Referências bibliográficas</i>	<i>88</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição geográfica da doença de Chagas.....	2
Figura 2 -	<i>Triatoma infestans</i> , principal transmissor da doença de Chagas.....	3
Figura 3 -	Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	5
Figura 4 -	Estrutura molecular dos medicamentos disponíveis no mercado para o tratamento da doença de Chagas.....	7
Figura 5 -	A TR catalisa a redução dependente de NADPH da forma tripanotiona dissulfeto (TS_2) para a sua forma ditiol ($T[SH]_2$).....	10
Figura 6 -	a: Modo de ligação da tripanotiona na forma $T[S]_2$ com a TR; b: Molécula tripanotiona.....	11
Figura 7 -	Esquema representativo da ação catalítica da TR frente ao seu substrato.....	12
Figura 8 -	A GR catalisa a redução NADPH-dependente da glutathiona dissulfeto (GSSG) formando duas moléculas de GSH.....	14
Figura 9 -	Estágios do ciclo catalítico da GR.....	15
Figura 10 -	Naftoquinonas testadas no <i>T. cruzi</i> sob a forma tripomastigota.....	21
Figura 11 -	Representação ORTEP da β -lapachona.....	26
Figura 12 -	Projeção do empacotamento na cela unitária da β -lapachona.....	28
Figura 13 -	Representação ORTEP das ligações de hidrogênio encontradas na estrutura da β -lapachona.....	29
Figura 14 -	Representação ORTEP do composto naftoq-01.....	32
Figura 15 -	Projeção do empacotamento na cela unitária.....	33
Figura 16 -	Representação ORTEP das ligações de hidrogênio não convencionais existentes na Naftoq-01.....	34
Figura 17 -	Representação do dímero supramolecular formado através da interação $C-H \cdots \pi$	35
Figura 18 -	Compostos naftoimidazólicos selecionados para a modelagem molecular	38
Figura 19 -	Orbitais HOMO para compostos naftoi.....	42
Figura 20 -	Gráfico da distribuição do conjunto de treinamento e sua atividade biológica correspondente em escala logarítmica.....	57
Figura 21 -	Gráfico do conjunto teste e sua atividade biológica correspondente em escala logarítmica.....	58
Figura 22 -	Reta de regressão obtida pelo PLS utilizando as 9 variáveis selecionadas e validação cruzada.....	60
Figura 23 -	Compostos escolhidos para o estudo das possíveis formações dos complexos nos sítios de interação das proteínas TR e GR.....	67
Figura 24 -	Modo de ligação da β -lapachona no sítio ativo da TR.....	71
Figura 25 -	Modo de ligação da α -lapachona no sítio ativo da GR.....	72
Figura 26 -	Modo de ligação da β -lapachona no sítio ativo da GR.....	72
Figura 27 -	Modo de ligação do composto naftoq-01 no sítio da interface da TR.....	73
Figura 28 -	Modo de ligação do composto naftoq-01 no sítio da interface da GR.....	75
Figura 29 -	Modo de ligação do composto naftoi-2C no sítio ativo da TR.....	77
Figura 30 -	Modo de ligação do composto naftoi-2B no sítio ativo da GR	78
Figura 31 -	Modo de ligação do composto naftoi-3A no sítio ativo da GR.....	79
Figura 32 -	Modo de ligação do composto naftoi-2C no sítio da interface da TR.....	80
Figura 33 -	Modo de ligação do composto naftoi-04 no sítio da interface da GR.....	82

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1 -</i>	<i>Resumo dos dados cristalográficos da β-lapachona.....</i>	<i>25</i>
<i>Tabela 2 -</i>	<i>Distâncias interatômicas (Å) com os respectivos desvios padrão (Å), entre parênteses, para a β-lapachona.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabela 3 -</i>	<i>Ângulos interatômicos (°) com os respectivos desvios padrão (°) para a β-lapachona</i>	<i>27</i>
<i>Tabela 4 -</i>	<i>Equações dos planos de mínimos quadrados e a distância dos átomos aos planos, com os respectivos desvios padrão entre parênteses.....</i>	<i>28</i>
<i>Tabela 5 -</i>	<i>Interações de hidrogênio não convencionais existentes entre as moléculas.....</i>	<i>30</i>
<i>Tabela 6 -</i>	<i>Resumo dos principais dados cristalográficos para o composto Naftoq-01</i>	<i>31</i>
<i>Tabela 7 -</i>	<i>Distâncias interatômicas (Å) com os respectivos desvios padrão, entre parênteses, para Naftoq-01.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabela 8 -</i>	<i>Ângulos interatômicos (°) com os respectivos desvios padrão para o composto Naftoq-01</i>	<i>32</i>
<i>Tabela 9 -</i>	<i>Equações dos planos de mínimos quadrados e a distância dos átomos aos planos, com os respectivos desvios padrão entre parênteses.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabela 10 -</i>	<i>Interações não covalentes existentes na Naftoq-01.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabela 11 -</i>	<i>Parâmetros moleculares calculados para os naftoimidazóis.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabela 12 -</i>	<i>Parâmetros moleculares calculados para os naftoimidazóis.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabela 13 -</i>	<i>Parâmetros moleculares calculados para os naftoimidazóis.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabela 14 -</i>	<i>Parâmetros moleculares calculados para os naftoimidazóis.....</i>	<i>51</i>
<i>Tabela 15 -</i>	<i>Parâmetros moleculares calculados para os naftoimidazóis.....</i>	<i>52</i>
<i>Tabela 16 -</i>	<i>Parâmetros moleculares calculados para os naftoimidazóis.....</i>	<i>53</i>
<i>Tabela 17 -</i>	<i>Coefficientes de correlação das variáveis selecionadas para os 29 compostos.....</i>	<i>55</i>
<i>Tabela 18 -</i>	<i>Resultados do modelo PLS utilizando as nove variáveis e validação cruzada (excluindo 3 amostras por vez).....</i>	<i>59</i>
<i>Tabela 19 -</i>	<i>Valores previstos pelo PLS.....</i>	<i>59</i>
<i>Tabela 20 -</i>	<i>Valores previstos pelo modelo PLS.....</i>	<i>61</i>
<i>Tabela 21 -</i>	<i>Média dos valores da energia eletrostática e de van der Waals (kcal/mol) para cada complexo formado.....</i>	<i>69</i>
<i>Tabela 22 -</i>	<i>Valores médios da energia total (kcal/mol) para todos os sítios e ligantes e porcentagem de repetição.....</i>	<i>70</i>
<i>Tabela 23 -</i>	<i>Valores médios da energia total (kcal/mol) para todos os sítios e ligantes e porcentagem de repetição.....</i>	<i>76</i>

RESUMO

Este trabalho apresenta as estruturas determinadas por difração de raio X de dois compostos naftoquinônicos, 3,4-diidro-[2,2-dimetil]-2H-nafto[1,2-b]pirano-5,6-diona (β -lapachona) e dimetil-1,4-naftoquinona. A estrutura cristalina destes compostos mostrou que estes são estabilizados por ligações de hidrogênio do tipo C-H $\cdots$ O, formando estruturas supramoleculares. Dos compostos derivados da β -lapachona, os naftoimidazóis têm-se mostrado muito ativos contra o *T. cruzi*, agente causador da doença de Chagas. Partindo das estruturas modeladas de 29 compostos naftoimidazólicos, propriedades eletrônicas, geométricas e topológicas foram calculadas para análise estatística por mínimos quadrados parciais (PLS). Após a análise e redução das variáveis foram selecionados os descritores Morp17p, X4a, piPC09, RDF065v, BELp6, RDF060p, R4u, RDF035m e RCI que foram utilizados para a construção de um modelo de regressão com o método de PLS. Para o modelo, o menor erro de validação foi obtido com 3 fatores e os coeficientes de correlação $R = 0,71$ e $Q = 0,82$. O estudo de docking de alguns compostos naftoquinônicos e naftoimidazólicos mostrou que, do ponto de vista energético e de complementaridade química, estes compostos possuem pouca probabilidade de se ligarem no sítio ativo da tripanotiona redutase (TR), uma enzima essencial para o metabolismo do *T. cruzi*, bem como no sítio ativo da enzima humana glutationa redutase (GR), homóloga a TR. Há, no entanto, uma tendência geral destes compostos se ligarem no sítio da interface, sobretudo, de se ligarem neste sítio da enzima humana.

ABSTRACT

This work presents the structure determined by X-ray analyses for two naphthoquinone compounds 3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphtho[1,2-b]pyran-5,6-dione and dimethyl-1,4-naphthoquinone. The crystal packing of these compounds showed the existence of intermolecular hydrogen bonds of the type $\text{CH}\cdots\text{O}$. These intermolecular forces are responsible for the self-assembly in three-dimensional supramolecular structure. A set of 29 naphthoimidazoles, derived from β -lapachone, that has shown activity against *T. cruzi*, the agent of Chagas disease, were modeled. From these structures electronic, geometric, topological, etc, properties were calculated to be used in the investigation by statistic analysis, using the partial least squares method (PLS). After reduction of the number of variables, the best PLS model found was the one obtained with the following variables: Morp17p, X4a, piPC09, RDF065v, BELp6, RDF060p, R4u, RDF035m and RCI. For the PLS model, the lower error of validation was obtained using 3 factors with the coefficients $R=0.71$ and $Q=0.82$. Two sets of compounds, naphthoquinones and naphthoimidazoles, were studied by docking method. The results showed that, for both, naphthoquinones and naphthoimidazoles and both trypanothione and glutathione reductase, the compounds have low probability to bind in the active site, and are more likely to bind in the interface site, especially in the interface site of the human protein.

I – INTRODUÇÃO

I.1 – Motivação do trabalho

O conhecimento dos processos biológicos no nível estrutural, aliado ao avanço computacional, torna possível o acúmulo de informações que poderão ser aplicadas no desenvolvimento de novos fármacos que visam ao combate de doenças.

Graças ao grande potencial biológico e à sua abundância na flora brasileira, as naftoquinonas têm motivado os pesquisadores, sobretudo brasileiros, a buscarem novos compostos bioativos – tomando como base a sua estrutura – que sejam eficazes contra várias doenças.

No grupo de Cristalografia do Departamento de Química e Física Molecular do Instituto de Química de São Carlos, os trabalhos com compostos naftoquinônicos surgiram com as teses de doutorado de Mariano A. Pereira e Valéria R.S. Malta [Pereira, 1989, Malta, 2000] - hoje, docentes da Universidade Federal de Alagoas. Nestes trabalhos foram analisados compostos derivados da alfa e beta-lapachonas, cujas estruturas cristalina e molecular foram determinadas e serviram de base para o estudo quimiométrico deste conjunto de compostos.

Com o objetivo de dar continuidade a estes estudos, novos compostos serão apresentados neste trabalho. As classes de compostos selecionadas para este estudo foram as naftoquinonas (naftoq) e naftoimidazóis (naftoi), sintetizadas pelo grupo de pesquisas do professor Dr. Antonio Ventura Pinto, da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

A fim de tentar entender o mecanismo de interação destes compostos frente ao *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), foi realizado o estudo de docking nos sítios de interação da Tripanotiona Redutase e da Glutationa Redutase.

I.2 - A doença de Chagas

A doença de Chagas não deveria ser considerada somente uma enfermidade, mas também uma questão político-social que merece atenção dos órgãos públicos responsáveis, já que é uma doença endêmica que atinge países de economias

emergentes - onde há uma grande desigualdade social e poucas medidas de prevenção e assistência aos portadores da doença.

Por afetar apenas os países latino-americanos – a incidência é percebida apenas até o México, sendo inexistente nos demais continentes – a atenção da comunidade científica internacional também é pequena, e há pouco interesse das indústrias farmacêuticas no desenvolvimento de novos medicamentos [Pink *et al.*, 2005].

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (WHO - www.who.int/topics/chagas_disease/en), a doença de Chagas afeta 18 países das Américas Central e do Sul, desde o norte do México até o sul da Argentina, como mostra a Figura 1. São mais de 17 milhões de pessoas infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*, com quase 3,5 milhões de casos sintomáticos e uma incidência anual de 200 mil novos casos.

Figura 1 - Distribuição geográfica da doença de Chagas [WHO, 2007].

Descoberta, em 1909, pelo cientista brasileiro Carlos Chagas, a doença de Chagas também é conhecida como tripanossomíase por *Trypanosoma cruzi*, ou tripanossomíase americana (terminologia adotada pela Nomenclatura Internacional de Doenças, NID). O nome tripanossomíase é dado a qualquer enfermidade causada por protozoários flagelados do gênero *Trypanosoma*, que parasitam o sangue e os tecidos de vertebrados.

O *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) geralmente é transmitido de um hospedeiro a outro por insetos hematófagos das espécies *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* [Sucen, 2008] - o principal vetor de transmissão é o inseto *Triatoma infestans*, popularmente conhecido como barbeiro ou chupão, mostrado na Figura 2.

Figura 2 - *Triatoma infestans*, principal transmissor da doença de Chagas (Sucen).

I.3 – O Ciclo de vida do *T. cruzi*

O agente etiológico da doença de Chagas é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, pertencente à ordem *Kinetoplastidae* e à família *Trypanosomatidae*, caracterizado pela presença de um flagelo e uma única mitocôndria responsável pelo cinetoplasto, uma organela autoreplicável que contém o DNA extracelular [De Souza, 1999; Devera; Fernandes; Coura, 2003]. Embora o *T. cruzi* tenha uma aparência simples, possui ciclo de vida complexo, com três estágios distintos, além de envolver dois tipos diferentes de hospedeiros: os insetos triatomíneos (hospedeiro invertebrado intermediário) – a partir dos quais se desenvolvem as formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos - e os vertebrados – que se desenvolvem nas formas amastigotas e tripomastigotas [Garcia; Gonzalez; Azambuja, 1999].

I.3.1 - O ciclo de vida nos invertebrados

O ciclo de vida deste parasito começa quando o inseto hematófago pica uma pessoa ou animal infectado, sugando - juntamente com o sangue - a forma tripomastigota metacíclica, que irá circular na sua corrente sanguínea e também o infectará.

A primeira transformação do parasito inicia-se poucas horas depois da sua ingestão, junto com o sangue contaminado - se diferencia em epimastigota no interior do intestino médio, multiplicando-se por fissão binária (Esta é a fase de

proliferação da doença que tornará o inseto infectado até a sua morte). Após alguns ciclos de multiplicação, os epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas que, ao romperem a parede celular, caem na circulação e podem invadir novas células.

Na região do intestino posterior ou reto, a forma tripomastigota também se multiplica e se diferencia na forma tripomastigota metacíclica. Esta fase do *T. cruzi* é altamente infectante para os vertebrados [De Souza, 2002].

I.3.2 - O ciclo de vida nos vertebrados

A transmissão do *T. cruzi* para os seres vertebrados se dá pelas fezes e urina que o inseto deposita sobre a pele enquanto suga o sangue, liberando a forma tripomastigota metacíclica. Como a picada provoca coceira, o ato de coçar facilita a penetração do parasito pelo local da picada ou através de alguma área lesada da pele ou, ainda, pela mucosa dos olhos, nariz ou boca.

Existem outras formas de contágio menos comuns, como a transfusão de sangue, transmissão congênita da mãe chagásica para o filho via placenta, ingestão de alimentos contaminados e acidentalmente, em laboratórios de pesquisa.

No corpo humano ou em outros hospedeiros vertebrados, os tripomastigotas metacíclicos (forma infectante e não proliferativa da doença) invadirão qualquer tipo de célula - a partir da formação de um vacúolo fagocítico por onde se estabelecem no citoplasma - exceto as hemácias, os neutrófilos e os eosinófilos. Depois de sofrerem vários ciclos de diferenciação binária, eles se transformam na forma amastigota que, posteriormente, passa a se dividir por fissão binária (estágio proliferativo da doença).

Após alguns dias, os amastigotas sofrem um processo de alongamento e se diferenciam em tripomastigotas que, após a ruptura da membrana celular, liberam os parasitos para o meio extracelular e a corrente sanguínea. Estes, por sua vez, invadem novas células e entram na corrente sanguínea do hospedeiro e podem ser ingeridos por um inseto triatomíneo, quando recomeça o ciclo.

No Brasil, além do homem, os animais domésticos e alguns animais silvestres, principalmente os marsupiais e certos tipos de roedores, são também considerados reservatórios de grande importância epidemiológica.

A Figura 3 representa de maneira ilustrativa e resumida o ciclo de vida do parasito.

Figura 3 - Ciclo de vida do *T. cruzi* (adaptado do site <http://www.uta.edu/chagas>).

I.4 - Fases e sintomas da doença de Chagas

Segundo o Consenso Brasileiro em Doença de Chagas [Consenso..., 2005], publicado pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, o ser humano ao ser contaminado pelo protozoário *T. cruzi* desenvolverá três estágios diferentes da doença: aguda, indeterminada e crônica.

A fase aguda inicia-se uma semana após a picada do inseto contaminado e está intimamente relacionada com a disseminação do protozoário no organismo.

Os pacientes podem apresentar um nódulo doloroso e avermelhado no local da picada do inseto ou um inchaço nas pálpebras. Se o protozoário entrar pela mucosa ocular, apresentar-se-á inchaço ocular conhecido como sinal de Romaña. Independentemente do mecanismo de transmissão, seja ele vetorial (mais comum), por transfusão, via oral, congênita ou acidental, os pacientes devem ser tratados. Estima-se que 60% dos pacientes adultos tratados neste estágio se curam, em crianças, o quadro pode se agravar e levar à morte.

Freqüentemente, nesta fase, não há qualquer manifestação clínica da doença (como febre, poliadenite e mal-estar), o que contribui para que esta doença possa passar despercebida. Ainda assim, quando há sintomas, eles desaparecem de 4 a 8 semanas após a contaminação, mesmo sem tratamento.

Os critérios laboratoriais de definição da doença de Chagas na fase aguda são os exames parasitológicos e sorológicos. No primeiro caso, verifica-se a existência de *T. cruzi* circulantes no exame de sangue periférico. O exame visual com microscópio (ampliação de 400 vezes) é o procedimento mais simples e barato. No exame sorológico verifica-se a presença de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgM no sangue periférico - o que é considerado indicativo da fase aguda, particularmente, quando o resultado positivo pode ser associado a alterações clínicas e epidemiológicas sugestivas.

De 8 a 10 semanas após a infecção, inicia-se uma fase assintomática da doença, denominada fase indeterminada, que pode durar anos. Esta fase ocorre em 60-70% dos pacientes - muitos deles não desenvolverão a fase crônica.

A última fase da doença, relacionada à reprodução sistêmica do *T. cruzi*, é conhecida como fase crônica, na qual existem poucos parasitos circulantes, ao contrário da fase aguda. Este estágio ocorre de 10 a 40 anos depois da infecção e é o mais preocupante nos dias atuais, em função da existência do grande número de infectados e do número significativo de mortes.

Estima-se que, no Brasil, 20-40% da população infectada apresenta a cardiopatia chagásica crônica - que acarreta sérios problemas cardíacos, incluindo o aumento do coração e lesões (fibroses), que levam a arritmias, palpitações, insuficiência cardíaca e morte súbita. Em 10% dos casos, associado à forma cardíaca da doença, ocorre a forma digestiva - que afeta principalmente o esôfago (megaesôfago) e o intestino grosso (megacólon) e causa sérios transtornos, como a dificuldade na deglutição e constipação crônica, respectivamente.

Na fase crônica, o diagnóstico deverá ser realizado por sorologia para a verificação de anticorpos do tipo IgG, a partir de dois testes sorológicos de princípios distintos, existem técnicas como: o teste imunoenzimático Elisa, imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação indireta (HAI) e reação em cadeia da polimerase

(PCR). Recomenda-se utilizar dois destes métodos e, se houver discordância, um terceiro método.

I.5 - Medicação disponível

Segundo a Organização Mundial de Saúde um medicamento ideal para o tratamento da doença de Chagas dever possuir as seguintes características:

- Ação parasitológica nas fases aguda e crônica;
- Ser efetivo em dose única ou em poucas doses;
- Ser acessível a todos os pacientes, ou seja, de baixo custo;
- Não ter efeitos colaterais ou teratogênicos;
- Não ser necessária a hospitalização no tratamento;
- Não causar resistência.

Infelizmente, um medicamento nestes padrões não está disponível no mercado. Desde o início da década de 70, dois medicamentos antichagásicos têm sido amplamente utilizados: o Nifurtimox e o Benzonidazol, comercializados com os nomes de Lampit® e Rochagan®, respectivamente [Coura; De Castro, 2002].

A estrutura destes compostos heterocíclicos pode ser visualizada na Figura 4. O Nifurtimox é fabricado pela Bayer e o Benzonidazol (ou Benznidazol) pela Roche Farmacêutica, cujos direitos e tecnologia de fabricação do Benzonidazol foram doados ao governo do Brasil em 2003.

Figura 4 - Estrutura molecular dos medicamentos disponíveis no mercado para o tratamento da doença de Chagas.

Estes dois fármacos, além de serem pouco específicos, são também muito tóxicos: apresentam grandes limitações devido aos efeitos colaterais e à necessidade de administração durante, pelo menos, 60 dias [Maya *et al.*, 2007].

O Nifurtimox (1,1-dióxido da tetraidro-3-metil4[(5-nitrofurfurilideno) amino]-2H-1,4-tiazina) gera um aumento na taxa de radicais livres intracelulares (ânions superóxidos e peróxido de hidrogênio) que atacam o parasito, tornando-o mais susceptível ao estresse oxidativo [Docampo *et al.*, 1981]. Alguns efeitos colaterais deste medicamento podem ser anorexia, perda de peso, vômitos, excitabilidade ou sono excessivo, problemas digestivos, cólicas intestinais e diarreia.

A ação do Benzonidazol (N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida) está diretamente relacionada à diminuição da síntese de proteínas, redução da incorporação dos precursores de RNA e da timidina no DNA. Algumas das reações adversas decorrentes do uso deste medicamento são: febre, dores musculares e nas articulações, hipersensibilidade e dermatite [Coura; De Castro, 2002].

O resultado clínico obtido com estes medicamentos varia de acordo com a fase da doença, o período, a dose prescrita, a idade e a origem dos pacientes. Estudos comprovam que estes medicamentos apresentam eficiência na fase aguda com 80% de cura (pacientes de pouca idade e crônicos recentes). Entretanto, na fase crônica, são poucos eficazes, com resultados em apenas 8% dos casos (crônicos antigos) [De Castro, 1993; Coura; De Castro, 2002].

Atualmente, no Brasil, Argentina, Chile e Uruguai, somente o Benzonidazol é comercializado.

O critério utilizado para verificar a cura é o resultado negativo permanente da sorologia convencional, detectado entre um e três anos (nos casos agudos), três e cinco anos (crônicos recentes) e 15 e 20 anos (crônicos antigos) após o tratamento.

No Brasil e em outros países do Cone Sul, o controle químico contínuo dos vetores por parte da vigilância epidemiológica desde a década de 1970, o maior controle nos bancos de sangue, o esvaziamento demográfico e a modernização das zonas rurais estão contribuindo para que as taxas de novos casos de infecção diminuam de maneira efetiva e, conseqüentemente, as taxas de casos agudos tenham incidência menos expressiva nos últimos anos [Dias; Silveira; Schofield, 2002]. No entanto, não há ainda uma indicação de tratamento eficaz para os casos de pessoas portadoras da doença de Chagas em estágios mais avançados, que constituem o grande número de casos registrados recentemente.

1.6 - Um alvo molecular específico contra o *T. cruzi*

Para a prevenção de possíveis lesões cardíacas e digestivas causadas pela presença do *T. cruzi*, se faz necessária sua eliminação total nos portadores da doença de Chagas, uma vez que os dois medicamentos atualmente disponíveis, além de muito tóxicos, são pouco eficazes na fase crônica da doença.

Para isto, a procura de um tratamento que elimine o parasita do hospedeiro humano tem, como base, o estudo da fisiologia e bioquímica do *T. cruzi*, na tentativa de identificar alvos terapêuticos promissores [Atwood *et al.*, 2005].

Neste contexto, algumas proteínas têm sido caracterizadas e identificadas como alvos bioquímicos de interesse [Coura; De Castro, 2002; Urbina; Docampo, 2003; Krauth-Siegel; Shirmer; Bauer, 2005; Kubata *et al.*, 2002; Castilho *et al.*, 2003].

As pesquisas de Fairlamb *et al.* [1985, 2001], identificaram um alvo molecular de grande interesse para um possível combate à doença, baseado no metabolismo redox específico existente nos protozoários, o que os difere de todos os outros eucariontes e procariontes.

1.7 - Tripanotiona Redutase

A proteína de número EC 1.8.1.1, denominada Tripanotiona Redutase (TR), é uma flavoproteína dissulfeto redutase dependente de NADPH, encontrada somente em parasitas protozoários da ordem *Kinetoplastidae* e família *Trypanosomatidae*. Está presente nos organismos *T. cruzi*, *Crithidia fasciculata*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma congolense* e *Leishmania donovani*. Nestes parasitas, o seu sistema de oxi-redução - envolvendo tripanotiona/tripanotiona redutase - substitui os sistemas glutatona/glutatona redutase e tioredoxina/tioredoxina redutase presentes na grande maioria dos organismos vivos [Fairlamb; Cerami, 1992; Müller *et al.*, 2003].

A função da TR é catalisar a redução do seu substrato tripanotiona dentro do citoplasma celular, uma vez que o acúmulo de dissulfetos afeta o equilíbrio tiólico-redox e, conseqüentemente, a atividade metabólica do parasito.

A principal forma do substrato encontrada nos tripanossomos é a ditiol ($T[SH]_2$). Estima-se que 99% da tripanotiona esteja na forma reduzida dentro da célula e, uma vez consumida nas reações metabólicas redox, converte-se na forma dissulfeto (TS_2) [Fairlamb, 2001]. Esta, por sua vez, é rapidamente recuperada para a forma ditiol pela ação catalítica da TR, como mostra a Figura 5.

Figura 5 - A TR catalisa a redução dependente de NADPH da forma tripanotiona dissulfeto (TS_2) para a sua forma ditiol $T(SH)_2$ [Müller et al., 2003].

Estudos realizados com a TR mostram que, quando esta proteína é inibida, a forma dissulfeto começa a acumular-se em decorrência do processo de oxidação contínuo da própria célula. Porém, não se sabe ainda em qual proporção $T[S]_2 / T[SH]_2$ inibe o crescimento ou mata a célula, mas grandes mudanças nos níveis de tióis foram observadas quando os níveis de TR diminuíram em torno de 90% [Fairlamb, 2001].

I.7.1 - Análise do sítio de ligação da tripanotiona na TR

A TR é um homodímero e possui dois sítios ativos idênticos no qual o substrato se liga. Este sítio é formado pelos resíduos pertencentes ao domínio FAD e alguns resíduos da interface pertencentes a outra subunidade da TR. Esta cavidade tem aproximadamente 20 Å de comprimento e 15 Å de largura e profundidade; é uma região ordenada da proteína formada principalmente por hélices, composta pela sequência de aminoácidos 14-21 (hélice α_1), 52-58 (hélices α_2 e α_3), 106-114 (hélice α_4) e 335-339 (volta) pertencentes a um monômero e 396-399' (folha β_3) e 460-470' (hélice 3_{10}) a outro monômero. O símbolo “'” será sempre utilizado para representar os aminoácidos que pertencem ao outro monômero.

A presença de resíduos ácidos como Glu18, Glu466', e Glu46 fazem com que a carga total dentro deste sítio seja negativa e compense as cargas positivas existentes no substrato [Zhang *et al.*, 1996].

Os resíduos que estão diretamente envolvidos na catálise são as cisteínas Cys53 e Cys58 e a histidina His461', que está no fundo desta cavidade, próxima ao anel isoaloxazina do FAD [Jacoby *et al.*, 1996; Bailey *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1996].

A tripanotona oxidada ($T[S]_2$) se liga de maneira assimétrica no sítio ativo, como mostra a Figura 6a. Uma parte da estrutura do substrato δ Glu-Cys-Gly-I fica próxima da ligação dissulfeto e da His461'; a região espermidina do substrato adota uma geometria em forma de U e a região Gly-Cys- δ Glu-II adota uma conformação estendida. Ao todo, vinte e cinco aminoácidos estão envolvidos na ligação do substrato ao sítio, seja por meio de ligações de hidrogênio seja por interações de van der Waals [Bond *et al.*, 1999].

A Figura 6b mostra a estrutura molecular da tripanotona, ressaltando a região espermidina da molécula - por ser a região que diferencia a tripanotona da glutanotona.

Figura 6 – a: Modo de ligação da tripanotona na forma $T[S]_2$ com a TR;
b: Molécula tripanotona [Bond *et al.*, 1999].

Na Figura 6a, observa-se o modo de ligação do substrato; a parte espermidina se liga a uma parede hidrofóbica, representada pela superfície de van der Waals.

Na Figura 6b, o substrato é formado por uma sequência de aminoácidos δ Glu-Cys-Gly com os sufixos I e II para identificar os componentes separadamente;

entre eles está a parte espermidina do substrato que irá se ligar na região em destaque da Figura 6a.

A catálise envolve a transferência de elétrons do NADPH para o anel da flavina. O FAD, já reduzido, transfere rapidamente os elétrons para a ligação dissulfeto Cys53-Cys58 que se desfaz. Depois, forma-se um complexo entre a enzima reduzida e a tripanotiona oxidada, segundo a Figura 7. Em seguida, a Cys53 inicia uma transferência de elétrons com T[S]₂, formando a primeira molécula de tripanotiona. Então, o grupo tiol da Cys58 ataca a ponte dissulfeto do complexo formado, liberando a molécula de tripanotiona, e a TR retorna à forma oxidada através da ligação dissulfeto redox-ativa [Fairlamb; Cerami, 1992; Fairlamb, 2001].

Figura 7 - Esquema representativo da ação catalítica da TR frente ao seu substrato.

A tripanotiona tem uma função biológica similar à da glutatona, que inclui a manutenção do meio intracelular reduzido e a função antioxidante, participando da remoção de peróxidos e espécies oxigenadas reativas formadas pelo processo metabólico e do estresse oxidativo decorrente da resposta imunológica do hospedeiro; desta forma, é fundamental para a sobrevivência dos parasitos [Fairlamb; Cerami, 1992].

Diferentes classes de compostos são inibidores da TR. Porém, são – em maioria – inibidores competitivos e possuem a desvantagem de se ligarem de modo reversível à enzima, além de terem o seu efeito inibidor revertido com o acúmulo da tripanotiona dissulfeto no meio intracelular [Krauth-Siegel; Inhoff, 2003]. Como exemplo desta classe tem-se a mepacrina [Jacoby *et al.*, 1996].

Outra classe de inibidores, denominados subversivos, é capaz de induzir a atividade oxidativa na enzima (oxidação do NADPH na ausência do substrato dissulfeto). Como exemplo, existem os derivados dos nitrofuranos e naftoquinonas. Em presença de oxigênio, a redução (de um elétron) destes compostos faz com que

eles sejam ciclicamente reduzidos e reoxidados, gerando espécies reativas de oxigênio, afetando também a capacidade da TR de inibir a redução fisiológica do substrato [Cenas *et al.*, 1994]. O aumento do estresse oxidativo intracelular é um meio interessante para o desenvolvimento de medicamentos antiparasitários e antitumorais.

Existem também, inibidores irreversíveis que podem se ligar de modo covalente à proteína. Como exemplo, podemos citar um composto extraído do alho - conhecido como ajoene - que se liga à TR, modificando a Cys58; mas este composto é também capaz de inibir a glutathiona redutase, uma enzima homóloga à TR [Gallwitz *et al.*, 1999].

I.8 - Glutathiona Redutase

A Glutathiona Redutase (GR) é uma flavoproteína encontrada no organismo humano. Por ser homóloga a TR, apresenta similaridades tanto em sua estrutura secundária quanto em seu mecanismo cinético.

Esta proteína (catalogada como EC 1.8.1.7) é uma dissulfeto redutase dependente de NADPH, que catalisa a conversão da glutathiona oxidada (GSSG) para a forma reduzida (GSH) na presença dos cofatores NADPH e FAD [Voet; Voet, 1995]. Este processo, normalmente, produz uma razão de GSH:GSSG de 100:1 - o que permite a atuação da GSH como agente redutor intracelular.

Resumidamente, pode-se dizer que a função catalítica da GR acontece em duas fases. Na primeira, se dá a formação de um complexo entre a proteína - em seu estado oxidado - com o cofator NADPH e, posteriormente, a formação de um complexo entre a proteína já reduzida e a glutathiona na forma oxidada, reduzindo a glutathiona para a forma tiol (GSH).

O resultado da ação enzimática da GR sobre a GSSG converte-a em duas moléculas de tiol - como mostra a Figura 8 - enquanto que a tripanotiona (na forma dissulfeto e, sob ação da TR) é convertida em apenas uma molécula ditiol, T[SH]₂, como mostrado na Figura 5.

Figura 8 - A GR catalisa a redução NADPH-dependente da glutathione dissulfeto (GSSG) formando duas moléculas de GSH.

A forma reduzida da glutathione contribui para a diminuição dos níveis de peróxido de hidrogênio e outras espécies de oxigênio reativas, formadas espontaneamente nos processos oxidativos infecciosos ou após a ingestão de drogas.

I.8.1 - Análise no sítio ativo da GR

Assim como na TR, na GR existem dois sítios ativos idênticos no qual o substrato se liga. O anel isoaloxazina do grupo prostético FAD está localizado na parte interna do sítio e o separa em duas partes: uma na qual o NADPH se liga e outra onde se liga o substrato na forma reduzida.

Durante a catálise, o grupo fenol do resíduo da Tyr197 - que bloqueia o acesso do solvente ao anel flavina - se desloca e torna a região livre para a transferência de carga que ocorre do NADPH para a flavina e dessa para a ligação dissulfeto da GR, que fará a transferência para a glutathione oxidada [Bauer *et al.*, 2006; Pai; Shultz, 1983].

Como pode ser visto na Figura 9, a catálise envolve a transferência de carga do NADPH para a flavina que adquire a forma NADP^+ , e a cadeia lateral da tirosina volta a bloquear o anel flavina. O FAD reduzido transfere rapidamente os elétrons para a ligação dissulfeto Cys58-Cys63 que se desfaz.

Figura 9 - Estágios do ciclo catalítico da GR [Pai, Shultz, 1983].

Nesta figura, o número 1 representa a enzima oxidada (E); o 2, o complexo formado entre o NADP⁺ e a enzima reduzida (EH₂); o 3, é reação intermediária da enzima reduzida (EH₂) e o número 4, representa os passos da reação, entre a enzima reduzida e o substrato oxidado, seguida pela formação da ligação dissulfeto mista entre a glutatona I e a Cys-58 (linha pontilhada) e a subsequente liberação da glutatona II e da glutatona I. A flecha clara representa a transferência de elétron, a formação da ligação mista dissulfeto e a liberação da glutatona II. A flecha preta se refere à clivagem da ligação dissulfeto mista e à liberação da segunda molécula de glutatona.

A transferência de carga que reduz a enzima ocorre entre o íon tiolato Cys63 - que atua como doador - e a flavina - como receptor. Depois da liberação do NADP⁺, forma-se um complexo entre a enzima reduzida e a glutatona oxidada. Então, a Cys58 inicia uma transferência de elétrons com GSSG, formando a primeira molécula de glutatona. Logo, o grupo tiol Cys63 ataca a ponte dissulfeto do complexo formado, liberando a segunda molécula de glutatona, que retorna à forma oxidada através da ligação dissulfeto redox-ativa [Bauer *et al.*, 2006; Pai; Schluz, 1983].

O resíduo His467' participa diretamente da transferência dos prótons para formar duas moléculas de glutatona na forma reduzida. A orientação do anel

imidazol da histidina é estabilizada pela ligação de hidrogênio formada com o grupo carbonila da Glu472'.

O sítio de ligação da glutathione oxidada envolve a sequência de aminoácidos 30-37 (hélice $\alpha 1$), 59-64 (hélice $\alpha 2$ e $\alpha 3$), 110-117 (hélice $\alpha 4$) e 339-347 (hélice $\alpha 8$) de uma unidade, além do resíduo 406' e da sequência 467'-476' (volta e hélice 3_{10}) pertencentes ao outro monômero. A região da glutathione δ Glu-Cys-Gly-I se liga numa conformação em V, enquanto que a δ Glu-Cys-Gly-II fica estendida, de maneira similar à tripanotiona [Karplus; Pai; Schulz, 1989].

Na GR humana há dezenove aminoácidos envolvidos na ligação da GSSG; desses, quatorze são idênticos ou homólogos aos encontrados na TR. Os resíduos conservados incluem o maquinário catalítico e, como era de se esperar, os que estão envolvidos na ligação das regiões γ -glutamylcisteínas (δ Glu-Cys-Gly-I e δ Glu-Cys-Gly-II) do substrato.

Na GR, a existência dos aminoácidos Ala34, Arg37, Ile113, Asn117, Arg38 e Arg347 contribui para uma mudança nas características do sítio, tornando-o mais estreito e positivamente carregado. A diferença mais significativa se dá em relação à arginina Arg347, que interage diretamente com a parte γ -GluI do substrato. Na TR, esse resíduo não está presente nesta região positiva do sítio, ele é substituído pela Ala343 e resulta na perda desta interação eletrostática, proporcionando também uma maior liberdade a esta mesma região γ -Glu existente na tripanotiona [Bond *et al.*, 1999].

Na TR, estes aminoácidos são substituídos por Glu18, Trp21, Ser109, Met113 e Ala343 e Asn22. Neste caso, o resíduo Asn22 participa de maneira indireta, estabilizando a conformação da Glu18 que aceita a ligação de hidrogênio da amina do substrato. O Trp21 bloqueia parte do sítio e, juntamente com a Met113, forma uma parede hidrofóbica na qual a espermidina irá interagir; o grupo carbonil da Ser109 aceita uma ligação de hidrogênio da espermidina [Bailey *et al.*, 1993].

As substituições, discutidas acima, na sequência de aminoácidos contribuem para alterar o tamanho e as interações do sítio de ligação dos substratos. Estas modificações são suficientes para a GR ligar, de maneira eficiente, a glutathione e repelir a tripanotiona. E, de maneira análoga, uma molécula tripanotiona se ligará facilmente no sítio ativo da TR, mas este sítio é capaz de rejeitar a glutathione por meio

de uma repulsão de cargas e efeitos hidrofóbicos [Bond *et al.*, 1999]. Em outras palavras, estas duas proteínas possuem grande habilidade em discriminar seus substratos cognatos, glutatona e tripanotona.

Assim, como era de se esperar, o sítio de ligação da tripanotona na TR é maior que o da glutatona na GR e contém uma cavidade hidrofóbica para o reconhecimento da porção espermidina da tripanotona e de uma cadeia lateral carregada negativamente – glutamato - que repele de maneira eficiente a glutatona do sítio ativo. De maneira oposta, a GR tem um sítio menor e uma região carregada positivamente, capaz de acomodar perfeitamente a carga negativa da glutatona, característica que expulsa a tripanotona do seu sítio ativo. Porém, a base molecular para a notável discriminação dos seus substratos envolve também tamanho, carga e hidrofobicidade dos seus sítios ativos, refletindo nas propriedades físico-químicas de seus substratos [Faerman, 1996; Fairlamb; Cerami, 1992].

Um estudo publicado recentemente mostrou que derivados naftoquinônicos podem inativar de maneira irreversível a GR. A estrutura cristalográfica desta proteína complexada a um derivado da menadiona mostrou que este composto é capaz de se ligar covalentemente à Cys58 e interagir de maneira não covalente com os aminoácidos Arg37, Arg347, Tyr114 e His467', inativando-a [Bauer *et al.*, 2006].

I.9 - Outros possíveis sítios de interação existentes na TR e na GR

A análise da estrutura cristalográfica destas proteínas mostrou que existem outras regiões, além do sítio ativo, onde há a possibilidade de ligação de um composto que seja capaz de inibir a enzima.

Uma destas regiões é onde atua a coenzima NADPH, que participa diretamente do processo catalítico. Este sítio é, no entanto, pouco específico; ou seja, as diferenças existentes nesta região da TR e da GR não são significativas, o que torna este sítio alvo de pouco interesse para o estudo de novos compostos capazes de inibir apenas a atividade catalítica da TR frente à GR.

Há, no entanto, uma região que possui características distintas conhecida como sítio da interface. Este sítio é uma cavidade, gerada sob um eixo de ordem dois,

entre os dois monômeros. A união entre os monômeros na TR é feita através de interações intermoleculares do tipo van der Waals e, na GR, por uma ligação dissulfeto entre eles.

A comparação estrutural entre a TR e a GR mostra que elas apresentam um sítio de interface com uma dimensão similar, embora tenham um formato muito diferente. O sítio da TR é quase globular enquanto que na GR ele assume um formato de cruz [Salmon-Chemin *et al.*, 2001].

Esta cavidade da TR é composta por 32 aminoácidos de cada monômero. Embora sua interface seja estruturalmente parecida com a interface da GR, elas possuem 35% de identidade na sequência dos aminoácidos. Na GR esta região é formada por 41 aminoácidos de cada monômero.

Levando em consideração os resíduos que podem estar diretamente envolvidos na ligação de moléculas no sítio, verifica-se que Thr66, Gln69, Tyr70, Gln242, Ile369, Met400, Lys409, Phe411, Asp432, e Pro435 são conservados nas diferentes TRs (encontrados também na *Crithidia fasciculata*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma congolense* e *Leishmania donovani*) e não na GR humana. Destes, os resíduos Gln69, Met400 e Asp432 estão localizados em regiões de fácil acesso dentro do sítio e possuem um alto fator de vibração térmica na estrutura da TR sem ligantes, sugerindo certa flexibilidade [Salmon-Chemin *et al.*, 2001].

Interessante que, na estrutura da GR determinada com o inibidor não competitivo xantona, nenhum dos resíduos envolvidos na ligação deste composto (Trp70, Asn71, Val74, His75, Phe78, Met79, His82 e Tyr407) é conservado nas 5 sequências da TR [Savvides; Karplus, 1996; Salmon-Chemin *et al.*, 2001]. Estas diferenças tornam este sítio um alvo interessante para o desenvolvimento de novos compostos que possam interagir nesta região.

Outra informação importante é que, nas duas enzimas, o sítio da interface está conectado aos dois sítios ativos por um pequeno canal primário que começa próximo ao sítio de ligação do substrato, mas não há conexão direta com o sítio do NADPH. Este canal que se abre para o sítio catalítico está próximo à ponte dissulfeto redox-ativa. Na TR ele está delimitado pelos resíduos hidrofóbicos Phe396, Pro398, Leu399, Pro462, Thr463 e Val59'. Na GR ocorre uma única substituição da Leu399 pela Met406 [Salmon-Chemin *et al.*, 2001].

Na GR há também dois canais secundários que promovem o acesso direto à superfície da proteína, o que ajuda a explicar um número maior de resíduos nesta cavidade em relação à TR (41/monômero na GR versus 32/monômero na TR). Estes canais secundários permitem acesso direto à superfície da proteína numa região distinta do sítio catalítico [Salmon-Chemin *et al.*, 2001].

Enquanto não há estrutura de complexos da TR com inibidores não-competitivos ou subversivos, existem algumas estruturas da GR com estes tipos de ligantes descritos na literatura [Karplus; Pai; Shulz, 1989; Savvides; Karplus, 1996]. Estas estruturas revelam que a ligação do inibidor nesta larga cavidade, presente na interface do dímero, é realmente distinta do sítio de ligação do GSSG. A ligação dos compostos neste sítio causa a inibição da redução fisiológica da GSSG, mas nenhum destes compostos é reduzido pela GR. E ainda, os compostos podem se ligar em mais de um sítio, como é o caso da menadiona, que se liga numa região diferente do sítio catalítico e do NADPH [Karplus; Pai; Shulz, 1989].

I.10 - O desenvolvimento de novos fármacos contra a doença de Chagas

Embora alguns compostos estejam em fase de estudos, como por exemplo, cetoconazol, o fluconazol, o itroconazol e o alopurimol, ainda não é possível fazer uma previsão de quando novos medicamentos antichagásicos chegarão ao mercado; assim, é imprescindível o estudo de novas drogas específicas contra o *T. cruzi* [Coura; De Castro, 2002; Maya *et al.*, 2007].

A ação citotóxica dos compostos naftoquinônicos, aliada ao conhecimento sobre a sensibilidade dos tripanossomas em relação ao estresse oxidativo estão sendo testados no *T. cruzi*, cujo modelo experimental tem sido muito utilizado até o momento [Boveris *et al.*, 1978; Silva; Ferreira; Souza, 2003]. Estes estudos exploram a capacidade daqueles compostos induzirem o estresse oxidativo [Cenas *et al.*, 1994].

A quantidade de dados publicados na literatura comprova que o uso de naftoquinonas como potencial biológico é promissor contra a doença de Chagas [De Moura *et al.*, 2004; Goulart *et al.*, 1997; Menna-Barreto *et al.*, 2005, 2007; Rivarola; Paglini-Oliva, 2002].

Após o trabalho inicial de Henderson *et al.* (1988), as naftoquinonas têm sido testadas em relação à TR. Dentre as inúmeras naftoquinonas reportadas por sua atividade antiparasitária, algumas são conhecidas por exercerem a função de substrato subversivo da TR em presença de oxigênio, e são capazes de promover a reação não fisiológica, o que ocasiona a produção de ânions superóxidos que inibem, também, a redução fisiológica do dissulfeto [Salmon-Chemin *et al.*, 2000, 2001; Blumenstiel *et al.*, 1999; Jockers-Scherübl; Schirmer; Krauth-Siegel, 1989].

I.11 - As naftoquinonas

São considerados quinonas os compostos cujo esqueleto molecular seja formado por um sistema de anéis α,β -bisdienônico, o que lhes confere a capacidade de reagir de modo reversível em processos de oxi-redução, uma característica de fundamental importância em muitos processos biológicos. [Malta, 2000].

As quinonas, presentes em abundância na flora brasileira, possuem um grande potencial biológico graças a suas propriedades microbicidas, tripanossomicidas, antimalária, antitumorais e o desencadeamento da apoptose celular (suicídio celular) [Pinto; Menna-Barreto; De Castro, 2006; Morello *et al.*, 1995; Verma, 2006; Andrade-Netto *et al.*, 2004; Machado; Ayala, 2002]. Dentro desta ampla família, encontram-se as benzoquinonas, antraquinonas e as naftoquinonas. Um maior destaque é dado às naftoquinonas, que têm sido estudadas e testadas contra diversas doenças nestas últimas décadas.

As naftoquinonas são isoladas do cerne de árvores pertencentes à família Bignoniaceae e Verbanaceae, abundantes nas florestas tropicais. No Brasil, existem 46 tipos destas árvores, popularmente conhecidas como ipês (*Tabebuia* sp.) [Pinto; Menna-Barreto; De Castro, 2006].

Os compostos são caracterizados pela presença de anel quinonoídico sustentado por um anel naftalênico. Podem, por sua vez, apresentar isomerias 1,2 ou orto-quinonoídica (quando as carbonilas são vizinhas) ou 1,4 ou para-quinonoídica (quando as carbonilas estão separadas por dois carbonos). Como exemplo pode-se citar a orto-naftoquinona, conhecida como β -lapachona e seu isômero para-naftoquinona, denominado α -lapachona.

No organismo, sob ação enzimática, um substrato quinonoídico pode se reduzir com um elétron, formando um ânion semiquinona ($Q\bullet^-$) que, por sua vez, reduz o oxigênio molecular ao ânion-radical superóxido ($\bullet O_2^-$) e este, na presença da enzima superóxido dismutase (SOD), é transformado em H_2O_2 . O radical $\bullet O_2^-$, por catálise com metais de transição ou por reação com H_2O_2 , pode gerar o radical hidroxila ($HO\bullet$) no interior da célula [Silva *et al.*, 2003].

O ciclo redox das naftoquinonas, na presença de agentes redutores, gera espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo o ânion-radical superóxido e o peróxido de hidrogênio, principais espécies responsáveis pelo estresse oxidativo celular, cujo efeito pode danificar alguns componentes celulares - como as membranas, através da peroxidação dos lipídios - e promover a diminuição da capacidade antioxidante celular. Para eliminar ou controlar o estresse oxidativo causado pelos ROS, as células desencadeiam um mecanismo de detoxicação através de agentes antioxidantes - como a vitamina C e as enzimas superóxido dismutase (SOD) e a glutathione redutase (GR), por exemplo [Witte; Stoppani; Dubin, 2004].

O potencial biológico dos principais compostos naftoquinônicos contra a doença de Chagas, já foi testado [Pinto; Menna-Barreto; De Castro, 2003]. Na Figura 10, o valor entre parênteses corresponde ao valor de $IC_{50}/24h$ em $\mu mol.L^{-1}$ destes compostos.

Figura 10 - Naftoquinonas testadas no *T. cruzi* sob a forma tripomastigota. [Pinto; Menna-Barreto; De Castro, 2003].

Estas naftoquinonas apresentaram atividade biológica frente ao parasito. E, com o intuito de melhorar a atividade antiparasitária e diminuir os eventuais efeitos colaterais para o indivíduo, novos derivados semi-sintéticos (imidazol, oxazol, fenoxazina, indol, dipirano e ciclopentano) estão sendo sintetizados e testados [De Moura *et al.*, 2001, 2004].

Dentre as naftoquinonas, a série de compostos naftoimidazólicos tem-se mostrado altamente ativa nos ensaios biológicos contra o *T. Cruzi*. Estes compostos apresentam atividade antichagásica superior à das naftoquinonas e ao cristal de violeta. [De Moura *et al.*, 2001, 2004].

O cristal de violeta ou violeta de genciana (cloreto de hexametilpararosanilina) é a substância empregada como quimioprofilaxia nos bancos de sangue. A concentração necessária para a inibição de 50% do *T. cruzi* para este composto é de $IC_{50}/24\text{ h} = 536.0 \pm 1.0\text{ }\mu\text{M}$. Porém, a utilização do cristal de violeta para a eliminação do parasito deixa o sangue com uma coloração púrpura, além de necessitar de algum tempo de exposição a esta substância [Docampo, 1990].

Estudos recentes mostraram que os derivados naftoimidazólicos são altamente tóxicos para todas as formas do parasito, sobretudo a forma amastigota - forma proliferativa da doença que ocorre no ser humano [Menna-Barreto *et al.*, 2005; 2007].

II - DETERMINAÇÃO DAS ESTRUTURAS POR DIFRAÇÃO DE RAIO X

O primeiro passo para se obter um modelo estrutural de um composto por difração de raio X é a seleção da amostra. Com o auxílio de um microscópio de luz polarizada escolhe-se um monocristal de dimensões adequadas para ser colado em uma fibra de vidro que será fixada na cabeça goniométrica do difratômetro.

Neste estudo, para a coleta de dados das intensidades dos feixes difratados, utilizou-se o difratômetro CAD4, da Enraf Nonius, instalado no laboratório de Cristalografia do Instituto de Química de São Carlos - USP.

Após a centragem dos vetores de difração, são determinados os parâmetros de cela unitária e o grupo de Laue, efetuando-se, a seguir, a coleta das intensidades dos feixes difratados. As intensidades foram medidas no modo de varredura $\omega-2\theta$, utilizando-se a radiação $K\alpha(\text{Mo})$, com $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$, monocromatizada por um cristal de grafite.

Após a coleta das reflexões, os parâmetros da cela unitária são refinados aos melhores valores, utilizando-se as reflexões fortes medidas a altos valores de θ .

Como rotina de laboratório para a correção por absorção devida à forma do cristal, o grupo de Cristalografia utiliza o método PSISCAN [North; Phillips; Mathews, 1968]. Esta rotina efetua a medida de intensidade de algumas reflexões, medidas com variação ϕ de 0 a 360° em intervalos de 10° , e as registra em um arquivo especial.

A próxima etapa é a redução dos dados a módulos de fatores de estrutura com seus respectivos desvios padrão, aplicando as correções pelos fatores de Lorentz, polarização e absorção.

Todas as estruturas deste trabalho foram resolvidas e refinadas dentro do sistema de programas WinGX [Farrugia, 1999]. A solução foi feita pelos Métodos Diretos, por meio do programa SIR92 [Altomare *et al.*; 1993].

O processo de refinamento foi acompanhado pela verificação da geometria e pela coerência química do modelo, através de cálculos de parâmetros geométricos utilizando-se o sistema PLATON [Spek, 1998].

O refinamento foi feito pelo método de mínimos quadrados com matriz completa, através do sistema SHELXL97 [Sheldrick, 1998].

Uma vez obtido o modelo do composto em questão, realiza-se o posicionamento dos átomos de hidrogênio, baseados na geometria dos átomos a que eles se ligam. As posições destes átomos de hidrogênio não são refinadas, mas sim, recalculadas a cada etapa do refinamento.

Os ciclos de refinamento foram feitos até a convergência dos parâmetros refinados. O índice de verificação da adequação do sistema de pesos utilizado no refinamento foi o goodness of fit (GOF), ou S (desvio sobre uma observação).

A representação gráfica das moléculas foi feita pelo programa ORTEP3 [Farrugia, 1997], usando elipsóides com 50% de probabilidade. A análise das interações foi realizada com o auxílio do programa Platon [Spek, 1998].

Depois de concluída a análise das estruturas, buscou-se compostos semelhantes, na literatura e no banco de dados de Cambridge [Allen, 2002], visando comparações estruturais.

Neste capítulo, estão descritos os procedimentos utilizados e os resultados obtidos na determinação da estrutura cristalina e molecular dos compostos fornecidos pelo Prof. Dr. Ventura, identificados como 3,4-diidro-[2,2-dimetil]-2H-nafto[1,2-b]pirano-5,6-diona (β -lapachona) e dimetil-1,4-naftoquinona (naftoq-01).

II.1 – Redeterminação da estrutura cristalina e molecular da β -lapachona

Esta estrutura foi inicialmente determinada por Pereira [1989] em seu trabalho de doutorado. Porém, como os dados não tinham a acuracidade necessária, o composto foi submetido à recristalização e sua estrutura determinada novamente.

Os dados coletados foram obtidos de um monocristal amarelo montado no difratômetro CAD4, da Enraf Nonius, à baixa temperatura de 263° K. A matriz de orientação e os parâmetros da cela unitária foram determinados pelo método de mínimos quadrados, a partir da medida da intensidade de 25 reflexões.

As medidas das intensidades das reflexões foram feitas no modo zig-zag, com varredura do tipo $\omega - 2\theta$, com intervalos de θ variando entre 3° a 30°. Durante a coleta não se verificou alteração significativa na intensidade das reflexões padrão, e o coeficiente de absorção foi muito pequeno ($\mu = 0,092$) - por isso, não se fez necessária a correção por absorção.

O intervalo de medida da coleta de dados foi de $-9 \leq h \leq 2$; $-18 \leq k \leq 3$; $-2 \leq l \leq 37$. Das 3813 reflexões medidas, 3469 foram consideradas independentes [$R_{int} = 0,025$] e, 1471 observadas [$I \geq 2\sigma(I)$]. Após a correção pelos fatores de Lorentz, polarização e decaimento, os dados de intensidade foram transformados em módulos de fatores de estrutura.

O sistema cristalino encontrado foi o ortorrômbico e o grupo espacial Pcab. O resumo dos principais dados cristalográficos e de refinamento da determinação da estrutura cristalina e molecular deste composto está disponível na Tabela 1.

O primeiro modelo foi obtido através do programa SIR92 [Altomare *et al.*; 1993]. Este modelo foi completado a partir da localização das posições dos átomos remanescentes nos cálculos de Fourier diferença.

Com exceção dos átomos de hidrogênio, todos os outros tiveram seus fatores de vibração térmica transformados em anisotrópicos.

Os átomos de hidrogênio não foram refinados, e os seus fatores de vibração foram assumidos com iguais a 1,3 vezes o fator de vibração do átomo a ele ligado, posicionados conforme a geometria do mesmo e recalculados a cada estágio do refinamento.

Tabela 1 – Resumo dos dados cristalográficos da β -lapachona

Fórmula empírica	C ₁₅ H ₁₄ O ₃
Massa molecular	242,26
Temperatura	263(2) K
Sistema cristalino	Ortorrômbico
Grupo espacial	Pcab
a (Å)	6,9764(9)
b (Å)	12,858(3)
c (Å)	26,928(5)
Volume (Å ³)	2415,5(8)
Z (moléculas/cela unitária)	8
Densidade calculada (Mg.m ⁻³)	1,332
hkl min; max	-9:2; -18:3; -2:37
F(000)	1024
Reflexões coletadas; únicas; R _{int}	3813; 3469; 0,025
Reflexões observadas ($I \geq 2\sigma(I)$)	1471
Número de parâmetros refinados	165
R _{obs} ; R _{all} ; GOF	0,059; 0,1794; 0,98
Densidade residual (e/Å ³) máx; mín	0,21; -0,23

Durante toda a etapa de refinamento, os índices de discordância foram verificados, e os valores finais obtidos foram: $R_{\text{obs}} = 0,059$, $R_{\text{all}} = 0,1794$ e $\text{GOF} = 0,98$, com 165 parâmetros refinados para 1471 reflexões observadas. O mapa de Fourier diferença mostrou, ao final do refinamento, densidade eletrônica máxima e mínima de 0,21 e -0,23 e/Å³.

Na Figura 11, está representada a estrutura da β -lapachona com todos os átomos já identificados, exceto os de hidrogênio. Os elipsóides foram desenhados com 50% de probabilidade.

Figura 11 - Representação ORTEP da β -lapachona.

A Tabela 2 mostra as distâncias interatômicas e, na Tabela 3, estão colocados todos os ângulos interatômicos, exceto os que incluem os átomos de hidrogênio, com os respectivos desvios padrão, entre parênteses, para este composto.

As distâncias interatômicas indicam que as ligações entre os átomos de carbono nos anéis são de caráter aromático, e as ligações O1-C1 e O2-C2 das carbonilas (posição orto) tem caráter de ligação dupla. As demais ligações apresentam valores compatíveis com os de comprimentos de ligação simples. As distâncias e ângulos encontrados entre os átomos C10-C9-C11 são normais para esta hibridização do C.

Tabela 2 - Distâncias interatômicas (Å) com os respectivos desvios padrão (Å), entre parênteses, para a β -lapachona

O1	C1	1,224(3)	C4	C15	1,390(3)
O2	C2	1,208(3)	C5	C6	1,359(3)
O3	C5	1,337(2)	C6	C7	1,495(3)
O3	C9	1,483(3)	C7	C8	1,518(3)
C1	C2	1,544(3)	C8	C9	1,504(3)
C1	C6	1,444(3)	C9	C10	1,522(3)
C2	C3	1,475(3)	C9	C11	1,506(3)
C3	C4	1,404(3)	C12	C13	1,377(3)
C3	C12	1,390(3)	C13	C14	1,368(4)
C4	C5	1,474(3)	C14	C15	1,391(3)

Tabela 3 - Ângulos interatômicos (°) com os respectivos desvios padrão (°) para a β -lapachona

C5	O3	C9	119,6(1)	C1	C6	C5	119,8(2)
O1	C1	C2	118,1(2)	C1	C6	C7	119,0(2)
O1	C1	C6	123,2(2)	C5	C6	C7	121,1(2)
C2	C1	C6	118,7(2)	C6	C7	C8	109,7(2)
O2	C2	C1	119,2(2)	C7	C8	C9	112,7(2)
O2	C2	C3	122,9(2)	O3	C9	C8	110,5(2)
C1	C2	C3	117,9(2)	O3	C9	C10	106,1(2)
C2	C3	C4	119,8(2)	O3	C9	C11	104,1(2)
C2	C3	C12	120,7(2)	C8	C9	C10	112,8(2)
C4	C3	C12	119,5(2)	C8	C9	C11	111,3(2)
C3	C4	C5	119,7(2)	C10	C9	C11	111,5(2)
C3	C4	C15	119,0(2)	C3	C12	C13	120,5(2)
C5	C4	C15	121,3(2)	C12	C13	C14	120,4(2)
O3	C5	C4	111,7(2)	C13	C14	C15	120,1(2)
O3	C5	C6	124,3(2)	C4	C15	C14	120,4(2)
C4	C5	C6	124,0(2)				

A Figura 12 mostra a projeção do empacotamento existente na cela unitária, numa visão normal ao eixo cristalográfico a.

Figura 12 - *Projeção do empacotamento na cela unitária da β -lapachona.*

As equações dos planos da estrutura da β -lapachona estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 – Equações dos planos de mínimos quadrados e a distância dos átomos aos planos, com os respectivos desvios padrão entre parênteses

Plano 1 : $6,952(1)x - 0,29(1)y + 2,15(2)z = 2,102(8)$

C1	-0,010(1)	C4	0,011(1)
C2	0,013(1)	C5	-0,008(1)
C3	-0,014(1)	C6	0,008(1)

Plano 2 : $6,956(1)x + 0,13(1)y + 2,05(2)z = 2,14(1)$

C3	0,010(1)	C13	-0,008(2)
C4	-0,009(1)	C14	0,009(2)
C12	-0,002(2)	C15	0,000(1)

Plano 3 : $6,929(2)x - 1,33(1)y - 1,41(2)z = 0,697(9)$

C5	-0,088(1)	C8	-0,310(2)
C6	0,016(1)	C9	0,233(2)
C7	0,179(2)	O3	-0,031(1)

Os anéis quinonoídico (1) e naftalênico (2) presentes na estrutura são planares, dentro do erro experimental, com desvio médio quadrático para o plano 1 de 0,011 Å e, para o plano 2, de 0,007 Å. O anel pirano (3) possui conformação tipo “meia cadeira”, na qual os átomos C7, C8 e C9 estão fora do plano formado pelos demais átomos do anel. O desvio médio quadrático para o plano 3 é de 0,18 Å. Os ângulos formados entre os planos 1 e 2, 1 e 3, 2 e 3 de 1,87(2), 8,90(3) e 9,84(3)°, respectivamente, mostram que este composto pode ser considerado basicamente planar.

As posições atômicas dos átomos de hidrogênio dentro da estrutura não favorecem a formação de ligações de hidrogênio intramoleculares - embora a distância entre os átomos de carbono e oxigênio seja próxima, o ângulo é desfavorável para que este tipo de interação ocorra. No entanto, foi verificada a presença de ligações de hidrogênio intermoleculares entre todas as moléculas adjacentes, formando uma rede supramolecular tridimensional. Estas ligações estão representadas na Figura 13 por uma linha tracejada.

Figura 13 - Representação ORTEP das ligações de hidrogênio encontradas na estrutura da β -lapachona.

Na Tabela 5, está o resumo de todas as interações existentes na estrutura cristalina da β -lapachona.

Tabela 5 – Interações de hidrogênio não convencionais existentes entre as moléculas

	dD...A (Å)	dH...A (Å)	D-H...A (°)	Operação de simetria
C7-H71...O1	3,580(3)	2,768	141,7	$x+1/2,-y+1/2,+z$
C8-H81...O1	3,386(3)	2,561	143,1	$x-1/2,-y+1/2,+z$
C8-H82...O1	3,569(3)	2,619	166,4	$x,+y-1/2,-z+1/2$
C10-H3...O2	3,377(3)	2,728	125,4	$x+1/2,-y+1/2,+z$
C14-H11...O2	3,565(3)	2,736	149,0	$-x+1/2,+y-1/2,-z+1$

Após a finalização da estrutura uma nova busca no banco de dados revelou que a estrutura havia sido publicada. A comparação entre os dados estruturais obtidos neste trabalho e os dados encontrados na literatura mostra compatibilidade entre eles. Além disso, os parâmetros geométricos moleculares e do cristal estão em perfeito acordo [Cunha-Filho *et al.*, 2006].

II.2 – Determinação da estrutura cristalina e molecular da 2,6-dimetil-1,4-naftoquinona (naftoq-01)

A metodologia utilizada para a determinação da estrutura cristalina e molecular deste composto foi a mesma utilizada para a β -lapachona.

Para a medida das constantes de cela e coleta de dados das intensidades das reflexões, escolheu-se um monocristal amarelo com dimensões 0,15 x 0,10 x 0,075 mm. Os dados foram obtidos a 293K. A partir da localização e centragem dos ângulos de posicionamento para as 15 reflexões iniciais, foram obtidos os parâmetros da cela unitária: $a = 7,4320(1)$, $b = 8,273(1)$, $c = 14,989(1)$ Å; $\beta = 91,562(9)^\circ$; $V = 921,3(2)$ Å³. O cristal pertence ao sistema cristalino monoclinico, grupo espacial $P2_1/n$.

As intensidades foram coletadas usando-se a radiação $K\alpha$ do Molibdênio ($\lambda = 0,71073$ Å), no modo de varredura ω - 2θ , com θ variando entre 2,32 e 26,32°. Dentro do limite de θ , foram medidas as reflexões com os índices de Miller no intervalo $0 \leq h \leq 9$; $-10 \leq k \leq 0$; $-18 \leq l \leq 18$; obtendo-se 2639 reflexões; destas, 1869

eram independentes e 964, observadas ($I \geq 2\sigma(I)$). O cálculo da densidade, supondo $Z = 4$ moléculas por cela unitária, resultou no valor de $D_c = 1,343 \text{ Mg.m}^{-3}$.

Com exceção dos átomos de hidrogênio, todos os outros átomos tiveram seus fatores de vibração térmica transformados em anisotrópicos. Para os átomos de hidrogênio das metilas, os fatores de vibração foram assumidos como sendo iguais a 1,5 vezes e para os demais 1,2 vezes o fator de vibração dos átomos de carbono - posicionados conforme a geometria dos mesmos - não sendo refinados.

A Tabela 6 mostra o resumo dos resultados de coleta de dados e refinamento da estrutura.

Tabela 6 - Resumo dos principais dados cristalográficos para a Naftoq-01

Fórmula Molecular	C ₁₂ H ₁₀ 2
Massa Molecular	186,20
Sistema Cristalino	Monoclínico
Grupo Espacial	P ₂ ₁ /n
a (Å)	7,432(1)
b (Å)	8,273(1)
c (Å)	14,989(1)
β (°)	91,562(9)
Z (moléculas/cela unitária)	4
V (Å ³)	921,3(2)
D_c (Mg.m ⁻³)	1,343
hkl máx.: mín.	0:9; -10:0; -18:18
Reflexões coletadas; únicas; R(int)	2639; 1869; 0,215
Observadas [$I > 2\sigma(I)$]; Npar	964; 129
R_{obs} ; R_{all} ; GOF	0,070; 0,165; 1,154
Dens, residual (e/Å ³) máx; mín	0,354; -0,357

Os valores finais dos índices de discordância foram: $R_{\text{obs}} = 0,070$, $R_{\text{all}} = 0,165$, e $\text{GOF} = 1,154$, para os 129 parâmetros refinados e 964 reflexões observadas. O mapa de Fourier diferença mostrou, ao final do refinamento, densidade eletrônica máxima e mínima de 0,354 e -0,357 e/Å³.

A estrutura consiste de uma molécula por unidade assimétrica.

A representação ORTEP, com elipsóides desenhados com 50% de probabilidade para o naftoq-01, e com todos os átomos identificados, pode ser visualizada na Figura 14.

A Tabela 7 mostra as distâncias interatômicas, e, na Tabela 8, estão todos os ângulos interatômicos, exceto os que incluem os átomos de hidrogênio, encontrados para a estrutura do naftoq-01.

Figura 14 – Representação ORTEP do composto naftoq-01.

Tabela 7 - Distâncias interatômicas (Å) com os respectivos desvios padrão, entre parênteses, para Naftoq-01

O1	C1	1,209(5)	C3	C12	1,486(5)
O2	C4	1,213(5)	C4	C5	1,488(6)
C1	C2	1,502(6)	C5	C6	1,393(5)
C1	C6	1,474(5)	C5	C10	1,395(5)
C2	C3	1,337(5)	C6	C7	1,386(5)
C2	C11	1,506(5)	C8	C9	1,382(7)
C3	C4	1,490(5)	C9	C10	1,356(6)
C7	C8	1,384(7)			

Tabela 8 - Ângulos interatômicos (°) com os respectivos desvios padrão para o composto Naftoq-01

O1	C1	C2	120,3(3)	C3	C4	C5	119,2(3)
O1	C1	C6	121,2(4)	C4	C5	C6	120,3(3)
C2	C1	C6	118,5(3)	C4	C5	C10	120,3(3)
C1	C2	C3	122,0(3)	C6	C5	C10	119,5(4)
C1	C2	C11	115,2(3)	C1	C6	C5	120,0(3)
C3	C2	C11	122,8(4)	C1	C6	C7	120,4(4)
C2	C3	C4	120,1(3)	C5	C6	C7	119,6(4)
C2	C3	C12	124,1(4)	C6	C7	C8	119,7(4)
C4	C3	C12	115,8(4)	C7	C8	C9	120,4(4)
O2	C4	C3	120,3(4)	C8	C9	C10	120,2(4)
O2	C4	C5	120,6(3)	C5	C10	C9	120,6(4)

A Figura 15 mostra a projeção ORTEP do empacotamento molecular na cela unitária, numa visão normal ao eixo cristalográfico a.

Figura 15 - Projeção do empacotamento na cela unitária.

Os anéis quinonoídico (1) e naftalênico (2) presentes na estrutura são planares, dentro do erro experimental, com desvio médio quadrático, para o plano 1, de 0,001Å e, para o plano 2, de 0,004Å. O ângulo formado entre os planos 1 e 2 - de 0,3(1) - está muito próximo de zero, o que comprova que esta estrutura é plana, como era de se esperar.

Tabela 9 – Equações dos planos de mínimos quadrados e a distância dos átomos aos planos, com os respectivos desvios padrão entre parênteses.

Plano 1 : $7,034(3) x + 0,07(1) y - 5,23(2) z = 1,742(2)$

C1	-0,012(3)	C4	0,015(3)
C2	0,015(3)	C5	-0,002(3)
C3	-0,015(3)	C6	-0,011(3)

Plano 2 : $7,040(4) x + 0,10(1) y - 5,19(2) z = 1,732(3)$

C5	0,005(3)	C8	-0,001(3)
C6	-0,002(3)	C9	0,005(3)
C7	0,000(3)	C10	-0,006(3)

Na estrutura do composto Naftoq-01, foi verificada a presença de duas ligações de hidrogênio intermoleculares fracas: uma entre o átomo de hidrogênio H2, ligado ao carbono C8 e o oxigênio O2 ($d_{H-O} = 2,868(3) \text{ \AA}$ e $\angle C-H-O = 150^\circ$) e outra entre o H4, ligado ao C10, e o átomo de oxigênio O1 ($d_{H-O} = 2,858(3) \text{ \AA}$ e $\angle C-H-O = 131^\circ$). Estas interações resultam em uma cadeia bidimensional, planar, e podem ser visualizadas na Figura 16, representadas por uma linha tracejada. Os elipsóides estão representados com 50% de probabilidade.

Figura 16 - Representação ORTEP das ligações de hidrogênio não convencionais existentes na Naftoq-01.

Existe também uma interação do tipo $C-H \cdots \pi$ stacking entre as cadeias bidimensionais formadas pelas ligações de hidrogênio. Ela ocorre entre C(12)-H(8) e o anel Cg1 (formado pelos átomos C1, C2, C3, C4, C5 e C6) de moléculas paralelas, acarretando a formação de um dímero supramolecular, através da operação de simetria $-x, 1-y, 1-z$.

A distância existente entre os planos das moléculas no dímero supramolecular é de $3,8 \text{ \AA}$.

O átomo de hidrogênio presente na outra metila, embora esteja direcionado para o outro dímero, tem distância e ângulo não favoráveis à interação,

uma vez que os dímeros estão deslocados um em relação ao outro. O mesmo ocorre entre os anéis de diferentes planos. Não há, portanto, interações do tipo $\pi \cdots \pi$ stacking.

A Figura 17 mostra a interação $C-H \cdots \pi$ - que está representada pela linha tracejada - e os elipsóides foram desenhados com 30% de probabilidade, para uma melhor visualização do centróide do anel.

Na Tabela 10, são apresentadas as interações intermoleculares não convencionais discutidas no texto acima.

Figura 17 – Representação do dímero supramolecular da Naftoq-01, formado através da interação $C-H \cdots \pi$.

Tabela 10 – Interações não covalentes existentes na Naftoq-01

	dD...A (Å)	dH...A (Å)	D-H...A (°)	Operação de simetria
C8-H2...O2	3,702(5)	2,868	150	$x-1/2, -y-1/2, +z-1/2$
C10-H4...O1	3,536(5)	2,858	131	$x, +y-1, +z$
C(12)-H(8)...Cg1	3,611(5)	2,730	153	$-x, 1-y, 1-z$

II.3 – Considerações finais sobre a determinação das estruturas

Para a recristalização destes compostos, foram preparadas diversas soluções com diferentes concentrações e solventes (metanol, benzeno, clorofórmio, dimetilformamida, acetonitrila entre outros) e em temperaturas variadas, para que estes sistemas fornecessem monocristais apropriados para a coleta dos dados.

Embora o composto β -lapachona seja conhecido há muito tempo, por apresentar atividade biológica contra várias doenças, no início deste trabalho sua estrutura molecular ainda não havia sido determinada com a acuracidade necessária, devido à dificuldade de cristalização deste composto, o que acarretava a baixa qualidade dos cristais formados. Assim, depois de inúmeras tentativas de cristalização, os dados de intensidade foram coletados a baixa temperatura, 263(2) K, e podê-se determinar sua estrutura cristalina e molecular. Infelizmente, a demora na publicação - justificada pelo desejo de tornar o trabalho completo - implicou na publicação da estrutura por outros pesquisadores [Cunha-Filho *et al.*, 2006].

Para o composto naftoq-01, foram também necessárias várias tentativas de recristalização, e a formação de cristais melhores permitiu que seus dados fossem coletados em temperatura ambiente.

A estrutura cristalina e molecular destes compostos foi, então, determinada, e os dados - depois de refinados e analisados - mostraram que os parâmetros geométricos dos anéis quinonoídico e naftalênico das duas naftoquinonas são muito próximos.

As duas carbonilas existentes no composto naftoq-01 apresentaram distâncias de ligações muito próximas, devido à alta simetria desta molécula. No caso da β -lapachona, a distância C=O de uma das carbonilas é muito próxima dos valores encontrados para o composto naftoq-01, mas a distância na carbonila presente na posição orto do anel é maior em relação às demais.

A análise do empacotamento cristalino mostrou que estas duas estruturas são estabilizadas por ligações de hidrogênio do tipo C-H $\cdots$ O entre as moléculas adjacentes, formando estruturas supramoleculares.

As duas carbonilas presentes no anel quinonoídico na posição orto, na estrutura da β -lapachona, facilitam a formação de ligações de hidrogênio.. No caso da estrutura para-quinonoídica do composto naftoq-01 – em que as carbonilas estão separadas por dois átomos de carbono dentro da estrutura - observou-se uma diminuição do número de interações formadas. Entretanto, neste composto, a presença das metilas entre as carbonilas facilitou uma interação do tipo C-H $\cdots\pi$, que ocorre entre o hidrogênio de uma das metilas com o anel naftalênico.

III – MODELO DE PREVISÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS COMPOSTOS NAFTOIMIDAZÓLICOS

III.1 – Introdução

Os compostos naftoimidazólicos (naftoi) têm-se mostrado altamente ativos nos ensaios biológicos contra o *T. cruzi*.

Assim, com esta série de compostos (Figura 18) foram realizados ensaios biológicos utilizando as três formas do parasito: a tripomastigota, que infecta os hospedeiros; a amastigota, presente dentro das células; e, a epimastigota, que infecta o barbeiro - maior vetor da doença de Chagas. Os resultados obtidos foram promissores e comprovaram que esta classe de compostos é altamente tóxica para todas as formas [Menna-Barreto *et al.*, 2005; 2007; De Moura *et al.*, 2001; 2004].

Como ponto de partida para a síntese destes derivados naftoimidazólicos, De Moura *et al.* [2001; 2004], utilizaram o composto β -lapachona em reação com um aldeído aromático na presença de acetato de amônia.

Para o desenvolvimento deste trabalho, foi realizada a busca no banco de dados de Cambridge, tendo sido verificado que não há nenhuma estrutura cristalográfica depositada para compostos desta série [Allen, 2002].

Mas, como os naftoimidazóis foram sintetizados a partir da β -lapachona e apresentam três anéis idênticos a sua estrutura, os dados cristalográficos da β -lapachona serviram de base para a modelagem das estruturas utilizadas neste trabalho, que podem ser visualizadas na Figura 18.

Os compostos mostrados na Figura 18 são do tipo 4,5-diidro-6,6,-dimetil-6H-2-(**R**)-pirano[b-4,3]nafto[1,2-d]imidazol, onde **R** corresponde aos substituintes.

Naftoi-01 **Naftoi-02** **Naftoi-03** **Naftoi-04** **Naftoi-05** **Naftoi-06** **Naftoi-07** **Naftoi-08** **Naftoi-09** **Naftoi-10** **Naftoi-11** **Naftoi-12** **Naftoi-13** **Naftoi-14** **Naftoi-15** **Naftoi-16** **Naftoi-17** **Naftoi-18** **Naftoi-19** **Naftoi-20**

Figura 18 – Compostos naftoimidazólicos selecionados para a modelagem molecular [De Moura et al., 2001, 2004].

Figura 18 – Compostos selecionados para a modelagem molecular (continuação)
[De Moura et al., 2001, 2004].

III.2 – Modelagem molecular dos compostos e cálculo das propriedades

Para obter da geometria espacial dos compostos estudados, utilizou-se o método de Mecânica Molecular MM^+ , incluído no sistema computacional HyperChem 7.0 [Hypercube, 2002].

Depois que as moléculas foram desenhadas, foi realizada uma busca conformacional para a obtenção das geometrias de menor energia para estes compostos.

O objetivo desta otimização é obter as conformações de menor energia através das variações dos ângulos diedros, gerando-se, assim, isômeros conformacionais. Ao final do processo, são listados as geometrias e os valores de energia correspondentes.

Uma vez escolhida a geometria de menor energia, as coordenadas geométricas são transferidas para o sistema computacional AMPAC 6.55 [Semichem, 1997].

Para o cálculo das propriedades geométricas e eletrônicas dos compostos, como o calor de formação, energia eletrônica, energia de repulsão entre os núcleos, energia total, potencial de ionização, energias dos orbitais de fronteira HOMO-2, HOMO-1, HOMO, LUMO, LUMO+1 e LUMO+2, cargas atômicas, ordens de ligação, etc, utilizou-se o método semi-empírico AM1 (Austin Model 1) [Dewar, 1985].

Com o programa ChemPlus [Hypercube, 2002], foram calculadas algumas propriedades hidrofóbicas e estéricas, tais como: área superficial, volume, volume dos substituintes, massa molecular, refratividade molar e polarizabilidade.

O programa Dragon 2.1 [Todeschini, 2002] foi utilizado para o cálculo de uma grande quantidade de descritores obtidos através de cálculos matemáticos. Ao todo, é possível calcular mais de 1400 descritores, divididos em 18 classes, que podem ser utilizados para classificar as séries de dados em relação as suas características mais globais.

Através da utilização de ferramentas estatísticas, o objetivo desta etapa do trabalho foi tentar prever quais destas propriedades têm relevância na atividade biológica e verificar a possibilidade de predição de resultados futuros baseados nestas informações.

III.3 - Descrição de algumas propriedades físico-químicas calculadas

Para tentar obter as possíveis relações entre a atividade biológica dos compostos naftoimidazólicos e suas estruturas químicas, diversas propriedades foram calculadas a partir de métodos químico-quânticos e outras ferramentas computacionais.

Estas propriedades podem ser divididas em cinco grupos de parâmetros:

- Parâmetros eletrônicos
- Parâmetros estéricos
- Parâmetros de lipofilicidade
- Parâmetros de polarizabilidade

- Parâmetros topológicos

Os parâmetros eletrônicos relacionam a presença de grupos substituintes na distribuição da densidade eletrônica.

Como exemplo, temos as energias dos orbitais de fronteira denominados HOMO (High Occupied Molecular Orbital, ou último orbital molecular ocupado) e LUMO (Lower Unoccupied Molecular Orbital, ou primeiro orbital molecular desocupado).

O conceito destes orbitais envolve o princípio de que os elétrons, em uma molécula, não estão localizados entre os átomos, mas em orbitais moleculares deslocalizados, no qual um orbital molecular representa uma combinação linear dos orbitais atômicos.

Os orbitais HOMO e LUMO são propriedades importantes, uma vez que medem a capacidade doadora e receptora de elétrons, respectivamente. Assim, quanto maior a energia do HOMO, maior será a capacidade doadora de elétrons, já que a energia necessária para retirar um elétron do HOMO será menor.

Por outro lado, quanto mais baixo for o nível energético do LUMO, maior será a afinidade eletrônica, pois os elétrons estarão em um orbital mais estável [Honório; Da Silva, 2003].

O potencial de ionização está relacionado à força com que um elétron está ligado ao átomo. Assim, o primeiro potencial de ionização é a energia necessária para se retirar um elétron do átomo, e pode ser considerado como sendo análogo ao valor absoluto da energia do último orbital molecular ocupado correspondente (HOMO). Por outro lado, os valores de afinidade eletrônica são análogos aos dos correspondentes primeiros orbitais não ocupados (LUMO).

Na Figura 19, estão esquematizados (como exemplificação) os orbitais HOMO para todos os compostos modelados. As regiões em verde representam fases positivas e, em rosa, negativas.

Figura 19 - Orbitais HOMO para compostos naftoi.

Outra propriedade utilizada no estudo da relação estrutura-atividade é a eletronegatividade, que pode ser usada como parâmetro para estimar a capacidade que uma molécula tem de atrair elétrons de outra molécula, quando as duas se aproximam.

Os conceitos de dureza e moleza foram formulados de acordo com o conceito de Lewis, sobre ácidos e bases, e sua classificação em duro ou mole. Dentro desta classificação, uma base mole pode ser facilmente oxidada, no qual o átomo doador possui elevada polarizabilidade e baixa eletronegatividade, propriedade que se associa a orbitais vazios de curta existência.

Para uma base dura, o átomo doador possui características inversas ao de uma base mole, associado a orbitais vazios de alta energia. Para os ácidos moles, por sua vez, o átomo aceptor possui pequena carga positiva e tamanho grande. Nos ácidos duros, o aceptor possui elevada carga positiva e é pequeno, além de não possuir outros elétrons facilmente excitáveis. Como a quantificação da dureza (η) e moleza (S) é difícil, pode-se obtê-las através do potencial de ionização e da afinidade eletrônica, ou das energias dos orbitais HOMO e LUMO.

A medida do calor de formação de um composto pode ser feita de maneira direta ou calculada por métodos semi-empíricos, através de um conjunto de dados do calor de atomização em suas medidas estequiométricas. Como o programa AMPAC possui uma parametrização para os valores experimentais a 298K, este foi o método utilizado para seu cálculo [Semichem, 1997].

Outros parâmetros de caráter energético também podem ser calculados. A energia total é um deles. Seu valor é dado pela soma da energia de repulsão nuclear e da energia eletrônica. A energia de repulsão núcleo-núcleo é baseada na repulsão nuclear cuja função combina termos do Hamiltoniano do núcleo e efeitos de atração e repulsão do “core” eletrônico.

A energia eletrônica é calculada para a geometria de equilíbrio da molécula, onde a configuração nuclear terá um valor mínimo de energia eletrônica.

O potencial químico (μ) é a energia livre de Gibbs em relação ao número de moles de uma dada substância. O valor de μ pode ser determinado a partir do potencial de ionização somado ao valor da afinidade eletrônica.

A análise da estrutura por difração de raio X pode determinar a distribuição da densidade eletrônica através da geração do mapa de densidade [Altomare *et al.*, 1993], mas a distribuição da densidade eletrônica pode, também, ser calculada pelo método AM1, assim como o potencial eletrostático de uma dada molécula - quantidade mecânico-quântica que corresponde à interação com uma carga

positiva, em qualquer ponto do espaço em torno da molécula. O cálculo do potencial eletrostático utilizado foi feito através do método desenvolvido por Chirlian e Franci [1987].

Outra propriedade derivada da estrutura química, que pode ser calculada e estar diretamente relacionada à atividade biológica, é a ordem de ligação. Define-se como ordem de ligação como uma quantidade que fornece a distribuição dos elétrons nas regiões entre os átomos. É de se esperar que a relação entre o comprimento e a ordem de ligação se dê entre a força que liga os dois núcleos e a densidade de elétrons na região entre os núcleos; assim, o comprimento de uma ligação estará inversamente relacionado a sua força de ligação.

No método AM1 [Dewar, 1985], quando este índice de ligação é da ordem de 1,0, considera-se ligação simples; para ligações duplas, este índice é de 2,0; para ligações triplas, de 3,0 e, para ligações aromáticas, tal índice é da ordem de 1,5.

Os parâmetros estéricos, como área e volume, são propriedades importantes para o entendimento de mecanismos responsáveis pela atividade biológica, e podem fornecer informações sobre os ajustes espaciais do composto em relação ao sítio receptor, caso este seja conhecido.

Para o cálculo da área superficial, empregou-se o método de Bodor *et al.* [1989]. Inicialmente, um conjunto de pontos é gerado numa superfície esférica e uma rede cúbica é usada como ponto inicial. A rede é centrada na origem de um sistema de coordenadas e tem uma aresta com raio igual a dois.

O cálculo do volume molecular é feito pelo uso da técnica de integração, no qual gera-se um conjunto de redes cúbicas tridimensionais. O centro da rede é posicionado em um átomo, e o seu diâmetro é a aresta do cubo. Todos os pontos da rede são testados, como se eles estivessem dentro do átomo, cuidando para evitar o problema da sobreposição atômica [van de Waterbeend, 1995].

A superfície molecular total pode ser calculada somando-se todas as contribuições da superfície atômica, assim como o volume de um dado substituinte que também pode ser calculado.

Propriedades como momento dipolar, polarizabilidade e refratividade molar são parâmetros eletrônicos que relacionam a distribuição das cargas de uma molécula.

O momento dipolar está relacionado à distribuição das cargas na molécula, em função de sua geometria molecular.

A polarizabilidade é uma propriedade que representa a facilidade com que uma nuvem eletrônica pode se deformar em um campo elétrico, de maneira que quanto mais polarizável é a molécula, maior será sua tendência a unir-se a outras moléculas.

A refratividade molar é uma propriedade físico-química extremamente dependente da estrutura do composto, e pode, também, expressar o caráter lipofílico de seus grupos substituintes.

O parâmetro de lipofilicidade, log P, está intimamente relacionado com as propriedades de um dado composto e sua atividade biológica, o que demonstra a sua importância nos estudos que relacionam compostos bioativos e suas propriedades.

O log P pode ser definido como sendo o logaritmo da razão entre a solubilidade de um composto em octanol e a sua solubilidade em fase aquosa. Assim, se um composto é mais solúvel em água, seu log P será negativo; se é mais solúvel em octanol, então log P será positivo e a interação da droga ocorrerá na fase lipídica (membranas). A medida que “p” aproxima-se de zero, indica que a droga só será solúvel em água e não será capaz de atravessar uma membrana lipídica.

Para que um medicamento alcance o seu sítio de ação, ele deverá ser capaz de interagir com dois ambientes diferentes: um lipofílico - as membranas celulares - e um aquoso - o citoplasma. O citoplasma de uma célula é, essencialmente, uma solução diluída de sais em água, rodeada por uma fase não aquosa. Assim, uma estimativa do coeficiente de partição num sistema octanol/água pode representar um modelo de interação de um dado composto no meio biológico.

Para o cálculo do coeficiente de partição dos compostos e outras propriedades relacionadas à lipofilicidade, utilizou-se a versão on-line do programa ALOGPS 2.1 [Tetko; Tanchuk, 2002].

Devido à grande quantidade de descritores calculados pelo programa Dragon 2.1 [Todeschini, 2002], somente serão apresentados, neste trabalho, os que tiveram relevância para o modelo estatístico.

III.4 - Métodos utilizados para a análise dos dados

Como foi calculado um extenso conjunto de propriedades e descritores, doravante denominados variáveis, faz-se necessária uma seleção das mesmas através da redução deste conjunto, com o intuito de se eliminar as variáveis que não estejam diretamente relacionadas à atividade biológica dos compostos naftoimidazólicos.

Para essa seleção, foram usados: o método de Florestas aleatórias [Svetnik, 2003], o peso de Fisher, a variância e a correlação, por meio de uma planilha do Excel.

Florestas aleatórias (Random Forest) é um método de classificação não linear feito através de uma classificação por árvores, que pode ser utilizado para prever, de modo quantitativo, a categoria da atividade biológica baseada nas variáveis utilizadas, através de votos por classificação correta. A vantagem deste método é a possibilidade de trabalhar com um grande número de dados e a rapidez do cálculo. Por outro lado, o modelo obtido a partir deste algoritmo é aleatório. Como a seleção das variáveis utilizando este método foi insatisfatória, os resultados não serão discutidos neste trabalho.

O peso de Fisher foi calculado com o objetivo de selecionar as variáveis com maior poder de discriminação dentro deste conjunto de moléculas. Quanto maior o seu valor, maior será a contribuição de uma dada propriedade, pois maior será a separação do valor das médias das duas classes em questão.

A variância tem a mesma função do peso de Fisher e pode ser calculada para mais de duas classes, através da média geométrica das combinações possíveis. Para esse cálculo, faz-se uma divisão da variância entre as classes pela soma das variâncias intraclasse, e seu valor é sempre igual ou maior a uma unidade de variância [Bruns; Faigle, 1985].

Esta etapa do trabalho pode ser denominada redução das variáveis. Isto deve ser feito quando há grande número de parâmetros calculados. Seu objetivo é excluir informações pouco representativas ao modelo estatístico proposto, por não serem relevantes para a atividade biológica.

Vale lembrar que a eliminação de uma variável, na etapa de pré-processamento dos dados, pode, ou não, influir no padrão dos dados obtidos numa

análise, pois depende de quanto esta variável pode estar correlacionada com as demais. Assim, uma matriz de correlação deve ser construída entre cada par de variáveis para se avaliar quais parâmetros estão altamente correlacionados.

Outra etapa importante no pré-processamento dos dados é o escalonamento. Seu objetivo é assegurar que cada variável receba o mesmo peso no modelo estatístico, o que garante que a influência das variáveis utilizadas seja independente de sua unidade inicial. Neste estudo, utilizou-se o auto-escalonamento - técnica de escalonamento que apresenta os valores da média igual a zero e variância um, além de ser sensível a valores extremos, devido a sua média centrada. Pode-se, assim, detectar compostos que apresentam um comportamento muito diferente em relação aos demais pertencentes ao grupo.

Para o modelo estatístico, utilizou-se a análise multivariada dos dados através do modelo de regressão de mínimos quadrados parciais (PLS - Partial Least Square). O objetivo principal de uma PLS é correlacionar uma variável dependente através de uma relação quantitativa; neste caso, o valor da atividade biológica com as variáveis independentes - propriedades calculadas para a série de compostos. Este método está baseado na combinação linear de todas as variáveis originais, e ortogonal às demais componentes principais.

Para a geração do modelo, é necessário avaliar qual o melhor número de variáveis latentes - o que normalmente é feito por meio de um procedimento chamado validação cruzada ("*cross validation*"), no qual se pode determinar o erro mínimo de previsão.

O modelo final pode ser utilizado para fazer previsões quantitativas da atividade biológica de compostos similares, com base nos valores das variáveis independentes que formaram o modelo [van de Waterbeend, 1995]. O PLS foi utilizado neste trabalho pela capacidade de avaliar a confiabilidade do modelo e dos valores previstos.

III.5 – Seleção das propriedades calculadas

As Tabelas de 11 a 17 mostram algumas das principais propriedades calculadas para os 29 naftoi. Nas últimas duas linhas de cada tabela, estão os valores

obtidos com o cálculo do peso de Fisher e da correlação da propriedade em questão com a atividade biológica.

Tabela 11 – Parâmetros moleculares calculados para os naftoimidazóis

Naftoi	Log ativ ¹	Peso Mol ²	Area sup ³	Volume ⁴	Refrat ⁵	Polar ⁶	Cform ⁷
01-a	4,81	367,45	456,06	1052,73	101,14	43,26	376,768
02-a	4,81	342,44	484,65	1022,35	97,21	41,04	213,677
03-a	4,43	328,41	441,30	970,77	92,17	39,20	246,099
04-a	4,43	342,44	481,53	1022,63	97,21	41,04	214,397
05-a	4,40	362,86	464,19	1010,01	96,98	41,13	229,081
06-a	4,07	407,31	486,01	1033,19	99,79	41,83	267,422
07-a	4,04	342,44	463,75	1015,43	97,21	41,04	221,401
08-a	4,01	346,40	453,55	980,52	92,39	39,11	57,359
09-ma	3,89	396,41	499,70	1049,85	98,15	40,77	-406,355
10-ma	3,83	407,31	485,47	1032,30	99,79	41,83	267,464
11-ma	3,81	329,40	429,53	960,45	89,61	38,50	286,656
12-ma	3,72	329,40	428,38	957,01	89,95	38,50	288,642
13-ma	3,64	396,41	500,76	1048,69	98,15	40,77	-405,543
14-ma	3,61	346,40	445,53	981,80	92,39	39,11	69,158
15-ma	3,59	358,44	500,27	1046,91	98,63	41,68	86,293
16-ma	3,52	373,41	494,48	1031,07	98,49	41,05	263,405
17-ma	3,43	346,40	453,41	980,30	92,39	39,11	59,702
18-ma	3,35	396,41	474,80	1040,38	98,15	40,77	-384,483
19-ma	3,20	353,42	498,13	1027,01	98,37	41,60	380,774
20-ma	3,24	373,41	493,61	1031,05	98,49	41,05	266,446
21-i	2,97	362,86	476,20	1013,45	96,98	41,13	217,514
22-i	2,96	353,42	498,41	1027,17	98,37	41,60	379,550
23-i	2,73	372,42	460,63	1037,99	97,94	41,54	284,395
24-i	2,73	373,41	472,31	1029,31	98,49	41,05	1,344
25-i	2,70	407,31	469,92	1024,16	99,79	41,83	275,870
26-i	2,64	362,86	476,77	1012,85	96,98	41,13	217,046
27-i	2,51	358,44	499,34	1045,67	98,63	41,68	88,503
28-i	2,19	358,44	484,68	1051,13	98,63	41,68	102,362
29-i	2,09	353,42	469,23	1016,68	98,37	41,60	384,054
wF		0,022	0,062	0,168	0,285	0,422	0,097
wC		-0,165	-0,229	-0,211	-0,207	-0,183	-0,009

¹ logaritmo negativo da concentração (em M) para produzir 50% de inibição frente ao *T. cruzi*.

² Peso molecular (uma); ³ área superficial (Å²); ⁴ volume molecular (Å³); ⁵ refratividade molar (Å³);

⁶ polarizabilidade (Å³); ⁷ calor de formação (kcal/mol); wF: peso de Fisher; wC: peso da correlação.

A classificação dos compostos naftoimidazólicos em ativos (**a**), moderadamente ativos (**ma**) e inativos (**i**) foi baseada nos resultados obtidos nos testes biológicos com a forma tripomastigota do *T. cruzi*, classificados em relação à atividade do cristal de violeta, no qual a concentração de ED₅₀/24h frente ao *T. cruzi*

para este compostos é de $536.0 \pm 1.0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ [De Moura *et al.*; 2001, 2004]. Os compostos para os quais a atividade medida foi, pelo menos, 5 vezes maior que o valor do cristal de violeta (menor que $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) foram considerados ativos e, os menores que $536.0 \pm 1.0 \mu\text{mol.L}^{-1}$, considerados inativos. Os moderadamente ativos foram aqueles cuja concentração de inibição variou entre estes dois limites.

Tabela 12 – Parâmetros moleculares calculados para os naftoimidazóis

Naftoi	E total ¹	E c-c ²	E elet ³	Dipolo ⁴	Pot Ioniz ⁵
01-a	-4300,899	30365,377	-34666,277	5,165	7,625
02-a	-3980,711	27347,807	-31328,518	4,292	7,853
03-a	-3824,838	25671,166	-29496,003	4,230	7,886
04a	-3980,704	27466,101	-31446,805	4,420	7,873
05-a	-4184,814	27706,469	-31891,282	4,960	7,940
06-a	-4164,435	27163,330	-31327,765	4,277	7,988
07-a	-3980,631	27834,151	-31814,783	4,139	7,907
08-a	-4296,247	27364,432	-31660,679	4,285	7,960
09-ma	-5395,498	33597,808	-38993,306	3,007	8,065
10-ma	-4164,434	27281,507	-31445,942	3,352	7,979
11-ma	-3889,843	25718,387	-29608,230	2,992	7,904
12-ma	-3889,823	25712,511	-29602,334	5,621	7,983
13-ma	-5395,489	33122,398	-38517,888	5,336	8,111
14-ma	-4296,125	27835,694	-32131,819	5,166	7,929
15-ma	-4300,713	29154,864	-33455,578	3,456	7,827
16-ma	-4655,675	30458,501	-35114,176	7,121	8,225
17-ma	-4296,223	27458,570	-31754,793	5,258	7,988
18-ma	-5395,271	35071,818	-40467,089	6,139	8,023
19-ma	-4145,320	27927,106	-32072,426	6,821	8,051
20-ma	-4655,643	30723,789	-35379,433	8,413	8,159
21-i	-4184,934	27340,553	-31525,486	3,397	7,970
22-i	-4145,333	27801,994	-31947,327	5,236	8,075
23-i	-4655,457	31772,312	-36427,769	7,487	8,054
24-i	-4592,964	30789,219	-35382,183	4,021	7,918
25-i	-4164,347	27673,620	-31837,968	3,993	7,948
26-i	-4184,939	27225,592	-31410,531	4,227	7,965
27-i	-4300,690	29311,529	-33612,220	4,161	7,877
28-i	-4300,547	29933,459	-34234,006	4,389	7,816
29-i	-4145,286	28528,549	-32673,836	3,451	7,990
wF	0,050	0,003	0,001	0,054	0,002
wC	-0,089	-0,202	0,196	-0,062	-0,281

¹ Energia total (eV); ² Energia de repulsão entre núcleos (eV); ³ Energia eletrônica (eV); ⁴ Momento dipolar (Debye, D); ⁵ Potencial de ionização (eV); wF: peso de Fisher; wC: peso da correlação.

Tabela 13 – Parâmetros moleculares calculados para os naftoimidazóis

Naftoi	Homo-2*	Homo-1*	Homo*	Lumo*	Lumo+1*	Lumo+2*	H-L*	Log P
01-a	-8,815	-8,687	-7,625	-0,302	0,048	0,352	-7,323	4,87
02-a	-9,384	-8,816	-7,853	-0,420	0,139	0,288	-7,433	5,48
03-a	-9,540	-8,835	-7,886	-0,430	0,143	0,275	-7,456	5,10
04-a	-9,447	-8,822	-7,873	-0,405	0,166	0,287	-7,468	5,50
05-a	-9,567	-8,830	-7,940	-0,420	-0,018	0,045	-7,520	5,52
06-a	-9,562	-8,931	-7,988	-0,670	-0,081	0,099	-7,318	5,77
07-a	-9,448	-8,821	-7,907	-0,342	0,157	0,279	-7,565	5,45
08-a	-9,527	-8,913	-7,960	-0,606	-0,049	0,053	-7,354	5,24
09-ma	-9,796	-8,994	-8,065	-0,767	-0,404	-0,144	-7,298	5,93
10-ma	-9,628	-8,914	-7,979	-0,587	-0,081	-0,007	-7,392	5,78
11-ma	-9,602	-8,828	-7,904	-0,619	0,039	0,136	-7,285	4,32
12-ma	-9,670	-8,932	-7,983	-0,650	-0,042	0,072	-7,333	4,22
13-ma	-9,840	-9,033	-8,111	-0,916	-0,242	-0,133	-7,195	5,93
14-ma	-9,563	-8,836	-7,929	-0,478	-0,011	0,014	-7,451	5,18
15-ma	-9,177	-8,808	-7,827	-0,393	0,157	0,284	-7,434	5,12
16-ma	-9,957	-9,142	-8,225	-1,408	-0,475	-0,367	-6,817	5,21
17-ma	-9,630	-8,918	-7,988	-0,595	-0,042	0,042	-7,393	5,17
18-ma	-9,766	-8,894	-8,023	-0,653	-0,308	-0,138	-7,370	6,49
19-ma	-9,760	-8,978	-8,051	-0,765	-0,408	-0,086	-7,286	4,85
20-ma	-9,890	-9,069	-8,159	-1,207	-0,765	-0,269	-6,952	5,22
21-i	-9,602	-8,907	-7,97	-0,576	-0,007	0,013	-7,394	6,45
22-i	-9,749	-9,009	-8,075	-0,932	-0,252	-0,059	-7,143	4,87
23-i	-9,794	-8,937	-8,054	-0,983	-0,595	-0,213	-7,071	5,84
24-i	-9,136	-8,876	-7,918	-0,548	0,000	0,080	-7,370	4,90
25-i	-9,663	-8,832	-7,948	-0,495	-0,095	0,051	-7,453	5,72
26-i	-9,533	-8,913	-7,965	-0,614	-0,044	0,106	-7,351	5,57
27-i	-9,191	-8,820	-7,877	-0,448	0,128	0,284	-7,429	5,11
28-i	-9,176	-8,705	-7,816	-0,195	0,122	0,338	-7,621	5,17
29-i	-9,721	-8,896	-7,99	-0,818	-0,337	-0,040	-7,172	4,78
wF	0,037	0,028	0,002	0,002	0,002	0,001	0,001	0,006
wC	0,149	0,156	0,281	0,234	0,307	0,274	-0,174	0,008

* A unidade das energias dos orbitais moleculares HOMO-2, HOMO-1, HOMO, LUMO, LUMO+1 e LUMO+2 e a diferença de energia entre os orbitais HOMO e LUMO, é dada em (eV); H-L: diferença de energia entre os orbitais HOMO e LUMO; Log P: coeficiente de partição; wF: peso de Fisher; wC: peso da correlação.

Tabela 14 – parâmetros moleculares calculados para os naftoimidazóis

Naftoi	Mor17p	¹X4A	²	piPC04	³	piPC08	⁴	piPC09	⁵	piPC10	⁶	PCR	⁷
01-a	-0,813	0,098	302,250	2341,813	3548,500	4786,102	45,823						
02-a	-0,599	0,099	286,625	2275,688	3655,031	4976,320	39,265						
03-a	-0,527	0,099	279,875	2233,500	3536,906	4747,242	38,156						
04-a	-0,669	0,099	288,875	2285,531	3644,906	4982,648	39,660						
05-a	-0,391	0,099	290,375	2303,391	3653,766	4992,984	40,911						
06-a	-0,542	0,099	286,625	2275,688	3655,031	4976,320	39,265						
07-a	-0,584	0,099	290,375	2303,391	3653,766	4992,984	40,911						
08-a	-0,486	0,099	286,625	2275,688	3655,031	4976,320	39,265						
09-ma	-0,535	0,099	302,375	2365,688	3801,000	5306,648	42,785						
10-ma	-0,536	0,099	288,875	2285,531	3644,906	4982,648	39,660						
11-ma	-0,521	0,099	279,875	2233,500	3536,906	4747,242	38,156						
12-ma	-0,509	0,099	279,875	2233,500	3536,906	4747,242	38,156						
13-ma	-0,489	0,100	300,125	2326,313	3781,594	5330,695	41,558						
14-ma	-0,431	0,099	290,375	2303,391	3653,766	4992,984	40,911						
15-ma	-0,467	0,100	291,125	2292,563	3697,219	5094,445	40,172						
16-ma	-0,488	0,100	300,125	2326,313	3781,594	5330,695	44,912						
17-ma	-0,481	0,099	288,875	2285,531	3644,906	4982,648	39,660						
18-ma	-0,562	0,098	308,375	2404,922	3863,438	5343,563	46,669						
19-ma	-0,515	0,100	313,625	2431,781	3933,047	5586,352	59,675						
20-ma	-0,491	0,099	302,375	2365,688	3801,000	5306,648	46,237						
21-i	-0,392	0,099	288,875	2285,531	3644,906	4982,648	39,660						
22-i	-0,496	0,100	310,250	2372,719	3903,938	5622,422	57,512						
23-i	-0,582	0,099	342,625	2716,266	4371,469	6527,250	64,560						
24-i	-0,522	0,099	308,375	2404,922	3863,438	5343,563	50,436						
25-i	-0,470	0,099	290,375	2303,391	3653,766	4992,984	40,911						
26-i	-0,459	0,099	286,625	2275,688	3655,031	4976,320	39,265						
27-i	-0,501	0,100	293,375	2312,25	3696,938	5090,648	40,893						
28-i	-0,453	0,100	296,375	2337,234	3723,656	5109,844	43,176						
29-i	-0,449	0,100	322,625	2490,633	4026,703	5641,723	66,524						
wF	0,244	0,203	0,301	0,293	0,334	0,298	0,348						
wC	-0,510	-0,464	-0,461	-0,451	-0,519	-0,490	-0,487						

¹ fator 17 da função de espalhamento/polarizabilidade; ² Média do índice Chi 4; ³ múltiplo molecular de ordem 4 na contagem das distâncias topológicas; ⁴ múltiplo molecular de ordem 8 na contagem das distâncias topológicas; ⁵ múltiplo molecular de ordem 9 na contagem das distâncias topológicas; ⁶ múltiplo molecular de ordem 10 na contagem das distâncias topológicas; ⁷ razão da contagem da soma dos caminhos da distâncias topológicas.

Tabela 15 – Parâmetros moleculares calculados para os naftoimidazóis

Naftoi	BEHv7 ¹	BELv6 ²	BELe7 ³	BEHp7 ⁴	BELp6 ⁵	HATS4u ⁶	HATS5v ⁷
01-a	2,782	1,239	0,944	2,794	1,226	0,493	0,070
02-a	2,781	1,239	0,942	2,794	1,217	0,506	0,059
03-a	2,779	1,237	0,940	2,791	1,214	0,460	0,062
04-a	2,788	1,243	0,980	2,799	1,225	0,439	0,064
05-a	2,779	1,237	0,940	2,792	1,214	0,434	0,068
06-a	2,780	1,237	0,940	2,793	1,214	0,463	0,063
07-a	2,806	1,314	1,009	2,812	1,294	0,401	0,073
08-a	2,779	1,237	0,940	2,791	1,214	0,460	0,062
09-ma	2,789	1,239	0,949	2,798	1,234	0,443	0,068
10-ma	2,780	1,237	0,940	2,793	1,214	0,454	0,068
11-ma	2,779	1,237	0,940	2,791	1,214	0,544	0,065
12-ma	2,778	1,237	0,940	2,790	1,214	0,485	0,064
13-ma	2,781	1,238	0,941	2,794	1,217	0,482	0,061
14-ma	2,779	1,237	0,940	2,791	1,214	0,428	0,062
15-ma	2,781	1,253	0,951	2,794	1,250	0,422	0,069
16-ma	2,781	1,239	0,941	2,793	1,219	0,491	0,063
17-ma	2,779	1,237	0,940	2,791	1,214	0,456	0,062
18-ma	2,807	1,288	0,984	2,812	1,315	0,392	0,081
19-ma	2,795	1,239	0,981	2,802	1,219	0,478	0,070
20-ma	2,784	1,247	0,943	2,795	1,257	0,433	0,071
21-i	2,779	1,237	0,940	2,792	1,214	0,457	0,066
22-i	2,781	1,238	0,942	2,794	1,216	0,511	0,064
23-i	2,801	1,317	1,007	2,808	1,332	0,433	0,064
24-i	2,800	1,315	0,963	2,802	1,326	0,407	0,079
25-i	2,780	1,237	0,940	2,795	1,214	0,420	0,072
26-i	2,780	1,237	0,940	2,792	1,214	0,461	0,063
27-i	2,790	1,286	0,996	2,800	1,286	0,407	0,070
28-i	2,805	1,316	1,011	2,812	1,326	0,314	0,090
29-i	2,809	1,281	1,010	2,815	1,290	0,426	0,077
wF	0,240	0,454	0,289	0,267	0,406	0,245	0,272
wC	-0,457	-0,487	-0,453	-0,460	-0,520	0,462	-0,506

¹ autovalor número 7 da matriz de Burden/volume de van der Waals; ² autovalor número 6 da matriz de Burden/volume de van der Waals; ³ autovalor número 6 da matriz de Burden/eletronegatividade; ⁴ autovalor número 7 da matriz de Burden/polarizabilidade; ⁵ autovalor número 6 da matriz de Burden/polarizabilidade; ⁶ penalidade 4 na autocorrelação 3D obtida a partir da matriz de influência; ⁷ penalidade 5 na autocorrelação 3D obtida a partir da matriz de influência/volume de van der Waals.

Tabela 16 – parâmetros moleculares calculados para os naftoimidazóis

Naftoi	R4u ¹	RCI ²	RDF035m ³	RDF060v ⁴	RDF065v ⁵	RDF060p ⁶
01-a	1,739	1,42	4,480	12,494	9,133	12,993
02-a	1,798	1,42	3,344	11,924	10,055	12,481
03-a	1,613	1,42	3,386	11,923	9,687	12,493
04-a	1,691	1,42	3,353	12,312	9,712	12,937
05-a	1,570	1,42	3,913	12,544	10,066	13,089
06-a	1,604	1,43	3,365	12,221	9,602	12,840
07-a	1,661	1,42	3,727	12,962	10,350	13,757
08-a	1,608	1,43	3,718	12,064	10,108	12,640
09-ma	1,673	1,43	3,877	12,506	10,527	13,029
10-ma	1,589	1,43	3,377	12,089	10,371	12,681
11-ma	1,654	1,43	3,304	10,236	8,382	10,646
12-ma	1,629	1,43	3,279	11,115	8,796	11,547
13-ma	1,755	1,43	3,623	11,920	11,034	12,498
14-ma	1,565	1,42	3,807	13,125	9,566	13,680
15-ma	1,648	1,42	3,764	12,574	11,529	13,378
16-ma	1,729	1,43	4,861	12,057	10,391	12,657
17-ma	1,603	1,43	3,698	12,249	9,822	12,770
18-ma	1,629	1,43	5,614	12,856	10,830	13,146
19-ma	1,657	1,43	5,937	12,778	9,567	13,272
20-ma	1,665	1,43	4,990	13,161	10,879	13,771
21-i	1,595	1,43	3,392	11,980	9,792	12,560
22-i	1,699	1,43	5,981	12,015	10,589	12,579
23-i	1,594	1,43	4,710	12,820	10,153	13,387
24-i	1,618	1,43	5,701	13,576	10,159	14,127
25-i	1,539	1,43	3,721	12,917	10,819	13,436
26-i	1,605	1,43	3,370	12,839	9,524	13,570
27-i	1,598	1,43	3,680	13,146	11,123	13,856
28-i	1,504	1,42	5,063	12,874	12,733	13,751
29-i	1,582	1,43	5,564	13,828	11,406	14,466
wF	0,551	0,229	0,211	0,475	0,300	0,539
wC	0,535	-0,497	-0,473	-0,483	-0,514	-0,493

¹ penalidade 4 na autocorrelação 3D obtida a partir da matriz geométrica; ² Índice Jug de aromaticidade; ³ Função de distribuição radial 3,5/massa molecular; ⁴ Função de distribuição radial 6/volume de van der Waals; ⁵ Função de distribuição radial 6,5/volume de van der Waals; ⁶ Função de distribuição radial 6/polarizabilidade.

As seleções de variáveis foram feitas utilizando-se os maiores valores do peso de Fisher e da variância para a geração de modelos PLS; como os resultados obtidos não tiveram valor estatístico significativo, foram omitidos nesta apresentação.

Nas Tabelas 11, 12 e 13 pode-se observar que o peso de Fisher e da correlação calculados para estas variáveis são baixos (menores que 0,45). As variáveis que apresentaram valor mais significativo aparecem apenas nas Tabelas 14, 15 e 16 - coincidentemente, todas calculadas pelo programa Dragon 2.1 [Todeschini, 2002].

Assim, os descritores que apresentaram um valor de correlação acima de 0,45 foram escolhidos para a geração de um modelo de PLS.

Outro fator importante a ser avaliado é se estas variáveis escolhidas, as que apresentam um valor de correlação alto, estão correlacionadas ou não entre si. Uma vez que as variáveis que estão correlacionadas entre si fornecem a mesma informação, elas deverão ser excluídas. Esta análise pode ser feita através do cálculo da matriz de correlação. Nesta matriz, o coeficiente de correlação poderá variar entre 1 e -1 - quanto mais próximo de um, maior será a correlação entre duas variáveis.

Na Tabela 17, estão listadas as vinte variáveis que possuem os maiores valores de correlação em relação à atividade biológica, e os respectivos valores da correlação entre as variáveis.

Os valores da Tabela 17 mostram que algumas propriedades estão altamente correlacionadas (o coeficiente de correlação é maior que 0,7) e, portanto, devem ser desconsideradas. Assim, das vinte variáveis que apresentaram um valor maior de correlação entre a atividade biológica e a variável calculada (valores mostrados na primeira linha da matriz de correlação), apenas nove foram selecionadas para a construção da PLS:

- Morp17p
- piPC09
- BELp6
- R4u
- RCI
- X4a
- RDF065v
- RDF060p
- RDF035m

Tabela 17 – Coeficientes de correlação das variáveis selecionadas para os 29 compostos

[illegible]

O parâmetro Mor17p pertence à classe dos descritores 3D MORSE (Molecule Representation of Structures based on electron diffraction). Estes parâmetros são obtidos a partir da estrutura 3D do composto, a partir da somatória dos produtos das propriedades dos átomos envolvidos e das distâncias interatômicas. No caso do parâmetro Mor17p, a propriedade molecular considerada no cálculo é a polarizabilidade, e o número 17 representa um fator que divide a função de espalhamento [Schuur; Gasteiger, 1996].

O descritor picPC09 pertence à classe “Molecular Walk Counts”, que descreve uma molécula do ponto de vista de sua conectividade através de um gráfico molecular, considerando seus átomos como vértices e as suas ligações como arestas. Avaliando a molécula em duas dimensões, a partir de um átomo, pode-se calcular todas as distâncias topológicas e somá-las, como se a molécula estivesse sobre um plano [Kier; Hall, 1986]. O descritor X4A também é um descritor topológico relacionado à conectividade molecular - neste caso, 4 foi a média do índice **chi**.

O parâmetro BELp6 é um descritor molecular pertencente à classe dos autovalores de Burden [Burden, 1997]. É calculado a partir dos autovalores obtidos da matriz de adjacência de uma molécula baseada na sua estrutura bi-dimensional. No caso do parâmetro BELp6, os elementos da diagonal da matriz são valores relacionados à polarizabilidade atômica, e o menor autovalor utilizado é 6.

O parâmetro R4u pertence à série de descritores GETAWAY (Geometric Topology and Atom Weights Assembly) - gerados a partir da matriz de coordenadas moleculares em relação ao centro da molécula tridimensional, denominada matriz de influência molecular [Consonni; Todeschini; Pavan, 2002].

O RCI é um parâmetro geométrico relacionado ao índice de Jug [Jug, 1983]. Tais parâmetros estão diretamente relacionados à geometria molecular e à distância interatômica.

As propriedades RDF065v, RDF060p e RDF035 pertencem à classe de descritores RDF (Radial Distribution Function) [Hemmer; Steinhauer; Gasteiger, 1999]. A função de distribuição radial descreve o modo da variação da densidade em torno da molécula, em função de uma dada distância interatômica. Para o cálculo das propriedades de uma molécula, são considerados: o número de átomos, uma de suas propriedades (nenhuma, massa atômica, eletronegatividade, volume de van der Waals

e polarizabilidade) e a distância entre os átomos e um raio pré-definido. Para RDF065v, o descritor molecular é obtido a partir desta função, centrado a uma distância de 6,5 Å, considerando o volume de van der Waals. O RDF060p é calculado a uma distância de 6,0 Å em relação à polarizabilidade atômica e, em RDF035m, a 3,5 Å, considerando a massa atômica.

III.6 – Seleção dos compostos para a série de treinamento e de teste

Os compostos naftoimidazólicos foram divididos em dois conjuntos, um deles utilizado para a geração do modelo PLS, denominado *conjunto de treinamento* e, o outro, denominado *teste*, para a validação externa do modelo.

O número de compostos selecionados para o conjunto teste corresponde a 20% do número total de compostos. Dois deles pertencem à classe dos mais ativos, outros dois, à dos moderadamente ativos e dois mais, à dos inativos, de maneira abrangente em relação aos valores do logaritmo da atividade biológica. As distribuições dos valores das duas séries estão mostradas nas Figuras 20 e 21.

Figura 20 – Gráfico da distribuição do conjunto de treinamento e sua atividade biológica correspondente em escala logarítmica.

Figura 21 – Gráfico do conjunto teste e sua atividade biológica correspondente em escala logarítmica.

III.7 – Modelo PLS

O modelo PLS, construído com as variáveis selecionadas, foi obtido com a utilização do programa Pirouette 3.10 [Informetrix, 2002]. O modelo foi construído para a série de treinamento a partir do método de validação cruzada. O melhor resultado foi obtido excluindo-se três amostras por vez.

O modelo que apresentou o melhor valor do coeficiente de predição interno (para a série de treinamento) apresentou três variáveis latentes (menor valor de PRESS – soma dos quadrados dos erros de previsão).

Como a capacidade do modelo de previsão diminui com o aumento do número de variáveis latentes (dado pelo valor de PRESS), mesmo que a porcentagem da variância total seja de aproximadamente 67%, foram consideradas apenas três fatores para a construção do modelo. O valor do SEV (erro padrão de validação) é útil quando se deseja avaliar se o modelo superdimensiona, ou não, o número de variáveis latentes.

Os valores dos quadrados dos coeficientes de predição interna (Q) e externa (R), calculados foram, ambos, maiores que 0,6, ou seja, há uma boa correlação entre os valores observados e calculados para o logaritmo da atividade.

A Tabela 18 mostra os valores da variância acumulativa, de SEV e de PRESS, e também os coeficientes de ajuste de regressão e de predição interno para as

9 variáveis latentes, obtidas através da validação cruzada, excluindo-se três amostras por vez.

Tabela 18 – Resultados do modelo PLS utilizando as nove variáveis e validação cruzada (excluindo 3 amostras por vez)

	Variância	SEV	PRESS	Q	R
Fator 1	36,48	0,44	4,52	0,627	0,704
Fator 2	56,19	0,41	4,81	0,696	0,799
Fator 3	67,90	0,40	3,66	0,715	0,822
Fator 4	72,64	0,43	4,28	0,691	0,860
Fator 5	83,35	0,45	4,70	0,675	0,845
Fator 6	91,97	0,43	4,22	0,703	0,852
Fator 7	94,04	0,42	4,07	0,714	0,855
Fator 8	96,96	0,42	1,01	0,701	0,856
Fator 9	100,00	0,42	4,04	0,700	0,856

Na Tabela 18, o valor de R mostra que a variabilidade total do modelo gerado é capaz de explicar mais de 80% da variabilidade total dos valores observados para a atividade biológica. A Tabela 19 mostra os resíduos de validação interna do modelo. A reta de regressão resultante para esse modelo pode ser vista na Figura 22.

Tabela 19 – Valores previstos pelo PLS

Naftoi	Valor medido	Valor previsto	Resíduo de Validação
01-a	4,81	5,01	-0,20
02-a	4,81	4,41	0,40
03-a	4,43	4,16	0,27
05-a	4,40	3,56	0,85
06-a	4,07	3,75	0,32
07-a	4,04	3,70	0,34
9-ma	3,89	3,36	0,53
10-ma	3,83	3,60	0,23
11-ma	3,81	4,61	-0,80
12-ma	3,72	4,13	-0,41
14ma	3,61	3,66	-0,05
15-ma	3,59	3,25	0,34
16-ma	3,52	3,28	0,24
17-ma	3,43	3,63	-0,20
19-ma	3,29	2,84	0,45
20-mi	3,24	3,05	0,18
21-i	2,97	3,62	-0,65
22-i	2,96	3,05	-0,09
24-i	2,73	2,81	-0,08
25-i	2,70	3,21	-0,52
26-i	2,64	3,58	-0,94
27-i	2,51	2,89	-0,37
29-i	2,10	2,00	0,10

Figura 22 – Reta de regressão obtida pelo PLS utilizando as 9 variáveis selecionadas e validação cruzada (excluindo três amostras por vez).

O vetor de regressão gerado pode ser expresso pela equação:

$$\text{Log ativ} = -0,16\text{Mor17p} - 0,18\text{piPC09} - 0,12\text{BELp6} + 0,14\text{R4u} - 0,20\text{RCI} - 0,13\text{RDF065v} - 0,14\text{RDF060p} - 0,16\text{X4A} - 0,12\text{RDF035m}$$

Através da equação de regressão, observa-se que apenas a variável R4u contribui de maneira positiva para a atividade biológica enquanto, que todas as demais contribuem de maneira inversa.

III.7.1- Validação externa do modelo PLS

Para que o modelo PLS possa ser utilizado na predição da atividade biológica, sua validação externa poderá ser feita utilizando-se um conjunto teste, que não faça parte do conjunto utilizado para a construção do modelo e cuja atividade seja conhecida.

Assim, os seis compostos do conjunto teste foram utilizados. Os valores previstos e os determinados experimentalmente estão na Tabela 20, juntamente com os resíduos calculados.

Tabela 20 – Valores previstos pelo modelo PLS

Naftoi	Valor medido	Valor previsto	Resíduo de Validação
04-a	4,43	4,33	0,09
08-a	4,01	3,59	0,42
13-ma	3,64	3,39	0,25
18-ma	3,35	3,15	0,20
23-i	2,73	2,48	0,25
28-i	2,19	2,48	-0,29

Pela Tabela 20, percebe-se que a maioria dos resíduos de validação está em torno de 0,2. Embora os valores previstos não estejam muito próximos dos valores medidos experimentalmente, o modelo consegue prever, de maneira satisfatória, se um composto similar será ativo, moderadamente ativo ou inativo.

III.8 – Considerações finais

A motivação para a escolha dos compostos estudados foi o fato de que, de todos os compostos naftoquinônicos e seus derivados, os naftoimidazóis, apresentarem maior inibição do *T. cruzi*.

Outro fator decisivo é que, em relação as naftoquinonas, as propriedades que são relevantes para a sua atividade, já foram identificadas e descritas na literatura [Malta *et al.*, 2003; Molfetta *et al.*, 2005].

Assim, de todos os naftoimidazóis descritos na literatura, 29 compostos foram selecionados para a geração de um modelo estatístico que pudesse identificar

quais propriedades são importantes para a atividade, e gerar um modelo de previsão para a análise de compostos similares.

O mecanismo de ação destes compostos ainda não foi esclarecido em detalhes, mas, ao contrário das naftoquinonas, os naftoimidazóis não causarão danos ao parasita através do stress oxidativo, uma vez que na presença de agentes redutores, não formaram facilmente espécies reativas de oxigênio como as naftoquinonas [Pinto, Menna-Barreto, De Castro, 2006].

Os dados estruturais desta série de compostos foram submetidos a uma busca conformacional e, a partir da conformação de menor energia, foram calculados diversos tipos de propriedades de caráter eletrônico, estrutural e topológico, entre outros.

A análise dos resultados obtidos mostrou que as propriedades eletrônicas, relacionadas com a capacidade de doar e receber elétrons destes compostos - como os orbitais de fronteira HOMO e LUMO, por exemplo - que poderiam influenciar a transferência de carga entre o composto e o sítio receptor, não são relevantes para esta série de compostos. Isso é o contrário do que ocorre com as naftoquinonas, no qual as diferenças de energia do orbital HOMO-1 (energia do primeiro orbital molecular abaixo do HOMO) mostraram que essa é uma propriedade importante para a diferenciação entre naftoquinonas ativas e inativas [Molfetta *et al.*, 2005]. Estas constatações indicam que o mecanismo de inibição dos compostos apresentados neste trabalho deve ser diferente.

Todos os compostos da série naftoimidazólica apresentam estrutura molecular muito próxima. Dentre os 29 analisados, 25 apresentam apenas a variação no substituinte e da posição no anel fenila, presente no esqueleto molecular. Assim, grande parte das propriedades calculadas para estes compostos não teve relevância para a distinção entre ativos, moderadamente ativos e inativos.

Na realidade, existe uma diferença muito grande de atividade biológica dentro desta série, e não foi encontrada uma relação direta entre o tipo de substituinte (e sua posição) com o valor da atividade biológica obtido.

Como exemplo, pode-se citar os substituintes flúor, cloro e bromo - que apesar de possuírem propriedades químicas muito próximas, na posição orto são, respectivamente, moderadamente ativo, ativo e inativo; na posição para eles, são,

respectivamente: ativo, inativo e ativo, e, finalmente, na posição meta, temos: moderadamente ativo para flúor e bromo, e inativo para cloro.

O uso de métodos estatísticos aplicados à química (Quimiometria) torna possível interpretar um grande conjunto de propriedades e obter o máximo de informações sobre o sistema químico de interesse. Com este intuito, foram feitas análises exploratórias das propriedades calculadas e análises de regressão.

Foram realizadas inúmeras tentativas de agrupar compostos semelhantes num espaço multivariado, de acordo com suas características, através dos métodos de análise exploratória dos dados. Porém, a análise de componentes principais (PCA) e a análise hierárquica de grupos (HCA) não foram conclusivas, o que evidencia a falta de métodos como estes que sejam capazes de analisar compostos muito semelhantes.

Foi feita, posteriormente, uma análise de regressão - capaz de correlacionar de modo quantitativo as variáveis independentes (propriedades calculadas) com uma variável dependente. Para isto, foi utilizado o método de mínimos quadrados parciais (PLS), construído e validado interna e externamente.

Das inúmeras propriedades calculadas pelo programa Dragon, nove delas conseguiram relacionar a atividade biológica destes compostos em função da sua estrutura molecular. São elas: Morp17p, X4a, piPC09, RDF065v, BELp6, RDF060p, R4u, RDF035m e RCI.

Embora estas propriedades não tenham um significado físico claro, por serem descritores derivados da descrição matemática das estruturas, elas conseguem, através de um modelo de PLS, prever o valor da atividade biológica de futuros compostos similares a estes.

IV – Docking

O docking é uma poderosa ferramenta para o estudo e análise dos modos de ligação e reconhecimento entre moléculas. Inicialmente, foi utilizado apenas para prever os complexos formados entre proteínas e ligantes, supondo que fossem formados por interações não-covalentes.

Hoje, este tipo de estudo foi estendido. Além disso, são feitos também estudos para complexos covalentes como, por exemplo, o descrito no trabalho de Cunha *et al.* [2006] que mostra o docking do composto 1-cloro-2-triclorotelúrio-3-fenil-propeno-2-ol na enzima catepsina B.

O docking tem sido também utilizado na avaliação do modo de reconhecimento de proteína-proteína, proteína-DNA e DNA-ligantes, entre outros.

Quando o receptor é uma proteína e os ligantes são compostos candidatos a fármacos, o docking fornece um meio de avaliar os compostos-líder de uma família de moléculas ou, ainda, de sugerir possíveis modificações nas moléculas, de forma que possam ser mais eficientes no efeito desejado.

O docking pode ser considerado um experimento *in silico* (no âmbito da simulação computacional), onde são escolhidos os reagentes (receptor e ligante) e o meio de reação (o software). Porém, os softwares existentes apresentam conceitos diferentes.

O sistema computacional Dock3.5 [Kuntz, 1992; Kuntz, Meng, Shoichet, 1994], utilizado nos cálculos realizados neste trabalho, apresenta a aproximação de corpos rígidos, com a possibilidade de obter orientações relativas entre o receptor e o ligante, com a função escore sendo dada por:

$$E = \sum_{i=1}^{lig} \sum_{j=1}^{rec} \left[\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} + 332,0 \frac{q_i q_j}{D r_{ij}} \right] \quad (1)$$

onde: cada termo é a dupla soma sobre os átomos *i* do ligante e os átomos *j* do receptor; *A_{ij}* e *B_{ij}* são os parâmetros de atração e repulsão de van de Waals; *r_{ij}* é a distância entre o átomo *i* e *j*; *q_i* e *q_j* são as cargas pontuais de *i* e *j*; *D* é a função dielétrica e 332,0 é o fator de conversão a kcal/mol.

Outros sistemas computacionais permitem a flexibilização do ligante.

No presente caso, apesar dos ligantes terem sido considerados corpos rígidos, foram analisados os compostos e alguns de seus confôrmeros, o que permitiu uma análise similar à de ligantes semi-flexíveis.

IV.1 – Metodologia

O estudo de docking pode ser dividido em três etapas principais:

- 1) Preparação do receptor;
- 2) Preparação dos ligantes;
- 3) Docking e análise dos resultados em tela gráfica.

IV.1.1 – Preparação do receptor

As coordenadas das estruturas tridimensionais das enzimas utilizadas neste trabalho foram obtidas no *Protein Data Bank* – PDB (PDB – www.rcsb.org/pdb) e *PDBSum* (PDBSum – www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum). Estes bancos de dados contêm as informações sobre as estruturas tridimensionais de proteínas e ácidos nucleicos. Foram consideradas as enzimas glutathione reductase humana GR (códigos 1GRE e 1XAN) e a tripanotona reductase (TR) do *T. cruzi* (1BZL).

A enzima humana, sob o código 1GRE, possui substrato reduzido (2 GSH) complexado ao sítio ativo, enquanto que a macromolécula, sob o código 1XAN, apresenta o inibidor xantona complexado ao sítio da interface; ambas apresentam resolução de 2 Å.

A enzima TR, por sua vez, apresenta como ligante o seu substrato, com resolução de 2,4 Å.

Para as três enzimas estudadas, foram adicionados os hidrogênios, por meio da sub-rotina addprh do Programa Dock3.5. Os sítios escolhidos para estudo da formação de complexos foram:

- (a) o sítio ativo da enzima 1GRE;
- (b) o sítio da interface da enzima 1XAN;
- (c) o sítio ativo e da interface de 1BZL.

A seleção, descrição dos sítios e validação da metodologia está descrita no trabalho de Vega-Tejido, Caracelli, Zukerman-Schpector [2006], no qual foi feita, também, uma correlação com dados experimentais publicados anteriormente [Paulino *et al.*, 2002].

IV.1.2 – Preparação dos ligantes

Como ligantes, foram selecionadas algumas naftoquinonas (Figura 23), duas das quais apresentadas neste trabalho e outras cujas estruturas cristalina e molecular foram determinadas anteriormente no Grupo de Cristalografia do IQSC por Malta (2000), ou seja:

- 3,4-diidro-2,2-dimetil-2H-nafto[1,2-b]pirano-5,6-diona (beta);
- 2,3-dimetil-1,4-naftoquinona (naftoq-01);
- 2,6-dimetil-1,4-naftoquinona (naftoq-02);
- 2-hidroxi-3-metil-1,4-naftoquinona (naftoq-03);
- 2-(N-pirrolidinil)-1,4-nafto-quinona (naftoq-04);
- 3,4-diidro-2,2-dimetil-5,10-diona-2H-nafto[2,3-b]pirano (alfa).

Também foram escolhidos, como ligantes, os compostos naftoimidazóis, derivados das naftoquinonas (Figura 23) – por apresentarem uma atividade biológica muito superior ao das naftoquinonas [De Moura *et al.*, 2001; 2004]. Suas coordenadas foram obtidas por modelagem molecular. Neste caso, a estrutura correspondente à molécula β -lapachona foi obtida dos dados cristalográficos e os demais átomos da estrutura foram modelados como descrito anteriormente.

Os ligantes naftoimidazóis escolhidos para a modelagem foram os que apresentaram os melhores valores de inibição frente ao parasita, sendo eles:

- 4,5-diidro-6,6-dimetil-6H-2-(fenil)-pirano[b-4,3]nafto[1,2-d]-imidazol (naftoi-01);
- 4,5-diidro-6,6-dimetil-6H-2-(2-metil-fenil)-pirano[b-4,3]-nafto[1,2-d]imidazol (naftoi-02);

4,5-diidro-6,6-dimetil-6H-2-(3-metil-fenil)-pirano[b-4,3]nafto-[1,2-d]imidazol (naftoi-03);
4,5-diidro-6,6-dimetil-6H-2-(4-metil-fenil)-pirano[b-4,3]nafto[1,2-d]imidazol (naftoi-04).

Como existe a possibilidade de mais de um confôrmero para os compostos naftoi-02 e naftoi-03, os mesmos foram incluídos no estudo de docking.

O programa Dock 3.5 utiliza a abordagem de corpos rígidos, em que apenas a orientação do ligante dentro do sítio é variada; assim considerando-se os confôrmeros dos compostos como ligantes, pode-se considerar que o estudo em questão é similar ao de docking semi-flexível.

Figura 23 - Compostos escolhidos para o estudo das possíveis formações dos complexos nos sítios de interação das proteínas TR e GR.

IV.1.3 - Docking e Análise dos Resultados em Tela Gráfica

No arquivo de resultados de saída do programa estão as orientações geradas e que devem ser analisadas com o auxílio de um programa gráfico.

As orientações obtidas para os ligantes foram organizadas em grupos com o objetivo de identificar, em primeiro lugar, o índice de repetição e de significância da orientação; e, posteriormente, qual desses grupos gerados tem uma orientação mais favorável do ponto de vista estrutural, energético e de complementaridade química.

A avaliação foi feita com o auxílio do programa gráfico “O” [Jones; Kjeldgard, 1998]. Para a representação dos complexos formados utilizou-se o programa Ds visualizer 2.0.1 [2008].

IV.2 – Análise dos complexos nos sítios de interação da TR e da GR

A energia total de cada complexo formado é dada pela soma da contribuição da energia eletrostática e da energia de van der Waals.

Pode-se dizer que a energia eletrostática é a responsável pelo reconhecimento, orientação e a estabilidade do ligante dentro do sítio, enquanto que a energia de van der Waals está mais relacionada à adaptação geométrica do ligante dentro do mesmo.

Na Tabela 21 são apresentados os resultados obtidos dos cálculos de docking, em que se pode observar a contribuição destas energias calculadas para todos os ligantes em cada sítio de interação.

Em todos os complexos formados, a contribuição da energia de van der Waals prevalece na energia total. Este comportamento segue o mesmo padrão encontrado em estudos de docking dos compostos derivados do nitrofurano e do nitrotiofeno, publicados recentemente [Vega-Tejido; Caracelli; Zukerman-Schpector, 2006].

Tabela 21 - Média dos valores da energia eletrostática e de van der Waals (kcal/mol) para cada complexo formado

	TR				GR			
	Eletrostática		van der Waals		Eletrostática		van der Waals	
	A	I	A	I	A	I	A	I
Alfa	-1,43	-1,94	-14,51	-21,46	-1,26	-0,25	-22,07	-30,08
Beta	-1,03	-2,36	-15,68	-21,64	-2,55	-0,67	-23,57	-29,57
Naftoq-01	-0,10	-1,96	-14,64	-18,88	-1,11	-0,76	-21,58	-26,84
Naftoq-02	-0,90	-1,59	-13,12	-19,72	-0,52	-0,94	-19,97	-27,44
Naftoq-03	-1,41	-1,85	-13,60	-18,83	-1,59	-0,99	-21,34	-27,11
Naftoq-04	-2,02	-4,44	-14,61	-21,85	-4,66	-1,82	-20,07	-29,12
Naftoi-01	-1,30	-1,96	-17,32	-30,42	-1,68	-0,39	-21,49	30,66
Naftoi-2A	-1,08	-0,71	-19,28	-31,66	-1,57	-0,58	-19,37	-32,30
Naftoi-2B	-0,72	-1,40	-18,10	-31,03	-1,80	-0,55	-22,09	-31,05
Naftoi-2C	-0,77	-0,80	-18,43	-31,83	-1,29	+0,41	-19,56	-29,86
Naftoi-3A	-1,07	-1,04	-18,01	-30,44	-1,87	-0,16	-24,07	-31,83
Naftoi-3B	-0,88	-1,30	-17,77	-31,40	-0,41	-0,34	-21,59	-30,69
Naftoi-04	-1,01	-1,17	-17,94	-31,70	-1,56	-0,71	-19,98	-31,27

A: sítio ativo; I: sítio da interface.

IV.2.1 – Análise dos complexos formados com compostos naftoquinônicos

Na Tabela 22, estão apresentados os valores médios da energia de ligação para cada ligante complexado nos sítios de interesse das proteínas, assim como a porcentagem de repetição, ou seja, do total de complexos formados para cada ligante, quantas orientações são idênticas ou muito próximas. Os valores mostrados serão discutidos por sítio de interação.

Tabela 22 - Valores médios da energia total (kcal/mol) para todos os sítios e ligantes e porcentagem de repetição

	TR				GR			
	Energia		% repetição		Energia		% repetição	
	A	I	A	I	A	I	A	I
Alfa	-15,94	-23,40	26	31	-23,33	-30,33	89	92
Beta	-16,71	-24,00	68	33	-26,12	-30,24	54	42
Naftoq-01	-15,64	-20,83	44	55	-22,69	-27,60	35	58
Naftoq-02	-14,01	-21,31	25	20	-20,48	-28,38	34	26
Naftoq-03	-15,03	-20,67	20	30	-22,93	-28,10	44	71
Naftoq-04	-16,63	-26,29	25	27	-24,73	-30,94	29	65

A: sítio ativo; I: sítio da interface.

IV.2.1.1 - Sítio ativo da TR

Os dados apresentados na Tabela 22 mostram que todos os complexos naftoquinônicos formados no sítio ativo da TR apresentaram uma energia de ligação muito alta e uma baixa porcentagem de repetição, o que indica uma não-especificidade para esta série de ligantes neste sítio.

A análise visual dos complexos formados, juntamente com os dados de energia e de repetição de orientação, mostrou que, de todos os ligantes naftoquinônicos, o único que tem possibilidade de atuar como inibidor no sítio de ligação da tripanotona é o composto β -lapachona, por ter maior especificidade no modo de ligação, ainda que o valor da sua energia de ligação não seja muito alto. O modo de orientação deste ligante dentro do sítio pode ser visualizado na Figura 24.

Pela Figura 24, observa-se que o ligante beta está localizado próximo ao sítio catalítico da TR. A alta energia de ligação pode ser explicada pelo pequeno número de interações que este ligante é capaz de fazer dentro do sítio, no qual há apenas duas ligações de hidrogênio com a serina Ser15 (a uma distância de 2,82 e 2,94 Å, representadas por um traçado) e interações com a valina Val59 (aminoácidos em destaque). Os resíduos cisteína Cys53, histidina His461', leucina Leu399 e tirosina

Tyr111 foram colocados na figura com o intuito de facilitar a visualização do ligante dentro sítio ativo da TR.

Figura 24 – Modo de ligação da β -lapachona no sítio ativo da TR.

Um fato relevante é que este ligante não faz interações com os aminoácidos responsáveis pela atividade catalítica, Cys53, Cys58 e His461', apesar de estar próximo destes resíduos.

IV.2.1.2 - Sítio ativo da GR

Embora a energia de ligação para as naftoquinonas, no sítio ativo da GR, seja mais baixa do que no mesmo sítio da TR, a baixa porcentagem de repetição indica que, também neste caso, tal série de compostos é pouco específica para este sítio (Tabela 22). Observou-se que apenas as naftoquinonas alfa e beta possuem maior especificidade e probabilidade de formarem complexos.

Pelas Figuras 25 e 26, pode ser observado que os ligantes alfa e beta formaram complexos na mesma região do sítio.

Figura 25 – Modo de ligação da α -lapachona no sítio ativo da GR.

No caso do ligante alfa, embora sua energia de ligação seja favorável à formação de complexos, ele não faz interações com nenhum dos aminoácidos envolvidos diretamente na reação catalítica (Cys58, Cys63, His467'). Há, no entanto, formação de duas ligações de hidrogênio (valores em Å mostrados na Fig. 25) entre alfa e os resíduos glicina Gly55 e arginina Arg347 e, ainda, interações com os resíduos serina Ser30, leucina Leu33 e valina Val59, que contribuem para a estabilidade deste complexo.

Para o ligante beta, observa-se que a posição do anel pirano favorece a formação do complexo, do ponto de vista da complementaridade química e energética.

Figura 26 – Modo de ligação da β -lapachona no sítio ativo da GR.

Na Figura 26, está representada a formação do complexo, onde se pode observar que há ligações de hidrogênio com os resíduos da Cys58 e His467' e Glu472' (distâncias em Å mostrados na Fig. 26). O resíduo Glu472' contribui na atividade catalítica pois estabiliza a orientação do anel imidazol através de uma ligação de hidrogênio, da carbonila com o anel da histidina His460' que participa diretamente da redução da glutathione. Existem ainda, ligações de hidrogênio com os resíduos Gly55, Tyr114, Arg347 e interações com o resíduo Ser30.

O aumento no número de interações no complexo formado com a beta pode explicar a diferença de energia encontrada para este complexo, quando comparado ao ligante alfa (Figura 25).

IV.2.1.3 - Sítio da interface da TR

A análise energética e estrutural dos ligantes naftoquinônicos no sítio da interface da TR mostrou que estes ligantes se adaptam melhor a este sítio em relação ao sítio ativo. Embora as ligações sejam energeticamente mais favoráveis em relação ao sítio ativo, os resultados obtidos indicam que os ligantes naftoquinônicos são pouco específicos para a formação dos complexos, uma vez que este sítio é relativamente grande para acomodar os ligantes, tornando-os pouco específicos no modo de ligação dentro da interface desta proteína.

Dos ligantes pertencentes a esta série, somente o composto naftoq-01 tem maior especificidade neste sítio, como mostra a Figura 27.

Figura 27 – Modo de ligação do composto naftoq-01 no sítio da interface da TR.

Na Figura 27 observa-se que o ligante naftoq-01 está posicionado numa região mais central do sítio, próximo ao eixo de ordem dois existente entre os monômeros.

O anel naftalênico do ligante naftoq-01 faz ligações de hidrogênio com His73', Thr66 e Tyr70 (resíduos mais próximos da superfície da proteína, onde se encontram as His73 e His73'), e as metilas formam ligações de hidrogênio com os resíduos que estão na região mais interna deste sítio, os resíduos da asparagina Asn433 e Asn433' (valores mostrados em Å na Fig. 27). Há também interações com os resíduos da His73, Gln69, Thr66 e Asp432, que contribuem para a estabilidade deste ligante dentro do sítio.

Dos dez aminoácidos, que são conservados nas cinco estruturas da tripanotona redutase encontrada nos parasitas e ausentes na estrutura da GR, o ligante naftoq-01 é capaz de interagir com Thr66, Gln69, Trp70 e Asp432.

IV.2.1.4 - Sítio da interface da GR

Dos quatro sítios estudados, o da interface da GR é onde os compostos naftoquinônicos apresentam melhor padrão de orientação - consequência do formato deste sítio, que facilita a orientação de compostos com estruturas planares, por causa da posição dos resíduos da Phe78 e Phe78', que estabilizam os complexos formados via interações do tipo π *stacking* - o que contribui para uma maior especificidade destes ligantes neste sítio de interação.

Da série das naftoquinonas, todos os ligantes se complexaram entre estes resíduos, porém, os que apresentaram maior especificidade dentro do sítio foram os compostos alfa, naftoq-01, naftoq-3 e naftoq-4.

A análise gráfica destes complexos formados mostrou que estes ligantes se orientam de maneira similar, formando um padrão de ligação único, no qual os ligantes estão localizados no centro da cavidade formada pelos monômeros, entre os resíduos das Phe78 e Phe78', como pode ser observado na Figura 28.

Figura 28 – Modo de ligação do composto naftoq-01 no sítio da interface da GR.

Na Figura 28, pode-se notar que o complexo formado com o ligante naftoq-01 está localizado entre os anéis dos resíduos Phe78 e Phe78'. A distância entre os centróides do anel fenila e do anel quinônico é de 3,9 e 4,1 Å, para Phe78 e Phe78', respectivamente. Além da interação entre os anéis, o ligante naftoq01 faz ligações de hidrogênio com o anel imidazol, presente nas histidinas, His75 e His75'.

Em relação aos contatos existentes entre os ligantes e os aminoácidos contidos nesta região, constatou-se que, em todas as naftoquinonas estudadas, os ligantes interagem, principalmente, com os resíduos que estão próximos às Phe78 e Phe78'.

IV.2.1.2 – Comparação dos complexos naftoquinônicos formados nos possíveis sítios de interação da GR e da TR

Os dados apresentados na Tabela 22, juntamente com a análise gráfica de todos os ligantes estudados, indicam que todos os complexos formados com os ligantes naftoquinônicos no sítio ativo da TR apresentaram alta energia de ligação e uma baixa porcentagem de repetição, mostrando uma não-especificidade desta série de ligantes em relação ao sítio.

A comparação entre os dois sítios de ligação da tripanotona redutase indica que, embora não exista um padrão de ligação para as naftoquinonas também no sítio da interface, existe uma pequena tendência destes ligantes formarem complexos mais facilmente neste sítio.

Do ponto de vista energético, geométrico e estrutural, para o composto beta há a possibilidade maior de ligação no sítio ativo da TR, cujo complexo pode ser estabilizado através de ligações de hidrogênio e outras interações, o que não ocorre para os demais ligantes. Para o composto beta, tanto no sítio ativo da TR (Figura 24) quanto no da GR (Figura 26) é possível formar complexos, o que sugere que este composto possa atuar como inibidor em ambos os casos, sendo pouco específico em relação ao alvo biológico, que, neste caso, é a inibição da TR.

As análises indicam também que estes compostos possuem maior tendência à inibição da enzima humana e não à do parasita, ligando-se, sobretudo, no sítio da interface da GR, por apresentar energia de ligação mais baixa e maior complementaridade química para todos os casos analisados.

IV.2.2 – Análise dos complexos formados com compostos naftoimidazólicos

Na Tabela 23, são apresentados os valores médios da energia de ligação para cada ligante naftoimidazólico complexado nos sítios de interesse da TR e da GR, assim como sua porcentagem de repetição.

Tabela 23 - Valores médios da energia total (kcal/mol) para todos os sítios e ligantes e porcentagem de repetição

	TR				GR			
	Energia		% repetição		Energia		% repetição	
	A	I	A	I	A	I	A	I
Naftoi-01	-18,62	-32,38	33	52	-23,16	-31,05	40	50
Naftoi-2A	-20,36	-32,38	27	62	-20,94	-32,87	40	25
Naftoi-2B	-18,82	-32,44	25	39	-23,89	-31,59	76	19
Naftoi-2C	-19,20	-32,63	51	83	-20,86	-29,45	57	75
Naftoi-3A	-19,07	-31,48	33	49	-25,94	-31,99	54	79
Naftoi-3B	-18,65	-32,70	23	40	-22,00	-31,03	22	66
Naftoi-04	-18,95	-32,87	25	77	-21,54	-31,98	44	57

A: sítio ativo; I: sítio da interface

IV.2.2.1 - Sítio ativo da TR

Analisando as interações dos complexos em tela gráfica e avaliando os dados apresentados na Tabela 23, verificou-se que os ligantes naftoimidazólicos possuem pouca especificidade e baixa energia de ligação em relação ao sítio ativo da TR. Desta série de compostos, constatou-se que apenas o conformero do composto naftoi-2C terá maior possibilidade de se ligar neste sítio, na Figura 29.

Figura 29 – Modo de ligação do composto naftoi-2C no sítio ativo da TR.

Na Figura 29, observa-se que o ligante está próximo à Cys53, fazendo uma ligação de hidrogênio com o enxofre deste resíduo e interações com o anel imidazol da His461', que atua diretamente no transporte de prótons durante a redução da tripanotiona. Além da Cys53 e da His461', há ligações de hidrogênio e interações com os resíduos Tyr111, Ser15, Val59 e Leu399. Nesta figura são mostrados os valores das ligações de hidrogênio em Å.

Para o ligante naftoi-2C, observa-se que o grupo fenila está direcionado para uma região hidrofóbica do sítio, formada pelos resíduos Leu399, Val59 e Ile107, denominada de sítio Z, no qual a molécula de tripanotiona não se liga, mas algumas fenotiazinas podem ligar-se inibindo a atividade desta proteína [Khan *et al.*, 2000].

IV.2.2.2 - Sítio ativo da GR

A análise dos complexos formados no sítio ativo da enzima humana indicou que os compostos que possuem a metila nas posições orto e para do anel fenil são os que têm maior possibilidade de ligação e inibição da proteína, tanto do ponto de vista energético quanto de complementaridade química.

Em relação aos isômeros conformacionais do composto naftoi-02, além do ligante naftoq-2B, existe também a possibilidade de ligação do isômero naftoi-2C. Porém, a análise das interações e das energias demonstrou que o isômero 2B tem maior probabilidade de interagir dentro deste sítio.

Outro composto que também pode se ligar no sítio ativo da GR é o confôrmero naftoi-3A. As Figuras 30 e 31 mostram o modo de ligação no sítio ativo da TR dos ligantes naftoi-2B e naftoi-3A, respectivamente.

Figura 30 – Modo de ligação do composto naftoi-2B no sítio ativo da GR.

Figura 31 – Modo de ligação do composto naftoi-3A no sítio ativo da GR.

Pelas Figuras 30 e 31 pode-se observar que o modo de ligação mais provável para os compostos naftoi-2B e naftoi-3A não é similar. Ainda assim, estas estruturas são capazes de fazer diversas interações dentro do sítio.

Uma importante diferença entre estes ligantes é que, no complexo formado com o ligante naftoi-2B, há interações com os resíduos Cys58 e His467', em que o átomo de enxofre da cisteína Cys58 faz uma ligação de hidrogênio com o anel naftalênico do composto naftoi-2B e, como a região tricíclica deste ligante está próxima do resíduo da His467', há uma ligação de hidrogênio com um H do anel naftalênico. O mesmo não ocorre para o ligante naftoi-3A.

Um fato relevante é que o anel fenila do ligante naftoi-2B está localizado numa região do sítio onde interage com a região Glu-Cys-Cly-I da glutathione [Karplus; Pai; Schulz, 1989]. Nesta região, há vários resíduos carregados, e este ligante é capaz de interagir com as argininas Arg347 Arg37, presentes na região. No caso do ligante naftoi-3A, o anel fenila está próximo do sítio catalítico, estabilizado por ligações de hidrogênio com Ser e Tyr114.

Em relação à estrutura tricíclica do anel, observa-se a formação de ligações de hidrogênio com o resíduo carregado Glu41 e com Thr476'. O composto naftoi-2B também é estabilizado por interações com os resíduos Ala34, Arg37,

Tyr114, Ile343, Arg347 e Met406'. Por outro lado, composto naftoi-3A faz outras interações, além das ligações de hidrogênio, com Arg37 e Arg347.

IV.2.2.3 - Sítio da interface da TR

A análise energética e estrutural dos ligantes naftoimidazólicos no sítio da interface da proteína presente no *T. cruzi* mostrou que estes ligantes se adaptam melhor a este sítio do que no sítio ativo, aumentando a possibilidade de estes compostos inibirem esta proteína do parasita em relação às naftoquinonas.

Para ilustrar o modo de ligação nos complexos formados dos ligantes naftoi-01, naftoi-02 A e C, naftoi-3A e naftoi-04, a Figura 32 apresenta o complexo formado com confôrmero naftoi-2C neste sítio.

Figura 32 – Modo de ligação do composto naftoi-2C no sítio da interface da TR.

Na Figura 32, pode-se observar que o ligante naftoi-2C é capaz de fazer ligações de hidrogênio com os resíduos carregados His73', Glu76 e Asp432, assim como com os resíduos polares Asn433 e Asn433', Gln69, e Thr66, aumentando a estabilidade do complexo formado.

É importante ressaltar que, quando compostos se ligam no sítio da interface e interagem com os resíduos de aminoácidos carregados como Lys62, His73

e Glu76, eles podem influenciar o centro redox ativo da TR, presente nesta mesma hélice - formada pela sequência de aminoácidos 63-80 [Vega-Tejido; Caracelli; Zukerman-Schpector, 2006].

Um fato relevante é que em todos os possíveis inibidores da TR para este sítio, naftoi-01, naftoi-02 A e C, naftoi-3A e naftoi-04, o anel fenila está próximo ao canal que liga os dois sítios de um dos monômeros. Assim, todos estes compostos estão direcionados para a mesma região hidrofóbica, localizada numa região mais interna da interface, formada pelos aminoácidos Pro371, Met400 e Phe367, como mostra a Figura 32.

IV.2.2.4 - Sítio da interface da GR

Dos quatro sítios estudados, o da interface da GR é onde os ligantes naftoimidazólicos apresentam o melhor padrão de orientação, como ocorre também com os compostos naftoquinônicos, devido à presença dos aminoácidos Phe78 e Phe78' que estabilizam as estruturas de ligantes planares, via interações do tipo π *stacking*.

Como esperado para este sítio, os ligantes se orientam de maneira similar, formando complexos no centro da cavidade formada pelos monômeros. Da série de compostos estudada, apenas os confôrmeros naftoi-2A e naftoi-2B apresentaram pouca especificidade dentro do sítio.

Na Figura 33, pode-se observar que a região rígida do esqueleto molecular deste ligante está orientada entre os resíduos da fenilalanina, formando um tipo de “sanduíche” (Phe78 e Phe78'), o que contribui para a estabilidade do complexo formado através da interação π existente entre os anéis, que ocorre a uma distância de 3,9 e 4,1 Å para a Phe78 e Phe78', respectivamente.

Como há um padrão de ligação único para esta série, no qual a orientação destes ligantes dentro do sítio da interface da GR é muito similar, apenas um complexo foi selecionado para demonstração do modo de ligação, de acordo com a Figura 33.

Figura 33 – Modo de ligação do composto naftoi-04 no sítio da interface da GR.

Além das interações com as fenilalaninas, o ligante naftoi-04 faz ligações de hidrogênio com os resíduos Asn71, Asn71', Asp441' e Glu442' (valores em Å mostrados na Fig.33), ainda há interações com os aminoácidos Lys67', Val74, His75, His75', Trp70, Tyr407'.

No caso desta série de compostos, o aumento de volume da estrutura molecular propicia um maior número de interações, favorecendo energeticamente a formação dos complexos.

O aumento do número de interações, sobretudo com os aminoácidos positivamente carregado Lys67, e, negativamente carregados, AspB441' e GluB442', faz com que estes compostos possam atuar como inibidores não competitivos, através de transferência de cargas através da hélice que conecta este sítio ao sítio ativo.

A análise das orientações dos confôrmeros naftoi-2A e B mostrou que a presença da metila na posição orto do anel fenila acarreta um impedimento estérico em relação à asparagina Asn71', diminuindo a possibilidade de ligação destes compostos no sítio da interface da GR.

IV.2.2.3 – Comparação dos complexos naftoimidazólicos formados nos possíveis sítios de interação da GR e da TR

O estudo de docking realizado com os compostos naftoimidazólicos apontou que estes compostos, tanto do ponto de vista energético quanto da complementaridade química, possuem probabilidade muito pequena de se ligarem no sítio ativo da TR, quando comparado aos outros três sítios estudados.

Os resultados obtidos no sítio ativo da TR mostraram que, de todos os ligantes estudados, o composto naftoi-2C tem maior especificidade e probabilidade para se ligar neste sítio. Porém, do ponto de vista energético, há uma diferença de mais de 10 kcal/mol entre este sítio e o sítio da interface, indicando uma clara tendência deste ligante se complexar primeiro no sítio da interface. Todos os outros ligantes possuem probabilidade de formarem complexos no sítio da interface, exceto naftoi-2b e naftoi-3B.

Esta é uma tendência geral também observada no caso da enzima humana, no qual se pode observar maior preferência para o sítio da interface, mostrando que estes compostos possuem uma baixa energia de ligação, uma alta especificidade dentro do sítio, e ainda há um grande número de interações que contribuem para a formação dos complexos.

IV.3 – Considerações finais

Os resultados obtidos neste estudo de docking demonstram que, do ponto de vista energético e de complementaridade química, os compostos naftoquinônicos e naftoimidazólicos têm probabilidade muito pequena de se ligarem no sítio ativo da TR. Do ponto de vista estrutural, esperava-se que os compostos estudados pudessem interagir com os aminoácidos que formam uma parede hidrofóbica presente no sítio ativo da TR, no qual interage a porção espermidina da estrutura da tripanotiona, o que confere à TR características diferenciadas quando comparada ao sítio ativo da GR, como mencionado anteriormente. Porém, as duas séries de ligantes fazem interações apenas com o resíduo da Tyr110, presente nesta região.

Comparando os resultados obtidos nos quatro sítios de ligação para a série das naftoquinonas, constatou-se que, todos os ligantes estudados têm pouca probabilidade de atuarem como inibidores da TR - as únicas exceções seriam os compostos beta, que pode se ligar no sítio ativo da TR, embora sua energia de ligação não seja favorável, e o naftoq-01, que pode se ligar no sítio da interface desta proteína, mas que também possui alta energia de ligação.

Em termos energéticos e estruturais, pode-se afirmar que as naftoquinonas tendem a inibir a enzima humana e não a do parasita, com uma clara preferência para o sítio da interface.

Analisando as duas séries, verifica-se que o aumento de volume na estrutura molecular dos naftoimidazóis, em relação aos naftoquinônicos, através do acréscimo do anel imidazol e do grupo fenila, favorece a complementaridade química e geométrica dos primeiros nos quatro sítios de interação.

Para a série dos naftoimidazóis, verificou-se que o naftoi-2C é o que tem a maior probabilidade de se ligar nos dois sítios da TR, mas, em termos energéticos, ligar-se-à, preferencialmente, no sítio da interface, com ganho de energia de mais de 10 kcal/mol. Há possibilidade, também, de que os ligantes naftoi-01 a 04 se liguem no sítio da interface da proteína do parasito.

Considerando os possíveis ligantes naftoimidazólicos para a GR, observou-se que os ligantes naftoi-2C e naftoi-3A se complexam de maneira diferente dentro deste sítio e que o composto naftoi-02, na conformação C, é o que possui tendência de inibir a enzima humana, por fazer interações com resíduos que participam da atividade catalítica, e também com resíduos carregados, o que pode afetar diretamente a função biológica desta proteína. Mas, para esta série de compostos há uma tendência geral de se ligarem também no sítio da interface da GR, com exceção dos isômeros conformacionais naftoi-02 A e B.

Finalmente, a constatação de que o naftoi-02, nas conformações A e B, molécula com os anéis coplanares, mostra que a presença de substituintes lipofílicos na posição orto aumenta a chance de não se ligarem no sítio da interface da GR, o que aumentaria a possibilidade destes compostos atuarem na TR, inibindo-a.

V - CONCLUSÕES

Depois de inúmeras tentativas de recristalização foi possível a determinação da estrutura dos compostos naftoquinônicos, 3,4-diidro-[2,2-dimetil]-2H-nafto[1,2-b]pirano-5,6-diona (beta-lapachona) e dimetil-1,4-naftoquinona (naftoq-01). A análise do empacotamento cristalino mostrou que estas duas estruturas são estabilizadas por ligações de hidrogênio do tipo C-H $\cdots$ O. Na estrutura da β -lapachona foram observadas cinco ligações de hidrogênio intermoleculares enquanto que na naftoq-01 observaram-se apenas duas. Em ambos os casos há formação de estruturas supramoleculares. Entretanto, a interação do tipo C-H $\cdots$ π foi encontrada somente na estrutura do composto naftoq-01, formando dímeros supramoleculares.

A análise das propriedades calculadas para a série de compostos naftoimidazólicos foi complexa; os métodos de análise exploratória dos dados, como análise por componentes principais (PCA) e análise hierárquica de agrupamentos (HCA) foram utilizados, mas os modelos gerados não agrupavam os compostos por similaridades.

Apenas o modelo de regressão obtido com o método de mínimos quadrados parciais (PLS) apresentou resultados satisfatórios, e verificou-se que os descritores Morp17p, X4a, piPC09, RDF065v, BELp6, RDF060p, R4u, RDF035m e RCI mostraram uma contribuição estatisticamente significativa.

Observou-se que o modelo de PLS gerado com estas propriedades possui um bom coeficiente de correlação (Q e $R > 0,7$). Embora estas propriedades não tenham um significado físico claro, por serem parâmetros derivados da descrição matemática das estruturas, elas conseguem através de um modelo de PLS, prever o valor da atividade biológica de futuros compostos que sejam similares a estes.

O estudo de docking mostrou que tanto os compostos naftoquinônicos quanto os naftoimidazólicos podem atuar como inibidores tanto no sítio ativo da enzima tripanotiona redutase, presente no *T. cruzi*, quanto no sítio ativo da enzima glutatona redutase, presente no organismo humano.

Em termos energéticos e estruturais, pode-se afirmar que as naftoquinonas possuem tendência de inibir, principalmente, a enzima humana e não a do parasita, com uma clara preferência para o sítio da interface da GR.

Os complexos formados com os compostos naftoimidazólicos mostraram que a complementaridade química, geométrica e energética destes é mais favorável a ligação nos sítios da interface da TR e da GR, sobretudo, da GR.

Para os compostos naftoimidazólicos estudados, observou-se que, os confôrmeros do composto que tem uma metila na posição orto no anel fenil, diminuíram a especificidade destes no sítio da interface da GR, por meio de impedimento estérico em relação a Asn71; o que aumentaria a possibilidade de estes compostos atuarem na TR.

VI – Sugestões para trabalhos futuros

Para verificar se estes ligantes terão maior afinidade de se ligar no sítio ativo, atuando como inibidores competitivos principalmente da TR (que possui uma carga total negativa no sítio ativo ao contrário da GR) sugere-se aumentar a especificidade dos naftoimidazóis em relação a TR; acrescentando uma amina quaternária de cadeia pequena no anel fenil para que esta possa interagir com os resíduos carregados pois, além desta possível interação, existirá também uma maior complementaridade de carga o que facilitaria a ligação destes compostos no sítio ativo da TR.

Como os compostos apresentados neste trabalho tendem a se ligar com mais facilidade na glutatona redutase humana do que na tripanotiona redutase,

presente no *T. cruzi*; outra sugestão é fazer um estudo destes compostos na enzima glutathione redutase, presente no parasito *P. falciparum*, que é o agente causador da Malária. A GR do plasmódio também desempenha um papel fundamental no seu metabolismo.

O estudo das naftoquinonas e dos naftoimidazóis complexados na GR, presente no *P. falciparum*, poderá servir de base para o desenvolvimento futuro de inibidores mais potentes contra a Malária. Isto se deve ao fato de que a GR presente no *P. falciparum* desempenha uma função similar à da GR humana.

Referências Bibliográficas

Allen, F. H. The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising. *Acta Cryst.*, v. B58, p. 380-388, 2002.

Altomare, A.; Cascarano, G.; Giacovazzo, C.; Guagliardi, A. A program for crystal structure solution. *J. Appl. Crystallogr.*, v. 26, p. 343-350, 1993.

Andrade-Neto, V. F.; Goulart, M. O. F.; Silva Filho, J. F.; Da Silva, M. J.; Pinto, M. C. F. R.; Pinto, A. V.; Zalis, M. G.; Carvalho, L. H.; Krettli, A. U. Antimalarial activity of phenazines from lapachol, β -lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in vivo. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 14, p. 1145-1149, 2004.

Atwood, J. A.; Weatherly, D. B.; Minning, T. A.; Bundy, B.; Cavola, C.; Oppendoes, F. R.; Orlando, R.; Tarleton, R. L. The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science*, v. 309, n. 5733, p. 473-476, 2005.

Bailey, S.; Smith, K.; Fairlamb, A. H.; Hunter, W. H. Substrate interactions between trypanothione reductase and N¹-glutathionylspermidine disulphide at 0.28-nm resolution. *Eur. J. Biochem.*, v. 213, p. 67-75, 1993.

Bauer, H.; Fritz-Wolf, K.; Winzer, A.; Kühner, S.; Little, S.; Yardley, V.; Vezin, R.; Palfe, B.; Schirmer, R. H.; Davioud-Charvet, E. A. Fluoro analogue of the menadione derivative 6-[2'-(3'-Methyl)-1',4' naphthoquinolyl]-hexanoic acid is a suicide substrate of glutathione reductase. Crystal structure of the alkylated human enzyme. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 128, p. 10784-10794, 2006.

Blumenstiel, K.; Schöneck, R.; Yardley, V.; Croft, S. L.; Krauth-Siegel, R. L. Nitrofurans as common subversive substrates of *Trypanosoma cruzi* Lipoamide Dehydrogenase and trypanothione reductase. *Biochem. Pharmacol.*, v. 58, p. 1791-1799, 1999.

Bodor, N.; Gabanyi, Z.; Wong, C. A new method for the estimation of partition coefficient *J. Am. Chem. Soc.*, v. 111, p. 3783, 1989.

Bond, C. S.; Zhang, Y.; Berriman, M.; Cunningham, M. L.; Fairlamb, A. H.; Hunter, W. N. Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural product inhibitors. *Structure*, v. 7, n. 1, p. 81-89, 1999.

Boveris, A.; Docampo, R.; Turrens, J.F.; Stoppani, A. O. M. Effect of beta-lapachone on superoxide anion and hydrogen peroxide production in *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. J.**, v. 175, p. 431-439, 1978.

Bruns, R. E.; Faigle, J. F. G. Quimiometria. **Quím. Nova**, v. 8, p. 84-99, 1985.

Burden, F. R. Chemically intuitive molecular index. **Quant. Struct.-Act. Relat.**, v. 16, p. 309-314, 1997.

Castilho, M. S.; Pavão, F.; Oliva, G.; Ladame, S.; Willson, M.; Périé, J. Evidence for the two phosphate binding sites of an analogue of the thioacyl intermediate for the *Trypanosoma cruzi* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-catalyzed reaction, from its crystal structure. **Biochemistry**, v. 42, p. 7143-7151, 2003.

Cenas, N. K.; Arscott, D.; Williams, C. H., Blanchard, J. S. Mechanism of reduction of quinones by *Trypanosoma congolense* trypanothione reductase. **Biochemistry**, v. 33, p. 2509-2515, 1994.

Chemplus: **Extensions for HyperChem**. Manual do usuário. Gainesville: Hypercube, 2002. Programa de computador.

Chirlian, L. E.; Francl, M. M. Atomic charges derived from electrostatic potentials: a detailed study. **J. Comput. Chem.**, v. 8, p. 894-905, 1987.

Consenso Brasileiro em doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, p. 1-29, 2005. Suplemento 3.

Consonni, V.; Todeschini, R.; Pavan, M. Structure/response correlations and similarity/ diversity analysis by GETAWAY descriptors. 1. Theory of the novel 3D molecular descriptors. **J. Chem. Inf. Comput. Sci.**, v. 42, n. 3, p. 682-692, 2002.

Coura, J. R.; De Castro S. L. A critical review on Chagas Disease chemotherapy **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.

Cunha-Filho, M. S. S.; Landin, M.; Martinez-Pacheco, R.; Dacunha-Marinho, B. β -Lapachone. **Acta Cryst.**, v. C62, p. o473-o475, 2006.

Cunha, R. L. O. R.; Zukerman-Schpector, J.; Caracelli, I.; Comassetto, J. V. Revisiting the addition reaction of TeCl_4 to alkynes: The crystal structure and docking studies of 1-chloro-2-trichlorotelluro-3-phenyl-propen-2-ol. **J. Organomet. Chem.**, v. 691, p. 4807-4815, 2006.

Da Silva, M. N.; Ferreira, V. F.; De Souza, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. *Quim. Nova*, v. 26, n.3, p. 407-416, 2003.

De Castro, S. L. The challenge of Chagas' disease chemotherapy: An update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.*, v. 53, p. 83-98, 1993.

De Moura, K. C. G.; Emery, F. S.; Neves-Pinto, C.; Pinto, M. C. F. R.; Dantas, A. P.; Salomão, K.; De Castro, S. L.; Pinto, A. V. Trypanocidal activity of isolated naphthoquinones from *Tabebuia* and some heterocyclic derivatives: a review from an interdisciplinary Study. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 12, n. 3, p. 325-338, 2001.

De Moura, K. C. G.; Salomão, K.; Menna-Barreto, R. F. S.; Emery, F. S.; Pinto, M. C. F. R.; Pinto, A. V.; De Castro, S. L. Studies on the trypanocidal activity of semi-synthetic pyran[*b*-4,3]naphtho[1,2-*d*]imidazoles from β -lapachone. *Eur. J. Med. Chem.*, v. 39, p. 639-645, 2004.

De Souza, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Pharm. Des.*, v. 8, p. 269-285, 2002.

De Souza, W. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, n. 1, p. 17-36, 1999.

Devera, R.; Fernandes, O.; Coura, J. R. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after *in vitro* culturing and mice infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 1, p. 1-12, 2003.

Dewar, M. J. S.; Zoebisch, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. J. P. Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 107, p. 3902-3909, 1985.

Dias, J. C. P.; Silveira, A. C.; Schofield, C. J. The impact of Chagas Disease control in Latin America - A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 5, p. 603-612, 2002.

Docampo, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chem. Biol. Interact.*, v. 73, p. 1-27, 1990.

Docampo, R.; Masong, R. P.; Mottleyg, C.; Muniz, R. P. A. Generation of free radicals induced by Nifurtimox in mammalian tissues. *J. Biol. Chem.*, v. 256, n. 21, p. 10930-10933, 1981.

Ds visualiser: **Discovery Studio Viewer Datasheet for Windows - 5.0**. San Diego: Accelrys, 2002. Programa de computador.

Faerman, C. H.; Savvides, S. N.; Strickland, C.; Breidenbach, M. A.; Ponasik, J. A.; Ganem, B.; Ripoll, D.; Krauth-Siegel, R. L.; Karplus, P. A. Charge is the major discriminating factor for glutathione reductase *versus* trypanothione reductase inhibitors. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 4, n. 8, p. 1247-1253, 1996.

Fairlamb, A. H. Target discovery and validation with special reference to trypanothione. In: Fairlamb, A. H.; Ridley, R. G.; Vial, H. J. **Drugs against parasitic diseases**. R&D methodologies and issues - Discoveries and drug development. 2001. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/publications/publications/prd-drug.htm>. Acesso em: 10 maio 2004.

Fairlamb, A. H.; Blackburn, P.; Ulrich, P.; Chait, B. T.; Cerami, A. trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. **Science**, v. 227, n. 4693, p. 1485-1487, 1985.

Fairlamb, A. H.; Cerami, A. Metabolism and Functions of trypanothione in the Kinetoplastida. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 46, p. 695-729, 1992.

Farrugia, L. J. ORTEP3 for Windows. **J. Appl. Crystallogr.**, v. 30, p. 565, 1997.

Farrugia, L. J. WinGX Suite for single crystal small molecule crystallography. **J. Appl. Cryst.**, v. 32, p. 837-838, 1999.

Gallwitz, H.; Bonse, S.; Martinez-Cruz, A.; Schlichting, I.; Schumacher, K.; Krauth-Siegel, R. L. Ajoene is an inhibitor and subversive substrate of human glutathione reductase and *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase: crystallographic, kinetic, and spectroscopic studies. **J. Med. Chem.**, v. 42, p. 364-372, 1999.

Garcia, E. S.; Gonzalez, M. S.; Azambuja, P. Biological factors involving *Trypanosoma cruzi* life cycle in the invertebrate vector, *Rhodnius prolixus*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 1, p. 213-216, 1999.

Goulart, M. O. F.; Zani, C. L.; Tonholo, J.; Freitas, L. R.; Abreu, F. C.; Oliveira, A. B.; Raslan, D. S.; Starling, S.; Chiari, E. Trypanocidal activity and redox potential of heterocyclic and 2-hydroxy-naphthoquinones. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 7, n. 15, p. 2043-2048, 1997.

Hemmer, M. C.; Steinhauer, V.; Gasteiger, J. The prediction of the 3D structure of organic molecules from their infrared spectra. *Vibrat. Spect.*, v. 19, p. 151-164, 1999.

Henderson, G. B.; Ulrich, P.; Fairlamb, A. H.; Rosember, I. G.; Pereira, M.; Sela, M.; Cerami, A. "Subversive" substrates for the enzyme trypanothione disulfide reductase: Alternative approach to chemotherapy of Chagas disease. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v. 85, p. 5374-5378, 1988.

Honório, K. M.; Da Silva, A. B. F. An AM1 study on the electron-donating and electron-accepting character of biomolecules. *Int. J. Quantum Chem.*, v. 95, p. 126-132, 2003.

Hypercube. **HyperChem7.0 for Windows**: molecular modeling system. Gainesville: Hypercube, 2002. Programa de computador.

Informetrix. **Pirouette 3.11**. Woodinville, 2002. Programa de computador.

Jacoby, E. M.; Schlichting, I.; Lantwin, C. B.; Wolfgang, K.; Krauth-Siegel, R. L. Crystal structure of the *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase mepacrine complex. *Proteins: Struct., Funct., Genet.*, v. 24, p. 73-80, 1996.

Jockers-Scherübl, M. C.; Schirmer, R. H.; Krauth-Siegel, R. L. trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi* catalytic properties of the enzyme and inhibition studies with trypanocidal compounds. *Eur. J. Biochem.*, v. 180, p. 267-272, 1989.

Jones, T. A; Kjeldgaard, M. **Essential O**: software manual. Uppsala: Uppsala University Press, 1998. Programa de computador.

Jug, K, J. A bond order approach to ring current and aromaticity. *Org. Chem.*, v. 48, p. 1344-1348, 1983.

Karplus, P. A.; Pai, E. F.; Schulz, G. E. Substrate binding and catalysis by glutathione reductase as derived from refined enzyme: substrate crystal structures at 2 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, v. 210, p. 163-180, 1989.

Khan, M. O. F.; Austin, S. E.; Chan, C.; Yin, H.; Marks, D.; Vaghjiani, S. N.; Kendrick, H.; Yardley, V.; Croft, S. L.; Douglas, K. T. Use of an additional hydrophobic binding site, the z site, in the rational drug design of a new class of stronger trypanothione reductase inhibitor, quaternary alkylammonium phenothiazines. *J. Med. Chem.* v. 43, p. 3148-3156, 2000.

Kier, L. B.; Hall, L. H. **Molecular connectivity in structure analysis**. New York: Research Studies Press, 1986. 280 p.

Krauth-Siegel, R. L.; Inhoff, O. Parasite-specific trypanothione reductase as a drug target molecule. *Parasitol. Res.*, v. 90, p. S77-S85, 2003.

Krauth-Siegel R. L.; Schirmer, R. H; Bauer, H. Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: Old and new drug targets in Trypanosomes and Malaria-Causing Plasmodia. *Angew. Chem. Int. Ed.*, v. 44, p. 690-715, 2005.

Kubata, B. K.; Kabututu, Z.; Nozaki, T.; Munday, C. J.; Fukuzumi, S.; Ohkubo, K.; Lazarus, M.; Maruyama, T.; Martin, S. K.; Duszenko, M.; Urade, Y. A key role for Old Yellow enzyme in the metabolism of drugs by *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.*, v. 196, n. 9, p. 1241-1251, 2002.

Kuntz, I. D. Structure-based strategies for drug design and discovery. *Science*, v. 257, n. 5073, p. 1078-1082, 1992.

Kuntz, I. D.; Meng, E. C.; Shoichet, B. K. Structure-based molecular design. *Acc. Chem. Res.*, v. 27, n. 5, p. 117-123, 1994.

Machado, C. A.; Ayala, F. J. Sequence variation in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) and trypanothione reductase (TR) genes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 121, p. 33-47, 2002.

Malta, V. R. S. **Estudo cristalográfico de naftoquinonas e seus derivados e cálculos teóricos de propriedades relevantes na relação estrutura-atividade**. 2000. 258 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

Maya, J. D.; Cassels, B. K.; Iturriaga-Vásquez, P.; Ferreira, J.; Faúndez, M.; Galanti, N.; Ferreira, A.; Morello, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol.*, v. 146, p. 601-620, 2007.

Menna-Barreto, R. F. S.; Corrêa, J. R.; Pinto, A. V.; Soares, M. S.; De Castro, S. L. Mitochondrial disruption and DNA fragmentation in *Trypanosoma cruzi* induced by naphthoimidazoles synthesized from β -lapachone. *Parasitol. Res.*, v. 101, p. 895-905, 2007.

Menna-Barreto, R. F. S.; Henriques-Pons, A.; Pinto, A. V.; Morgado-Diaz, J. A.; Soares, M. S.; De Castro, S. L. Effect of a β -lapachone-derived naphthoimidazole on *Trypanosoma cruzi*: identification of target organelles. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 56, n. 6, p. 1034-1041, 2005.

Molfetta, F. A.; Bruni, A.T.; Honório, K. M.; da Silva, A. B. F. A structure–activity relationship study of quinone compounds with trypanocidal activity. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 40, p. 329–338, 2005.

Morello, A.; Pavani, M.; Garbarino, J. A.; Chamy, M. C.; Frey, C.; Mantilla, J.; Guerrero, A.; Repetto, Y.; Ferreira, J. Effects and mode of action of 1,4-naphthoquinones isolated from *Calceolaria sessilis* on tumoral cells and *Trypanosoma* parasites. **Comp. Biochem. Physiok**, v. 112C, n. 2, p. 119-128, 1995.

Müller, S.; Liebau, E.; Walter R. D.; Krauth-Siegel, L. Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. **Trends Parasitol.**, v. 19, n. 7, p. 320-328, 2003.

North, A. C. T.; Phillips, D. C.; Mathews, F. S. A semi-empirical method of absorption correction. **Acta Cryst.**, v. A24, p. 351-359, 1968.

Pai, E. F.; Shultz, G. E. The catalytic mechanism of glutathione reductase as derived from x-ray diffraction analyses of reaction intermediate. **J. Biol. Chem.**, v. 258, n. 3, p. 1752-1757, 1983.

Paulino, M.; Iribarne, F.; Hansz, M.; Vega-Tejido, M. A.; Seoane, G.; Cerecetto, H.; Di Maio, R.; Caracelli, I.; Zukerman-Schpector, J.; Olea, C.; Stoppani, A. O. M.; Berriman, M.; Fairlamb, A. H.; Tapia, O. Computer assisted design of potentially active anti-trypanosomal compounds. **J. Mol. Struct. (Theochem)**, v. 584, p. 95-105, 2002.

Pereira, M. A. **Análise estrutural do lapachol e lapachonas**. 1989. 260 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

PDBSum. Disponível em: <www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum>. Acesso em: 01maio 2004.

PDB. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb>>. Acesso em: 01 maio 2004.

Pink, R.; Hudson, A.; Mouriès, M.-A; Bendig, M. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. **Nature Rev. Drug Discov.**, v. 4, p. 727-740, 2005.

Pinto, A. V.; Menna-Barreto, R. F. S.; De Castro, S. L. Naphthoquinones isolated from tabebuia: a review about the synthesis of heterocyclic derivatives, screening against *Trypanosoma cruzi* and correlation structure-trypanocidal activity. In: Govil, J. N.; Singh V. K.; Bhardwaj, R. (Ed.). **Recent progress in medicinal plants: phytomedicines**. Houston: Studium Press LLC, 2006. v. 16, p. 109-127.

Rivarola, H. W.; Paglini-Oliva, P. A. *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase inhibitors: phenothiazines and related compounds modify experimental Chagas disease evolution. **Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematological Disorders**, v. 2, p. 43-52, 2002.

Salmon-Chemin, L.; Eric Buisine, E.; Yardley, V.; Kohler, S.; Debreu, M.-A.; Landry, V.; Sergheraert, C.; Croft, S. L.; Krauth-Siegel, R. L.; Davioud-Charvet, E. D. 2- and 3-Substituted 1,4-naphthoquinone derivatives as subversive substrates of trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: synthesis and correlation between redox cycling activities and *in vitro* cytotoxicity. **J. Med. Chem.**, v. 44, p. 548-565, 2001.

Savvides, S. N.; Karplus, P. A. Kinetics and crystallographic analysis of human glutathione reductase in complex with a xanthene inhibitor. **J. Biol. Chem**, v. 271, p. 8101-8107, 1996.

Semichem. **AMPAC 6.55**: software manual. Shawnee: Semichem, 1997. Programa de Computador.

Sheldrick, G. M. **SHELX97**: programs for crystal structure analysis (Release 97-2). Germany: University of Göttingen, 1998. Programa de computador.

Shoichet, B. K.; Kuntz, I. D. Protein docking and complementarity. **J. Mol. Biol.**, v. 221, p. 327-346, 1991.

Silva, M. N.; Ferreira, V. F.; Souza, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Quim. Nova**, v. 26, n.3, p. 407-416, 2003.

Spek, A. L. **Platon**: a multipurpose crystallographic tool. Utrecht: Utrecht University, 1998. Programa de computador.

Svetnik, V.; Liaw, A.; Tong, C.; Culberson, J. C.; Sheridan, R. P.; Feuston, B. P. Random forest: a classification and regression tool for compound classification and QSAR modeling. **J. Chem. Inf. Comput. Sci.**, v. 43, p. 1947-1958, 2003.

Schuur, J.; Gasteiger, J. 3D-MoRSE Code - A method for coding the 3D structure of Molecules. In: Gasteiger, J. (Ed.) **Software development in chemistry**. Frankfurt: Main, 1996. p. 67-80.

Sucen: Superindendência de controle de endemias. Disponível em: <<http://www.sucen.sp.gov.br/>>. Acesso em: 10 jan. 2008.

Tetko, I. V.; Tanchuk, V. Y. Application of associative neural networks for prediction of lipophilicity in ALOGPS 2.1 program. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, v. 42, p. 1136-45, 2002.

Todeschini, R; Consoni, V.; Pavan, M. **Dragon 2.1**. Milano, 2002. Programa de computador.

Urbina, J. A.; Docampo, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.*, v. 19, n. 11, p. 495-501, 2003.

van de Waterbeemd, H. *Chemometric method in molecular design*. Weinheim: Wiley-VCH, 1995. v. 2, p. 346.

Vega-Tejjido, M. A. **Simulação computacional: formação de complexos proteína-ligante aplicada ao estudo das flavoenzimas glutathione reductase e tripanotona reductase, importantes em doenças parasitárias**. 2003. 105 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

Vega-Tejjido, M. A.; Caracelli, I.; Zukerman-Schpector, J.; Conformational analyses and docking studies of a series of 5-nitrofur- and 5-nitrothiophen-semicarbazone derivatives in three possible binding sites of trypanothione and glutathione reductases. *J. Mol. Graphics Model.*, v. 24, p. 349-355, 2006.

Verma, R. P. Anti-cancer activities of 1,4-naphthoquinones: A QSAR study. *Anti Canc. Agents Med. Chem.*, v. 6, p. 489-499, 2006.

Voet, D; Voet, J. G. **Biochemistry**. 2. ed. New York: Wiley, 1995. 1392 p.

Zhang, Y.; Bond, C. S.; Bailey, S.; Cunningham, M. L.; Fairlamb, A. H.; Hunter, W. N. The crystal structure of trypanothione reductase from the human pathogen *Trypanosoma cruzi* at 2.3 Å resolution. *Protein Sci.*, v. 5, p. 2-61, 1996.

WHO: Relatório da Organização Mundial da Saúde. Disponível em: <<http://www.who.int>>. Acesso em: 03 out 2007.

Witte, N.V.; Stoppani, A. O. M.; Dubin, M. 2-Phenyl- β -lapachone can affect mitochondrial function by redox cycling mediated oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 432, n. 2, p. 129-135, 2004.