



**UFRRJ**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**TESE**

**MODELAGEM MOLECULAR APLICADA AO ESTUDO DE REAÇÕES  
DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA COM APLICAÇÃO POTENCIAL NO  
CONTROLE DE *Leishmania amazonensis***

**Catarina De Nigris Del Cistia**

**2010**



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MODELAGEM MOLECULAR APLICADA AO ESTUDO DE REAÇÕES  
DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA COM APLICAÇÃO POTENCIAL NO  
CONTROLE DE *Leishmania amazonensis*

CATARINA DE NIGRIS DEL CISTIA

*Sob a orientação do Professor*  
**Carlos Maurício Rabello de Sant'Anna**

*e Co-orientação da Professora*  
**Aurea Echevarria**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutor em**  
**Ciências**, no Programa de Pós-  
Graduação em Química, Área de  
Concentração em Química Orgânica

Seropédica, RJ

Junho de 2010

547.21  
D331m  
T

Del Cistia, Catarina de Nigris, 1980-.  
Modelagem molecular aplicada ao estudo  
de reações de inibição enzimática com  
aplicação potencial no controle de  
Leishmania amazonensis / Catarina de Nigris  
Del Cistia - 2010.  
193 f.: il.

Orientador: Carlos Maurício Rabello de  
Sant'Anna.

Tese (doutorado) - Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-  
Graduação em Química.

Bibliografia: f. 144-159.

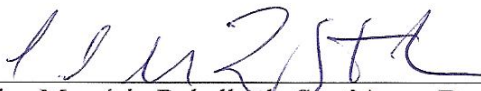
1. Síntese orgânica - Teses. 2.  
Leishmania - Teses. 3. Leishmaniose -  
Teses. 4. Inibidores enzimáticos - Teses.  
I. Sant'Anna, Carlos Maurício Rabello de,  
1965-. II. Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação  
em Química. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

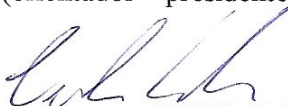
**CATARINA DE NIGRIS DEL CISTIA**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química Orgânica.

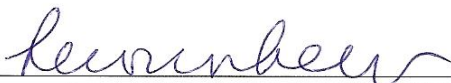
TESE APROVADA EM 11 / 06 / 2010



Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna, Dr., UFRRJ  
(orientador – presidente da banca)



Cedric Stephan Graebin, Dr., UFRRJ



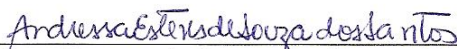
Leonor Laura Pinto Leon, Dra., FIOCRUZ



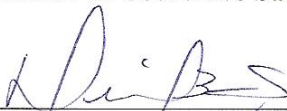
Nelilma Correia Romeiro, Dra., UFRJ



Sérgio de Paula Machado, Dr., UFRJ



Andressa Esteves de Souza dos Santos, Dra., UFRRJ (suplente)



Denise Barçante Castro Pinto, Dra., FIOCRUZ (suplente)

“Os loucos abrem os  
caminhos que mais tarde os  
sábios percorrem.”

*James Joyce*

## AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais Ana Maria De Nigris e Roberto Diniz Del Cistia, e aos irmãos Roberto e Guilherme De Nigris Del Cistia, pelo amor, paciência, apoio e carinho durante toda esta jornada.
- Ao orientador Prof. Dr. Carlos Maurício Rabello de Sant'Anna, principalmente pela amizade, paciência e compreensão, e por todo trabalho, incentivo, confiança, presença e transmissão de conhecimentos. Serei eternamente grata por todos os esclarecimentos, conselhos e atos.
- Ao namorado Rodrigo Medeiros, por todo amor, amizade, companhia, compreensão, ajuda, carinho e paciência. Sua ajuda e amor são de valia inestimável.
- Ao Prof. Dr. Marco Antônio Soares de Souza (USS), por todo trabalho, incentivo, exemplo, confiança e amizade por todos esses anos. Sem seu trabalho de iniciação científica, provavelmente eu não estaria nesta empreitada.
- Ao Prof. Dr. Marcos André Vannier dos Santos (FIOCRUZ), por todo material e explicações gentilmente cedidos; à Prof<sup>a</sup>. Dra. Clarissa Oliveira da Silva (UFRRJ), pela convivência, incentivo, apoio e paciência.
- A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ - UFRRJ) pelas aulas e conhecimentos transmitidos.
- Aos colegas de turma de mestrado Eliete, Welisson, Rodney e Kênia, aos grandes amigos Anivaldo e José Geraldo em especial, e aos companheiros de laboratório Fábio Javaroni, Jorge Fábio, Daniel, Nailton e tantos outros, por toda ajuda, compreensão, carinho, amizade, conselhos, paciência e companhia, a todo momento.
- Aos colegas de trabalho Harleson, Giuliano, Davyson, Sebastião, José Luis, Leonardo e Alacyr (UBM), e Cristiane, Evelize, Milane, Marco André, Luiz, Rafael, Sonia, Flavio, Marcelo, Ana Paula e vários outros (UFRRJ) por todo apoio, conselhos, ajuda e companhia nesta difícil jornada.
- Às companheiras de alojamento Maristella, Luciana, Michelle, Margareth, Livya, Natália, Antonieta, Amanda, Roberta, Bruna e Cinthya pela hospitalidade, companhia, ajuda, amizade e paciência.
- Aos amigos de Volta Redonda Thaís, Alessandra, Christian, Anna Carolina, Leonardo, Geraldo, Fernanda e tantos outros pela companhia, carinho, apoio, ajuda e compreensão em todos (e tantos) momentos difíceis.
- Aos funcionários e técnicos do PQ, por todo trabalho e convivência.
- Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPERJ, por todo o auxílio concedido.
- A todos os membros da banca examinadora, por gentilmente aceitar o convite.
- E finalmente a Deus, por TUDO.

## RESUMO

CISTIA, Catarina De Nigris Del. **Modelagem molecular aplicada ao estudo de reações de inibição enzimática com aplicação potencial no controle de *Leishmania amazonensis***. 2010. 197p. Tese (Doutorado em Química Orgânica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

As doenças provocadas por protozoários, transmitidas principalmente por insetos hematófagos, constituem o problema de saúde humana mais distribuído no mundo, e estima-se que três milhões de indivíduos sofram de uma doença parasitária (principalmente pelos tripanossomatídeos e apicomplexa), responsáveis por importantes doenças humanas. Os compostos aqui estudados constituem as amidinas e os mesoiônicos, ambos sintetizados por Echevarria e colaboradores, UFRRJ. Este trabalho possui, como proposta inicial, uma procura por relações e equações que possuam boa correlação entre os valores de " $\ln(IC_{50})$ " calculados e os valores de " $\ln(IC_{50})$ " determinados experimentalmente, para determinar se o composto será ou não capaz de inibir as enzimas NO sintase (NOS) e tripanotiona redutase (TR) (em relação a enzimas pertencentes à *Leishmania amazonensis*). Como não há estruturas disponíveis da enzima TR para este organismo, um modelo foi feito através da técnica de modelagem por homologia, com um sequenciamento feito por laboratórios da FIOCRUZ [CASTRO-PINTO *et al.*, 2008]. Esta estrutura foi usada para chegarmos aos resultados voltados realmente à *Leishmania*. As correlações foram procuradas através de 2 métodos diferentes: através do método de atracamento molecular (ou "*docking*") e do método semi-empírico (com hamiltoniano PM3 [STEWART, 1989a,b]). Através destes métodos, foi analisada a probabilidade destes compostos se complexarem ao sítio ativo (como um inibidor isostérico), ou aos sítios do FAD e NADPH (como um inibidor alostérico). Frente aos compostos de atividade já conhecida analisados para montar o esquema (as fenotiazinas), encontrou-se que estes compostos se complexam melhor ao sítio ativo, atuando como inibidores isostéricos; porém os mesoiônicos e amidinas se complexam melhor ao sítio do FAD, caracterizando uma inibição alostérica. Frente ao padrão de atracamento destas moléculas no respectivo sítio, alterações foram propostas em suas estruturas básicas para fazer com que fiquem ainda mais ativos. Com isto, foram encontradas equações que possuem alta correlação entre os valores de  $\ln(IC_{50})$  experimentais e calculados, fazendo com que estas equações possam ser usadas para a síntese de estruturas mais ativas, com menos efeitos colaterais.

Palavras chave: *Leishmania amazonensis*, modelagem molecular, mesoiônicos, amidinas

## ABSTRACT

CISTIA, Catarina De Nigris Del. **Applied molecular modeling to the enzymatic inhibition reactions study with *Leishmania amazonensis* control's potential application.** 2010. 197p. Tese (Doctor Scientiae in Organic Chemistry). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

Parasitic protozoan diseases, transmitted by blood-feeding insects, constitute the world's most widely spread human health problem. It is estimated that three million people suffer from a parasitic infection (mainly trypanosomatid and apicomplexan parasites), responsible for important human diseases. The compounds here studied constitute the amidines and the mesoionics, synthesized by Echevarria and collaborators, UFRRJ. This work constitute, as an initial proposal, a search for relationships and equations that has good correlation between the calculated and experimental " $\ln(IC_{50})$ " values, to determinate the NO synthase (NOS) and trypanothione reductase (TR) inhibition capacity of the compounds (*Leishmania amazonensis* enzymes). A model was made through the homology modeling method, with a sequence made by FIOCRUZ laboratories [CASTRO-PINTO *et al.*, 2008], as there are no TR enzyme available structures for this organism. This structure was used to get results really focused on *Leishmania*. The correlations were searched through 2 different methods: docking and semi-empirical methods (with PM3 parametric model [STEWART, 1989a,b]). Through these methods, the compounds active site binding probability (as an isosteric inhibitor) and the FAD and NADPH site binding probability (as an allosteric inhibitor) was analyzed. With the known activity compounds (the phenothiazines) used to build the model, the results shown that these compounds are better docked at the active site, acting as an isosteric inhibitor. However, the mesoionics and amidines dock better at the FAD binding site, featuring an allosteric inhibition. Through these molecules docking pattern at this binding site, structural alterations were proposed to make them even more active. High correlation equations were found between calculated and experimental  $\ln(IC_{50})$ . These equations can now be used for more active compounds synthesis, with less side effects.

Key words: *Leishmania amazonensis*, molecular modeling, mesoionics, amidines



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1:** Demonstrações microscópicas dos parasitos *Trypanosoma brucei* (forma evolutiva tripomastigota) [A], *Trypanosoma cruzi* (forma evolutiva epimastigotas) [B] e *Leishmania donovani* [C] (forma evolutiva promastigota).....1
- Figura 2.1:** Fotos de William Boog Leishman (1865-1926) [A] e Charles Donovan (1863-1915) [B], cientistas que primeiro descreveram parasitos do gênero *Leishmania*.....4
- Figura 2.2:** Demonstração da leishmaniose cutânea [A e B], visceral [C] e mucocutânea [D e E].....5
- Figura 2.3:** Distribuição das espécies de *Leishmania* no Brasil, em 2005. Notar que as espécies *L. (L.) amazonensis* e *L.(V.) braziliensis* são as mais amplamente distribuídas.....7
- Figura 2.4:** *Phlebotomus* sp. [A/B/C], flebotomíneos transmissores da leishmaniose no “velho mundo”; *Lutzomyia* sp. [D/E/F], transmissores no “novo mundo”.....8
- Figura 2.5:** Distribuição dos vetores (gênero *Lutzomyia*) responsáveis pela transmissão de *Leishmania* no Brasil, em 2005. Os símbolos representam as diferentes espécies do vetor, sendo elas: *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia wellcomei*, *Lutzomyia umbratilis* e *Lutzomyia migonei*, respectivamente.....9
- Figura 2.6:** Distribuição geográfica de casos de leishmaniose visceral (áreas em **verde**) e leishmaniose tegumentar (cutânea/mucocutânea – áreas em **vermelho**) em 2002, de acordo com a OMS. As áreas em **roxo** correspondem a regiões com incidência dos 3 tipos de doença. Segundo a pesquisa, existem 12 milhões de pessoas infectadas, e outras 350 milhões em risco de contaminação.....10
- Figura 2.7:** Demonstração de formas amastigotas ou aflageladas (setas) de *Leishmania* sp. [A], em um aspirado de células do baço [B].....11
- Figura 2.8:** Demonstração de formas promastigotas ou flageladas de *Leishmania* sp. [A], crescendo em meio de cultura apropriado [B].....12
- Figura 2.9:** Ciclo de vida de *Leishmania* spp.. Promastigotas procíclicas na saliva do inseto flebotomíneo passam por diferenciação em formas metacíclicas infectantes [8], as quais são injetadas no hospedeiro vertebrado durante o repasto [1]. Na derme, promastigotas são rapidamente reconhecidas por receptores macrofágicos sendo captadas [2]. O vacúolo parasitóforo é formado ao redor do parasito captado, que se diferencia em amastigotas imóveis [3], proliferando dentro do fagolisossoma. A lise do macrófago infectado as torna livres, infectando novos macrófagos [4]. As células infectadas são ingeridas pelos mosquitos flebotomíneos ([5] e [6]), diferenciando-se em promastigotas procíclicas [7]. As setas **vermelhas** indicam o ciclo no hospedeiro invertebrado, e as **azuis**, no hospedeiro vertebrado. Os símbolos *d* e *i* indicam fases diagnosticáveis e infectantes do ciclo, respectivamente.....13
- Figura 2.10:** Demonstração de outras formas evolutivas de tripanossomatídeos: [A] coanomastigotas, que possuem este nome pela forma de sino, de *Crithidia* sp.; [B]

epimastigotas, de *Trypanosoma* sp.; [C] tripomastigotas, que possuem uma membrana ondulante, de *Trypanosomas* sp.....14

**Figura 2.11:** Estruturas dos compostos antimoniais estibogliconato de sódio e antimoniato de *N*-metil-*D*-meglumina.....15

**Figura 2.12:** Lesão cutânea (e não mucocutânea) por leishmaniose, em aspecto framboesóide [A]. Mesmo paciente, 2 meses após o início do tratamento com antimoniato de *N*-metil-*D*-glucamina [B].....15

**Figura 2.13:** Estruturas da paramomicina, pentamidina (uma amidina), miltefosina e anfotericina B.....17

**Figura 2.14:** Estruturas da suramina (uma naftiluréia polissulfonada), do melarsoprol (um agente arsenial), da eflornitina (difluorometil ornitina ou DFMO) e do nifurtimox.....19

**Figura 2.15:** Estruturas das amidinas aromáticas utilizadas como agentes quimioterápicos. Para sua administração na forma de sal, os grupamentos amidínicos encontram-se protonados.....20

**Figura 2.16:** Fórmulas estruturais dos fármacos sulfametoxazol, trimetoprim e dapsona, utilizados em conjunto para o combate das pneumonias causadas por *P. carinii*.....21

**Figura 2.17:** Primeiros sistemas mesoiônicos sintetizados, por E. Fisher e E. Besthorn [A] e por M. Busch [B,C].....22

**Figura 2.18:** Estrutura básica dos compostos mesoiônicos sintetizados (X = H; CH<sub>3</sub>; OCH<sub>3</sub>; NO<sub>2</sub>; F; Cl; CN; Br; OH. Y = H; OCH<sub>3</sub>; NO<sub>2</sub>; Cl; Br).....23

**Figura 2.19:** Estruturas básicas das sidnonas [A], sidnoniminas [B] e oxi-triazóis [C], todos compostos doadores de NO; os mesoiônicos tiadiazólicos [D] já não possuem esta característica.....23

**Figura 2.20:** Organização tridimensional da NOS, demonstrando em [A] sua estrutura dimérica, onde cada uma das unidades monoméricas se encontra em um tom diferente de azul (código PDB 1DMJ), e em [B] a disposição dos ligantes na estrutura, em apenas uma das unidades monoméricas (código PDB 1M7Z).....26

**Figura 2.21:** Esquema da estrutura da NOS. É demonstrada sua estrutura em domínios, cofatores, e grupos prostéticos. O elétron é levado do domínio redutor para o domínio oxidante da outra unidade monomérica pela influência da calmodulina (CaM). Pela presença desta última, é formado um tetrâmero temporário. A mudança na concentração de Ca<sup>2+</sup> não afeta a atividade da enzima. A presença da cisteína no domínio oxidante está envolvida na conformação das unidades monoméricas.....27

**Figura 2.22:** Formação do NO, através da conversão do intermediário *N*-hidroxiarginina (NOHA) em *L*-citrulina.....28

- Figura 2.23:** Representação esquemática das duas etapas de formação da *L*-citrulina e NO, a partir da *L*-arginina. Notar o fluxo de elétrons, através dos compostos oxidados e reduzidos.....**28**
- Figura 2.24:** Demonstração do sítio ativo de uma NOS de *Bacillus subtilis* (código PDB **1M7Z**). Notar a proximidade de um análogo da BH<sub>4</sub>, o THF [tetraidrofolato, ou 5,6,7,8-tetraidropterol-*L*-glutamato] com o carboxilato proveniente do grupo heme. A Cys194 forma um complexo hexa-coordenado com o átomo de ferro (em laranja), possibilitando a oxidação da arginina a NOHA.....**29**
- Figura 2.25:** Composição da glutathiona – GSH [glicina (Gly), cisteína (Cys) e glutamato (Glu)]. Imagem gerada no programa PC Spartan Pro [Wavefunction Inc.].....**32**
- Figura 2.26:** Reação catalisada pela GR: conversão da glutathiona na forma oxidada (GSSG) para a forma reduzida (2 GSH).....**33**
- Figura 2.27:** Composição da tripanotiona – TSH [2 GSHs (I e II) interligadas por uma espermidina]. Imagem gerada no programa PC Spartan Pro [Wavefunction Inc.].....**34**
- Figura 2.28:** Reação catalisada pela TR: conversão da tripanotiona na forma oxidada (TSST) para a forma reduzida (TSH).....**34**
- Figura 2.29:** Esquema ilustrativo da síntese/degradação da tripanotiona. A atividade amidase da enzima está demonstrada em vermelho; a atividade sintetase, em preto.....**36**
- Figura 2.30:** Comparação das estruturas da TR de *Crithidia fasciculata* (código PDB **1FEC**), com cadeias em verde e amarelo, e da GR humana (código PDB **5GRT**), em azul — esta última também é dimérica, porém apenas uma das unidades monoméricas é aqui demonstrada. Notar que apesar da semelhança, as estruturas não são iguais, possuindo diferenças no posicionamento e formação de sua estrutura terciária.....**37**
- Figura 2.31:** Estrutura da TR (código PDB **1TYP**, modelo de fitas) proveniente de *C. fasciculata*, com o sítio do **FAD** (modelo bastão/bolas, em rosa), a presença do **NADPH** (modelo bastão/bolas, em amarelo) e o sítio da **TSST** (modelo bastão/bolas, padrão CPK de cores). Notar a formação de uma grande “fenda” neste último sítio, com intensa comunicação com o meio externo.....**38**
- Figura 2.32:** Demonstração da proximidade entre os cofatores (**FAD**, em rosa, e **NADPH**, em amarelo) e o substrato (**TSST**, padrão CPK de cores), necessária para a troca de equivalentes redutores entre os sítios ativo e alostéricos, na estrutura da TR de *C. fasciculata* (código PDB **1TYP**).....**38**
- Figura 2.33:** Estruturas: **[A]** clorpromazina (fenotiazina antipsicótica); **[B]** quinacrina (R=H) e/ou mostardas de quinacrina (R=Cl); **[C]** conjugado poliamino-peptídico; **[D]** N<sup>1</sup>,N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>,N<sup>8</sup>,N<sup>12</sup>-penta(3-fenilpropil)espermina (poliamina substituída); **[E]** cefarantina (alcalóide bisbenzil-isoquinolínico); **[F]** derivado 2-aminodifenilsulfídeo; **[G]** chinifur (derivado nitrofurano); **[H]** derivado cumarínico.....**40**
- Figura 2.34:** Estrutura da 8-metoxi-nafto[2,3-*b*]tiofen-4,9-quinona, ou TNQ2.....**41**

- Figura 2.35:** Estrutura do FAD, demonstrando seu anel isoaloxazínico [A], o carboidrato ribitol [B] e a adenosina [C], na forma difosfatada [D].....42
- Figura 2.36:** Representação das semi-reações sofridas pelas riboflavinas (FAD). Destacadas em azul encontram-se as alterações sofridas após as reações de redução.....43
- Figura 2.37:** Estrutura do NAD<sup>+</sup>/NADP<sup>+</sup>, demonstrando sua nicotinamida [A] e a adenosina [B], na forma difosfatada [C].....44
- Figura 2.38:** Representação das semi-reações sofridas pelo NADPH. Destacadas em azul encontram-se as alterações sofridas após as reações de redução.....44
- Figura 2.39:** Estruturas das substâncias iodoniodifenil (ID), di-2-tieniliodônio (DTI) e difenileniodônio (DPI).....45
- Figura 2.40:** Comparação entre a conformação do FAD presente na estrutura das enzimas AIF (código PDB 1GV4), GR (código PDB 5GRT) e TR (código PDB 1BZL).....46
- Figura 2.41:** Fases do processo de descoberta de um fármaco.....48
- Figura 4.1:** Demonstração das principais interações ligadas (energias de estiramento, dobramento e torção) e não ligadas consideradas em um campo de força, em mecânica molecular.....56
- Figura 4.2:** Gráfico representativo da função 12-6 de Lennard-Jones, e demonstração das variáveis  $\epsilon$  e  $\sigma$  (equação 3).....59
- Figura 4.3:** Exemplos de representações em grade: [A] Superfície de uma grade capturando o potencial eletrostático de uma HIV protease (código PDB 1BVE) por todo seu sítio ativo, com seu inibidor. Áreas em azul e vermelho representam áreas de potencial eletrostático positivo e negativo, respectivamente. [B] Grade de potencial eletrostático “contrário” (cut-away) de uma enzima ao redor do inibidor ligado (não incluído no cálculo).....60
- Figura 4.4:** Estado fixo sem duplicatas do GA, utilizado no programa GOLD (CCDC Ltd.).....65
- Figura 4.5:** Comparação das estruturas cristalográficas da NOS bovina (código 1DMJ, em azul – cada cadeia em uma tonalidade) e bacteriana (código 1M7Z, em rosa). O domínio a mais da estrutura bovina encontra-se destacado por uma círculo vermelho.....87
- Figura 4.6:** Estrutura do sítio de 6 Å, com a pterina co-cristalizada (modelo bastões/bolas). Para minimização da energia do complexo, foram mantidos apenas os carboxilatos do grupo heme (modelo bastões, padrão CPK de cores), junto aos 12 aminoácidos (Trp73, Arg367, His373, Ile 450, Pro453, Trp447, Ala448, Trp449, Phe462, His463, Gln464 e Glu465). As moléculas de água e átomos de H estão ocultos. Imagem manipulada no programa RasMol 2.7.2.1.1.....89
- Figura 4.7:** Estrutura otimizada do sítio da NOS com a amidina 10 complexada (padrão CPK de cores) – recorte de 6 Å, com 15 aminoácidos (Trp76, Val187, Met360, Glu363, Arg 367, His373, Trp447, Ala448, Trp449, Ile450, Pro453, Phe462, His463, Gln464 e Glu465). As

moléculas de água e átomos de H estão ocultos. Imagem manipulada no programa RasMol 2.7.2.1.1.....	90
<b>Figura 4.8:</b> Estruturas amidínicas propostas através da análise das possíveis interações com o sítio ativo.....	91
<b>Figura 4.9:</b> Demonstração da protonação das estruturas amidínicas, com as formas neutra e catiônica, respectivamente.....	92
<b>Figura 4.10:</b> Comparação entre as estruturas da TR de <i>L. amazonensis</i> (AMA), <i>C. fasciculata</i> (FAS) e <i>T. cruzi</i> (CRU). Os sítios estão indicados (hachurados), e os resíduos diferentes nos sítios estão destacados em vermelho.....	93
<b>Figura 4.11:</b> Estrutura final do sítio ativo da TR (recorte de 20 Å), adotado para atracamento, em duas formas diferentes de visualização. Em destaque, encontra-se o substrato da enzima (TSST) e a molécula de FAD, conforme indicado. No substrato, a seta aponta para o carbono que teve suas coordenadas utilizadas para definir o sítio de atracamento no programa GOLD (CCDC Ltd.). Imagem gerada no programa RasMol 2.7.2.1.1.....	94
<b>Figura 4.12:</b> Formas <b>neutra</b> e <b>catiônica</b> , testadas em relação aos compostos mesoiônicos, com indicação de seu sítio de protonação (seta).....	98
<b>Figura 4.13:</b> Estrutura final do sítio da TR com uma fenotiazina complexada (composto 37, modelo bastão/bolas). Recorte de 5 Å, com 22 aminoácidos (Gly14, Ser15, Gly16, Leu18, Glu19, Ala20, Trp22, Asn23, Cys53, Val54, Val59, Ile107, Tyr111, Met114, Thr335, Pro336, Ile339, Gly459, His461, Glu466, Cys469 e Ser470). Os hidrogênios dos resíduos foram ocultos. Os átomos de oxigênio correspondem às moléculas de água, sem seus átomos de hidrogênio. Imagem manipulada no programa RasMol 2.7.2.1.1.....	99
<b>Figura 4.14:</b> Comparação entre as sequências primárias da sequência-alvo e do modelo escolhido, gerada pela ferramenta BLAST [ALTSCHUL <i>et al.</i> , 1990].....	102
<b>Figura 4.15:</b> Alinhamento das sequências do sítio selecionado a 5 Å do FAD, proveniente de <i>L. amazonensis</i> (AMZ, em verde) e <i>T. cruzi</i> (BZL, em azul): nota-se que são 7 os resíduos diferentes (destacados em vermelho), e destes 7, apenas aqueles destacados por um asterisco (A—S e Y—F) são os resíduos de características realmente diferenciadas entre si. Alinhamento gerado com o programa Swiss PDB Viewer.....	104
<b>Figura 5.1:</b> Gráfico: $\ln(IC_{50})$ experimental $\times$ $\ln(IC_{50})$ calculado. Gerado com o programa Origin 6.0.....	107
<b>Figura 5.2:</b> Sobreposição das estruturas da TSST co-cristalizada (em <b>vermelho</b> ) e atracada (em <b>verde</b> ), após atracamento com o programa GOLD. Átomos de H da proteína omitidos. Imagem gerada no programa Hermes 1.3.....	110
<b>Figura 5.3:</b> Sobreposição das estruturas do FAD co-cristalizado (no padrão <b>CPK</b> de cores) e atracado (em <b>ciano</b> ), após atracamento com o programa GOLD. Átomos de H da proteína omitidos. Imagem gerada no programa RasMol 2.7.2.1.1.....	111

**Figura 5.4:** Sobreposição das estruturas do NADPH co-cristalizado (em **rosa claro**) e obtida (carbonos em **verde**) por atracamento com o programa GOLD (função *Goldscore*), demonstrando várias diferenças em sua conformação. Imagem gerada no programa Hermes 1.3.....112

**Figura 5.5:** Gráfico:  $\ln(IC_{50})$  experimental X  $\ln(IC_{50})$  calculado por correlação com descritores gerados através do atracamento das fenotiazinas. Gerado com o programa Origin 6.0.....114

**Figura 5.6:**  $\ln(IC_{50})$  experimental X  $\ln(IC_{50})$  calculado por correlação com descritores gerados através do atracamento dos mesoiônicos, no sítio do FAD. Gerado com o programa Origin 6.0.....118

**Figura 5.7:** À esquerda, mesoiônicos (compostos em verde) sobrepostos ao sítio do FAD. A molécula de FAD encontra-se em amarelo, para comparação. À direita, representação da maneira como os mesoiônicos se encontram atracados ao sítio do FAD, com legenda para a representação dos compostos. Imagens geradas no programa Hermes 1.3.....118

**Figura 5.8:** Demonstração das interações entre os mesoiônicos atracados e os resíduos presentes no sítio do FAD. As interações demonstradas entre o substituinte **Y** ocorrem para os compostos que possuem grupamentos polares nesta posição; caso o composto possua o grupamento polar na posição **X**, estas interações ocorrem perante o substituinte **X** (*vide* item 4.4.3, tabela 4.4). Imagem gerada no programa MDL Isis Draw 2.5.....119

**Figura 5.9:**  $\ln(IC_{50})$  experimental X  $\ln(IC_{50})$  calculado a partir do modelo TR II para as fenotiazinas, no sítio da TSST. Gerado com o programa Origin 6.0.....122

**Figura 5.10:**  $\ln(IC_{50})$  experimental X  $\ln(IC_{50})$  calculado, para: **[A]** mesoiônicos neutros e formas amastigotas; **[B]** mesoiônicos catiônicos e formas amastigotas; **[C]** mesoiônicos neutros e formas promastigotas; **[D]** mesoiônicos catiônicos e formas promastigotas. Gerados com o programa Origin 6.0.....126

**Figura 5.11:** Alinhamento de seqüências conhecidas de TR: cadeia de *L. donovani* (**DON**) e (**Dd8**), *L. infantum* (**INF**), *L. major* Friendlin (**MAJ**), *L. amazonensis* (**AMA**; este trabalho), ... (continua).....128

...(continuação) *L. braziliensis* (**BRA**), *C. fasciculata* (**FAS**), *T. cruzi* (**CRU**), *T. congolense* (**CON**) e *T. brucei* (**BRU**). Os resíduos sombreados indicam os sítios ativos do FAD, NADPH e TSST, como descrito para a TR de *L. donovani* [TAYLOR *et al.*, 1994]. Asteriscos indicam identidade, (:) e (.) indicam substituições conservativas e não-conservativas, respectivamente. Resíduos da seqüência de *L. amazonensis* correspondentes aos *primers* usados na amplificação estão sublinhados. Seqüências consultadas em <http://www.sanger.ac.uk>. Alinhamento gerado com T-CoVee [NOTREDAME *et al.*, 2000]. Encontram-se destacadas de vermelho as seqüências correspondentes aos sítios do FAD e TSST de *L. amazonensis* e *T. cruzi*.....129

**Figura 5.12:** Gráfico de Ramachandran [RAMACHANDRAN & SASISKEHARAN, 1968]. As setas vermelhas indicam os *outliers* citados, diferentes de glicinas. Gráfico gerado com o programa Swiss PDB Viewer.....129

**Figura 5.13:** Comparação entre as estruturas tridimensionais das TRs de *C. fasciculata* e *L. amazonensis*, respectivamente. Imagem gerada no programa RasMol 2.7.2.1.1.....130

**Figura 5.14:** Sobreposição das estruturas da TR de *L. amazonensis* (coloração ciano) e de *C. fasciculata* (padrão CPK de cores). Os resíduos Ile9 e Ile33 (*L. amazonensis*) estão sobrepostos aos resíduos Leu10 e Val 34 (*C. fasciculata*), respectivamente. A molécula de FAD encontra-se destacada (modelo bastão/bolas). Imagem gerada no programa RasMol 2.7.2.1.1.....130

**Figura 5.15:** Sobreposição das estruturas da TR de *L. amazonensis* (coloração ciano) e de *C. fasciculata* (padrão CPK de cores). Os resíduos Asn402 e His461 (*L. amazonensis*) estão sobrepostos aos resíduos Lys402 e His461 (*C. fasciculata*), respectivamente. A molécula de TSST encontra-se destacada (modelo bastão/bolas), com distância de 3,22 Å entre a ligação C=O da TSST e o N amínico da Lys402. Imagem gerada no programa RasMol 2.7.2.1.1....131

**Figura 5.16:** Sobreposição entre os sítios ativos minimizados (método semi-empírico PM3) pertinentes à TSST de *T. cruzi* e *L. amazonensis*. Cores: C (TR de *T. cruzi*): verde, C (TR de *L. amazonensis*): cinza, C (TSST de *T. cruzi*): ciano; C (TSST de *L. amazonensis*): rosa; N: azul, O: vermelho, S: amarelo. Átomos de hidrogênio foram omitidos. Imagem gerada no programa RasMol 2.7.2.1.1.....132

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1:</b> Diferentes manifestações clínicas e seus agentes etiológicos (gênero <i>Leishmania</i> ).....	<b>6</b>
<b>Tabela 4.1:</b> Estrutura dos compostos pterínicos escolhidos para construção do modelo de inibição da NOS, assim como sua atividade frente a enzima (como $IC_{50}$ ).....	<b>86</b>
<b>Tabela 4.2:</b> Estrutura e atividade ( $DL_{50}$ ) dos compostos amidínicos utilizados neste estudo.....	<b>90</b>
<b>Tabela 4.3:</b> Compostos fenotiazínicos escolhidos para construção do modelo de inibição da TR, com seus valores de $IC_{50}$ determinados experimentalmente.....	<b>96</b>
<b>Tabela 4.4:</b> Compostos mesoiônicos sintetizados com suas atividades ( $IC_{50}$ ) frente às diferentes formas evolutivas (promastigotas e amastigotas) de <i>L. amazonensis</i> .....	<b>97</b>
<b>Tabela 4.5:</b> Compostos fenotiazínicos escolhidos para avaliação do modelo de inibição da TR, com seus valores de $IC_{50}$ determinados experimentalmente.....	<b>98</b>
<b>Tabela 5.1:</b> Valores calculados para os 8 compostos em estudo (sítio de 6 Å).....	<b>107</b>
<b>Tabela 5.2:</b> Valores calculados para as estruturas amidínicas, no estado <b>neutro</b> .....	<b>108</b>
<b>Tabela 5.3:</b> Valores calculados para as estruturas amidínicas, no estado <b>catiônico</b> .....	<b>108</b>
<b>Tabela 5.4:</b> Valores calculados para as estruturas amidínicas propostas, no estado <b>neutro</b> .....	<b>109</b>
<b>Tabela 5.5:</b> Valores calculados para as estruturas amidínicas propostas, no estado <b>catiônico</b> .....	<b>109</b>
<b>Tabela 5.6:</b> Valores de aptidão e de atividade calculados e obtidos experimentalmente dos compostos fenotiazínicos, e descritores de importância ( $D_{vdW}$ , $D_{HYD}$ e $D_{AH}$ ), calculados para os compostos escolhidos.....	<b>114</b>
<b>Tabela 5.7:</b> Valores de atividade calculados e obtidos experimentalmente, e descritores de importância ( $D_{vdW}$ , $D_{HYD}$ e $D_{AH}$ ) calculados para os 3 compostos fenotiazínicos escolhidos.....	<b>115</b>
<b>Tabela 5.8:</b> Escores de aptidão calculados para o sítio da TSST, NADPH e FAD, no atracamento dos compostos mesoiônicos (44 – 56) na forma <b>catiônica</b> .....	<b>116</b>
<b>Tabela 5.9:</b> Valores experimentais e calculados de $\ln(IC_{50})$ e escores de aptidão para o sítio do FAD, no atracamento dos compostos mesoiônicos (44 – 56) na forma <b>catiônica</b> ; descritores de importância para a equação 35.....	<b>117</b>



<b>Tabela 5.10:</b> Maiores escores de aptidão encontrados para as amidinas no sítio da TSST, NADPH e FAD, nas formas neutra (neut.) e catiônica (cat.) , respectivamente.....	<b>120</b>
<b>Tabela 5.11:</b> Valores calculados para os compostos fenotiazínicos, no sítio da TSST.....	<b>122</b>
<b>Tabela 5.12:</b> Valores calculados para os mesoiônicos, no estado <b>catiônico</b> , no sítio do FAD, com valores dos coeficientes $c_1-c_5$ calculados com base nos valores de $IC_{50}$ das formas promastigotas [ $\ln(IC_{50})$ calc. pr.] e amastigotas [ $\ln(IC_{50})$ calc. am.].....	<b>124</b>
<b>Tabela 5.13:</b> Valores calculados para os mesoiônicos, no estado <b>neutro</b> , no sítio do FAD, com valores dos coeficientes $c_1-c_5$ calculados com base nos valores de $IC_{50}$ das formas promastigotas [ $\ln(IC_{50})$ calc. pr.] e amastigotas [ $\ln(IC_{50})$ calc. am.].....	<b>124</b>
<b>Tabela 5.14:</b> Comparação dos valores de $\ln(IC_{50})$ dos compostos mesoiônicos calculados ( <b>calc.</b> ) e experimentais ( <b>exp.</b> ) contra <i>L. amazonensis</i> , nas formas amastigota ( <b>am.</b> ) e promastigota ( <b>pr.</b> ), e valores calculados nos estados catiônico ( <b>cat.</b> ) e neutro ( <b>neut.</b> ).....	<b>125</b>
<b>Tabela 5.15:</b> Comparação entre os escores de aptidão encontrados para o atracamento dos compostos fenotiazínicos ao sítio da TSST, na TR de <i>L. amazonensis</i> , com e sem moléculas de água.....	<b>133</b>
<b>Tabela 5.16:</b> Comparação entre os valores de aptidão encontrados para o atracamento dos compostos fenotiazínicos ao sítio do FAD, perante a TR de <i>L. amazonensis</i> com e sem moléculas de água.....	<b>134</b>
<b>Tabela 5.17:</b> Comparação entre os valores de aptidão encontrados para o atracamento dos compostos mesoiônicos <b>catiônicos</b> ao sítio da TSST, na TR de <i>L. amazonensis</i> com e sem moléculas de água.....	<b>135</b>
<b>Tabela 5.18:</b> Comparação entre os valores de aptidão encontrados para o atracamento dos compostos mesoiônicos <b>neutros</b> ao sítio da TSST, na TR de <i>L. amazonensis</i> com e sem moléculas de água.....	<b>135</b>
<b>Tabela 5.19:</b> Comparação entre os valores de aptidão encontrados para o atracamento dos compostos mesoiônicos <b>catiônicos</b> ao sítio do FAD, na TR de <i>L. amazonensis</i> com e sem moléculas de água.....	<b>136</b>
<b>Tabela 5.20:</b> Comparação entre os valores de aptidão encontrados para o atracamento dos compostos mesoiônicos <b>neutros</b> ao sítio do FAD, na TR de <i>L. amazonensis</i> com e sem moléculas de água.....	<b>137</b>
<b>Tabela 5.21:</b> Comparação entre os valores de aptidão encontrados para o atracamento dos compostos amidínicos <b>catiônicos</b> ao sítio da TSST, na TR de <i>L. amazonensis</i> com e sem moléculas de água.....	<b>138</b>
<b>Tabela 5.22:</b> Comparação entre os valores de aptidão encontrados para o atracamento dos compostos amidínicos <b>neutros</b> ao sítio da TSST, na TR de <i>L. amazonensis</i> com e sem moléculas de água.....	<b>138</b>

**Tabela 5.23:** Comparação entre os valores de aptidão encontrados para o atracamento dos compostos amidínicos **catiônicos** ao sítio do FAD, na TR de *L. amazonensis* com e sem moléculas de água.....**139**

**Tabela 5.24:** Comparação entre os valores de aptidão encontrados para o atracamento dos compostos amidínicos **neutros** ao sítio do FAD, na TR de *L. amazonensis* com e sem moléculas de água.....**140**

## LISTA DE ABREVIÇÕES E SÍMBOLOS

$1/r^{12}$ .....	Repulsões de curta distância
$1/r^6$ .....	Forças atrativas provenientes dos efeitos de dispersão de London
1BZL.....	Código PDB para a tripanotiona redutase proveniente de <i>Trypanosoma cruzi</i>
1DMJ.....	Código PDB para a óxido nítrico sintase proveniente de <i>Bos taurus</i>
1FEC.....	Código PDB para a tripanotiona redutase proveniente de <i>Crithidia fasciculata</i>
1GV4.....	Código PDB para o fator indutor de apoptose proveniente de <i>Mus musculus</i>
1M7Z.....	Código PDB para a óxido nítrico sintase proveniente de <i>Bacillus subtilis</i>
1TYP.....	Código PDB para a tripanotiona redutase proveniente de <i>Crithidia fasciculata</i>
5GRT.....	Código PDB para a glutationa redutase proveniente de <i>Homo sapiens</i>
Å.....	Ângstrom(s)
$\alpha, \beta$ .....	Funções de spin
$\chi_k$ .....	Função spin-orbital molecular
$\delta_{mn}$ .....	Delta de Kronecker
$\Delta G$ .....	Energia livre
$\Delta G_{solv}$ .....	Energia livre de solvatação
$\Delta H$ .....	Termo entálpico (entalpia)
$\Delta H_{cpx}$ .....	Entalpia do complexo enzima/inibidor
$\Delta H_f, \Delta H^P$ .....	Entalpia de formação
$\Delta H_{int}$ .....	Entalpia de interação (complexo ligante-sítio ativo)
$\Delta H_{lig}$ .....	Entalpia calculada do ligante
$\Delta H_{sa}$ .....	Entalpia do sítio ativo (vazio)
$\Delta S$ .....	Termo entrópico (entropia)
$\varepsilon$ .....	Profundidade do poço do potencial (eletrostático, van der Waals)
$\varepsilon_0$ .....	Constante dielétrica
$\phi_v$ .....	Orbitais atômicos, funções de base
$\Phi$ .....	Produto anti-simétrico
$\varphi_i^\mu$ .....	Função de um orbital molecular
$\mu$ .....	Elétron com coordenadas $x^\mu, y^\mu, z^\mu$
$\mu\text{m}$ .....	Micrômetros
$\mu\text{M}$ .....	Micromolar
$\pi$ .....	(pi) 3,1416
$\rho$ .....	Densidade de probabilidade eletrônica
$\sigma$ .....	Diâmetro de colisão entre átomos ( $i$ e $j$ )
$\Sigma$ .....	Somatório
$\tau$ .....	Espaço (densidade de probabilidade eletrônica)
$\Psi$ ou $\psi$ .....	Função de onda (psi)
$\nabla^2$ .....	Operador de energia cinética
(L.).....	Subgênero <i>Leishmania</i> [ex: <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> ]
(V.).....	Subgênero <i>Viannia</i> [ex: <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> ]
$a$ .....	Energia cinética dos elétrons
$A$ .....	Energia cinética dos núcleos
ADP.....	Difosfato de adenosina
AIF.....	Fator indutor de apoptose
Am.....	Abreviação para “amastigotas”

AM1.....	Modelo de Austin 1 (do inglês “ <i>Austin Model I</i> ”)
AMA.....	Sequência primária da TR de <i>Leishmania amazonensis</i>
AMZ.....	Estrutura tridimensional da TR de <i>Leishmania amazonensis</i> obtida por modelagem por homologia
ANVISA.....	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP.....	Trifosfato de adenosina
ASP.....	Algoritmo (do inglês “ <i>Action Selection for Planning</i> ”)
BH <sub>4</sub> .....	Tetraidro-biopterina
BRA.....	Sequência primária da TR de <i>Leishmania braziliensis</i>
BRU.....	Sequência primária da TR de <i>Trypanosoma brucei</i>
$c_1, c_2...c_n$ .....	Coefficientes obtidos pelo método de regressão múltipla
$c_{vi}$ .....	Coefficientes de base
C $\alpha$ .....	Carbono alfa (aminoácidos)
Calc.....	Abreviação para “calculado”
CaM.....	Proteína calmodulina
Cat.....	Abreviação para “catiônico”
Cmp, Comp.	Abreviação para “composto”
CNDO.....	Negligência completa das integrais de sobreposição (do inglês “ <i>Complete Neglect of Differential Overlap</i> ”)
CoMFA.....	Análise comparativa dos campos moleculares (do inglês “ <i>Comparative molecular field analysis</i> ”)
CON.....	Sequência primária da TR de <i>Trypanosoma congolense</i>
CRU.....	Sequência primária da TR de <i>Trypanosoma cruzi</i>
CYP-450.....	Família do citocromo P-450
$d$ .....	Fase diagnosticável do ciclo de vida da <i>Leishmania</i>
$d\tau$ .....	Integração com todo o espaço ( $dx dy dz$ )
$D_{AH}$ .....	Número de aceptores de ligação hidrogênio do ligante
$D_{FTN}$ .....	Escore de aptidão obtido
$D_{HYD}$ .....	Número de átomos hidrofóbicos do ligante acessíveis ao solvente
$DL_{50}$ .....	Concentração necessária para matar 50% das cobaias utilizadas em teste
$D_{OPT}$ .....	Número de doadores de ligação de hidrogênio da proteína oclusos pelo ligante
$D_{TRS}$ .....	Componente torcional da função de escore
$D_{VDW}$ .....	Contribuição em interações de van der Waals entre ligante/proteína
Dd8.....	Sequência primária da TR de <i>Leishmania donovani</i>
DFMO.....	Difluorometil ornitina ou eflornitina
DFT.....	Teoria do funcional de densidade
DNA.....	Ácido desoxirribonucléico
DON.....	Sequência primária da TR de <i>Leishmania donovani</i>
DPI.....	Difeniliodônio
DTI.....	Di-2-tieniliodônio
$e$ .....	Carga do elétron
$e^-$ .....	Elétron
$E$ .....	Energia total do elétron ou sistema; enzima
$E_{bend}$ .....	Energia de dobramento do ângulo da ligação
$E_{coul}$ .....	Energia potencial eletrostática
$E_{cross}$ .....	Acoplamento entre $E_{str}$ , $E_{bend}$ e $E_{tors}$
$E_{el}$ .....	Energia de interação eletrostática
EF.....	“ <i>Eigenvector Following</i> ”
$E_{FF}$ .....	Energia total do campo de força
EI.....	Complexo enzima-inibidor

$E_{str}$ .....	Energia de estiramento da ligação
$E_{tors}$ .....	Energia de torção (modificação do ângulo diedro)
EUA.....	Estados Unidos da América
$E_{vdw}$ .....	Energia de interação de van der Waals
Exp.....	Abreviação para “experimental”
FAD.....	Flavina adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
FADH <sub>2</sub> .....	Flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
FAS.....	Sequência primária da TR de <i>Crithidia fasciculata</i>
$f_i$ .....	Operador de Fock
FIOCRUZ...	Fundação Oswaldo Cruz
FMN.....	Flavina mononucleotídeo
GA.....	Algoritmo genético
GMP.....	Monofosfato de guanósina
GMPC.....	Monofosfato 3',5' cíclico de guanósina
GOLD.....	Programa de atracamento molecular (“ <i>Genetic Optimisation for Ligand Docking</i> ”) – CCDC Ltd.
GPCRs.....	Receptores acoplados à proteína G
GPx.....	Enzima glutatona peroxidase
GR.....	Enzima glutatona redutase
GSH.....	Glutatona (forma tiólica ou reduzida)
GSSG.....	Glutatona dissulfeto (forma oxidada)
$h$ .....	Constante de Planck
$\hat{H}$ .....	Operador Hamiltoniano
Heme.....	Ferro-protoporfirina IX
HIV.....	Vírus da imunodeficiência humana (AIDS)
$i$ .....	Fase infectante do ciclo de vida da <i>Leishmania</i> ; representação de um átomo ou orbital (assim como $j$ ); índice para os orbitais moleculares
$I$ .....	Inibidor enzimático
$IC_{50}$ .....	Concentração necessária para inibir 50% das enzimas
ID.....	Difeniliodônio
IFN- $\gamma$ .....	Interferon gama
INDO.....	Negligência intermediária das diferenciais de sobreposição (do inglês “ <i>Intermediate Neglect of Differential Overlap</i> ”)
INF.....	Sequência primária da TR de <i>Leishmania infantum</i>
$j$ .....	Representação de um átomo ou orbital (assim como $i$ )
$k$ .....	Diferentes spins moleculares
K, $K$ .....	Graus kelvin, e número de funções de base, respectivamente
$K_{as}$ .....	Constante de associação do complexo EI
$K_{ds}$ .....	Constante de dissociação do complexo EI
$K_i$ .....	Constante de inibição enzimática
LCAO.....	Combinação linear de orbitais atômicos (do inglês “ <i>Linear Combination of Atomic Orbital</i> ”)
$M$ .....	Massa nuclear
MAJ.....	Sequência primária da TR de <i>Leishmania major</i> Friendlin
MINDO.....	INDO modificado (do inglês “ <i>Modified INDO</i> ”)
MK-801.....	Substância com atividade bloqueadora dos canais glutamatérgicos
MM.....	Mecânica molecular
MNDO.....	Negligência modificada das sobreposições diatômicas (do inglês “ <i>Modified Neglect of Diatomic Overlap</i> ”)
$N_A, N_B$ .....	Número de átomos das moléculas A e B, respectivamente

NAD <sup>+</sup> .....	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH.....	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NADP <sup>+</sup> .....	Nicotinamida dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)
NADPH.....	Nicotinamida dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
Neut.....	Abreviação para “neuro”
$N_{LR}$ .....	Número de ligações com rotação livre do inibidor, imobilizadas pela interação inibidor/enzima
NMDA.....	Ácido <i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspártico
NOHA.....	<i>N</i> -hidróxi-arginina
NOS.....	Enzima óxido nítrico sintase
NOS-I.....	Isoenzima óxido nítrico sintase neuronal
NOS-II.....	Isoenzima óxido nítrico sintase induzida
NOS-III.....	Isoenzima óxido nítrico sintase endotelial
eNOS.....	Isoenzima óxido nítrico sintase endotelial
iNOS.....	Isoenzima óxido nítrico sintase induzida
nNOS.....	Isoenzima óxido nítrico sintase neuronal
OM.....	Orbital molecular
OMS.....	Organização Mundial de Saúde
P&D.....	Pesquisa e desenvolvimento
PDB.....	Banco de dados de proteínas (do inglês “ <i>Protein Data Bank</i> ”)
PES.....	Superfície de energia potencial (do inglês “ <i>Potential Energy Surface</i> ”)
$P_i$ .....	Fosfato inorgânico
PM3.....	Método paramétrico número 3 (do inglês “ <i>Parametric method number 3</i> ”)
PM4.....	Método paramétrico número 4 (do inglês “ <i>Parametric method number 4</i> ”)
PM5.....	Método paramétrico número 5 (do inglês “ <i>Parametric method number 5</i> ”)
PM6.....	Método paramétrico número 6 (do inglês “ <i>Parametric method number 6</i> ”)
PMF.....	Implementação de função de escore (do inglês “ <i>Potential of Mean Force</i> ”)
Pr.....	Abreviação para “promastigotas”
$q$ .....	Carga de cada átomo
QM.....	Mecânica quântica (do inglês “ <i>quantum mechanics</i> ”)
QSAR.....	Relação estrutura-atividade quantitativa (do inglês “ <i>Quantitative structure-activity relationship</i> ”)
R.....	Coefficiente de correlação linear
R, $R_{free}$ .....	Medidas de correlação entre o modelo feito e os dados experimentais (fator) (Confiabilidade)
$r, r_{ij}$ .....	Distância (entre 2 átomos $i$ e $j$ )
$R_{AB}, r_{ab}, r_{Aa}$ ..	Distâncias que separam 2 núcleos $A$ e $B$ , 2 elétrons $a$ e $b$ , e elétrons e núcleos, respectivamente
REA, SAR...	Relação estrutura-atividade (do inglês “ <i>Structure-activity relationship</i> ”)
RM1.....	Modelo de Recife 1 (do inglês “ <i>Recife Model 1</i> ”)
RMN.....	Ressonância magnética nuclear
RMSD.....	Desvio de mínimos quadrados, desvio quadrático médio (do inglês “ <i>root mean square deviation</i> ”)
RNA.....	Ácido ribonucléico
S.....	Número quântico spin
$S_{ij}$ .....	Integral de sobreposição entre orbitais $i$ e $j$
SAM1.....	Método <i>ab initio</i> semi-empírico 1 (do inglês “ <i>Semiempirical ab initio Method 1</i> ”)
SCF.....	Campo auto-consistente (do inglês “ <i>self-consistent field</i> ”)
SD.....	Determinante de Slater

SOM.....	Spin-orbital molecular
T.....	Temperatura
THF.....	Tetraidrofolato ou 5,6,7,8-tetraidropterol-L-glutamato
TNF.....	Fator de necrose tumoral
TNQ2.....	8-metoxi-nafto[2,3- <i>b</i> ]tiofen-4,9-quinona
TR.....	Enzima tripanotiona redutase
TSA.....	Enzima tripanotiona sintetase-amidase
TSH.....	Tripanotiona (forma tiólica ou reduzida)
TSST.....	Tripanotiona dissulfeto (forma oxidada)
VDW.....	van der Waals
Z.....	Carga de um núcleo

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. <i>Leishmania</i> spp. e Leishmaniose.....</b>	<b>4</b>
2.1.1. Características gerais.....	4
2.1.2. Formas evolutivas e ciclo biológico.....	10
<b>2.2. Quimioterapia Antiparasitária.....</b>	<b>14</b>
2.2.1. Fármacos atuais.....	14
2.2.2. Novas propostas: amidinas e mesoiônicos.....	19
<b>2.3. Óxido Nítrico Sintase (NOS) e Óxido Nítrico (NO).....</b>	<b>24</b>
2.3.1. Função fisiológica da NOS e NO.....	24
2.3.2. Estrutura e organização catalítica da enzima.....	25
2.3.3. Mecanismo de catálise.....	27
2.3.4. Função e estrutura da NOS no parasito tripanossomatídeo.....	30
<b>2.4. Tripanotiona Redutase (TR) e Tripanotiona (TSH).....</b>	<b>31</b>
2.4.1. Função fisiológica e mecanismo catalítico da TR.....	31
2.4.2. Estrutura e organização catalítica da TR.....	36
<b>2.5. Ação de Quimioterápicos contra a NOS e a TR.....</b>	<b>39</b>
2.5.1. Quimioterápicos testados.....	39
2.5.2. Busca por elucidações das interações com as enzimas: sítios alostéricos.....	41
<b>2.6. Planejamento Racional de Fármacos.....</b>	<b>47</b>
2.6.1. Descoberta e desenvolvimento de novos fármacos.....	47
2.6.2. O alvo terapêutico – biomacromolécula protéica.....	48
2.6.3. A química computacional e o desenvolvimento de fármacos.....	50
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>53</b>
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>55</b>
<b>4.1. Considerações Teóricas.....</b>	<b>55</b>
4.1.1. Métodos clássicos – mecânica molecular (MM).....	55
4.1.2. Atracamento molecular (“ <i>docking</i> ”).....	57
<i>i. Funções de escore baseadas em campos de força.....</i>	<i>61</i>
<i>ii. Funções de escore empíricas.....</i>	<i>62</i>

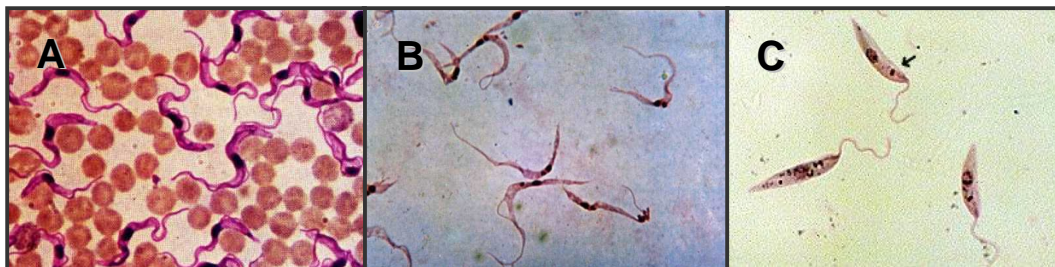


iii. Funções de escore baseadas em conhecimento.....	63
4.1.3. O programa GOLD e o algoritmo genético (GA).....	63
i. Preparação da proteína e ligantes (inicialização).....	66
ii. A representação do cromossomo.....	66
iii. A função de aptidão (“fitness”).....	66
iv. Os operadores genéticos.....	67
v. Extensões ao algoritmo.....	68
4.1.4. Métodos quânticos – equação de Schrödinger.....	68
4.1.5. A interpretação de Born.....	70
4.1.6. Aproximação de Born-Oppenheimer.....	71
4.1.7. O determinante de Slater.....	73
4.1.8. As equações de Hartree-Fock.....	74
4.1.9. Combinação linear dos orbitais atômicos (LCAO).....	75
4.1.10. A aproximação semi-empírica.....	76
4.1.11. Métodos semi-empíricos.....	78
4.1.12. Energia de interação.....	80
<b>4.2. Estratégia Geral.....</b>	<b>83</b>
i. Inibição da NOS.....	84
ii. Inibição da TR.....	84
<b>4.3. Modelo Para Estudo da Inibição da NOS.....</b>	<b>85</b>
4.3.1. Construção do modelo da NOS.....	85
4.3.2. Aplicação do modelo aos compostos amidínicos.....	89
<b>4.4. Construção dos Modelos Para Estudo da Inibição da TR.....</b>	<b>92</b>
4.4.1. Escolha da estrutura.....	92
4.4.2. Validação do método de atracamento – “redocking”.....	93
4.4.3. Modelo TR I.....	95
4.4.4. Modelo TR II.....	98
4.4.5. Construção de um modelo tridimensional da TR de <i>L. amazonensis</i> .....	100
4.4.6. Modelo TR III.....	104
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>106</b>
<b>5.1. Modelos de Inibição da NOS.....</b>	<b>106</b>
5.1.1. Modelo pterínico de inibição da NOS.....	106
5.1.3. Aplicação do modelo pterínico de inibição da NOS às amidinas.....	107
<b>5.2. Modelo de Inibição da TR.....</b>	<b>110</b>
5.2.1. Validação do atracamento (“redocking”).....	110

5.2.2. Modelo TR I.....	113
5.2.3. Modelo TR II.....	121
5.2.4. Modelo tridimensional a partir da sequência primária da TR de <i>L. amazonensis</i> .....	127
5.2.5. Modelo TR III.....	133
<b>6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>141</b>
<b>6.1. Conclusões.....</b>	<b>141</b>
6.1.1. Enzima NOS.....	141
6.1.2. Enzima TR.....	141
<b>6.2. Perspectivas.....</b>	<b>143</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>144</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>160</b>
<b>Anexo A.....</b>	<b>161</b>
<b>Anexo B.....</b>	<b>162</b>
<b>Anexo C.....</b>	<b>163</b>
<b>Anexo D.....</b>	<b>164</b>
<b>Anexo E.....</b>	<b>165</b>
<b>Anexo F.....</b>	<b>166</b>
<b>Anexo G.....</b>	<b>170</b>
<b>Anexo H (1-3).....</b>	<b>171</b>
<b>Anexo I (1-8).....</b>	<b>174</b>
<b>Anexo J (1-10).....</b>	<b>182</b>
<b>Anexo K.....</b>	<b>192</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Doenças parasitárias provocadas por protozoários, transmitidas principalmente por insetos hematófagos, constituem o problema de saúde humana mais distribuído. É estimado que três bilhões de indivíduos no mundo sofram destes acometimentos, e as maiores causas de mortalidade são atribuídas aos parasitos tripanossomatídeos (*Kinetoplastida*) e apicomplexa, responsáveis por importantes doenças humanas. A ação combinada do *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. (**figura 1.1**), por exemplo, resultou até o ano de 2000 em aproximadamente 20 milhões de casos destas doenças por todos os continentes, principalmente nos países em desenvolvimento. Considerando-se apenas o gênero *Leishmania*, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam sob risco de contaminação, com dois milhões de novos casos de leishmaniose por ano [MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; SILVA *et al.*, 2002; KRIEGER *et al.*, 2000].



**Figura 1.1:** Demonstrações microscópicas dos parasitos *Trypanosoma brucei* (forma evolutiva tripomastigota) [A], *Trypanosoma cruzi* (forma evolutiva epimastigotas) [B] e *Leishmania donovani* [C] (forma evolutiva promastigota).

**Fonte:** [A], [B] <<http://www.ucm.es/info/parasito/aTLAS.htm>>; [C] <<http://www.msu.edu/course/zol/316/htm>>. Acesso em junho/2006.

Tripanossomatídeos causam uma variedade de doenças em humanos e animais. Duas subespécies africanas, *Trypanosoma brucei rhodesiense* e *Trypanosoma brucei gambiense* causam a Tripanossomíase Africana ou “Doença do Sono”, enquanto outras espécies causam as tripanossomíases animais. O *Trypanosoma cruzi*, mais comum na América do Sul, causa a Doença de Chagas, ocorrendo também na América Central [BARRETT & GILBERT, 2002; BARRETT *et al.*, 1999].

Os parasitos tripanossomatídeos possuem um ciclo de desenvolvimento complexo entre seus hospedeiros invertebrados (geralmente insetos) e vertebrados (mamíferos). As características de seus estágios evolutivos podem ser distinguidas, um do outro (gênero *Trypanosoma* do gênero *Leishmania*, por exemplo) através de suas morfologias, taxas de crescimento, requisições nutricionais e regulação da expressão de proteínas de superfície (fator este extremamente importante para o reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro), glicanas e lipídios que mediam as interações entre parasito e hospedeiro, dentre outros. Curiosamente, a diferenciação entre os parasitos é frequentemente marcada por mudanças dramáticas na morfologia e funcionamento de suas organelas, nas vias metabólicas secretórias e endocíticas [WALLER & McCONVILLE, 2002].

Vários aspectos incomuns de sua bioquímica fisiológica são compartilhados entre os tripanossomatídeos, mas não pelas células de seus hospedeiros mamíferos. Este fato fez com que houvesse um relativo otimismo em relação ao desenvolvimento de uma estrutura útil contra as doenças causadas por todos os tripanossomatídeos. Infelizmente, diferenças profundas nas maneiras como cada gênero interage com seu hospedeiro fazem com que diversos critérios farmacológicos precisem ser considerados no desenvolvimento destes fármacos. Fatos como estes fazem com que haja uma intensa busca por uma estrutura que possua equivalente ou que pelo menos tenha diferenças significativas de enzimas ou receptores humanos. Assim, várias substâncias têm sido testadas contra estes parasitos, na busca de um agente de síntese viável e simples, barato, eficiente e, ao mesmo tempo, pouco tóxico para o hospedeiro humano. Infelizmente, até hoje nenhum agente com todas essas características foi disponibilizado para o tratamento dessas parasitoses.

Nesta intensa busca, fármacos com uso já consolidado no mercado contra outras doenças, há anos, têm sido testados contra tais organismos, para que se encontre algum agente com eficácia, conjugada a uma toxidez conhecida (inclusive já testados clinicamente) e com rotas sintéticas já estipuladas e otimizadas.

A procura por tais moléculas, nos dias atuais, faz com que os profissionais que lidam com a área medicinal, engajados no descobrimento de fármacos, sejam parte de equipes interdisciplinares, entendendo não apenas do ramo da química orgânica, mas de uma gama de outras disciplinas, para antecipar problemas e interpretar resultados para ajudar a mover projetos à frente. Várias metodologias de pesquisa são utilizadas nesta procura, para que fatores como tempo e dinheiro sejam utilizados da melhor forma possível.

As diversas metodologias da modelagem molecular, uma ciência em intenso crescimento nas últimas décadas, têm contribuído para que fármacos sejam descobertos

[JORGENSEN, 2004]. Os vários dados obtidos por meio dessas metodologias objetivam não apenas a descoberta de novos agentes farmacológicos, mas a diminuição de custos e tempo com a síntese de moléculas com menor chance de apresentarem a bioatividade desejada, ao se descobrir detalhes dos mecanismos de ação de determinados fármacos. O conhecimento dos mecanismos de ação no nível molecular e de aspectos farmacodinâmicos permite que novas estruturas sejam propostas, baseadas em sua interação com seus respectivos sítios de ação farmacológica.

O presente trabalho descreve o uso de técnicas em modelagem molecular, tais como cálculos com métodos semi-empíricos, atracamento molecular (“*docking*”), modelagem por homologia e outros, para buscar elucidções em mecanismos de ação ainda não conhecidos. As substâncias aqui estudadas, pertencentes às classes dos mesoiônicos e amidinas, foram principalmente sintetizadas pelo NUSQMED (Núcleo de Síntese e Química Medicinal), coordenado pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Aurea Echevarria (UFRRJ), e já testadas frente a diferentes estados evolutivos do parasito *Leishmania amazonensis*.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. *Leishmania* spp. e Leishmaniose

#### 2.1.1. Características gerais

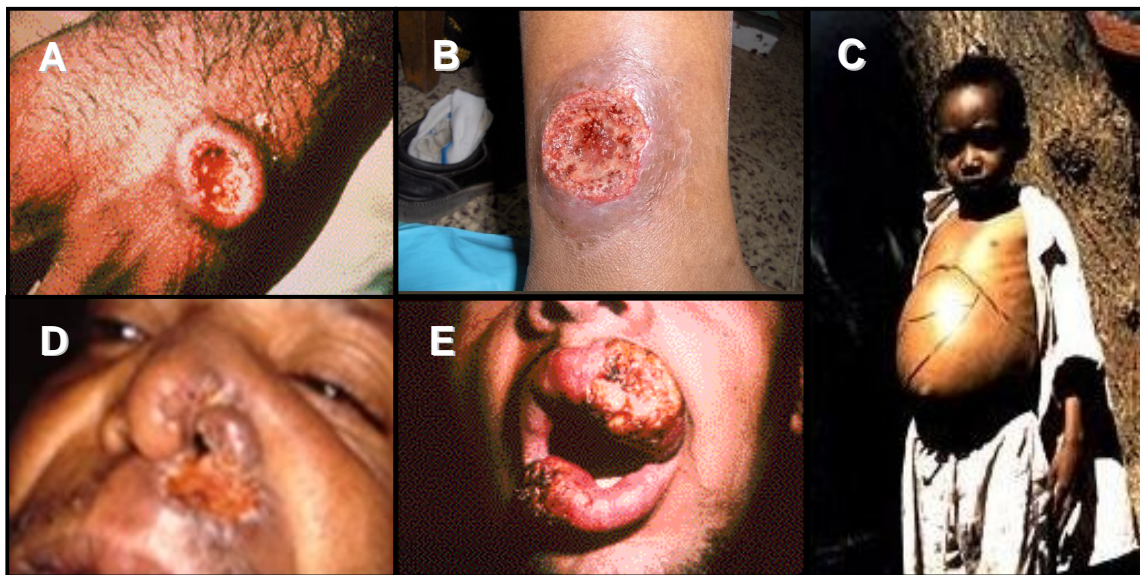
O gênero *Leishmania* é constituído por protozoários parasitos intracelulares obrigatórios (*Kinetoplastida; Trypanosomatidae*), caracterizados por grande diversidade e complexidade, podendo causar diferentes doenças em seres humanos. Sua caracterização taxonômica está representada no **anexo A**. Estes parasitos foram descritos independentemente por William Leishman e Charles Donovan (**figura 2.1**) em 1903, mas foram observados (porém não descritos) previamente por David D. Cunningham em 1885 e Peter Borovsky em 1898. Foram confundidos com outros protozoários, e o gênero *Leishmania* foi proposto por James Wright apenas em 1903 [VANNIER-SANTOS *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2002]. Espécies deste gênero causam um vasto espectro de doenças endêmicas em vários países, como naqueles localizados nos trópicos, sub-trópicos e no sul da Europa, em áreas que compreendem desde florestas e manguezais nas Américas a desertos no oeste da Ásia, em áreas rurais ou periurbanas [WALLER & McCONVILLE, 2002].



**Figura 2.1:** Fotos de William Boog Leishman (1865-1926) [A] e Charles Donovan (1863-1915) [B], cientistas que primeiro descreveram parasitos do gênero *Leishmania*.

**Fonte:** <<http://www.levriers.net/leishmaniose.html>>. Acesso em julho/2006.

Estas doenças, consideradas infecciosas zoonóticas não-contagiosas, constituem síndromes clínicas graves, incluindo as formas de leishmaniose tegumentar e visceral (**figura 2.2**), além de casos de infecção assintomática (ou infecção inaparente) e de leishmaniose linfonodal. Estas formas afetam outros animais, e não somente o ser humano. A forma tegumentar é ainda dividida nas formas cutânea, mucocutânea (ou mucosa) e difusa (cutâneo difusa ou disseminada), correspondendo a lesões extensas, causadas principalmente pela destruição de células do sistema imune e adjacências à região da picada do mosquito transmissor da doença (o inseto flebotomíneo conhecido como mosquito-palha, tatuquira, birigui, dentre outros) [MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; GOMES *et al.*, 2003; BARRETT & GILBERT, 2002].



**Figura 2.2:** Demonstração da leishmaniose cutânea [A e B], visceral [C] e mucocutânea [D e E].

**Fonte:** [A], [E] <<http://www.wehi.edu.au/research/overview/inf.html>>; [B], [D] <<http://www.mgm.ufl.edu/~gulig/mmid/>>; [C] <[http://www.kit.nl/frameset.asp?biomedical\\_research/html/leishmaniasis.asp&fnr=1&](http://www.kit.nl/frameset.asp?biomedical_research/html/leishmaniasis.asp&fnr=1&)>. Acesso em julho/2006.

No Brasil, a confirmação de formas de *Leishmania* em úlceras cutâneas e nasobufofaríngeas primeiro ocorreu no ano de 1909, quando Lindenberg encontrou o parasito em indivíduos que trabalhavam em áreas de desmatamentos, para a construção de rodovias no interior de São Paulo. Cada forma da doença é causada por um conjunto diferente de aproximadamente 21 espécies, sendo as principais indicadas na **tabela 2.1**, resultado da replicação dos parasitos em macrófagos e fagócitos mononucleares, na pele e na mucosa

nasobucofaringea [MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; GOMES *et al.*, 2003; BARRETT & GILBERT, 2002].

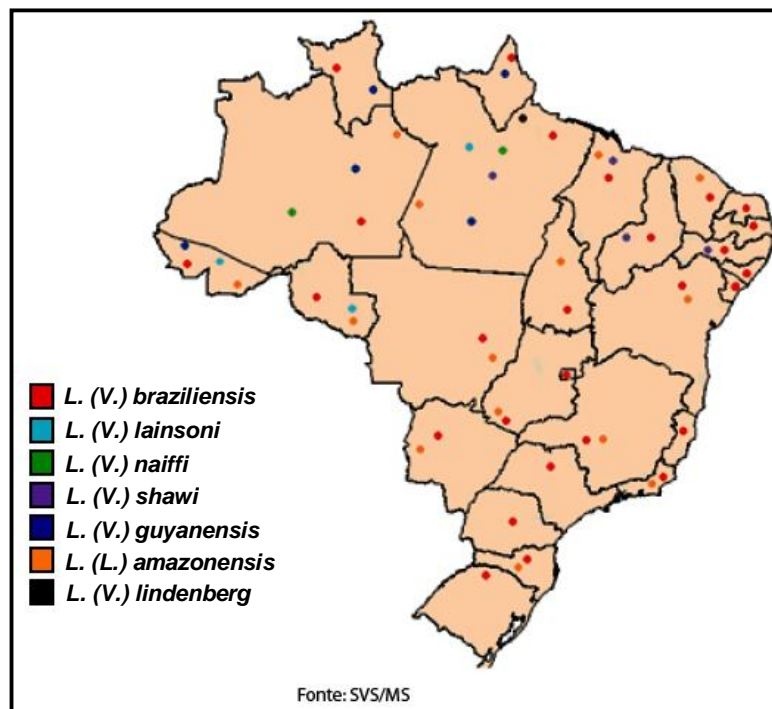
**Tabela 2.1:** Diferentes manifestações clínicas e seus agentes etiológicos (gênero *Leishmania*).

<b>Tipo de leishmaniose</b>	<b>Agente etiológico</b>	<b>Variações</b>
<b>Leishmaniose visceral</b> (calazar ou kala-azar)	Espécies do complexo <i>L. donovani</i> [ <i>L. (L.) donovani</i> , <i>L. (L.) infantum</i> , <i>L. (L.) chagasi</i> ], <i>L. (L.) tropica</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i>	Pós-calazar (leishmaniose dérmica): desenvolve-se após a resolução da leishmaniose visceral, caracterizada por lesões cutâneas.
<b>Leishmaniose cutânea</b>	<i>L. (L.) tropica</i> , <i>L. (L.) major</i> , <i>L. (L.) aethiopica</i> , <i>L. (L.) infantum</i> , <i>L. (L.) donovani</i> , espécies do complexo <i>L. mexicana</i> [ <i>L. (L.) mexicana</i> , <i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>L. (L.) venezuelensis</i> ] e subgênero <i>Viannia</i> [mais comuns <i>L. (V.) braziliensis</i> , <i>L. (V.) panamensis</i> , <i>L. (V.) guyanensis</i> , <i>L. (V.) peruviana</i> ]; e ainda <i>L. (L.) chagasi</i> .	Leishmaniose “recidivans” ou lupóide: uma variação crônica e oligoparasitária, manifestada tipicamente por uma lesão facial solitária que é curada centralmente, mas gradualmente aumenta com o passar dos anos. Pode lembrar o lúpus (a tuberculose da pele). Causada principalmente por <i>L. (L.) tropica</i> .  Leishmaniose cutânea difusa ou disseminada: uma variante crônica, progressiva e poliparasitária, manifestando múltiplas lesões cutâneas que lembram a lepra. Causada por <i>L. (L.) aethiopica</i> e complexo <i>L. mexicana</i> .
<b>Leishmaniose mucocutânea (ou nasobucofaringea)</b>	Subgênero <i>Viannia</i> [tipicamente <i>L. (V.) braziliensis</i> , mas também <i>L. (V.) panamensis</i> e <i>L. (V.) guyanensis</i> ], <i>L. (L.) amazonensis</i> .	A leishmaniose mucocutânea é considerada por muitos autores uma variação da leishmaniose cutânea.

**Fonte:** [HERWALDT, 1999].

Em humanos, a leishmaniose cutânea é causada principalmente por *Leishmania (Leishmania) major* em países da Europa e Ásia, e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* na América do Sul. Esta última foi assim nomeada por Gaspar Vianna no Brasil, após Splendore ter diagnosticado a forma mucosa da doença em 1911. A distribuição das espécies presentes no Brasil para a forma tegumentar da doença está demonstrada na **figura 2.3**. O período de incubação da doença em seres humanos é de 2 a 3 meses, podendo chegar a 2 anos [MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; HERWALDT, 1999]. Um perfil detalhado da distribuição dos casos de leishmaniose tegumentar no Brasil, de estado em estado, assim como o coeficiente de detecção de tais zoonoses de 1985 a 2005 é apresentado nos **anexos B e C**.





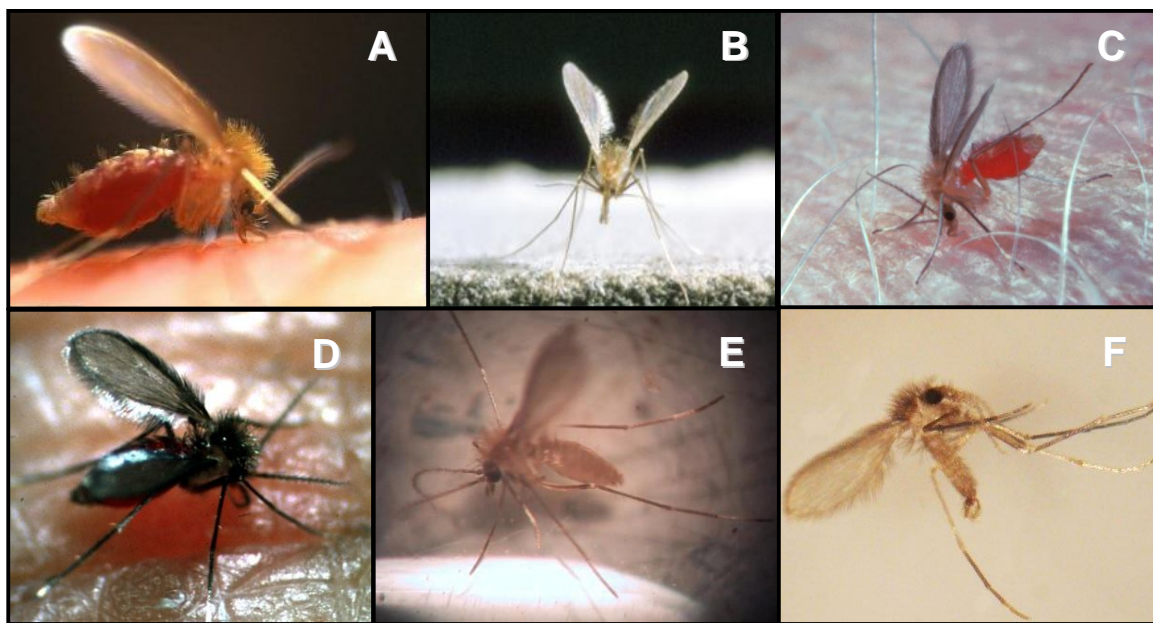
**Figura 2.3:** Distribuição das espécies de *Leishmania* no Brasil, em 2005. Notar que as espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* são as mais amplamente distribuídas.

**Fonte:** MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007.

Nas últimas décadas, as análises epidemiológicas da leishmaniose têm sugerido mudanças no padrão de transmissão da doença, inicialmente considerada especificamente como uma zoonose de animais silvestres, que acometia ocasionalmente pessoas em contato com florestas. Posteriormente, a doença começou a ocorrer em zonas rurais, já praticamente desmatadas, e em regiões periurbanas. Com esta mudança de características e localidades, observa-se a existência de três padrões epidemiológicos de transmissão [MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007]:

- a) **Padrão silvestre** – transmissão que ocorre em áreas de vegetação primária, como uma zoonose de animais silvestres;
- b) **Padrão ocupacional ou de lazer** – transmissão associada à exploração desordenada da floresta e derrubada de matas para construção de estradas, extração de madeira, desenvolvimento de atividades agropecuárias e ecoturismo (antropozoonose);
- c) **Padrão rural ou periurbano** – transmissão em áreas de colonização (zoonose de matas residuais) ou periurbana, em que houve adaptação do vetor ao peridomicílio (zoonose de matas residuais e/ou antropozoonose).

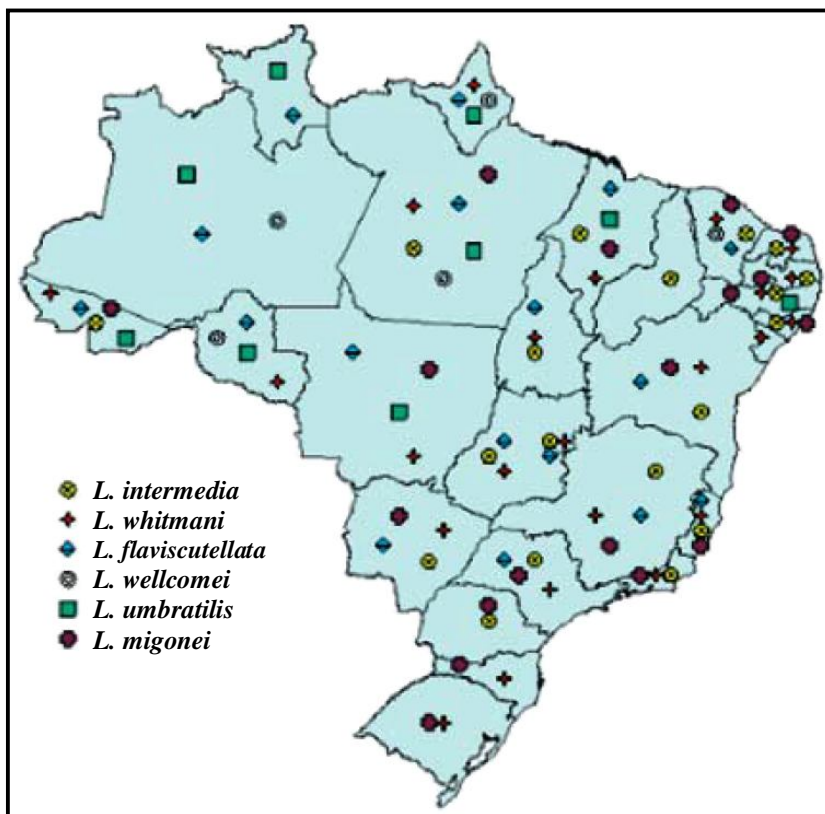
A leishmaniose é transmitida por aproximadamente 30 espécies de flebotomíneos. A transmissão da doença engloba a participação do inseto flebotomíneo como vetor (**figura 2.4**), que adquire o parasito através do sangue infectado de hóspedes mamíferos [GRIMALDI & TESH, 1993].



**Figura 2.4:** *Phlebotomus* sp. [A/B/C], flebotomíneos transmissores da leishmaniose no “velho mundo”; *Lutzomyia* sp. [D/E/F], transmissores no “novo mundo”.

**Fonte:** [A] <<http://www.keele.ac.uk/depts/aep/images/rdw%20phleb.jpg>>; [B] <<http://www.unine.ch/zool/para/guerin/index.html>>; [C] <<http://www.afpmb.org/netpub/server.np?find&catalog=catalog&template=detail.np&field=itemid&op=matches&value=961&site=Bravado>>; [D] <<http://faculty.vetmed.ucdavis.edu/faculty/gclanzaro/lab/images/sandflyimagerlarge.jpg>>; [E] <<http://www.fmt.am.gov.br/areas/entomologia/imagens/imagem009.jpg>>; [F] <<http://www.parasitesandvectors.com/content/figures/1756-3305-2-S1-S1-3.jpg>>. Acesso em julho/2006 [B/C], e agosto/2009 [A/D/E/F].

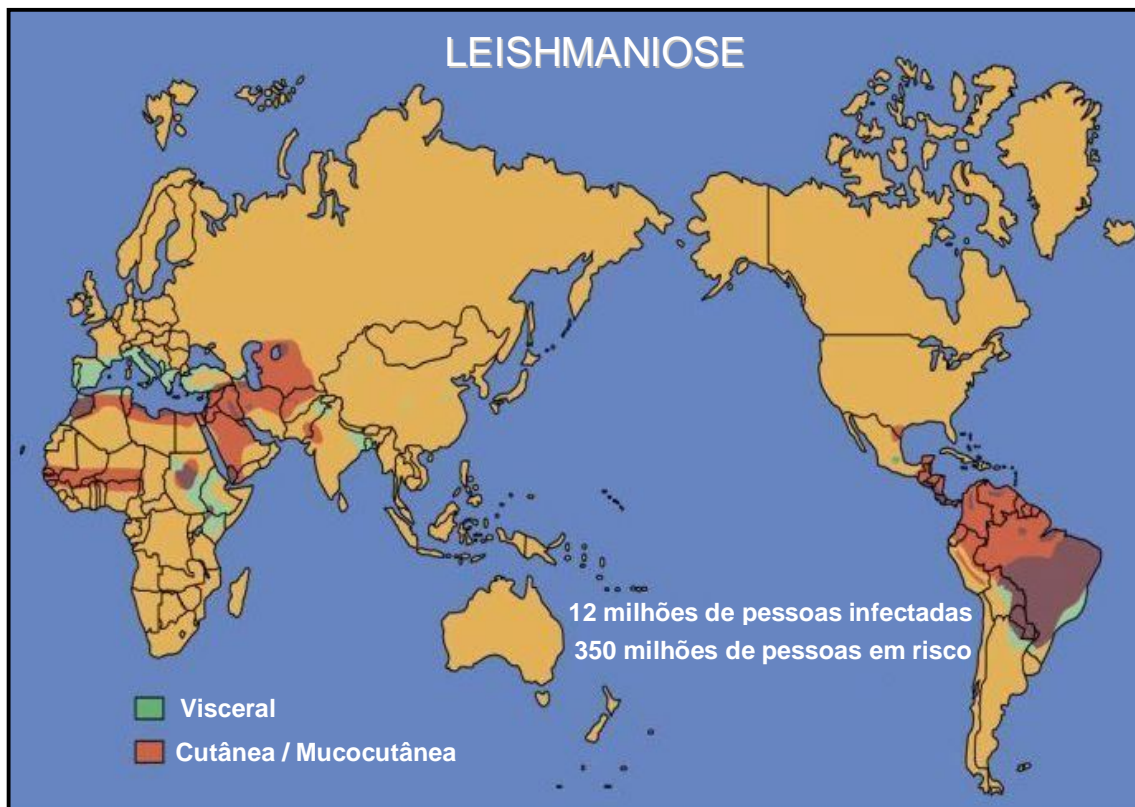
No ano de 1922, Aragão demonstrou pela primeira vez no Brasil o papel do flebotomíneo na transmissão da leishmaniose tegumentar e Forattini, em 1958, encontrou roedores silvestres parasitados em áreas florestais do estado de São Paulo. O gênero *Phlebotomus* é considerado o principal transmissor da doença no mundo, mas nas Américas (o chamado “novo mundo”) e principalmente nas Américas do Sul e no Brasil, o parasito se adaptou também aos insetos do gênero *Lutzomyia*, mais numerosos nesta região, sendo ali identificados como vetores da doença. A **figura 2.5** demonstra os principais vetores encontrados no Brasil, e sua distribuição por região [MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; GRIMALDI & TESH, 1993].



**Figura 2.5:** Distribuição dos vetores (gênero *Lutzomyia*) responsáveis pela transmissão de *Leishmania* no Brasil, em 2005. Os símbolos representam as diferentes espécies do vetor, sendo elas: *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia wellcomei*, *Lutzomyia umbratilis* e *Lutzomyia migonei*, respectivamente.

**Fonte:** MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007.

A leishmaniose é endêmica em 88 países, incluídos nas Américas nas regiões do norte da Argentina ao sul do Texas (mas não no Uruguai, Chile e Canadá), no sul da Europa, Ásia (com exceção da região sudeste), Oriente Médio e África (particularmente norte e leste, com casos esporádicos nas outras regiões). Por ser detectada em tantos países e também por causar graves deformidades, é considerada pela OMS uma das 6 doenças infecciosas mais importantes. Estima-se que 500.000 indivíduos contraíam a forma visceral da doença por ano, sendo 90% destes casos em Bangladesh, nordeste da Índia (particularmente no estado de Bihar), Nepal, Sudão e nordeste do Brasil (**figura 2.6**); e que 1,5 milhão de pessoas contraíam a forma cutânea da doença, sendo 90% destas localizadas no Afeganistão, Argélia, Irã, Iraque, Arábia Saudita, Síria, Brasil e Peru [GOMES *et al.*, 2003; HERWALDT, 1999; GRIMALDI & TESH, 1993]. A distribuição dos casos tegumentares da doença no Brasil se encontra nos **anexos D e E**.



**Figura 2.6:** Distribuição geográfica de casos de leishmaniose visceral (áreas em **verde**) e leishmaniose tegumentar (cutânea/mucocutânea – áreas em **vermelho**) em 2002, de acordo com a OMS. As áreas em **roxo** correspondem a regiões com incidência dos 3 tipos de doença. Segundo a pesquisa, existem 12 milhões de pessoas infectadas, e outras 350 milhões em risco de contaminação.

**Fonte:** <<http://www.wehi.edu.au/research/divisions/inf/labs/handman/leishmaniasis.html>>. Acesso em agosto/2006.

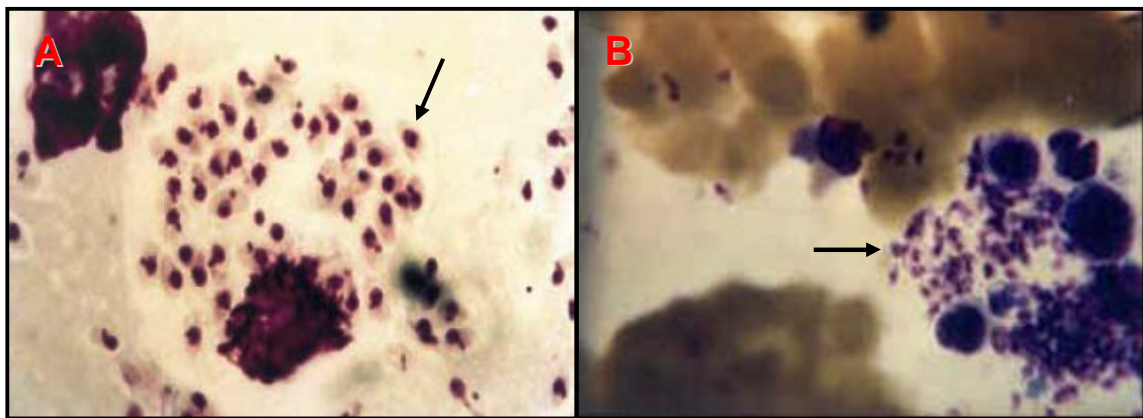
### 2.1.2. Formas evolutivas e ciclo biológico

Os ciclos de transmissão da leishmaniose variam de acordo com a região geográfica, dependendo da espécie do parasito presente em maior quantidade na região em questão, assim como o vetor envolvido, reservatórios (animais silvestres ou domésticos que possuem as infecções) e hospedeiros de forma geral. No entanto, algumas características são comuns a todas as espécies, e tais características serão aqui exploradas.

Todas as espécies do gênero *Leishmania* são similares morfologicamente e possuem 2 estágios fundamentais de desenvolvimento em seu ciclo de vida: a forma amastigota (ou aflagelada), intracelular obrigatória imóvel, infectando as células fagocíticas mononucleares dos hospedeiros vertebrados; e a forma promastigota (ou flagelada), que se prolifera no intestino do inseto flebotomíneo [MARTINY & VANNIER-SANTOS, 2005].



As formas amastigotas são um estágio evolutivo esférico sem mobilidade (**figura 2.7**), de aproximadamente 2,5 a 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, proliferando dentro de fagolisossomas nos macrófagos do hospedeiro vertebrado. Os parasitos se replicam acentuadamente dentro destas vesículas e eventualmente tornam-se livres dos macrófagos infectados, espalhando a doença por todo o organismo do hospedeiro vertebrado. Para espécies dermatrópicas de *Leishmania*, a lesão permanece na pele, mas para espécies viscerotrópicas, o parasito migra da lesão cutânea inicial para o fígado, baço e medula óssea [MARTINY & VANNIER-SANTOS, 2005].

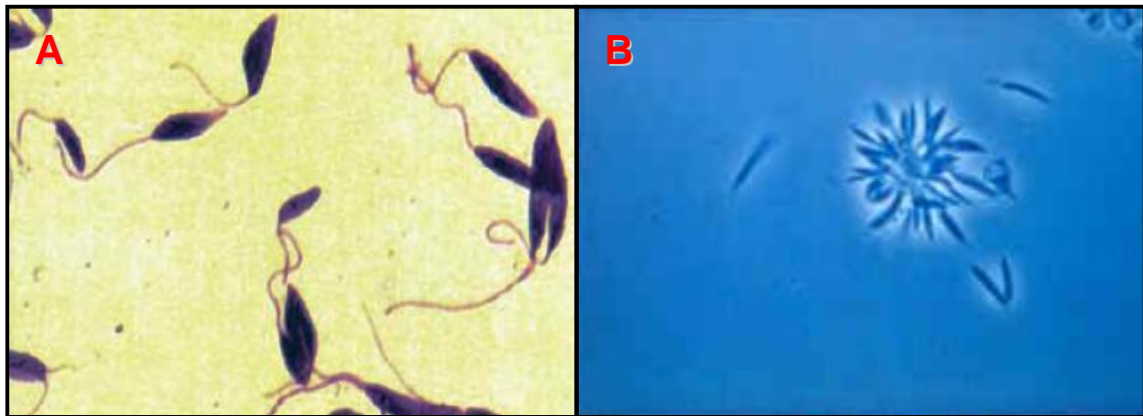


**Figura 2.7:** Demonstração de formas amastigotas ou aflageladas (setas) de *Leishmania* sp. [A], em um aspirado de células do baço [B].

**Fonte:** [A] MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; [B] OMS <[http://www.who.int/leishmaniasis/surveillance/slides\\_manual/en/index8.html](http://www.who.int/leishmaniasis/surveillance/slides_manual/en/index8.html)>. Acesso em junho/2010.

A forma amastigota é transmitida a outros vertebrados através do mosquito flebotomíneo, que a ingere em macrófagos no sangue do hospedeiro infectado, durante o repasto sanguíneo. Estas amastigotas, uma vez em contato com o hospedeiro invertebrado, são liberadas no interior de seu intestino, onde se diferenciam em formas evolutivas flageladas e afiladas, denominadas promastigotas procíclicas (**figura 2.8**). Desta forma, estas se ligam às microvilosidades do epitélio intestinal, passando por um processo denominado metaciclogênese, onde a forma procíclica ainda não patogênica adquire virulência, transformando-se em uma forma infectante metacíclica (formas menores e mais finas que as procíclicas, com flagelo mais longo e maior capacidade de locomoção). Este processo dura de 4 a 7 dias — as formas captadas 3 dias após o repasto do inseto são avirulentas, tornando altamente patogênicas a ratos se captadas de 4 a 8 dias após o repasto sanguíneo.

Modificações bioquímicas fazem com que reconhecimentos moleculares ocorram entre estruturas das microvilosidades e formas metacíclicas, permitindo com que elas migrem do epitélio intestinal para a faringe e cavidade oral do inseto, tornando-se prontas para serem reinoculadas em um novo hospedeiro vertebrado [MARTINY & VANNIER-SANTOS, 2005; PONTE-SUCRE, 2003; CUNNINGHAM, 2002].

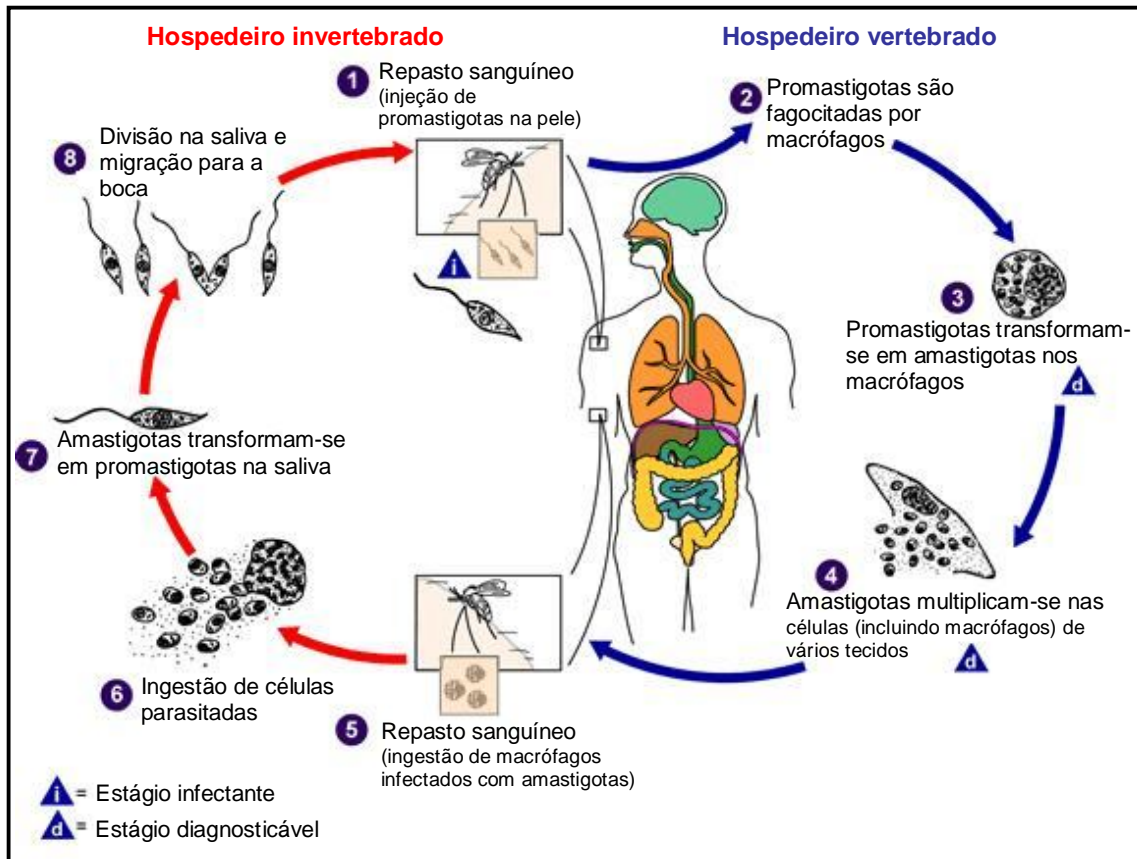


**Figura 2.8:** Demonstração de formas promastigotas ou flageladas de *Leishmania* sp. [A], crescendo em meio de cultura apropriado [B].

**Fonte:** [A] MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; [B] OMS <[http://www.who.int/leishmaniasis/surveillance/slides\\_manual/en/index3.html](http://www.who.int/leishmaniasis/surveillance/slides_manual/en/index3.html)>. Acesso em junho/2010.

Durante o próximo repasto sanguíneo do vetor infectado, a forma infectante metacíclica é passada ao hospedeiro vertebrado. Altas concentrações desta forma evolutiva provocam o bloqueio de estruturas do trato digestivo do inseto, e à medida que este suga o sangue da vítima, ele regurgita o conteúdo de sua glândula salivar, onde se encontram os parasitos, infectando o hospedeiro vertebrado. A saliva do mosquito contém fatores químicos que potencializam o poder infectante do parasito, com ação vasodilatadora que inibe eventos pró-inflamatórios no hospedeiro e induz a produção de citocinas exercendo um efeito quimiotático sobre as células reticuloendoteliais, sendo estas últimas atraídas ao local da inoculação. Uma vez no sangue, as promastigotas metacíclicas deverão ser reconhecidas por anticorpos, ativando o sistema complemento, para que se liguem aos eritrócitos e, posteriormente, consigam se instalar nos macrófagos através de fagocitose mediada por receptores. As promastigotas são então incorporadas aos fagolisossomas, onde se diferenciarão à forma amastigota. Estas proliferarão, eventualmente rompendo o macrófago infectado, sendo liberadas para infectar outros macrófagos, começando novamente o ciclo

[MARTINY & VANNIER-SANTOS, 2005; HAILU *et al.*, 2004; PONTE-SUCRE, 2003; CUNNINGHAM, 2002]. O processo descrito está representado na **figura 2.9**.

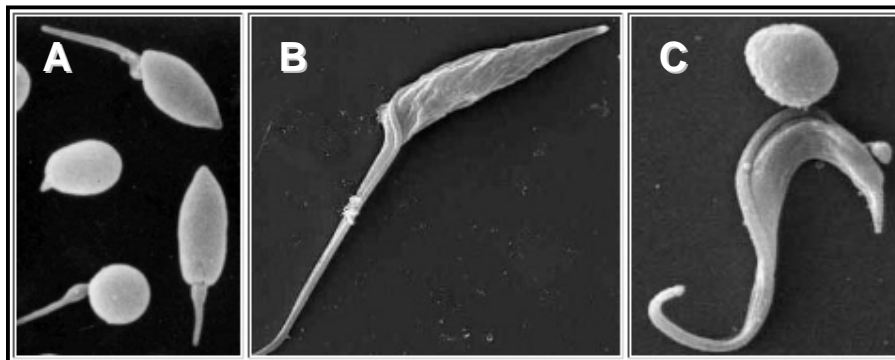


**Figura 2.9:** Ciclo de vida de *Leishmania* spp.. Promastigotas procíclicas na saliva do inseto flebotômico passam por diferenciação em formas metacíclicas infectantes [8], as quais são injetadas no hospedeiro vertebrado durante o repasto [1]. Na derme, promastigotas são rapidamente reconhecidas por receptores macrófágicos sendo captadas [2]. O vacúolo parasitóforo é formado ao redor do parasito captado, que se diferencia em amastigotas imóveis [3], proliferando dentro do fagolisossoma. A lise do macrófago infectado as torna livres, infectando novos macrófagos [4]. As células infectadas são ingeridas pelos mosquitos flebotômicos ([5] e [6]), diferenciando-se em promastigotas procíclicas [7]. As setas **vermelhas** indicam o ciclo no hospedeiro invertebrado, e as **azuis**, no hospedeiro vertebrado. Os símbolos **d** e **i** indicam fases diagnosticáveis e infectantes do ciclo, respectivamente.

**Adaptado de:** HAILU *et al.*, 2004; VANNIER-SANTOS *et al.*, 2002.

Outros protozoários tripanossomatídeos não possuem necessariamente as mesmas formas evolutivas que *Leishmania*: enquanto esta apresenta as formas amastigotas e promastigotas, parasitos do gênero *Trypanosoma* possuem formas amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas, assim como o gênero *Crithidia* apresenta formas coanomastigotas (**figura**

**2.10).** *Crithidia* constitui um parasito não-patogênico para humanos — este é patogênico apenas para outros animais e insetos, como abelhas [<http://www.icc.fiocruz.br>].



**Figura 2.10:** Demonstração de outras formas evolutivas de tripanossomatídeos: [A] coanomastigotas, que possuem este nome pela forma de sino, de *Crithidia* sp.; [B] epimastigotas, de *Trypanosoma* sp.; [C] tripomastigotas, que possuem uma membrana ondulante, de *Trypanosomas* sp..

**Fonte:** FIOCRUZ <<http://www.icc.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=37>>. Acesso em setembro/2009.

## 2.2. Quimioterapia Antiparasitária

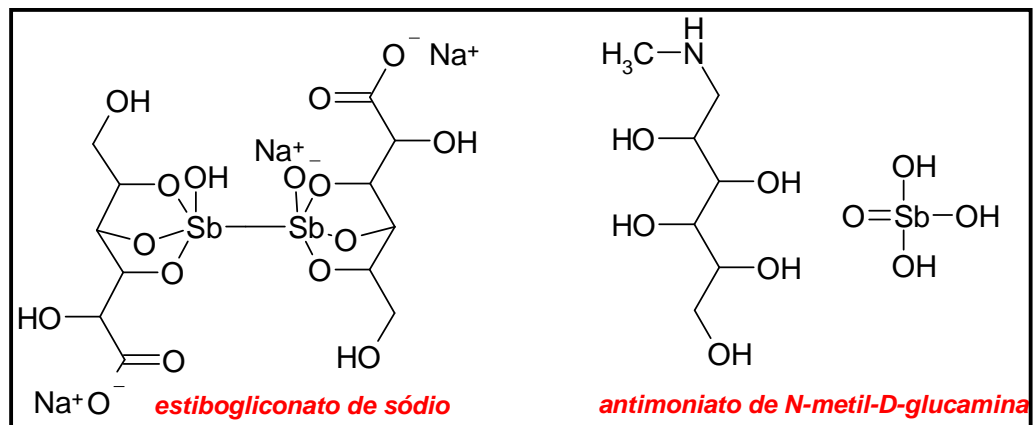
### 2.2.1. Fármacos atuais

No caso da leishmaniose ou quaisquer outras doenças transmitidas por insetos hematófagos, o controle do vetor se mostra extremamente difícil, fazendo com que a quimioterapia continue sendo a principal forma de controle destas doenças. Mas os fármacos disponíveis no mercado atualmente não são satisfatórios para este fim, pois a terapia é geralmente lenta, cara e tóxica, fazendo com que novos fármacos sejam requeridos urgentemente para estas doenças [BARRETT & GILBERT, 2002]. Desta forma, estudos têm sido desenvolvidos nesta área para encontrar agentes com alta eficácia terapêutica, baixa toxicidade e viabilidade de síntese.

A quimioterapia para tratamento da leishmaniose ainda é baseada no trabalho começado por Gaspar Vianna, que em 1912 iniciou o tratamento da doença com antimoniais, extremamente tóxicos aos pacientes [SILVA *et al.*, 2002]. Como exemplo do uso deste tipo de fármaco, encontra-se um dos mais utilizados no Brasil, o antimoniato de *N*-metil-*D*-glucamina, considerado o fármaco de primeira escolha (nome comercial antimoniato de meglumina – **figura 2.11**), que, como dito anteriormente, é extremamente tóxico, mas faz

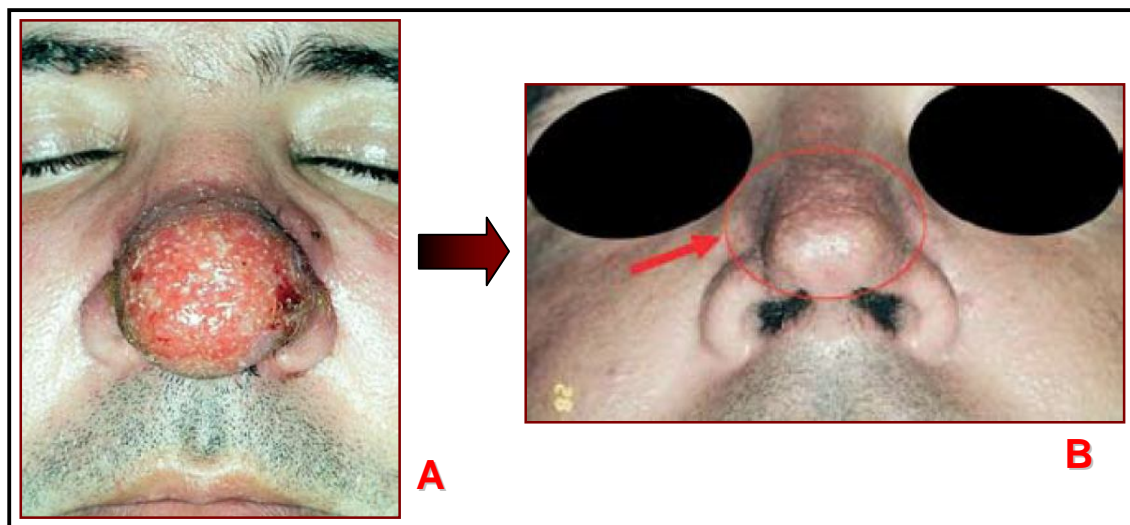


com que as formas tegumentares sejam aparentemente curadas após 2 a 3 meses de tratamento contínuo, de forma endovenosa (**figura 2.12**). Entretanto, poucos pacientes conseguem a cura clínica — o longo período de tratamento necessário constitui um grande problema, principalmente para as populações de menor renda, pois comparecer ao hospital e/ou posto de saúde por tanto tempo acaba sendo extremamente caro e difícil, o que faz com que o paciente abandone o tratamento. Como a terapia é endovenosa, dificilmente o paciente conseguirá realizá-lo em sua residência [MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007].



**Figura 2.11:** Estruturas dos compostos antimoniais estibogliconato de sódio e antimoniato de *N*-metil-*D*-meglomina.

**Fonte:** WILLIAMS & LEMKE, 2002; RATH *et al.*, 2003.



**Figura 2.12:** Lesão cutânea (e não mucocutânea) por leishmaniose, em aspecto framboesóide [A]. Mesmo paciente, 2 meses após o início do tratamento com antimoniato de *N*-metil-*D*-glucamina [B].

**Fonte:** MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007.

Dentre os fármacos antileishmaniais disponíveis atualmente deve ser citado também o estibogluconato de sódio (**figura 2.11**), que recentemente teve seu nome modificado para estibogliconato de sódio pela ANVISA, para adequações à língua portuguesa [[www.anvisa.gov.br/medicamentos/dcb](http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/dcb)]. Este contém antimônio, agindo portanto sobre a forma amastigota. Para ser eficaz, deve ser administrado por 20 dias ou mais também na forma endovenosa, para controle de leishmaniose tegumentar e visceral, ou na lesão para a forma tegumentar [RATH *et al.*, 2003]. Como dito anteriormente para o antimoniato de meglumina, tal período de tratamento também acaba sendo extremamente problemático para que a cura seja conseguida.

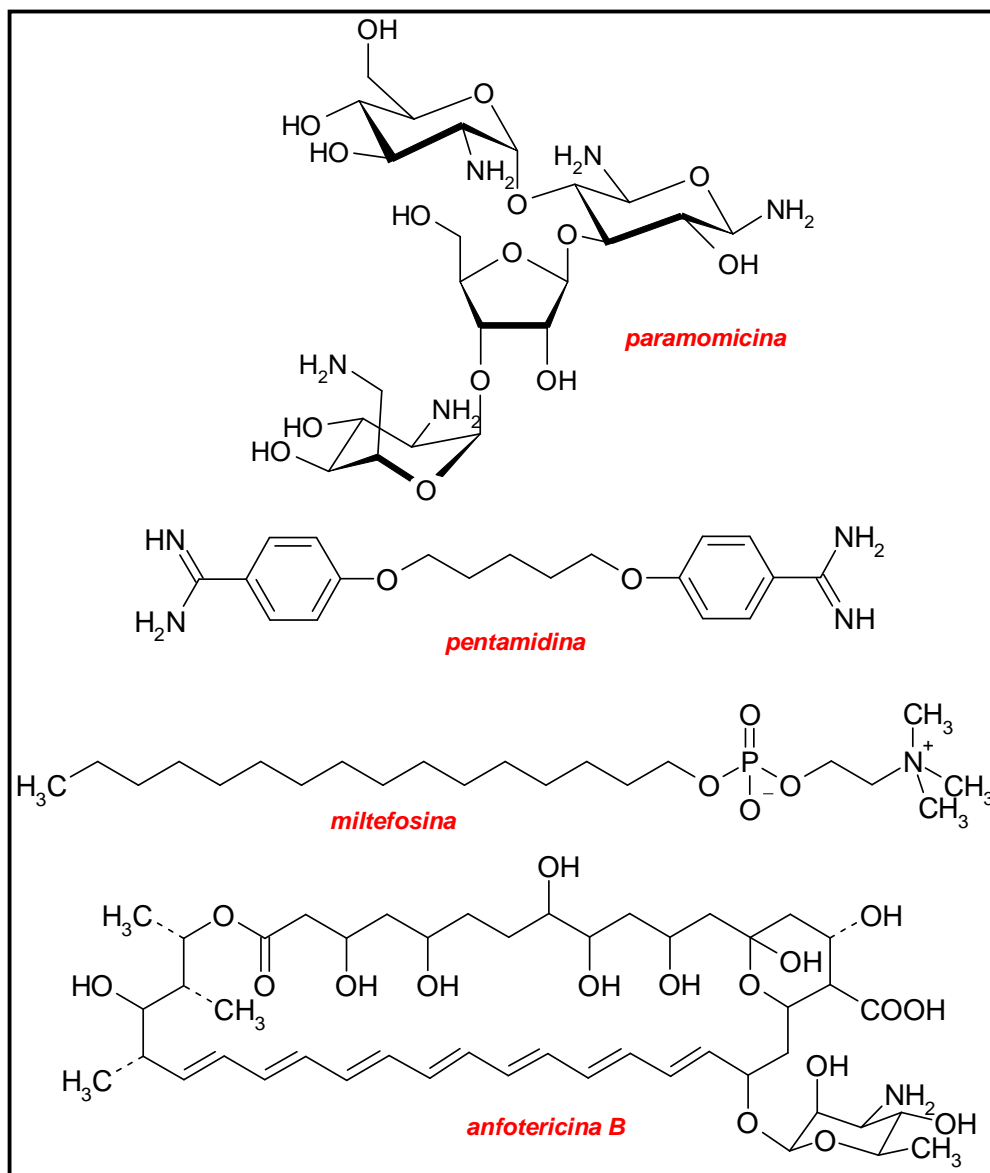
Os antimoniais foram desenvolvidos empiricamente há mais de 80 anos atrás. São considerados leishmanicidas, pois agem inibindo a glicólise e oxidação dos ácidos graxos das formas amastigotas, diminuindo a produção de ATP e GTP. Há um grande contraste observado entre as atividades *in vitro* e *in vivo* dos antimoniais, sugerindo que, para exercer sua atividade, é necessária a redução de  $Sb^{5+}$  para  $Sb^{3+}$ , embora outros mecanismos possam estar envolvidos em sua ação. No entanto, possuem um pequeno índice terapêutico graças à sua grande toxidez, existindo ainda condições adicionais que permitem a persistência de *Leishmania* em hospedeiros vertebrados [MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; CHIBALE, 2002].

Conforme demonstrado na **figura 2.6** e nos **anexos B e C**, a OMS apontou que a incidência de leishmaniose vem aumentando desde 1980, e que a doença havia ganhado posição relevante mundo afora, dentre casos de morte por doenças infecciosas. Este fato se deve ao menos parcialmente aos fatores abaixo [PONTE-SUCRE, 2003]:

- O risco da co-infecção de parasitos causadores de leishmaniose visceral com HIV tem aumentado em grandes taxas;
- Doses inadequadas dos fármacos empregados, principalmente dos antimoniais citados acima (como pela dificuldade do paciente em ir sempre ao hospital), podem aumentar a resistência;
- A falta de resposta de *Leishmania* a vários fármacos vem ocorrendo com relativa frequência.

Quando estas substâncias são ineficazes, ou não podem ser prescritas, o tratamento com os fármacos de segunda escolha — anfotericina B (ou sua forma lipossomal) e pentamidinas (amidinas, com formulações isotianato e mesilato) — é indicado (**figura 2.13**); caso estes também não se mostrem eficazes, são utilizados ainda esquemas alternativos, como a associação de um antimonial pentavalente e imunoterápicos, paramomicina (**figura 2.13**)

dentre outros [MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007]. Em geral, todas as formas de tratamento mostram características insatisfatórias, demonstrando a importância do desenvolvimento de uma terapia barata, eficaz e rápida, tanto para a forma tegumentar quanto para a visceral da doença.



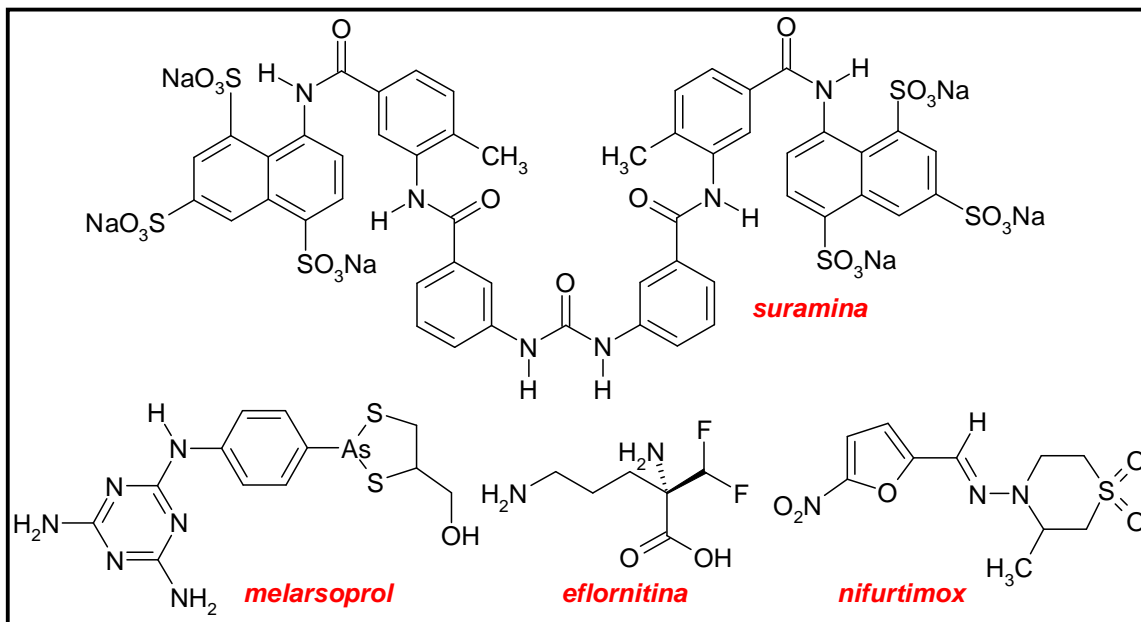
**Figura 2.13:** Estruturas da paramomicina, pentamidina (uma amidina), miltefosina e anfotericina B.

**Fonte:** WILLIAMS & LEMKE, 2002; <[http://www.chemistry.org/portal/a/c/s/1/acsdisplay.html?DOC=patentwatch%5Carchive%5C050905\\_patentwatch.html](http://www.chemistry.org/portal/a/c/s/1/acsdisplay.html?DOC=patentwatch%5Carchive%5C050905_patentwatch.html)>. Acesso em julho/2006.

Por esse motivo, a miltefosina, um alquilfosfolipídio inibidor da biossíntese do ergosterol (**figura 2.13**), foi aprovada como o primeiro fármaco oral para a leishmaniose visceral na Índia, elevando as chances de cura em 98%, usada de maneira satisfatória para casos de resistência aos antimoniais [JHA *et al.*, 1999]. O tratamento oral da leishmaniose é extremamente importante, pois desta forma o paciente não precisaria estar tantas vezes no hospital para sua administração de forma endovenosa, e os casos de resistência diminuiriam. Porém, infelizmente, este fármaco possui efeitos teratogênicos, não podendo ser administrado a gestantes, e *Leishmania* pode desenvolver resistência também à miltefosina, de forma intensa, conforme relatado [PÉREZ-VICTORIA *et al.*, 2001].

Segundo Barrett e Gilbert (2002), para a tripanossomíase africana, existem quatro fármacos registrados (licenciados pelos órgãos pertinentes nos países africanos). Destes, a pentamidina (**figura 2.13**) e a suramina (**figura 2.14**) são usadas prioritariamente para manifestações patológicas que envolvam o sistema nervoso, para doenças causadas por *T. b. gambiense* e *T. b. rhodesiense*, respectivamente. Contra o último estágio da doença (com envolvimento do sistema nervoso central), o principal fármaco utilizado é o derivado de arsênio melarsoprol (**figura 2.14**), embora o inibidor da síntese de poliaminas eflornitina (DFMO ou difluorometil ornitina) também seja útil contra *T. b. gambiense*; e o nifurtimox (**figura 2.14**), um nitrofurano registrado para o uso contra a Doença de Chagas, tem mostrado eficácia limitada para os últimos estágios da doença, assim como para a doença do sono refratária ao melarsoprol.

A terapia adotada atualmente contra as leishmanioses e tripanossomíases é inadequada, tóxica ou ambas. Enquanto a demanda de substâncias antiparasitárias nas áreas endêmicas é alta, a resistência a fármacos estabelecidos no mercado farmacêutico vem se tornando um grande problema. Os fármacos antes adotados como os de primeira linha para determinadas parasitoses tornaram-se ineficazes na maior parte das áreas mais gravemente acometidas. O entendimento do mecanismo de resistência e o desenvolvimento de agentes químicos que não possuam resistência cruzada em relação a fármacos existentes é de fundamental importância [CHIBALE, 2002].



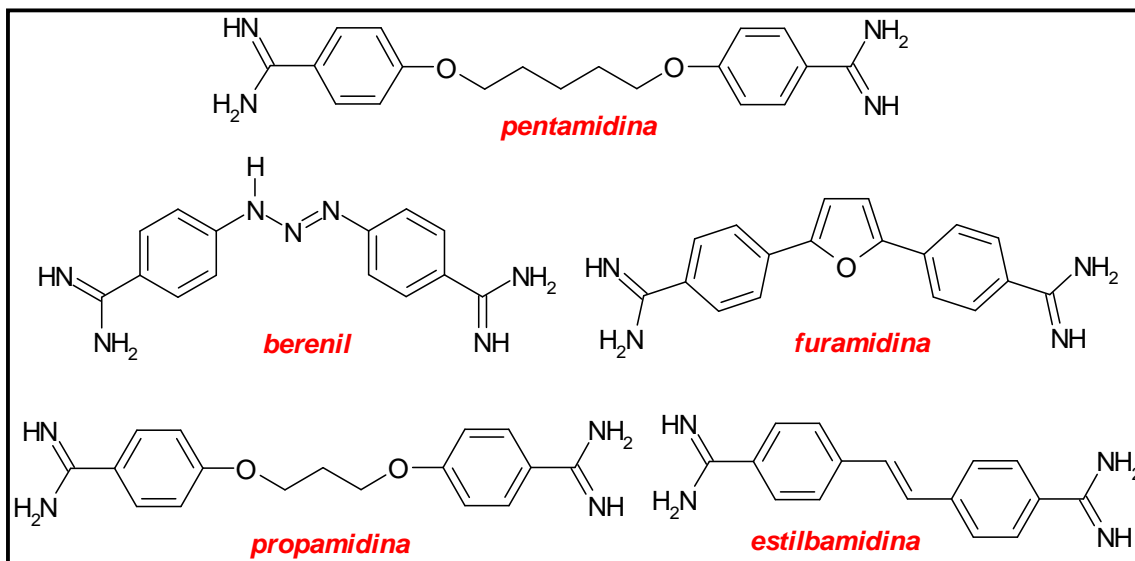
**Figura 2.14:** Estruturas da suramina (uma naftiluréia polissulfonada), do melarsoprol (um agente arsenial), da eflornitina (difluorometil ornitina ou DFMO) e do nifurtimox.

**Fonte:** WILLIAMS & LEMKE, 2002.

Para interferir no desenvolvimento normal de um parasito intracelular, o fármaco em questão precisa atingir o compartimento onde se desenvolve o parasito. A morte deste último poderá ser observada por mecanismos diretos ou indiretos, provocados pelo fármaco no hospedeiro. O ciclo de vida complexo de parasitos como *Leishmania* e a natureza intracelular de seus estágios de desenvolvimento faz com que a tarefa seja ainda mais difícil. Além disso, como algumas espécies possuem a capacidade de migrar para vários tecidos, estas podem ser associadas a todos os tipos de doenças causadas por *Leishmania* [PONTE-SUCRE, 2003].

### 2.2.2. Novas propostas: amidinas e mesoiônicos

Amidinas aromáticas, como o berenil, pentamidina, furamidina e compostos correlatos (**figura 2.15**) foram descobertas há alguns anos por possuírem excelente atividade contra doenças infecciosas, desde pneumonia causada por *Pneumocystis carinii* à tripanossomíase, sendo testadas, ainda, como agentes antitumorais. As propriedades antimicrobianas de moléculas dicatiônicas como estas têm sido estudadas desde 1930 [GENESTRA *et al.*, 2003].



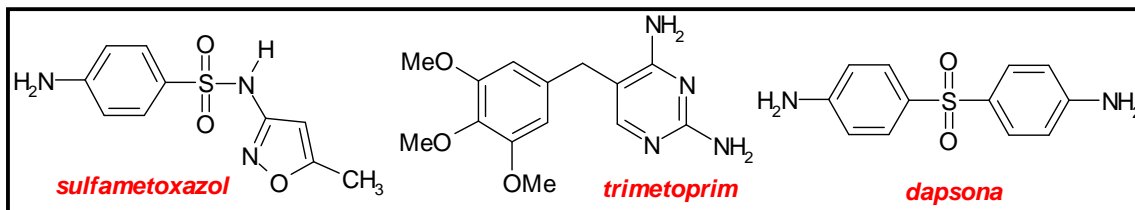
**Figura 2.15:** Estruturas das amidinas aromáticas utilizadas como agentes quimioterápicos. Para sua administração na forma de sal, os grupamentos amidínicos encontram-se protonados.

**Fonte:** LANSIAUX *et al.*, 2002.

Compostos desta classe possuem, tipicamente, as amidinas como grupamentos catiônicos ligados a anéis aromáticos de forma geralmente simétrica em sua molécula, sendo por isso denominadas amidinas aromáticas dicatiônicas. Encontram-se geralmente na forma de sal, possuindo atividade reportada contra um número extenso de patógenos, incluindo os fungos *Pneumocystis carinii*, *Candida albicans*, *Aspergillus* sp. e *Cryptococcus neoformans*; e os protozoários *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, *Leishmania* sp., *Plasmodium* sp., *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma* sp.. Apesar da ampla atividade exibida por tais amidinas aromáticas, apenas um composto desta classe de estruturas, a pentamidina, possui uso clínico significativo. O berenil, usualmente usado apenas para o tratamento de tripanossomíase animal, tem sido utilizado sem licença [NGUYEN *et al.*, 2004; LANSIAUX *et al.*, 2002; STEPHENS *et al.*, 2001; SOUTHAN *et al.*, 1995; TIDWELL *et al.*, 1993].

Até a sugestão, por meio de estudos, de que a combinação de trimetoprim e sulfametoxazol ou dapsona (**figura 2.16**) era tão eficaz quanto a pentamidina e consideravelmente mais barata, a administração na forma de aerossol da pentamidina havia se tornado, rapidamente, o método de escolha para a profilaxia primária para pneumonias causadas por *P. carinii* em pacientes HIV-positivos [TIDWELL *et al.*, 1993]. Atualmente, a pentamidina tem sido utilizada clinicamente contra a tripanossomíase africana, leishmanioses

com parasitos resistentes aos compostos antimoniais e na pneumonia causada por *P. carinii* [STEPHENS *et al.*, 2001].

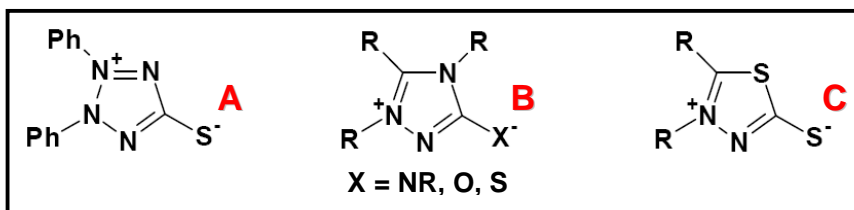


**Figura 2.16:** Fórmulas estruturais dos fármacos sulfametoxazol, trimetoprim e dapsona, utilizados em conjunto para o combate das pneumonias causadas por *P. carinii*.

**Fonte:** WILLIAMS & LEMKE, 2002.

As amidinas possuem amplo espectro de atividade contra uma série de organismos patológicos, desenvolvidas como parte de extensas pesquisas científicas. Estes resultados fazem com que amidinas aromáticas representem uma frente de pesquisa promissora para o desenvolvimento de fármacos contra organismos responsáveis por doenças infecciosas. No entanto, cuidado deve ser tomado englobando muitos trabalhos científicos, pois amidinas como a furamidina (**figura 2.15**), obtida em 2003 como um pró-fármaco ativo na forma oral [NGUYEN *et al.*, 2004], foi aprovada nas fases I e II de testes clínicos contra a tripanossomíase, mas falhou na fase III, por possuir toxicidade hepática e renal, tendo portanto seu uso abandonado (para os conceitos da fase I, II e III, *vide* item 2.6.2).

Sistemas mesoiônicos fornecem numerosos compostos com ampla atividade biológica, incluindo antibacteriana, antifúngica e antitumoral (como por exemplo contra carcinoma de Ehrlich e sarcoma 180). Estes são conhecidos desde 1882, quando sintetizados pela primeira vez por Emil Fischer e Emil Besthorn. Max Busch sintetizou compostos similares e descreveu suas propriedades químicas no período de 1895 a 1905 (**figura 2.17**). Desde então, vários sistemas similares têm sido trabalhados, por vários grupos de pesquisa por todo o mundo. O nome mesoiônico (mesomérico + iônico) só foi sugerido, no entanto, em 1946 por Simpson, ao propor que tais estruturas fossem representadas por vários híbridos de ressonância [REIS, 2008; SILVA *et al.*, 2002; OLLIS *et al.*, 1985].



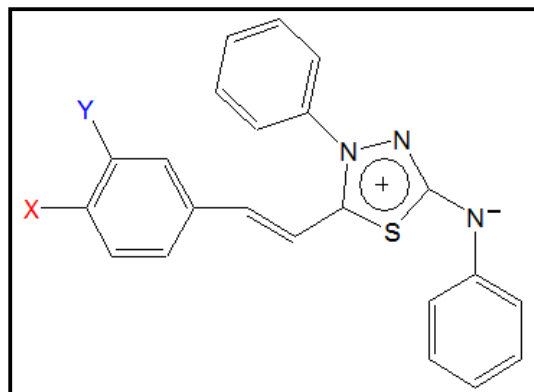
**Figura 2.17:** Primeiros sistemas mesoiônicos sintetizados, por E. Fisher e E. Besthorn [A] e por M. Busch [B,C].

**Adaptado de:** REIS, 2008.

Tais compostos possuem características interessantes, relacionadas à presença de regiões bem delineadas com cargas positivas e negativas em sua estrutura, apresentando grande interesse para utilização como agentes medicinais. Possuem um anel heterocíclico aromático de 5 membros positivamente carregado, podendo ser constituído por carbono, oxigênio, nitrogênio, enxofre e selênio. Tal anel possui ainda considerável energia de ressonância, balanceada por uma carga formal negativa, localizada em sua cadeia lateral em átomo ou grupamento exocíclico. A presença e caracterização destas cargas foi formalmente estudada por Echevarria e colaboradores (1992), através de difração de raios-X, confirmando tais colocações. Os átomos carregados devem ser substancialmente separados e estar no mesmo plano (ou quase), para que exista considerável energia de ressonância no sistema, sendo esta característica a possível responsável por seu potencial como substância biologicamente ativa [REIS, 2008; SOARES-BEZERRA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2002; ECHEVARRIA *et al.*, 1992].

Os compostos mesoiônicos sintetizados e estudados por Echevarria e colaboradores (**figura 2.18**) [REIS, 2008; SOARES-BEZERRA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2002] são da classe das 1,3,4-tiadiazólio-2-aminidas, também descritas como da classe das betaínas mesoméricas heterocíclicas conjugadas, por constituírem moléculas conjugadas representadas por estruturas dipolares (ou *zwitterions*), em que as cargas negativa e positiva se encontram em conjugação mútua, associadas ao sistema de elétrons  $\pi$ . Outras características tornam estas substâncias ainda mais interessantes, como a variação da densidade eletrônica em torno do anel e a possibilidade de diferentes padrões de distribuição eletrônica em função dos variados sistemas heterocíclicos possíveis. A associação das características descritas sugere fortes interações com as biomacromoléculas, como proteínas e/ou DNA.

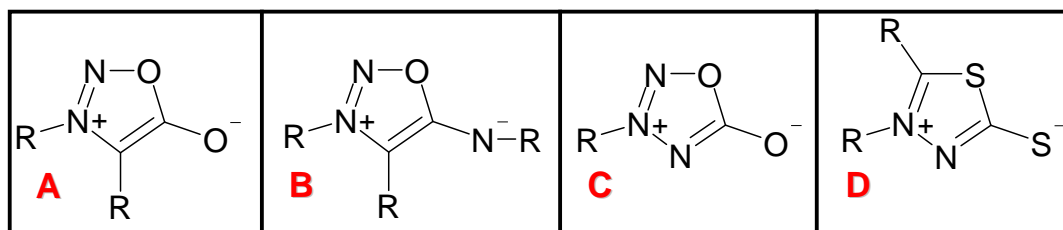




**Figura 2.18:** Estrutura básica dos compostos mesoiônicos sintetizados (X = H; CH<sub>3</sub>; OCH<sub>3</sub>; NO<sub>2</sub>; F; Cl; CN; Br; OH. Y = H; OCH<sub>3</sub>; NO<sub>2</sub>; Cl; Br).

**Adaptado de:** SOARES-BEZERRA *et al.*, 2008.

Em contraste com sidnonas (que possuem este nome por terem sido sintetizadas na cidade de Sidney – Austrália), sidnoniminas e oxitriazóis, os sais de derivados mesoiônicos sintetizados demonstrados na **figura 2.18** não são doadores de óxido nítrico (NO), não contribuindo para aumento do estresse oxidativo no organismo em questão. O grupamento exocíclico pode constituir um nitrogênio ou um enxofre, desde que não haja um nitrogênio ligado diretamente a um átomo de oxigênio, conforme demonstrado na **figura 2.19** [REIS, 2008; SOARES-BEZERRA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2002; ECHEVARRIA *et al.*, 1992].



**Figura 2.19:** Estruturas básicas das sidnonas [A], sidnoniminas [B] e oxitriazóis [C], todos compostos doadores de NO; os mesoiônicos tiadiazólicos [D] já não possuem esta característica.

**Adaptado de:** SOARES-BEZERRA *et al.*, 2008.

Como parte de um programa de pesquisa em quimioterapia contra doenças causadas por tripanossomatídeos, como *T. cruzi*, *L. amazonensis* e outros, diferentes amidinas [PROSKURYAKOV *et al.*, 2005; CASTRO-PINTO *et al.*, 2004; GENESTRA *et al.*, 2003; SOUTHAN *et al.*, 1995] e sais de derivados mesoiônicos [SOARES-BEZERRA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2002] vêm sendo testados contra estes parasitos. Até o momento, foi detectada

a atividade inibitória destes compostos contra três enzimas diferentes: a óxido nítrico sintase (NOS) [SOARES-BEZERRA *et al.*, 2008; PROSKURYAKOV *et al.*, 2005; GENESTRA *et al.*, 2003; SOUTHAN *et al.*, 1995], a tripanotiona redutase (TR) [CASTRO-PINTO *et al.*, 2004], e a arginase [SOARES-BEZERRA *et al.*, 2008], porém com baixa atividade quanto a esta última (inibição enzimática de 30%, determinada experimentalmente). Várias outras enzimas e sistemas biológicos têm sido testados, como sistemas bacterianos, fúngicos e neoplásicos. À seguir, serão descritos detalhes acerca das enzimas NOS e TR, assim como outros possíveis sítios de interação das substâncias estudadas.

### **2.3. Óxido Nítrico Sintase (NOS) e Óxido Nítrico (NO)**

#### **2.3.1. Função fisiológica da NOS e NO**

A NOS é uma flavoproteína NADPH-dependente, responsável pela produção de NO, não só para o organismo humano, mas para vários outros organismos. No organismo humano, o NO possui um importante papel, tanto em fisiologia, quanto como uma molécula sinalizadora no sistema nervoso e sistema cardiovascular, ou ainda em fisiopatologia, como uma citocina nas respostas imune e auto-imune. O NO está presente em uma série de eventos metabólicos, tais como relaxamento dos músculos lisos, inibição da agregação plaquetária, citotoxicidade macrófaga, desordens inflamatórias, metabolismo do ferro, neurotransmissão e neurotoxicidade [JIA *et al.*, 2003; KOTSONIS *et al.*, 2001; PANTKE *et al.*, 2001; BOUCHER *et al.*, 1999; GERBER *et al.*, 1997; CILLARI *et al.*, 1994; KWON *et al.*, 1989].

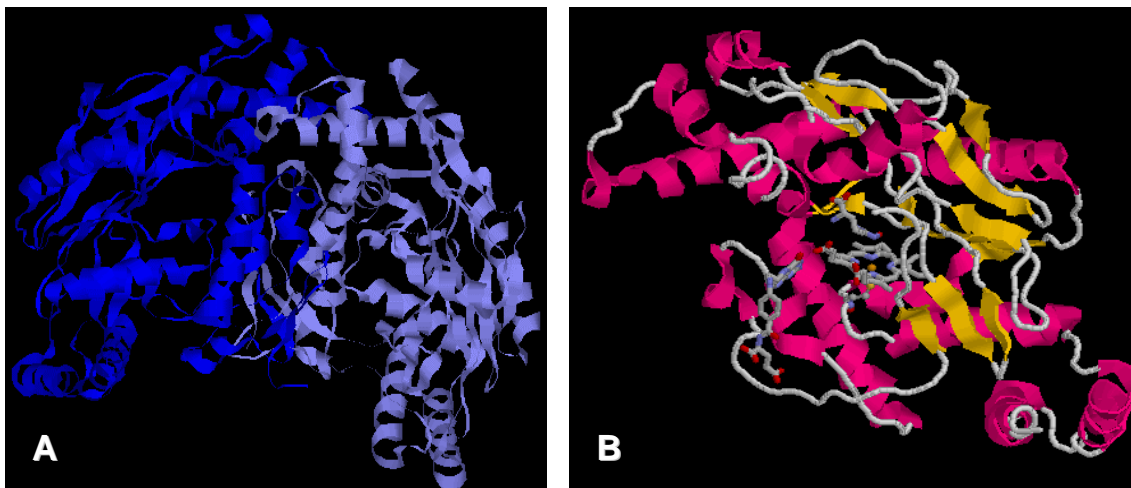
O NO é gerado por 3 isoformas geneticamente diferentes da enzima: a neuronal (nNOS ou NOS-I), a induzível (iNOS ou NOS-II) e a endotelial (eNOS ou NOS-III). As duas isoformas expressas constitutivamente no organismo estão localizadas: no endotélio vascular (eNOS), envolvida na regulação do tônus vascular e no processo de antitrombose; ou nos tecidos neuronais (nNOS), envolvida em processos de neuromodulação. A isoforma denominada induzível (iNOS) é expressa por macrófagos e várias outras células, sob exposição a citocinas. Esta última isoforma possui um papel-chave na resposta imune, por funcionar como um sinalizador, com papel similar às próprias citocinas. Macrófagos estimulados por interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) ou pelo fator de necrose tumoral (TNF) expressam altos níveis de iNOS, produzindo altas taxas de NO. Na leishmaniose murina, o NO possui um papel imprescindível na resistência imune do hospedeiro ao tripanossomatídeo. Todas as três

isoformas catalisam a mesma reação, porém as isoformas expressas constitutivamente (eNOS e nNOS) são estimuladas por níveis plasmáticos elevados de  $\text{Ca}^{2+}$  livre e calmodulina (CaM) [BOUCHER *et al.*, 1999; FRÖHLICH *et al.*, 1999; CILLARI *et al.*, 1994].

Em contraste, a ligação da iNOS à CaM é essencialmente irreversível, e sua atividade é regulada não por mudanças na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ , mas por mudanças na taxa de síntese da própria enzima, a chamada regulação gênica transcricional. As formas constitutivas (reguladas pela concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ ), adicionalmente aos grupamentos heme, CaM e domínios redutores comuns a todas as 3 isoformas da enzima, diferem pela presença na nNOS de um domínio N-terminal adicional, que provavelmente está envolvido em sinalização subcelular, enquanto a eNOS é única por possuir sítios de interação com os ácidos palmítico e mirístico, para que esta possa se integrar à membrana, sendo assim uma enzima encontrada na membrana endotelial. As outras duas isoformas constituem enzimas citossólicas [JACKSON *et al.*, 2005; NISHIDA & MONTELLANO, 1998; RAMAN *et al.*, 1998; GERBER *et al.*, 1997].

### **2.3.2. Estrutura e organização catalítica da enzima**

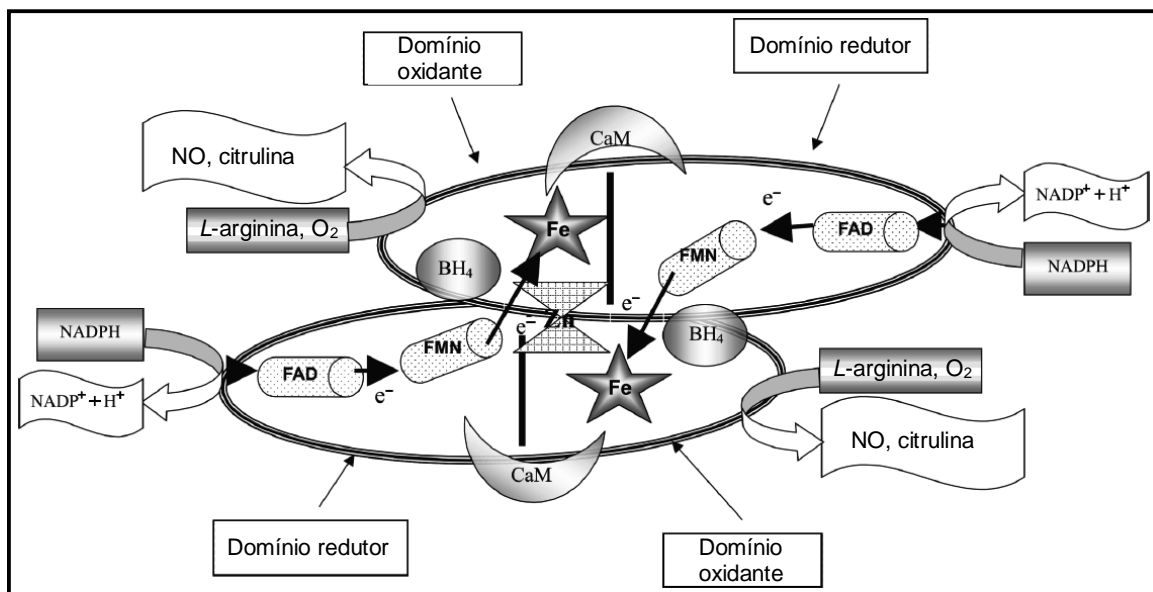
As isoformas da NOS são ativas cataliticamente como homodímeros (**figura 2.20**), e apenas a estrutura homodimérica é capaz de converter a arginina, seu substrato natural, em NO e L-citrulina (*vide* item 2.3.3). Cada uma das subunidades possui um sítio para sua ação como redutase (domínio redutor), e outro para sua ação como mono-oxidase (domínio hemeprotéico ou oxidante). Ao domínio redutor se liga uma molécula de NADPH, que doa elétrons através dos grupos prostéticos FAD e FMN a um núcleo heme (ferro-protoporfirina IX), ativo cataliticamente através do domínio hemeprotéico. Em adição às moléculas de NADPH, FAD e FMN, o fluxo de elétrons dentre as duas subunidades inclui a redução intermediária de uma molécula de triidro-biopterina a tetraidro-biopterina ( $\text{BH}_4$ ) [JIA *et al.*, 2003; PANTKE *et al.*, 2001].



**Figura 2.20:** Organização tridimensional da NOS, demonstrando em [A] sua estrutura dimérica, onde cada uma das unidades monoméricas se encontra em um tom diferente de azul (código PDB 1DMJ), e em [B] a disposição dos ligantes na estrutura, em apenas uma das unidades monoméricas (código PDB 1M7Z).

**Fonte 1DMJ:** KOTSONIS *et al.*, 2001; **1M7Z :** PANT *et al.*, 2002. Imagens manipuladas no programa RasMol 2.7.2.1.1.

No domínio hemoprotéico um resíduo de cisteína promove uma sexta ligação ao átomo de ferro, fazendo com que a estrutura protéica possua grande similaridade sequencial ao sítio redutor do citocromo P-450 (CYP-450) e oxidoredutases associadas (**figura 2.21**) [KWON *et al.*, 1989]. O sítio ao qual se liga a BH<sub>4</sub>, a *L*-arginina e um átomo de Zn<sup>2+</sup> possui ligação com o domínio hemoprotéico e, de acordo com Proskuryakov *et al.* (2005), esta primeira pode ser única na estrutura da proteína, que por ser um dímero, possui 2 sítios pterínicos — se apenas uma molécula de BH<sub>4</sub> estiver ligada à enzima, em apenas uma das unidades monoméricas, a atividade catalítica da enzima não cessa. Conforme demonstrado, a quantidade e natureza dos inúmeros ligantes da estrutura enzimática pode constituir um grande problema para o planejamento de fármacos. Deve ser enfatizado que a BH<sub>4</sub>, a *L*-arginina e o núcleo heme estão envolvidos cooperativamente na constituição do sítio principal da enzima, sendo todos essenciais para sua atividade catalítica. No entanto, a substituição de um destes componentes por um inibidor previne diretamente não só a síntese de NO, mas, em muitos casos, a formação da estrutura terciária ativa da enzima [PROSKURYAKOV *et al.*, 2005].



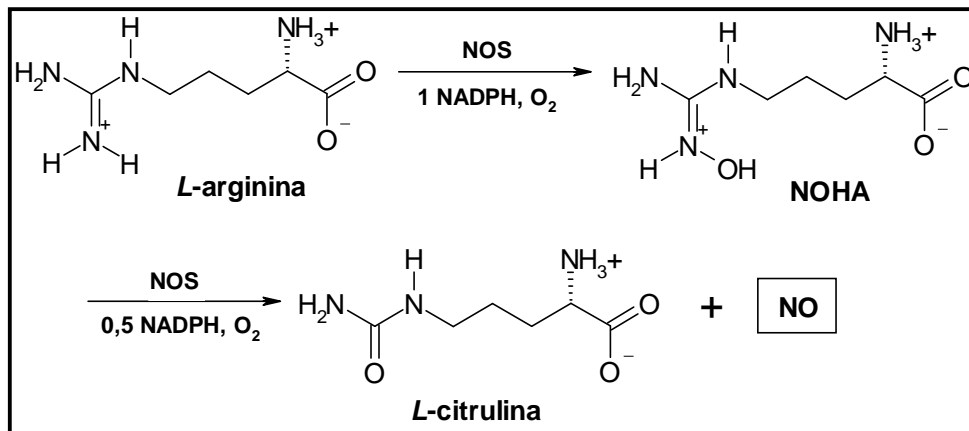
**Figura 2.21:** Esquema da estrutura da NOS. É demonstrada sua estrutura em domínios, cofatores, e grupos prostéticos. O elétron é levado do domínio redutor para o domínio oxidante da outra unidade monomérica pela influência da calmodulina (CaM). Pela presença desta última, é formado um tetrâmero temporário. A mudança na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  não afeta a atividade da enzima. A presença da cisteína no domínio oxidante está envolvida na conformação das unidades monoméricas.

**Fonte:** PROSKURYAKOV *et al.*, 2005.

### 2.3.3. Mecanismo de catálise

As atividades catalíticas das isoformas da enzima diferem entre si, em relação à formação de NO. É encontrado que a produção de NO da iNOS e nNOS é consideravelmente mais alta que a da eNOS. A menor atividade catalítica desta última se deve principalmente a uma menor habilidade do domínio redutor (onde se liga a coenzima flavínica, FAD) em transferir elétrons ao domínio hemo-prostético [NISHIDA & MONTELLANO, 1999].

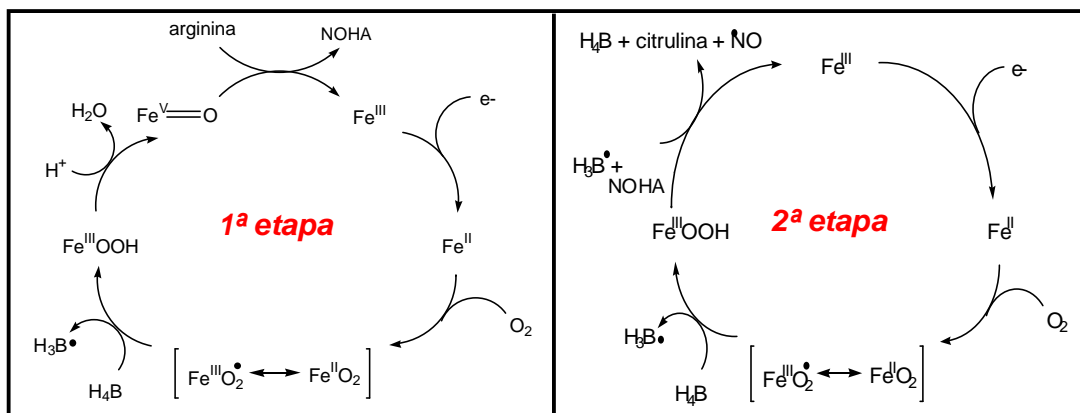
A catálise depende da presença de 3 substratos em específico: *L*-arginina e oxigênio como substratos principais, e a presença de NADPH, como fonte de elétrons, em uma reação de duas etapas. Na primeira etapa, há formação de um intermediário, a *N*-hidroxiarginina (NOHA), através da incorporação de um átomo de oxigênio à função guanidina da *L*-arginina. Na segunda etapa, a NOHA é novamente oxidada, formando *L*-citrulina e NO (**figura 2.22**) [JACKSON *et al.*, 2005; JIA *et al.*; 2003].



**Figura 2.22:** Formação do NO, através da conversão do intermediário *N*-hidroxiarginina (NOHA) em *L*-citrulina.

Adaptado de: JIA *et al.*, 2003.

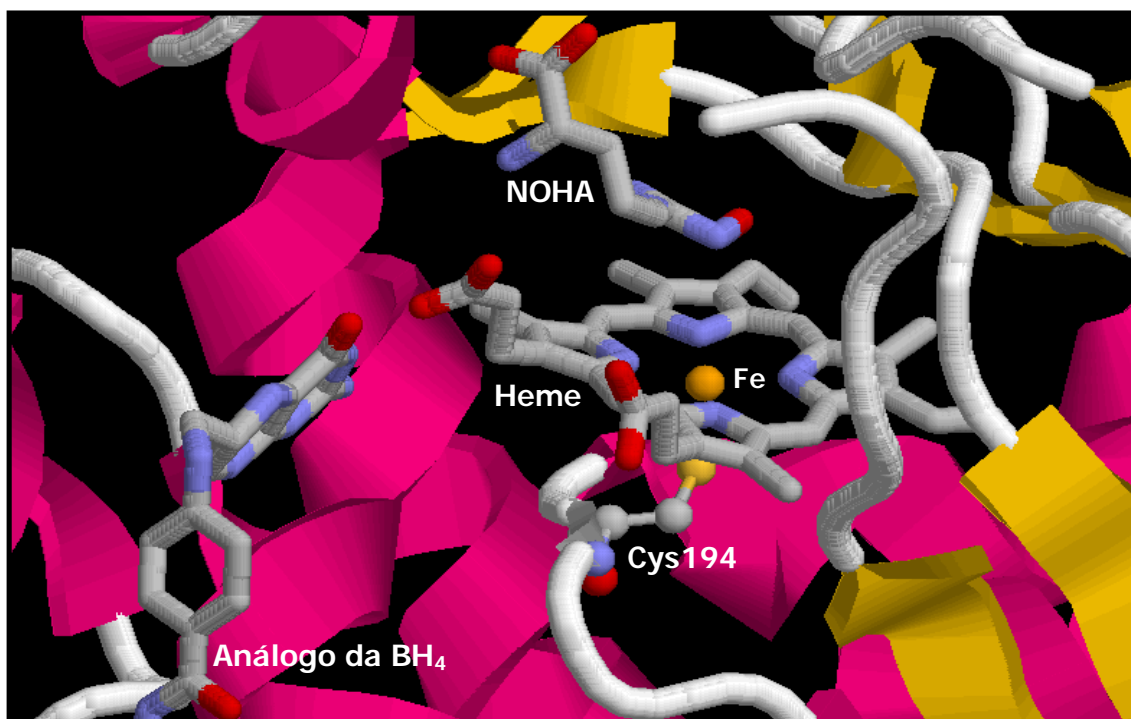
No processo, o FAD transfere equivalentes redutores do NADPH para o FMN, que então reduz o átomo de ferro protoporfirínico. Esta redução leva à ativação do O<sub>2</sub>, seguida pela oxidação do nitrogênio guanidínico da *L*-arginina a NO e *L*-citrulina. Pode-se levar à formação de NO<sup>-</sup> (nitroxil) e outros *N*-óxidos relacionados, através do mecanismo de formação do NO. O processo completo, com a participação da BH<sub>4</sub> e os cofatores, está representado na **figura 2.23** [PANTKE *et al.*, 2001; RAMAN *et al.*, 1998].



**Figura 2.23:** Representação esquemática das duas etapas de formação da *L*-citrulina e NO, a partir da *L*-arginina. Notar o fluxo de elétrons, através dos compostos oxidados e reduzidos.

Adaptado de: JIA *et al.*; 2003; PANTKE *et al.*, 2001; RAMAN *et al.*, 1998.

As propriedades do grupamento heme na NOS já foram caracterizadas por espectroscopias de absorção Raman e ressonância paramagnética eletrônica [WANG *et al.*, 1994a]. Essas técnicas demonstraram que o átomo de ferro do grupamento heme está coordenado à proteína por um grupo tiólico, de forma extremamente similar à orientação do grupamento heme das oxidases pertencentes ao CYP-450. Assim como nestas enzimas, o domínio hemeprotéico está orientado de maneira a formar o sítio onde a oxidação da *L*-arginina ocorre (**figura 2.24**). O domínio redutor desemparelha os elétrons fornecidos pelo NADPH e os entrega, um por vez, ao átomo de ferro do grupo prostético heme, conforme demonstrado na **figura 2.23**. A BH<sub>4</sub> é requerida para a síntese de NO por todas as 3 isoformas da enzima [NISHIDA & MONTELLANO, 1998].



**Figura 2.24:** Demonstração do sítio ativo de uma NOS de *Bacillus subtilis* (código PDB 1M7Z). Notar a proximidade de um análogo da BH<sub>4</sub>, o THF [tetraidrofolato, ou 5,6,7,8-tetraidropterol-*L*-glutamato] com o carboxilato proveniente do grupo heme. A Cys194 forma um complexo hexacoordenado com o átomo de ferro (em laranja), possibilitando a oxidação da arginina a NOHA.

**Fonte 1M7Z:** PANT *et al.*, 2002. Imagem manipulada no programa RasMol 2.7.2.1.1.

O grupamento heme participa das duas etapas descritas, ligando-se à molécula de O<sub>2</sub> e ativando-a. Por este motivo, a síntese de NO é inibida (em suas duas etapas) pelo monóxido de carbono (CO), e muitos dados espectrais sugerem que o CO se coordena diretamente ao

átomo de ferro. A procura por inibidores mais ativos e seletivos para uma isoforma particular da NOS ainda constitui um problema. Estes inibidores seletivos seriam promissores para o tratamento de doenças inflamatórias, diabetes, isquemia cardíaca, hipotensão associada ao choque etc [JIA *et al.*, 2003].

#### **2.3.4. Função e estrutura da NOS no parasito tripanossomatídeo**

Muito se especulou a respeito da função de tal enzima nos tripanossomatídeos, visto que esta é pertencente a importantes eventos metabólicos no organismo humano e nos mamíferos em geral.

Os protozoários são eucariotos. Isto faz com que sejam mais semelhantes aos mamíferos que às bactérias, por exemplo, por serem estas últimas procariontas, possuindo funções metabólicas únicas. Mesmo sabendo que possuem organização celular semelhante aos mamíferos, inúmeras dúvidas permaneceram a respeito da existência ou não desta enzima em seres unicelulares. Caso esta estivesse presente, provavelmente não estaria envolvida na mesma rota metabólica que para um organismo multicelular. O NO participa de importantes eventos de sinalização celular no sistema imune do organismo humano.

De um ponto de vista evolucionar, evidências indicam que a via metabólica de transdução de sinais à qual pertence a enzima NOS é operante apenas em organismos eucariotos superiores. A primeira demonstração de que esta via metabólica também está presente em eucariotos como *T. cruzi* foi dada por Paveto *et al.* (1995). Foi demonstrada a existência de uma NOS estimulada pela presença de  $Ca^{2+}$ , uma guanilil ciclase ativada por nitroprussiato, assim como por receptores de ácido *N*-metil-*D*-aspártico (NMDA) em formas epimastigotas. Revelou-se ainda que o aumento de *L*-arginina e NMDA incrementam a produção de NO e níveis de GMP cíclico (GMPc). O estudo então demonstrou que o organismo em questão possui uma NOS extremamente similar em atividade à NOS dos mamíferos, possuindo inclusive dependência da presença de  $Ca^{2+}$  e CaM para sua atividade catalítica. Os substratos requeridos são os mesmos, assim como os produtos da catálise. Aminoácidos excitatórios, conhecidos por alterar a atividade na nNOS nos tecidos neuronais, curiosamente também alteram a atividade da NOS em tripanossomatídeos *in vivo*. Este fato sugere que os tripanossomatídeos também possuem NMDA, descritos em humanos como pertencentes ao tecido neuronal [PAVETO *et al.*, 1995].



A NOS está presente em organismos procariotos, como demonstrado em 1994 por Chen e Rosazza. A enzima foi extraída e purificada de bactérias do gênero *Nocardia*, tendo sido comprovado que, para estes organismos, ela também depende da presença de NADPH,  $\text{Ca}^{2+}$ , FAD, FMN e  $\text{BH}_4$  [CHEN & ROSAZZA, 1994]. Após os estudos mencionados anteriormente, Basu e colaboradores (1997) isolaram e purificaram a enzima NOS proveniente de *L. donovani* em um estudo semelhante ao descrito para *T. cruzi*, comprovando sua existência no gênero em questão [BASU *et al.*, 1997]. A caracterização da presença da NOS na espécie *L. amazonensis* foi feita por grupos de pesquisa da FIOCRUZ [GENESTRA, 2002; GENESTRA *et al.*, 2003], demonstrando detalhadamente sua presença e produção de NO nas formas amastigotas axênicas [GENESTRA *et al.*, 2006a] e promastigotas metacíclicas [GENESTRA *et al.*, 2006b].

Possuir a enzima, entretanto, não implica que esta esteja envolvida nos mesmos processos metabólicos que para os mamíferos. Foi demonstrado em um estudo que a mobilidade flagelar em culturas líquidas de formas epimastigotas de *T. cruzi* é controlada pela via metabólica à qual pertence a NOS. A mobilidade flagelar da espécie é aumentada pela presença de *L*-arginina, NMDA, glutamato, nitroprussiato de sódio e GMPc. O uso da substância MK-801, bem conhecida por sua atividade bloqueadora dos canais glutamatérgicos, inibiu estes efeitos ao parasito. Existem evidências de que a presença de tal sistema enzimático nestes organismos indica um precedente evolucionário em comum com organismos superiores, pelo fato de neurotransmissores como NMDA possuírem efeito nestes parasitos [FLAWIÁ *et al.*, 1997].

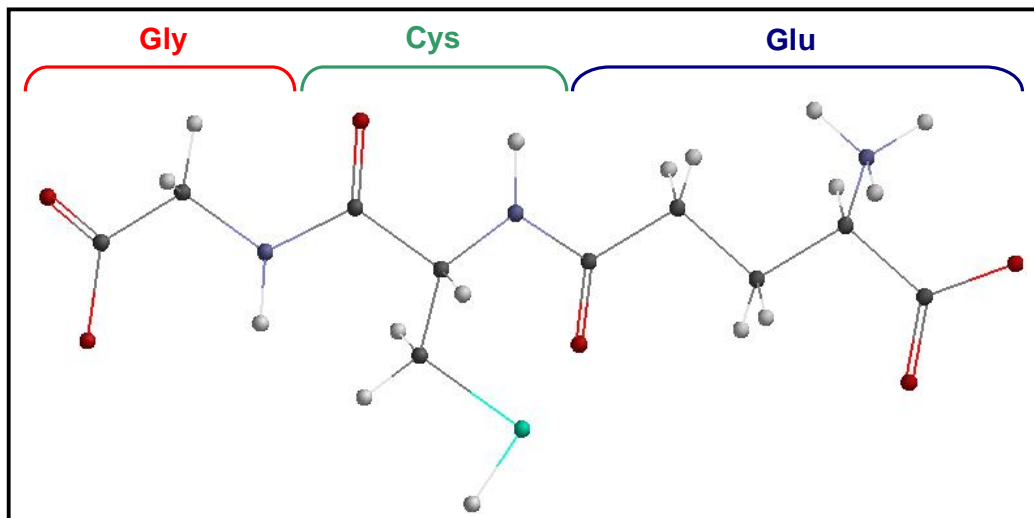
Por estar ligada à mobilidade e locomoção destes parasitos, a inibição da enzima NOS torna-se para estes maléfica, conforme comprovado, prejudicando seu ciclo normal de vida.

## **2.4. Tripanotiona Redutase (TR) e Tripanotiona (TSH)**

### **2.4.1. Função fisiológica e mecanismo catalítico da TR**

Os seres vivos necessitam de duas classes de substâncias químicas de massa molecular relativamente baixa em uma gama extensiva de funções biológicas: as poliaminas e as estruturas contendo grupos tiólicos. Entre outras funções, as poliaminas estão envolvidas na síntese de proteínas, crescimento e desenvolvimento celular, considerando que o peptídeo glutationa, formado por três aminoácidos (glicina, cisteína e glutamato — **figura 2.25**) está

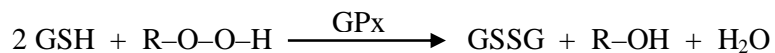
envolvido na manutenção do balanço redox e na regulação de diversos aspectos do metabolismo celular [BOND *et al.*, 1999].



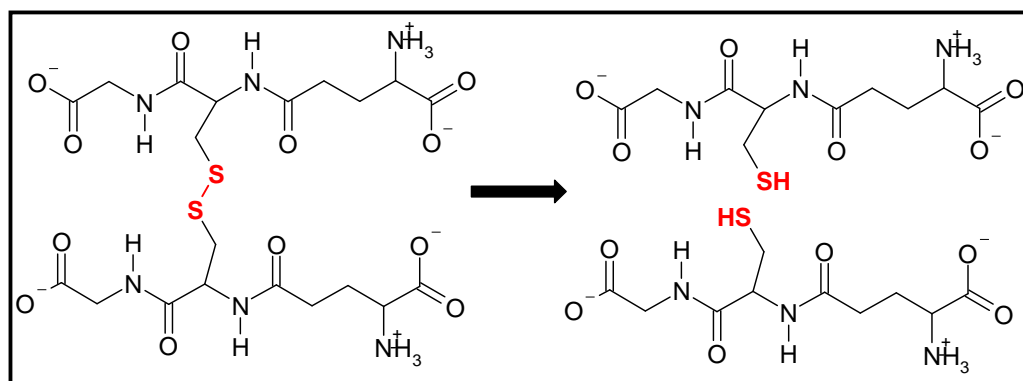
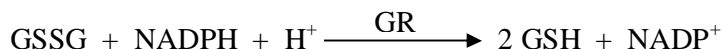
**Figura 2.25:** Composição da glutationa – GSH [glicina (Gly), cisteína (Cys) e glutamato (Glu)]. Imagem gerada no programa PC Spartan Pro [Wavefunction Inc.].

A forma tiólica da glutationa, a GSH ( $\gamma$ -L-glutamyl-L-cisteinilglicina, **figura 2.25**), funciona como um agente protetor, mantendo um meio intracelular redutor, através da manutenção dos níveis dos grupos tiólicos (–SH) das proteínas, redução das pontes dissulfeto (–S–S–) induzidas pelo estresse oxidativo, neutralização de radicais livres, desintoxicação de eletrólitos e hidroperóxidos (e outros processos pertencentes ao metabolismo redox) e síntese de precursores do DNA. Sua função nas hemácias é eliminar a  $H_2O_2$  e os hidroperóxidos orgânicos (metabólitos reativos de oxigênio) reduzindo-os, pois estes podem danificar irreversivelmente a hemoglobina e clivar ligações C–C dos fosfolípidios. O acúmulo descontrolado de peróxidos resulta no rompimento prematuro da célula [FYFE *et al.*, 2008; VOET *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 1996; HENDERSON *et al.*, 1991].

Os peróxidos são eliminados por meio da reação com a GSH, catalisada pela enzima glutationa peroxidase (GPx), gerando a glutationa em sua forma oxidada, ou seu derivado dissulfeto (GSSG) [VOET *et al.*, 2008]:



A GSSG é transformada em sua forma reduzida (2 GSH) pela enzima glutatona redutase (GR), como demonstrado na **figura 2.26**. A reação oposta mediada pela GPx na presença de peróxidos leva à formação de radicais oxidantes danosos às células [STOLL *et al.*, 1997; KURIYAN *et al.*, 1991]. A enzima GR garante que altos níveis de derivados tiólicos sejam mantidos no meio intracelular, catalisando a reação de redução do dissulfeto formado [VOET *et al.*, 2008]:



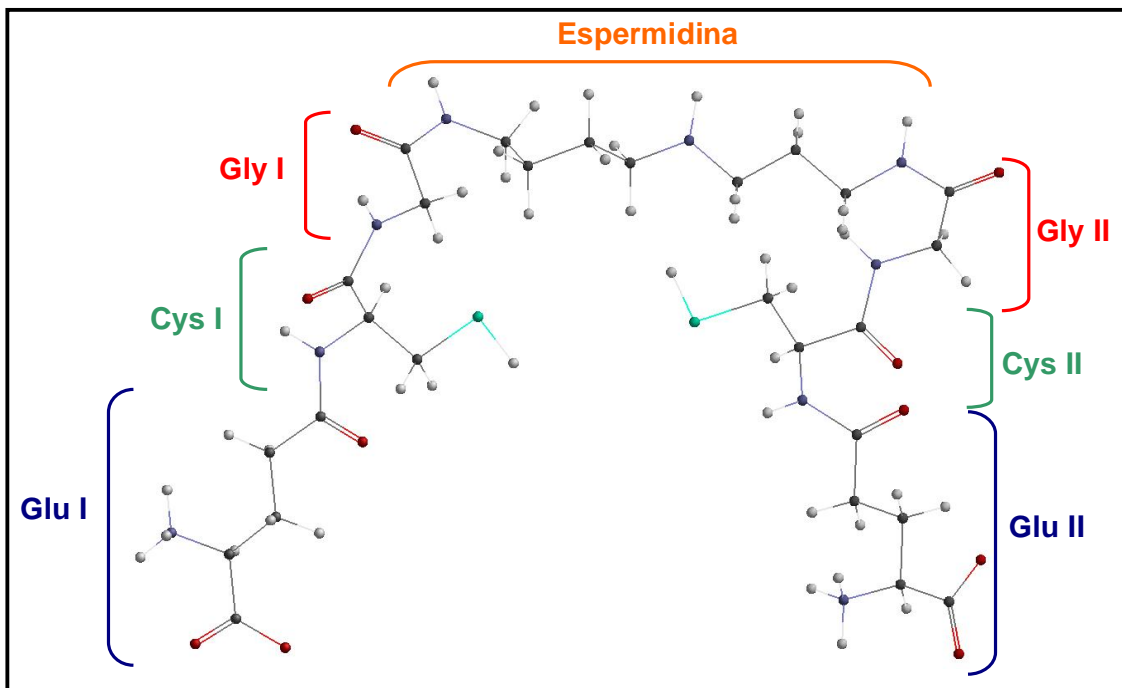
**Figura 2.26:** Reação catalisada pela GR: conversão da glutatona na forma oxidada (GSSG) para a forma reduzida (2 GSH).

**Adaptado de:** BOND *et al.*, 1999.

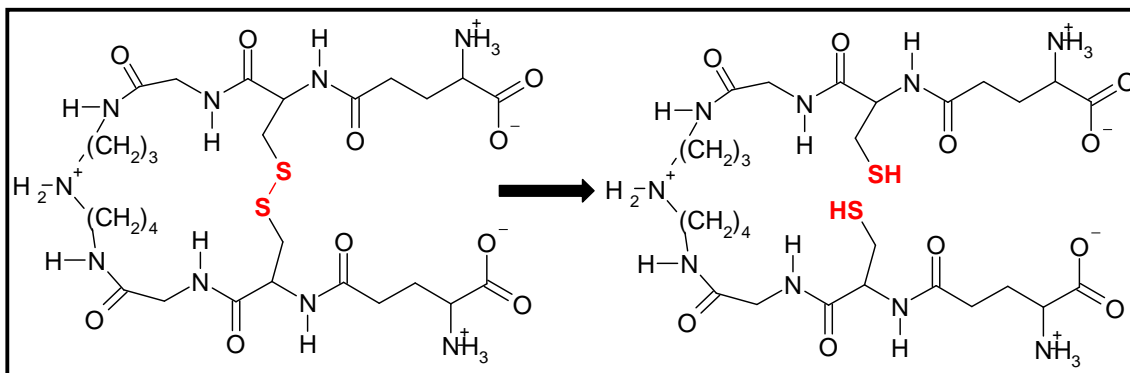
Os protozoários *Kinetoplastida* compartilham deste mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo, porém não possuem a GR, usando adutos de poliamina-glutationa ao invés da GSH, em uma função protetora e regulatória similar a esta. Dentre estes adutos, três podem ser citados: a tripanotona [ $N^1, N^8$ -bis(glutationil)-espermidina (TSH)], um conjugado covalente de 2 moléculas de GSH e 1 espermidina (**figura 2.27**) [KRIEGER *et al.*, 2000; STOLL *et al.*, 1997]; a glutatióniespermidina [KURIYAN *et al.*, 1991]; e a homotripanotona [BOND *et al.*, 1999].

Similaridades em relação à GSH sugerem que estes metabólitos devem possuir uma função biológica similar na eliminação de radicais livres e espécies oxigenadas reativas formadas em processos metabólicos, ou ainda quando os parasitos são submetidos ao estresse oxidativo provocado pela resposta imunológica do hospedeiro. Este mecanismo é baseado na ação da enzima tripanotona redutase (TR), envolvendo uma reação extremamente similar

àquela catalisada pela GR (**figura 2.28**). A TR, junto à triparredoxina e triparredoxina peroxidase, forma a via metabólica da triparredoxina peroxidase, para defesa destes organismos contra o estresse oxidativo [FYFE *et al.*, 2008; ZANI & FAIRLAMB, 2003].



**Figura 2.27:** Composição da tripanotione – TSH [2 GSHs (I e II) interligadas por uma espermidina]. Imagem gerada no programa PC Spartan Pro [Wavefunction Inc.].

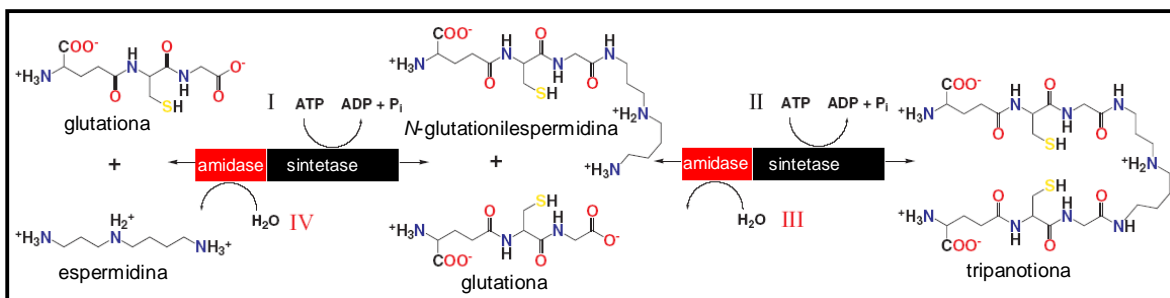


**Figura 2.28:** Reação catalisada pela TR: conversão da tripanotione na forma oxidada (TSST) para a forma reduzida (TSH).

Adaptado de: BOND *et al.*, 1999.

O papel da TR em muitas vias metabólicas, incluindo estas claramente dependentes do sistema redox da GR em eucariotos superiores, não foi demonstrado até o ano de 2000. Até aquele momento, a possibilidade de outros tióis como a glutarredoxina, tiorredoxina ou até mesmo a GSH (que é um intermediário na síntese da TSH) substituírem a TSH frente à sua deficiência não deveria ser excluída, apesar de que a GR ou a tiorredoxina redutase nunca foram detectadas nesses organismos. Para tanto, Krieger e colaboradores (2000) geraram células do *T. brucei* contendo apenas 1 gene responsável pela expressão da TR, sob o controle de um promotor induzível por uma tetraciclina. Variando a concentração desta tetraciclina, variava-se também a expressão da enzima. Foi então verificado que células contendo menos de 10% da atividade enzimática da TR foram impossibilitadas de crescer, ainda que os níveis de TSH e tióis totais permanecessem constantes. Em meios sem agentes redutores, a hipersensibilidade frente ao peróxido de hidrogênio foi observada, comprovando a importância da enzima no estresse oxidativo. Quando as células foram injetadas em camundongos na ausência da tetraciclina, nenhuma infecção foi detectada, e quando a tetraciclina foi retirada de animais previamente infectados, a parasitemia foi suspensa. Tais fatos demonstram que tripanossomatídeos sem a TR são avirulentos [KRIEGER *et al.*, 2000].

A sensibilidade da TR ao estresse oxidativo, que a faz extremamente essencial para a sobrevivência, patogenicidade e manutenção-redox destes parasitos, é devida em parte à falta das enzimas catalase e GPx nos tripanossomatídeos em geral. Por tal motivo a TR, assim como as demais enzimas envolvidas na via metabólica da triparredoxina peroxidase e síntese/degradação da TSH, é reconhecida como um alvo importante e extremamente promissor para o desenvolvimento de novos fármacos contra as doenças mencionadas anteriormente [FYFE *et al.*, 2008; ZANI & FAIRLAMB, 2003; KRIEGER *et al.*, 2000; STOLL *et al.*, 1997]. A síntese e degradação mencionada da TSH é feita pela enzima tripanotiona sintetase-amidase (TSA), que age como uma tripanotiona sintetase, uma tripanotiona amidase, uma glutationilpermidina sintetase e uma glutationilpermidina amidase. O mecanismo pelo qual a TSA sintetiza a TSH está demonstrado na **figura 2.29** a seguir [FYFE *et al.*, 2008].

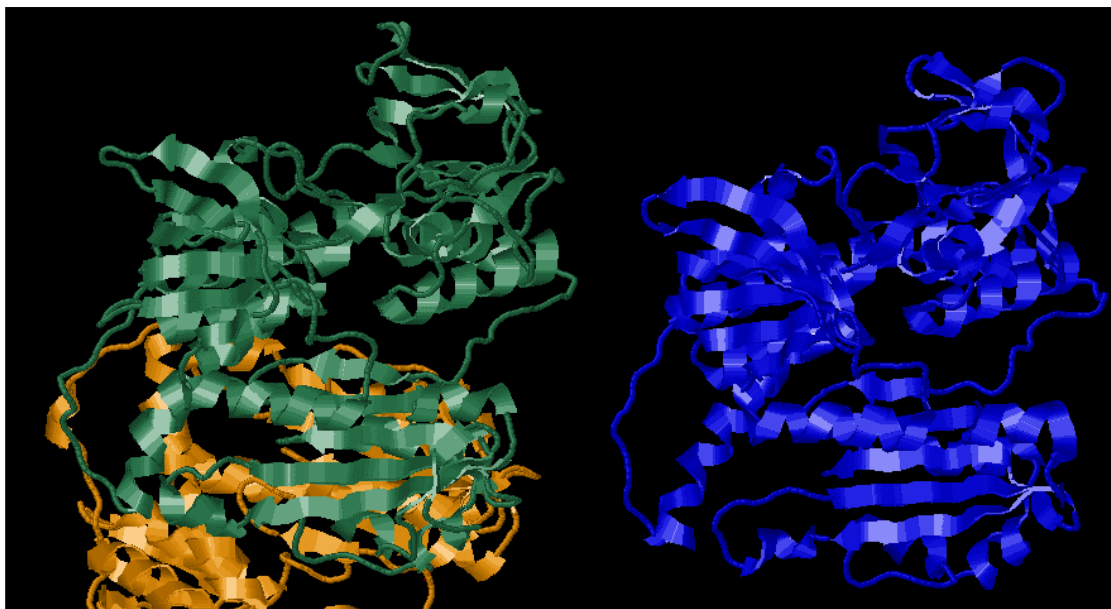


**Figura 2.29:** Esquema ilustrativo da síntese/degradação da tripanotona. A atividade amidase da enzima está demonstrada em vermelho; a atividade sintetase, em preto.

**Adaptado de:** FYFE *et al.*, 2008.

#### 2.4.2. Estrutura e organização catalítica da TR

A GR humana e a TR são ambas membros da família de oxirredutases flavoprotéicas dependentes de NADPH, e precisam da presença do FAD como cofator, contendo sítios flavínicos para complexação deste último, sob a forma de homodímeros. Elas são extremamente similares estrutural e mecanisticamente, mas possuem especificidades quanto ao seu substrato. Mesmo possuindo estruturas muito parecidas, com 41% de similaridade entre as sequências da TR de *T. congolense* e a GR humana, conforme demonstrado na **figura 2.30**, têm um mecanismo catalítico diferenciado, o que sugere que inibidores seletivos à TR possam ser descobertos. Tal fato aumenta o índice terapêutico do agente em questão, se comparado àqueles já utilizados em tratamentos clínicos, pois não há uma enzima em total equivalência no organismo humano, o que nos leva a crer que este agente deverá apresentar poucos efeitos colaterais [SARAVANAMUTHU *et al.*, 2004; KRAUTH-SIEGEL & INHOFF, 2003; KRIEGER *et al.*, 2000].

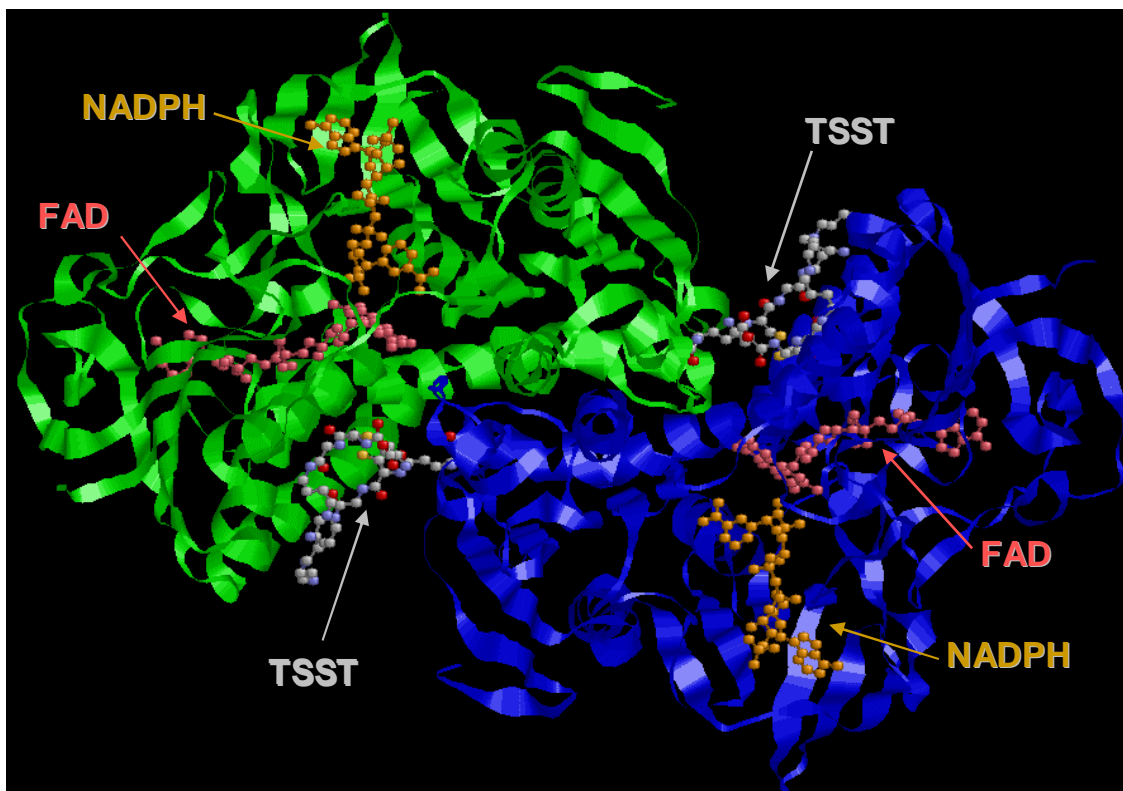


**Figura 2.30:** Comparação das estruturas da TR de *Crithidia fasciculata* (código PDB **1FEC**), com cadeias em verde e amarelo, e da GR humana (código PDB **5GRT**), em azul — esta última também é dimérica, porém apenas uma das unidades monoméricas é aqui demonstrada. Notar que apesar da semelhança, as estruturas não são iguais, possuindo diferenças no posicionamento e formação de sua estrutura terciária.

**Fonte:** **1FEC:** STRICKLAND *et al.*, 1995. **5GRT:** STOLL *et al.*, 1997. Imagem manipulada no programa RasMol 2.7.2.1.1.

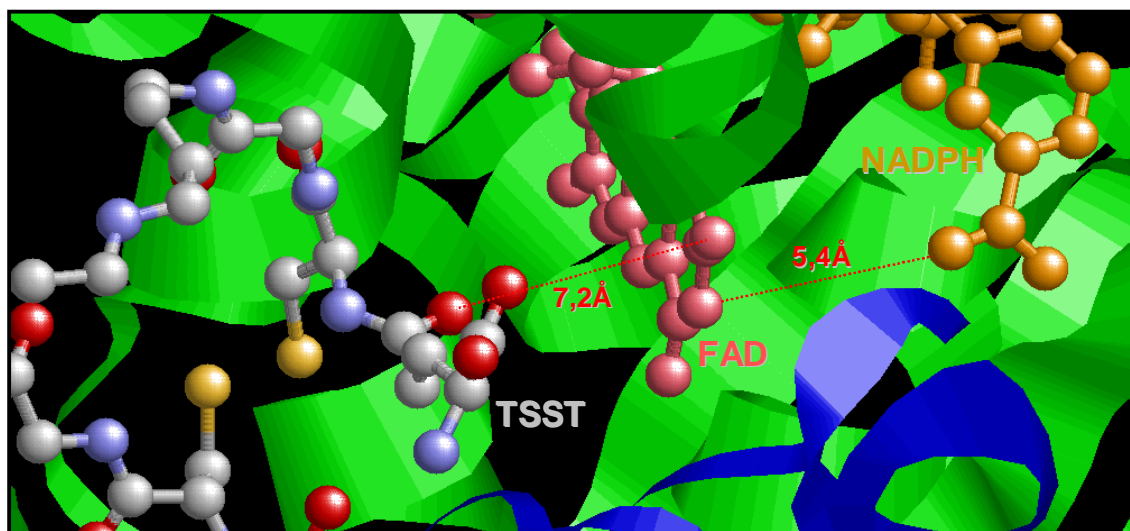
A TR possui mais de uma possibilidade para complexação de inibidores, por possuir o cofator flavínico (FAD) e o NADPH ancorados à sua estrutura; este fator dificulta a elucidação de possíveis mecanismos de inibição. Na **figura 2.31** é mostrada a localização dos sítios da tripanotiona (TSST), do NADPH e do FAD, na estrutura da TR de *Crithidia fasciculata* (código PDB 1TYP [BAILEY *et al.*, 1993]) [HAMILTON *et al.*, 2003; STOLL *et al.*, 1997].

De acordo com as estruturas cristalográficas disponíveis, nota-se que há uma grande proximidade de tais sítios ativos — a troca de equivalentes redutores nas reações de oxirredução promove uma grande comunicação entre os sítios dos cofatores e substratos (**figura 2.32**), assim como demonstrado para a NOS. Além da presença de cofatores, o sítio ativo pertencente ao seu substrato natural, a TSST, constitui uma grande “fenda”, em intensa comunicação com o meio externo. Tal característica faz com que os aminoácidos presentes no sítio ativo, em sua maioria, sejam intensamente polares, visto que a enzima é citossólica, ou seja, está imersa em um meio aquoso, fazendo com que as interações enzima-inibidores sejam de características extremamente particulares.



**Figura 2.31:** Estrutura da TR (código PDB 1TYP, modelo de fitas) proveniente de *C. fasciculata*, com o sítio do FAD (modelo bastão/bolas, em rosa), a presença do NADPH (modelo bastão/bolas, em amarelo) e o sítio da TSST (modelo bastão/bolas, padrão CPK de cores). Notar a formação de uma grande “fenda” neste último sítio, com intensa comunicação com o meio externo.

**Fonte 1TYP:** BAILEY *et al.*, 1993. Imagem manipulada no programa RasMol 2.7.2.1.1.



**Figura 2.32:** Demonstração da proximidade entre os cofatores (FAD, em rosa, e NADPH, em amarelo) e o substrato (TSST, padrão CPK de cores), necessária para a troca de equivalentes redutores entre os sítios ativo e alostéricos, na estrutura da TR de *C. fasciculata* (código PDB 1TYP).

**Fonte 1TYP:** BAILEY *et al.*, 1993. Imagem manipulada no programa RasMol 2.7.2.1.1.



## 2.5. Ação de Quimioterápicos Contra a NOS e TR

### 2.5.1. Quimioterápicos testados

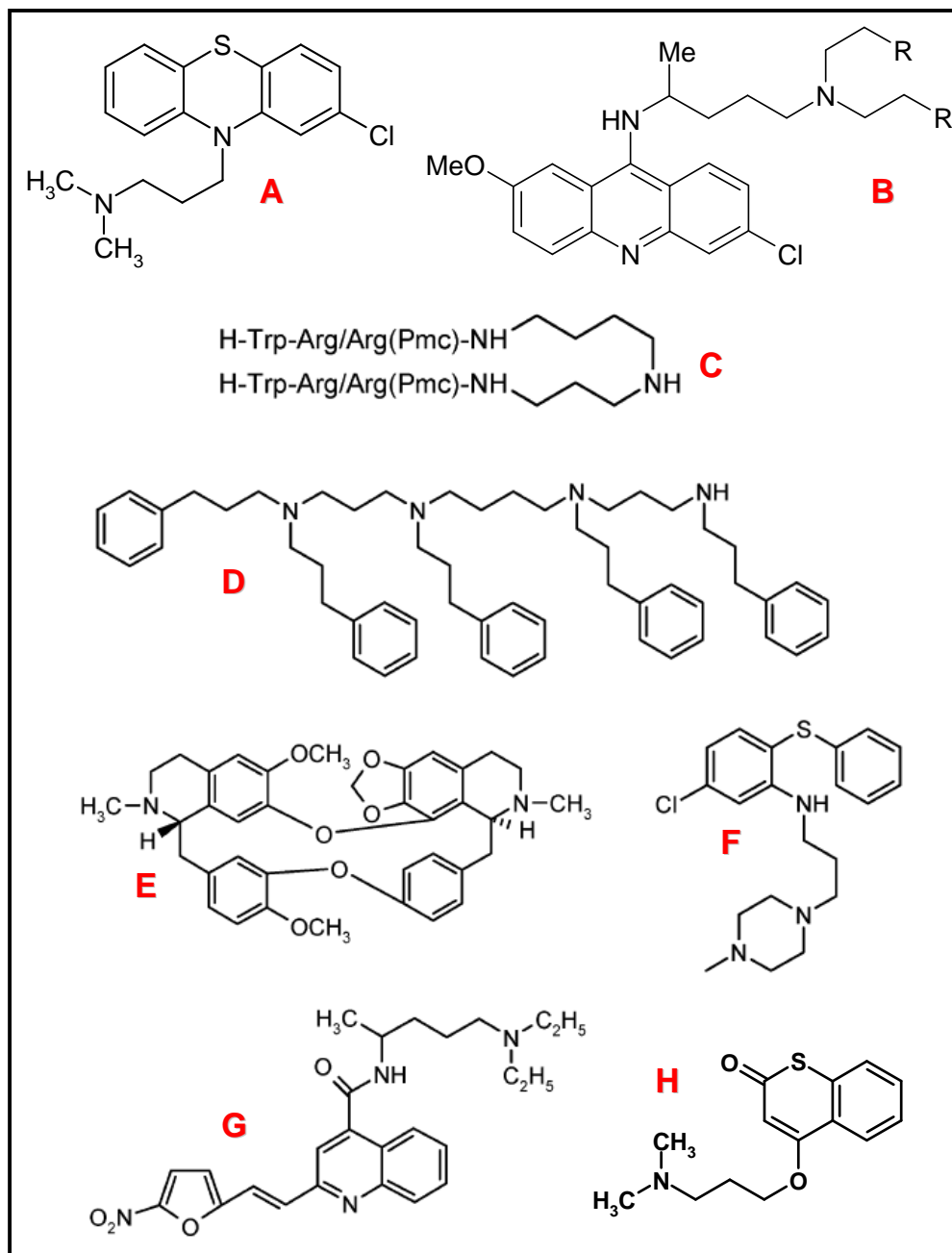
Vários agentes quimioterápicos têm sido testados contra estas duas enzimas, NOS e TR, em especial, por constituírem alvos moleculares interessantes, possibilitando a descoberta de fármacos específicos às enzimas presentes nos parasitos em questão, e com isso, pouco tóxicos aos seres humanos e mamíferos em geral. Com isso, muitos fármacos já em uso no mercado para outros fins têm sido testados, pois tais moléculas possuem perfis de toxidez já delimitados, com processos de produção, síntese, semi-síntese ou extração já conhecidos.

A maior limitação na busca por fármacos inibidores da TR é o alto custo comercial de seu substrato natural, a TSST, para a realização de testes experimentais e comparação de resultados. Com isto, vários substratos alternativos, incluindo inibidores análogos simplificados da TSST e análogos não-peptídicos, têm sido testados frente a esta enzima na busca de inibidores de baixo custo para procedimentos experimentais e medicinais [HAMILTON *et al.*, 2003].

Com isto, o uso do planejamento racional na busca de fármacos antiparasitários levou à descoberta das fenotiazinas [KHAN *et al.*, 2000; CHAN *et al.*, 1998], assim como outras estruturas tricíclicas (como a quinacrina e mostardas de quinacrina — **figura 2.33** [SARAVANAMUTHU *et al.*, 2004; KRAUTH-SIEGEL & INHOFF, 2003]) como inibidores da TR, comprometendo as defesas redox dos parasitos, conforme descrito anteriormente. As fenotiazinas, como a clorpromazina (**figura 2.33A**), que são extensamente utilizadas em clínica como fármacos neurolépticos antipsicóticos, foram assim descobertas como sendo extremamente ativas contra os tripanossomatídeos.

Diferentes classes de compostos, além das fenotiazinas e mostardas de quinacrinas, foram testadas frente a TR, por metodologias empíricas ou teóricas: análogos da acridina (como a quinacrina, acima), peptídeos e peptóides (**figura 2.33C**), poliaminas substituídas (**figura 2.33D**), alcalóides bisbenzilisquinolínicos (**figura 2.33E**), 2-aminodifenilsulfídeos (**figura 2.33F**), derivados do nitrofurano (**figura 2.33G**) e muitos outros [KRAUTH-SIEGEL & INHOFF, 2003]. Além do teste de substâncias já presentes no mercado, a síntese de substâncias análogas às presentes na bioquímica natural do parasito tem sido intensa, na procura por agentes que possuam viabilidade de síntese, pouca toxidez e alta atividade. Kotsonis e colaboradores (2001) sintetizaram inúmeros análogos da BH<sub>4</sub> (*vide* item 4.3.1), imprescindível para a atividade da NOS, com bons resultados. Análogos da BH<sub>4</sub> provenientes

de fontes naturais, como derivados cumarínicos (**figura 2.33H**), foram testados por Jackson e colaboradores (2005), comprovando a atividade e ancoramento destes compostos através de cristalografia de raios-X.

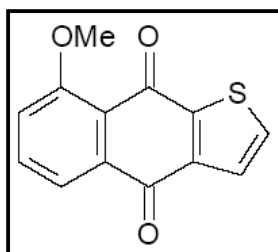


**Figura 2.33:** Estruturas: [A] clorpromazina (fenotiazina antipsicótica); [B] quinacrina (R=H) e/ou mostardas de quinacrina (R=Cl); [C] conjugado poliamino-peptídico; [D]  $N^1, N^1, N^4, N^8, N^{12}$ -penta(3-fenilpropil)espermina (poliamina substituída); [E] cefarantina (alcalóide bisbenzil-isoquinolínico); [F] derivado 2-aminodifenilsulfídeo; [G] chinifur (derivado nitrofurano); [H] derivado cumarínico.

**Fonte:** [A] WILLIAMS & LEMKE, 2002; [B] SARAVANAMUTHU *et al.*, 2004 ; [C–G] KRAUTH-SIEGEL & INHOFF, 2003; [H] JACKSON *et al.*, 2005.

### 2.5.2. Busca por elucidações das interações com as enzimas: sítios alostéricos

Zani e Fairlamb (2003) realizaram estudos cinéticos para descobrir por qual mecanismo de inibição age o composto 8-metoxi-nafto[2,3-*b*]tiofen-4,9-quinona, ou TNQ2 (**figura 2.34**), que possui uma inibição de 87% da atividade enzimática da TR a 100  $\mu\text{M}$ , e assim como as fenotiazinas e quinacrinas, constitui uma estrutura tricíclica. Observaram que se tratava de um mecanismo de inibição não-competitivo, caracterizado por inibições em sítios alternativos ao principal, principalmente o(s) sítio(s) alostérico(s). Com isto, verificaram o perfil de inibição não somente em relação à TSST, mas também em relação ao NADPH. Novamente, trata-se de um mecanismo de inibição não-competitivo — o sítio de interação de TNQ2 não deve ser considerado nem o sítio TSST, nem o sítio alostérico de interação do NADPH, com os resultados da pesquisa cinética [ZANI & FAIRLAMB, 2003]. Um outro cofator poderia ter sido investigado, neste caso, pois a enzima em questão possui ainda um sítio flavínico. Este, até o momento, não foi investigado.

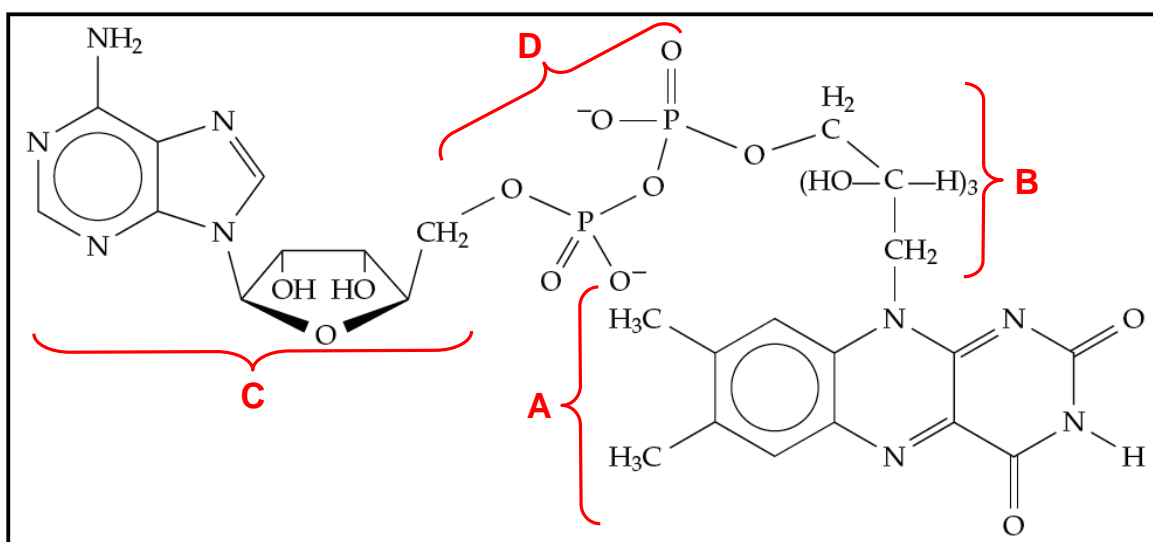


**Figura 2.34:** Estrutura da 8-metoxi-nafto[2,3-*b*]tiofen-4,9-quinona, ou TNQ2.

**Fonte:** ZANI & FAIRLAMB, 2003.

As amidinas e mesoiônicos são ativos contra a mesma enzima, TR (e também a NOS), mas o mecanismo de interação permanece desconhecido. Para a elucidação de tal mecanismo de interação, seria necessário buscar por características comuns a estas duas enzimas. Além da presença de mais de um cofator em suas estruturas, demonstrando alta atividade alostérica, ambas são flavoproteínas NADPH-dependentes, ou seja, possuem como cofatores a presença de uma riboflavina (FAD/FMN) e do NADPH, conforme descrito anteriormente [SARAVANAMUTHU *et al.*, 2004; HAMILTON *et al.*, 2003; JIA *et al.*, 2003; KRAUTH-SIEGEL & INHOFF, 2003; KOTSONIS *et al.*, 2001; PANTKE *et al.*, 2001; BOND *et al.*, 1999; BOUCHER *et al.*, 1999; GERBER *et al.*, 1997; CILLARI *et al.*, 1994; KWON *et al.*, 1989].

As riboflavinas, que possuem ação vitamínica, foram primeiramente isoladas por A. W. Blyth em 1879, ao analisar o leite e encontrar nele um pigmento amarelo fluorescente. Na década de 30, pigmentos fluorescentes esverdeados foram extraídos de fontes naturais diversas, permitindo maior estudo e purificação das riboflavinas. A estrutura do FAD é constituída por várias subestruturas, com um anel tricíclico isoaloxazínico (que lhe fornece uma cor amarelada, assim como sua fluorescência), um grupo ribitol (proveniente do carboidrato ribitol), e o nucleosídeo adenosina na forma difosfatada (**figura 2.35**) [SOUZA *et al.*, 2005; MASSEY, 2000].

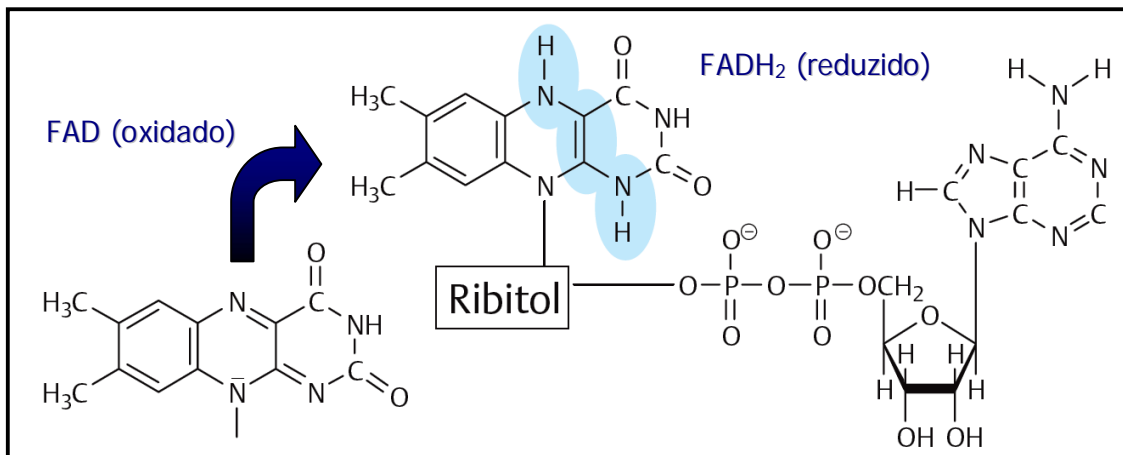


**Figura 2.35:** Estrutura do FAD, demonstrando seu anel isoaloxazínico [A], o carboidrato ribitol [B] e a adenosina [C], na forma difosfatada [D].

**Adaptado de:** METZLER, 2003.

O FAD possui várias possibilidades conformacionais, principalmente em relação aos grupamentos ribitol e difosfato, que fornecem grande liberdade conformacional à estrutura, por não se tratar de estruturas cíclicas como a adenosina e o anel isoaloxazínico. Várias enzimas possuem o FAD em diferentes conformações, quando comparadas umas às outras. Pode-se notar que sítios que possuem compostos como o FAD (cofatores de grande tamanho) não possuem muito espaço para a complexação de outros compostos, ao mesmo tempo que o cofator, diferente do sítio da TSST, que pela grande comunicação com o meio externo à enzima, possui um sítio de grande espaço. O sítio do FAD, na TR, possui o espaço suficiente para ancorar o FAD, e apenas ele [NELSON & COX, 2005; BOND *et al.*, 1999].

As riboflavinas atuam como agentes carreadores de prótons e elétrons, passando por reações metabólicas enzimáticas de forma reversível. São consideradas coenzimas solúveis em água, e estão fortemente ligadas às enzimas nas quais se encontram, porém de forma não-covalente, atuando nestas como grupos prostéticos. Seu anel isoaloxazínico passa por reações de oxidação/redução reversíveis, conforme demonstrado na **figura 2.36** [NELSON & COX, 2005; MASSEY, 2000].

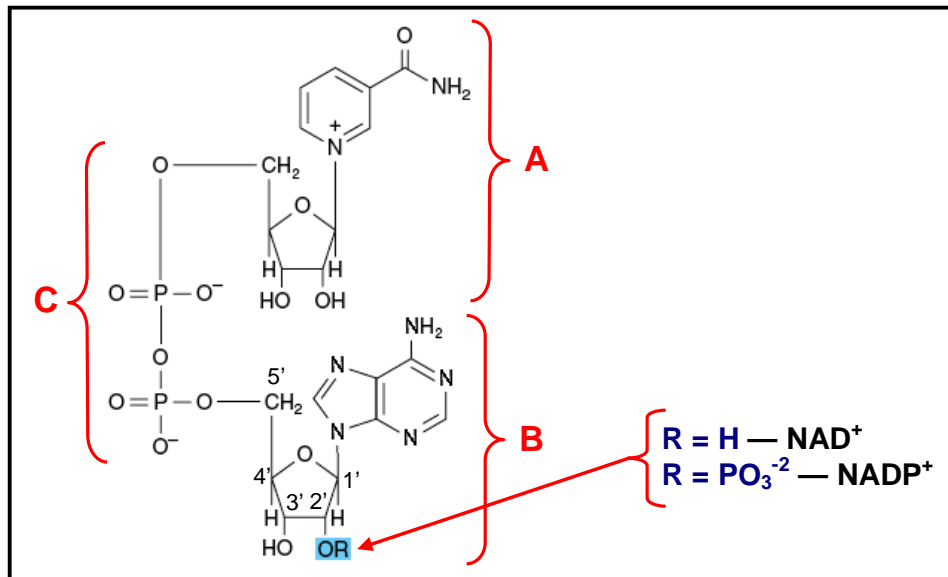


**Figura 2.36:** Representação das semi-reações sofridas pelas riboflavinas (FAD). Destacadas em azul encontram-se as alterações sofridas após as reações de redução.

**Adaptado de:** KOOLMAN & RÖHM, 2005.

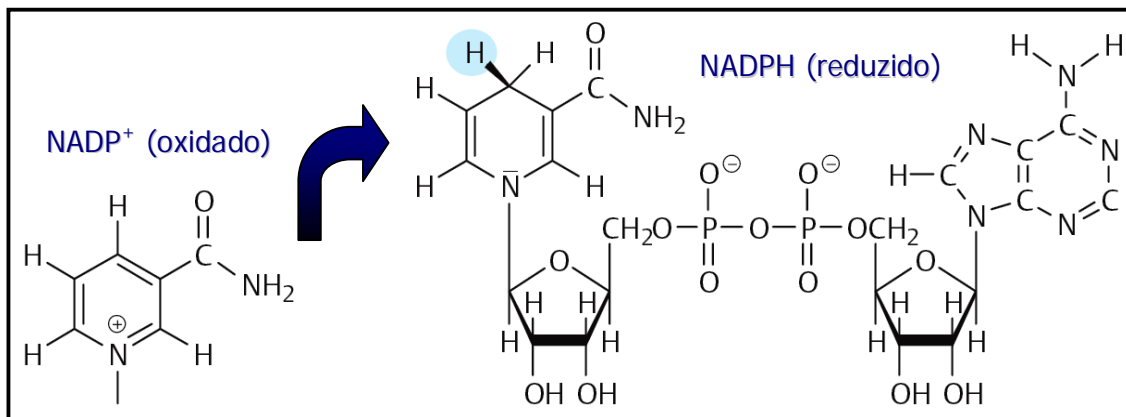
Os nucleosídeos pirimidínicos NAD<sup>+</sup> e NADP<sup>+</sup> estão amplamente distribuídos pelo organismo como cofatores principalmente das desidrogenases, sendo formados pela adenosina e pela nicotinamida (a vitamina niacina — **figura 2.37**).

Estes nucleosídeos foram descobertos durante os estudos sobre a pelagra (uma dermatite fotossensível), e não devem ser considerados de ação vitamínica no sentido estrito pois podem ser sintetizados pelo organismo a partir do triptofano. Eles transportam íons hidreto (2e<sup>-</sup> e 1H<sup>+</sup> — **figura 2.38**) e sempre atuam na forma solúvel, atuando nas reações de redução/oxidação mais importantes do organismo. O NADH transfere equivalentes redutores de vias catabólicas à cadeia respiratória, contribuindo assim ao metabolismo de energia. Em contraste, o NADPH é o agente redutor mais importante envolvido na biossíntese [KOOLMAN & RÖHM, 2005; MURRAY *et al.*, 2003].



**Figura 2.37:** Estrutura do NAD<sup>+</sup>/NADP<sup>+</sup>, demonstrando sua nicotinamida [A] e a adenosina [B], na forma difosfatada [C].

Adaptado de: MURRAY *et al.*, 2003.



**Figura 2.38:** Representação das semi-reações sofridas pelo NADPH. Destacadas em azul encontram-se as alterações sofridas após as reações de redução.

Adaptado de: KOOLMAN & RÖHM, 2005.

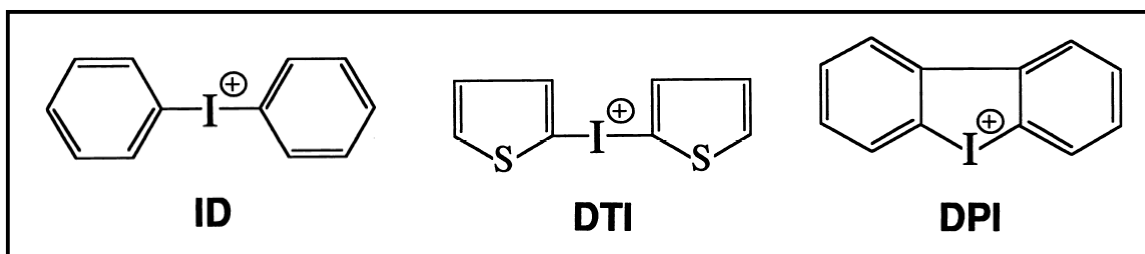
Dependendo do tipo de interação com a enzima, é feita uma distinção entre os “cofatores solúveis” e os denominados “grupos prostéticos”. Os cofatores solúveis estão ligados ao substrato durante as reações, passam por modificações químicas, e são novamente liberados da estrutura protéica. A forma original do cofator é regenerada em uma segunda reação, independente da enzima em jogo. Grupos prostéticos, ao contrário, são cofatores que

estão fortemente ligados à enzima e permanecem a ela associados durante toda a reação (não são liberados). Parte do substrato ligado pelo cofator é transferida mais tarde a outro substrato ou cofator (outra estrutura) na mesma enzima [KOOLMAN & RÖHM, 2005].

O NADPH possui, assim como o FAD, uma grande liberdade conformacional, fazendo com que existam várias conformações possíveis para seu ancoramento à estrutura enzimática. Este é um cofator solúvel, possuindo portanto um sítio com grande comunicação ao meio externo para que o composto possa se ligar e desligar da estrutura durante a reação. O FAD, no entanto, atua como um grupo prostético, possuindo um sítio mais interno à estrutura enzimática e permanecendo neste ligado por todo o tempo. As **figuras 2.31 e 2.32** (*vide* item 2.4.2) demonstram a diferença do posicionamento destes sítios na estrutura da TR.

Estando o FAD fortemente ligado à estrutura das flavoproteínas, conforme descrito, poderia a enzima em questão sofrer um processo de inibição através do sítio flavínico?

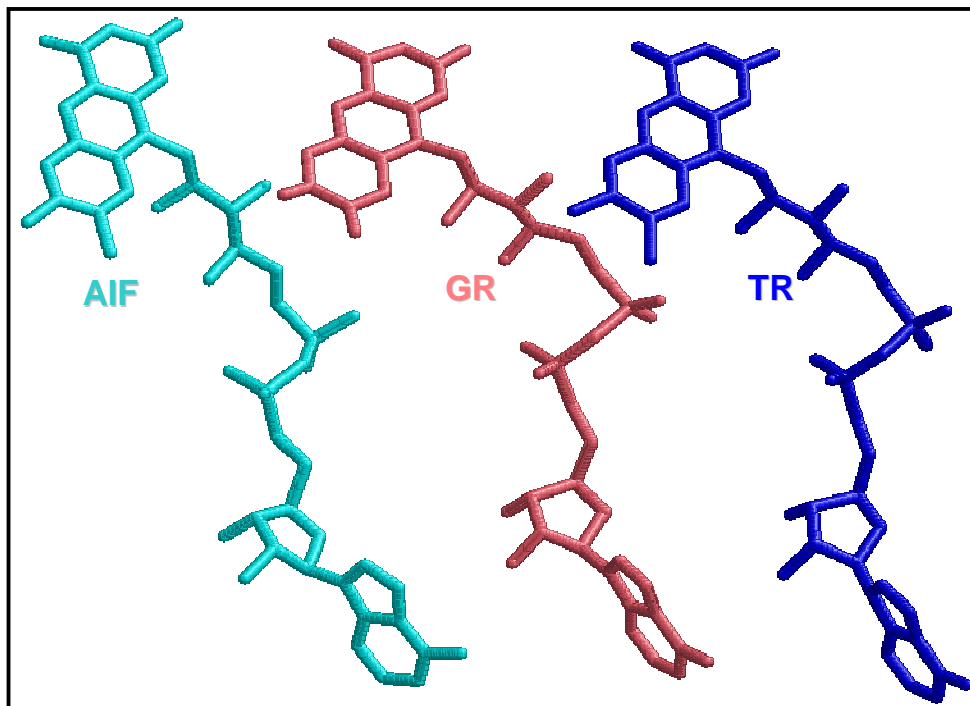
O composto difenileniodônio (DPI — **figura 2.39**) teve seu mecanismo de ação pesquisado, primeiramente, como um composto hipoglicêmico em ratos, por Holland e colaboradores (1973). Anos após, como explicação para seus efeitos hipoglicemiantes (inibição da ubiquinona/NADH redutase mitocondrial em hepatócitos), teve seus efeitos pesquisados sobre outros sistemas, como em reações mitocondriais feitas por oxidoredutases [GATLEY & SHERRAT, 1976; RAGAN & BLOXHAM, 1977], e sistemas geradores de superóxidos em neutrófilos e macrófagos [CROSS & JONES, 1986; HANCOCK & JONES, 1987]. Em 1991, Stuehr e colaboradores pesquisaram a inibição da NOS pelo DPI e pelos compostos di-2-tieniliodônio (DTI) e difeniliodônio (ID) (**figura 2.39**), o que confirmou ser este composto um potente inibidor flavínico, antagonizado apenas pelo FAD e NADPH. Desde então, há vários relatos de seu uso como um inibidor de várias flavoproteínas, dentre elas a GR, e o fator indutor de apoptose (AIF) [MATE *et al.*, 2002; MIRAMAR *et al.*, 2001].



**Figura 2.39:** Estruturas das substâncias iodoniodifenil (**ID**), di-2-tieniliodônio (**DTI**) e difenileniodônio (**DPI**).

**Fonte:** STUEHR *et al.*, 1991.

As enzimas/proteínas NOS, GR, TR e AIF são todas flavoproteínas; as três últimas, especificamente, possuem o FAD em uma conformação extremamente similar em suas estruturas (**figura 2.40**). Tal fato nos faz supor que se inibidas neste sítio, o composto responsável por tal inibição provavelmente poderá ser capaz de inibir todas estas enzimas ao mesmo tempo, pois terá como se complexar ao sítio flavínico de todas estas enzimas.



**Figura 2.40:** Comparação entre a conformação do FAD presente na estrutura das enzimas AIF (código PDB 1GV4), GR (código PDB 5GRT) e TR (código PDB 1BZL).

**Fonte 1GV4:** MATE *et al.*, 2002; **5GRT:** STOLL *et al.*, 1997; **1BZL:** BOND *et al.*, 1999. Imagem manipulada no programa RasMol 2.7.2.1.1.

Um composto com estas características (inibição de um sítio flavínico presente em várias enzimas), em um âmbito medicinal, seria visto como um composto propício ao desenvolvimento de vários efeitos colaterais, pela possibilidade de interação simultânea com vários sistemas enzimáticos de atividades totalmente diferenciadas entre si. Porém, cada sistema enzimático aqui citado costuma se encontrar, em uma célula, em organelas e localizações também diferentes, fazendo com que exista a possibilidade deste composto ser um fármaco com poucos efeitos colaterais, se este não conseguir atingir todas as organelas e localizações das enzimas envolvidas [LIN & LU, 1997]. Tal possibilidade, no entanto, é



extremamente pequena frente a todos os sistemas enzimáticos flavínicos presentes no organismo.

Para o alcance destas enzimas, em diferentes organelas, as características mais importantes seriam principalmente a lipofilicidade e capacidade de ionização do composto, pois para ter acesso a tais localidades, o fármaco precisaria atravessar vários sistemas membranosos; e para tanto, é necessária alta lipofilicidade e baixa capacidade de ionização [LIN & LU, 1997].

## **2.6. Planejamento Racional de Fármacos**

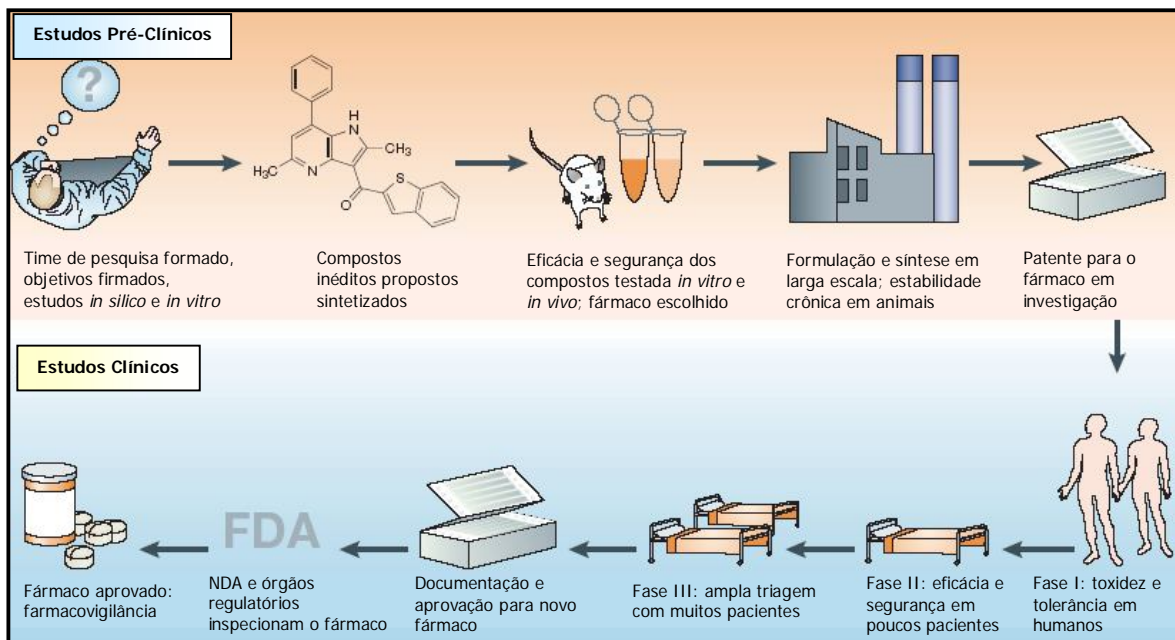
### **2.6.1. Descoberta e desenvolvimento de novos fármacos**

Criar e desenvolver um novo fármaco é um processo longo, complexo, caro e extremamente arriscado, com poucos processos similares no mundo comercial. O processo de seleção de novas substâncias, ou “*screening*”, é acompanhado de forma clássica por modelos *in vitro* ou *in vivo* utilizando animais, para determinar a atividade baseada em seus receptores para cada composto candidato [LOMBARDINO & LOWE III, 2004; NORRIS *et al.*, 2000]. Com isso, a procura por novos fármacos pode ser dividida funcionalmente em 2 estágios: a descoberta, também chamada de pesquisa, e o desenvolvimento, em conjunto chamados de P&D (pesquisa e desenvolvimento).

O primeiro estágio consiste em desenvolver uma hipótese de trabalho, escolhendo uma enzima ou receptor-alvo para uma patologia particular, que possa servir como um modelo realista para testar ou comprovar atividades biológicas, propor grupamentos farmacofóricos e possíveis substituições em estruturas para melhoramento das atividades farmacológicas, assim como para a procura de novos agentes, estabelecendo moléculas que possam ter suas atividades biológicas testadas *in vitro* e/ou *in vivo*. No estágio de desenvolvimento, os esforços estão voltados para a avaliação da toxicidade e eficácia de novos candidatos a fármacos. Pesquisas recentes indicam que as novas substâncias à disposição no mercado, nos Estados Unidos, passam por 10 a 15 anos no estágio de desenvolvimento e custam mais de 300 milhões de dólares [LIN & LU, 1997].

O processo de P&D para a maior parte dos fármacos presentes no mercado atualmente necessitou de 12 a 24 anos para um único fármaco novo, desde o início de um projeto ao

lançamento do fármaco em questão no mercado. A exemplificação do exposto acima se encontra na **figura 2.41** [LOMBARDINO & LOWE III, 2004].



**Figura 2.41:** Fases do processo de descoberta de um fármaco.

**Adaptado de:** LOMBARDINO & LOWE III, 2004.

### 2.6.2. O alvo terapêutico – biomacromolécula protéica

A escolha de um alvo terapêutico é feita primeiramente com base em dados biológicos e bioquímicos. A biomacromolécula-alvo ideal para o desenvolvimento de fármacos baseando-se em dados estruturais deve estar relacionada a uma doença humana, permitindo a interação com uma micromolécula (fármaco), para que sua função possa ser modulada.

Alguns milhares de biomacromoléculas têm sido clonadas e estão disponíveis como alvos terapêuticos de estruturas sintetizadas para descoberta de fármacos. Estes alvos incluíam, até o ano 2000, mais de 750 receptores acoplados à proteína G (GPCRs), mais de 100 receptores acoplados a canais iônicos, mais de 60 receptores nucleares e 50 citocinas, e aproximadamente 20 proteínas de transporte/recaptação. Uma nova metodologia terapêutica para o tratamento de uma doença conhecida é publicada basicamente toda semana, como resultado de uma proliferação exponencial de alvos moleculares e bioquímicos. O grande volume de informação genética sendo produzida comprovou a ênfase na geração de uma nova série de sequências de DNA, para a determinação de quais destes novos alvos oferecem a

maior oportunidade para a descoberta de um novo agente terapêutico. Entretanto, com tantos alvos em potencial disponíveis, a seleção e a validação destes tornou-se o componente mais crítico do processo de descoberta de um novo fármaco, e continuará talvez mais crítico no futuro [ANDERSON, 2003; OHLSTEIN *et al.*, 2000].

A biomacromolécula-alvo deve, geralmente, possuir um sítio de ligação bem definido, permitindo com que outras micromoléculas possam competir, em um nível requerido de potência, com o ligante natural da estrutura (micromolécula endógena), para modular a função da biomacromolécula-alvo. Muitos alvos terapêuticos utilizados atualmente consistem em proteínas, pois sítios ativos protéicos possuem um reconhecimento altamente seletivo de pequenas moléculas orgânicas. Esta característica tem sido explorada para encontrar moléculas seletivas, com a capacidade de acelerar ou retardar determinadas rotas metabólicas, levando assim aos efeitos biológicos esperados [JÓNSDÓTTIR *et al.*, 2005; JONES *et al.*, 1997].

Entretanto, o desenvolvimento de fármacos contra alvos como DNA e RNA com uma estrutura secundária bem-definida, como o ribossomo bacteriano ou porções do genoma viral (como para o HIV) também consistem em modelos eficazes. Alguns métodos podem ser utilizados para a obtenção destas estruturas, como cristalografia de raios-X, ressonância magnética nuclear, modelagem por homologia, entre outros. A cristalografia de raios-X, em especial, tem possibilitado várias destas estruturas, para a construção destes sítios ativos [ANDERSON, 2003; JONES *et al.*, 1997].

O *Protein Data Bank* (PDB — Banco de Dados de Proteínas, <http://www.rcsb.org/pdb/> [BERMAN *et al.*, 2000]) consiste na principal fonte de estruturas protéicas cristalográficas e de informações estruturais obtidas por RMN, com mais de 62.000 estruturas até o início do ano de 2010, e com um crescimento semanal de aproximadamente 100 estruturas. Este rápido aumento do número de estruturas demonstra a grande importância da determinação estrutural protéica mundo afora, na denominada genômica estrutural (“*structural genomics*”) [JÓNSDÓTTIR *et al.*, 2005; [www.rcsb.org/pdb/](http://www.rcsb.org/pdb/)].

As estruturas cristalográficas constituem a fonte mais comum de informação estrutural de proteínas para desenvolvimento de fármacos, desde que estruturas determinadas em resoluções aceitáveis estejam disponíveis, tornando o método útil para peptídeos ou proteínas estruturalmente volumosas. Outra vantagem do método cristalográfico consiste na elucidação da presença de moléculas de água nas estruturas obtidas experimentalmente, permitindo a predição de fatores importantes como a realização de ligações de hidrogênio, solvatação das

proteínas na biofase etc. Uma estrutura cristalográfica deve ser avaliada pelos seguintes fatores [ANDERSON, 2003]:

- Resolução de suas amplitudes de difração (geralmente denominada apenas por “resolução”);
- Confiabilidade, ou fator R;
- Erros de coordenação;
- Fatores relacionados à temperatura;
- Correção química.

Considera-se que estruturas determinadas com até 2,5 Å de resolução são aceitáveis para o desenvolvimento de fármacos, desde que possuam uma boa razão entre os parâmetros obtidos e os experimentais, e a localização dos resíduos no mapa de densidade eletrônica não possua ambiguidades. O fator R e  $R_{\text{free}}$  reportados para o modelo são medidas de correlação entre o modelo feito e os dados experimentais. O valor de  $R_{\text{free}}$  deve ser menor que 28%, preferencialmente menor que 25%, e o fator R deve ser menor que 25%, para que a estrutura seja satisfatória para o desenvolvimento de fármacos. Se a única estrutura disponível para um alvo terapêutico particular não se enquadrar nos parâmetros colocados para a resolução e fator R, os projetos para desenvolvimento do fármaco em questão ainda poderão ser feitos, mas os resultados deverão ser julgados com cuidado e critério [TEAGUE, 2003; ANDERSON, 2003].

### **2.6.3. A química computacional e o desenvolvimento de fármacos**

A química computacional é um campo de rápido crescimento, com um enorme potencial e aplicabilidade. Ela compreende a compilação e o uso sistemático de informação química, e a utilização destes dados para prever o comportamento de um composto desconhecido e racionalizar o comportamento de compostos conhecidos *in silico*. O termo “quimioinformática” utilizado para designar o uso da química computacional é bastante novo, mas os trabalhos que melhor se enquadram neste campo, aplicados ao desenvolvimento de moléculas bioativas, remetem-se ao meio da década de 1960, onde as relações estrutura-atividade (REA, ou SAR) foram propostas, baseadas no trabalho de Hansh e Fujita (1964), ou ainda o trabalho anterior de Hammett e Taft, datados entre as décadas de 1930 e 1950 [JÓNSDÓTTIR *et al.*, 2005; DREWS, 2000].

Em química, o método da regressão linear, assim como vários outros métodos numéricos, proporcionou meios de identificação de quais características estruturais podem ser importantes na determinação da atividade biológica de um grupo de estruturas análogas, em um sistema com interações pouco conhecidas. Isto é alcançado pela construção de uma relação linear entre as características que descrevem a variação estrutural dentro o grupo de estruturas estudado, e aquelas que descrevem a atividade biológica dos mesmos, pela denominada “relação estrutura atividade quantitativa” (QSAR — “*Quantitative Structure Activity Relationship*”). Estudos em QSAR constituem uma associação com a química combinatória, onde as variações nas atividades causadas pelas modificações estruturais sistemáticas podem levar a esclarecimentos sobre mecanismos de atividade biológica [PLATT *et al.*, 2001]. As modificações estruturais de um grupo de estruturas precisam ser quantificadas para extrair um modelo de correlação matemático. A QSAR é um dos métodos utilizados para construir tais modelos e já foi utilizada extensivamente no campo do desenvolvimento racional de fármacos. A QSAR utiliza escalas descritivas de características estruturais, como por exemplo propriedades eletrônicas, estéricas e hidrofóbicas, para contabilizar a correlação observada entre a estrutura e a atividade em interações fármaco-receptor. Os modelos de QSAR são combinados a métodos estatísticos multivariados, para extrair o máximo de informação de um mínimo de amostras de dados. Adicionalmente, a confiabilidade dos dados e dos modelos é estimada [GENST *et al.*, 2002; YALÇIN *et al.*, 2000].

Um exemplo de método de QSAR é a análise comparativa dos campos moleculares — CoMFA (“*Comparative Molecular Field Analysis*” [CRAMER III *et al.*, 1988]), onde moléculas com substituições diferentes, mas com uma estrutura em comum, são alinhadas, e características físico-químicas como potencial eletrostático e energia estérica podem ser medidas e comparadas em uma grade comum com centenas de pontos. Este método usa descritores que dependem do caráter tridimensional de uma molécula (QSAR-3D), e não apenas de fatores topológicos unidimensionais dos métodos de QSAR clássicos [PLATT *et al.*, 2001]. Métodos como este se encontram em pleno desenvolvimento, englobando fatores diversos em seus cálculos como o tempo (QSAR-4D, acrescido de métodos de dinâmica molecular [ROMEIRO *et al.*, 2005; ALBUQUERQUE *et al.*, 1998]), o encaixe-induzido (QSAR-5D [VEDANI & DOBLER, 2002]) e modelos de solvatação (QSAR-6D [VEDANI *et al.*, 2005]).

A pressão das indústrias farmacêuticas na produção rápida e eficiente de estruturas biologicamente ativas levou os cientistas envolvidos na descoberta de novos fármacos a

desenvolver alternativas computacionais, que levassem à identificação de sítios de interação para estas estruturas. O campo relacionado à química computacional foi plenamente estabelecido na década de 1990, tornando-se uma atividade integrada à maioria das grandes companhias farmacêuticas [JÓNSDÓTTIR *et al.*, 2005; OPREA & MATTER, 2004; DREWS, 2000].

A química computacional já cumpriu parcialmente sua promessa, mas a realidade das interações fármaco-receptor, em nível molecular, continua muito complexa para fornecer uma tecnologia *in silico* livre de falhas para a descoberta de novos fármacos. A entropia e a influência do solvente, além dos aspectos dinâmicos das interações, são exemplos de assuntos debatidos continuamente dentre os especialistas. Os desafios para a descoberta *in silico* incluem a avaliação de múltiplos modos de ligação, de estados conformacionais acessíveis tanto para o ligante quanto para o receptor, ou a afinidade e seletividade *versus* eficácia, entre outros [OPREA & MATTER, 2004].

A base “por trás” do sucesso da bioinformática é o acesso a uma vasta quantidade de dados experimentais, junto à natureza estrutural da informação genética. Muitos autores têm publicado recentemente revisões sobre o uso de métodos na bioinformática e química computacional, em processos de descoberta de novos fármacos [JÓNSDÓTTIR *et al.*, 2005].

As metodologias utilizadas na química computacional para a descoberta de novos fármacos, assim como sua teoria, descoberta e uso constituem assuntos extremamente vastos, compreendendo muitas técnicas diferenciadas. Estas técnicas têm sido cada vez mais utilizadas, e rapidamente crescem quanto à tecnologia nelas presentes. Discussões mais detalhadas sobre tais técnicas serão colocadas a seguir, abrangendo os métodos utilizados para realização deste trabalho.

### 3. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

Considerando-se os processos que envolvem a produção de NO no organismo humano e em outros organismos, a inibição da enzima NOS pode trazer benefícios em estados de sepse, infartos e reações inflamatórias [JIA *et al.*, 2003; KOTSONIS *et al.*, 2001], além de possivelmente impedir a proliferação de protozoários e outros organismos patogênicos. Conseqüentemente, a inibição da produção de NO pelo parasito é um mecanismo promissor para o desenvolvimento de fármacos. Frente à diversidade dos possíveis ligantes da NOS, é importante identificar e elucidar os prováveis mecanismos envolvidos na sua inibição, pois a elucidação destes mecanismos poderá auxiliar o planejamento de substâncias antiparasitárias, cardioprotetoras, antiinflamatórias e até mesmo antitumorais [JIA *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2002; KOTSONIS *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 1997].

Por outro lado, dada a relevância da redução da TSH pela enzima TR para a sobrevivência de parasitos [CASTRO-PINTO *et al.*, 2004; VANNIER-SANTOS *et al.*, 2002; BARRETT & GILBERT, 2002; BARRET *et al.*, 1999], o conhecimento dos mecanismos de inibição desta enzima poderá prover melhorias em uma classe de compostos com poucos efeitos adversos para o organismo humano, visto que o ligante endógeno desta estrutura não é compartilhado com os seres humanos. Diferenças estruturais entre a TSH e seus metabólitos e a GSH, o substrato da enzima humana, poderão ser exploradas para o planejamento de ligantes com ação inibitória seletiva. Inibidores específicos da TR possuem grande utilidade clínica, como fármacos utilizados para o tratamento de inúmeros males parasitários, ou como adjuvantes no tratamento com outros fármacos utilizados com o mesmo fim, para diminuir a posologia destes últimos, geralmente tóxicos.

Neste contexto, propomos a elucidação dos possíveis mecanismos químicos pelos quais as amidinas e os mesoiônicos desenvolvidos pelo grupo da Dra. Áurea Echevarria [SOARES-BEZERRA *et al.*, 2008; CASTRO-PINTO *et al.*, 2004; GENESTRA *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2002] podem inibir a NOS e a TR como uma estratégia para auxiliar o planejamento de modificações estruturais que possam resultar na melhoria do perfil inibitório destas substâncias, objetivando o desenvolvimento de novos fármacos com ação leishmanicida.

As amidinas, comprovadamente ativas contra as enzimas NOS e TR dos tripanossomatídeos [PROSKURYAKOV *et al.*, 2005; CASTRO-PINTO *et al.*, 2004;

GENESTRA *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2002; SOUTHAN *et al.*, 1995], possuem mecanismos de inibição não esclarecidos. As duas enzimas possuem vários domínios de importância para suas respectivas atividades, compreendendo domínios para seus substratos e cofatores.

A BH<sub>4</sub> é essencial para a produção de NO, sendo sua ligação ao respectivo sítio ativo um pré-requisito para a atividade catalítica da NOS sobre a *L*-arginina [PANT *et al.*, 2002; KOTSONIS *et al.*, 2001]. Para avaliar a complexação dos compostos mesoiônicos e amidinas neste sítio como um possível mecanismo de inibição desta enzima, propomos inicialmente a construção de um modelo teórico baseado em informações experimentais da ação de inibidores pterínicos conhecidos da NOS [KOTSONIS *et al.*, 2001]. Com um modelo adequado, podem-se aplicar estes mesmos preceitos ao estudo da possível complexação das amidinas e compostos mesoiônicos a esta enzima. O mesmo procedimento pode ser aplicado a inibidores conhecidos do outro possível alvo enzimático do parasito, a TR, como demonstrado em relação às fenotiazinas [KHAN *et al.*, 2000; CHAN *et al.*, 1998].

O objetivo deste trabalho é a proposição de modelos teóricos eficientes para a determinação da atividade inibitória das amidinas e compostos mesoiônicos sobre a NOS e a TR. Em razão da limitação de dados quantitativos disponíveis sobre a inibição enzimática por estas duas séries de compostos, os modelos serão construídos através dos dados experimentais da inibição da atividade da NOS por derivados pterínicos, determinados por Kotsonis *et al.* (2001) e pelo estudo dos derivados fenotiazínicos como inibidores da TR, realizado por Khan *et al.* (2000) e Chan *et al.* (1998). Os modelos serão baseados em descritores gerados a partir de estruturas de complexos enzima/inibidores, obtidas pela técnica de atracamento molecular (ou *docking*).



## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Considerações Teóricas

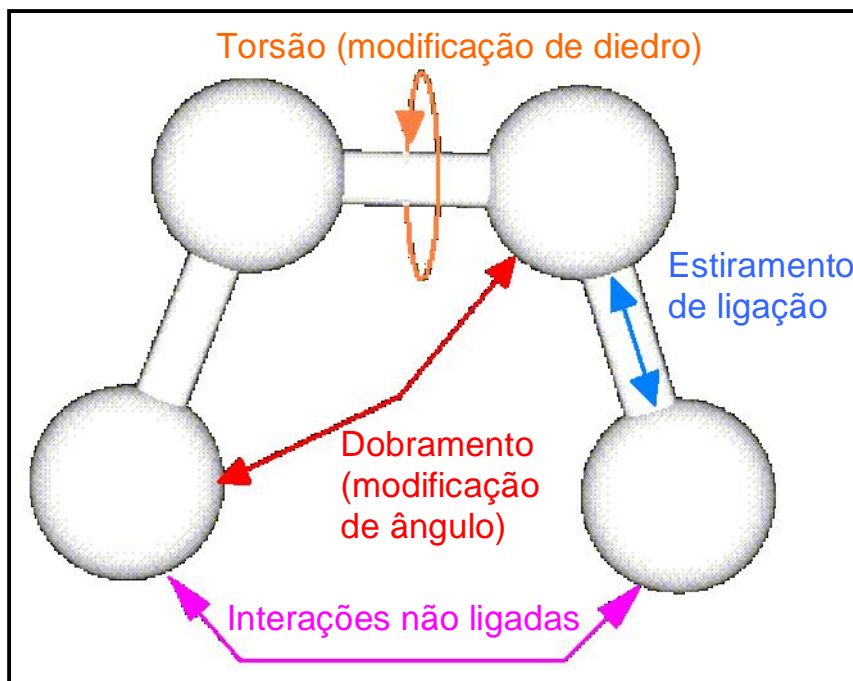
A química computacional foi considerada por muitos, durante muito tempo, um ramo contraditório da química, pelo fato de que esta última é caracterizada por ser, principalmente, uma ciência experimental. Esta aparente contradição permite assinalar uma das maiores virtudes e contribuições atuais da química teórica: a atuação como uma ferramenta de apoio à análise e interpretação de dados experimentais, através de informações que muitas vezes não são de obtenção direta em experimentos, ou da previsão de propriedades moleculares diversas [MORGON, 2001].

Métodos computacionais estão sendo usados de forma cada vez mais constante para a predição de propriedades de compostos. Dentre estas últimas, o calor de formação em fase gasosa a 298K é um dos mais importantes. Há 2 tipos básicos de métodos computacionais: os métodos clássicos, como a mecânica e a dinâmica moleculares, e os métodos quânticos. Os métodos quânticos podem ser classificados em duas grandes famílias: os métodos semi-empíricos e os métodos *ab initio*, como os métodos Hartree-Fock, pós-Hartree-Fock e o funcional de densidade (DFT) [STEWART, 2004]. Abaixo, serão descritas as bases teóricas, importância e aplicabilidade destes métodos, com enfoque nos métodos utilizados neste trabalho.

#### 4.1.1. Métodos clássicos – mecânica molecular (MM)

A mecânica molecular (MM) constitui um método com potencial aplicação a moléculas em seus estados eletrônicos fundamentais, onde cada átomo é representado como uma esfera com uma massa particular, em geral, sua respectiva massa atômica. As ligações químicas são representadas por “molas” conectando as esferas, formando os sistemas moleculares. A geometria dos sistemas moleculares formados é descrita pela diferença das distâncias (ou tamanho) de ligação, ângulos de ligação e ângulos diedros (torções), tratados em função de valores “ideais”, junto com interações interatômicas, como as de van der Waals (vdW) e as de Coulomb — as chamadas interações não ligadas, pois não dizem respeito a

átomos diretamente ligados (**figura 4.1**). Assim sendo, as equações obtidas por MM consideram apenas o núcleo dos átomos, na forma mencionada de esferas, e não incluem os elétrons nos cálculos [OLIVEIRA, 2005; CARVALHO *et al.*, 2003; JENSEN, 1999].



**Figura 4.1:** Demonstração das principais interações ligadas (energias de estiramento, dobramento e torção) e não ligadas consideradas em um campo de força, em mecânica molecular.

**Adaptado de:** TOMASI *et al.*, 2005.

Os cálculos em MM são utilizados para a determinação de geometrias e conformações de equilíbrio em moléculas, com energias relativas a cada nova geometria determinada através da variação gradual das coordenadas dos átomos do sistema molecular para produzir diferentes confôrmeros [OLIVEIRA, 2005; SILVA, 2005]. Os métodos utilizados com embasamento em MM possuem a vantagem da simplicidade conceitual e computacional [ALMEIDA *et al.*, 2001]. Tal simplicidade faz com que estes cálculos sejam extremamente rápidos, com as interações não-ligadas ocupando a maior parte do tempo de cálculo. Suas aplicações são geralmente relacionadas a compostos orgânicos (incluindo biomacromoléculas, como proteínas e ácidos nucléicos), mas as aplicações em compostos organometálicos e compostos de coordenação aumentam progressivamente. Como os cálculos de MM são muito

mais rápidos que os cálculos mecânico-quânticos, sistemas com até centenas de milhares de átomos podem ser tratados por este método [GROOT & GRUBMÜLLER, 2001].

O método permite a construção de uma expressão de energia, usando parâmetros como constantes de força de estiramento das ligações e distorção de ângulos de ligação e ângulos diedros, incluindo as interações entre átomos não ligados [OLIVEIRA, 2005]. De forma simplificada, o campo de força é escrito como uma soma de termos, cada um descrevendo a energia necessária para a “distorção” da molécula de uma forma particular (**equação 1**):

$$E_{FF} = E_{str} + E_{bend} + E_{tors} + E_{vdw} + E_{el} + E_{cross} \quad (1)$$

onde  $E_{str}$  representa a função de energia para o estiramento da ligação entre 2 átomos,  $E_{bend}$  representa a energia requerida para o dobramento de um ângulo,  $E_{tors}$  é a energia torsional para a rotação sobre uma ligação (modificação do ângulo diedro),  $E_{vdw}$  e  $E_{el}$  descrevem as interações não-ligadas entre dois átomos (vdW e eletrostáticas, respectivamente), e  $E_{cross}$  descreve o acoplamento entre os 3 primeiros termos, formando os chamados termos cruzados [JENSEN, 1999]. Os campos de força da MM são utilizados integral ou parcialmente por vários programas como método rápido de otimização estrutural, ou em meio a várias técnicas diferenciadas, como o atracamento (ou ancoramento) molecular, que será explicado a seguir.

#### 4.1.2. *Atracamento molecular (“docking”)*

Para a modelagem e predição da atividade de moléculas inéditas, seriam vantajosos métodos que permitissem grande capacidade de explicação do modo pelo qual estas estruturas se ligam a sítios ativos, quando a geometria do sítio ativo é conhecida — o chamado “problema do atracamento” (“*the docking problem*”). Com isto surgiu, na década de 1980 [KUNTZ *et al.*, 1982], a técnica de atracamento molecular, também conhecida como “*docking*”, altamente utilizada quando as estruturas dos sítios ativos e das moléculas estão disponíveis, ou ainda para o atracamento entre duas proteínas.

Entretanto, a identificação das características moleculares responsáveis pelo reconhecimento biológico, ou a predição de modificações moleculares que aumentem a potência das estruturas envolvidas, são assuntos complexos, de difícil simulação computacional. Com isto, o atracamento molecular é geralmente conceituado como um processo multi-etapas, onde cada passo introduz mais graus de complexidade para a predição

do modo de interação do ligante — os chamados posicionamentos, ou “*posing*”, que são combinações de orientações e conformações [KITCHEN *et al.*, 2004; BROOIJMANS & KUNTZ, 2003].

A investigação de todas as combinações possíveis em um domínio protéico geraria um número enorme de combinações, geralmente bilhões. Qualquer solução para este problema requer uma excelente técnica de pesquisa e amostragem, capaz de explorar adequadamente as orientações e as conformações de interação entre a proteína e o ligante, e um bom entendimento do processo de reconhecimento molecular, para o desenvolvimento das chamadas “funções de escore” (“*scoring functions*”), capazes de prever as interações de forma rápida e confiável. Portanto, o processo é iniciado com a aplicação de algoritmos de atracamento capazes de atrair as pequenas moléculas em um sítio ativo, fazendo uma amostragem efetiva de regiões no espaço próximas à solução correta, sem uma investigação exaustiva de todas as conformações. De forma geral, há dois objetivos nos estudos por atracamento: a modelagem estrutural com acurácia e a predição correta da atividade [McCONKEY *et al.*, 2002; JONES *et al.*, 1997].

O teste das várias possibilidades, devido ao grande grau de liberdade dentre as conformações possíveis em uma molécula, deve ser efetuado com acurácia suficiente para identificar a conformação que melhor interage com a estrutura do receptor/enzima, e deve ser rápido o suficiente para permitir a avaliação de centenas de compostos. Para tanto, os algoritmos são complementados por funções de escore, designadas à predição da atividade biológica através da avaliação de interações (geralmente eletrostáticas e de vdW, conforme descritas no item anterior) entre os compostos e alvos protéicos, além de efeitos entrópicos e de solvatação [GOHLKE & KLEBE, 2002; HALPERIN *et al.*, 2002].

Para avaliar os métodos de atracamento, é importante considerar como os ligantes e proteínas são representados pelos programas. Existem três representações básicas:

1 – **Representação atômica:** em geral, apenas é usada em conjunção com funções de energia potencial, ou durante procedimentos de ranqueamento (“*ranking*”) — a reavaliação de vários resultados de escores iniciais, para uma reprodução da interação mais próxima possível da realidade — pela complexidade computacional da avaliação das interações atômicas repetidamente [HALPERIN *et al.*, 2002].

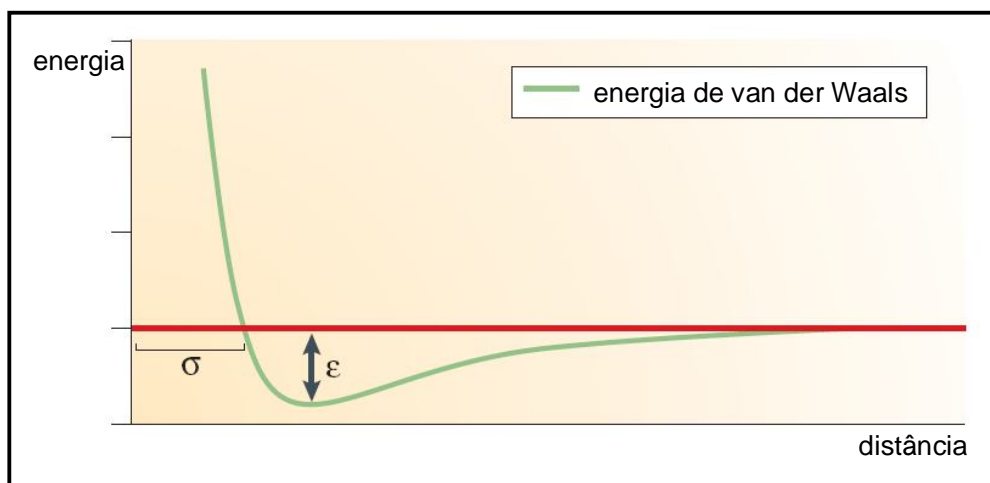
2 – **Representação superficial:** programas baseados neste tipo de representação de superfície são apenas utilizados para atracamento entre duas proteínas (o chamado atracamento proteína/proteína), através do alinhamento de pontos superficiais, minimizando o ângulo entre as superfícies de moléculas opostas [NOREL *et al.*, 1999].

3 – **Representação em grade:** o uso de grades de energia potencial, iniciado por Goodford (1985), é feito por vários programas para o cálculo de energia, acumulando informações sobre a contribuição energética da proteína como pontos em uma grade ou rede, para que sejam lidas e utilizadas durante o escore do ligante. Isto é feito com a energia potencial eletrostática (**equação 2**), representada como uma soma de interações coulombianas, e a de vdW (**equação 3**), modelada como uma função 12-6 de Lennard-Jones [KITCHEN *et al.*, 2004]:

$$E_{coul}(r) = \sum_{i=1}^{N_A} \sum_{j=1}^{N_B} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (2)$$

$$E_{vdW}(r) = \sum_{i=1}^{N_A} \sum_{j=1}^{N_B} 4\epsilon \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (3)$$

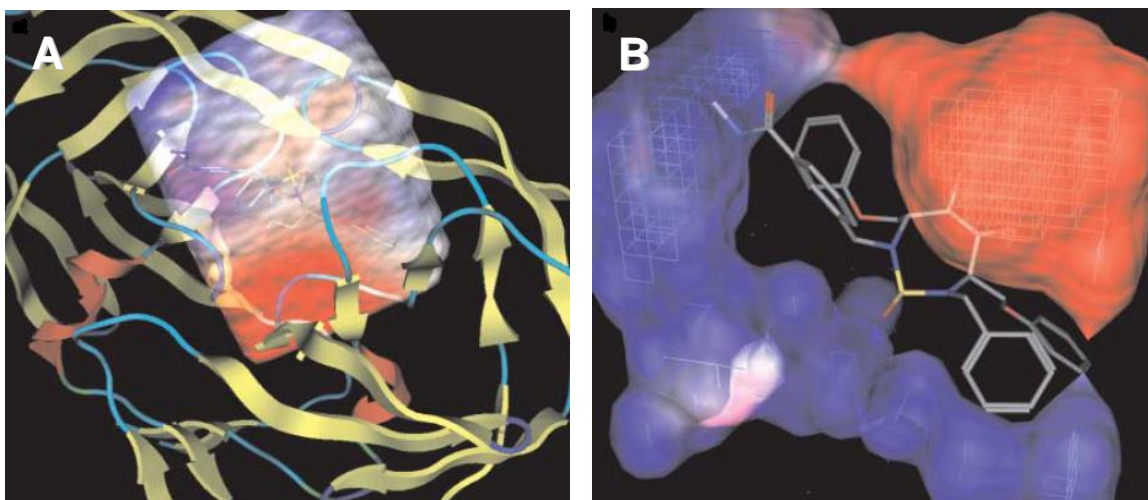
onde  $N_A$  e  $N_B$  representam o número de átomos das moléculas  $A$  e  $B$ , respectivamente,  $q$  a carga de cada átomo,  $r_{ij}$  a distância entre eles e  $\epsilon_0$  é a constante dielétrica;  $\epsilon$  representa a profundidade do poço do potencial, e  $\sigma$  o diâmetro de colisão dos átomos  $i$  e  $j$  [GOODFORD, 1985]. A **figura 4.2** demonstra a representação da função 12-6 de Lennard-Jones. Repulsões de curta distância são representadas pelo termo  $1/r^{12}$  enquanto que as forças atrativas provenientes dos efeitos de dispersão de London são descritas pelo termo  $1/r^6$ .



**Figura 4.2:** Gráfico representativo da função 12-6 de Lennard-Jones, e demonstração das variáveis  $\epsilon$  e  $\sigma$  (equação 3).

**Adaptado de:** KITCHEN *et al.*, 2004.

A **figura 4.3** demonstra uma grade representativa para capturar potenciais eletrostáticos, que podem ser demonstrados pelo programa que os calcula como um mapa de potencial eletrostático, demonstrando quais partes do ligante se encontram com maior ou menor densidade eletrônica, de acordo com a interação feita com aquele receptor ou enzima. A maior parte dos programas utilizados atualmente para atracamento utiliza este modo de representação.



**Figura 4.3:** Exemplos de representações em grade: **[A]** Superfície de uma grade capturando o potencial eletrostático de uma HIV protease (código PDB 1BVE) por todo seu sítio ativo, com seu inibidor. Áreas em azul e vermelho representam áreas de potencial eletrostático positivo e negativo, respectivamente. **[B]** Grade de potencial eletrostático “contrário” (cut-away) de uma enzima ao redor do inibidor ligado (não incluído no cálculo).

**Fonte:** KITCHEN *et al.*, 2004.

Os algoritmos utilizados para tratar a flexibilidade do ligante são divididos em três categorias básicas. A primeira constitui os denominados métodos *sistemáticos*, com algoritmos que exploram todos os graus de liberdade conformacional da molécula, mas que vêm sendo menos utilizados, pois possuem o problema denominado “explosão combinatorial”. Vários fragmentos moleculares são atracados no sítio, sendo então ligados covalentemente um ao outro, podendo ser ainda divididos em regiões rígidas (“núcleos”) e flexíveis (cadeias laterais) [LEACH, 2001]. Tal método inclui ainda, em alguns programas, uma pesquisa de conformações geradas previamente, em bancos de dados.

Uma segunda categoria engloba os denominados métodos *estocásticos*, que atuam promovendo mudanças aleatórias em ligantes, de acordo com funções de probabilidade, implementadas principalmente por duas metodologias: “Monte Carlo” e “algoritmo genético”

(GA); esta última é utilizada por vários programas, incluindo o GOLD (*Genetic Optimisation for Ligand Docking* — Otimização Genética para Atracamento de Ligantes — CCDC Ltd.). O GA utiliza uma estratégia evolucionária para explorar a variabilidade estrutural de um ligante flexível, testando simultaneamente vários modos disponíveis de ligação em um sítio ativo protéico parcialmente flexível [KITCHEN *et al.*, 2004; JONES *et al.*, 1997].

Os métodos *simulacionais* constituem a terceira categoria básica, sendo a técnica de dinâmica molecular (simulação dos movimentos e do espaço conformacional de sistemas de partículas atômicas [GOODMAN, 2000]) a mais utilizada neste tipo de método. Estes constituem métodos mais demorados, por se tratarem de processos dinâmicos complexos, e devem apenas ser utilizados quando não há uma grande barreira energética a ser quebrada para o atracamento, sendo necessário utilizar diferentes fragmentos protéicos para que a técnica seja aplicada de forma mais adequada.

A avaliação e ranqueamento de conformações dos ligantes é um aspecto crucial para o atracamento. Por tal motivo foram implementadas as funções de escore, compreendendo várias suposições e simplificações na avaliação dos complexos formados, pois estes não contam com vários fenômenos físicos que determinam o reconhecimento molecular, como por exemplo, os efeitos entrópicos. Há três tipos de funções de escore: as baseadas em campos de força (“*force-field-based scoring functions*”), as empíricas (“*empirical scoring functions*”) e as baseadas em conhecimentos (“*knowledge-based scoring functions*”), que serão demonstradas a seguir [KITCHEN *et al.*, 2004].

#### ***i. Funções de escore baseadas em campos de força:***

Estas funções quantificam a soma de duas energias: a de interação entre o receptor e o ligante (energia “externa”) e a energia “interna” do ligante. Por constituir um método de campo de força (MM), são também investigadas as interações não-ligadas envolvidas no reconhecimento molecular. As interações entre o ligante e a proteína em jogo são quase sempre descritas utilizando termos de energia eletrostática e de vdW. Potenciais 12-6 (Lennard-Jones) (**equação 3**), como o presente da função “*D-Score*” [KRAMER *et al.*, 1999], aumentam a repulsão, desfavorecendo contatos muito próximos entre receptor e ligante; termos menores, como o potencial 8-4 da função “*G-Score*” [KRAMER *et al.*, 1999], tornam este termo mais “suave”.

O termo eletrostático é uma formulação de Coulomb (equação 2), com uma função dielétrica dependente de distância, para o tratamento de interações carga-carga. Funções de escore do tipo descrito possuem complicações, sendo necessária a definição de um “raio de

corte” para o tratamento destas interações não-ligadas. Distâncias muito grandes complicam a acurácia do método, diminuindo a possibilidade de atracamento nestas posições muito distantes. Muitos destes escores foram originalmente feitos para modelar contribuições estruturais e entálpicas em fase gasosa, não incluindo termos entrópicos e de solvatação [KITCHEN *et al.*, 2004; SCHNEIDER & BÖHM, 2002].

A maior parte das funções de escore considera uma única conformação protéica, o que faz com que a determinação da energia interna da proteína possa ser omitida, simplificando o cálculo do escore. Várias funções são baseadas em diferentes parâmetros de campos de força: por exemplo, o “*G-Score*” é baseado no campo de força Tripos [KRAMER *et al.*, 1999] e o “*AutoDock*” [MORRIS *et al.*, 1998] é baseado no campo de força AMBER [WEINER *et al.*, 1986]. Algumas funções possuem extensões dos termos de energia para englobar termos entrópicos e outros. Como exemplo, temos a inclusão de termos de entropia torsional ao “*G-Score*” e “*Goldscore*” [VERDONK *et al.*, 2003], e a inclusão de termos para ligação hidrogênio entre ligante e proteína no “*Goldscore*” [VERDONK *et al.*, 2003] e “*AutoDock*” [MORRIS *et al.*, 1998].

## **ii. Funções de escore empíricas:**

Essas funções de escore reproduzem dados experimentais, como energias de interação e conformacionais, como uma soma de várias funções parametrizadas, primeiramente propostas por Böhm (1992), baseado na aproximação das energias de interação por uma soma de termos individuais não-correlacionados. Tais termos são obtidos de uma análise por regressão, usando energias de interação determinadas experimentalmente, com informações estruturais (obtidas por cristalografia de raios-X). Suas formas funcionais são frequentemente mais simples que as funções de escore obtidas por campos de força, com termos de avaliação mais simples. Sua desvantagem reside na dependência dos conjuntos de dados moleculares, o que leva a diferentes fatores (quando comparados a funções de campos de força), que não podem ser facilmente recombinados em uma nova função de aptidão [KITCHEN *et al.*, 2004]. Para evitar isso, termos que contabilizam interações não-ligadas podem ser implementados de várias formas. Na formulação de “*LUDI*” [BÖHM, 1992], os termos de ligação hidrogênio são separados em ligações hidrogênio neutras e ligações hidrogênio iônicas, enquanto o “*ChemScore*” [ELDRIDGE *et al.*, 1997] não diferencia os tipos de ligação hidrogênio. “*LUDI*” calcula as contribuições hidrofóbicas com base na representação da área superficial molecular, enquanto “*ChemScore*” avalia o contato entre pares de átomos hidrofóbicos, e “*F-*



*Score*” [RAREY *et al.*, 1996] adiciona um termo para incluir as interações entre fragmentos aromáticos.

### **iii. Funções de escore baseadas em conhecimento:**

Estas funções de escore foram feitas para reproduzir estruturas experimentais, ao invés de energias de ligação. Os complexos ligante-proteína são modelados usando potenciais de interação atômica relativamente simples. Assim como os métodos empíricos, incluem implicitamente efeitos de ligação difíceis de incluir explicitamente. Implementações destas funções incluem o “*PMF*” (“*Potencial of Mean Force*”) [MUEGGE & MARTIN, 1999] e o “*DrugScore*” [GOHLKE *et al.*, 2000], que também incluem correções como a acessibilidade ao solvente, dentre outras. “*S<sub>MoG</sub>*” [DeWITTE & SHAKHNOVICH, 1996] utiliza potenciais de pares de átomos para avaliar interações entre ligantes e proteínas. Tais funções primam pela simplicidade, fazendo com que grandes conjuntos de moléculas possam ser avaliadas com rapidez. A desvantagem deste método reside no fato de que sua derivação é baseada na informação codificada implicitamente em conjuntos limitados de complexos ligante-proteínas.

#### **4.1.3. O programa GOLD e o algoritmo genético (GA)**

O tratamento dado à flexibilidade da proteína não é tão avançado quanto o tratamento dado à flexibilidade do ligante. Na maioria dos programas, as proteínas são consideradas rígidas, o que corresponderia à existência de uma proteína em apenas um estado conformacional, previamente definido. Porém, sabe-se que as proteínas possuem a capacidade de se adaptar a um determinado ligante, para que o complexo tenha a menor energia possível (ajuste induzido). Portanto, um bom modelo deve considerar algum tipo de flexibilidade protéica, para que cada ligante interaja, com a mais alta afinidade, com a conformação da proteína de mais baixa energia — a conformação mais provável de ser encontrada no meio correspondente [CARLSON, 2002; CARLSON & McCAMMON, 2000].

A flexibilidade protéica tem sido explorada progressivamente. O programa GOLD foi desenvolvido por Jones e colaboradores (1997) para explorar a flexibilidade conformacional do ligante com possibilidade de conferir flexibilidade parcial à proteína (algumas cadeias laterais e fragmentos da cadeia polipeptídica), fazendo com que o atracamento não seja feito com a proteína completamente rígida.

O programa se utiliza de métodos estocásticos para a busca por conformações, com funções de escore baseadas em campos de força, totalmente implementadas com termos que combinam informações de diferentes escores para balancear erros e melhorar a probabilidade na identificação de ligantes “reais”. Tal implementação é denominada “escore de consenso”, fazendo com que as imperfeições no método de busca sejam diminuídas [KITCHEN *et al.*, 2004].

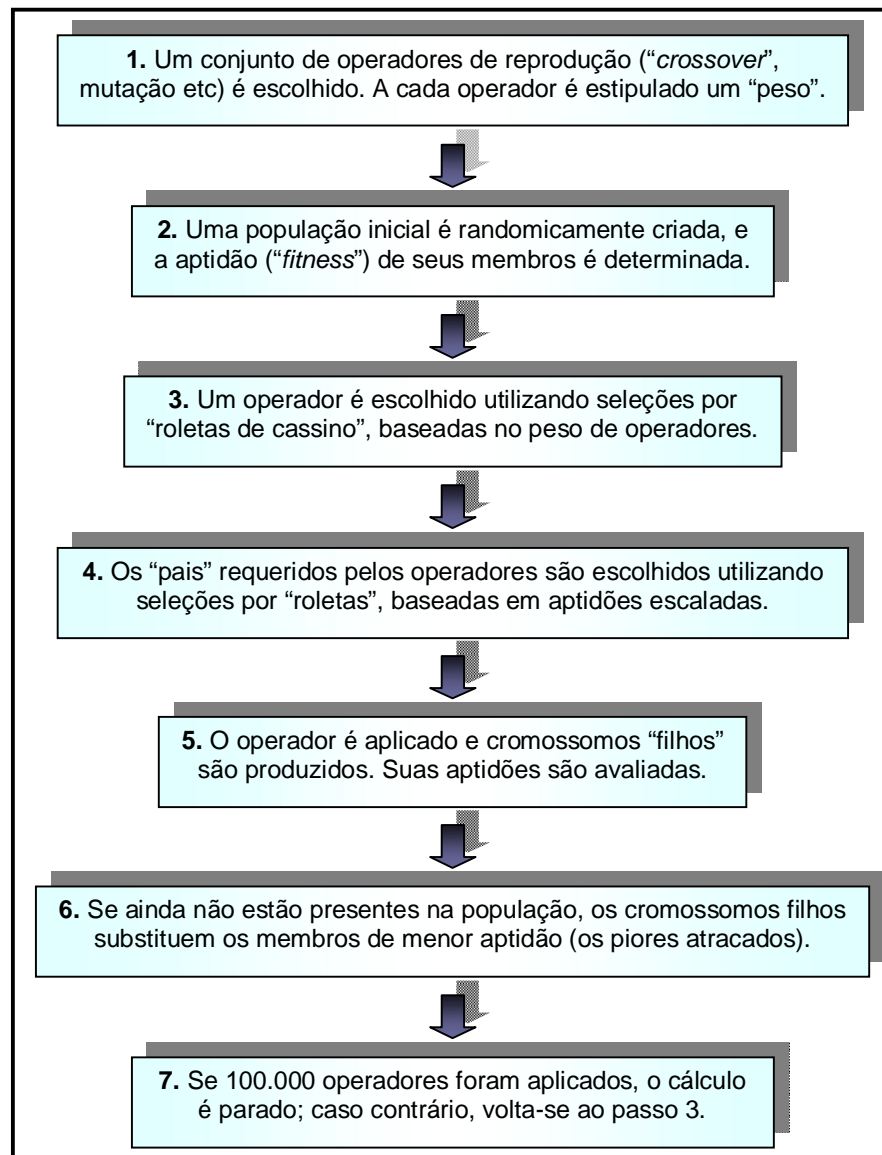
As moléculas de água podem ser consideradas livres para girar ou até para se deslocar translacionalmente. Para avaliar se uma molécula de água deve ou não ser deslocada, o programa avalia a energia livre associada com a transferência da molécula do interior do solvente até seu sítio de interação no complexo proteína/ligante. Desta forma, o requerimento fundamental de que o ligante precisa deslocar moléculas de água solvatantes da proteína para nela se ancorar é respeitado, com grande sucesso na identificação do sítio ativo experimental.

O algoritmo usado pelo programa (GA) simula matematicamente idéias genéticas e evolucionárias, com a seleção de operadores genéticos como o “*crossover*” e as mutações. Proposta no anos 60 por John H. Holland, pesquisador da Universidade de Michigan (EUA), tal metodologia foi primeiramente utilizada em Química por Lucasius e Kateman (1991), em um trabalho para seleção de comprimentos de onda em espectros de ultravioleta. O algoritmo otimiza as soluções encontradas em várias situações, sendo considerado um dos melhores algoritmos de otimização estocástica, encontrando soluções muito próximas às verdadeiras (as encontradas em métodos experimentais, como a cristalografia de raios-X). Tal método tem sido recomendado para atracamentos bastante complicados [COSTA FILHO & POPPI, 1999; MORRIS *et al.*, 1998].

O GA, para sua criação, envolve 5 etapas básicas: a codificação das variáveis, a criação da população inicial, a avaliação da resposta (aptidão), o cruzamento (o “*crossover*”) e a mutação. A codificação das variáveis consiste na criação dos “cromossomos”, formados por possíveis soluções (ou seja, pelos arranjos e orientações de um ligante frente a uma proteína/sítio ativo), que podem ser definidas por um grupo de valores (geralmente por codificação binária) descrevendo a translação, orientação e conformação do ligante atracado, ou seja, seu genótipo; enquanto as coordenadas atômicas de um ligante correspondem ao seu fenótipo. Com isto, temos a criação da população inicial, constituída por vários cromossomos. Sua aptidão é então calculada a partir dos valores descritos acima, baseados no mérito relativo das soluções encontradas, para saber quais cromossomos serão capazes de gerar a melhor resposta esperada, determinando com qual probabilidade este cromossomo irá cruzar. Pares randômicos de cromossomos são então cruzados, onde novas gerações de cromossomos

herdarão características de seus “pais”. Alguns passarão pelo processo de mutação, onde ocorrem permutações nas informações contidas nos genes. A seleção da descendência de tais gerações é baseada na aptidão do cromossomo: aqueles que melhor atacam ao seu ambiente (proteína) são selecionados, e aqueles que não se adaptam bem são abandonados [COSTA FILHO & POPPI, 1999; MORRIS *et al.*, 1998; JONES *et al.*, 1997].

No programa GOLD, as etapas acima colocadas possuem um desenvolvimento específico (**figura 4.4**), e os passos que fazem parte do GA serão explicados a seguir.



**Figura 4.4:** Estado fixo sem duplicatas do GA, utilizado no programa GOLD (CCDC Ltd.).

Adaptado de: JONES *et al.*, 1997.

### ***i. Preparação da proteína e ligantes (inicialização)***

O programa exige, para iniciar o cálculo, que seja definido o sítio de ligação (que equivale a um raio de corte, citado no item 4.1.2), pelo fornecimento de um ponto de origem (o comando “*origin*”), que pode ser fornecido através de coordenadas cartesianas, da indicação de um determinado átomo, ou mesmo pelo posicionamento de um resíduo, que deve ser centralizado em relação ao possível sítio de ligação. Além deste ponto, é necessário o tamanho do raio do sítio de ligação em Å (o comando “*radius*”), que deve englobar todo o sítio e possíveis posicionamentos dos ligantes em estudo, para que todo o sítio de ligação seja pesquisado [JONES *et al.*, 1997; JONES *et al.*, 1995a,b]. Os parâmetros-base do programa definem um raio do sítio de ligação de 10,0 Å.

Como uma outra etapa da preparação para o cálculo, todos os doadores e aceptores de ligações hidrogênio são identificados na superfície do sítio de ligação (em relação à proteína e ao ligante), usando a caracterização SYBYL de tipos de átomos [CLARK *et al.*, 1989], com a adição dos pares solitários de elétrons aos aceptores, a uma distância de 1,0 Å. As ligações hidrogênio, assim como todas as ligações simples acíclicas não-terminais do ligante, são marcadas como giratórias apropriadamente [JONES *et al.*, 1997; JONES *et al.*, 1995a,b].

### ***ii. A representação do cromossomo***

Informações conformacionais são codificadas em duas fitas duplas: uma para a proteína e uma para o ligante, onde cada *bite* codifica um ângulo de rotação de uma ligação marcada como giratória, podendo variar de  $-180^\circ$  a  $180^\circ$ . Duas fitas íntegras codificam mapeamentos, sugerindo possíveis ligações hidrogênio entre proteína e ligante (uma com doadores da proteína e aceptores do ligante, e a outra com o oposto). Estas ligações hidrogênio são codificadas por mínimos quadrados, de forma a encontrar o máximo de ligações possíveis em um atracamento de um determinado ligante [JONES *et al.*, 1997].

### ***iii. A função de aptidão (“fitness”)***

A aptidão é avaliada em 6 estágios diferentes [JONES *et al.*, 1997]:

1. A conformação do ligante e sítio ativo da proteína é gerada;
2. O ligante é ancorado ao sítio ativo utilizando um procedimento de atracamento por mínimos quadrados;
3. Uma energia de ligação hidrogênio (“*H-bond-energy*”) é obtida para o complexo;
4. Uma energia entre os pares de átomos (a energia do complexo — “*Complex-energy*”) é obtida para a energia estérica de interação entre a proteína e o ligante;

5. Expressões de MM são usadas para gerar um termo de energia interna (“*Internal-energy*”), que corresponde ao cálculo de energia interna do ligante;
6. Os termos de energia são somados para gerar uma função final de aptidão.

Para o ancoramento do confôrmero gerado ao sítio ativo destacado no programa, as ligações de hidrogênio são buscadas, a uma distância de no máximo 2,9 Å do átomo doador. A energia da ligação (entre doador e acceptor) é então calculada, como função da distância e ângulo entre os 2 átomos individualmente, e a energia geral do confôrmero (“*H-bond-energy*”) é uma soma de todas as ligações (doador da proteína e acceptor do ligante + acceptor da proteína e doador do ligante) [JONES *et al.*, 1997; JONES *et al.*, 1995a].

Após o ancoramento descrito, um potencial 4-8 com “*cut-off*” linear é calculado, de forma similar ao descrito por Surles e colaboradores (1994), para determinar a energia de interação entre ligante e proteína [SURLES *et al.*, 1994]. Todas as interações entre 2 átomos de ligante e proteína em contato um com o outro, em uma distância (“*cut-off*”) de 1,5 vez a soma do raio de vdW dos 2 átomos em questão são calculadas, gerando a energia do complexo (“*complex-energy*”).

O termo de energia interna (“*internal-energy*”) constitui a soma das energias estérica e de torção do ligante, sendo a estérica determinada por um potencial 6-12, e a torsional por uma equação do campo de força Tripos (com parâmetros provenientes de Clark *et al.*, 1989).

O escore final da aptidão é determinado através de uma soma de todos os componentes de energia, conforme demonstrado abaixo [JONES *et al.*, 1997]:

$$-H\text{-bond-energy} - (\text{internal-energy} + \text{complex-energy})$$

#### ***iv. Os operadores genéticos***

Ao invés de manipular uma grande população de cromossomos, um ambiente distribuído conhecido como “modelo de ilha” foi empregado, envolvendo várias subpopulações e a migração de cromossomos individuais dentre as subpopulações. No programa são utilizadas 5 subpopulações, cada uma com 100 indivíduos [JONES *et al.*, 1995b].

O GA do programa utiliza 3 operadores genéticos: o cruzamento (“*crossover*”), a mutação [JONES *et al.*, 1995a] e a migração [JONES *et al.*, 1995b]. Os operadores são escolhidos usando uma seleção do tipo “roleta”, baseada no peso de operadores. Estes pesos são escolhidos de forma que o cruzamento e a mutação sejam aplicados com igual probabilidade, e a migração seja aplicada a 5% do tempo. Depois da aplicação de 100.000

operadores genéticos o algoritmo termina, produzindo o ancoramento de maior escore [JONES *et al.*, 1997].

#### **v. Extensões ao algoritmo**

Para que o programa tenha a capacidade de gerar melhores modos de predição, para uma ampla variedade de complexos ligante-proteína várias extensões foram feitas ao algoritmo básico descrito acima. Dentre estas extensões, encontram-se [JONES *et al.*, 1997]:

- **Íons metálicos:** um grande número de interações ligante-proteína observados envolvem coordenações de íons metálicos. Para predizer estes modos de ligação, geometrias comuns de íons metálicos foram incorporadas ao programa;
- **Modelos de pequenos ligantes:** se um ligante possui menos que 3 átomos doadores ou aceptores de ligações de hidrogênio, o atracamento pelos métodos descritos acima não será possível. Adicionalmente, o atracamento será incerto se o ligante possuir um pequeno número de grupamentos polares, especialmente pela possibilidade destes grupamentos estarem solvatados, na realidade. Para estes casos o programa possui uma codificação alternativa para o atracamento.
- **Flexibilidade de ligantes cíclicos:** como conformações bioativas com formas cíclicas são dotadas de certa incerteza, e determinados átomos presentes nestes anéis podem ser desconfigurados em sua geometria durante o atracamento, fazendo com que a complexidade do atracamento seja aumentada, a possibilidade destes átomos em sair da configuração normal de um anel foi “desligada” no programa. Mas se for de interesse do usuário que esta flexibilidade seja considerada, esta opção se faz disponível.
- **Inibidores ligados covalentemente:** uma modificação no algoritmo é requerida para atracar inibidores covalentemente. Ao usuário é requerido selecionar a ligação covalente como uma opção, e informar ao programa os átomos do ligante e proteína que devem ser ligados um ao outro covalentemente. Com isto os átomos informados não serão desligados durante o atracamento.

#### **4.1.4. Métodos quânticos — equação de Schrödinger**

Quando existe o interesse na descrição da distribuição eletrônica de determinados átomos, moléculas ou sistemas mais complexos com detalhes, como para o estudo de reações em que ligações são formadas e/ou quebradas, o método mais adequado envolve a mecânica

quântica (QM). Elétrons são partículas extremamente leves, que não podem ser descritas por métodos clássicos, como a MM. A QM descreve as moléculas em função da relação entre núcleos e elétrons, levando em conta a dualidade partícula-onda da matéria, permitindo assim que ao invés de se deslocar ao longo de uma trajetória perfeitamente definida, uma partícula se distribua no espaço como uma onda, que na QM substitui o conceito clássico de trajetória e é definida pela função de onda,  $\psi$  (psi) [ATKINS & PAULA, 2004; JENSEN, 1999].

Cálculos da química quântica, embora significativamente mais exigentes do ponto de vista computacional, são rotineiramente utilizados, pois permitem obter resultados quantitativos da termodinâmica e cinética molecular, propriedades de estados de transição, estabilidade relativa de moléculas e mecanismos de reações químicas sem as aproximações drásticas da MM. Nesta metodologia, a descrição das moléculas é dada pelas interações entre os núcleos e elétrons e a geometria molecular é dada pelos arranjos de energia mínima dos núcleos. Os métodos da QM se reportam à equação de Schrödinger, proposta pelo cientista de mesmo nome em 1926 para a determinação da função de onda de um sistema (**equação 4**), que no caso particular do átomo de hidrogênio (próton de massa infinita) tem solução exata [ATKINS & PAULA, 2004].

$$\left[ \frac{-h^2}{8\pi^2m} \nabla^2 - \frac{Ze^2}{r} \right] \Psi(x, y, z) = E\Psi(x, y, z) \quad (4)$$

O termo entre colchetes representa a soma dos operadores energia cinética e potencial de um elétron de massa  $m$  a uma distância  $r$  do núcleo de carga  $Z$ .  $h$  é a constante de Planck e  $(e)$  a carga do elétron.  $E$  é a energia total do elétron e  $\psi$  a função de onda que descreve o seu movimento. No operador energia cinética,  $\nabla^2$  é a abreviação descrita na **equação 5**:

$$\nabla^2 = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \quad (5)$$

A equação de Schrödinger pode ser descrita como dependente ou independente do tempo. Para a realização de cálculos quânticos semi-empíricos, é escolhida a forma independente do tempo, por se tratar de cálculos de estados estacionários de sistemas moleculares [SILVA, 2005].

#### 4.1.5. A interpretação de Born

De acordo com Max Born, quando a função de onda  $\psi$  em um ponto  $r$  é multiplicada pelo seu complexo conjugado  $\psi^*$ , obtém-se a densidade da probabilidade ( $\rho$ ) de se encontrar a partícula neste determinado ponto no espaço [ATKINS & PAULA, 2004; ROGERS, 2003].

A interpretação de Born afasta dificuldades sobre o significado de valores negativos (ou complexos) de  $\psi$ , pois  $\psi^*\psi$  é sempre real e nunca negativo. Mas impõe algumas restrições, visto que a função de onda deve ser sempre contínua, ter derivada primeira contínua, ser unívoca e finita em todos os pontos do seu domínio. Isto implica na quantização da energia da partícula [SILVA, 2005; LEACH, 2001].

Se a probabilidade for integrada em todo o espaço  $\tau$ , então o resultado deve ser 1, conforme a **equação 6** [LEACH, 2001]:

$$\int \psi^* \psi d\tau = 1 \quad (6)$$

onde  $d\tau$  indica sua integração com todo o espaço, que em três dimensões possui o significado  $d\tau = dx dy dz$ . Nesta situação, a integração se faz sobre todo espaço acessível à partícula. Funções de onda que satisfaçam estas condições são ditas “normalizadas” [ATKINS & PAULA, 2004]. As soluções da equação de Schrödinger são ortonormais (**equação 7**), ou seja:

$$\int \psi_m^* \psi_n d\tau = \delta_{mn} = \begin{cases} 0 & \text{se } m \neq n \\ 1 & \text{se } m = n \end{cases} \quad (7)$$

onde  $\delta_{mn}$  é o delta de Kronecker, usado como uma forma conveniente para expressar a ortonormalidade de diferentes funções de onda e as condições de normalização.

Pode-se generalizar a equação de Schrödinger para um sistema multinuclear e multieletrônico, como uma forma sistemática (e compacta) para a extração de informações das funções de onda (**equação 8**) [ROGERS, 2003]:

$$\hat{H}\psi = E\psi \quad (8)$$

onde agora a função de onda é multieletrônica e  $\hat{H}$  é o operador hamiltoniano, isto é, símbolo das operações matemáticas que se devem efetuar sobre  $\psi$ , assim denominado em homenagem ao matemático William Hamilton, do século XIX. Para resolver esta equação, é necessário



calcular os valores de  $E$  e  $\psi$  de forma que a função de onda retorne a própria função de onda multiplicada pela energia — isto faz com que a equação de Schrödinger pertença à categoria das equações parciais diferenciais de autovalor, em que um operador age na função (autofunção) e retorna a função multiplicada por um escalar (autovalor) [OLIVEIRA, 2005; LEACH, 2001]. Para um sistema constituído de vários átomos, o operador hamiltoniano possui a forma (**equação 9**):

$$\hat{H} = \frac{-\hbar^2}{8\pi^2} \sum_A \frac{1}{M_A} \nabla_A^2 - \frac{-\hbar^2}{8\pi^2 m} \sum_a \nabla_a^2 - e^2 \sum_A \sum_a \frac{Z_A}{r_{Aa}} + e^2 \sum_{A>} \sum_B \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} + e^2 \sum_{a>} \sum_b \frac{1}{r_{ab}} \quad (9)$$

Os dois primeiros termos descrevem a energia cinética dos núcleos ( $A$ ), e dos elétrons ( $a$ ), respectivamente. Os três termos restantes referem-se às interações Coulombianas entre partículas.  $M$  é a massa nuclear e  $R_{AB}$ ,  $r_{ab}$  e  $r_{Aa}$  são distâncias que separam núcleos, elétrons, e elétrons e núcleos respectivamente.

Uma segunda complicação com espécies multieletrônicas diz respeito ao spin. Spin é caracterizado pelo número quântico  $s$ , sendo um efeito puramente relativístico. Como a equação de Schrödinger é não-relativística, inclusões adicionais que computem tal efeito na forma de função de onda devem ser feitas [SILVA, 2005].

Se as soluções para tais equações são geradas sem referência alguma a parâmetros determinados experimentalmente, os métodos são usualmente denominados *ab initio* (que em latim significa “do início”), em contraste aos modelos semi-empíricos, parametrizados experimentalmente, que serão descritos no item 4.1.11.

Devido à grande complexidade para a resolução da equação de Schrödinger, mesmo para sistemas simples, torna-se necessário introduzir aproximações, para aplicações práticas de tal equação. Todos estes problemas envolvem a imposição de restrições sobre as soluções, ou condições de contorno. Deste modo, aproximações devem ser feitas para se obter a resolução do problema [JENSEN, 1999].

#### 4.1.6. Aproximação de Born-Oppenheimer

Foi colocado anteriormente que a equação de Schrödinger não pode ser resolvida exatamente para qualquer sistema com mais de duas partículas, como as moléculas. Uma primeira forma de simplificá-la, é assumir a imobilidade dos núcleos atômicos. Em 1927, Max Born e J. Robert Oppenheimer mostraram que pelo fato da massa nuclear ser várias

vezes maior que a massa dos elétrons, e pelo fato dos elétrons se moverem muito mais rápido que os núcleos, os elétrons deveriam se ajustar de forma praticamente instantânea a qualquer mudança de posição nuclear. Esta aproximação é conhecida como aproximação de Born-Oppenheimer, que permite separar a equação de Schrödinger em duas: uma parte eletrônica e outra parte nuclear. Ou seja, a função de onda total para uma molécula pode ser descrita da seguinte forma (**equação 10**) [LEACH, 2001; LEVINE, 1995]:

$$\psi_{tot}(núcleos, elétrons) = \psi(e elétrons) \psi(núcleos) \quad (10)$$

A energia total é igual à soma da energia nuclear (a repulsão eletrostática entre as partículas positivas do núcleo) e a energia eletrônica. A equação de Schrödinger “eletrônica” possui a forma colocada a seguir (**equação 11 e 12**), com dependência na posição dos núcleos:

$$\hat{H}^{el} \psi^{el} = E^{el} \psi^{el} \quad (11)$$

$$\hat{H} = \frac{-\hbar^2}{8\pi^2 m} \sum_a^{el\acute{e}tron} \nabla_a^2 - e^2 \sum_A^{núcleo} \sum_a^{el\acute{e}tron} \frac{Z_A}{r_{Aa}} + e^2 \sum_{a>}^{el\acute{e}tron} \sum_b^{el\acute{e}tron} \frac{1}{r_{ab}} \quad (12)$$

onde  $r_{Aa}$  é a distância entre o núcleo  $A$  e o elétron  $a$  e  $r_{ab}$  a distância entre dois elétrons  $a$  e  $b$ . Para cada configuração considerada, a equação de Schrödinger é resolvida para os elétrons, considerando que estes se encontram nos campos produzidos pelos núcleos. O termo que descreve a energia cinética nuclear está ausente, já que os núcleos estão parados no espaço, e é necessário que o termo de interação coulombiano entre núcleos seja adicionado à energia eletrônica  $E^{el}$ , para produzir a energia total  $E$  do sistema de forma satisfatória (**equação 13**) [LEVINE, 1995]:

$$E = E^{el} + e^2 \sum_{A>}^{núcleo} \sum_B^{núcleo} \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (13)$$

Nota-se que não há referência à massa nuclear na equação de Schrödinger “eletrônica”. Este fato se deve à superfície de energia potencial (“*potencial energy surface*”, ou PES), que compreende uma solução à equação de Schrödinger “eletrônica” e independente da massa nuclear (ou seja, é igual para moléculas isotópicas). Mesmo com a aproximação de Born-Oppenheimer, a equação ainda não é resolvida analiticamente para sistemas com mais que um elétron, sendo necessárias ainda outras aproximações [SILVA, 2005; LEACH, 2001; JENSEN, 1999].

#### 4.1.7. O determinante de Slater

A equação de Schrödinger “eletrônica” não admite soluções exatas devido às complexas interações intereletrônicas. Com isso, deve-se recorrer a uma solução aproximada para um sistema de muitos elétrons. Em uma dessas aproximações, assume-se que os elétrons do sistema serão descritos por uma combinação de funções de onda de um elétron e estendidas por toda a molécula. Esta função é usualmente chamada de orbital molecular (OM), sendo denotada por  $\varphi_i^\mu$  (**equação 14**) [ROGERS, 2003]:

$$\varphi_i^\mu = \varphi_i(x^\mu, y^\mu, z^\mu) \quad (14)$$

onde  $\mu$  designa certo elétron com coordenadas  $x^\mu, y^\mu$  e  $z^\mu$ , e o índice  $i$  designa os vários orbitais moleculares.

Em um tratamento mais rigoroso devemos impor que, em adição às coordenadas espaciais (cartesianas), por negligenciar efeitos relativísticos, a função de onda de um elétron contenha também as coordenadas de spin do referido elétron. A função assim construída é então chamada de spin-orbital molecular (SOM), sendo denotada por  $\chi_k(\mu)$  (**equação 15**).

$$\chi_k(\mu) = \varphi_i(x^\mu, y^\mu, z^\mu) \eta_k(S^\mu) \quad (15)$$

$$\text{onde } \eta_k(S^\mu) = \begin{cases} \alpha^\mu & \uparrow \\ \beta^\mu & \downarrow \end{cases}$$

e o índice  $k$  designa diferentes spins moleculares. As funções de spin são denotadas por  $\alpha$  e  $\beta$ , e obedecem às condições de ortonormalidade [JENSEN, 1999].

A função de onda eletrônica total para uma molécula com  $N$  elétrons em  $N$  spin-orbitais é então construída como um produto anti-simétrico dos spin-orbitais moleculares (SOM) de forma a satisfazer o Princípio de Exclusão de Pauli (dois elétrons não podem ter todos os números quânticos iguais). A anti-simetria da função de onda pode ser alcançada através da sua construção a partir dos determinantes de Slater (“*Slater determinants*”, ou SDs), conforme a **equação 16** [LEACH, 2001]:

$$\psi = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \chi_1(1) & \chi_2(1) & \cdots & \chi_N(1) \\ \chi_1(2) & \chi_2(2) & \cdots & \chi_N(2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \chi_1(N) & \chi_2(N) & \cdots & \chi_N(N) \end{vmatrix} \quad (16)$$

Esta forma funcional é a mais simples para uma função de onda orbital que satisfaça o princípio da anti-simetria. O SD é uma forma conveniente e concisa devido às propriedades especiais dos determinantes. As colunas representam funções de onda de elétrons únicos ou orbitais, enquanto as coordenadas eletrônicas se encontram ao longo das linhas. Trocando quaisquer duas colunas de um determinante, um processo que corresponde à troca de dois elétrons, troca-se o sinal do determinante preservando a propriedade anti-simétrica, pré-requisito indispensável para funções de onda de sistemas multieletrônicos. Se duas colunas são idênticas, correspondendo a dois elétrons de mesmo spin-orbital, o determinante é nulo. [LEACH, 2001; JENSEN, 1999].

#### 4.1.8. As equações de Hartree-Fock

Esta simplificação da equação de Schrödinger envolve a separação das variáveis, ou seja, a função de onda de vários elétrons é substituída por um produto de funções de onda de um elétron. A aproximação mais simples, denominada Hartree-Fock, envolve o uso de um único determinante de produtos das funções de um elétron, os spin-orbitais (ou orbitais de spin). Cada spin-orbital é descrito como um produto de um termo espacial,  $\psi$ , função das coordenadas de um único elétron e referida como um orbital molecular, e um termo de spin,  $\alpha$  ou  $\beta$ , conforme descrito no item anterior. [OLIVEIRA, 2005; ANTUNES *et al.*, 1999].

As equações de Hartree-Fock são obtidas impondo, para uma determinada função de onda, que a energia é sujeita à restrição de que os SOMs permaneçam ortonormais entre si. A condição de ortonormalidade é escrita em termos da integral de sobreposição,  $S_{ij}$ , entre os orbitais  $i$  e  $j$  (**equação 17**) [LEACH, 2001; JENSEN, 1999]:

$$S_{ij} = \int \chi_i \chi_j d\tau = \delta_{ij} \quad (17)$$

A maior diferença entre sistemas multieletrônicos e monoelétrônicos é a presença das interações entre elétrons. O que se deseja é obter a função de onda de menor energia para um sistema multieletrônico mantendo a formulação orbital (SOM individual). O problema então é achar uma solução que simultaneamente englobe todos os movimentos eletrônicos, bem como o efeito que um elétron em um SOM exerce no comportamento de outro elétron em outro SOM, devido a estes movimentos eletrônicos [ROGERS, 2003].

De acordo com o teorema variacional, a energia calculada a partir de uma forma aproximada para a função de onda verdadeira será sempre maior que a energia verdadeira. Consequentemente, quanto melhor a função de onda, menor de energia.

No mínimo, a primeira derivada da energia,  $\delta E$ , será igual a zero. A aproximação de Hartree-Fock leva ao grupo de equações diferenciais acopladas (chamadas de equações de Hartree-Fock), considerando um elétron no SOM  $\chi_i$  no campo dos núcleos e dos outros elétrons em seus SOMs fixos  $\chi_j$  (**equação 18**) [LEACH, 2001]:

$$f_i \chi_i = \sum_j \epsilon_{ij} \chi_j \quad (18)$$

onde  $f_i$  é chamado operador de Fock, um hamiltoniano efetivo unieletrônico para um elétron do sistema multieletrônico, que depende do próprio orbital  $\chi_i$  e assume-se como se cada elétron se “movesse” num campo fixo, provocado pelos núcleos e demais elétrons. Ao resolver estas equações obtém-se o conjunto de funções  $\chi_i$ , e por sua vez a energia do estado eletrônico para cada geometria nuclear [ANTUNES *et al.*, 1999].

A estratégia de resolução das equações de Hartree-Fock é chamada método do campo auto-consistente (SCF), que pode ser demonstrado pelo algoritmo abaixo:

- 1- Arbitra-se um conjunto  $\chi_i$ ;
- 2- Com este conjunto, calcula-se o operador de Fock;
- 3- Resolve-se as equações de Hartree-Fock;
- 4- Novo conjunto  $\chi_i$  é obtido, recomeça-se do passo 2.

O método SCF é iterativo, ao prosseguir refinando as soluções  $\chi_i$ , com a energia eletrônica total se reduzindo até que a diferença entre dois ciclos não mude segundo um critério de convergência pré-estabelecido, alcançando-se a auto-consistência [SILVA, 2005].

#### **4.1.9. Combinação linear dos orbitais atômicos (LCAO)**

As equações de Hartree-Fock não são convenientes do ponto de vista prático para moléculas, e por tal motivo, Roothan propôs que os orbitais de Hartree-Fock fossem representados como uma combinação linear dos orbitais atômicos puros (LCAO — “*Linear Combination of Atomic Orbital*”), que compreende uma combinação de um grupo de funções conhecidas, denominadas funções de base (**equação 19**) [LEVINE, 2000]:

$$\Psi_i = \sum_{v=1}^K c_{vi} \phi_v \quad (19)$$

Os orbitais  $\phi_v$  (as funções de base) correspondem aos orbitais atômicos. Esta proposta vem da noção de que nas proximidades de cada núcleo da molécula, as soluções de um elétron vão ser semelhantes às soluções de um átomo hidrogenóide (monoeletrônico). Para a **equação 19**, existem  $K$  funções de base  $\phi_v$  (nem todos os orbitais estão ocupados por elétrons), completando um total de  $K$  orbitais moleculares  $\Psi_i$ . O menor número de funções de base será aquele que possui a capacidade de acomodar todos os elétrons de um sistema molecular, denominado conjunto de bases mínimo [LEACH, 2001]. Funções de base adicionais são acrescentadas para melhorar a qualidade da representação dos elétrons, como é o caso dos conjuntos de bases com funções difusas e de polarização.

Para um dado conjunto de bases e um dado determinante de Slater, o melhor conjunto de coeficientes é aquele para o qual a energia é mínima para todos os  $c_{vi}$  (**equação 20**):

$$\frac{\partial E}{\partial c_{vi}} = 0 \quad (20)$$

O objetivo é então determinar o conjunto de coeficientes que proporciona a menor energia para o sistema em questão [LEACH, 2001].

#### 4.1.10. A Aproximação semi-empírica

Os métodos quanto-mecânicos podem ser classificados como semi-empíricos ou *ab initio*. Um cálculo *ab initio* utiliza o hamiltoniano molecular verdadeiro, sem base em valores determinados experimentalmente. O método Hartree-Fock calcula o produto anti-simétrico  $\Phi$  de spin-orbitais que minimizam a integral variacional, usando o hamiltoniano real. O método de cálculo Hartree-Fock constitui um método *ab initio*, como um cálculo do tipo SCF que fornece apenas uma aproximação à função de onda Hartree-Fock, pelo tamanho limitado do conjunto de bases. Pela forma restrita da  $\Phi$ , o método Hartree-Fock não fornece a função de onda real [LEVINE, 1995].

A maior parte do tempo gasto para realizar um cálculo como o colocado acima é utilizado no cálculo de integrais, já que a equação de Schrödinger é uma equação diferencial e sua solução requer integração. Para reduzir o trabalho computacional e o gasto de tempo, algumas destas integrais podem ser negligenciadas ou aproximadas [OLIVEIRA, 2005]. Os

métodos semi-empíricos utilizam um hamiltoniano mais simples que o verdadeiro, usando dados empíricos (determinados experimentalmente) para assumir os valores de algumas integrais do cálculo. Os elétrons de camadas atômicas mais internas são tratados como um “caroço congelado”, considerando no cálculo apenas os elétrons pertencentes à camada de valência, visto que são estes os elétrons que participam mais efetivamente nas ligações químicas [ROGERS, 2003; LEACH, 2001]. Além disso, nos cálculos com métodos semi-empíricos é usado o conjunto de bases mínimo.

A razão para se usar métodos semi-empíricos reside no fato de que cálculos *ab initio* de grande acurácia, em moléculas razoavelmente grandes, são de difícil realização. Os métodos semi-empíricos foram desenvolvidos originalmente para moléculas orgânicas conjugadas, mas atualmente enquadram praticamente todos os tipos de moléculas. Boas estimativas de valores de entalpias de formação ( $\Delta H_f^\circ$ ) em fase gasosa são possíveis através da escolha de um hamiltoniano adequado (*vide* próximo item). Embora não seja tão preciso quanto o método *ab initio*, o método semi-empírico é capaz de calcular propriedades químicas e físicas de moléculas e sistemas muito maiores, visto que os cálculos *ab initio* geralmente levam  $10^3$  vezes mais tempo que os semi-empíricos para uma mesma molécula. Cálculos *ab initio* são, em geral, restritos a moléculas que contenham algumas dezenas de átomos, enquanto os semi-empíricos pode proceder com cálculos de propriedades de sistemas contendo milhares de átomos [OLIVEIRA, 2005; LEACH, 2001; LEVINE, 1995].

Uma comparação foi feita por J. J. P. Stewart (2004) entre cálculos semi-empíricos (MNDO, AM1, PM3 e PM5) e a teoria do funcional de densidade (DFT), para a predição de calores de formação de vários sistemas moleculares. Os valores obtidos através da utilização das duas metodologias de cálculo foi comparado com valores determinados experimentalmente. O erro médio dos métodos PM3 (5,36 kcal/mol) e PM5 (5,03 kcal/mol) foi comparável ao dos métodos DFT B88-LYP(DZVP) (5,25 kcal/mol) e B88-PW91(DZVP) (5,22 kcal/mol) [STEWART, 2004]. No ano de 2007, J. J. P. Stewart publicou um trabalho sobre um novo método semi-empírico (PM6), contendo parâmetros também para os metais de transição [STEWART, 2007]. Além disso, o novo método mostrou-se superior que outros na determinação de valores de  $\Delta H_f$  em um sub-conjunto de 1.373 compostos contendo os elementos H, C, N, O, F, P, S, Cl e Br; o erro médio de  $\Delta H_f$  do método PM6 foi de 4,4 kcal/mol, enquanto o erro equivalente de outros métodos foi: RM1: 5,0, B3LYP 6-31G\*: 5,2, PM5: 5,7, PM3: 6,3, HF 6-31G\*: 7,4 e AM1: 10,0 kcal/mol. Uma breve descrição de alguns dos métodos semi-empíricos é apresentada a seguir.

#### 4.1.11. Métodos semi-empíricos

Muitos métodos semi-empíricos foram desenvolvidos; estes incluem o CNDO [POPLE & SEGAL, 1965], INDO [POPLE *et al.*, 1965], MINDO [DEWAR & WEINER, 1972; BINGHAM *et al.*, 1975], MNDO [DEWAR & THIEL, 1977], AM1 [DEWAR *et al.*, 1985], PM3 [STEWART, 1989a, b, 1991], SAM1 [DEWAR *et al.*, 1993], RM1 [ROCHA *et al.*, 2006], além do método mais recente, o PM6 [STEWART, 2007], dentre outros.

A abordagem semi-empírica desenvolvida por Pople e colaboradores na década de 1960 resultou nos métodos CNDO (do inglês “*Complete neglect of differential overlap*” ou Negligência completa das integrais de sobreposição) e INDO (do inglês “*Intermediate neglect of differential overlap*” ou Negligência intermediária das diferenciais de sobreposição), [POPLE & SEGAL, 1965; POPLE *et al.*, 1965]. Os nomes indicam a natureza das aproximações feitas nas teorias. Estes métodos são aplicáveis às moléculas conjugadas e não conjugadas, possuindo uma acurácia razoável em relação às geometrias moleculares, porém momentos de dipolo pobres e energias de ionização não confiáveis.

O método MINDO (“*modified INDO*”, ou INDO modificado) [DEWAR & WEINER, 1972; BINGHAM *et al.*, 1975] foi desenvolvido por Dewar e colaboradores de 1969 a 1975 e envolveu várias versões, dentre elas MINDO/1, MINDO/2, MINDO/2' e MINDO/3. Seu objetivo era obter geometrias moleculares e energias de dissociação de maior acurácia que a anterior.

Pelas várias deficiências do método MINDO, uma teoria melhorada, a MNDO (do inglês “*Modified Neglect of Diatomic Overlap*” ou negligência modificada das sobreposições diatômicas) foi desenvolvida por Dewar e Thiel em 1977. MNDO faz menores aproximações, quando comparada à MINDO/3, mas a sua principal vantagem relação aos métodos mais novos consiste nos valores dos parâmetros, que foram otimizados para reproduzir propriedades moleculares, e não apenas atômicas, como vinha acontecendo. Infelizmente, várias limitações foram encontradas, dentre elas a falta total de ligações de hidrogênio, de importância vital para quaisquer sistemas [STEWART, 2007].

Uma melhoria à teoria MNDO consiste no método AM1 (modelo de Austin 1, ou “*Austin model I*”). O nome se refere à Universidade do Texas em Austin (EUA), onde o método foi desenvolvido [DEWAR *et al.*, 1985]. O método não fornece valores exatos para a diferenciação de confôrmeros, mas geralmente prevê qual deles é o mais estável, pela adição de uma função gaussiana estabilizadora às interações núcleo-núcleo para representar a ligação de hidrogênio, o que não é possível com os métodos MNDO e MINDO/3. Com isto, pela



primeira vez métodos NDDO possuem uma boa, embora limitada, modelagem para ligações de hidrogênio [STEWART, 2007].

Em 1989, J. J. P. Stewart melhorou as técnicas de parametrização e publicou o PM3 (do inglês *Parameterized Model 3* ou modelo parametrizado 3), que fornece menor faixa de erros que o AM1, principalmente para parâmetros como as entalpias de formação ( $\Delta H_f$ ), sendo por isso considerado o melhor método, dentre os mencionados anteriormente. Combinando-se os valores experimentais dos calores de formação dos átomos determinados em 25°C, obtêm-se o  $\Delta H_{f,298}^o$ , ou seja, o calor de formação do composto em fase gasosa a 298 K. Para uma amostra de 713 compostos, a média absoluta de erros nos valores de  $\Delta H_{f,298}^o$  é de 22 kcal/mol para MNDO, 14 kcal/mol para AM1 e 8 kcal/mol para PM3 [ROCHA *et al.*, 2006; STEWART, 1990].

SAM1 (Método *ab initio* semi-empírico 1, ou “*Semiempirical ab initio Method 1*”) [DEWAR *et al.*, 1993] é uma versão melhorada de AM1. O método SAM1 calcula integrais de repulsão entre os elétrons de forma bastante adequada, enquanto os métodos MINDO, MNDO, AM1 e PM3 estimam estas integrais usando uma fórmula simples que envolve parâmetros cujos valores foram escolhidos por fornecer bons resultados em moléculas utilizadas como teste. No entanto, SAM1 requer um tempo de cálculo computacional maior que os outros métodos semi-empíricos citados, mesmo sendo mais rápido que cálculos *ab initio*, visto que algumas integrais que dizem respeito à repulsão entre os elétrons são negligenciadas [LEVINE, 1995].

Até o ano de 2004, o método PM3 [STEWART, 1989a,b] contou com a parametrização para diversos átomos (37 elementos), principalmente os mais utilizados em química/bioquímica (considerado por Stewart os “principais átomos”), sendo capaz de acrescentar todos os grupos principais, junto a 3 metais de transição (Zn, Cd, Hg), o que fez com que este método ficasse ainda mais completo [STEWART, 1990,1991,2004]. O modelo resultante, PM5, possui uma média de erros 40% menor que os outros métodos semi-empíricos para todos os 37 elementos. Entretanto, o método PM5 não foi publicado, estando disponível apenas em programas comerciais que contenham o MOPAC (Fujitsu, Co.) [ROCHA *et al.*, 2006].

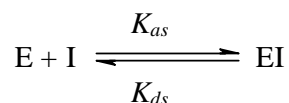
O método AM1 [DEWAR *et al.*, 1985] está presente em inúmeros programas comerciais e não-comerciais para cálculos quânticos. Há outros métodos semi-empíricos e modelos disponíveis que podem ter ainda mais acurácia. Entretanto, não foram parametrizados para vários elementos, ou ainda não foram amplamente distribuídos como os

métodos AM1 e PM3. Por este motivo, no ano de 2006, a equipe de Gerd B. Rocha, na Universidade Federal de Pernambuco, realizou a reparametrização do método AM1 que, por analogia, foi denominada método RM1 (Modelo de Recife 1, ou “*Recife Model 1*”). Por ser uma reparametrização, o método RM1 possui a mesma estrutura matemática e qualidades do AM1, mas com significativa melhoria de sua acurácia quantitativa, graças à ajuda dos computadores atuais e técnicas mais avançadas disponíveis para otimização não-linear [ROCHA *et al.*, 2006].

Métodos como o RM1 foram criados para fazer com que as parametrizações fossem ainda mais seguras e corretas, fazendo com que os resultados dos cálculos fiquem cada vez mais próximos dos valores reais. O mais novo desses métodos é o PM6 [STEWART, 2007], criado para: (i) investigar a incorporação de algumas modificações às aproximações nos termos de interação caroço-caroço dos métodos anteriores; (ii) promover uma parametrização global de todos os componentes do elemento representativo, totalizando 70 elementos (e não somente os principais), com ênfase nos de uso em bioquímica; e (iii) estender a metodologia realizando uma otimização restrita de parâmetros para metais de transição. O termo PM6 foi escolhido para evitar confusões com outros métodos não publicados, PM4 e PM5 [STEWART, 2007].

#### 4.2.12. Energia de interação

Esquemáticamente, a interação entre a enzima (E) e o inibidor (I) pode ser dada pelo seguinte equilíbrio:



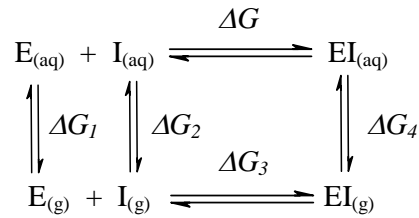
onde EI representa o complexo enzima-inibidor,  $K_{as}$ , a constante de associação do complexo (definida pela relação **21** abaixo), e  $K_{ds}$ , a constante de dissociação do complexo, ou seja, o inverso de  $K_{as}$  [OLIVEIRA, 2005].

$$K_{as} = \frac{[EI]}{[E][I]} \quad (21)$$

Estas constantes se relacionam com a variação de energia livre ( $\Delta G$ ) da reação de acordo com a equação a seguir (**22**):

$$\Delta G = -RT \ln K_{as} = RT \ln K_{ds} \quad (22)$$

Em relação à inibição enzimática, a constante de dissociação pode ser denominada  $K_i$  (constante de inibição enzimática [CHENG & PRUSOFF, 1973]), substituindo o termo  $K_{ds}$  na equação acima. A referida reação enzimática ocorre em meio aquoso, visto que a biofase é composta por mais de 60% de água; a variação da energia livre  $\Delta G$  em água pode ser dividida, conceitualmente, nas etapas representadas a seguir [WANG *et al.*, 1994b]:



Desta forma, a variação de energia livre total do sistema é representada pela soma das energias livres das etapas colocadas acima ( $\Delta G = \Delta G_1 + \Delta G_2 + \Delta G_3 + \Delta G_4$ ); substituindo na **equação 22** [WANG *et al.*, 1994b; OLIVEIRA *et al.*, 2006; OLIVEIRA, 2005]:

$$RT \ln K_i = \Delta G_1 + \Delta G_2 + \Delta G_3 + \Delta G_4 \quad (23)$$

Assumindo-se pesquisas de conjuntos de inibidores enzimáticos (um modelo teórico de inibição), vários compostos serão avaliados frente a uma mesma enzima. De acordo com Wang e colaboradores (1994b), a **equação 23** pode ser usada para determinar constantes relativas. Caso sejam considerados dois inibidores em avaliação (A e B), a equação anterior é colocada como:

$$RT(\ln K_i^A - \ln K_i^B) = (\Delta G_1^A - \Delta G_1^B) + (\Delta G_2^A - \Delta G_2^B) + (\Delta G_3^A - \Delta G_3^B) + (\Delta G_4^A - \Delta G_4^B) \quad (24)$$

O primeiro termo do lado direito da correlação é nulo, pois envolve apenas a enzima e, portanto,  $\Delta G_1^A = \Delta G_1^B$ . Dada a diferença de tamanho entre o ligante e o receptor, o termo  $\Delta G_4$  é determinado essencialmente pela estrutura do receptor, ou seja,  $\Delta G_4^A \approx \Delta G_4^B$  [OLIVEIRA, 2005; WANG *et al.*, 1994b]. A **equação 24** pode então ser simplificada a:

$$RT(\ln K_i^A - \ln K_i^B) = (\Delta G_2^A - \Delta G_2^B) + (\Delta G_3^A - \Delta G_3^B) \quad (25)$$

Como a energia livre de Gibbs é definida por termos entrópicos e entálpicos, com influência da temperatura no sistema, o termo  $\Delta G_3$  pode ser subdividido em:

$$\Delta G_3^A - \Delta G_3^B = (\Delta H_3^A - \Delta H_3^B) - T(\Delta S_3^A - \Delta S_3^B) \quad (26)$$

Substituindo-se na **equação 25**, obtém-se a equação:

$$RT(\ln K_i^A - \ln K_i^B) = (\Delta G_2^A - \Delta G_2^B) + (\Delta H_3^A - \Delta H_3^B) - T(\Delta S_3^A - \Delta S_3^B) \quad (27)$$

Se uma das constantes ( $K_i^A$  ou  $K_i^B$ ) for determinada experimentalmente ou conhecida, a outra constante poderá ser determinada a partir de dados teóricos, como demonstra a **equação 28** a seguir:

$$RT \ln K_i^A = [(\Delta G_2^A - \Delta G_2^B) + (\Delta H_3^A - T\Delta S_3^A)] - [(\Delta H_3^B - T\Delta S_3^B) - RT \ln K_i^B] \quad (28)$$

O segundo termo do lado direito da **equação 28** corresponde a uma constante, fazendo com que  $\ln K_i^A$  dependa do primeiro termo, linearmente. O termo entálpico ( $\Delta H_3^A$ ) que corresponde à interação enzima/inibidor em fase gasosa, pode ser calculado diretamente por vários métodos. O método semi-empírico constitui um excelente método para cálculo de entalpias de formação, conforme explicado no item 4.1.11; por ser baseado na determinação da distribuição eletrônica ao redor dos núcleos atômicos, com a escolha do hamiltoniano adequado, permite a avaliação das ligações químicas que determinam a estrutura molecular do ligante, assim como as interações intermoleculares entre ligante/biomacromolécula, e de forma rápida o suficiente para ser aplicado a sistemas com centenas de átomos, como os sistemas protéicos e enzimáticos [OLIVEIRA *et al.*, 2006; OLIVEIRA, 2005].

As perdas entrópicas envolvidas na associação em fase gasosa entre a enzima e o inibidor devem-se principalmente a restrições impostas à translação, rotação e às perdas causadas pela imobilização de ligações com rotação livre do inibidor, em solução. Como as perdas translacionais e rotacionais devem ser aproximadamente as mesmas para inibidores com estruturas similares, a mudança entrópica  $\Delta S_3$  seria proporcional ao número de ligações com rotação livre ( $N_{LR}$ ) dos inibidores que seriam imobilizadas pela interação inibidor/enzima, imobilização esta que corresponde à perda de liberdade conformacional [OLIVEIRA, 2005; SEARLE & WILLIAMS, 1992; SEARLE *et al.*, 1992].

Conforme representado no esquema, o termo  $\Delta G_2$  diz respeito à transferência dos inibidores avaliados do meio aquoso para o meio gasoso, representando a variação na energia livre neste transporte, valor este representado pela energia livre de solvatação,  $\Delta G_{solv}$ .

Aplicando as considerações aqui colocadas aos modelos matemáticos apresentados, uma correlação entre os termos  $K_i$ ,  $\Delta H_3$ ,  $\Delta G_{solv}$  e  $N_{LR}$  foi proposta por Oliveira (2005):

$$RT \ln K_i = c_1(\Delta G_{solv} + c_2)^2 + c_3\Delta H_3 + c_4N_{LR} + c_5 \quad (29)$$

onde os coeficientes  $c_1$ - $c_5$  são obtidos ajustando-se a **equação 29** acima aos valores experimentais de  $K_i$  por regressão múltipla.

O termo entálpico foi neste trabalho renomeado de  $\Delta H_3$  para  $\Delta H_{int}$ , onde  $\Delta H_{int}$  constitui a entalpia de interação entre os componentes do complexo ligante-sítio ativo, determinada através da equação:

$$\Delta H_{int} = \Delta H_{cpx} - (\Delta H_{sa} + \Delta H_{lig}) \quad (30)$$

sendo o termo  $\Delta H_{cpx}$  correspondente à entalpia calculada para o complexo enzima/inibidor; o termo  $\Delta H_{sa}$ , a entalpia calculada para o sítio ativo enzimático vazio, sem inibidor algum; e o termo  $\Delta H_{lig}$ , a entalpia de formação do inibidor, todos em fase gasosa.

## 4.2. Estratégia Geral

Para elucidar os possíveis mecanismos de inibição das enzimas NOS e TR pelas amidinas e mesoiônicos, buscou-se desenvolver modelos de inibição capazes de prever as interações proteína-ligante importantes para o processo. A estratégia adotada foi dividida em duas frentes:

### *i. Inibição da NOS:*

Este trabalho será constituído das seguintes etapas:

- Construção de um modelo de inibição para a enzima NOS por substâncias de atividade conhecida e comprovada experimentalmente (compostos pterínicos). O trabalho foi iniciado a partir de uma estrutura cristalográfica contendo um inibidor co-cristalizado, que

foi usado como base para construção das estruturas dos demais complexos. As estruturas dos complexos inibidor/NOS foram otimizadas através do uso da metodologia semi-empírica; este modelo de correlação com os dados experimentais de atividade foi baseado em descritores de natureza termodinâmica (modelo empírico de energia livre [OLIVEIRA *et al.*, 2006]);

- Aplicação do modelo proposto aos compostos em estudo (amidinas);
- Uso do modelo para a proposição de novos inibidores da NOS.

## **ii. Inibição da TR:**

Devido à ausência de uma estrutura cristalográfica inicial com um inibidor co-cristalizado, duas metodologias diferentes foram avaliadas para a obtenção de modelos complementares:

- **Modelo TR I:** Construção de um modelo de inibição para a enzima TR por substâncias de atividade conhecida e comprovada experimentalmente (compostos fenotiazínicos) através da metodologia de atracamento molecular (“*docking*”) para geração das estruturas dos complexos e de descritores associados a essas estruturas; estes descritores foram aplicados no desenvolvimento de modelos de correlação com os dados experimentais de atividade; como os dados disponíveis na literatura baseiam-se na inibição da TR de *T. cruzi*, neste estudo foi usada a estrutura cristalográfica da enzima deste parasito;
- Aplicação do modelo proposto diretamente aos compostos em estudo (amidinas e mesoiônicos);
- Verificação da possibilidade de inibição nos sítios dos cofatores ou outros sítios presentes na enzima, como um mecanismo alostérico alternativo de inibição.
- **Modelo TR II:** Construção de um modelo alternativo de inibição da TR, baseado nas estruturas de complexos TR/fenotiazinas e reotimizadas através do uso da metodologia semi-empírica. A partir dessas estruturas foram gerados descritores de natureza termodinâmica, que foram usados no desenvolvimento de modelos de correlação com os dados de atividade experimental. Este estudo serviu para identificar os descritores de natureza termodinâmica e a função de correlação mais adequada para o desenvolvimento de um modelo empírico de energia livre aplicado à inibição da TR;
- Aplicação do modelo empírico proposto diretamente aos compostos em estudo (mesoiônicos);

- Verificação da possibilidade de inibição nos sítios dos cofatores ou outros sítios presentes na enzima, como um mecanismo alostérico alternativo de inibição.
- **Modelo TR III:** Criação de um modelo tridimensional inédito para a TR de *L. amazonensis* a partir do sequenciamento disponibilizado recentemente [CASTRO-PINTO *et al.*, 2008], usando o método de modelagem comparativa de proteínas, visto que não foi disponibilizada até hoje a estrutura cristalográfica desta enzima para este gênero. Aplicação do modelo obtido no atracamento molecular de amidinas e mesoiônicos, utilizando estrutura da TR específica para o parasito em estudo (*L. amazonensis*).
- Uso do modelo para a proposição de novos inibidores da TR.

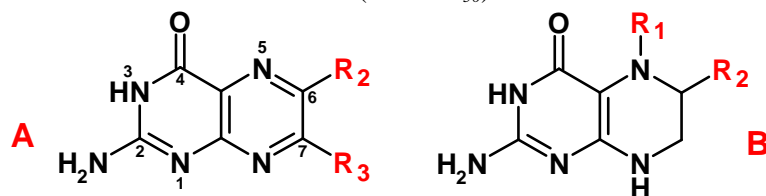
A metodologia de cada etapa listada acima será explicada a seguir.

### 4.3. Modelo Para Estudo da Inibição da NOS

#### 4.3.1. Construção do modelo da NOS

Para a proposição de um modelo de inibição da NOS pelos compostos em estudo, é necessário um modelo teórico eficiente. Antes de se passar ao estudo dos compostos amidínicos avaliados neste trabalho, foi desenvolvido um estudo prévio baseado nos dados experimentais obtidos por Kotsonis *et al.* (2001), em relação a derivados pterínicos sintetizados por este grupo. O trabalho contém 35 compostos pterínicos sintetizados e testados em relação à sua atividade inibitória frente à NOS. Destes 35 compostos, 8 foram escolhidos para a construção do modelo, incluindo 4-oxo-pteridinas 6,7-dissubstituídas e 4-oxo-5,6,7,8-tetraidropteridinas 5,6-dissubstituídas (listadas na **tabela 4.1**), buscando uma boa variabilidade estrutural.

**Tabela 4.1:** Estrutura dos compostos pterínicos escolhidos para construção do modelo de inibição da NOS, assim como sua atividade frente a enzima (como  $IC_{50}$ ).

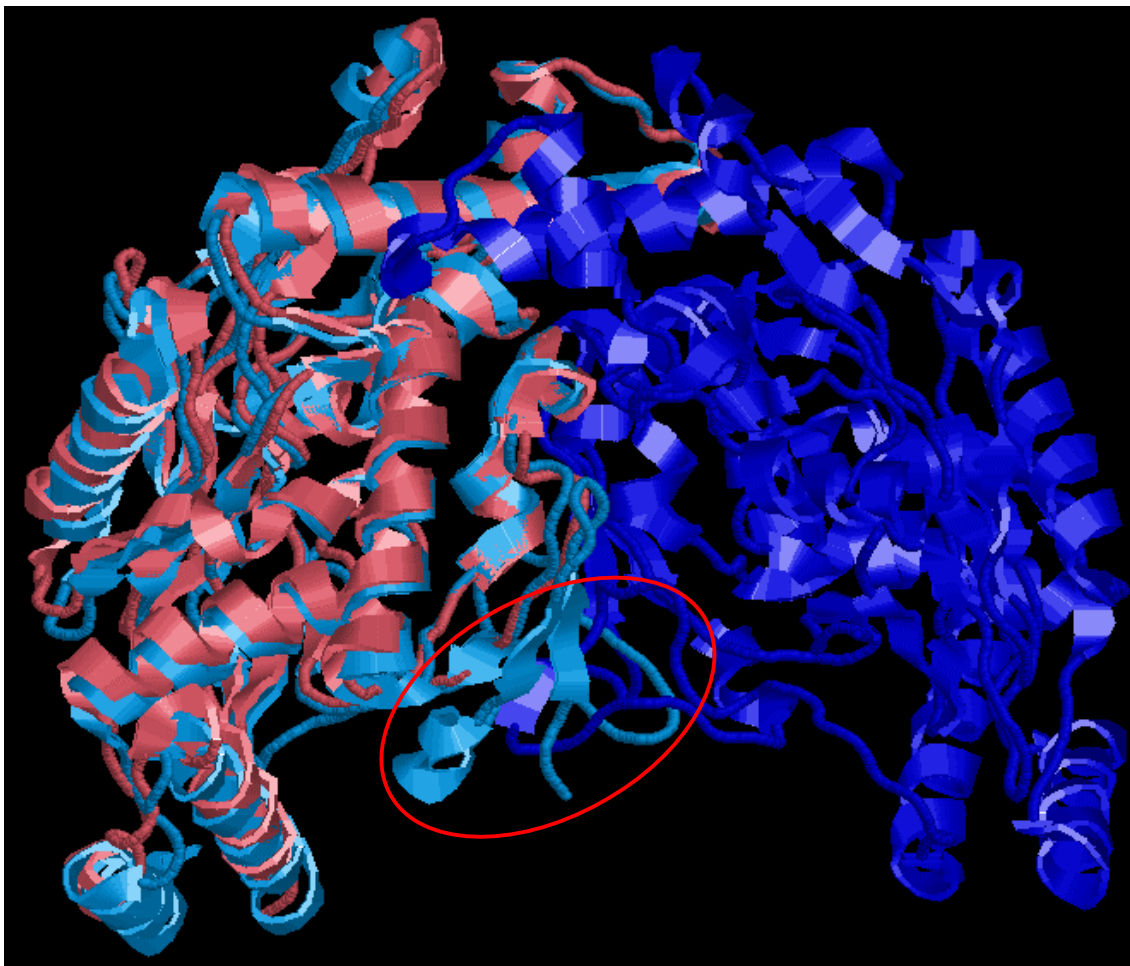


Composto	Esqueleto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)
1	A	-	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H	26
2	A	-	ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	27
3	A	-	H	naftil	33
4	B	CH <sub>2</sub> OCO	-	-	35
5	B	CSNHC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H	-	50
6	B	H	CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	-	32
7	B	H	CH <sub>2</sub> NHCH <sub>3</sub>	-	20
8	B	H	CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-	25

Fonte: KOTSONIS *et al.*, 2001.

No momento da escolha da estrutura enzimática, apenas duas estruturas de NOS encontravam-se disponíveis no PDB [BERMAN *et al.*, 2000]: a de código 1DMJ, proveniente de *Bos taurus*, fornecida pelo mesmo grupo de pesquisa associado à síntese das pterinas [KOTSONIS *et al.*, 2001], e a de código 1M7Z, proveniente da bactéria *Bacillus subtilis* [PANT *et al.*, 2002]. A estrutura bovina foi a escolhida para o trabalho, pois possui um inibidor co-cristalizado (o que não ocorre na estrutura bacteriana), e protozoários como *Leishmania* são eucariotos, e bactérias, procariotos. Além destes detalhes, a estrutura proveniente de bactérias possui disponível apenas um protômero (a estrutura é dimérica), e a estrutura bovina possui uma cadeia maior, com um domínio a mais localizado na parte inferior dos protômeros (**figura 4.5**), próxima ao sítio ativo da BH<sub>4</sub> e do grupo heme, sendo por isso de importância para a estrutura.





**Figura 4.5:** Comparação das estruturas cristalográficas da NOS bovina (código **1DMJ**, em azul – cada cadeia em uma tonalidade) e bacteriana (código **1M7Z**, em rosa). O domínio a mais da estrutura bovina encontra-se destacado por uma círculo vermelho.

**Fonte 1DMJ:** KOTZONIS *et al.*, 2001; **1M7Z:** PANT *et al.*, 2002. Imagem manipulada no programa RasMol 2.7.2.1.1.

Portanto, através da estrutura cristalográfica de código 1DMJ [KOTSONIS *et al.*, 2001], foram selecionados os aminoácidos localizados a 6 Å do inibidor pterínico co-cristalizado através do programa RasMol 2.7.2.1.1 [SAYLE & MILNER-WHITE, 1995], totalizando 12 resíduos (Trp73, Arg367, His373, Ile450, Pro453, Trp447, Ala448, Trp449, Phe462, His463, Gln464 e Glu465). Procedeu-se com a minimização dos complexos ligante/sítio ativo com o programa Mopac 2002 (Fujitsu, Co.), utilizando-se a metodologia semi-empírica.

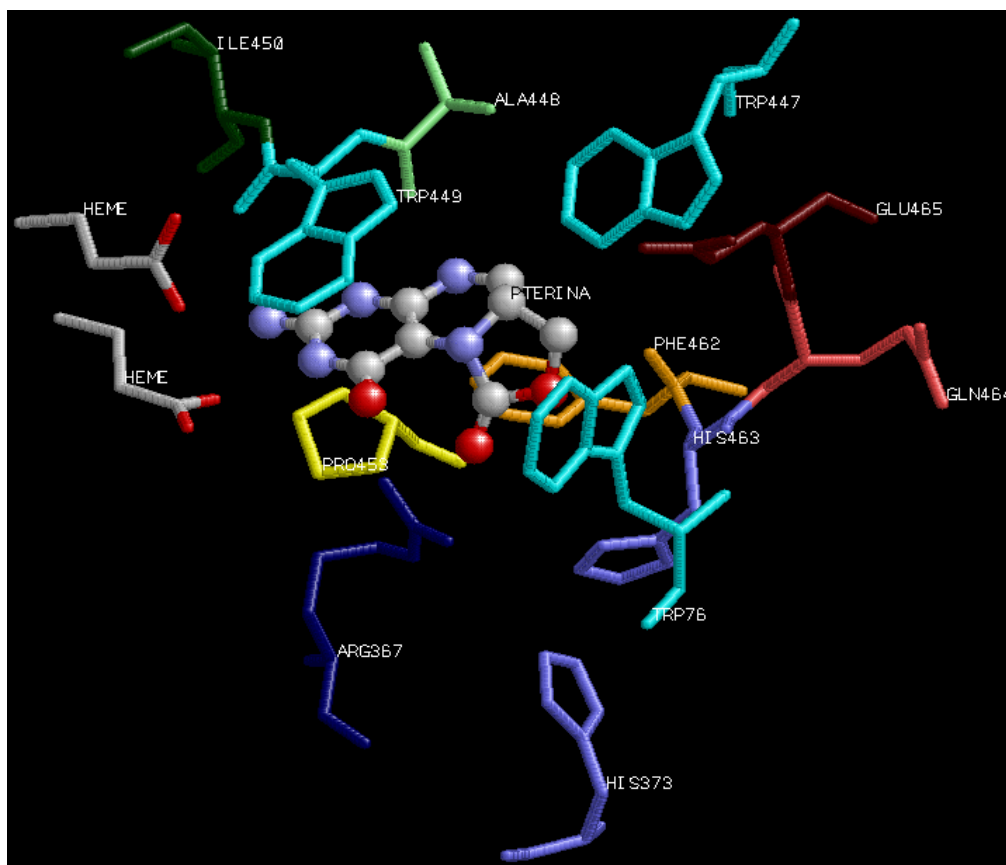
Para a minimização da energia e predição correta do ancoramento de um ligante à estrutura protéica, é necessária a presença dos átomos de hidrogênio da estrutura. O arquivo do complexo de 6 Å com extensão *pdb* foi convertido em arquivo de extensão *mop*, através do

programa Babel 1.6 [GOSPER, 1998], adicionando-se os respectivos átomos de hidrogênio. Baseado nas informações do artigo [KOTSONIS *et al.*, 2001], as moléculas de água importantes para a manutenção da topologia do sítio foram escolhidas e mantidas, e os átomos de hidrogênio destas moléculas foram inseridos manualmente, através da edição da matriz que descreve a estrutura molecular.

Após a obtenção da referida estrutura, o complexo teve sua matriz de coordenadas atômicas editada para fixação no espaço das ligações peptídicas, através da inserção do marcador (“*flag*”) 0 em substituição ao marcador 1, localizado ao lado de cada um das três coordenadas internas da matriz, a saber: distâncias de ligação, ângulos de ligação e ângulos diedros (de torção). Desta forma, o sítio não perde sua estrutura terciária original durante a minimização da energia. Um exemplo de uma matriz editada está representado no **anexo F**.

Todos os cálculos semi-empíricos foram efetuados com o hamiltoniano PM3 [STEWART, 1989a,b] do programa Mopac 2002 (Fujitsu Ltd.); as geometrias moleculares foram otimizadas com a rotina EF (“*Eigenvector Following*” [BAKER, 1986]) até uma norma de gradiente inferior a 1.0 kcal/(Å or rad).

Para inserção dos compostos listados na **tabela 4.1** nessa estrutura, o composto original co-cristalizado em seu sítio de interação foi modificado através da edição da matriz, átomo a átomo, até que os compostos fossem obtidos. Como exemplo, encontra-se representada a estrutura final do sítio com o composto pterínico co-cristalizado na **figura 4.6**. Paralelamente, cada ligante foi desenhado, utilizando o programa PC Spartan Pro (Wavefunction, Inc.), para que sua energia livre de solvatação fosse calculada através do método SM5.4 [CHAMBERS *et al.*, 1996]. Para cada composto, isoladamente, também foi gerado um arquivo de entrada para cálculo no Mopac (coordenadas internas), para otimização de suas estruturas com o hamiltoniano PM3 do programa Mopac 2002. Finalmente, a estrutura do sítio ativo vazio, ou seja, sem nenhuma estrutura pterínica complexada, foi também otimizada.



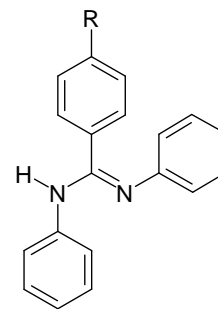
**Figura 4.6:** Estrutura do sítio de 6 Å, com a pterina co-cristalizada (modelo bastões/bolas). Para minimização da energia do complexo, foram mantidos apenas os carboxilatos do grupo heme (modelo bastões, padrão CPK de cores), junto aos 12 aminoácidos (Trp73, Arg367, His373, Ile 450, Pro453, Trp447, Ala448, Trp449, Phe462, His463, Gln464 e Glu465). As moléculas de água e átomos de H estão ocultos. Imagem manipulada no programa RasMol 2.7.2.1.1.

#### 4.3.2. Aplicação do modelo aos compostos amidínicos

Para elucidação do possível mecanismo de inibição da enzima NOS pelas amidinas, procedeu-se com a complexação das amidinas inicialmente no sítio ativo de 6 Å descrito. As estruturas foram desenhadas, complexadas e minimizadas de acordo com a metodologia utilizada para montagem do modelo pterínico, ou seja, pela modificação da matriz a partir da pterina co-cristalizada. A estrutura amidínica utilizada como base para a construção dos compostos foi a metoxiamidina, seguida da troca do substituinte na posição *para* (**tabela 4.2**) dos compostos sintetizados e testados pelo grupo da Dra. Aurea Echevarria — UFRRJ [SOUZA, 2007; GENESTRA *et al.*, 2003].

**Tabela 4.2:** Estrutura e atividade ( $DL_{50}$ ) dos compostos amidínicos utilizados neste estudo.

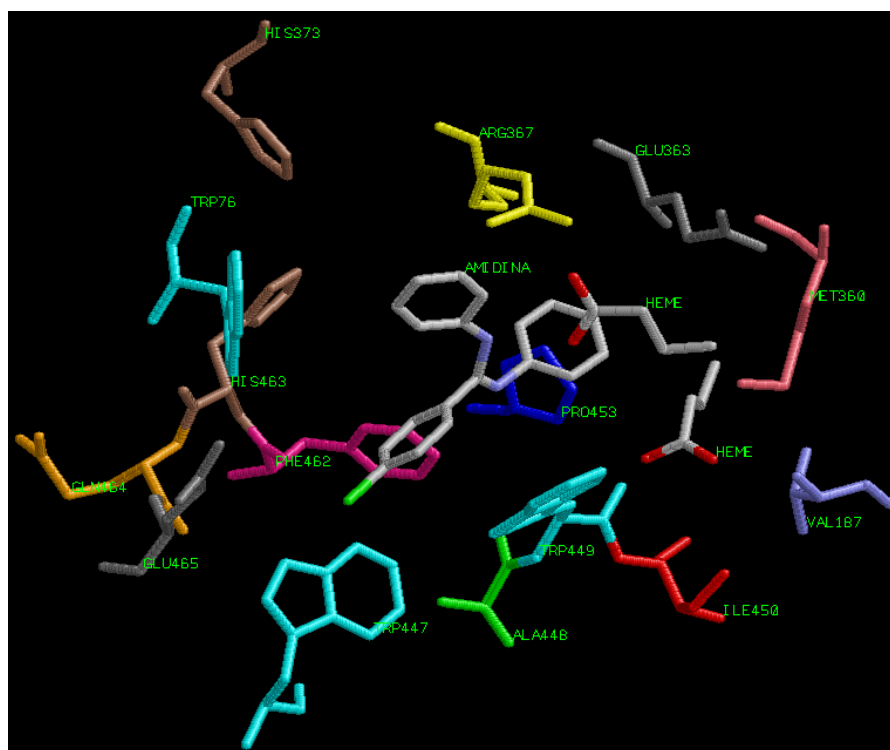
Composto	R	$DL_{50}$ ( $\mu\text{mol/L}$ ) <sup>a</sup>	$DL_{50}$ ( $\mu\text{mol/L}$ ) <sup>b</sup>
9	OCH <sub>3</sub> (metoxiamidina)	14 ± 1,4	280 ± 24
10	Cl	41 ± 26	888 ± 9
11	Br	22 ± 14	341 ± 39
12	NO <sub>2</sub>	28 ± 3	417 ± 9
13	H	628 ± 10	1183 ± 19
14	CH <sub>3</sub>	285 ± 23	1277 ± 18
15	CN	263 ± 18	> 1700



<sup>a</sup> Determinado em promastigotas [CANTO-CAVALHEIRO *et al.*, 2000]

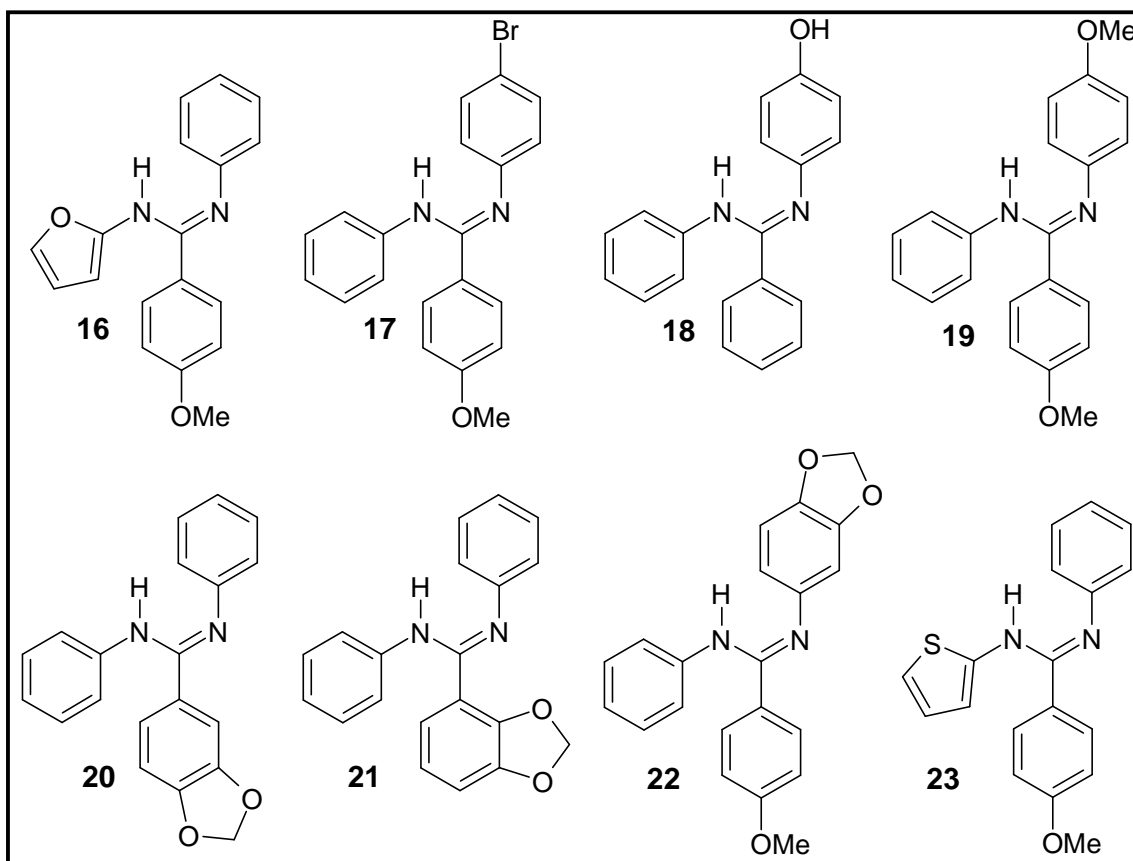
<sup>b</sup> Determinado em amastigotas [CANTO-CAVALHEIRO *et al.*, 2000]

Em razão do maior volume ocupado pelas amidinas, o número de aminoácidos do sítio ativo teve de ser aumentado de 12 para 15 (**figura 4.7**), sendo estes Trp76, Val187, Met360, Glu363, Arg 367, His373, Trp447, Ala448, Trp449, Ile450, Pro453, Phe462, His463, Gln464 e Glu465, para uma predição mais adequada das interações das amidinas com o sítio em questão.



**Figura 4.7:** Estrutura otimizada do sítio da NOS com a amidina 10 complexada (padrão CPK de cores) – recorte de 6 Å, com 15 aminoácidos (Trp76, Val187, Met360, Glu363, Arg 367, His373, Trp447, Ala448, Trp449, Ile450, Pro453, Phe462, His463, Gln464 e Glu465). As moléculas de água e átomos de H estão ocultos. Imagem manipulada no programa RasMol 2.7.2.1.1.

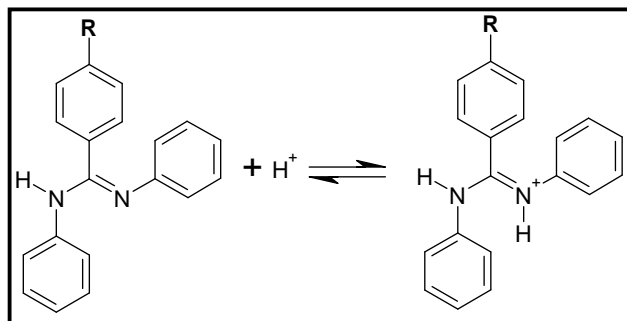
Além das amidinas com atividade determinada experimentalmente pelo grupo da Dra. Echevarria [SOUZA, 2007; CANTO-CAVALHEIRO *et al.*, 2000], foram propostas novas estruturas amidínicas, através da análise visual das possíveis interações com os aminoácidos e moléculas de água pertencentes ao sítio ativo, mantendo-se também como objetivo a viabilidade de síntese. Para as estruturas propostas, foram feitos cálculos com a mesma metodologia aplicada na construção do modelo de inibição da NOS pelas pterinas. As estruturas neste trabalho propostas estão representadas na **figura 4.8**.



**Figura 4.8:** Estruturas amidínicas propostas através da análise das possíveis interações com o sítio ativo.

Em razão da possibilidade de protonação das amidinas em organelas ácidas no interior dos parasitos, foram também procedidos cálculos para os compostos amidínicos testados e para os compostos propostos neste trabalho, mudando-se o estado de protonação da estrutura, conforme demonstrado na **figura 4.9**, para uma análise mais completa das possíveis interações com moléculas de água e outros grupamentos aceptores de ligações de hidrogênio e

para comparação da atividade dos compostos catiônicos (protonados) e neutros (desprotonados) frente a NOS.



**Figura 4.9:** Demonstração da protonação das estruturas amidínicas, com as formas neutra e catiônica, respectivamente.

#### 4.4. Construção dos Modelos Para Estudo da Inibição da TR

##### 4.4.1. Escolha da estrutura

Para a montagem de um modelo de inibição da enzima TR, foi feita uma comparação entre as estruturas disponíveis no PDB no momento da pesquisa para a escolha da melhor estrutura a ser utilizada. Havia estruturas cristalográficas disponíveis dos tripanossomatídeos *C. fasciculata* (código PDB 1FEC [STRICKLAND *et al.*, 1995]) e *T. cruzi* (código PDB 1BZL [BOND *et al.* 1999]), porém nenhuma estrutura proveniente do gênero *Leishmania*.

A partir de um sequenciamento da TR de *L. amazonensis* disponibilizado pelos laboratórios Bioquímica de Tripanossomatídeos, Genômica Funcional e Bioinformática, e Imunopatologia da FIOCRUZ [CASTRO-PINTO *et al.*, 2008], foi feita inicialmente uma comparação entre as sequências envolvidas, visando os sítios de interação com os 3 bioligantes TSST, FAD e NADPH (**figura 4.10**). Analisando os resíduos dos sítios das moléculas co-cristalizadas TSST e/ou FAD, temos uma grande similaridade entre as 3 enzimas, sendo esta completa no sítio da TSST — o sítio é idêntico nas 3 enzimas. Em relação ao sítio do FAD, temos poucas diferenças, totalizando apenas cinco resíduos diferentes entre si. O sítio do NADPH, por outro lado, é extremamente diferenciado nas 3 enzimas, possuindo 12 resíduos diferentes entre elas. Esta grande diferença torna interessante a pesquisa pela inibição através deste sítio, pois se existem diferenças de atividade entre os compostos em estudo em relação a estes 3 parasitos, este sítio poderá ser o responsável por este fato.

	Sítio do FAD	Sítio Ativo (TSST)
AMA	-MARAYDLVVLGAGSGGLEA <b>G</b> WNA <b>A</b> V <b>T</b> H <b>K</b> K <b>K</b> VAVVDLQAVHGPPPLFAALGGTCVNVGCVPKKL	
FAS	-MSRAYDLVVIGAGSGGLEA <b>G</b> WNA <b>A</b> <b>S</b> L <b>H</b> K <b>K</b> RVAVIDLQKHHGPPHYAALGGTCVNVGCVPKKL	
CRU	MMSKIFDLVVIGAGSGGLEA <b>A</b> WNA <b>A</b> <b>T</b> L <b>Y</b> K <b>K</b> RVAVIDVQMVHGPPFFSALGGTCVNVGCVPKKL	
	<b>S. Ativo</b>	<b>Sítio do NADPH</b>
	<b>85-183</b>	
AMA	MVTGAQYMDTLRESGGFGWEMS-SNEAFYLEDAPKRTL CVGGG <b>Y</b> I <b>A</b> VEFAGIFNG <b>Y</b> K <b>P</b> R <b>G</b> G <b>I</b> V	
FAS	MVTGANYMDTIRESAGFGWELD-SNEAFYLDEAPKRAL CVGGG <b>Y</b> I <b>S</b> I <b>E</b> EFAGIFN <b>A</b> Y <b>K</b> A <b>R</b> G <b>G</b> Q <b>V</b>	
CRU	MVTGAQYMEHLRESAGFGWEFD-SNEAFYLPEPPRRVLT VGGG <b>F</b> I <b>S</b> V <b>E</b> EFAGIFN <b>A</b> Y <b>K</b> <b>P</b> K <b>D</b> G <b>Q</b> V	
	<b>S. do NADPH</b>	<b>255</b>
AMA	<b>D</b> L <b>C</b> Y <b>R</b> G <b>D</b> V <b>I</b> L <b>R</b> G <b>F</b> D <b>L</b> E <b>V</b> R <b>K</b> S <b>L</b> T <b>K</b> Q <b>L</b> E <b>A</b> N <b>G</b> I <b>Q</b> V <b>R</b> ...	
FAS	<b>D</b> L <b>A</b> Y <b>R</b> G <b>D</b> M <b>I</b> L <b>R</b> G <b>F</b> D <b>S</b> E <b>L</b> R <b>K</b> Q <b>L</b> T <b>E</b> Q <b>L</b> R <b>A</b> N <b>G</b> I <b>N</b> V <b>R</b> ...	
CRU	<b>T</b> L <b>C</b> Y <b>R</b> G <b>E</b> M <b>I</b> L <b>R</b> G <b>F</b> D <b>H</b> T <b>L</b> R <b>E</b> E <b>L</b> T <b>K</b> Q <b>L</b> T <b>A</b> N <b>G</b> I <b>Q</b> I <b>L</b> ...	

**Figura 4.10:** Comparação entre as estruturas da TR de *L. amazonensis* (AMA), *C. fasciculata* (FAS) e *T. cruzi* (CRU). Os sítios estão indicados (hachurados), e os resíduos diferentes nos sítios estão destacados em vermelho.

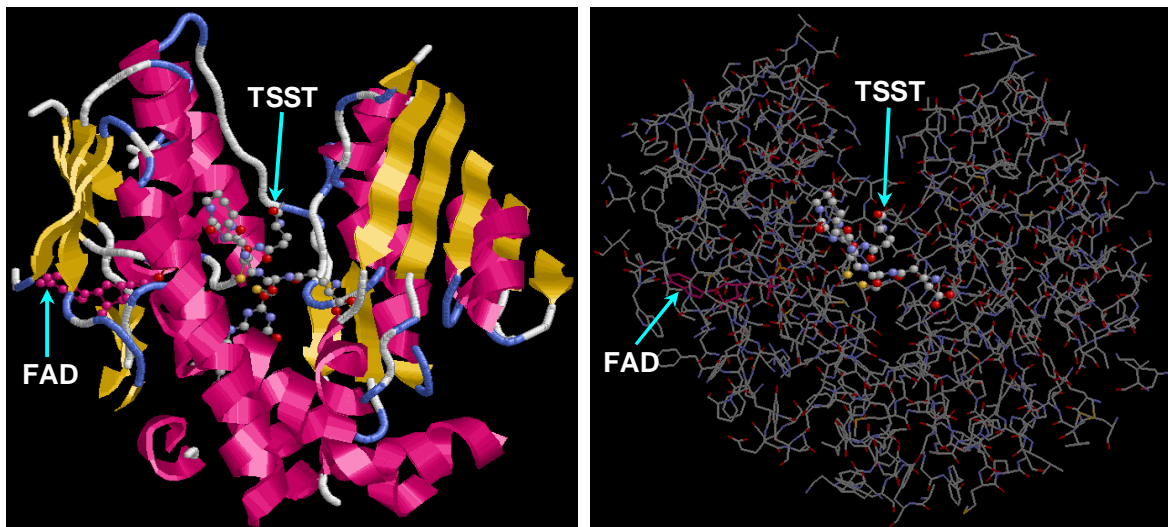
Em razão desta grande semelhança nos sítio da TSST e do FAD, foi inicialmente escolhida a estrutura cristalina da enzima de *T. cruzi* (código PDB 1BZL [BOND *et al.*, 1999]) para estudos objetivando o desenvolvimento de modelos. Além da estrutura cristalográfica, há dados sobre inibidores da TR de *T. cruzi* disponíveis para serem usados nestes estudos. Para o estudo do sítio do NADPH, no entanto, foi escolhida uma estrutura proveniente de *C. fasciculata* (código PDB 1TYP [BAILEY *et al.*, 1993]), por ser esta a única no momento da pesquisa que possuía o NADPH co-cristalizado.

#### 4.4.2. Validação do método de atracamento – “redocking”

Para a avaliação da qualidade do atracamento feito pelo programa GOLD (CCDC Ltd.), foi realizado o atracamento das estruturas co-cristalizadas (TSST, FAD e NADPH) em seus próprios sítios de interação, procedimento denominado “redocking” (reatracamento ou redocagem).

Através da estrutura cristalográfica de *T. cruzi* escolhida (1BZL [BOND *et al.*, 1999]), foram selecionados os aminoácidos localizados a 20 Å do substrato co-cristalizado (neste caso, a TSST), mantendo-se as moléculas de água presentes. A necessidade de um recorte maior (se comparado ao utilizado para o modelo de inibição da NOS, que continha 6 Å) se dá pela metodologia de atracamento molecular, onde é necessária maior extensão do sítio ativo para a análise das diversas possibilidades e posicionamentos para o atracamento, além do fato

de tal análise englobar os 2 sítios (TSST/FAD) simultaneamente. A estrutura resultante encontra-se a seguir (**figura 4.11**).



**Figura 4.11:** Estrutura final do sítio ativo da TR (recorte de 20 Å), adotado para atracamento, em duas formas diferentes de visualização. Em destaque, encontra-se o substrato da enzima (TSST) e a molécula de FAD, conforme indicado. No substrato, a seta aponta para o carbono que teve suas coordenadas utilizadas para definir o sítio de atracamento no programa GOLD (CCDC Ltd.). Imagem gerada no programa RasMol 2.7.2.1.1.

Este procedimento foi adotado com o fim de verificar os posicionamentos dos bioligantes obtidos pelo programa nos possíveis sítios de interação da enzima, e com isso validar o método. O sítio interno para atracamento da TSST no programa foi definido a partir de 20 Å das coordenadas cartesianas do átomo de carbono carbonílico do GluI (o mais externo), por ser o mais central ao sítio (**figura 4.11**, acima — a seta aponta para o carbono que teve suas coordenadas utilizadas). Escolheu-se 20 Å como extensão do sítio da TSST, para que todas as possibilidades de posicionamento para os compostos no sítio fossem consideradas. Para o atracamento do FAD, foi utilizado o nitrogênio pertencente ao resíduo Ser15 como origem do sítio, também com 20 Å de extensão, pelo tamanho da molécula de FAD e, conseqüentemente, de seu sítio alostérico. O procedimento foi repetido com os principais escores, *Chemscore* [ELDRIDGE *et al.*, 1997] e *Goldscore* [VERDONK *et al.*, 2003], disponibilizados pelo programa.

Para avaliar o posicionamento no sítio alostérico do NADPH, utilizou-se a estrutura da TR de *C. fasciculata* (1TYP [BAILEY *et al.*, 1993]), por ser a única estrutura disponível com o NADPH complexado. As estruturas geralmente não possuem este cofator por ser ele solúvel

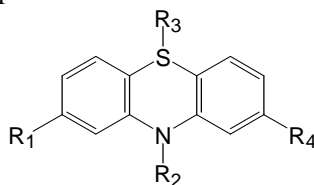


(conforme explicado no item 2.5.2), diferente do FAD, que por ser um grupo prostético, está complexado a praticamente todas as estruturas presentes no PDB. Para definição do sítio interno, foram utilizadas como centro as coordenadas cartesianas pertencentes ao átomo de fósforo do fosfato ligado ao carbono 5' da ribose (*vide* **figura 2.37**, item 2.5.2), com extensão de 10 Å, e não 20 Å como para os outros 2 sítios, pois o sítio do NADPH é pequeno e tem uma grande comunicação com o meio externo. Quando testada a extensão de 20 Å, os compostos foram atracados pelo programa praticamente “saindo” do sítio — com isto foi necessário diminuir a extensão aplicada. As funções de escore *Chemscore* [ELDRIDGE *et al.*, 1997], *Goldscore* [VERDONK *et al.*, 2003], *ASP* [BONET *et al.*, 1997] e *ChemPLP* [KORB *et al.*, 2007, 2009] foram testados para o atracamento.

#### 4.4.3. Modelo TR I

A montagem do modelo foi baseada nos dados experimentais obtidos por Khan *et al.* (2000) e Chan *et al.* (1998). Estes pesquisadores estudaram a interação de derivados fenotiazínicos com a TR de *T. cruzi*. Destes estudos, foram selecionados 20 compostos (**tabela 4.3**), primando-se pela variabilidade estrutural e variabilidade dos valores de  $IC_{50}$  determinados experimentalmente. Cada um dos 20 compostos escolhidos foi desenhado, com otimização estrutural com o campo de força MMFF94 [HALGREN, 1996] no programa PC Spartan Pro (Wavefunction, Inc.). Os compostos foram então convertidos à extensão *mol2*, através do programa Babel 1.6 [GOSPER, 1998], e atracados por meio do programa GOLD nas estruturas cristalográficas descritas [BOND *et al.*, 1999; BAILEY *et al.*, 1993], utilizando-se os mesmos critérios de definição da origem e da extensão dos sítios e os algoritmos descritos no item anterior. Após o atracamento, foram selecionadas as conformações com os melhores escores de aptidão (“*fitness score*”) para a predição dos 19 descritores disponibilizados através do programa GOLDMINE 1.1 (CCDC Ltd.). Estes descritores foram calculados para a busca de uma correlação com a atividade dos compostos, englobando características estruturais importantes para seu ancoramento à estrutura protéica.

**Tabela 4.3:** Compostos fenotiazínicos escolhidos para construção do modelo de inibição da TR, com seus valores de  $IC_{50}$  determinados experimentalmente.

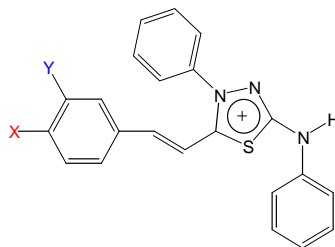


Cmp.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)
24 *	Cl	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NMe <sub>2</sub>	-	H	35,4 ± 7,7
25 *	COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NMe <sub>2</sub>	-	H	357 ± 30
26 *	COOH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NMe <sub>2</sub>	-	H	3911 ± 306
27 *	CONH <sub>2</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NMe <sub>2</sub>	-	H	458 ± 96
28 *	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> C(NH <sub>2</sub> )=NH	-	H	992 ± 112
29 *	CF <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> N(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NCH <sub>3</sub>	-	H	72 ± 13,9
30 *	Cl	CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	-	H	1484 ± 340
31 *	Cl	COCH <sub>2</sub> Br	-	H	251 ± 80
32 *	Cl	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> C(NH <sub>2</sub> )=NH	-	H	307 ± 65
33 *	Cl	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NMe <sub>2</sub>	-	COCH <sub>3</sub>	175 ± 60
34 *	Cl	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NMe <sub>2</sub>	=O	H	76,6 ± 63
35 *	COCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	-	H	2811 ± 855
36 *	COCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	-	COCH <sub>3</sub>	49,1 ± 8,7
37 **	Cl	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> N <sup>+</sup> (Me) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	-	H	8,02 ± 0,56
38 **	Cl	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> N <sup>+</sup> (Me) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> 3,4-Cl	-	H	0,78 ± 0,04
39 **	Cl	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> N <sup>+</sup> (Me) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> 4-NO <sub>2</sub>	-	H	17,9 ± 2,25
40 **	Cl	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> N <sup>+</sup> (Me) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> 3,4-CH <sub>3</sub>	-	H	3,9 ± 0,27
41 **	Cl	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> N <sup>+</sup> (Me) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> 3,5-OCH <sub>3</sub>	-	H	5,4 ± 1,1
42 **	Cl	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> N <sup>+</sup> (Me) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> F <sub>5</sub>	-	H	10 ± 2,2
43 **	Cl	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> N <sup>+</sup> (Me) <sub>3</sub>	-	H	28 ± 6,3

\* CHAN *et al.*, 1998; \*\* KHAN *et al.*, 2000.

A mesma metodologia foi aplicada às amidinas (compostos 9 a 23) e compostos mesoiônicos (compostos 44 a 56, **tabela 4.4**, a seguir). O sítio ativo utilizado para estes compostos foi o mesmo utilizado para as fenotiazinas (**figura 4.11**). O atracamento molecular foi aplicado não só ao sítio ativo pertencente à TSST, mas também ao sítio de interação do FAD e NADPH. Como explicitado anteriormente, a TR é uma flavoproteína, possuindo sítios alostéricos para estes cofatores. Essa iniciativa foi baseada em resultados preliminares de atracamentos com o FAD ausente do seu sítio de interação, para os quais o algoritmo do programa GOLD encontrou esse sítio como o sítio de interação dos compostos mesoiônicos em estudo. Portanto, a mesma metodologia foi utilizada, lançando-se mão apenas da presença ou não do cofator — para verificação do ancoramento no sítio da TSST, a estrutura do FAD foi deixada na estrutura protéica; para a verificação do ancoramento no sítio do FAD, sua estrutura foi retirada.

**Tabela 4.4:** Compostos mesoiônicos sintetizados com suas atividades ( $IC_{50}$ ) frente às diferentes formas evolutivas (promastigotas e amastigotas) de *L. amazonensis*.

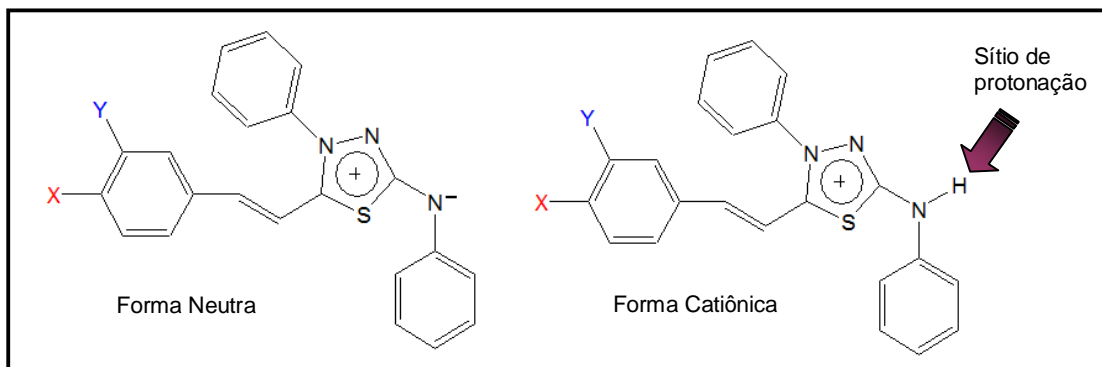


Composto	X	Y	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) <sup>b</sup>
44	H	H	$0,47 \pm 0,03$	$104,54 \pm 11,95$
45	CH <sub>3</sub>	H	$0,98 \pm 0,05$	$287,46 \pm 20,15$
46	OCH <sub>3</sub>	H	$0,17 \pm 0,01$	$23,93 \pm 4,88$
47	NO <sub>2</sub>	H	$1,00 \pm 0,12$	$52,92 \pm 5,92$
48	F	H	$0,92 \pm 0,06$	$5,37 \pm 0,28$
49	Cl	H	$1,51 \pm 0,22$	$186,34 \pm 18,11$
50	CN	H	$27,80 \pm 8,48$	$79,85 \pm 6,28$
51	Br	H	$0,87 \pm 0,10$	$33,26 \pm 2,38$
52	OH	H	$7,58 \pm 0,03$	$113,21 \pm 5,33$
53	H	OCH <sub>3</sub>	$0,04 \pm 0,01$	$41,88 \pm 2,83$
54	H	NO <sub>2</sub>	$1,58 \pm 0,29$	$193,38 \pm 14,27$
55	H	Cl	$0,48 \pm 0,05$	$178,11 \pm 15,39$
56	H	Br	$0,52 \pm 0,05$	$5,48 \pm 0,04$

<sup>a</sup> Determinado em promastigotas [SILVA *et al.*, 2002]

<sup>b</sup> Determinado em amastigotas [SILVA *et al.*, 2002]

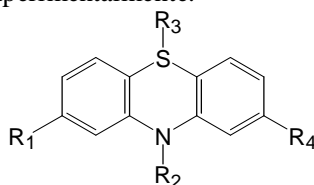
Os compostos mesoiônicos, assim como as amidinas (conforme descrito no modelo de inibição da NOS), possuem 2 possíveis estados de protonação, determinados pelo pH do meio. Em um pH menos ácido, deve predominar a forma neutra (com o átomo de N exocíclico desprotonado), onde estão presentes as duas cargas opostas descritas anteriormente (item 2.2.3), gerando a forma conhecida como “*zwitterion*” (ou íon dipolar). Em um pH mais ácido, deve predominar a forma catiônica resultante da protonação do N exocíclico. Ambas as formas descritas (neutra e catiônica, **figura 4.12**) foram testadas com a metodologia de atracamento molecular, para o reconhecimento de qual forma deverá ser mais ativa frente a enzima, e com isso o reconhecimento de qual forma deverá ser utilizada caso os compostos venham a ser utilizados como fármacos.



**Figura 4.12:** Formas **neutra** e **catiônica**, testadas em relação aos compostos mesoiônicos, com indicação de seu sítio de protonação (seta).

Como um teste simples da preditividade do modelo desenvolvido quanto à atividade dos compostos, 3 fenotiazinas foram escolhidas, demonstradas na **tabela 4.5**, com estruturas e valores de  $IC_{50}$  determinados experimentalmente variados, representadas abaixo. Estes compostos, não usados na construção do modelo, tiveram suas atividades calculadas, para posterior comparação a seus valores reais.

**Tabela 4.5:** Compostos fenotiazínicos escolhidos para avaliação do modelo de inibição da TR, com seus valores de  $IC_{50}$  determinados experimentalmente.



Cmp.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)
57 *	Cl	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> N <sup>+</sup> (Me) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -Br	-	H	11,9 ± 1,76
58 **	CF <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NMe <sub>2</sub>	-	H	110 ± 18
59 **	COCH <sub>2</sub> Cl	COCH <sub>3</sub>	-	H	436 ± 37

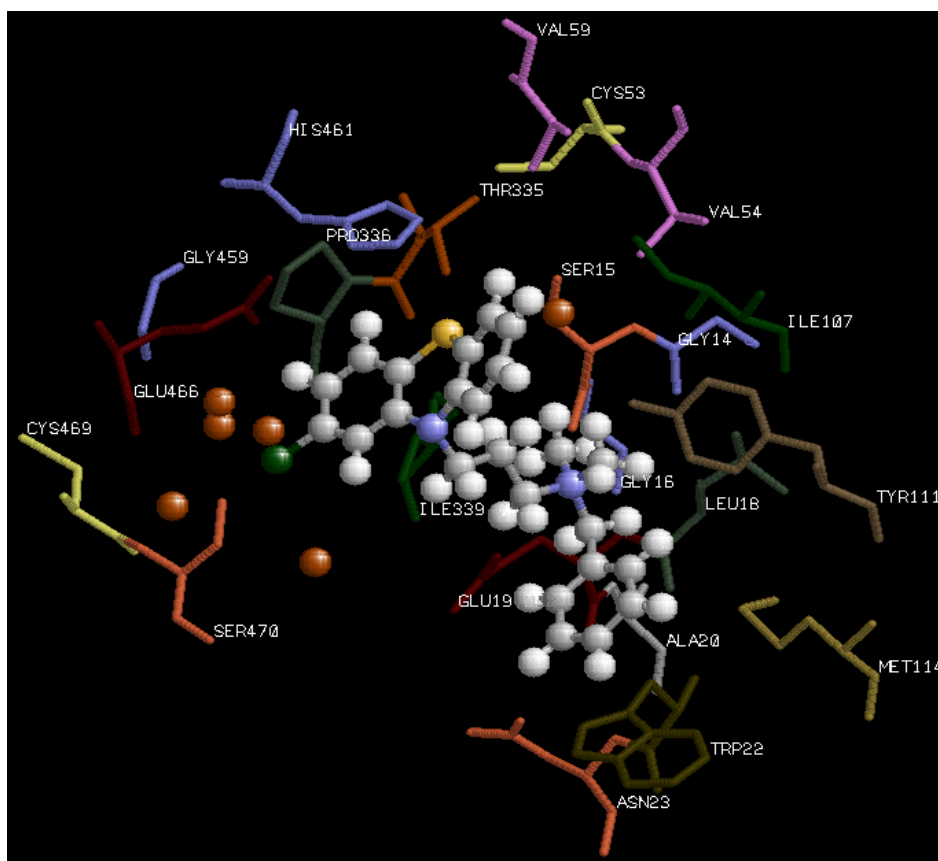
\* KHAN *et al.*, 2000; \*\* CHAN *et al.*, 1998.

#### 4.4.4. Modelo TR II

Para construção dos arquivos para os cálculos semi-empíricos, inicialmente arquivos no formato *mol2* referentes às conformações dos compostos fenotiazínicos com os melhores escores de aptidão obtidos no atracamento tiveram seus arquivos convertidos no formato *pdb* através do programa Babel 1.6 [GOSPER, 1998]. As informações referentes às estruturas foram adicionadas ao arquivo *pdb* correspondente ao recorte protéico de 20 Å. Este procedimento evita a alteração da posição de ancoramento determinada pelo programa

GOLD, pois tal posição possui seus dados correspondentes às coordenadas cartesianas, sem alteração das coordenadas correspondentes à proteína.

Com cada ligante ancorado à estrutura protéica, foram feitos recortes de 5 Å a partir do ligante fenotiazínico, através do programa RasMol 2.7.2.1.1 [SAYLE, MILNER-WHITE, 1995]. Como os recortes foram feitos a partir de cada estrutura ancorada, que não possuem necessariamente o mesmo posicionamento na proteína, possuem aminoácidos variados entre si. Como exemplo, o complexo formado pelo atracamento do composto 37, demonstrado na **figura 4.13**, possui 22 aminoácidos (Gly14, Ser15, Gly16, Leu18, Glu19, Ala20, Trp22, Asn23, Cys53, Val54, Val59, Ile107, Tyr111, Met114, Thr335, Pro336, Ile339, Gly459, His461, Glu466, Cys469 e Ser470).



**Figura 4.13:** Estrutura final do sítio da TR com uma fenotiazina complexada (composto 37, modelo bastão/bolas). Recorte de 5 Å, com 22 aminoácidos (Gly14, Ser15, Gly16, Leu18, Glu19, Ala20, Trp22, Asn23, Cys53, Val54, Val59, Ile107, Tyr111, Met114, Thr335, Pro336, Ile339, Gly459, His461, Glu466, Cys469 e Ser470). Os hidrogênios dos resíduos foram ocultados. Os átomos de oxigênio correspondem às moléculas de água, sem seus átomos de hidrogênio. Imagem manipulada no programa RasMol 2.7.2.1.1.

Antes dos cálculos semi-empíricos, as estruturas ancoradas foram previamente otimizadas por mecânica molecular (campo de força MMFF94 [HALGREN, 1996]), através do programa PC Spartan Pro (Wavefunction, Inc.), mantendo a estrutura protéica “congelada”. Os complexos foram então convertidos no formato de entrada para cálculos com o programa Mopac 2002 através do programa Babel 1.6 [GOSPER, 1998] e submetidos à otimização através do programa Mopac 2002 (Fujitsu, Co.) com o hamiltoniano PM3 [STEWART, 1989a,b], seguindo-se os mesmos procedimentos descritos anteriormente para os compostos pterínicos e amidínicos inseridos na NOS (item 4.3.1).

O procedimento descrito acima para os compostos fenotiazínicos foi aplicado aos compostos mesoiônicos atacadados, seguindo-se a mesma metodologia descrita, tanto para o sítio da TSST, quanto para o sítio do FAD.

#### **4.4.5. Construção de um modelo tridimensional da TR de *L. amazonensis***

Como dito no item 4.1.1, não foram encontradas estruturas cristalográficas no PDB ou mesmo sequências disponíveis em bancos de dados de acesso público, como o *SwissProt/TrEMBL* (<http://www.expasy.ch/sprot/>) [BAIROCH, BOECKMANN, 1993,1991], para a TR de *L. amazonensis*. Entretanto, a partir de um sequenciamento da TR de *L. amazonensis* disponibilizado pelos laboratórios Bioquímica de Tripanossomatídeos, Genômica Funcional e Bioinformática, e Imunopatologia da FIOCRUZ [CASTRO-PINTO *et al.*, 2008], foi possível realizar a construção de um modelo tridimensional para a enzima.

Inicialmente, foi explorada a técnica de modelagem por homologia (modelagem comparativa). A sequência usada como molde para a montagem da TR de *L. amazonensis*, a cadeia A da TR de *C. fasciculata* (código do PDB 1FEC [STRICKLAND *et al.*, 1995]), foi encontrada com a ferramenta BLAST [ALTSCHUL *et al.*, 1990], fornecida pelo servidor *Swiss-Model* (<http://swissmodel.expasy.org/>) [SCHWEDE *et al.*, 2003]. Esta ferramenta procura por estruturas na base de dados ExNRL-3D (proveniente do PDB) a partir da sequência em pesquisa, para selecionar os moldes mais apropriados para o *Swiss-Model* [SCHWEDE *et al.*, 2003]. O molde (TR de *C. fasciculata*) compartilha de alto grau de identidade (79%) com a sequência-alvo (TR de *L. amazonensis*), e sua estrutura tridimensional possui a melhor resolução encontrada (1,7 Å) dentre as sequências pesquisadas com a ferramenta BLAST [ALTSCHUL *et al.*, 1990].

Após a seleção do molde, a estrutura tridimensional foi construída com o modo “*First Approach*” do servidor *Swiss-Model* [SCHWEDE *et al.*, 2003; GUEX, PEITSCH, 1997; PEITSCH, 1995], que inclui a geração de um modelo tridimensional com o método *ProModII* e minimização de energia com o campo de força GROMOS96 [VAN GUNSTEREN *et al.*, 1996]. A **figura 4.14** demonstra a comparação da sequência primária da TR de *L. amazonensis* com o molde escolhido.

Conforme demonstrado nas **figuras 2.33 e 4.11**, o sítio ativo da enzima TR possui um formato incomum para sítios ativos, com uma fenda de extensa comunicação com o meio externo. O sítio onde se encontra complexada a TSST, conforme as estruturas cristalográficas consultadas no PDB [BERMAN *et al.*, 2000], possui resíduos provenientes das duas cadeias do homodímero. O modelo desenvolvido através do servidor *Swiss-Model* é constituído de apenas uma cadeia da proteína. Para uma predição completa e adequada das interações e complexação dos fármacos em estudo com a enzima proveniente de *L. amazonensis*, torna-se necessária a presença da outra cadeia, pois apenas com uma, faltariam muitos resíduos e os estudos semi-empíricos e de atracamento molecular possuiriam resultados incompletos.

```

• 1fecA
• UNLIGANDED CRITHIDIA FASCICULATA TRYPANOTHIONE REDUCTASE A
• 1.7 ANGSTROM RESOLUTION
• MOL_ID: 1;
• MOLECULE: TRYPANOTHIONE REDUCTASE;
• CHAIN: A, B;
• EC: 1.6.4.8;
• BIOLOGICAL_UNIT: HOMODIMER;
• OTHER_DETAILS: MONOCLINIC CRYSTAL FORM, DIMER IN THE
• ASYMMETRIC UNIT
• MOL_ID: 1;
• ORGANISM_SCIENTIFIC: CRITHIDIA FASCICULATA;
• OTHER_DETAILS: SEE STRICKLAND, ET. AL. (1995) ACTA CRYST.
• D51, 337-341
• C.STRICKLAND,P.KARPLUS
• PQS assignment: HOMO DIMERIC
• Length = 485
• Score = 782 bits (1998), Expect = 0.0
• Identities = 375/485 (77 Positives = 418/485 (85

• Query: 2 ARAYDLVVLGAGSGGLEAGWNXXXXXXXXXXXXXXXXDLQAVHGPPPLFAALGGTCVNVGCVPKK 61
RAYDLVV GAGSGGLEAGWN DLQ HGPP AALGGTCVNVGCVPKK
• Sbjct: 1 SRAYDLVVIGAGSGGLEAGWNAASLHKRRVAVIDLQKHHGPPHYAALGGTCVNVGCVPKK 60

• Query: 62 LMVTGAQYMDTLRESGGFGWEMSRESLCPNWKTLIAAKNKVVSGINESYKMKFAETEGLS 121
LMVTGA YMDT RES GFGWE RES PNWK LIAAKNK VSGIN SY MFA TEGL
• Sbjct: 61 LMVTGANYMDTIRESAGFGWELDRSVPNWKALIAAKNKAVSGINDSYEGMFADTEGLT 120

• Query: 122 FHMFGAFQDAHTVVVRKSEDQNSDVLDTLDEYILLIATGSWPTRLGIPGDELCSITSNEA 181
FH GFGA QD HTV VR S D NS VLETLDTEYIL ATGSWP LGI GD LCITSNEA
• Sbjct: 121 FHQGFALQDNHTVLVRESADPNSAVLETLDTEYILLATGSWPQHLGIEGDDLCITSNEA 180

• Query: 182 FYLEDAPKRTL CVGGYIAVEFAGIFNGYKPRGGIvdLCYRGDVLIRGFDLEVRKSLTKQ 241
FYL APKR LCVGGGYI EFAGIFN YK RGG vdl YRGD ILRGFD E RK LT Q
• Sbjct: 181 FYLDEAPKRALCVGGYISIEFAGIFNAYKARGGQvdLAYRGDMILIRGFDSELKQLTEQ 240

• Query: 242 LEANGIQVRTKLSPTKITKNEDGSKVHFNDGTEADYDQVMLAIGRVPRSQALQLDKAGV 301
L ANGI VRT P K TKN DG HV F G EADYD VMLAIGRVPRSQ LQL KAGV
• Sbjct: 241 LRANGINVRTHENPAKVTKNADGTRHVVVFESGAEADYDVMLAIGRVPRSQTLQLEKAGV 300

• Query: 302 KTGKNDAVLvdAYSKTSMDNIYAIGDVTSRVMLTPVAINEGAAFVETVFAGKPSATDHTK 361
KN A vdAYSKT DNIYAIGDVT RVMLTPVAINEGAAFV TVFA KP ATDHTK
• Sbjct: 301 EVAKNGAIKvdAYSKTNvdNIYAIGDVTDRVMLTPVAINEGAAFvdTVFANKPRATDHTK 360

• Query: 362 VACAIFSIPPITGTCGLTEEEAAKIYETVAVYENSFTPLMHNISGSKYKFMVRIITNESD 421
VACA FSIPP G CG EE AAK Y VAVYE SFTPLMHNISGS YK FMVRI TN D
• Sbjct: 361 VACA VFSIPPMGVCGYVEEDA AKKYDQVAVYESSFTPLMHNISGTYKFMVRIVTNHAD 420

• Query: 422 GEVLGVHMLGESAPEIIQSVGICMKGAKISDFHNTIGVHPTSABEELCSMRAPAYFYENG 481
GEVLGVHMLG S PEIIQSV IC KMGAKISDF NTIGVHPTSABEELCSMR PAYFYE G
• Sbjct: 421 GEVLGVHMLGDSPEIIQSVVAICLKGAKISDFYNTIGVHPTSABEELCSMRTPAYFYEK 480

• Query: 482 KRVEK 486
KRVEK
• Sbjct: 481 KRVEK 485

```

Figura 4.14: Comparação entre as seqüências primárias da seqüência-alvo e do modelo escolhido, gerada pela ferramenta BLAST [ALTSCHUL *et al.*, 1990].



Para contornar essa limitação do modelo comparativo obtido, foi utilizada a substituição direta de resíduos de aminoácidos em uma estrutura cristalográfica para obtenção de um modelo completo da TR de *L. amazonensis*. Para uma avaliação inicial da qualidade de modelos de TR gerados e para treino no uso dessa técnica, construiu-se inicialmente um modelo apenas do sítio de interação da TR de *L. amazonensis*. Foram identificados e selecionados todos os resíduos e moléculas de água com ao menos 1 átomo localizado a 4 Å de distância da TSST na estrutura cristalográfica da TR de *T. cruzi*, em complexo com a TSST (1BZL [BOND *et al.*, 1999]), pois a estrutura utilizada como molde (1FEC) no modelo inicial não possui a TSST complexada. O sítio ativo selecionado desta forma era composto por 7 moléculas de água e 23 aminoácidos, provenientes das cadeias A e B do homodímero de *T. cruzi*. Em seguida, os aminoácidos correspondentes da TR de *L. amazonensis* foram substituídos, com a ferramenta “mutate” do programa *Deep View 3.7* [GUEX *et al.*, 1999; GUEX, PEITSCH, 1997]. Os átomos de hidrogênio foram incluídos com o programa PC Spartan Pro (Wavefunction Inc.) e as coordenadas correspondentes aos átomos de hidrogênio e átomos do substrato tiveram suas energias preliminarmente otimizadas por mecânica molecular (campo de força MMFF94 [HALGREN, 1996]). Após isto, os modelos foram otimizados com o método semi-empírico PM3 [STEWART, 1989a,b], através do programa Mopac 2002 (Fujitsu, Co.). Como nos casos anteriores, as ligações peptídicas foram mantidas fixas durante a minimização de energia pelo método semi-empírico.

A partir dos resultados obtidos, um modelo para a estrutura completa foi construído através do programa *Deep View 3.7* (Swiss PDB Viewer). As ferramentas integradas disponíveis no programa para alinhamento de sequências e algoritmos de sobreposição de estruturas [GUEX *et al.*, 1999; GUEX, PEITSCH, 1997] foram usadas para comparar a estrutura da TR de *L. amazonensis* com estruturas tridimensionais conhecidas de TRs, determinadas experimentalmente por cristalografia de raios-X. Usou-se a estrutura cristalográfica proveniente de *C. fasciculata* (código PDB 1FEC [STRICKLAND *et al.*, 1995]) como modelo e as mutações dos aminoácidos em divergência com a sequência de *L. amazonensis* foram feitas manualmente, com a ferramenta de mutação disponível no programa (“mutate”), com posterior minimização de energia por mecânica molecular (campo de força GROMOS96 [VAN GUNSTEREN *et al.*, 1996]), através da ferramenta disponível no próprio programa (“Energy minimization”).



de FAD (pois a estrutura não possui a TSST em seu sítio). Como o recorte de 20 Å feito na estrutura da TR de *T. cruzi* possui ambos os sítios, um recorte de 20 Å no modelo a partir do FAD também possui o sítio da TSST em sua estrutura.

Foram atracadas a este sítio as estruturas dos mesoiônicos, amidinas e fenotiazinas, para comparação dos valores de aptidão obtidos frente aos 2 parasitos. Pelas dimensões da molécula de FAD, este sítio possui um grande tamanho, maior que o anterior, possuindo 342 aminoácidos da cadeia A e 46 aminoácidos da cadeia B (sendo o sítio selecionado a partir do FAD pertencente à cadeia A).

Por não ter sido possível obter soluções para o “*redocking*” da molécula do NADPH com a mesma qualidade da obtida para a TSST e o FAD (conforme será descrito no item 5.2.1), decidiu-se que cálculos perante este sítio não seriam feitos para a estrutura de *L. amazonensis*.

Para avaliar a influência da solvatação desta estrutura, foram realizados cálculos com a presença e ausência das moléculas de água solvatantes. As estruturas cristalográficas possuem um grande número de moléculas de água — sendo assim, para o cálculo sem as moléculas de água, estas foram deletadas da matriz que descreve sua estrutura.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Modelos de Inibição da NOS

#### 5.1.1. Modelo pterínico de inibição da NOS

Considerações sobre os termos que influenciam a atividade de inibidores enzimáticos permitem a proposição da equação **29** [OLIVEIRA *et al.*, 2006; OLIVEIRA, 2005], demonstrada e explicada no item 4.2.12.

Valores de  $K_i$  não estão disponíveis para a série de derivados deste estudo, mas sim de  $IC_{50}$ . Assumindo que estes valores sejam proporcionais aos valores de  $K_i$ , a equação **29** (com outros coeficientes) deve também permitir o cálculo do  $IC_{50}$  (**31**) na presença dos inibidores:

$$\begin{aligned} RT \ln K_i &= c_1(\Delta G_{solv} + c_2)^2 + c_3 \Delta H_{int} + c_4 N_{LR} + c_5 \\ RT \ln IC_{50} &= c_1'(\Delta G_{solv} + c_2')^2 + c_3' \Delta H_{int} + c_4' N_{LR} + c_5' \end{aligned} \quad (31)$$

A equação proposta (equação **31**) foi aplicada a um conjunto de 4-oxo-pteridinas 6,7-dissubstituídas e de 4-oxo-5,6,7,8-tetraidropteridinas 5,6-dissubstituídas.  $\Delta H_{int}$  foi calculado como a diferença entre o  $\Delta H_f$  do complexo ( $\Delta H_{cpx}$ ) e o somatório do  $\Delta H_f$  dos seus componentes separados ( $\Delta H_{lig} + \Delta H_{sa}$ ), conforme demonstrado no item 4.2.12 (equação **30**). Os valores de  $\Delta G_{solv}$  foram calculados com o método SM5.4 [CHAMBERS *et al.*, 1996] do programa PC Spartan Pro (Wavefunction, Inc.), e os valores de  $N_{LR}$  foram obtidos por inspeção visual dos complexos após minimização. Os coeficientes  $c_1$ - $c_5$  foram obtidos pela aplicação do modelo de regressão múltipla aos dados disponíveis, conforme demonstrado na equação **32**:

$$\ln(IC_{50}) = 5,16 \cdot 10^{-3} \Delta H_{int} - 1,43 \cdot 10^{-1} \Delta G_{solv} - 1,68 \cdot 10^{-3} \Delta G_{solv}^2 + 9,46 \cdot 10^{-2} N_{LR} + 0,78 \quad (32)$$

Os valores calculados encontram-se na **tabela 5.1**. Os valores de  $IC_{50}$  calculados pela equação apresentam boa correlação (coeficiente de correlação linear R=0,90) com os dados experimentais, conforme demonstrado na **figura 5.1**.

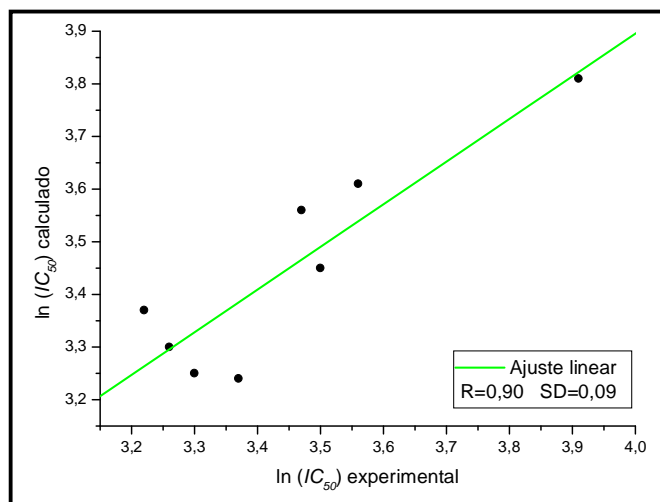
**Tabela 5.1:** Valores calculados para os 8 compostos em estudo (sítio de 6 Å).

Comp.	$\Delta H_{lig}^a$	$\Delta H_{cpx}^a$	$\Delta H_{int}^{a,b}$	$\Delta G_{solv}^a$	$N_{LR}$	$\ln(IC_{50}NOS)$ calculado	$\ln(IC_{50}NOS)$ experimental <sup>c</sup>
1	44,22	-1151,72	-5,97	-22,40	1	3,30	3,26
2	37,68	-1123,22	-5,05	-20,92	1	3,25	3,30
3	61,35	-1120,97	7,65	-23,50	1	3,45	3,50
4	-62,62	-1258,28	-5,69	-28,91	0	3,61	3,56
5	74,93	-1117,61	-2,57	-27,13	3	3,81	3,91
6	9,75	-1183,17	-2,95	-24,62	2	3,56	3,47
7	7,01	-1182,97	-0,01	-23,42	3	3,52	3,00
8	5,13	-1179,33	5,51	-21,29	2	3,37	3,22

<sup>a</sup> Valores em kcal/mol

<sup>b</sup> Para cálculo de  $\Delta H_{int}$ ,  $\Delta H_{sa} = -1189,97$  kcal/mol.

<sup>c</sup> KOTSONIS *et al.* (2001)



**Figura 5.1:** Gráfico:  $\ln(IC_{50})$  experimental X  $\ln(IC_{50})$  calculado. Gerado com o programa Origin 6.0.

A boa correlação encontrada entre os dados de atividade calculada e experimental sugere que o modelo teórico desenvolvido é adequado para a determinação da atividade inibitória das 4-oxo-pteridinas 6,7-dissubstituídas e de 4-oxo-5,6,7,8-tetraidropteridinas 5,6-dissubstituídas sobre a NOS.

### 5.1.2. Aplicação do modelo pterínico de inibição da NOS às amidinas

Pelo maior volume das amidinas comparadas às estruturas anteriores, foi necessário o uso do sítio de 6 Å aumentado de 12 para 15 aminoácidos (item 4.3.2), para o qual se encontrou o valor de  $\Delta H_{sa}$  de -1408,5 kcal/mol.

A correlação expressa na equação **32** mostra como cada termo ( $\Delta H_{int}$ ,  $\Delta G_{solv}$ ,  $N_{LR}$ ) influencia o valor de  $\ln(IC_{50})$  dos inibidores da NOS. Entretanto, sua extrapolação para outras séries de inibidores, como as amidinas, deve ser considerada com precaução. Como a série de compostos usada na obtenção da equação **32** e a série das amidinas apresentam diferenças estruturais significativas, a aplicação da equação às amidinas não deve levar a resultados quantitativos da atividade prevista. Contudo, como as estruturas das amidinas são semelhantes entre si, os erros associados com esta aplicação também devem ser semelhantes para toda a série avaliada e, portanto, é razoável assumir que os resultados obtidos devem se manter paralelos aos valores da atividade real dos inibidores propostos. Desse modo, os resultados da aplicação direta da equação **32** às amidinas podem ser considerados como um indicativo semi-quantitativo da atividade inibitória destas estruturas, útil na análise *comparativa* da atividade prevista para a série de compostos proposta (**tabelas 5.2 e 5.3**, a seguir).

**Tabela 5.2:** Valores calculados para as estruturas amidínicas, no estado **neutro**.

<b>Cmp.</b>	$\Delta H_{lig}^a$	$\Delta H_{cpx}^a$	$\Delta H_{int}^a$	$\Delta G_{solv}^a$	$N_{LR}$	<b><math>\ln(IC_{50} \text{ NOS})</math> calculado</b>
<b>9</b>	60,55	-1365,77	-17,82	-6,73	1	1,70
<b>10</b>	92,25	-1332,07	-15,82	-5,46	1	1,55
<b>11</b>	106,53	-1317,83	-15,86	-5,97	1	1,61
<b>12</b>	89,49	-1340,13	-21,12	-6,98	1	1,71
<b>13</b>	98,13	-1324,62	-14,25	-5,70	1	1,59

<sup>a</sup> Valores em kcal/mol.

**Tabela 5.3:** Valores calculados para as estruturas amidínicas, no estado **catiônico**.

<b>Cmp.</b>	$\Delta H_{lig}^a$	$\Delta H_{cpx}^a$	$\Delta H_{int}^a$	$\Delta G_{solv}^a$	$N_{LR}$	<b><math>\ln(IC_{50} \text{ NOS})</math> calculado</b>
<b>9</b>	195,8	-1335,48	-122,78	-40,99	1	3,46
<b>10</b>	229,89	-1297,94	-119,33	-42,06	1	3,48
<b>11</b>	245,11	-1283,27	-119,88	-42,23	1	3,48
<b>12</b>	235,45	-1298,42	-125,37	-48,09	1	3,43
<b>13</b>	235,28	-1323,04	-149,82	-40,28	1	3,31

<sup>a</sup> Valores em kcal/mol.

O mesmo procedimento foi aplicado às amidinas propostas neste trabalho, utilizando-se a equação **32** para cálculo de  $IC_{50}$  e o mesmo sítio ativo (mesmo valor de  $\Delta H_{sa}$ ), conforme demonstrado nas **tabelas 5.4 e 5.5**:

**Tabela 5.4:** Valores calculados para as estruturas amidínicas propostas, no estado **neutro**.

Cmp.	$\Delta H_{lig}^a$	$\Delta H_{cpx}^a$	$\Delta H_{int}^a$	$\Delta G_{solv}^a$	$N_{LR}$	$\ln(IC_{50}NOS)$ calculado
<b>16</b>	34,35	-1389,99	-15,84	-7,99	1	1,86
<b>17</b>	67,81	-1357,65	-16,96	-6,99	1	1,74
<b>18</b>	53,35	-1370,35	-15,20	-10,15	1	2,12
<b>19</b>	24,1	-1406,59	-22,19	-6,61	1	1,66
<b>20</b>	35,91	-1387,08	-14,49	-10,37	1	2,15
<b>21</b>	36,24	-1388,7	-16,44	-9,31	1	2,02
<b>22</b>	-2,79	-1429,09	-17,80	-12,07	1	2,32
<b>23</b>	70,75	-1351,51	-13,76	-7,99	1	1,87

<sup>a</sup> Valores em kcal/mol.**Tabela 5.5:** Valores calculados para as estruturas amidínicas propostas, no estado **catiônico**.

Cmp.	$\Delta H_{lig}^a$	$\Delta H_{cpx}^a$	$\Delta H_{int}^a$	$\Delta G_{solv}^a$	$N_{LR}$	$\ln(IC_{50}NOS)$ calculado
<b>16</b>	171,85	-1372,23	-135,58	-42,95	1	3,41
<b>17</b>	205,9	-1328,51	-125,91	-43,06	1	3,46
<b>18</b>	189,31	-1338,38	-119,19	-44,91	1	3,49
<b>19</b>	156,46	-1378,43	-126,39	-41,67	1	3,45
<b>20</b>	173,61	-1371,88	-136,99	-46,19	1	3,39
<b>21</b>	173,48	-1354,35	-119,33	-45,52	1	3,49
<b>22</b>	143,08	-1400,5	-135,08	-47,97	1	3,38
<b>23</b>	207,98	-1324,79	-124,27	-42,92	1	3,46

<sup>a</sup> Valores em kcal/mol.

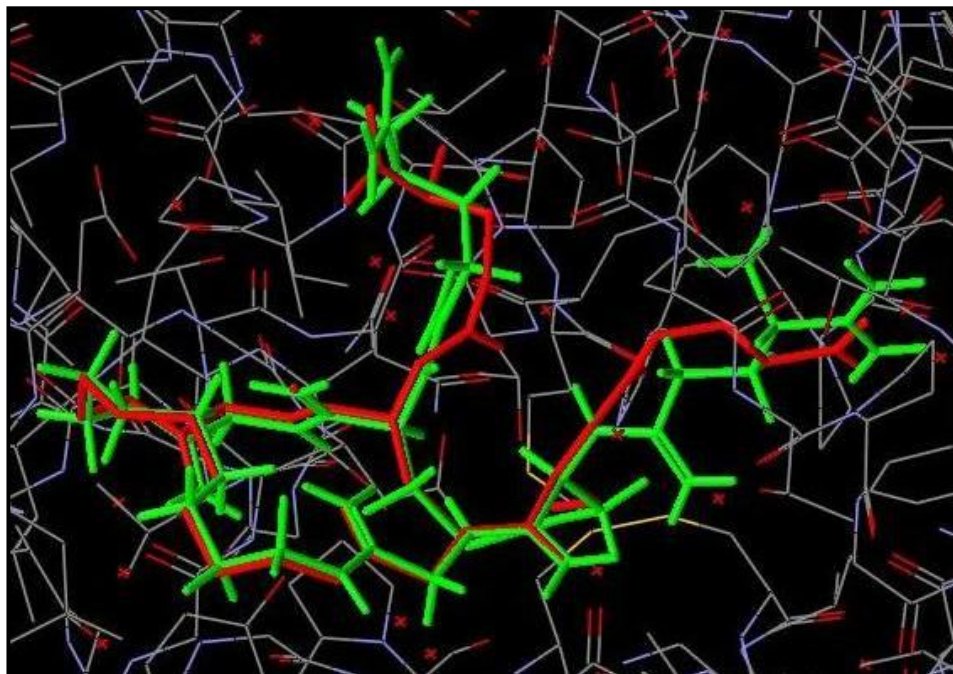
Mesmo diante das limitações do uso da equação **32** para estruturas em geral, a aplicação do modelo desenvolvido à série da amidinas (tanto para as inibidoras conhecidas da enzima quanto para as propostas neste trabalho) permite que algumas conclusões importantes podem ser obtidas. As modificações estruturais propostas não levaram a melhorias significativas do perfil de interação com a NOS. Os resultados sugerem também que os compostos seriam mais ativos [menor  $\ln(IC_{50})$ ] na forma neutra, o que pode ser descrito como uma consequência direta da energia livre de solvatação ( $\Delta G_{solv}$ ) mais favorável da forma catiônica. Se o sítio de interação das estruturas no parasito estiver localizado em uma organela acídica, o resultado é indicativo de que a atividade destes compostos pode ser melhorada através da retirada do seu sítio de protonação.

## 5.2. Modelos de Inibição da TR

### 5.2.1. Validação do atracamento (“redocking”)

Conforme citado anteriormente, a TSST e o FAD foram atracados em seus próprios sítios na estrutura proveniente de *T. cruzi*, para comprovar se o atracamento está sendo feito pelo programa GOLD da forma adequada (comparação dos compostos co-cristalizados com os atracamentos obtidos). Para os 2 compostos, foram obtidas várias orientações/conformações, com escores de aptidão variados. Os maiores escores de aptidão encontrados foram 62,57 para a TSST em seu sítio, e 117,28 para o FAD, com o *Goldscore* (o escore escolhido [VERDONK *et al.*, 2003]).

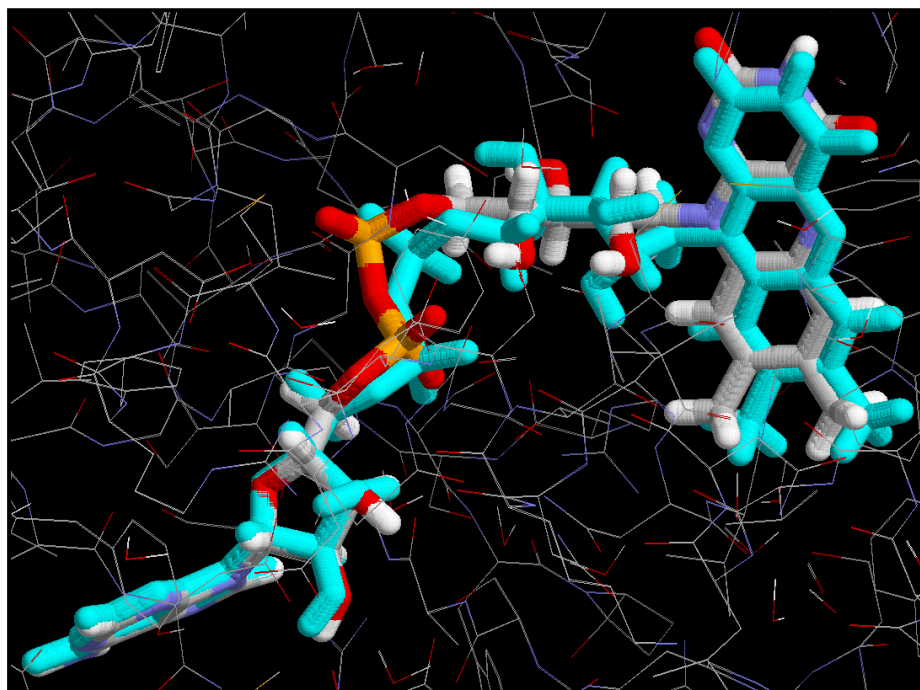
A **figura 5.2** apresenta a sobreposição da melhor conformação da TSST atracada com a TSST co-cristalizada, mostrando que o atracamento feito levou a uma estrutura de conformação extremamente similar à obtida experimentalmente. Não foram observadas diferenças nas interações com os aminoácidos ou grandes modificações conformacionais em relação à estrutura co-cristalizada.



**Figura 5.2:** Sobreposição das estruturas da TSST co-cristalizada (em **vermelho**) e atracada (em **verde**), após atracamento com o programa GOLD. Átomos de H da proteína omitidos. Imagem gerada no programa Hermes 1.3.



Assim como a estrutura da TSST, o FAD, ao ser atracado em seu próprio sítio ativo, também demonstrou poucas modificações conformacionais em relação à estrutura co-cristalizada, e nenhuma modificação em relação às interações com os aminoácidos (**figura 5.3**). Seu grupamento adenina (*vide* **figura 2.35**, item 2.5.2) encontra-se em perfeita sobreposição com o da estrutura co-cristalizada.

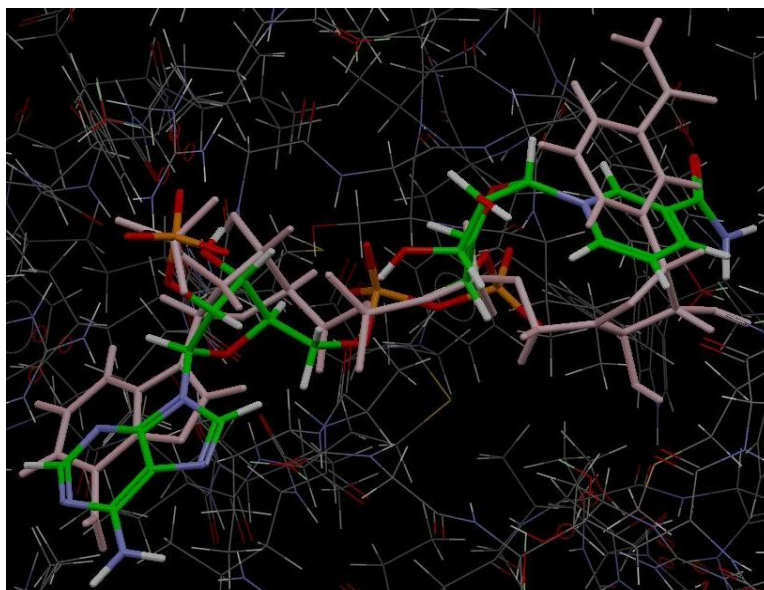


**Figura 5.3:** Sobreposição das estruturas do FAD co-cristalizado (no padrão CPK de cores) e atracado (em **ciano**), após atracamento com o programa GOLD. Átomos de H da proteína omitidos. Imagem gerada no programa RasMol 2.7.2.1.1.

Esses resultados demonstram que o programa GOLD, com a função de aptidão escolhida (*Goldscore* [VERDONK *et al.*, 2003]), é capaz de levar a atracamentos confiáveis em ambos os sítios demonstrados, quanto ao posicionamento da conformação obtida com o maior escore de aptidão.

Em relação ao NADPH, no entanto, o resultado obtido não apresentou a mesma qualidade. Conforme descrito anteriormente, foi utilizada uma estrutura proveniente de *C. fasciculata*, e testados 4 funções de aptidão. Nenhuma das funções foi capaz de levar a uma conformação que possua uma boa sobreposição com a estrutura co-cristalizada, como demonstrado acima para a TSST e o FAD.

Nenhum posicionamento encontrado se sobrepõe bem à estrutura co-cristalizada, nem mesmo aquele com a função de aptidão com os valores mais altos obtidos, *Goldscore* [VERDONK *et al.*, 2003]. Isto faz com que os atracamentos encontrados perante este sítio não sejam tão confiáveis quanto para os outros 2 sítios. A **figura 5.4** apresenta a sobreposição da estrutura de maior escore de aptidão obtida com o *Goldscore* [VERDONK *et al.*, 2003] à estrutura cristalográfica.



**Figura 5.4:** Sobreposição das estruturas do NADPH co-cristalizado (em **rosa claro**) e obtida (carbonos em **verde**) por atracamento com o programa GOLD (função *Goldscore*), demonstrando várias diferenças em sua conformação. Imagem gerada no programa Hermes 1.3.

Para tentar solucionar este problema, foram feitos novos atracamentos, porém utilizando extensão de sítio de interação de 15 Å, e não mais de 10 Å. Tal procedimento poderia fazer com que interações que não estavam sendo encontradas pelo programa fossem incluídas, em uma gama maior de resíduos no sítio. No entanto, o maior escore de aptidão obtido foi de 75,51, na mesma faixa do maior valor encontrado com o sítio de 10 Å. Os valores restantes são ainda menores, sendo o menor deles de 55,36, pois muitas das conformações obtidas estavam atracadas fora do sítio (parte externa da estrutura cristalográfica utilizada). O posicionamento da conformação de maior escore é ainda mais diferenciado em relação ao NADPH co-cristalizado. Com isto, o sítio de 10 Å utilizado anteriormente foi mantido.

### 5.2.2. Modelo TR I

Inicialmente, foi feito o atracamento das fenotiazinas no sítio ativo da TR (o sítio da TSST), com o programa GOLD. Essa série foi escolhida inicialmente para avaliar o método, por sua grande quantidade de estruturas disponíveis e de dados de inibição da TR. Após a obtenção das estruturas atracadas, foi gerada uma série de 20 descritores dos complexos formados, que foram explorados para a busca de funções de correlação com a atividade. Para os compostos fenotiazínicos (compostos 24 a 43) atracados no sítio da TSST, a melhor correlação obtida entre os diversos descritores calculados, selecionados manualmente de forma tentativa, levou à seguinte equação (33):

$$\ln(IC_{50}) = c_1 D_{VDW} + c_2 D_{HYD} + c_3 D_{AH} + c_4 \quad (33)$$

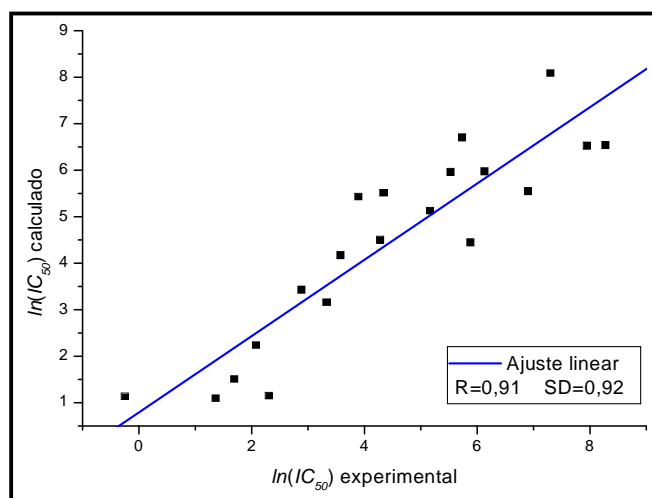
onde  $D_{vdw}$  é a contribuição em interações de vdW entre ligante/proteína,  $D_{HYD}$  o número de átomos hidrofóbicos do ligante acessíveis ao solvente, e  $D_{AH}$  o número de aceptores de ligação hidrogênio do ligante. Os coeficientes  $c_1$ - $c_4$  foram obtidos ajustando-se a equação aos valores experimentais de  $\ln(IC_{50})$  [KHAN *et al.*, 2000; CHAN *et al.*, 1998] (equação 34):

$$\ln(IC_{50}) = -0,042 D_{VDW} - 0,279 D_{HYD} + 0,788 D_{AH} + 8,351 \quad (34)$$

Na **tabela 5.6** estão demonstrados os descritores calculados que participam da correlação encontrada (o restante dos descritores obtidos se encontra no **anexo H**). Os valores de atividade calculada pela equação 34 apresentam boa correlação ( $R=0,91$ ) com os dados experimentais (**figura 5.5**).

**Tabela 5.6:** Valores de aptidão e de atividade calculados e obtidos experimentalmente dos compostos fenotiazínicos, e descritores de importância ( $D_{vdW}$ ,  $D_{HYD}$  e  $D_{AH}$ ), calculados para os compostos escolhidos.

Composto	Aptidão (TSST)	$\ln(IC_{50})$ calc.	$\ln(IC_{50})$ exp.	$D_{vdW}$	$D_{HYD}$	$D_{AH}$
24	38,77	4,17	3,57	30,96	16	2
25	40,01	4,45	5,88	36,50	17	3
26	36,79	6,54	8,27	31,99	13	4
27	37,22	5,98	6,13	33,39	12	3
28	32,69	5,55	6,89	31,38	11	2
29	42,01	4,5	4,28	35,34	17	3
30	36,59	8,09	7,3	28,29	8	4
31	39,97	5,96	5,53	28,32	10	2
32	34,21	6,71	5,73	30,40	7	2
33	26,06	5,13	5,16	33,47	15	3
34	6,71	5,52	4,34	30,86	14	3
35	34,63	6,53	7,94	26,71	11	3
36	36,78	5,43	3,89	31,80	17	4
37	45,52	2,24	2,08	38,34	19	1
38	49,72	1,14	-0,25	37,89	23	1
39	48,21	3,43	2,88	40,85	20	3
40	37,48	1,1	1,36	38,71	23	1
41	45,25	1,51	1,69	33,33	28	3
42	50,23	1,15	2,3	37,63	23	1
43	38,39	3,16	3,33	29,59	17	1



**Figura 5.5:** Gráfico:  $\ln(IC_{50})$  experimental  $\times$   $\ln(IC_{50})$  calculado por correlação com descritores gerados através do atracamento das fenotiazinas. Gerado com o programa Origin 6.0.

A correlação obtida através do uso da técnica de atracamento molecular e análise de descritores dos complexos enzima/inibidores mostrou que os fatores mais importantes previstos na interação dessa série de ligantes incluem a energia de vdW, as interações

hidrofóbicas e a capacidade de receber ligações de hidrogênio dos inibidores. Os dois primeiros se justificam pelo fato das fenotiazinas possuírem um núcleo central contendo anéis aromáticos, fazendo com que interações entre grupos apolares e/ou aromáticos sejam de grande importância. O terceiro descritor se justifica pelo fato de boa parte das cadeias laterais dos compostos conterem grupamentos aceptores e doadores de ligação de hidrogênio.

Os valores obtidos pelo cálculo das atividades das fenotiazinas que não entraram na construção do modelo (57, 58 e 59), usando-se a equação obtida (34), estão demonstrados na **tabela 5.7**. O modelo obtido gerou valores na mesma ordem observada experimentalmente, com pequenas diferenças entre os valores, sugerindo que o modelo pode ser utilizado para prever se um composto é ou não ativo contra esta enzima.

**Tabela 5.7:** Valores de atividade calculados e obtidos experimentalmente, e descritores de importância ( $D_{vdw}$ ,  $D_{HYD}$  e  $D_{AH}$ ) calculados para os 3 compostos fenotiazínicos escolhidos.

Composto	$\ln(IC_{50})$ calc.	$\ln(IC_{50})$ exp.	$D_{vdw}$	$D_{HYD}$	$D_{AH}$
57	2,15	2,48	40,51	19	1
58	5,28	4,7	31,28	12	2
59	7,35	6,08	27,14	8	3

A partir dos bons resultados obtidos com a metodologia de *docking* combinada com a geração de descritores para a geração de modelos de previsão de atividade, aplicou-se o mesmo método aos compostos mesoiônicos (compostos 44 a 56). Foram feitos atracamentos de maneira semelhante à feita para as fenotiazinas. Como estes compostos ainda não possuem mecanismos conhecidos de inibição perante a TR, os atracamentos foram feitos nos sítios da TSST, FAD e NADPH, nas formas catiônica e neutra, para determinar qual a melhor forma de inibição desta enzima por meio de um modelo teórico.

Uma comparação entre os escores de aptidão e o  $\ln(IC_{50})$  experimental contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* demonstra uma melhor correlação para os atracamentos no sítio do FAD ( $R=0,64$ ) do que no sítio da TSST ( $R=-0,42$ ) e do NADPH ( $R=-0,26$ ). A **tabela 5.8** demonstra os valores obtidos na forma catiônica (a que possui os maiores escores e provavelmente constitui o modo mais ativo perante a enzima), para comparação.

**Tabela 5.8:** Escores de aptidão calculados para o sítio da TSST, NADPH e FAD, no atracamento dos compostos mesoiônicos (44 – 56) na forma **catiônica**.

Composto	Aptidão (TSST)	Aptidão (NADPH)	Aptidão (FAD)
44	40,19	48,08	63,04
45	40,65	43,88	68,01
46	44,21	45,61	61,71
47	43,06	45,12	67,47
48	40,61	47,78	68,41
49	42,61	54,24	69,24
50	41,65	43,82	67,69
51	43,99	49,20	67,90
52	39,43	46,47	66,32
53	44,61	47,92	57,75
54	46,65	45,54	64,22
55	43,35	49,91	67,35
56	44,84	49,81	67,57

Diferentes dos descritores termodinâmicos obtidos no modelo de inibição da NOS, que descrevem características gerais do processo de interação, os descritores gerados a partir das estruturas obtidas pelo programa Hermes 1.3 (CCDC Ltd.) revelam características específicas de cada série analisada. Por isso, foi buscada uma nova função de correlação a partir dos 20 descritores calculados com o programa Hermes 1.3 (CCDC Ltd.). A melhor correlação obtida entre os descritores calculados (forma catiônica no sítio do FAD), selecionados de forma tentativa, levou à uma equação onde os descritores mais significativos foram (**equação 35**):

$$\ln(IC_{50}) = c_1 D_{FTN} + c_2 D_{TRS} + c_3 D_{OPT} + c_4 \quad (35)$$

onde  $D_{FTN}$  é o escore de aptidão obtido,  $D_{TRS}$  o valor do componente torcional da função de aptidão,  $D_{OPT}$  o número dos doadores de ligação hidrogênio da proteína oclusos pelo ligante; os coeficientes  $c_1$ - $c_4$  foram obtidos ajustando-se a equação por correlação múltipla aos valores de  $\ln(IC_{50})$ , obtidos experimentalmente perante a forma promastigota do parasito (*L. amazonensis* [SILVA *et al.*, 2002]) (**equação 36**):

$$\ln(IC_{50}) = 0,019D_{FTN} + 0,395D_{TRS} + 0,325D_{OPT} + 1,050 \quad (36)$$

A função de aptidão “*Goldscore*” [VERDONK *et al.*, 2003] tem um termo para a energia de vdW proteína-ligante, um termo para a energia de ligação hidrogênio proteína-

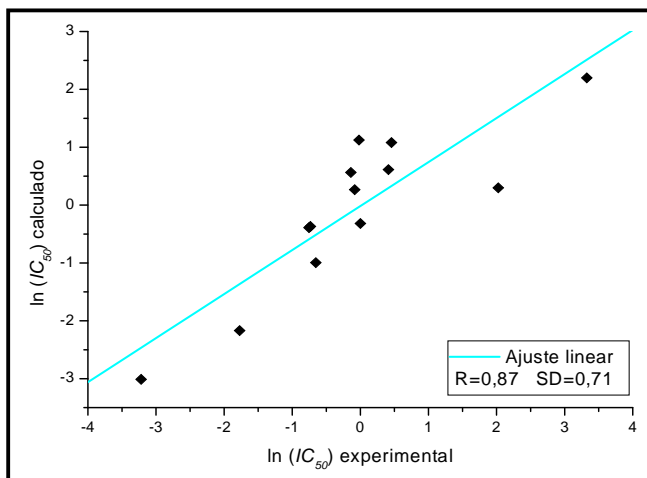
ligante, um termo para a energia de vdW interna do ligante e um termo de energia torcional do ligante. Como o escore de aptidão foi um dos descritores da correlação, todos esses termos de energia foram incluídos, o que mostra que o volume, a flexibilidade e a capacidade de fazer ligações hidrogênio tiveram papel significativo na interação. A estrutura dos compostos mesoiônicos, uma combinação de 4 anéis aromáticos, ligações flexíveis e grupos que podem interagir por meio de ligações de hidrogênio explicam a correlação com o descritor  $D_{FTN}$ . O termo torcional reaparece no descritor  $D_{TRS}$  e o efeito das ligações de hidrogênio reaparece no descritor  $D_{OPT}$ .

Os valores envolvidos estão listados na **tabela 5.9**. Os diversos descritores calculados para os compostos mesoiônicos, em ambos os sítios, encontram-se no **anexo I**. A atividade calculada pela equação acima (**36**) possui uma boa correlação ( $R=0,87$ , **figura 5.6**) com os dados experimentais, quando utilizados os valores calculados para o sítio do FAD.

**Tabela 5.9:** Valores experimentais e calculados de  $\ln(IC_{50})$  e escores de aptidão para o sítio do FAD, no atracamento dos compostos mesoiônicos (44 – 56) na forma **catiônica**; descritores de importância para a equação 35.

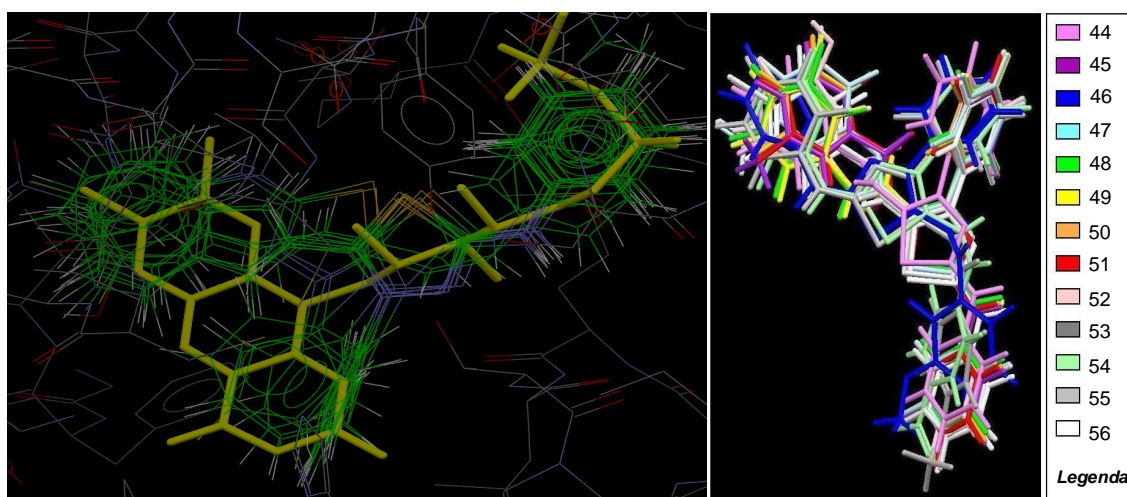
Composto	$\ln(IC_{50})$ exp*	$\ln(IC_{50})$ calc	Aptidão (FAD)	$D_{TRS}$	$D_{OPT}$
44	-0,76	-0,39	63,04	-12,36	7
45	-0,02	1,12	68,01	-12,05	11
46	-1,77	-2,17	61,71	-15,98	6
47	0,00	-0,32	67,47	-13,20	8
48	-0,08	0,27	68,41	-12,59	9
49	0,41	0,61	69,24	-11,76	9
50	3,33	2,20	67,69	-10,14	12
51	-0,14	0,56	67,89	-12,64	10
52	2,03	0,30	66,32	-13,24	10
53	-3,22	-3,01	57,75	-22,03	11
54	0,46	1,08	64,22	-11,16	10
55	-0,73	-0,37	67,35	-12,51	7
56	-0,65	-0,99	67,57	-13,28	6

\* formas promastigotas ( $\mu\text{M}$ ) [SILVA *et al.*, 2002]



**Figura 5.6:**  $\ln(IC_{50})$  experimental  $\times$   $\ln(IC_{50})$  calculado por correlação com descritores gerados através do atracamento dos mesoiônicos, no sítio do FAD. Gerado com o programa Origin 6.0.

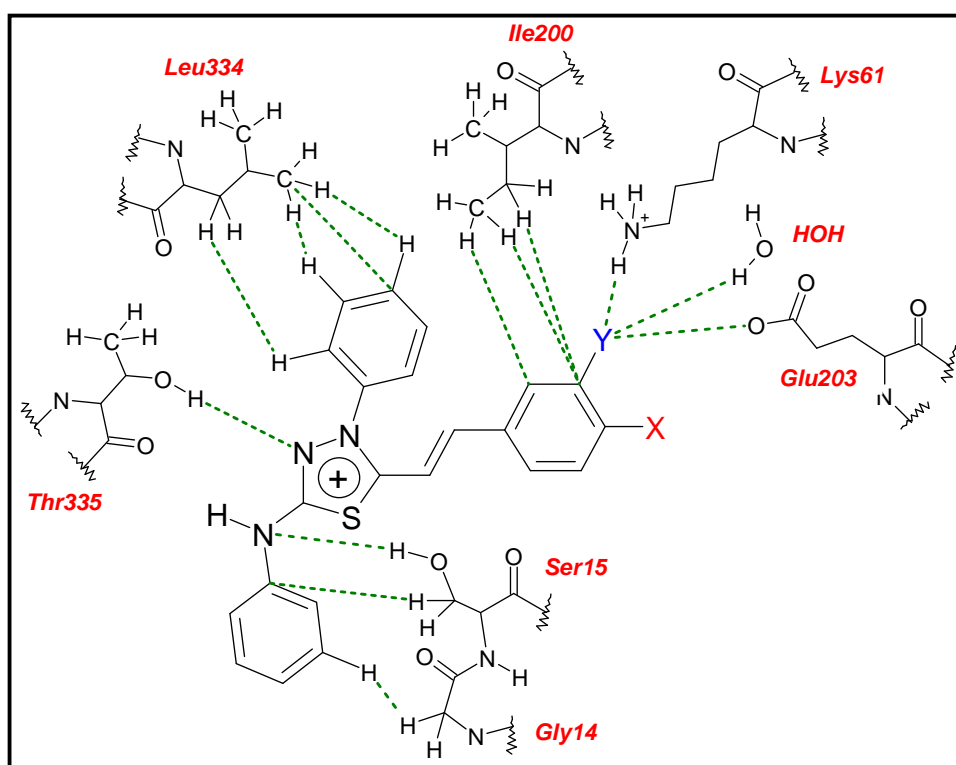
Além dos melhores escores de aptidão, os compostos mesoiônicos listados na **tabela 5.9** se apresentaram todos em posições bastante similares, quando no sítio do FAD, o que não ocorreu em relação ao sítio da TSST ou do NADPH. Nestes últimos, os compostos apresentaram-se de forma extremamente variada, cada qual em uma orientação diferente, realizando interações sem um padrão definido. Em relação ao sítio do FAD, como mostra a **figura 5.7**, os compostos ficaram atracados em posições quase idênticas: todos os anéis aromáticos ficaram voltados para os mesmos sítios, o que mostra as mesmas interações de importância para esses compostos, possuindo um padrão de atracamento.



**Figura 5.7:** À esquerda, mesoiônicos (compostos em verde) sobrepostos ao sítio do FAD. A molécula de FAD encontra-se em amarelo, para comparação. À direita, representação da maneira como os mesoiônicos se encontram atracados ao sítio do FAD, com legenda para a representação dos compostos. Imagens geradas no programa Hermes 1.3.



Por possuírem um modo de atracamento extremamente similar, todos os mesoiônicos demonstram praticamente as mesmas interações, sendo estas hidrofóbicas em sua maioria. Algumas interações entre dipolos ocorrem quando possíveis, pois são dependentes do substituinte presente na estrutura (*vide* item 4.4.3, tabela 4.4) — estas não estão presentes no caso dos compostos 44 e 45, por possuírem como substituintes X o H e CH<sub>3</sub>, respectivamente. No entanto, a ausência destas interações não fez com que os compostos apresentassem os menores valores de aptidão encontrados, pois como dito anteriormente, as interações são em sua maioria hidrofóbicas. O composto 45 possui o 3º maior valor de aptidão encontrado. Os resíduos responsáveis por estas interações são Gly14, Ser15, Lys61, Ile200, Glu203, Leu334 e Thr335. Outros resíduos contribuem com interações hidrofóbicas, porém de forma mais variada (com interações mais intensas ou fracas, dependendo da estrutura do composto em questão). Na **figura 5.8** as interações presentes em praticamente todos os compostos estão demonstradas de forma esquemática.



**Figura 5.8:** Demonstração das principais interações entre os mesoiônicos atracados e os resíduos presentes no sítio do FAD. As interações demonstradas com o substituinte Y ocorrem para os compostos que possuem grupamentos polares nesta posição; caso o composto possua o grupamento polar na posição X, estas interações ocorrem com este substituinte (*vide* item 4.4.3, tabela 4.4). Imagem gerada no programa MDL Isis Draw 2.5.

Em relação aos compostos amidínicos (compostos 9 a 23), foram obtidas várias conformações atracadas, com o cálculo dos respectivos descritores. Tais descritores encontram-se no **anexo J**. Foi atracada tanto a forma neutra quanto a catiônica das estruturas em questão, com os maiores escores de aptidão demonstrados na **tabela 5.10**.

**Tabela 5.10:** Maiores escores de aptidão encontrados para as amidinas no sítio da TSST, NADPH e FAD, nas formas neutra (neut.) e catiônica (cat.) , respectivamente.

Composto	Aptidão	Aptidão	Aptidão	Aptidão	Aptidão	Aptidão
	TSST (neut.)	TSST (cat.)	NADPH (neut.)	NADPH (cat.)	FAD (neut.)	FAD (cat.)
<b>9</b>	35,84	-17,11	38,64	-22,44	48,28	-59,12
<b>10</b>	36,46	-15,07	38,50	-7,42	50,90	-23,46
<b>11</b>	35,82	-21,92	37,34	-15,68	53,12	-56,03
<b>12</b>	39,99	-25,26	47,41	-19,59	53,55	-32,85
<b>13</b>	33,34	-43,95	36,33	-37,50	47,86	-55,09
<b>14</b>	35,75	-11,99	36,96	-9,34	51,19	-0,84
<b>15</b>	34,16	-11,26	40,30	-10,25	52,09	-48,74
<b>16</b>	35,79	15,76	39,38	-26,49	58,23	-43,66
<b>17</b>	38,88	-28,28	37,32	-25,89	22,66	-38,67
<b>18</b>	33,45	-20,57	40,50	-15,86	49,77	-114,56
<b>19</b>	35,99	-23,56	39,66	-92,36	52,17	-110,72
<b>20</b>	33,83	-92,75	36,11	21,73	49,38	-23,76
<b>21</b>	37,62	-85,86	31,92	-83,49	51,25	-113,45
<b>22</b>	33,97	-59,48	41,95	-55,76	49,76	-98,51
<b>23</b>	30,05	-39,48	36,53	-30,26	44,58	-60,67

Conforme demonstrado na tabela anterior, estes compostos geraram, em sua forma catiônica, alguns escores de aptidão com valores negativos, fato este que faria com que o atracamento destas estruturas não ocorresse, já que o escore de aptidão é o negativo da soma dos termos de energia calculados. Mesmo para as formas neutras, o maior escore encontrado no sítio da TSST foi de 39,99, enquanto para as fenotiazinas foi de 50,23, e para os mesoiônicos, de 46,65, mostrando que as interações dessas estruturas não são previstas como das mais favoráveis. Assim como para os compostos anteriores, o atracamento ocorre, em geral, de melhor forma no sítio do FAD, sendo o sítio da TSST o de atracamento mais desfavorável. No caso das amidinas, não foi encontrado qualquer padrão de atracamento, nem mesmo no sítio do FAD, de forma diferente dos mesoiônicos.

Baseado nos valores demonstrados e na falta de padrão para a complexação das amidinas, pode-se concluir que a forma pela qual elas inibem a TR provavelmente é mais

fraca, menos potente que os mesoiônicos e fenotiazinas. O sítio mais provável para a inibição, segundo os resultados obtidos, seria o sítio do FAD.

### 5.2.3. Modelo TR II

Conforme descrito anteriormente, foram criados complexos dos compostos fenotiazínicos a partir das conformações de maiores escores de aptidão, para aplicação da metodologia semi-empírica, semelhante ao procedimento desenvolvido para a NOS e os compostos pterínicos/amidínicos. Porém, como no caso das fenotiazinas estes complexos foram obtidos a partir do atracamento destes compostos no sítio da TSST, que conforme dito anteriormente possui um grande sítio ativo, cada um dos 20 compostos interagiu de uma forma diferente com o sítio, fazendo com que os resíduos presentes em cada complexo não sejam exatamente os mesmos (os resíduos, assim como sua quantidade, moléculas de água do complexo e sua carga total estão presentes no **anexo K**). Por tal motivo, não foi utilizado um único valor para o sítio ativo vazio ( $\Delta H_{sa}$ ), como no caso das pterinas e amidinas complexadas com a NOS. Para cada complexo, retirou-se a respectiva fenotiazina atracada e calculou-se o valor de  $\Delta H_{sa}$ , utilizando a mesma metodologia para os cálculos semi-empíricos anteriores. A equação gerada a partir dos valores de  $\Delta G_{solv}$ ,  $\Delta H_{int}$  e  $N_{LR}$  das fenotiazinas foi:

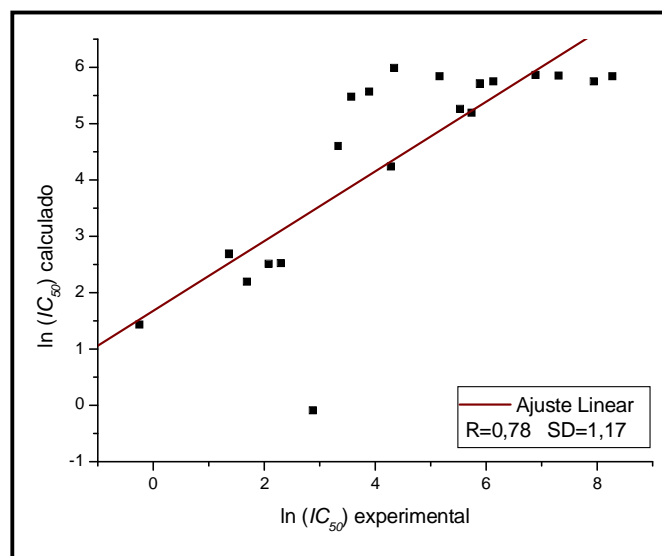
$$\ln(IC_{50}) = -0,15\Delta G_{solv} - 4,28 \times 10^{-3} \Delta G_{solv}^2 - 7,57 \times 10^{-3} \Delta H_{int} + 6,61 \times 10^{-2} N_{LR} + 4,33 \quad (37)$$

Com esta equação, foram obtidos os valores calculados de  $\ln(IC_{50})$  listados na **tabela 5.11**, a seguir. Como pode ser visto, os valores de  $\ln(IC_{50})$  não são sempre tão bem previstos pela equação 37 como pelas equações anteriores, fazendo com que a correlação entre valores experimentais e calculados seja apenas razoável ( $R=0,78$ ) (**figura 5.9**).

**Tabela 5.11:** Valores calculados para os compostos fenotiazínicos, no sítio da TSST.

Cmp.	$\Delta H_{\text{lig}}^a$	$\Delta H_{\text{cpx}}^a$	$\Delta H_{\text{sa}}^a$	$\Delta H_{\text{int}}^a$	$\Delta G_{\text{solv}}^a$	$N_{\text{LR}}$	$\ln(IC_{50})_{\text{exp.}}$	$\ln(IC_{50})_{\text{calc.}}$
24	46,69	-1388,19	-1425,33	-9,55	-8,18	2	3,57	5,48
25	7,73	-1603,27	-1593,75	-17,25	-10,58	2	5,88	5,71
26	-33,80	-1606,64	-1556,77	-16,07	-17,01	1	8,27	5,84
27	19,24	-1419,18	-1434,23	-4,19	-16,93	1	6,13	5,75
28	76,73	-1447,41	-1495,59	-28,55	-11,96	2	6,89	5,87
29	-102,22	-1351,08	-1406,43	157,57	-8,51	2	4,28	4,24
30	-71,29	-1307,52	-1235,79	-0,44	-15,99	3	7,3	5,85
31	32,15	-1289,50	-1312,02	-9,63	-7,10	0	5,53	5,26
32	70,46	-1188,64	-1310,24	51,14	-11,85	1	5,73	5,19
33	5,51	-1459,43	-1443,70	-21,24	-11,13	3	5,16	5,84
34	21,78	-1614,11	-1607,46	-28,43	-16,26	2	4,34	5,99
35	-16,19	-1459,28	-1419,91	-23,18	-11,67	1	7,94	5,75
36	-58,24	-1335,29	-1277,41	0,36	-11,58	1	3,89	5,57
37	231,61	-1526,39	-1623,41	-134,59	-49,33	2	2,08	2,51
38	221,68	-1329,59	-1431,77	-119,5	-52,90	3	-0,25	1,43
39	231,71	-1483,51	-1581,33	-133,89	-58,11	4	2,88	-0,09
40	212,02	-1517,73	-1634,98	-94,77	-47,71	3	1,36	2,69
41	155,03	-1324,13	-1319,86	-159,3	-51,30	3	1,69	2,20
42	31,05	-1551,65	-1444,46	-138,24	-49,38	2	2,3	2,52
43	56,51	-930,28	-1059,82	73,03	-6,09	1	3,33	4,60

<sup>a</sup> Valores em kcal/mol.



**Figura 5.9:**  $\ln(IC_{50})$  experimental X  $\ln(IC_{50})$  calculado a partir do modelo TR II para as fenotiazinas, no sítio da TSST. Gerado com o programa Origin 6.0.

As maiores discrepâncias entre valores demonstrados na tabela anterior envolvem duas estruturas carregadas, 39 e 40. Isso sugere que pode ser difícil obter uma única equação de

previsão da atividade a partir dos parâmetros calculados para séries de compostos que contenham estruturas neutras e carregadas juntas. Deve-se lembrar que o termo em  $\Delta G_4$  da equação 28 (item 4.2.13) foi eliminado pela suposição de que todos os complexos enzima-inibidor teriam comportamentos semelhantes no que diz respeito à passagem entre a fase aquosa e a fase gasosa, mas isso não deve ser completamente verdadeiro para a série das fenotiazinas, algumas neutras e outras carregadas.

Os mesmos procedimentos foram feitos para os compostos mesoiônicos, porém em relação ao sítio do FAD, pois seu atracamento foi muito melhor neste sítio, conforme demonstrado no item 5.2.2. Os complexos foram obtidos da mesma forma descrita, ou seja, através das conformações obtidas com maiores escores de aptidão. Porém, em relação ao mesoiônicos, temos valores experimentais obtidos frente às formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania*, e em duas formas possíveis, neutra e catiônica. Sendo assim, foram realizados cálculos semi-empíricos nas duas formas citadas (neutra e catiônica), e os valores de  $\ln(IC_{50})$  foram calculados com base nos valores obtidos experimentalmente frente às duas formas evolutivas do parasito. Estes valores, em relação às formas catiônicas, são representados pela equação 38 e 39, frente às formas promastigotas e amastigotas, respectivamente:

$$\ln(IC_{50}) = -3,63\Delta G - 3,7 \times 10^{-2} \Delta G^2 - 6 \times 10^{-3} \Delta H_{\text{int}} - 2,11N_{LR} - 78,45 \quad (38)$$

$$\ln(IC_{50}) = 9,57\Delta G + 0,12\Delta G^2 + 2 \times 10^{-3} \Delta H_{\text{int}} - 0,22N_{LR} + 1,96 \times 10^2 \quad (39)$$

Caso as formas dos compostos mesoiônicos sejam as neutras, temos as equações 40 e 41, frente às formas promastigotas e amastigotas, respectivamente:

$$\ln(IC_{50}) = -1,45\Delta G - 7 \times 10^{-3} \Delta G^2 + 4,85 \times 10^{-4} \Delta H_{\text{int}} - 3,38N_{LR} - 4,45 \quad (40)$$

$$\ln(IC_{50}) = -0,07\Delta G + 8 \times 10^{-3} \Delta G^2 + 3 \times 10^{-3} \Delta H_{\text{int}} - 0,404N_{LR} + 3,47 \quad (41)$$

Os valores resultantes destes cálculos estão demonstrados nas tabelas 5.12 e 5.13. Diferentemente das fenotiazinas, estes se encontram atracados no sítio do FAD da mesma forma (figura 5.7), tanto para as estruturas neutras como para as catiônicas. Com isto, apenas foi preciso usar um único sítio vazio.

**Tabela 5.12:** Valores calculados para os mesoiônicos, no estado **catiônico**, no sítio do FAD, com valores dos coeficientes  $c_1$ - $c_5$  calculados com base nos valores de  $IC_{50}$  das formas promastigotas [ $\ln(IC_{50})$  calc. pr.] e amastigotas [ $\ln(IC_{50})$  calc. am.].

Cmp.	$\Delta H_{lig}^a$	$\Delta H_{cpx}^a$	$\Delta H_{int}^{a,b}$	$\Delta G_{solv}^a$	$N_{LR}$	$\ln(IC_{50})$ calc. pr.	$\ln(IC_{50})$ calc. am.
44	310,43	-1919,33	-12,20	-36,96	3	-1,09	6,40
45	301,79	-1967,99	-52,22	-36,79	3	-0,99	6,44
46	273,20	-1876,23	68,12	-38,35	4	-2,51	5,61
47	307,58	-1883,82	26,16	-43,34	4	0,78	6,68
48	296,95	-1975,42	-27,82	-38,38	3	0,20	5,62
49	304,99	-1935,45	-22,88	-38,49	3	0,26	5,59
50	349,96	-1891,64	-24,04	-41,65	3	2,37	5,74
51	320,50	-1878,71	18,35	-39,15	3	0,51	5,51
52	266,48	-1977,09	-26,01	-41,66	4	0,28	5,52
53	271,94	-2066,45	-120,84	-37,84	4	-1,79	5,45
54	308,92	-1819,52	89,11	-44,63	4	0,88	8,08
55	305,63	-1774,18	137,74	-38,81	3	-0,46	5,82
56	320,73	-1891,05	5,78	-39,36	3	0,74	5,45

<sup>a</sup> Valores em kcal/mol. <sup>b</sup>  $\Delta H_{sa} = -2217,56$  kcal/mol

**Tabela 5.13:** Valores calculados para os mesoiônicos, no estado **neutro**, no sítio do FAD, com valores dos coeficientes  $c_1$ - $c_5$  calculados com base nos valores de  $IC_{50}$  das formas promastigotas [ $\ln(IC_{50})$  calc. pr.] e amastigotas [ $\ln(IC_{50})$  calc. am.].

Cmp.	$\Delta H_{lig}^a$	$\Delta H_{cpx}^a$	$\Delta H_{int}^a$	$\Delta G_{solv}^a$	$N_{LR}$	$\ln(IC_{50})$ calc. pr.	$\ln(IC_{50})$ calc. am.
44	181,94	-2045,40	-9,79	-10,34	3	-0,36	3,81
45	173,56	-2101,83	-57,83	-10,41	3	-0,29	3,68
46	144,96	-2014,66	57,93	-11,92	4	-1,65	3,99
47	174,36	-2030,77	12,43	-12,41	4	-1,05	3,99
48	139,49	-2108,58	-30,52	-9,85	3	-1,01	3,63
49	175,42	-2067,30	-25,16	-10,50	3	-0,15	3,79
50	218,28	-2048,01	-48,73	-11,65	3	1,33	4,01
51	190,60	-2014,78	12,18	-11,11	3	0,66	4,06
52	137,86	-2116,32	-36,62	-15,11	4	2,33	4,63
53	144,68	-2195,58	-122,71	-12,14	4	-1,46	3,51
54	174,27	-1960,44	82,84	-12,68	4	-0,67	4,28
55	176,23	-1888,51	152,81	-10,78	3	0,29	4,40
56	190,73	-2021,11	5,72	-11,21	3	0,79	4,07

<sup>a</sup> Valores em kcal/mol. <sup>b</sup>  $\Delta H_{sa} = -2217,56$  kcal/mol

Conforme demonstrado, os valores calculados de  $\ln(IC_{50})$  são muito diferentes entre as formas promastigotas e amastigotas, sendo melhores (ou seja, menores) para as formas promastigotas, indicando os compostos como mais ativos contra estas formas evolutivas. Este dado encontra-se de acordo com os dados experimentais, pois conforme citado anteriormente, tais compostos são realmente mais ativos perante as formas promastigotas. Na **tabela 5.14** são comparados os valores experimentais com os valores calculados.

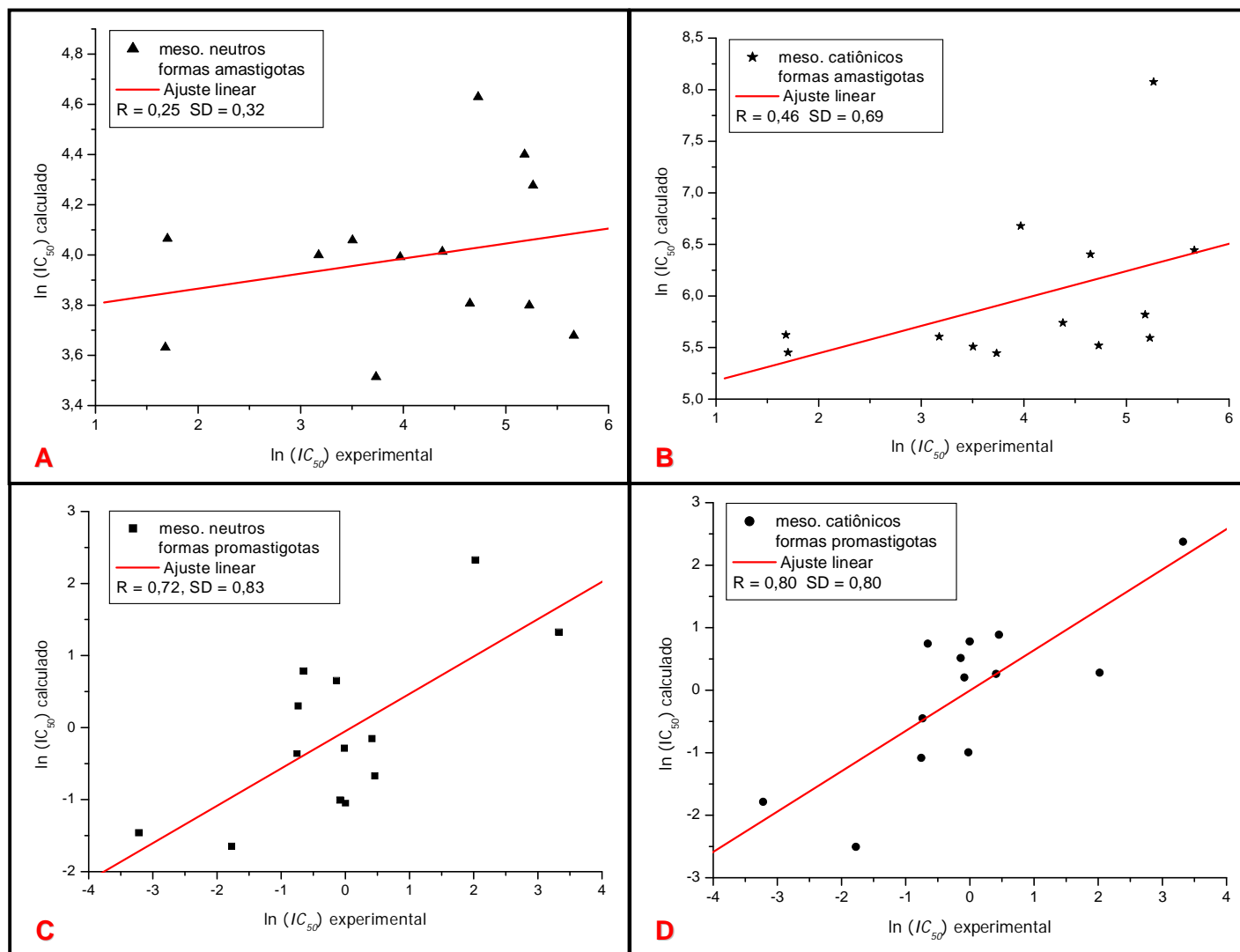
**Tabela 5.14:** Comparação dos valores de  $\ln(IC_{50})$  dos compostos mesoiônicos calculados (**calc.**) e experimentais (**exp.**) contra *L. amazonensis*, nas formas amastigota (**am.**) e promastigota (**pr.**), e valores calculados nos estados catiônico (**cat.**) e neutro (**neut.**).

Cmp.	$\ln(IC_{50})$ exp.	$\ln(IC_{50})$ calc.	$\ln(IC_{50})$ calc.	$\ln(IC_{50})$ exp.	$\ln(IC_{50})$ calc.	$\ln(IC_{50})$ calc.
	am.	am. cat.	am. neut.	pr.	pr. cat.	pr. neut.
44	4,65	6,40	3,81	-0,76	-1,09	-0,36
45	5,66	6,44	3,68	-0,02	-0,99	-0,29
46	3,18	5,61	3,99	-1,77	-2,51	-1,65
47	3,97	6,68	3,99	0	0,78	-1,05
48	1,68	5,62	3,63	-0,08	0,20	-1,01
49	5,23	5,59	3,79	0,41	0,26	-0,15
50	4,38	5,74	4,01	3,33	2,37	1,33
51	3,50	5,51	4,06	-0,14	0,51	0,66
52	4,73	5,52	4,63	2,03	0,28	2,33
53	3,74	5,45	3,51	-3,22	-1,79	-1,46
54	5,27	8,08	4,28	0,46	0,88	-0,67
55	5,18	5,82	4,40	-0,73	-0,46	0,29
56	1,70	5,45	4,07	-0,65	0,74	0,79

Frente a esses valores, obtidos de formas variadas, foi feita uma comparação por regressão linear das 4 situações aqui existentes, demonstradas a seguir:

- Quando os valores calculados de  $\ln(IC_{50})$  são comparados aos valores experimentais obtidos perante formas promastigotas, frente aos mesoiônicos em sua forma catiônica (equação 38), temos  $R=0,80$ .
- Quando os valores calculados de  $\ln(IC_{50})$  são comparados aos valores experimentais obtidos perante formas amastigotas, frente aos mesoiônicos em sua forma catiônica (equação 39), temos  $R=0,46$ .
- Quando os valores calculados de  $\ln(IC_{50})$  são comparados aos valores experimentais obtidos perante formas promastigotas, frente aos mesoiônicos em sua forma neutra (equação 40), temos  $R=0,72$ .
- Quando os valores calculados de  $\ln(IC_{50})$  são comparados aos valores experimentais obtidos perante formas amastigotas, frente aos mesoiônicos em sua forma neutra (equação 41), temos  $R=0,25$ .

Na **figura 5.10** a seguir, demonstram-se os gráficos referentes às regressões lineares apresentadas. O modelo possui boa correlação quando valores de  $IC_{50}$  referentes às formas promastigotas são utilizados ( $R=0,72$  e  $0,80$ ), mas o mesmo não pode ser considerado para as formas amastigotas.



**Figura 5.10:**  $\ln(IC_{50})$  experimental X  $\ln(IC_{50})$  calculado, para: **[A]** mesoiônicos neutros e formas amastigotas; **[B]** mesoiônicos catiônicos e formas amastigotas; **[C]** mesoiônicos neutros e formas promastigotas; **[D]** mesoiônicos catiônicos e formas promastigotas. Gerados com o programa Origin 6.0.



#### 5.2.4. Modelo tridimensional a partir da sequência primária da TR de *L. amazonensis*

O alinhamento feito entre a TR de *L. amazonensis* e as outras TRs [CASTRO-PINTO *et al.*, 2008] apontou a sequência de aminoácidos pertencente aos sítios ativos do FAD, NADPH e TSST de todas as TRs reportadas até 2008, incluindo dados de projetos genômicos disponíveis [<http://www.sanger.ac.uk>]. A **figura 5.11** demonstra este alinhamento, com destaque para as sequências dos sítios ativos do FAD e TSST de *L. amazonensis* e *T. cruzi*, para comparação dos modelos desenvolvidos com a estrutura proveniente de *T. cruzi* (1BZL [BOND *et al.*, 1999]).

O sítio ativo correspondente à TSST é igual para ambos os tripanossomatídeos, demonstrando que não seria necessária qualquer correção ao modelo aplicado — este se diz adequado para o estudo frente à *L. amazonensis* e *T. cruzi*, ao menos no que diz respeito aos aminoácidos pertencentes ao sítio ativo.

O sítio do FAD, por sua vez, apresenta algumas modificações — dos 22 aminoácidos apontados como pertencentes ao sítio flavínico, apenas 5 (22,7%) são diferentes, quando tal sequência é comparada com outras 9, pertencentes a 8 outros organismos (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. major* Friendlin, *L. braziliensis*, *C. fasciculata*, *T. cruzi*, *T. congolense* e *T. brucei*, **figura 5.11**). As modificações, no entanto, não alteram as características do sítio — as substituições são todas entre aminoácidos que possuem semelhanças de polaridade e acidez entre si. Porém, é necessário investigar as semelhanças quanto à estrutura tridimensional da enzima, pois ainda que os sítios tenham praticamente os mesmos aminoácidos, diferenças que podem surgir no enovelamento (“*fold*ing”) das enzimas dos tripanossomatídeos resultantes de diferenças de aminoácidos em outras partes da estrutura podem fazer com que os sítios envolvidos sejam diferentes, o que mudará as interações dos compostos em estudo com a enzima.

```

                                FAD-binding site                                Active site
DON  -MSRAYDLVVLGAGSGGLEAGWNAAVTHKKKAVVDVQATHGPPALVALGGTCVNVVGCVPKPLMVTGAQYMDLIRESGGFGEWMD
Dd8  -MSRAYDLVVLGAGSGGLEAGWNPVAVTHKKKVGPSM-CRRRTVRRSLSGGTCVNVVGCVPKPLMVTGAQYMDLIRESGGFGEWMD
INF  -MSRAYDLVVLGAGSGGLEAGWNAAVTHKKKAVVDVQATHGPPALVALGGTCVNVVGCVPKPLMVTGAQYMDLIRESGGFGEWMD
MAJ  -MSRAYDLVVLGAGSGGLEAGWNAATYKKKAVVDVQATHGPPFPFALGGTCVNVVGCVPKPLMVTGAQYMDLIRESGGFGEWMD
AMA  -MARAYDLVVLGAGSGGLEAGWNAAVTHKKKAVVDLQAVHGPPLFAALGGTCVNVVGCVPKPLMVTGAQYMDLIRESGGFGEWMD
BRA  -MPRAYDLVVLGAGSGGLEAGWNAASLYNKKVAVVEAQHGGPPCFPAALGGTCVNVVGCVPKPLMVTGAQYMDLIRESGGFGEWMD
FAS  -MSRAYDLVVLGAGSGGLEAGWNAASLHKKRVAIDLQKHHGPPHYAALGGTCVNVVGCVPKPLMVTGANVMDLIREAGFGWEFL
CRU  -MMSKIFDLVVLGAGSGGLEAANNAATLYKKRVAIDVQMVHGGPPFFSALGGTCVNVVGCVPKPLMVTGAQYMEHLRESAGFGWEFL
CON  -MSKAFDLVVLGAGSGGLEAGWNAATLYKKRVAIDVQVTVHGGPPFFAALGGTCVNVVGCVPKPLMVTGAQYMDLQRESAGFGWEFL
BRU  -MSKIFDLVVLGAGSGGLEAGWNAATLYKKRVAIDVQVTHHGPPHYAALGGTCVNVVGCVPKPLMVTGAQYMDHLRESAGFGWEFL
    * : * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * :

DON  RESLCPNWKTLIAAKNKVNSINESYKSMFADTEGLSFHMGPALQDAHT--VVVRKSEDPHS-DVLETLDTE-YILIATGSWPT
Dd8  RESLCPHWKTLIAAKNKVNSIYESYKSMFADTEGLSFHMGPAINLTRWVCASRKTHTATCWDPRHGLHPCHRLADAPRS-
INF  RESLCPNWKTLIAAKNKVNSINESYKSMFADTEGLSFHMGPALQDAHT--VVVRKSEDPHS-DVLETLDTE-YILIATGSWPT
MAJ  RESLCPNWKTLIAAKNKVNSINESYKSMFADTEGLSFHMGPALQDAHT--VLVRKSEDPHS-DVLETLDTE-YILIATGSWPT
AMA  RESLCPNWKTLIAAKNKVNSINESYKSMFADTEGLSFHMGPALQDAHT--VVVRKSEDPHS-DVLETLDTE-YILIATGSWPT
BRA  RDSIRSNWKKLIAAKNKVVSDINKSYTGMPFDSLEGHGFALQDAHT--VVVRKSEDPHS-DVLETLDTE-YILIATGSWPT
FAS  RESVPRNWKALIAAKNKVNSINESYKSMFADTEGLSFHMGPALQDAHT--VVVRKSEDPHS-DVLETLDTE-YILIATGSWPT
CRU  RTTLRAEWKLVIAVKNVSDINKSYTGMPFDSLEGHGFALQDAHT--VVVRKSEDPHS-DVLETLDTE-YILIATGSWPT
CON  ASTIKANWTKLIAAKNKVNSINESYKSMFADTEGLSFHMGPALQDAHT--VVVRKSEDPHS-DVLETLDTE-YILIATGSWPT
BRU  GSSVKANWTKLIAAKNKVNSINESYKSMFADTEGLSFHMGPALQDAHT--VVVRKSEDPHS-DVLETLDTE-YILIATGSWPT
    : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * :

                                NADPH-binding site
DON  RLGVPGEDEFCITSNEAFYLEADAPKRMFCVGGGYIAVEFAGIPNGYKPCGGYVLDLCYRGDLILRGPDETVRKS LTKQLGANGIRVR
Dd8  ----PRRRVLLHHEQRGFYLEADAPKRMFCVGGGYIAVEFAGIPNGYKPCGGYVLDLCYRGDLILRGPDETVRKS LTKQLGANGIRVR
INF  RLGVPGEDEFCITSNEAFYLEADAPKRMFCVGGGYIAVEFAGIPNGYKPCGGYVLDLCYRGDLILRGPDETVRKS LTKQLGANGIRVR
MAJ  RLGVPGEDEFCITSNEAFYLEADAPKRMFCVGGGYIAVEFAGIPNGYKPCGGYVLDLCYRGDLILRGPDETVRKS LTKQLGANGIRVR
AMA  RLGIPGDELFCITSNEAFYLEADAPKRMFCVGGGYIAVEFAGIPNGYKPCGGYVLDLCYRGDLILRGPDETVRKS LTKQLGANGIRVR
BRA  RLGIPGDELFCITSNEAFYLEADAPKRMFCVGGGYIAVEFAGIPNGYKPCGGYVLDLCYRGDLILRGPDETVRKS LTKQLGANGIRVR
FAS  HLGIEGDELFCITSNEAFYLEADAPKRMFCVGGGYIAVEFAGIPNGYKPCGGYVLDLCYRGDLILRGPDETVRKS LTKQLGANGIRVR
CRU  MPNIPIGIIEHCISNEAFYLDPEPRRVLTVGGGFIISVEFAGIPNAYKPCGGYVLDLCYRGDLILRGPDETVRKS LTKQLGANGIRVR
CON  MLKIPGIIEHCISNEAFYLDPEPRRVLTVGGGFIISVEFAGIPNAYKPCGGYVLDLCYRGDLILRGPDETVRKS LTKQLGANGIRVR
BRU  MPAIPGVHIEHCISNEAFYLDPEPRRVLTVGGGFIISVEFAGIPNAYKPCGGYVLDLCYRGDLILRGPDETVRKS LTKQLGANGIRVR
    . . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * :

DON  TNLNPTKITKNEDEGSHVHPNDGTEEDYDQVMLAIG-VPRSQALQQLDQKAGVTRGKNGAVQVDAYSKTSVDNIYA--IGDVTNRVM
Dd8  TNLNPTKITKNEDEGSHVHPNDGTEEDYDQVMLAIGVPRSQALQQLDQKAGVTRGKNGAVQVDAYSKTSVDNIYAIAIGDVTNRVM
INF  TNLNPTKITKNEDEGSHVHPNDGTEEDYDQVMLAIGVPRSQALQQLDQKAGVTRGKNGAVQVDAYSKTSVDNIYA--IGDVTNRVM
MAJ  TNLNPTKITKNEDEGSHVHPNDGTEEDYDQVMLAIGVPRSQALQQLDQKAGVTRGKNGAVQVDAYSKTSVDNIYA--IGDVTNRVM
AMA  TNLNPTKITKNEDEGSHVHPNDGTEEDYDQVMLAIGVPRSQALQQLDQKAGVTRGKNGAVQVDAYSKTSVDNIYA--IGDVTNRVM
BRA  TKVNSPRITKNEDEGSHVHPNDGTEEDYDQVMLAIGVPRSQALQQLDQKAGVTRGKNGAVQVDAYSKTSVDNIYA--IGDVTNRVM
FAS  THENPAKVTKNADGSRHVVVFESGAEADYDQVMLAIGVPRSQALQQLDQKAGVTRGKNGAVQVDAYSKTSVDNIYA--IGDVTNRVM
CRU  TKENPAKVEKNADGSRHVVVFESGAEADYDQVMLAIGVPRSQALQQLDQKAGVTRGKNGAVQVDAYSKTSVDNIYA--IGDVTNRVM
CON  TNEPAKVEKNADGSRHVVVFESGAEADYDQVMLAIGVPRSQALQQLDQKAGVTRGKNGAVQVDAYSKTSVDNIYA--IGDVTNRVM
BRU  TNEPAKVEKNADGSRHVVVFESGAEADYDQVMLAIGVPRSQALQQLDQKAGVTRGKNGAVQVDAYSKTSVDNIYA--IGDVTNRVM
    * : . * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * :

DON  LTPVAINEGACVLETVFPGKPRATDHTKVACAVPSIPPICGTCMTEEEAAKNYETVAVYASSFTPLMHNISGSKHKEFMRIIT
Dd8  LTPVAINEGACVLETVFPGKPRATDHTKVACAVPSIPPICGTCMTEEEAAKNYETVAVYASSFTPLMHNISGSKHKEFMRIIT
INF  LTPVAINEGACVLETVFPGKPRATDHTKVACAVPSIPPICGTCMTEEEAAKNYETVAVYASSFTPLMHNISGSKHKEFMRIIT
MAJ  LTPVAINEGACVLETVFPGKPRATDHTKVACAVPSIPPICGTCMTEEEAAKNYETVAVYASSFTPLMHNISGSKHKEFMRIIT
AMA  LTPVAINEGACVLETVFPGKPRATDHTKVACAVPSIPPICGTCMTEEEAAKNYETVAVYASSFTPLMHNISGSKHKEFMRIIT
BRA  LTPVAINEGACVLETVFPGKPRATDHTKVACAVPSIPPICGTCMTEEEAAKNYETVAVYASSFTPLMHNISGSKHKEFMRIIT
FAS  LTPVAINEGACVLETVFPGKPRATDHTKVACAVPSIPPICGTCMTEEEAAKNYETVAVYASSFTPLMHNISGSKHKEFMRIIT
CRU  LTPVAINEGACVLETVFPGKPRATDHTKVACAVPSIPPICGTCMTEEEAAKNYETVAVYASSFTPLMHNISGSKHKEFMRIIT
CON  LTPVAINEGACVLETVFPGKPRATDHTKVACAVPSIPPICGTCMTEEEAAKNYETVAVYASSFTPLMHNISGSKHKEFMRIIT
BRU  LTPVAINEGACVLETVFPGKPRATDHTKVACAVPSIPPICGTCMTEEEAAKNYETVAVYASSFTPLMHNISGSKHKEFMRIIT
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * :

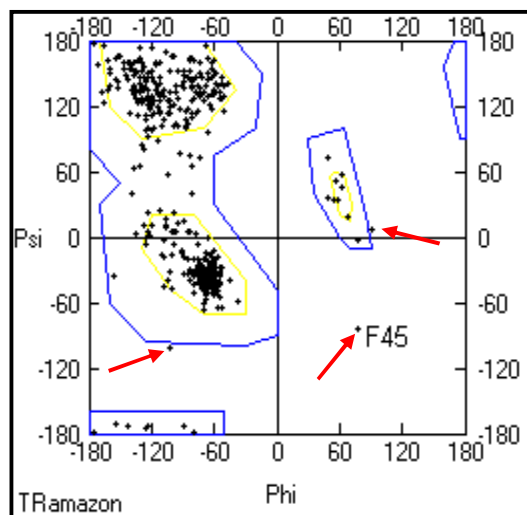
DON  NESNGEVLGVHMLGDSAPEIQSVGICMKGAKISDFHSTIGVHPTSAEELCSMRTPAYFYESGKRVEKLSSNL
Dd8  NESNGEVLGVHMLGDSAPEIQSVGICMKGAKISDFHSTIGVHPTSAEELCSMRTPAYFYESGKRVEKLSSNL
INF  NESNGEVLGVHMLGDSAPEIQSVGICMKGAKISDFHSTIGVHPTSAEELCSMRTPAYFYESGKRVEKLSSNL
MAJ  DQPSGEVLGVHMLGDSAPEIQSVGICMKGAKISDFHSTIGVHPTSAEELCSMRTPAYFYENGRVEKLSSNL
AMA  NESDGEVLGVHMLGDSAPEIQSVGICMKGAKISDFHSTIGVHPTSAEELCSMRTPAYFYENGRVEKLSSNL
BRA  KEKIDGVLGVHMLGDSAPEIQSVGICMKGAKISDFHSTIGVHPTSAEELCSMRTPAYFYENGRVEKLSSNL
FAS  NHADGEVLGVHMLGDSAPEIQSVGICMKGAKISDFHSTIGVHPTSAEELCSMRTPAYFYENGRVEKLSSNL
CRU  NHSDGTVLGVHMLGDSAPEIQSVGICMKGAKISDFHSTIGVHPTSAEELCSMRTPAYFYENGRVEKLSSNL
CON  DHGDGTVLGVHMLGDSAPEIQSVGICMKGAKISDFHSTIGVHPTSAEELCSMRTPAYFYENGRVEKLSSNL
BRU  NHSDGTVLGVHMLGDSAPEIQSVGICMKGAKISDFHSTIGVHPTSAEELCSMRTPAYFYENGRVEKLSSNL
    . . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * :

```

Figura 5.11: Alinhamento de sequências conhecidas de TR: cadeia de *L. donovani* (DON) e (Dd8), *L. infantum* (INF), *L. major Friendlin* (MAJ), *L. amazonensis* (AMA; este trabalho), ... (continua)

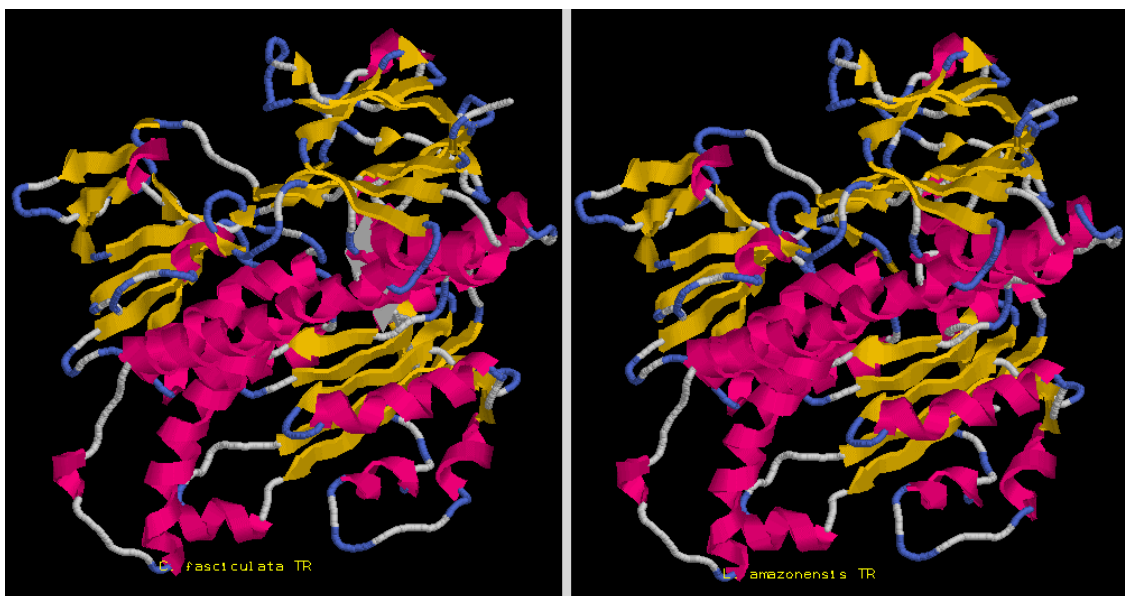
...(continuação) *L. braziliensis* (**BRA**), *C. fasciculata* (**FAS**), *T. cruzi* (**CRU**), *T. congolense* (**CON**) e *T. brucei* (**BRU**). Os resíduos sombreados indicam os sítios ativos do FAD, NADPH e TSST, como descrito para a TR de *L. donovani* [TAYLOR *et al.*, 1994]. Asteriscos indicam identidade, (:) e (.) indicam substituições conservativas e não-conservativas, respectivamente. Resíduos da sequência de *L. amazonensis* correspondentes aos *primers* usados na amplificação estão sublinhados. Sequências consultadas em <http://www.sanger.ac.uk>. Alinhamento gerado com T-CoVee [NOTREDAME *et al.*, 2000]. Encontram-se destacadas de vermelho as sequências correspondentes aos sítios do FAD e TSST de *L. amazonensis* e *T. cruzi*.

Quanto à estrutura tridimensional gerada por modelagem por homologia, a sobreposição da estrutura do modelo da TR de *L. amazonensis* sobre a TR de *C. fasciculata* resultou em um desvio de mínimos quadrados (RMSD) muito baixo para átomos de C $\alpha$ , de 0,07 Å. O gráfico de Ramachandran [RAMACHANDRAN & SASISKEHARAN, 1968] mostra apenas 3 resíduos, diferentes de glicina, fora das regiões favoráveis (**figura 5.12**). O “*outlier*” mais notável, Phe45, corresponde a um resíduo na TR de *C. fasciculata* que também corresponde a um “*outlier*”, Tyr44. A conformação tensionada do resíduo Phe45 é provavelmente decorrente de interações simultâneas de seu grupamento NH peptídico com o grupamento C=O peptídico do resíduo Ala46 (N–O = 3,84 Å) e de seu grupamento C=O peptídico com o grupamento NH peptídico do resíduo Gly41 (O–N = 3,00 Å).



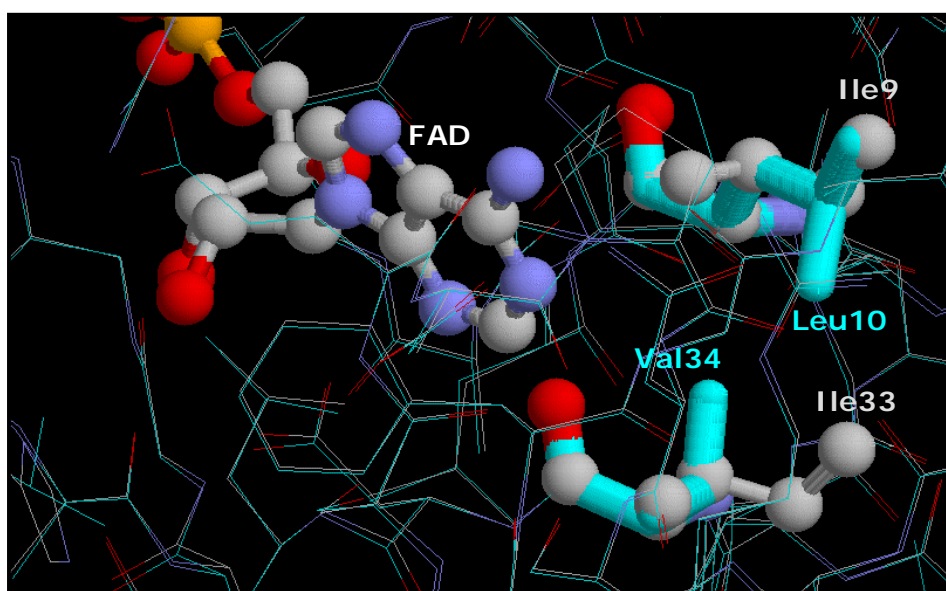
**Figura 5.12:** Gráfico de Ramachandran [RAMACHANDRAN & SASISKEHARAN, 1968]. As setas vermelhas indicam os *outliers* citados, diferentes de glicinas. Gráfico gerado com o programa Swiss PDB Viewer.

A comparação entre as estruturas tridimensionais das duas enzimas encontra-se na **figura 5.13**. Grande semelhança estrutural pode ser notada.



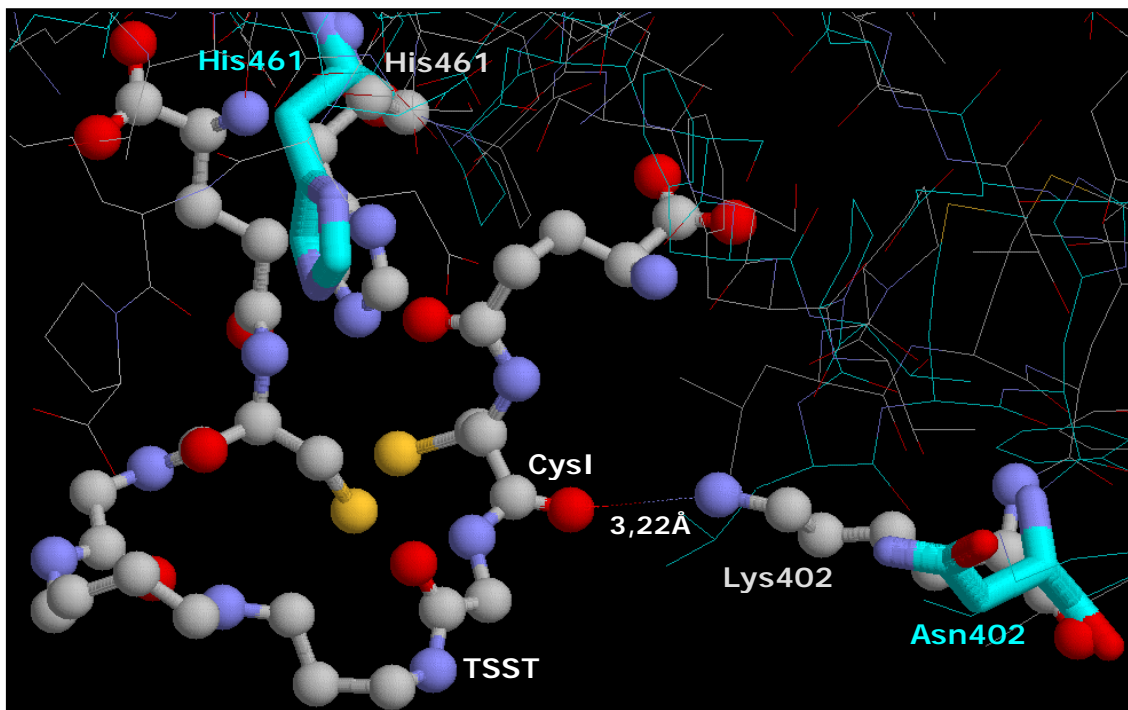
**Figura 5.13:** Comparação entre as estruturas tridimensionais das TRs de *C. fasciculata* e *L. amazonensis*, respectivamente. Imagem gerada no programa RasMol 2.7.2.1.1.

O sítio flavínico é quase idêntico entre as duas enzimas: dos 37 resíduos alocados a um raio de 4 Å da molécula de FAD na TR de *C. fasciculata*, apenas 2 resíduos (5%), Ile9 e Ile33, não são idênticos aos correspondentes na TR de *L. amazonensis*, onde foram substituídos por uma leucina (Leu10) e uma valina (Val34), respectivamente (**figura 5.14**).



**Figura 5.14:** Sobreposição das estruturas da TR de *L. amazonensis* (coloração ciano) e de *C. fasciculata* (padrão CPK de cores). Os resíduos Ile9 e Ile33 (*L. amazonensis*) estão sobrepostos aos resíduos Leu10 e Val 34 (*C. fasciculata*), respectivamente. A molécula de FAD encontra-se destacada (modelo bastão/bolas). Imagem gerada no programa RasMol 2.7.2.1.1.

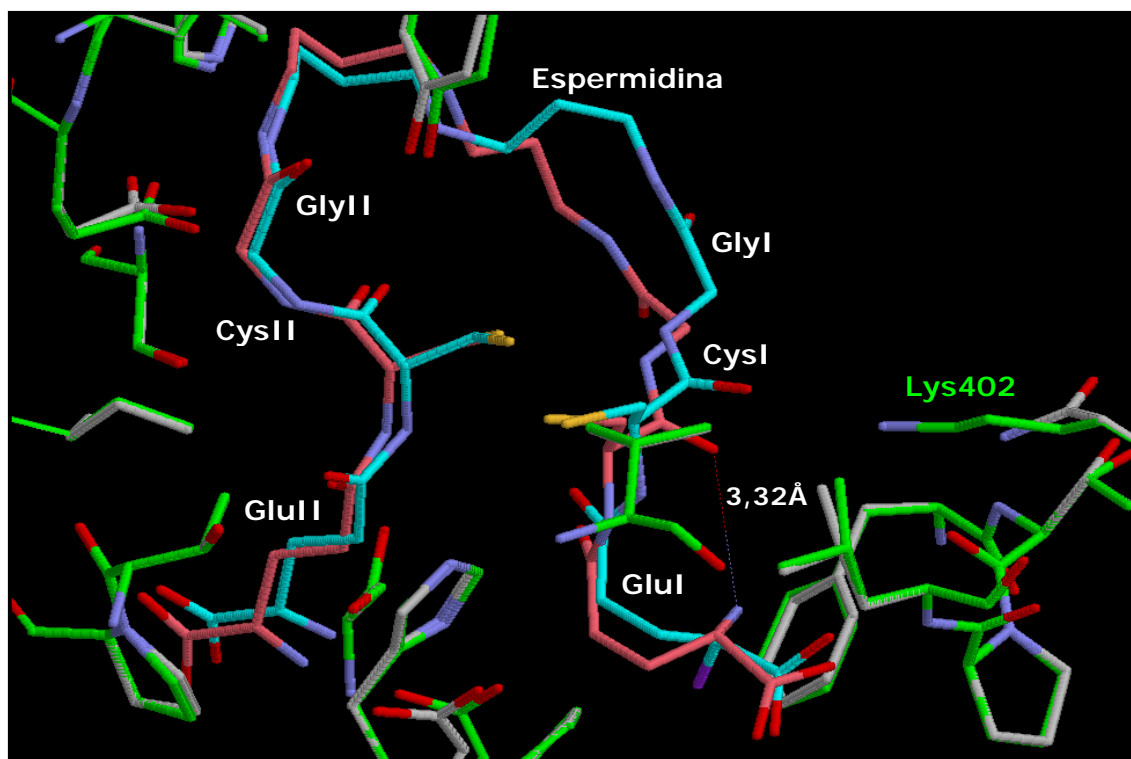
É interessante a comparação entre o modelo proposto para a TR de *L. amazonensis* com outra TR de *T. cruzi*, co-cristalizada com seu substrato TSST [BOND *et al.*, 1999]. O RMSD entre a cadeia A da TR de *T. cruzi* e nosso modelo é de 0,65 Å para átomos de C $\alpha$ . Existem duas moléculas de substrato co-cristalizadas no homodímero da TR de *T. cruzi*, interagindo com resíduos em ambas as cadeias A e B [ZHANG *et al.*, 1996]. Os resíduos selecionados em um raio de 4 Å das duas estruturas co-cristalizadas não são exatamente os mesmos e ambos os sítios de ligação foram considerados para comparação. Análises de todos os resíduos pertencentes a estes dois sítios de ligação revelaram que apenas um resíduo não é o mesmo entre as enzimas destes dois parasitos: Lys402, que é um resíduo asparagina na TR de *L. amazonensis*. A cadeia lateral amínica de Lys402 interage de forma fraca com o grupo carbonila da ligação peptídica de CysI (*vide* **figura 2.27**, item 2.4.1) (N–O = 3,4 Å) na TR de *T. cruzi*, mas espera-se que a mesma interação não exista na TR de *L. amazonensis*, pois a cadeia lateral da asparagina é mais curta que a cadeia lateral da lisina (**figura 5.15**). Os resíduos correspondentes aos aminoácidos Glu19 e Tyr111, envolvidos em ligações de hidrogênio entre componentes de GlyI e espermidina, e o resíduo His461, que forma uma ligação de hidrogênio com GluII, são idênticos na TR de *L. amazonensis*.



**Figura 5.15:** Sobreposição das estruturas da TR de *L. amazonensis* (coloração ciano) e de *C. fasciculata* (padrão CPK de cores). Os resíduos Asn402 e His461 (*L. amazonensis*) estão sobrepostos aos resíduos Lys402 e His461 (*C. fasciculata*), respectivamente. A molécula de TSST encontra-se destacada (modelo bastão/bolas), com distância de 3,22 Å entre a ligação C=O da TSST e o N amínico da Lys402. Imagem gerada no programa RasMol 2.7.2.1.1.



Para analisar o efeito da substituição de resíduos citada acima no sítio ativo da TSST, foi feito um procedimento de minimização de energia através de método semi-empírico PM3 [STEWART, 1989a,b] no sítio ativo de *L. amazonensis* e *T. cruzi*, ambos contendo a molécula do substrato (TSST). Na estrutura de energia minimizada resultante da substituição da Lys402 pela Asn (**figura 5.16**), o grupo carbonil peptídico da CysI está na realidade muito distante para formar uma ligação de hidrogênio com a cadeia da Asn ( $N-O = 6.6 \text{ \AA}$ ). Foram observadas torções na cadeia- $\alpha$  (“backbone”) dos grupamentos  $\gamma$ -glutamil e cisteinil, que resultaram na formação de uma ligação de hidrogênio entre o grupo amino peptídico do GluI e o grupo carbonil peptídico da CysI ( $N-O = 3.3 \text{ \AA}$ ). Devido às torções da cadeia- $\alpha$  da TSST, a fração espermidina não ocupa a mesma posição nas estruturas minimizadas de *L. amazonensis* e *T. cruzi*, mas isso não influencia significativamente a orientação do fragmento GluII—CysII—GlyII, que é bastante similar na enzima das 2 espécies, como no posicionamento da ponte dissulfeto formada (**figura 5.16**). Essas torções foram provavelmente causadas pela ausência da outra cadeia do homodímero neste primeiro modelo.



**Figura 5.16:** Sobreposição entre os sítios ativos minimizados (método semi-empírico PM3) pertinentes à TSST de *T. cruzi* e *L. amazonensis*. Cores: C (TR de *T. cruzi*): verde, C (TR de *L. amazonensis*): cinza, C (TSST de *T. cruzi*): ciano; C (TSST de *L. amazonensis*): rosa; N: azul, O: vermelho, S: amarelo. Átomos de hidrogênio foram omitidos. Imagem gerada no programa RasMol 2.7.2.1.1.

### 5.2.5. Modelo TR III

Em razão da possível influência da ausência da segunda cadeia do homodímero nas interações com os ligantes, foi construído o segundo modelo tridimensional da TR de *L. amazonensis* pela substituição direta de aminoácidos na estrutura da TR de *T. cruzi*.

O atracamento das estruturas dos ligantes foi feito utilizando a mesma metodologia empregada frente à estrutura proveniente de *T. cruzi*, descrita anteriormente. Perante os resultados obtidos nos modelos TR I e II, notou-se grande variabilidade dentre os valores obtidos pela presença de estruturas neutras e carregadas, influenciando muito a solvatação destes compostos. Considerando que os mesoiônicos e amidinas possuem a possibilidade de estruturas catiônicas e neutras, tal fator seria de grande influência para todos os compostos. Para verificar a influência da solvatação perante a TR de *L. amazonensis*, os cálculos foram feitos neste modelo com e sem a presença das moléculas de água de solvatação da estrutura.

Como os resultados anteriores mostraram que as interações são em geral menos favoráveis no sítio do NADPH, optou-se por fazer o atracamento no Modelo TR III apenas no sítio de interação do TSST e no sítio de interação do FAD. Na **tabela 5.15**, temos os resultados do atracamento das fenotiazinas no sítio da TSST, na presença e na ausência das moléculas de água de solvatação.

**Tabela 5.15:** Comparação entre os escores de aptidão encontrados para o atracamento dos compostos fenotiazínicos ao sítio da TSST, na TR de *L. amazonensis*, com e sem moléculas de água.

Composto	Aptidão com H <sub>2</sub> O	Aptidão sem H <sub>2</sub> O
24	25,78	36,42
25	28,73	30,70
26	-5,42	9,41
27	0,32	4,07
28	26,73	30,62
29	33,47	36,74
30	29,09	45,63
31	37,21	38,93
32	25,02	32,40
33	31,01	38,34
34	30,41	34,29
35	28,38	43,16
36	26,35	40,55
37	24,99	33,89
38	35,31	36,89
39	26,16	38,66
40	24,28	35,31
41	18,94	35,88
42	34,66	31,80
43	1,32	13,19

A tabela mostra que apenas uma estrutura (42) possui um valor melhor no sítio com as moléculas de água, mostrando a influência da dessolvatação da estrutura no atracamento. Os compostos se atracam melhor se conseguirem deslocar de forma mais eficaz a camada de solvatação, sendo esta característica extremamente importante para que os compostos apresentem grande atividade frente a esta enzima. Como este sítio tem uma extensa comunicação com o meio onde se encontra a enzima (citossol), é também de estrutura muito polar, fazendo com que a presença destas moléculas seja extensa.

A seguir temos a **tabela 5.16**, demonstrando o atracamento destes mesmos compostos, porém frente ao sítio do FAD.

**Tabela 5.16:** Comparação entre os valores de aptidão encontrados para o atracamento dos compostos fenotiazínicos ao sítio do FAD, perante a TR de *L. amazonensis* com e sem moléculas de água.

Composto	Aptidão com H <sub>2</sub> O	Aptidão sem H <sub>2</sub> O
24	60,65	53,93
25	25,25	50,67
26	25,99	23,12
27	26,25	26,14
28	38,97	42,91
29	55,21	55,57
30	37,07	51,95
31	45,78	58,01
32	29,69	46,36
33	29,72	47,16
34	56,83	53,22
35	39,95	52,30
36	2,58	54,14
37	54,11	57,26
38	41,71	60,48
39	55,79	58,83
40	52,77	56,87
41	61,71	59,60
42	16,69	44,44
43	13,96	21,44

Neste caso, provavelmente existe uma semelhança entre estes dois atracamentos, porém com eficácia ligeiramente melhor no sítio sem água. Parte das estruturas possui melhor escore para o sítio com água, com valores que variam de 2,58 a 61,71, e parte com melhor escore para o outro sítio sem água, variando de 21,44 a 60,48, ou seja, mostram-se similares. Tal fato pode ser explicado pela baixa presença de moléculas de água no sítio cristalográfico do FAD, que justifica a pequena diferença entre sua ausência e presença, pois este não possui muito “espaço” para estas moléculas (sem comunicação direta com o meio externo) e com muitos resíduos de característica apolar, pela presença do anel isoaloxazínico da estrutura do



FAD. As fenotiazinas demonstraram um padrão de atracamento muito similar à maneira como o próprio FAD se encontra ancorado a seu sítio, promovendo interações também similares.

Em relação aos compostos mesoiônicos, estes foram atracados a ambos os sítios, assim como as fenotiazinas, e nas formas catiônica e neutra, para comparação. Nas **tabelas 5.17 e 5.18**, temos o resultado do atracamento para o sítio da TSST, nas duas formas citadas.

**Tabela 5.17:** Comparação entre os valores de aptidão encontrados para o atracamento dos compostos mesoiônicos **catiônicos** ao sítio da TSST, na TR de *L. amazonensis* com e sem moléculas de água.

Composto	Aptidão com H <sub>2</sub> O	Aptidão sem H <sub>2</sub> O
44	32,23	51,31
45	35,12	52,21
46	36,65	55,83
47	36,69	53,64
48	36,03	53,07
49	35,13	53,12
50	34,36	54,38
51	33,91	53,94
52	35,05	51,29
53	40,20	50,86
54	39,20	53,24
55	35,97	49,64
56	36,21	51,80

**Tabela 5.18:** Comparação entre os valores de aptidão encontrados para o atracamento dos compostos mesoiônicos **neutros** ao sítio da TSST, na TR de *L. amazonensis* com e sem moléculas de água.

Composto	Aptidão com H <sub>2</sub> O	Aptidão sem H <sub>2</sub> O
44	35,66	53,84
45	41,47	57,76
46	38,18	57,77
47	38,56	54,48
48	41,91	53,87
49	37,62	57,72
50	37,37	48,52
51	37,93	57,58
52	40,82	50,44
53	35,60	51,24
54	39,18	52,66
55	36,50	46,39
56	39,84	52,18

Conforme demonstrado acima, todos os compostos testados se atracam melhor ao sítio que não possui as moléculas de água. Uma possível explicação para esta diferença no atracamento pode ser o fato de que os compostos mesoiônicos, além de bastante volumosos,

possuem 4 anéis aromáticos de conformação muito específica (uma liberdade conformacional mais limitada), fazendo com que quaisquer grupamentos polares pudessem atrapalhar sua interação com os resíduos pertencentes a este sítio. Além deste fato, como dito para as fenotiazinas, o sítio da TSST possui intensa comunicação com o meio externo, fazendo com que um bom atracamento necessite o deslocamento da camada de solvatação do sítio. Os escores encontrados foram elevados, variando de 49,64 a 55,83 na forma catiônica, e de 46,39 a 57,77 na forma neutra.

Porém, no atracamento realizado em relação à estrutura de *T. cruzi*, foi observado que tais compostos se ancoram de forma mais adequada ao sítio do FAD. Portanto, nas **tabelas 5.19** e **5.20** a seguir, encontram-se os escores encontrados para o atracamento dos mesoiônicos catiônicos e neutros, respectivamente, frente a tal sítio.

**Tabela 5.19:** Comparação entre os valores de aptidão encontrados para o atracamento dos compostos mesoiônicos **catiônicos** ao sítio do FAD, na TR de *L. amazonensis* com e sem moléculas de água.

<b>Composto</b>	<b>Aptidão com H<sub>2</sub>O</b>	<b>Aptidão sem H<sub>2</sub>O</b>
<b>44</b>	42,07	64,66
<b>45</b>	46,10	69,22
<b>46</b>	45,36	67,77
<b>47</b>	36,61	68,00
<b>48</b>	37,90	66,79
<b>49</b>	42,79	67,74
<b>50</b>	39,67	68,53
<b>51</b>	39,16	68,58
<b>52</b>	41,69	67,63
<b>53</b>	41,87	62,75
<b>54</b>	42,09	67,30
<b>55</b>	45,32	67,89
<b>56</b>	45,62	66,75

**Tabela 5.20:** Comparação entre os valores de aptidão encontrados para o atracamento dos compostos mesoiônicos **neutros** ao sítio do FAD, na TR de *L. amazonensis* com e sem moléculas de água.

<b>Composto</b>	<b>Aptidão com H<sub>2</sub>O</b>	<b>Aptidão sem H<sub>2</sub>O</b>
<b>44</b>	42,97	67,44
<b>45</b>	45,12	71,70
<b>46</b>	38,89	69,56
<b>47</b>	38,60	71,72
<b>48</b>	61,64	70,60
<b>49</b>	39,79	72,01
<b>50</b>	48,87	71,45
<b>51</b>	44,09	71,68
<b>52</b>	49,79	70,93
<b>53</b>	44,57	69,37
<b>54</b>	46,52	71,17
<b>55</b>	42,94	69,78
<b>56</b>	45,37	68,79

Se observados os escores encontrados neste atracamento, vemos que os valores continuam bem mais altos para o sítio do FAD, se comparados ao sítio da TSST, correspondendo ao encontrado na TR de *T. cruzi*. Os escores variam de 62,75 a 69,22 para a forma catiônica, e de 67,44 a 72,01 para a forma neutra, valores bastante superiores aos encontrados para o sítio da TSST.

O ancoramento nas enzimas de *T. cruzi* e *L. amazonensis* é bastante similar, possuindo valores correspondentes entre si, fato este demonstrado por meio de uma regressão linear entre escores obtidos para formas catiônicas ( $R=0,76$ ). Conforme dito anteriormente, a presença de moléculas de água em determinados pontos do sítio do FAD impedirá com que interações apolares ocorram, principalmente em relação à parte do sítio onde se ancora o anel isoaloxazínico do FAD. Este fato justifica a grande diferença entre os valores obtidos nos sítios com e sem moléculas de água, e demonstra a grande importância da solvatação desta estrutura.

Em relação às amidinas, foram encontrados resultados similares àqueles encontrados anteriormente, perante a técnica de atracamento: valores negativos de ajuste, para o sítio da TSST. Estes compostos realmente parecem não se atracar a este sítio. Porém estes resultados foram encontrados apenas em relação aos compostos em seu estado catiônico (**tabela 5.21**) — compostos neutros não apresentaram valores negativos (**tabela 5.22**).

**Tabela 5.21:** Comparação entre os valores de aptidão encontrados para o atracamento dos compostos amidínicos **catiônicos** ao sítio da TSST, na TR de *L. amazonensis* com e sem moléculas de água.

Composto	Aptidão com H <sub>2</sub> O	Aptidão sem H <sub>2</sub> O
9	-29,57	-15,19
10	-16,78	-8,45
11	-26,15	-16,65
12	-32,37	-23,94
13	-48,37	-36,92
14	-12,98	-7,13
15	-16,15	-8,77
16	-32,54	-17,88
17	-30,00	-14,04
18	-27,21	-10,19
19	-95,56	-91,58
20	18,72	25,23
21	-89,76	-83,97
22	-61,34	-47,54
23	-39,61	-27,40

**Tabela 5.22:** Comparação entre os valores de aptidão encontrados para o atracamento dos compostos amidínicos **neutros** ao sítio da TSST, na TR de *L. amazonensis* com e sem moléculas de água.

Composto	Aptidão com H <sub>2</sub> O	Aptidão sem H <sub>2</sub> O
9	30,17	38,17
10	30,12	34,93
11	37,93	35,19
12	33,92	35,94
13	31,71	34,22
14	29,63	35,43
15	32,51	35,24
16	29,75	41,40
17	31,23	35,23
18	32,30	36,97
19	25,16	40,85
20	29,43	37,33
21	30,35	40,78
22	30,37	37,48
23	32,02	31,86

Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados para a enzima NOS, que também indicam estes compostos neutros como sendo provavelmente os mais ativos contra a enzima. Definitivamente, para que os compostos amidínicos sejam mais ativos contra ambas as enzimas, a retirada do sítio de protonação poderá auxiliar em sua atividade. A interação das amidinas é facilitada pela retirada de moléculas de água, pois há menos espaço disponível no sítio solvatado e pontos de interação podem estar sendo ocupados por moléculas de água.

Além do sítio da TSST, foi realizado o atracamento das amidinas em relação ao sítio do FAD de *L. amazonensis*, para comparação dos resultados obtidos. Os valores encontrados

variam de -91,58 a 25,23 para o sítio da TSST, e de -76,86 a 38,73 para o sítio do FAD na forma catiônica (**tabela 5.23**), demonstrando que apesar de fraca, a interação ainda se mostra melhor para o sítio do FAD, em relação aos compostos amidínicos. Em seu estado neutro, os valores de ajuste variam de 30,05 a 39,99 para o sítio da TSST, e de 48,75 a 59,99 para o sítio do FAD (**tabela 5.24**). Novamente, os compostos possuem maiores valores de ajuste para as formas neutras, e quando atracados ao sítio do FAD, assim como para os mesoiônicos. Os mesmos motivos para o melhor atracamento dos mesoiônicos em relação a este sítio se aplicam às amidinas, pois estas estruturas também possuem muitos anéis aromáticos, e o sítio do FAD possui mais resíduos aromáticos e apolares, por estar mais “interior” à estrutura da proteína.

**Tabela 5.23:** Comparação entre os valores de aptidão encontrados para o atracamento dos compostos amidínicos **catiônicos** ao sítio do FAD, na TR de *L. amazonensis* com e sem moléculas de água.

Composto	Aptidão com H <sub>2</sub> O	Aptidão sem H <sub>2</sub> O
9	-22,93	-2,75
10	-8,75	-0,75
11	-24,32	30,25
12	-28,61	-0,10
13	-51,49	-19,85
14	13,08	10,14
15	-34,29	12,42
16	-37,03	-10,87
17	-57,11	-3,04
18	-26,44	4,49
19	-114,77	-76,86
20	14,41	38,73
21	-109,62	-60,08
22	-68,17	-31,70
23	-31,91	-15,92

**Tabela 5.24:** Comparação entre os valores de aptidão encontrados para o atracamento dos compostos amidínicos **neutros** ao sítio do FAD, na TR de *L. amazonensis* com e sem moléculas de água.

<b>Composto</b>	<b>Aptidão com H<sub>2</sub>O</b>	<b>Aptidão sem H<sub>2</sub>O</b>
<b>9</b>	51,31	56,43
<b>10</b>	46,16	55,61
<b>11</b>	52,62	54,87
<b>12</b>	54,47	55,07
<b>13</b>	34,43	51,77
<b>14</b>	50,65	54,93
<b>15</b>	44,75	54,38
<b>16</b>	40,86	57,74
<b>17</b>	32,16	48,75
<b>18</b>	41,95	59,99
<b>19</b>	48,18	53,89
<b>20</b>	46,49	54,78
<b>21</b>	50,39	51,11
<b>22</b>	50,39	53,35
<b>23</b>	43,88	52,05

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

### 6.1. Conclusões

#### 6.1.1. Enzima NOS

Em relação à enzima NOS, foi possível encontrar uma equação para compostos pterínicos de atividade já conhecida (equação **32**), através de descritores de energia livre, que pudesse prever de forma adequada sua inibição. Foram propostas estruturas de amidinas neste trabalho (16-23) e suas atividades foram previstas. Algumas das propostas foram previstas como tão ativas quanto as anteriores; algumas já foram sintetizadas e testadas, demonstrando que são realmente ativas frente à *L. amazonensis*, tendo uma destas estruturas passado recentemente pelo processo de patenteamento.

Quando aplicada às amidinas, a equação **32** indica que estas substâncias seriam mais ativas na forma neutra, que, por possuírem energia de solvatação menos favorável, teriam um custo energético menor para serem removidas do solvente antes de atravessar as barreiras membranosas. Isso sugere que para o desenvolvimento de compostos ainda mais ativos frente a esta enzima, seu sítio de protonação poderia ser substituído por grupamentos que não pudessem ser protonados, como grupos metilênicos.

#### 6.1.2. Enzima TR

O método de atracamento molecular se mostrou adequado para a previsão da interação dos compostos em estudo com a enzima em questão. Foi possível obter correlações significativas para as duas séries de compostos estudados (equação **33** para as fenotiazinas e equação **35** para os mesoiônicos), entre os dados experimentais e os descritores de interação obtidos pelo método de atracamento. As correlações revelam detalhes sobre características estruturais importantes para o processo de interação destes compostos.

Alternativamente, foi possível obter uma correlação significativa entre os dados experimentais da série dos mesoiônicos e descritores de energia livre. Em relação às fenotiazinas, a relação obtida pelo método de atracamento molecular apresentou uma correlação com os dados experimentais mais adequada que a equação obtida pelo método semi-empírico (equação **37**).

Dentre os sítios estudados (TSST, NADPH e FAD), há uma maior probabilidade de interação das fenotiazinas ao sítio da TSST, por possuir melhor correlação com os dados experimentais. Para os mesoiônicos, os estudos de *docking* mostram interações mais favoráveis no sítio do FAD, além de ser possível obter uma boa correlação com os dados de atividade, caracterizando uma inibição alostérica. O sítio do NADPH não representou uma boa possibilidade de interação para nenhuma das estruturas em estudo, mas por possuir um atracamento ainda melhor que o sítio da TSST, reforça a inibição alostérica colocada, pois as possibilidades dos mesoiônicos se complexarem ao sítio da TSST (caracterizando uma inibição isostérica) são pequenas.

Aplicando-se o modelo de energia livre, observou-se as formas catiônicas dos mesoiônicos são previstas como mais ativas do que as formas neutras, indicando que uma maior atividade seria obtida na forma de sais (cloridratos, por exemplo). Além disso, há uma melhor correlação entre os dados de atividade calculados e experimentais. Deve ser lembrado, contudo, que a forma catiônica, por possuir carga total diferente de zero, pode também ter uma maior dificuldade de atravessar sistemas membranosos (e de ser dessolvatada), diminuindo a sua absorção. O pH do local onde se encontra a TR do parasito, portanto, deve ser determinante para a maior ou menor atividade desses compostos.

Em relação à interação das amidinas frente à TR, nota-se que as formas mais ativas seriam as formas neutras. Ainda assim, a interação das amidinas frente ao sítio do FAD é a mais satisfatória, e bastante fraca frente ao sítio da TSST ou NADPH. As modificações propostas para sua estrutura frente a NOS se aplicam de igual forma à TR, pois sua protonação se mostrou ruim para sua adequada interação. Com isto, existe a possibilidade das amidinas constituírem, frente a TR, pró-fármacos ou inibidores incompetivos (existem outras amidinas que constituem pró-fármacos, conforme colocado anteriormente). Mas para confirmar tal colocação, são necessários estudos acerca de seu metabolismo.

Graças ao sequenciamento da TR de *L. amazonensis*, foi possível a obtenção neste estudo de estruturas tridimensionais para esta enzima por métodos teóricos, que representam ferramentas úteis para o contínuo desenvolvimento de novos inibidores desta enzima. Foi determinado, através do atracamento molecular na presença e ausência das moléculas de água cristalizadas, que várias moléculas ali presentes, principalmente aquelas que não se encontram em interação a algum resíduo, atrapalham o atracamento dos compostos em estudo. Este atracamento se faz muito melhor na ausência destas moléculas, que provavelmente serão deslocadas pelos compostos ao se atracarem aos sítios estudados.



A semelhança verificada entre as TRs de *T. cruzi* e *L. amazonensis* demonstram a possibilidade da criação de compostos ativos contra os 2 parasitos. Este fato se aplica a praticamente todos os compostos aqui testados, pois todos se mostraram igualmente ativos frente às enzimas dos 2 parasitos. Apenas as fenotiazinas se mostraram mais ativas frente ao *T. cruzi*, enquanto os mesoiônicos e amidinas se mostraram mais ativos frente à *L. amazonensis*. Ainda assim, a diferença de atividade perante estes parasitos é muito pequena, o que ressalta a possibilidade de serem todos ativos frente aos 2 parasitos.

## 6.2. Perspectivas

Por serem mais ativos contra formas promastigotas, os mesoiônicos devem agir melhor se aplicados aos vetores do parasito — por exemplo, nos locais onde esses insetos põe seus ovos, como nos solos e locais úmidos que contém matéria orgânica — e não como fármacos para os hospedeiros vertebrados, visto que nestes últimos a forma que se encontra disseminada é a amastigota.

Com os modelos de inibição criados neste trabalho, a atividade de outras substâncias pode ser calculada contra estas enzimas.

Conforme dito acima, modificações na estrutura dos mesoiônicos e amidinas podem ser então propostas, para a obtenção de estruturas ainda mais ativas.

Com a criação do modelo estrutural de *L. amazonensis*, outras substâncias podem ser agora analisadas frente a este parasito.

Esta estrutura pode ainda ser analisada com outros métodos em modelagem, como a dinâmica molecular, para uma otimização de sua estrutura, e consequentemente dos modelos neste trabalho aplicados.

Novos testes bioquímicos podem ser propostos para a confirmação de uma inibição alostérica, como a verificação da inibição pelo sítio do FAD aqui proposta.

Através da proposição desta inibição alostérica, outros sítios da enzima NOS (como o sítio do grupamento heme, NADPH, FAD etc) podem ser ainda verificados, para a proposição de uma inibição mais próxima à real.

## 7. BIBLIOGRAFIA

ALBUQUERQUE, M.G., HOPFINGER, A.J., BARREIRO, E.J. & ALENCASTRO, R.B.de. Four-dimensional quantitative structure-activity relationship analysis of a series of interphenylene 7-oxabicycloheptane oxazole thromboxane A<sub>2</sub> receptor antagonists. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **1998**, v38, 5, pp 925-938.

ALMEIDA, K.J., COUTINHO, K., ALMEIDA, W.B., ROCHA, W.R. & CANUTO, S.. A monte carlo quantum mechanical study of the solvatochromism of pyrimidine in water and in carbon tetrachloride. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2001**, 3, pp 1583-1587.

ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J.. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, **1990**, 215, pp 403-410.

ANDERSON, A.C.. The process of structure-based drug design. *Chemistry & Biology*, **2003**, 10, pp 787-797.

ANTUNES, A., SANTOS, A.S., SILVA, M.F., RAGI, R. & BAGNATO, V.S.. Método de Hartree-Fock: dois exemplos analiticamente solúveis. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, **1999**, v21, 2, pp 221-232.

ATKINS, P.W. & PAULA, J.de. *Físico-Química*. 7ªed, vol.2. Rio de Janeiro: LTC Editora, **2004**, 620 p.

BAILEY, S., SMITH, K., FAIRLAMB, A.H. & HUNTER, W.N.. Substrate interactions between trypanothione reductase and N<sup>1</sup>-glutathionylspermidine disulphide at 0.28-nm resolution. *European Journal of Biochemistry*, **1993**, v213, pp 67-75.

BAIROCH, A. & BOECKMANN, B.. The SWISS PROT protein sequence data bank, recent developments. *Nucleic Acids Research*, **1993**, v21, 13, pp 3093-3096.

BAIROCH, A. & BOECKMANN, B.. The SWISS PROT protein sequence data bank. *Nucleic Acids Research*, **1991**, 19, pp 2247-2249.

BARRETT, M.P. & GILBERT, I.H.. Perspectives for new drugs against Trypanosomiasis and Leishmaniasis. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2002**, v2, 5, pp 471-482.

BARRETT, M.P., MOTTRAM, J.C. & COOMBS, G.H.. Recent advances in identifying and validating drug targets in trypanosomes and leishmanias. *Trends in Microbiology*, **1999**, v7, 2, pp 83-88.

BASU, N., KOLE, L., GHOSH, A. & DAS, P.K.. Isolation of a nitric oxide synthase from the protozoan parasite, *Leishmania donovani*. *Microbiology Letters*, **1997**, 156, pp 43-47.

BERMAN, H.M., WESTBROOK, J., FENG, Z., GILLILAND, G., BHAT, T.N., WEISSIG, H., SHINDYALOV, I.N. & BOURNE, P.E.. The protein data bank. *Nucleic Acids Research*, **2000**, v28, 1, pp 235-242.

- BINGHAM, R.C., DEWAR, M.J.S. & LO, D.H.. Ground states of molecules. XXV. MINDO/3. An improved version of the MINDO semiempirical SCF-MO method. *Journal of the American Chemical Society*, **1975**, v97, 6, p 1285.
- BÖHM, H.J.. LUDI: Rule-based automatic design of new substituents for enzyme inhibitor leads. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **1992**, 8, pp 593-606.
- BOND, C., ZHANG, Y., BERRIMAN, M., CUNNINGHAM, M., FAIRLAMB, A. & HUNTER, W.. Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural product inhibitors. *Structure*, **1999**, v7, 1, pp 81-89.
- BONET, B., LOERINCS, G. & GEFFNER, H.. A robust and fast selection mechanism for planning. *Proceedings of the 14<sup>th</sup> National Conference on Artificial Intelligence (American Association for Artificial Intelligence)*, **1997**, pp 714-719.
- BOUCHER, J.L., MOALI, C. & TENU, J.P.. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, **1999**, 55, pp 1015-1028.
- BROOIJMANS, N. & KUNTZ, I.D.. Molecular recognition and docking algorithms. *Annual Reviews of Biophysical and Biomolecular Structures*, **2003**, 32, pp 335-373.
- CANTO-CAVALHEIRO, M.M., ECHEVARRIA, A., SOUZA, M.A.S., CYSNE-FINKELSTEIN, L., TORRES, M.A.D. & LEON, L.L.. Effect of amidine derivatives on *Leishmania amazonensis* axenic amastigotes: preliminary studies of structure-activity relationships. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*, **2000**, v50, II, pp 925-928.
- CARLSON, H.A.. Protein flexibility and drug design: how to hit a moving target. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2002**, 6, pp 447-452.
- CARLSON, H.A. & McCAMMON, J.A.. Accommodating protein flexibility in computational drug design. *Molecular Pharmacology*, **2000**, 57, pp 213-218.
- CARVALHO, I., PUPO, M.T., BORGES, A.D.L. & BERNARDES, L.S.C.. Introdução à modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. *Química Nova*, **2003**, v26, 3, pp 428-438.
- CASTRO-PINTO, D.B., GENESTRA, M., MENEZES, G.B., WAGHABI, M., GONÇALVES, A., CISTIA, C.D.N.De, SANT'ANNA, C.M.R., LEON, L.L. & MENDONÇA-LIMA, L. Cloning and expression of trypanothione reductase from a New World *Leishmania* species. *Archives in Microbiology*, **2008**, v189, 4, pp 375-384.
- CASTRO-PINTO, D.B., ECHEVARRIA, A., GENESTRA, M., CYSNE-FINKELSTEIN, L. & LEON, L.. Trypanothione reductase activity is prominent in metacyclic promastigotes and axenic amastigotes of *Leishmania amazonensis*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **2004**, v19, 1, pp 57-63.

- CHAMBERS, C.C., HAWKINS, G.D., CRAMER, C.J. & TRUHLAR, D.G.. Model for aqueous solvation based on class IV atomic charges and first solvation shell effects. *Journal of Physical Chemistry*, **1996**, 100, pp 16385-16398.
- CHAN, C., YIN, H., GARFORTH, J., MCKIE, J.H., JAOUHARI, R., SPEERS, P., DOUGLAS, K.T., ROCK, P.J., YARDLEY, V., CROFT, S. & FAIRLAMB, A.H.. Phenothiazine inhibitors of trypanothione reductase as potential antitrypanosomal and antileishmanial drugs. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1998**, 41, pp 148-156.
- CHEN, Y. & ROSAZZA, J.P.N.. A bacterial nitric oxide synthase from a *Nocardia* species. *Biochemical e Biophysical Research Communications*, **1994**, v203, 2, pp 1251-1258.
- CHENG, Y.C. & PRUSOFF, W.H.. Relationship between the inhibition constant ( $K_I$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology*, **1973**, v22, 23, pp 3099-3108.
- CHIBALE, K. Towards broadspectrum antiprotozoal agents. *Arkivoc*, **2002**, 9, pp 93-98.
- CILLARI, E., ARCOLEO, F., DIELI, M., D'AGOSTINO, R., GROMO, G., LEONI, F. & MILANO, S.. The macrophage-activating tetrapeptide tuftsin induces nitric oxide synthesis and stimulates macrophages to kill *Leishmania* parasites *in vitro*. *Infection and Immunity*, **1994**, v62, 6, pp 2649-2652.
- CLARK, D.E., KRAMER, R.D. & van OPDENBOSCH, N.. Validation of the general-purpose TRIPOS 5.2 force-field. *Journal of Computational Chemistry*, **1989**, 10, pp 982-1012.
- COSTA FILHO, P.A.da & POPPI, R.J.. Algoritmo genético em química. *Química Nova*, **1999**, v22, 3, pp 405-411.
- CRAMER III, R.D., PATTERSON, D.E. & BUNCE, J.D.. Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *Journal of the American Chemical Society*, **1988**, 110, pp 5959-5967.
- CROSS, A.R. & JONES, O.T.G.. The effect of the inhibitor diphenyleneiodonium on the superoxide generating system of neutrophils: Specific labeling of a component polypeptide of the oxidase. *Biochemical Journal*, **1986**, 237, pp 111-116.
- CUNNINGHAM, A.. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Experimental and Molecular Pathology*, **2002**, 72, pp 132-141.
- DEWAR, M.J.S. & WEINER, P.. Ground states of molecules. *Theoretical Chemistry Accounts: Theory, Computation and Modeling*, **1972**, v27, 4, pp 373-375.
- DEWAR, M.J.S. & THIEL, W.. Ground states of molecule. 38. The MNDO method: approximation and parameters. *Journal of the American Chemical Society*, **1977**, 99, pp 4899-4907.
- DEWAR, M.J.S., ZOEBISCH, E.G., HEALY, E.F. & STEWART, J.J.P.. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *Journal of the American Chemical Society*, **1985**, 107, pp 3902-3909.

DEWAR, M.J.S., JIE, C. & YU, J.. SAM1; The first of a new series of general purpose quantum mechanical molecular models. *Tetrahedron*, **1993**, v49, 23, pp 5003-5038.

DeWITTE, R.S. & SHAKHNOVICH, E.I.. SMOG: *de novo* design method based on simple, fast and accurate free energy estimates. 1. Methodology and supporting evidence. *Journal of the American Chemical Society*, **1996**, 118, pp 11733-11744.

DREWS, J.. Drug discovery: a historical perspective. *Science*, **2000**, 287, pp 1960-1964.

DUARTE, H.A.. Índices de reatividade química a partir da teoria do funcional de densidade: formalismo e perspectivas. *Química Nova*, **2001**, v24, 4, pp 501-508.

ECHEVARRIA, A., CHUNG, K.K., GALLEMBECK, S., MACIEL, M.A., MILLER, J., RUMJANEK, V. & SIMAS, A.. Mesoionic compound. 3. Structure of the hydrochloride of 5-(4-methoxyphenyl)-4-phenyl-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylaminide. *Acta Crystallographica*, **1992**, 48, pp 1471-1474.

ELDRIDGE, M.D., MURRAY, C.W., AUTON, T.R., PAOLINI, G.V. & MEE, R.P.. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **1997**, 11, pp 425-445.

FLAWIÁ, M.M., TÉLLEZ-IÑÓN, M.T. & TORRES, H.N.. Signal transduction mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*, **1997**, v13, 1, pp 30-33.

FRÖHLICH, L.G., KOTSONIS, P., TRAUB, H., TAGHAVI-MOGHADAM, S., ALMASOUDI, N., HOFMANN, H., STROBEL, H., MATTER, H., PFLEIDERER, W. & SCHMIDT, H.. Inhibition of neuronal NO synthase by 4-amino pteridine derivatives: structure-activity relationship of antagonists of (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin cofactor. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1999**, v42, 20, pp 4108-4121.

FYFE, P.K., OZA, S.L., FAIRLAMB, A.H. & HUNTER, W.N.. *Leishmania* trypanothione synthetase-amidase structure reveals a basis for regulation of conflicting synthetic and hydrolytic activities. *Journal of Biological Chemistry*, **2008**, v283, 25, pp 17672-17680.

GATLEY, S.J. & SHERRATT, H.S.A.. The effects of diphenyliodonium on mitochondrial reactions. Relation of binding of diphenylene [<sup>125</sup>I]iodonium to mitochondria to the extent of inhibition of oxygen uptake. *Biochemical Journal*, **1976**, 158, pp 307-315.

GENESTRA, MARCELO. Proteína quinase A e óxido nítrico sintase como alvos de derivados amidínicos anti-*Leishmania*. *Tese de Doutorado*, FIOCRUZ **2002**.

GENESTRA, M., ECHEVARRIA, A., CYSNE-FINKELSTEIN, L., VIGNÓLIO-ALVES, L. & LEON, L.L.. Effect of amidine derivatives on nitric oxide production by *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. *Nitric Oxide*, **2003**, 8, pp 1-6.

GENESTRA, M., GUEDES-SILVA, D., SOUZA, W.J.S., CYSNE-FINKELSTEIN, L., SOARES-BEZERRA, R.J., MONTEIRO, F.P. & LEON, L.L.. Nitric oxide synthase (NOS) characterization in *Leishmania amazonensis* axenic amastigotes. *Archives of Medical Research*, **2006a**, 37, pp 328-333.

GENESTRA, M., SOUZA, W.J.S., GUEDES-SILVA, D., MACHADO, G.M.C., CYSNE-FINKELSTEIN, L., SOARES-BEZERRA, R.J., MONTEIRO, F.P. & LEON, L.L.. Nitric oxide biosynthesis by *Leishmania amazonensis* promastigotes containing a high percentage of metacyclic forms. *Archives in Microbiology*, **2006b**, 185, pp 348-354.

de GENST, E., ARESKOU, D., DECAMNIERE, K., MUYLDERMANS, S. & ANDERSSON, K.. Kinetic and affinity predictions of a protein-protein interaction using multivariate experimental design. *Journal of Biological Chemistry*, **2002**, v277, 33, pp 29897-29907.

GERBER, N.C., RODRIGUEZ-CRESPO, I., NISHIDA, C.R. & MONTELLANO, P.R.O.. Active site topologies and co-factor mediated conformational changes of nitric oxide synthases. *Journal of Biological Chemistry*, **1997**, v272, 10, pp 6285-6290.

GOHLKE, H., HENDLICH, M. & KLEBE, G.. Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions. *Journal of Molecular Biology*, **2000**, 295, pp 337-356.

GOHLKE, H. & KLEBE, G.. Approaches to description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. *Angewandte Chemie International Edition*, **2002**, 41, pp 2644-2676.

GOMES, I.N., CALABRICH, A.F., TAVARES, R.S., WIETZEBIN, J., FREITAS, L.A. & VERAS, P.S.. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. *Microbes and Infection*, **2003**, 5, pp 251-260.

GOODFORD, P.J.. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1985**, 28, pp 849-857.

GOODMAN, J.L., PAGEL, M.D. & STONE, M.J.. Relationships between protein structure and dynamics from a database of NMR-derived backbone order parameters. *Journal of Molecular Biology*, **2000**, 265, pp 963-978.

GOSPER, J. J.. A Babel windows interface program. Versão V.1.03b b2 bit, **1998**.

GRIMALDI JR., G. & TESH, R.B.. Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. *Clinical Microbiology Reviews*, **1993**, v6, 3, pp 230-250.

GROOT, B.L.de & GRUBMÜLLER, H.. Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science*, **2001**, 294, pp 2353-2357.

GUERX, N., DIEMAND, A. & PEITSCH, M.C.. Protein modeling for all. *Trends in Biochemical Science*, **1999**, 24, pp 364-367.

GUERX, N. & PEITSCH, M.C.. Swiss-Model and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, **1997**, 18, pp 2714-2723.

van GUNSTEREN, W., BILLETER, S., EISING, A., HÜNENBERGER, P., KRÜGER, P., MARK, A., SCOTT, W. & TIRONI, I.. *Biomolecular Simulations: The GROMOS96 Manual and User Guide*. VdF Hochschulverlag ETHZ, Zürich, **1996**.

HAILU, A., MUSA, A.M., ROYCE, C. & WASUNNA, M. Visceral leishmaniasis: new health tools are needed. *PloS Medicine*, **2004**, v2, 7, pp 590-594.

HALGREN, T.A.. Merck molecular force field. I: Basis, form, scope, parameterization and performance of MMFF94. *Journal of Computational Chemistry*, **1996**, 17, pp 490-519.

HALPERIN, I., MA, B., WOLISON, H. & NUSSINOV, R.. Principles of docking: an overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, **2002**, 47, pp 409-443.

HAMILTON, C.J., SARAVANAMUTHU, A., EGGLESTON, I.M. & FAIRLAMB, A.H.. Ellman's-reagent-mediated regeneration of trypanothione in situ: substrate economical microplate and time-dependent inhibition assays for trypanothione reductase. *Biochemical Journal*, **2003**, 369, pp 529-537.

HANCOCK, J.T. & JONES, O.T.G.. The inhibition by diphenyleneiodonium and its analogues of superoxide generation by macrophages. *Biochemical Journal*, **1987**, 242, pp 103-107.

HENDERSON, G.B., MURGOLO, N.J., KURIYAN, J., OSAPAY, K., KOMINOS, D., BERRY, A., SCRUTTON, N.S., HINCHLIFFE, N.W., PERHAM, R.N. & CERAMI, A.. Engineering the substrate specificity of glutathione reductase toward that of trypanothione reduction. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, **1991**, v88, pp 8769-8773.

HERWALDT, B.L.. Leishmaniasis. *The Lancet*, **1999**, 354, pp 1191-1199.

HOLLAND, P.C., CLARK, M.G., BLOXHAM, D.P. & LARDY, H.A.. Mechanism of action of the hypoglycemic agent diphenyleneiodonium. *Journal of Biological Chemistry*, **1973**, 242, pp 103-107.

<[http://chemdb.niaid.nih.gov/struct\\_search/lr/LR\\_HIV\\_EI.asp?LITREF=3905](http://chemdb.niaid.nih.gov/struct_search/lr/LR_HIV_EI.asp?LITREF=3905)>. Acesso em agosto/2006.

<<http://faculty.vetmed.ucdavis.edu/faculty/gclanzaro/lab/images/sandflyimagelarge.jpg>>. Acesso em agosto/2009.

<[http://www.afpmb.org/netpub/server.np?find&catalog=catalog&template=detail.np&field=it\\_emid&op=matches&value=961&site=Bravado](http://www.afpmb.org/netpub/server.np?find&catalog=catalog&template=detail.np&field=it_emid&op=matches&value=961&site=Bravado)>. Acesso em julho/2006.

<[http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/dcb/tabela\\_modificados.pdf](http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/dcb/tabela_modificados.pdf)>. Acesso em junho/2006.

<[http://www.axxora.com/obesity\\_diabetes-ALX-270-204/opfa.1.1.ALX-270204.1637.4.1.html](http://www.axxora.com/obesity_diabetes-ALX-270-204/opfa.1.1.ALX-270204.1637.4.1.html)>. Acesso em agosto/2006.

<<http://www.ch.embnet.org/software/TCoffee.html>>. Acesso em fevereiro/2007.

<[http://www.chemistry.org/portal/a/c/s/1/acsdisplay.html?DOC=patentwatch%5Carchive%5C050905\\_patentwatch.html](http://www.chemistry.org/portal/a/c/s/1/acsdisplay.html?DOC=patentwatch%5Carchive%5C050905_patentwatch.html)>. Acesso em julho/2006.

<<http://www.fmt.am.gov.br/areas/entomologia/imagens/imagem009.jpg>>. Acesso em agosto/2009.

<<http://www.icc.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=37>>. Acesso em setembro/2009.

<[http://www.infektionsbiologie.ch/seiten/modellparasiten/seiten/leishmania/steckbrief\\_leish.html](http://www.infektionsbiologie.ch/seiten/modellparasiten/seiten/leishmania/steckbrief_leish.html)>. Acesso em junho/2006.

<<http://www.keele.ac.uk/depts/aep/images/rdw%20phleb.jpg>>. Acesso em agosto/2009.

<[http://www.kit.nl/frameset.asp?biomedical\\_research/html/leishmaniasis.asp&frnr=1&](http://www.kit.nl/frameset.asp?biomedical_research/html/leishmaniasis.asp&frnr=1&)>. Acesso em julho/2006.

<<http://www.levriers.net/leishmaniose.html>>. Acesso em julho/2006.

<<http://www.mgm.ufl.edu/~gulig/mmid/>>. Acesso em julho/2006.

<<http://www.msu.edu/course/zol/316/htm>>. Acesso em junho/2006.

<<http://www.parasitesandvectors.com/content/figures/1756-3305-2-S1-S1-3.jpg>>. Acesso em agosto/2009.

<<http://www.rcsb.org/pdb/>>. Acesso em agosto/2004, setembro/2005, fevereiro/2006 e janeiro/2010.

<<http://www.sanger.ac.uk>>. Acesso em fevereiro/2007.

<<http://www.ucm.es/info/parasito/aTLAS.htm>>. Acesso em junho/2006.

<<http://www.unine.ch/zool/para/guerin/index.html>>. Acesso em julho/2006.

<<http://www.wehi.edu.au/research/divisions/inf/labs/handman/leishmaniasis.html>>. Acesso em agosto/2006.

<<http://www.wehi.edu.au/research/overview/inf.html>>. Acesso em julho/2006.

<[http://www.who.int/leishmaniasis/surveillance/slides\\_manual/en/index3.html](http://www.who.int/leishmaniasis/surveillance/slides_manual/en/index3.html)>. Acesso em junho/2010.

<[http://www.who.int/leishmaniasis/surveillance/slides\\_manual/en/index8.html](http://www.who.int/leishmaniasis/surveillance/slides_manual/en/index8.html)>. Acesso em junho/2010.

JACKSON, S.A., SAHNI, S., LEE, L., LUO, Y., NIEDUZAK, T.R., LIANG, G., CHIANG, Y., COLLAR, N., FINK, D., HE, W., LAOUI, A., MERRILL, J., BOFFEY, R., CRACKETT, P., REES, B., WONG, M., GUILLOTEAU, J.P., MATHIEU, M. & REBELLO, S.S.. Design, synthesis and characterization of a novel class of coumarin-based inhibitors of inducible nitric oxide synthase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2005**, v13, pp 2723-2739.



- JENSEN, F.. *Introduction to Computational Chemistry*. West Sussex: John Wiley & Sons, **1999**, 429 p.
- JHA, T.K., SUNDAR, S., THAKUR, C.P., BACHMANN, P., KARBWANG, J., FISCHER, C., VOSS, A. & BERMAN, J.. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of indian visceral leishmaniasis. *The New England Journal of Medicine*, **1999**, v341, 24, pp 1795-1800.
- JIA, O., TINGWEI, C., HUANG, M., LI, H., XIAM, M., POULOS, T. & WANG, P.. Isoform selective substrates of nitric oxide synthase. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2003**, 10.1021.
- JONES, G., WILLETT, P. & GLEN, R.C.. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *Journal of Molecular Biology*, **1995a**, 254, pp 43-53.
- JONES, G., WILLETT, P. & GLEN, R.C.. A genetic algorithm for flexible molecular overlay and pharmacophore elucidation. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **1995b**, 9, pp 532-549.
- JONES, G., WILLETT, P., GLEN, R.C., LEACH, A.R. & TAYLOR, R.. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *Journal of Molecular Biology*, **1997**, 267, pp 727-748.
- JÓNSDÓTTIR, S.Ó., JØRGENSEN, F.S. & BRUNAK, S.. Prediction methods and databases within chemoinformatics: emphasis on drugs and drug candidates. *Bioinformatics*, **2005**, v21, 10, pp 2145-2160.
- JORGENSEN, W.L.. The many roles of computation in drug discovery. *Science*, **2004**, v303, 5665, pp 1813-1818.
- KHAN, M.O., AUSTIN, S.E., CHAN, C., YIN, H., MARKS, D., VAGHJANI, 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 phenothiazides. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2000**, 43, pp 3148-3156.
- KITCHEN, D.B., DECORNEZ, H., FURR, J.R. & BAJORATH, J.. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews in Drug Discovery*, **2004**, 3, pp 935-949.
- KOOLMAN, J. & ROEHM, K.H.. *Color Atlas of Biochemistry*. 2<sup>nd</sup>ed. New York: Thieme, **2005**. 467p.
- KORB, O., STÜTZLE, T. & EXNER, T.E.. An ant colony optimization approach to flexible protein-ligand docking. *Swarm Intelligence*, **2007**, v1, 2, pp 115-134.
- KORB, O., STÜTZLE, T. & EXNER, T.E.. Empirical scoring function for advanced protein-ligand docking with PLANTS. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **2009**, v49, 1, pp 84-96.

KOTSONIS, P., FRÖHLICH, L.G., RAMAN, C.S., LI, H., BERG, M., GERWIG, R., GROEHN, V., KANG, Y., AL-MASOUDI, N., TAGHAVI-MOGHADAM, S., MOHR, D., MÜNCH, U., SCHNABEL, J., MARTASEK, P., MASTERS, B., STROBEL, H., POULOS, T., MATTER, H., PFLEIDERER, W. & SCHMIDT, H.H.. Structural basis for pterin antagonism in nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*, **2001**, 52, pp 49133-49141.

KRAMER, B., RAREY, M. & LENGAUER, T.. Evaluation of the FlexX incremental construction algorithm for protein-ligand docking. *Proteins*, **1999**, 37, pp 228-241.

KRAUTH-SIEGEL, R.L. & INHOFF, O.. Parasite-specific trypanothione reductase as a drug target molecule. *Parasitology Research*, **2003**, 90, pp 77-85.

KRIEGER, S., SCHWARZ, W., ARIYANAYAGAM, M.R., FAIRLAMB, A.H., KRAUTH-SIEGEL, R.L. & CLAYTON, C.. Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. *Molecular Microbiology*, **2000**, v35, 3, pp 542-552.

KUNTZ, I.D., BLANEY, J.M., OATLEY, S.J., LANGRIDGE, R. & FERRIN, T.E.. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *Journal of Molecular Biology*, **1982**, 161, pp 269-288.

KURIYAN, J., KONG, X., KRISHNA, T., SWEET, R., MURGOLO, N., FIELD, H., CERAMI, A. & HENDERSON, G.. X-ray structure of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata* at 2,4-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1991**, 88, pp 8764-8768.

KWON, N.S., NATHAN, C. & STUEHR, D.. Reduced biopterin as a cofactor in the generation of nitrogen oxides by murine macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, **1989**, v264, 34, pp. 20496-20501.

LANSIAUX, A., TANIOUS, F., MISHAL, Z., DASSONNEVILLE, L., KUMAR, A., STEPHENS, C.E., HU, Q., WILSON, W.D., BOYKIN, D.W. & BAILLY, C.. Distribution of furamide analogues in tumor cells: targeting of the nucleus or mitochondria depending on the amidine substitution. *Cancer Research*, **2002**, 62, pp 7219-7229.

LEACH, A.R.. *Molecular Modeling: Principles and Applications*. 2<sup>a</sup>ed. New Jersey: Prentice Hall, **2001**, 744 p.

LEVINE, I.N.. *Physical Chemistry*. 4<sup>a</sup>ed. Singapore: McGraw Hill International Editions, **1995**, 901 p.

LEVINE, I.N.. *Quantum Chemistry*. 5<sup>a</sup>ed. New Jersey: Prentice Hall, **2000**.

LIN, J.H. & LU, A.I.H.. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. *Pharmacological Reviews*, **1997**, v49, 4, pp 403-449.

LOMBARDINO, J.G. & LOWE III, J.A.. The role of the medicinal chemist in drug discovery – then and now. *Nature Reviews in Drug Discovery*, **2004**, 3, pp 853-862.

- LUCASIUS, C.B. & KATEMAN, G.. Genetic algorithms for large-scale optimization in chemometrics: An application. *Trends in Analytical Chemistry*, **1991**, v10, 8, pp 254-261.
- MARTINY, A. & VANNIER-SANTOS, M.A.. *Leishmania*-host interplay: the everlasting rivalry. *Medicinal Chemistry Reviews*, **2005**, v2, 3, pp 231-249.
- MASSEY, V.. The chemical and biological versatility of riboflavin. *Biochemical Society Transactions*, **2000**, v28, 4, pp 283-296.
- MATE, M.J., ORTIZ-LOMBARDIA, M., BOITEL, B., HAOUZ, A., TELLO, D., SUSIN, S.A., PENNINGER, J., KROEMER, G. & ALZARI, P.M.. The crystal structure of the mouse apoptosis-inducing factor AIF. *Nature Structural Biology*, **2002**, v9, 6, pp 442-446.
- McCONKEY, B.J., SOBOLEV, V. & EDELMAN, M.. The performance of current methods in ligand-protein docking. *Current Science*, **2002**, 83, pp 845-856.
- MENNUCCI, B., TONIOLO, A. & TOMASI, J.. *Ab initio* study of the electronic excited states in 4-(*N,N*-dimethylamino)benzotrile with inclusion of solvent effects: the internal charge transfer process. *Journal of the American Chemical Society*, **2000**, 122, pp 10621-10630.
- METZLER, D.E.. *Biochemistry: The chemical reactions of the living cells*. 2<sup>a</sup>ed. v.1 e 2. Elsevier Academic Press, **2003**. 1900 p.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). Secretaria de Vigilância em Saúde. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. 2<sup>a</sup>ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, **2007**. 182p.
- MIRAMAR, M.D., COSTANTINI, P., RAVAGNAN, L., SARAIVA, L.M., HAOUZI, D., BROTHERS, G., PENNINGER, J.M., PELEATO, M.L., KROEMER, G. & SUSIN, S.A.. NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Journal of Biological Chemistry*, **2001**, v276, 19, pp 16391–16398.
- MORGON, N.H.. Computação em química teórica: informações técnicas. *Química Nova*, **2001**, v24, 5, pp 676-682.
- MORRIS, G.M., GOODSSELL, D.S., HALLIDAY, R.S., HUEY, R., HART, W.E., BELEW, R.K. & OLSON, A.J.. Automated docking using a Lamarckian Genetic Algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*, **1998**, 19, pp 1639-1662.
- MUEGGE, I. & MARTIN, Y.C.. A general and fast scoring function for protein-ligand interactions: a simplified potential approach. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1999**, 42, pp 791-804.
- MULLER, S., LIEBAU, E., WALTER, R.D. & KRAUTH-SIEGEL, R.L.. Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. *Trends in Parasitology*, **2003**, v19, 7, pp 320-328.

- MURRAY, R.K., GRANNER, D.K., MAYES, P.A. & RODWELL, V.W.. *Harper's Illustrated Biochemistry*. 26<sup>a</sup>ed. United States of America: Lange Medical Books/McGraw-Hill Companies Inc., **2003**. 693 p.
- NELSON, D.L. & COX, M.M.. *Lehninger's Principles of Biochemistry*. 4<sup>a</sup>ed. New York: W. H. Freeman & Company, **2005**. 1119 p.
- NGUYEN, B., HAMELBERG, D., BAILLY, C., COLSON, P., STANEK, J., BRUN, R., NEIDLE, S. & WILSON, W.D.. Characterization of a novel DNA minor-groove complex. *Biophysical Journal*, **2004**, 86, pp 1028-1041.
- NISHIDA, C.R. & MONTELLANO, P.O.. Electron transfer and catalytic activity of nitric oxide synthases: chimeric constructs of the neuronal, inducible, and endothelial isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, **1998**, v273, 10, pp 5566-5571.
- NISHIDA, C.R. & MONTELLANO, P.O.. Autoinhibition of endothelial nitric-oxide synthase: identification of an electron transfer control element. *Journal of Biological Chemistry*, **1999**, v274, 21, pp 14692-14698.
- NOREL, R., WOLFSON, H. & NUSSINOV, R.. Small molecular recognition: solid angles surface representation and shape complementarity. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, **1999**, 2, pp 177-191.
- NORRIS, D.A., LEESMAN, G.D., SINKO, P.J. & GRASS, G.M.. Development of predictive pharmacokinetic simulation models for drug discovery. *Journal of Controlled Release*, **2000**, 65, pp 55-62.
- NOTREDAME, C., HIGGINS, D. & HERINGA, J.. T-Coffee: a novel method for multiple sequence alignments. *Journal of Biological Chemistry*, **2000**, 302, pp 205-217.
- OHLSTEIN, E.H., RUFFOLO JR., R.R. & ELLIOTT, J.D.. Drug discovery in the next millennium. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **2000**, 40, pp 177-191.
- OLIVEIRA, F.G., SANT'ANNA, C.M.R., CAFFARENA, E.R., DARDENNE, L.E. & BARREIRO, E.J.. Molecular docking study and development of an empirical binding free energy model for phosphodiesterase 4 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2006**, 14, pp 6001-6011.
- OLIVEIRA, FERNANDA GUEDES. Estudo do perfil de interação de fosfodiesterase 4 com seus inibidores. *Dissertação de Mestrado*, IQ/UFRJ **2005**.
- OLIVEIRA, S., FONSECA, S., ROMÃO, P., FERREIRA, S. & CUNHA, F.. Nitric oxide mediates the microbicidal activity of eosinophils. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **1997**, v92, 2, pp 233-235.
- OLLIS, W.D., STANFORTH, S.P. & RAMSDEN, C. A.. Heterocyclic mesomeric betaines. *Tetrahedron*, **1985**, v41, 12, pp 2239-2329.
- OPREA, T.I. & MATTER, H.. Integrating virtual screening in lead discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2004**, 8, pp 349-358.

- PANT, K., BILWES, A., ADAK, S., STUEHR, D. & CRANE, B.. Structure of a nitric oxide synthase heme protein from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, **2002**, 41, pp 11071-11079.
- PANTKE, M.M., REIF, A., VALTSCHANOFF, J.G., SHUTENKO, Z., FREY, A., WEINBERG, R.J., PFLEIDERER, W. & SCHMIDT, H.. Pterin interactions with distinct reductase activities of NO synthase. *Biochemical Journal*, **2001**, 356, pp 43-51.
- PAVETO, C., PEREIRA, C., ESPINOSA, J., MONTAGNA, A., FARBER, M., ESTEVA, M., FLAWIÁ, M. & HECTOR, T.. The nitric oxide transduction pathway in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry*, **1995**, v28, 14, pp 16576-16579.
- PEITSCH, M. C.. Protein modeling by e-mail. *Bio/Technology*, **1995**, 13, pp 658-660.
- PÉREZ-VICTORIA, J.M., PÉREZ-VICTORIA, F.J., PARODI-TALICE, A., JIMENEZ, I.A., RAVELO, A.G., CASTANYS, S. & GAMARRO, F.. Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2001**, v45, 9, pp 2468-2474.
- PLATT, D.E., PARIDA, L., GAO, Y., FLORATOS, A. & RIGOUTSOS, I.. QSAR in grossly underdetermined systems: Opportunities and issues. *IBM Journal of Research & Development*, **2001**, 45, pp 533-544.
- PONTE-SUCRE, A.. Physiological consequences of drug resistance in *Leishmania* and their relevance for chemotherapy. *Kinetoplastid Biology and Disease*, **2003**, v2, 14, 10p.
- POPLE, J.A., SANTRY, D.P. & SEGAL, G.A.. Approximate self-consistent molecular orbital theory. I. Invariant procedures. *Journal of Chemical Physics*, **1965**, 43, pp 129-135.
- POPLE, J.A. & SEGAL, G.A.. Approximate self-consistent molecular orbital theory. II. Calculations with complete neglect of differential overlap. *Journal of Chemical Physics*, **1965**, 43, pp 136-149.
- PROSKURYAKOV, S., KONOPLYANNIKOV, A., SKVORTSOV, V., MANDRUGIN, A. & FEDOSEEV, V.. Structure and activity of NO synthase inhibitors specific to the L-arginine binding site. *Biochemistry-Moscow*, **2005**, v70, 1, pp 8-23.
- RAGAN, C. I. & BLOXHAM, D. P.. Specific labeling of a constituent polypeptide of bovine heart mitochondrial reduced nicotinamide-adenine dinucleotide-ubiquinone reductase by the inhibitor diphenyleiodonium. *Biochemical Journal*, **1977**, 163, pp 605-615.
- RAMACHANDRAN, G.N. & SASISKEHARAN, V.. Conformation of polypeptides and proteins. *Advances in Protein Chemistry*, **1968**, 23, pp 283-256.
- RAMAN, C.S., LI, H., MARTÁSEK, P., KRÁL, V., MASTERS, B.S.S. & POULOS, T.L.. Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center. *Cell*, **1998**, 95, pp 939-950.
- RAREY, M., KRAMER, B., LENGAUER, T. & KLEBE, G.. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *Journal of Molecular Biology*, **1996**, 261, pp 470-489.

- RATH, S., TRIVELIN, L.A., IMBRUNITO, T.R., TOMAZELA, D.M., de JESÚS, M.N., MARZAL, P.C., ANDRADE Jr, H.F. & TEMPONE, A.G.. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Química Nova*, **2003**, v26, 4, pp 550-555.
- REIS, CAMILLA MORETTO DOS. Síntese, utilizando metodologias alternativas, e avaliação citotóxica de compostos mesoiônicos da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-aminida. *Dissertação de Mestrado*, UFRRJ, **2008**.
- ROCHA, G.B., FREIRE, R.O., SIMAS, A.M. & STEWART, J.J.P.. RM1: A reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I. *Journal of Computational Chemistry*, **2006**, v27, 10, pp 1101-1111.
- ROGERS, D.W.. *Computational Chemistry Using the PC*. 3<sup>ed</sup>. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc., **2003**. 349p.
- ROMEIRO, N.C., ALBUQUERQUE, M.G., ALENCASTRO, R.B.de, RAVI, M. & HOPFINGER, A.J.. Construction of 4D-QSAR models for use in the design of novel p38-MAPK inhibitors. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **2005**, v19, 6, pp 385-400.
- SARAVANAMUTHU, A., VICKERS, T., BOND, C., PETERSON, M., HUNTER, W. & FAIRLAMB, A.. Two interacting binding sites for quinacrine derivatives in the active site of trypanothione reductase. *Journal of Biological Chemistry*, **2004**, v279, 28, pp 29493-29500.
- SAYLE, R.A. & MILNER-WHITE, E.J.. RasMol: biomolecular graphics for all. *Trends in Biochemical Sciences*, **1995**, v20, 9, pp 374-376.
- SCHNEIDER, G. & BÖHM, H-J.. Virtual screening and fast automated docking methods. *Drug Discovery Today*, **2002**, v7, 1, pp 64-70.
- SCHWEDE, T., KOPP, J., GUEX, N. & PEITSCH, M.C.. Swiss-Model: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*, **2003**, 31, pp 3381-3385.
- SEARLE, M.S., WILLIAMS, D.H. & GERHARD, U.. Partitioning of free energy contributions in the estimation of binding constants: residual motions and consequences for amide-amide hydrogen bond strengths. *Journal of the American Chemical Society*, **1992**, 114, pp 10697-10704.
- SEARLE, M.S. & WILLIAMS, D.H.. The cost of conformational order: entropy changes in molecular associations. *Journal of the American Chemical Society*, **1992**, 114, pp 10690-10697.
- SILVA, GUSTAVO ROCHA. Estudo da reativação da acetilcolinesterase inibida por organofosforados: análise conformacional da molécula de HI-6 e simulação da reação de desfosforilação. *Dissertação de Mestrado*, IME **2005**.
- SILVA, E., CANTO-CAVALHEIRO, M., BRAZ, V., CYSNE-FINKELSTEIN, L., LEON, L. & ECHEVARRIA, A.. Synthesis, and biological evaluation of new 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine derivatives against *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2002**, 37, pp 979-984.

SOARES-BEZERRA, R.J., SILVA, E.F., ECHEVARRIA, A., GOMES-DA-SILVA, L., CYSNE-FINKELSTEIN, L., MONTEIRO, F.P., LEON, L.L. & GENESTRA, M.. Effect of mesoionic 4-phenyl-5-(cinnamoyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chloride derivative salts on the activities of the nitric oxide synthase and arginase of *Leishmania amazonensis*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **2008**, v23, 3, pp 328–333.

SOUTHAN, G., SZABO, C., O'CONNOR, M., SALZMAN, A. & THIEMERMANN, C.. Amidines are potent inhibitors of nitric oxide synthases: preferential inhibition of the inducible isoform. *European Journal of Pharmacology*, **1995**, v30, 291, pp 311-318.

SOUZA, MARCO ANTÔNIO SOARES DE. Estudo e desenvolvimento do modelo teórico de inibição da enzima tripanotona redutase de *Leishmania* spp. por uma classe de NN'-difenilbenzamidinas. *Tese de Doutorado*, PPGQO/UFRRJ **2007**.

SOUZA, A.C., FERREIRA, C.V., JUCÁ, M.B. & AOYAMA, H.. Riboflavina: uma enzima multifuncional. *Química Nova*, **2005**, v28, 5, pp 887-891.

STEPHENS, C., TANIOUS, F., KIM, S., WILSON, W.D., SCHELL, W., PERFECT, J., FRANZBLAU, S. & BOYKIN, D.. Diguanidino and "reversed" diamidino 2,5-diarylfurans as antimicrobial agents. *Journal of the American Chemical Society*, **2001**, 44, pp 1741-1748.

STEWART, J.J.P.. Optimization of parameters for semi-empirical methods. I Method. *Journal of Computational Chemistry*, **1989a**, v10, 2, pp 209-220.

STEWART, J.J.P.. Optimization of parameters for semiempirical methods. II Applications. *Journal of Computational Chemistry*, **1989b**, v10, 2, pp 221-264.

STEWART, J.J.P.. Reply to "Comments on a comparison of AM1 with the recently developed PM3 method". *Journal of Computational Chemistry*, **1990**, v11, 4, pp 543-544.

STEWART, J.J.P.. Optimization of parameters for semiempirical methods. III Extension of PM3 to Be, Mg, Zn, Ga, Ge, As, Se, Cd, In, Sn, Sb, Te, Hg, Tl, Pb, and Bi. *Journal of Computational Chemistry*, **1991**, v12, 3, pp 320-341.

STEWART, J.J.P.. Application of localized molecular orbitals to the solution of semiempirical self-consistent field equations. *International Journal of Quantum Chemistry*, **1996**, v58, 2, pp 133-146.

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

STEWART, J.J.P.. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *Journal of Molecular Modeling*, **2007**, 13, pp 1173-1213.

STOLL, V.S., SIMPSON, S.J., KRAUTH-SIEGEL, L., WALSH, C.T. & PAI, E.F.. Glutathione Reductase Turned into Trypanothione Reductase: Structural Analysis of an Engineered Change in Substrate Specificity. *Biochemistry*, **1997**, 36, pp 6437-6447.

STRICKLAND, C.L., PUCHALSKI, R., SAVVIDES, S.N. & KARPLUS, P.A.. Overexpression of *Crithidia fasciculata* trypanothione reductase and crystallization using a novel geometry. *Acta Crystallographica Biological Crystallography*, **1995**, v51, 3, pp 334-341.

STUEHR, D.J., FASEHUN, O.A., KWON, N.S., GROSS, S.S., GONZALEZ, J.A., LEVI, R. & NATHAN, C.F.. Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenyleneiodonium and its analogs. *The FASEB Journal*, **1991**, 5, pp 98-103.

SURLES, M.C., RICHARDSON, J.S., RICHARDSON, D.C. & BROOKS, F.P.. Sculpting proteins interactively: continual energy minimization embedded in a graphical modeling system. *Protein Science*, **1994**, 3, pp 198-210.

TAYLOR, M.C., KELLY, J.M., CHAPMAN, C.J., FAIRLAMB, A.H. & MILES, M.A.. The structure, organization, and expression of the *Leishmania donovani* gene encoding trypanothione reductase. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **1994**, 64, pp 293-301.

TEAGUE, S.J.. Implications on protein flexibility for drug discovery. *Nature Reviews: Drug Discovery*, **2003**, 2, pp 527-541.

TIDWELL, R., JONES, S., NAIMAN, N., BERGER, L., BRAKE, W., DYKSTRA, C. & HALL, J.. Activity of cationically substituted bis-benzimidazoles against experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1993**, v37, 8, pp 1713-1716.

TOMASI, J., MENNUCCI, B. & CAMMI, R.. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chemical Reviews*, **2005**, v105, 8, pp 2999-3094.

VANNIER-SANTOS, M.A., MARTINY, A. & SOUZA, W.. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. *Current Pharmaceutical Design*, **2002**, 8, pp 297-318.

VEDANI, A. & DOBLER, M.. 5D-QSAR: The key for simulating induced fit? *Journal of Medicinal Chemistry*, **2002**, v45, 11, pp 2139-2149.

VEDANI, A., DOBLER, M. & LILL, M.A.. Combining protein modeling and 6D-QSAR: Simulating the binding of structurally diverse ligands to the estrogen receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2005**, v48, 11, pp 3700-3703.

VERDONK, M.L., COLE, J.C., HARTSHOM, M.J., MURRAY, C.W. & TAYLOR, R.D.. Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins*, **2003**, 52, pp 609-623.

VOET, D., VOET, J.G. & PRATT, C.W.. *Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular*. 2ªed. Porto Alegre: Editora ArtMed, **2008**. 1264p.

WALLER, R.F. & MCCONVILLE, M.J.. Developmental changes in lysosome morphology and function *Leishmania* parasites. *International Journal of Parasitology*, **2002**, 32, pp 1435-1445.



- WANG, J., ROUSSEAU, D.L., ABU-SOUD, H.M. & STUEHR, D.J.. Heme coordination of NO in NO synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1994a**, 91, pp 10512-10156.
- WANG, S., MILNE, G.W.A., NICKLAUS, M.C., MARQUEZ, V.E., LEE, J. & BLUMBERG, P.M.. Protein kinase C. Modeling of the binding site and prediction of binding constants. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1994b**, 37, pp 1326-1338.
- WEINER, S.J., KOLLMAN, P.A., NGUYEN, D.T. & CASE, D.A.. An all-atom force field for simulations of proteins and nucleic acids. *Journal of Computational Chemistry*, **1986**, 7, 252.
- WILLIAMS, D.A. & LEMKE, T.L.. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. 5<sup>a</sup>ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, **2002**. 1114 p.
- YALÇIN, I., ÖREN, I., TEMİZ, Ö. & ŞENER, E.A.. QSARs of some novel isosteric heterocyclics with antifungal activity. *Acta Biochimica Polonica*, **2000**, v47, 2, pp 481-486.
- ZANI, C. & FAIRLAMB, A.. 8-methoxy-naphtho[2,3-*b*]thiophen-4,9-quinone, a non-competitive inhibitor of trypanothione reductase. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **2003**, v98, 4, pp 565-568.
- ZHANG, Y., BOND, C., BAILEY, S., CUNNINGHAM, M., FAIRLAMB, A. & HUNTER, W.. The crystal structure of trypanothione reductase from the human pathogen *Trypanosoma cruzi* at 2.3 Å resolution. *Protein Science*, **1996**, 5, pp 52-61.

## 8. ANEXOS

**A** → Esquema representativo da taxonomia do gênero *Leishmania*.

**B** → Novos casos de leishmaniose tegumentar no Brasil, segundo as Unidades Federadas (estados), no período de 1985 a 2005.

**C** → Coeficiente de detecção de leishmaniose tegumentar por 100.000 habitantes no Brasil, no período de 1987 a 2005.

**D** → Densidade de casos de leishmaniose tegumentar no Brasil por município, em 2003 e 2004 (acima), e densidade de casos (2004) e circuitos de leishmaniose por município, de 2001 a 2003.

**E** → Casos de leishmaniose tegumentar por município no Brasil, em 2003 e 2004 (cada ponto equivale a 5 casos notificados) – acima; e casos de leishmaniose tegumentar por município em 2004 e circuitos de produção de leishmaniose tegumentar no período de 2001 a 2003.

**F** → Demonstração da matriz que descreve a estrutura **8**. Em amarelo, encontra-se destacada a linha de comando do programa Mopac (Fujitsu Co.); as 2 linhas seguintes dizem respeito a informações diversas. As colunas encontram-se destacadas pela presença de chaves, que demonstram seu significado perante a matriz. As referentes às “*flags*”, se modificadas para 0, fazem com que os átomos fiquem fixos; se permanecem com o valor 1, possuem posicionamento livre, de acordo com a minimização do sistema.

**G** → Estrutura dos aminoácidos proteinogênicos, notação (3 letras e letra única) e características estruturais pertinentes.

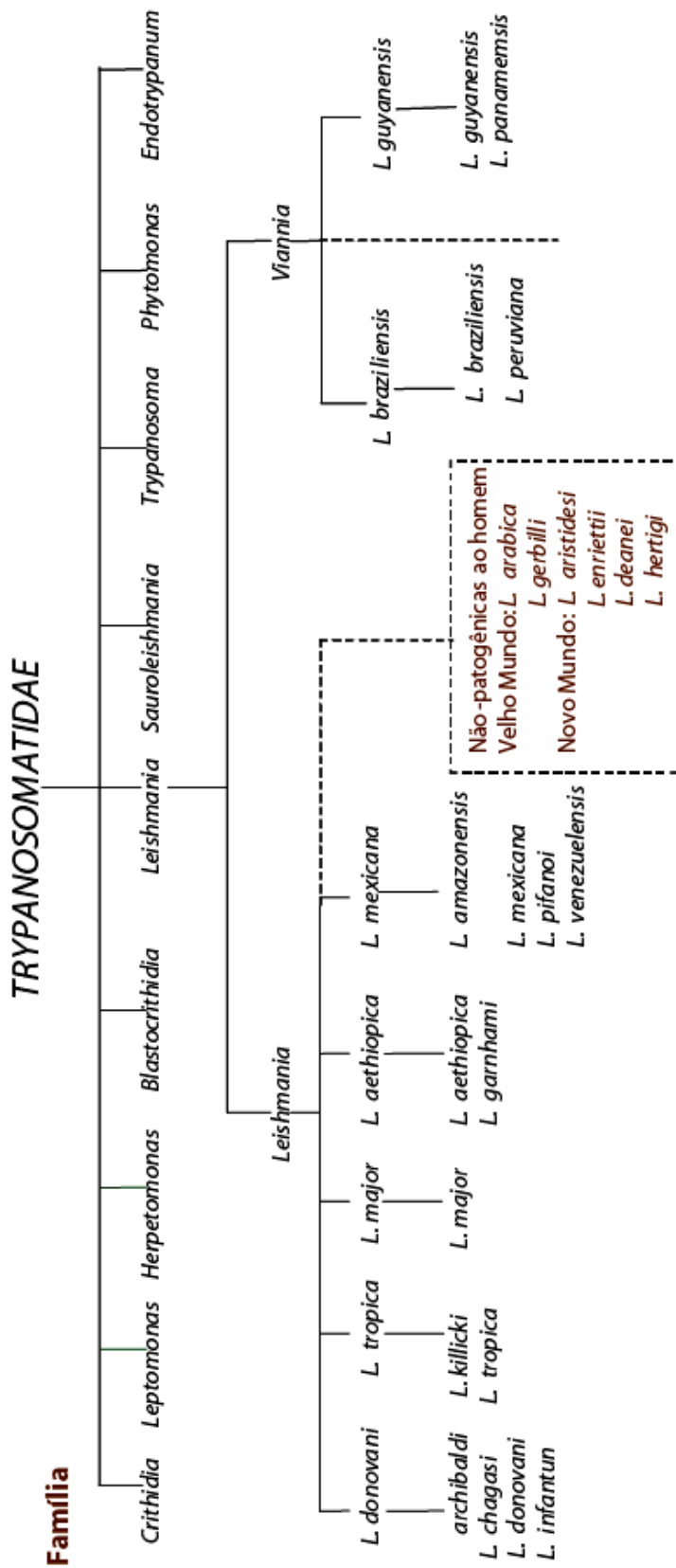
**H (1 - 3)** → Descritores simples obtidos após o atracamento das **fenotiazinas** na TR, nos sítios da TSST e FAD.

**I (1 - 8)** → Descritores simples obtidos após o atracamento dos **mesoiônicos** (nos estados neutro e catiônico) na TR, nos sítios da TSST, NADPH e FAD.

**J (1 - 10)** → Descritores simples obtidos após o atracamento das **amidinas** (nos estados neutro e catiônico) na TR, nos sítios da TSST, NADPH e FAD.

**K** → Tabela indicando os resíduos presentes no sítio (TSST) onde foram atracadas as fenotiazinas, para realização de cálculo semi-empírico. Estão indicados ainda a quantidade de resíduos em cada recorte (Nº Res.), as moléculas de água presentes nos sítios (H<sub>2</sub>O) e a carga final de cada sítio.

ANEXO A → Esquema representativo da taxonomia do gênero *Leishmania* [MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007].



**ANEXO B →** Novos casos de leishmaniose tegumentar no Brasil, segundo as Unidades Federadas (estados), no período de 1985 a 2005 [MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007].

UF	ANO	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
<b>BRASIL</b>		13.654	15.545	26.253	25.153	21.129	24.753	28.450	24.668	27.454	35.103	35.748	30.030	31.303	21.801	30.367	33.720	26.370	28.668	30.873	28.645	26.525
<b>NO</b>		5.935	4.777	10.195	10.209	7.365	7.318	9.359	9.720	9.739	11.306	13.117	9.987	11.058	6.078	9.129	11.140	8.117	10.328	13.549	13.095	10.703
RO		279	919	3.401	3.299	1.770	1.346	2.118	2.220	2.822	2.249	2.499	1.738	1.465	1.317	1.737	1.421	1.585	1.836	1.984	2.177	1.669
AC		204	403	679	364	204	59	252	403	563	372	365	490	413	280	490	903	711	1.089	1.372	1.526	1.360
AM		3.464	1.641	2.528	2.532	1.250	1.733	2.590	3.424	1.982	741	1.557	988	2.290	715		1.744	2.179	2.151	3.829	2.202	1.970
RR		72	113	134	333	474	170	507	492	605	470	251	303	308	244	146	352	458	460	307	160	283
PA		1.222	1.321	2.855	3.091	2.775	3.269	3.196	2.236	2.543	5.748	7.064	5.042	5.038	2.177	5.051	5.565	2.567	3.782	4.889	5.322	4.347
AP		694	380	598	590	480	185	394	475	643	895	645	563	902	892	884	592	52	386	558	1.152	578
TO						412	556	302	470	581	831	736	863	642	453	821	563	565	624	610	556	496
<b>NE</b>		4.417	7.377	11.373	8.862	8.896	12.428	12.020	7.140	8.218	14.426	13.887	11.303	11.868	8.455	9.112	13.078	10.849	9.437	7.980	7.818	8.071
MA		1.623	3.274	3.724	2.369	2.196	3.109	3.926	2.027	2.868	6.262	4.725	3.794	4.634	2.355	3.005	4.488	5.733	4.446	3.774	3.059	3.376
PI		52	91	142	141	100	249	324	161	72	56	40	96	102	96	106	95	166	152	127	115	248
CE		836	1.829	3.919	2.453	2.746	3.848	2.862	1.358	1.463	1.928	4.262	2.793	2.787	1.490	1.372	3.043	2.539	2.142	1.328	2.057	1.980
RN		1	8	648	30	9	20	6	...	13	4	15	42	49	26	13	11	8	6	8	13	9
PB		251	233	431	224	182	85	165	342	273	264	196	173	233	113	128	177	51	67	56	72	66
PE		259	125	274	268	258	680	474	378	436	806	891	714	667	643	979	1.149	524	569	548	706	330
AL		9	13	84	43	36	28	54	53	71	224	114	81	144	72	156	258	85	87	97	63	56
SE		45	70	166	34	15	54	50	24	46	46	52	19	47	34	30	58	92	57	16	7	10
BA		1.341	1.734	1.985	3.300	3.354	4.355	4.159	2.797	2.976	4.836	3.592	3.591	3.205	3.626	3.323	3.799	1.651	1.911	2.026	1.726	1.996
<b>SE</b>		844	963	1.218	2.017	2.241	2.347	3.386	3.854	4.771	3.763	2.605	2.369	2.294	2.945	3.983	2.938	2.133	2.943	3.255	2.529	2.764
MG		337	444	523	1.406	1.434	1.338	2.134	2.504	2.547	2.040	1.574	1.504	1.445	1.973	2.701	1.874	1.132	1.643	1.765	1.495	1.773
ES		279	257	288	273	573	670	728	722	893	490	307	244	404	646	884	548	352	209	234	145	189
RJ		103	124	71	67	83	227	319	269	496	396	241	282	302	186	269	250	171	295	233	213	313
SP		125	138	336	271	151	112	205	359	835	837	483	339	143	140	129	266	478	796	1.023	676	489
<b>SUL</b>		420	448	660	199	318	192	139	690	819	1.361	796	617	430	455	460	853	478	937	930	603	535
PR		419	447	652	194	315	192	139	690	819	1.361	794	616	428	453	457	850	465	903	886	575	439
SC		0	0	6	5	3	0	0	0	0	0	0	1	2	2	3	1	9	14	27	17	84
RS		1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	4	20	17	11	12
<b>CO</b>		2.038	1.980	2.807	3.866	2.309	2.468	3.546	3.264	3.907	4.247	5.343	4.721	4.640	2.981	6.384	4.605	4.727	4.918	5.000	4.458	4.303
MS		296	298	173	184	156	221	165	304	215	243	568	178	433	256	338	158	393	304	235	192	136
MT		1.157	1.300	2.281	3.223	1.867	2.021	3.200	2.682	3.346	3.734	4.492	4.195	3.779	2.283	5.504	3.921	3.884	4.131	4.203	3.753	3.628
GO		585	382	353	459	286	226	181	277	345	270	281	348	414	440	532	525	419	452	502	455	511
DF		0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	0	14	2	10	1	31	31	60	58	28
<b>UF Ignorada</b>		...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	1.033	1.013	887	1.299	1.106	66	105	159	142	149

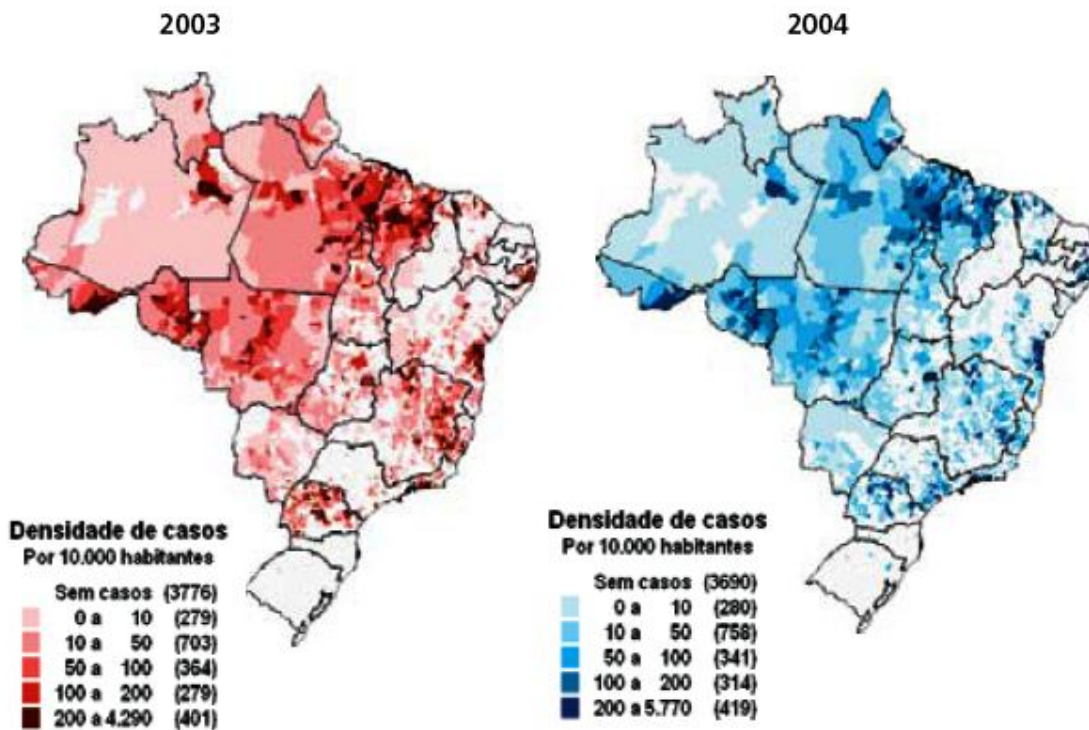
Fonte: SVS/MS

ANEXO C → Coeficiente de detecção de leishmaniose tegumentar por 100.000 habitantes no Brasil, no período de 1987 a 2005 [MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007].

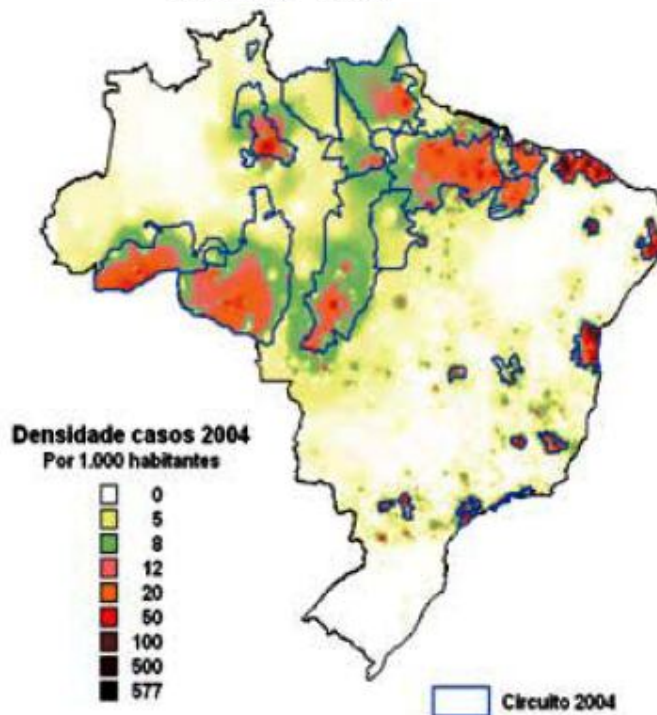
UF	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
<b>BRASIL</b>	19,12	17,99	14,85	17,39	19,36	16,53	18,11	22,83	22,94	19,02	19,61	13,47	19,78	20,29	22,41	19,55	17,74	16,03	14,44
<b>NORTE</b>	115,23	111,46	77,81	74,95	93,04	93,92	91,62	103,73	117,55	88,46	97,94	51,21	92,31	89,84	113,43	92,48	102,96	94,54	73,09
RO	372,67	339,61	172,05	124,11	186,03	186,41	227,27	174,18	186,56	141,19	119	103,19	134,35	107,84	147,92	182,50	143,35	143,99	108,89
AC	179,72	93,69	51,14	14,43	60,17	94,09	128,69	83,31	80,18	101,30	85,37	54,46	93,07	166,64	162,44	221,15	265,07	257,41	201,57
AM	135,02	130,91	62,68	84,43	122,79	158,20	89,38	32,65	67,11	41,35	95,84	28,36	80,83	66,02	99,26	78,77	122,53	73,93	61,60
RR	78,78	182,17	242,83	82,05	231,72	213,82	250,93	186,66	95,73	122,61	124,63	93,59	55,08	128,86	225,45	143,86	87,88	42,43	72,83
PA	64,60	67,76	59,05	67,63	64,38	43,93	48,78	107,80	129,65	91,49	91,41	37,73	86,16	92,67	116	72,16	83,33	80,39	62,65
AP	239,01	226,31	177,19	65,88	135,67	158,49	208,23	281,80	197,74	148,37	237,7	211,96	201,83	129,03	70,72	76,087	77,22	216,78	98,22
TO	-	-	46,97	62,03	32,85	49,72	59,88	83,87	73,09	82,30	61,22	40,89	72,34	48,44	61,54	57,66	48,29	44,28	37,99
<b>NORDESTE</b>	28,53	21,85	21,56	29,65	28,24	16,53	18,76	32,49	30,88	25,25	26,17	18,45	19,04	27,96	31,86	23,64	16,21	15,51	15,91
MA	80,78	50,45	45,95	63,97	79,49	40,42	56,36	121,33	90,32	72,65	88,72	43,96	55,72	81,89	94,63	81,66	67,90	52,54	55,69
PI	5,84	5,71	3,98	9,77	12,53	6,14	2,71	2,08	1,47	3,59	3,81	3,53	3,81	3,45	7,39	6,25	5,20	2,61	8,48
CE	65,35	40,24	44,35	61,22	44,88	21,01	22,34	29,07	63,48	41,01	40,92	21,24	17,6	42,26	55,38	31,42	12,26	26,30	24,50
RN	28,95	1,31	0,39	0,84	0,25	0,00	0,52	0,16	0,58	1,64	1,89	0,99	0,48	0,4	0,51	0,42	0,24	0,48	0,30
PB	14,12	7,24	5,81	2,68	5,15	10,55	8,34	7,98	5,87	5,23	7,04	3,36	1,21	5,2	2,31	2,80	1,65	2,03	1,92
PE	4,04	3,90	3,70	9,64	6,64	5,24	5,98	10,93	11,97	9,65	9,01	8,54	11,62	15,04	8,25	8,35	7,57	8,90	3,96
AL	3,60	1,81	1,48	1,13	2,14	2,07	2,73	8,47	4,24	3,08	5,46	2,67	5,76	9,42	5,64	3,05	2,91	2,27	1,82
SE	12,11	2,42	1,05	3,69	3,34	1,58	2,96	2,91	3,24	1,17	2,89	2,01	1,75	3,33	6,33	3,68	1,07	0,37	0,51
BA	17,98	29,30	29,22	37,27	34,98	23,14	24,24	38,80	28,40	28,63	25,21	28,21	25,72	28,92	34,42	24,63	15,80	11,59	14,51
<b>SUDESTE</b>	2,07	3,36	3,68	3,79	5,39	6,05	7,38	5,75	3,93	3,54	3,37	4,27	4,83	4,15	2,84	4,72	4,60	3,24	3,53
MG	3,50	9,28	9,34	8,60	13,54	15,69	15,78	12,49	9,54	9,02	8,54	11,53	12,06	10,71	7,89	11,22	10,36	7,87	9,23
ES	11,99	11,12	22,86	26,20	27,94	27,21	33,09	17,86	11,02	8,71	14,16	22,31	30,11	18,38	11,24	6,93	7,11	4,34	5,52
RJ	0,58	0,54	0,66	1,79	2,49	2,08	3,80	3,00	1,81	2,10	2,25	1,35	2,04	1,79	1,54	2,32	1,69	1,44	2,08
SP	1,15	0,91	0,49	0,36	0,65	1,12	2,55	2,52	1,43	0,99	0,41	0,39	0,36	0,73	0,23	2,33	2,76	1,62	1,21
<b>SUL</b>	3,13	0,93	1,47	0,88	0,63	3,08	3,61	5,94	3,44	2,62	1,8	1,88	1,88	3,44	2,53	4,09	3,65	2,31	2,02
PR	7,98	2,35	3,79	2,29	1,64	8,10	9,54	15,73	9,11	6,84	4,75	4,95	4,88	8,95	6,56	10,52	9,45	5,79	4,38
SC	-	0,12	-	-	-	-	-	-	-	0,02	0,04	0,03	0,05	0,01	0,05	0,25	0,12	0,33	1,41
RS	0,02	-	-	-	-	-	-	-	0,02	-	-	-	-	0,01	0,01	0,08	0,08	0,08	0,11
<b>C. OESTE</b>	32,91	44,09	25,65	26,74	37,67	33,77	39,57	42,31	52,01	45,10	44,18	27,11	50,45	40,22	42,49	44,95	37,42	35,64	32,98
MS	10,55	10,97	9,10	12,63	9,25	16,73	11,62	12,91	29,69	9,23	22,46	12,82	11,08	7,67	16,7	16,35	12,72	8,91	6,23
MT	132,43	178,67	99,13	103,09	158,23	127,24	153,61	166,19	194,15	187,63	169,01	97,91	206,05	162,05	165,43	173,57	145,55	140,90	129,17
GO	9,51	12,10	7,38	5,72	4,49	6,76	8,27	6,37	6,52	7,71	9,16	9,27	10,98	10,59	10,57	10,08	8,35	7,64	8,93
DF	0,00	-	0,00	0,00	-	0,06	0,06	-	0,12	-	0,76	0,1	0,5	0,04	0,09	2,05	1,42	2,55	1,29

Fonte: SVS/MS

**ANEXO D** → Densidade de casos de leishmaniose tegumentar no Brasil por município, em 2003 e 2004 (acima), e densidade de casos (2004) e circuitos de leishmaniose por município, de 2001 a 2003 (abaixo) [MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007].



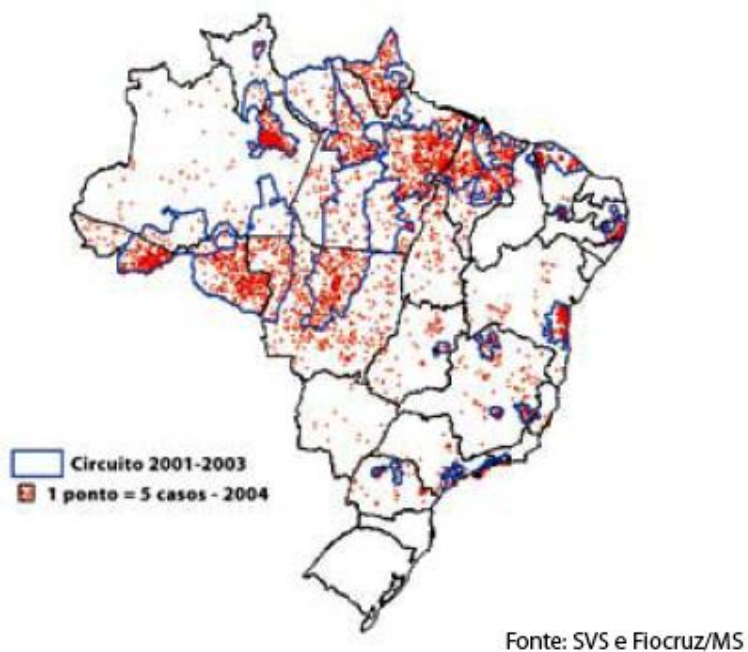
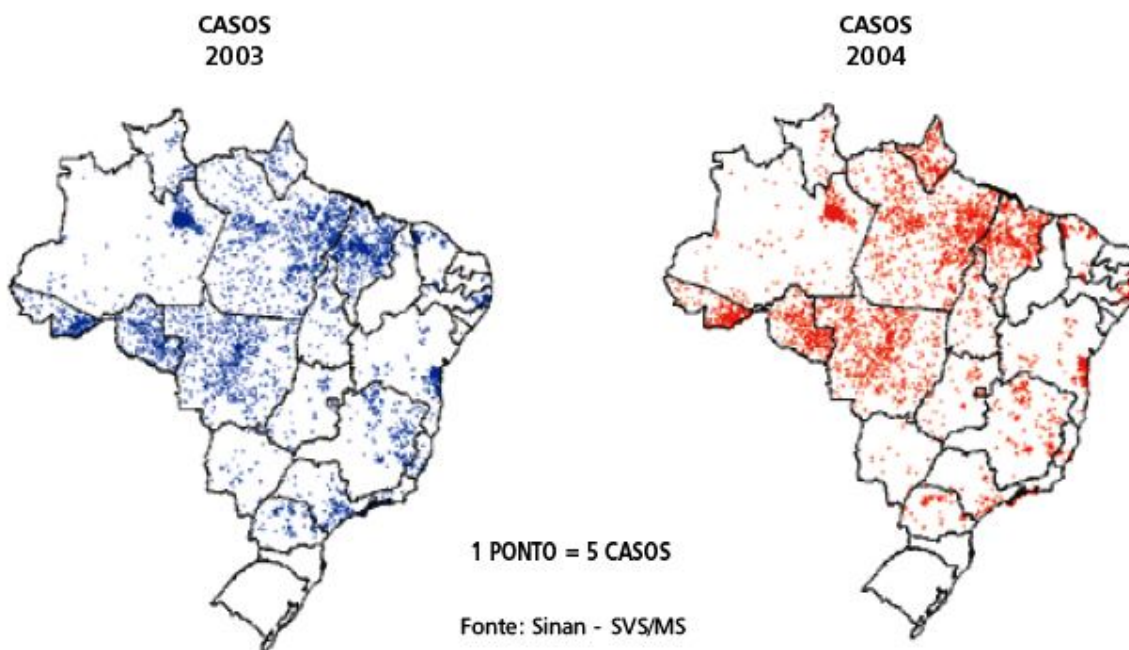
Fonte: Sinan - SVS/MS



Fonte: SVS e Flocruz/MS



**ANEXO E** → Casos de leishmaniose tegumentar por município no Brasil, em 2003 e 2004 (cada ponto equivale a 5 casos notificados) – acima; e casos de leishmaniose tegumentar por município em 2004 e circuitos de produção de leishmaniose tegumentar no período de 2001 a 2003 (abaixo) [MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007].



**ANEXO F** → Demonstração da matriz que descreve a estrutura **8**. Em amarelo, encontra-se destacada a linha de comando do programa Mopac (Fujitsu Co.); as 2 linhas seguintes dizem respeito a informações diversas. As colunas encontram-se destacadas pela presença de chaves, que demonstram seu significado perante a matriz. As referentes às “*flags*”, se modificadas para 0, fazem com que os átomos fiquem fixos; se permanecem com o valor 1, possuem posicionamento livre, de acordo com a minimização do sistema.

PM3 MMOK MOZYME CHARGE=-1 T=2D EF NOINTER NOLOG										
aminoacidos e aguas a 4A do inibidor 8 (sitio da pterina NO sintase)										
Inclui carboxilatos do grupo HEME										
N	0.0000000	0	0.0000000	0	0.0000000	0	0	0	0	0.0000
C	1.4610000	0	0.0000000	0	0.0000000	0	1	0	0	0.0000
C	1.5394782	0	115.716164	0	0.0000000	0	2	1	0	0.0000
O	1.2285947	0	120.581551	0	127.777940	0	3	2	1	0.0000
N	7.1845285	0	126.167118	0	40.649392	0	4	3	2	0.0000
C	1.4559742	0	78.535821	0	67.864216	0	5	4	3	0.0000
C	1.5285804	0	110.585878	0	-117.395146	0	6	5	4	0.0000
O	1.2366996	0	121.272293	0	136.137680	0	7	6	5	0.0000
N	1.3299767	0	115.618281	0	-43.683200	0	7	6	5	0.0000
C	1.4665436	0	124.095572	0	-177.481835	0	9	7	6	0.0000
C	1.5319899	0	113.903634	0	-80.671774	0	10	9	7	0.0000
O	1.2276877	0	120.628046	0	179.660839	0	11	10	9	0.0000
N	8.3828799	0	110.686390	0	-94.991063	0	12	11	10	0.0000
C	1.4641930	0	108.248266	0	96.834999	0	13	12	11	0.0000
C	1.5273641	0	112.717909	1	144.303701	0	14	13	12	0.0000
O	1.2193412	0	120.327115	0	135.600566	0	15	14	13	0.0000
N	11.4382800	0	89.366393	0	-82.638449	0	9	7	6	0.0000
C	1.4544820	0	55.380105	0	-127.725334	0	17	9	7	0.0000
C	1.5225285	0	116.289383	0	-145.951909	0	18	17	9	0.0000
O	1.2278978	0	120.838723	0	115.469120	0	19	18	17	0.0000
N	7.7278212	0	107.473570	0	-111.121810	0	3	2	1	0.0000
C	1.4619104	0	65.320352	0	-84.783575	0	21	3	2	0.0000
C	1.5232416	0	115.191199	0	-170.234299	0	22	21	3	0.0000
O	1.2358321	0	120.279254	0	149.966907	0	23	22	21	0.0000
N	1.3417858	0	116.659407	0	-30.591175	0	23	22	21	0.0000
C	1.4651515	0	122.616954	0	179.974377	0	25	23	22	0.0000
C	1.5307482	0	113.496082	0	-91.488785	0	26	25	23	0.0000
O	1.2381377	0	120.770227	0	150.418302	0	27	26	25	0.0000
C	5.2365391	0	128.553059	0	58.291090	0	28	27	26	0.0000
C	5.3533512	0	109.219664	0	15.822479	0	29	28	27	0.0000
C	1.5504032	1	109.832197	1	-120.626885	1	2	1	3	0.0000
C	1.4721090	1	113.939052	1	-160.672728	1	31	2	1	0.0000
C	1.3859571	1	126.069091	1	89.582714	1	32	31	2	0.0000
C	1.4375705	1	125.854101	1	-95.218659	1	32	31	2	0.0000
N	1.4044034	1	108.703578	1	176.218281	1	33	32	31	0.0000
C	1.4069762	1	108.639333	1	-1.260769	1	35	33	32	0.0000
C	1.4031244	1	133.295453	1	3.831247	1	34	32	31	0.0000
C	1.4031001	1	130.680401	1	-177.702231	1	36	35	33	0.0000
C	1.3781277	1	118.439041	1	-178.390016	1	37	34	32	0.0000
C	1.3773504	1	117.271378	1	-179.429289	1	38	36	35	0.0000
C	1.5512608	1	110.358180	1	120.123966	1	6	5	4	0.0000
C	1.4917500	1	115.642680	1	-178.541168	1	41	6	5	0.0000
C	1.3947720	1	120.589328	1	62.646931	1	42	41	6	0.0000
C	1.3971163	1	120.037557	1	-120.403917	1	42	41	6	0.0000
C	1.3910622	1	120.419240	1	178.599993	1	43	42	41	0.0000
C	1.3903359	1	120.143648	1	-177.454534	1	44	42	41	0.0000
C	1.3906294	1	120.024834	1	-1.654102	1	45	43	42	0.0000
C	1.5413218	1	110.873761	1	155.278459	1	10	9	7	0.0000
C	1.4775321	1	112.582836	1	-51.234737	1	48	10	9	0.0000
N	1.4063687	1	125.372938	1	-72.712749	1	49	48	10	0.0000
C	1.3919264	1	128.688473	1	107.956312	1	49	48	10	0.0000
C	1.3884293	1	108.347807	1	179.578208	1	50	49	48	0.0000
N	1.3536451	1	108.349130	1	0.957441	1	52	50	49	0.0000

{ Tamanho da ligação } *flag*
{ Ângulo da ligação } *flag*
{ Ângulo diedro (torção) } *flag*

Continua...



C	1.5544314	1	115.529348	1	20.959155	1	14	13	12	0.0000
C	1.5228293	1	109.995560	1	-165.919368	1	54	14	13	0.0000
C	1.5206150	1	112.814979	1	-43.702206	1	54	14	13	0.0000
C	1.5498987	1	112.038366	1	94.451298	1	18	17	9	0.0000
C	1.5159037	1	113.687878	1	-67.837565	1	57	18	17	0.0000
C	1.5252901	1	115.530843	1	-83.171989	1	58	57	18	0.0000
N	1.4820206	1	118.170227	1	-43.689224	1	59	58	57	0.0000
C	1.4271237	1	122.708316	1	-48.719565	1	60	59	58	0.0000
N	1.3383083	1	123.924078	1	-8.955629	1	61	60	59	0.0000
N	1.4141814	1	116.333145	1	169.606029	1	61	60	59	0.0000
C	1.5427767	1	111.097133	1	71.866947	1	22	21	3	0.0000
C	1.5448113	1	109.346527	1	150.868843	1	26	25	23	0.0000
C	1.4783078	1	115.008744	1	-68.188268	1	65	26	25	0.0000
C	1.3792886	1	129.703472	1	38.589314	1	66	65	26	0.0000
C	1.4480235	1	122.573255	1	-142.458378	1	66	65	26	0.0000
N	1.4146975	1	109.185461	1	176.885985	1	67	66	65	0.0000
C	1.4158651	1	107.364122	1	179.281105	1	68	66	65	0.0000
C	1.4012833	1	133.018425	1	-1.678170	1	68	66	65	0.0000
C	1.4035298	1	121.741015	1	-178.244770	1	70	68	66	0.0000
C	1.3805959	1	118.562660	1	-179.314226	1	71	68	66	0.0000
C	1.3817594	1	117.329472	1	-2.797065	1	72	70	68	0.0000
O	2.7637572	1	129.189244	1	-5.528133	1	62	61	60	0.0000
O	2.7183824	1	108.290709	1	-166.421534	1	62	61	60	0.0000
O	2.7726790	1	119.568091	1	-51.726914	1	75	62	61	0.0000
O	2.7969959	1	135.460564	1	4.668525	1	50	49	48	0.0000
C	2.8334832	1	121.530016	1	156.158438	1	69	67	66	0.0000
O	1.5134418	1	136.063139	1	-120.232947	1	29	28	27	0.0000
C	1.5239035	1	115.574871	1	30.155399	1	80	29	28	0.0000
O	1.2866278	1	122.976940	1	-18.955249	1	81	80	29	0.0000
O	1.2490813	1	121.411882	1	163.001430	1	81	80	29	0.0000
C	1.5085510	1	112.247741	1	-146.523352	1	30	29	28	0.0000
C	1.5555057	1	110.634712	1	112.050401	1	84	30	29	0.0000
O	1.2533016	1	118.924891	1	101.718470	1	85	84	30	0.0000
O	1.2581375	1	118.571455	1	-78.510722	1	85	84	30	0.0000
N	3.6467461	1	97.463904	1	-49.342410	1	77	75	62	0.0000
C	1.3665789	1	75.716408	1	-26.068577	1	88	77	75	0.0000
N	1.3771808	1	118.871484	1	-75.766917	1	89	88	77	0.0000
N	1.4072310	1	122.654200	1	106.985670	1	89	88	77	0.0000
C	1.4175930	1	120.047888	1	4.797497	1	91	89	88	0.0000
N	2.5114050	1	146.440017	1	-3.970483	1	92	91	89	0.0000
C	1.4994729	1	140.984805	1	38.483059	1	93	92	91	0.0000
C	1.5088714	1	111.515668	1	-52.935833	1	94	93	92	0.0000
N	1.2906130	1	124.285034	1	23.498645	1	95	94	93	0.0000
C	1.3724646	1	116.047573	1	87.834245	1	88	77	75	0.0000
C	1.3863914	1	123.738012	1	-85.255112	1	97	88	77	0.0000
C	1.5441114	1	109.145756	1	-172.576093	1	94	93	92	0.0000
H	0.9987742	1	109.354150	1	-178.479768	1	1	2	3	0.0000
H	0.9989770	1	110.203364	1	61.384663	1	1	2	3	0.0000
H	1.1193212	1	106.185040	1	121.146576	1	2	1	3	0.0000
H	1.1003104	1	118.284679	1	-54.314345	1	3	2	1	0.0000
H	0.9971855	1	32.265352	1	-125.083885	1	5	4	3	0.0000
H	1.0010025	1	130.108595	1	176.969987	1	5	4	3	0.0000
H	1.1223462	1	110.086008	1	0.761257	1	6	5	4	0.0000
H	0.9989760	1	120.475481	1	-2.247922	1	9	7	6	0.0000
H	1.1253395	1	107.184571	1	36.595092	1	10	9	7	0.0000
H	1.1003590	1	118.867630	1	0.187524	1	11	10	9	0.0000
H	1.0042052	1	15.554807	1	0.178994	1	13	12	11	0.0000
H	0.9999990	1	95.303303	1	-149.445103	1	13	12	11	0.0000
H	1.1274706	1	103.559520	1	-97.032873	1	14	13	12	0.0000
H	1.1011862	1	118.256840	1	-45.694664	1	15	14	13	0.0000
H	1.0028589	1	66.916646	1	7.006712	1	17	9	7	0.0000
H	0.9992882	1	159.332654	1	-76.513636	1	17	9	7	0.0000
H	1.1209326	1	105.173962	1	-24.285438	1	18	17	9	0.0000

Continua...



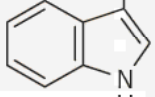
H	1.1013306	1	118.309295	1	-65.248107	1	19	18	17	0.0000
H	0.9981388	1	46.478208	1	116.571149	1	21	3	2	0.0000
H	1.0000110	1	110.397816	1	19.663739	1	21	3	2	0.0000
H	1.1277061	1	108.816011	1	-48.114209	1	22	21	3	0.0000
H	0.9966695	1	121.332062	1	0.460065	1	25	23	22	0.0000
H	1.1240658	1	108.183860	1	31.556755	1	26	25	23	0.0000
H	1.0996222	1	119.162721	1	-30.577409	1	27	26	25	0.0000
H	1.0974215	1	107.917001	1	88.535488	1	29	28	27	0.0000
H	1.0986815	1	34.688503	1	-176.402372	1	29	28	27	0.0000
H	1.0990837	1	74.412493	1	-15.094297	1	29	28	27	0.0000
H	1.0992161	1	56.402395	1	110.886352	1	30	29	28	0.0000
H	1.1045094	1	54.325842	1	-46.113307	1	30	29	28	0.0000
H	1.0972192	1	136.104207	1	30.963904	1	30	29	28	0.0000
H	1.1112016	1	109.788115	1	76.738440	1	31	2	1	0.0000
H	1.1101221	1	110.080812	1	-39.361579	1	31	2	1	0.0000
H	1.0897013	1	128.386320	1	-3.705449	1	33	32	31	0.0000
H	0.9872842	1	125.748238	1	-175.310992	1	35	33	32	0.0000
H	1.0951625	1	119.932099	1	1.375487	1	37	34	32	0.0000
H	1.0982208	1	121.081749	1	1.136184	1	38	36	35	0.0000
H	1.1006316	1	120.286918	1	176.592620	1	39	37	34	0.0000
H	1.1044659	1	119.211092	1	-179.192722	1	40	38	36	0.0000
H	1.1121412	1	109.838699	1	57.298784	1	41	6	5	0.0000
H	1.1104931	1	108.688954	1	-57.796698	1	41	6	5	0.0000
H	1.0975924	1	120.131311	1	-2.401744	1	43	42	41	0.0000
H	1.0974630	1	120.251155	1	1.911909	1	44	42	41	0.0000
H	1.1037368	1	119.382559	1	176.317604	1	45	43	42	0.0000
H	1.0967981	1	119.824578	1	179.300336	1	46	44	42	0.0000
H	1.0989531	1	119.889052	1	179.698764	1	47	45	43	0.0000
H	1.1093029	1	108.986210	1	-174.153242	1	48	10	9	0.0000
H	1.1093552	1	110.317363	1	70.019118	1	48	10	9	0.0000
H	1.0045402	1	125.766992	1	2.426576	1	50	49	48	0.0000
H	1.0893452	1	129.276418	1	0.694159	1	51	49	48	0.0000
H	1.0928573	1	126.331013	1	-179.569113	1	52	50	49	0.0000
H	1.1185356	1	108.140635	1	75.296171	1	54	14	13	0.0000
H	1.0985117	1	111.263489	1	169.288368	1	55	54	14	0.0000
H	1.1070456	1	112.284832	1	48.738475	1	55	54	14	0.0000
H	1.0988103	1	111.748454	1	-70.966286	1	55	54	14	0.0000
H	1.0996008	1	110.963699	1	169.439921	1	56	54	14	0.0000
H	1.1018648	1	112.422377	1	49.310516	1	56	54	14	0.0000
H	1.1082134	1	112.531134	1	-71.433304	1	56	54	14	0.0000
H	1.1087299	1	109.366881	1	167.697240	1	57	18	17	0.0000
H	1.1116483	1	109.211929	1	53.750836	1	57	18	17	0.0000
H	1.1314796	1	110.504686	1	152.908353	1	58	57	18	0.0000
H	1.1134280	1	109.353722	1	38.827264	1	58	57	18	0.0000
H	1.1127412	1	108.991767	1	-166.132060	1	59	58	57	0.0000
H	1.1100946	1	110.824221	1	77.414414	1	59	58	57	0.0000
H	0.9993383	1	112.213109	1	89.718201	1	60	59	58	0.0000
H	1.1006957	1	110.680184	1	-166.047069	1	64	22	21	0.0000
H	1.1081074	1	111.654662	1	75.085453	1	64	22	21	0.0000
H	1.0973591	1	112.281722	1	-46.392294	1	64	22	21	0.0000
H	1.1105949	1	108.448038	1	170.750948	1	65	26	25	0.0000
H	1.1111548	1	110.409101	1	55.571661	1	65	26	25	0.0000
H	1.0991551	1	130.314768	1	-1.734411	1	67	66	65	0.0000
H	1.0004504	1	121.643955	1	155.322777	1	69	67	66	0.0000
H	1.0948393	1	120.446866	1	0.186965	1	71	68	66	0.0000
H	1.1003686	1	121.279102	1	176.549464	1	72	70	68	0.0000
H	1.1084079	1	120.862160	1	178.113382	1	73	71	68	0.0000
H	1.1009728	1	121.128835	1	-178.731531	1	74	72	70	0.0000
H	1.1081173	1	109.783241	1	-91.514619	1	80	29	28	0.0000
H	1.1081841	1	109.501321	1	152.881214	1	80	29	28	0.0000
H	1.1061664	1	110.084945	1	-9.139959	1	84	30	29	0.0000
H	1.1060226	1	110.144682	1	-125.605641	1	84	30	29	0.0000
H	1.0989641	1	118.897645	1	-156.384779	1	95	94	93	0.0000

Continua...

H	1.1073848	1	109.733325	1	90.339466	1	99	94	93	0.0000
H	1.1094296	1	111.392594	1	-28.369418	1	99	94	93	0.0000
H	1.0300005	1	120.848419	1	-170.109635	1	62	61	60	0.0000
H	1.0196597	1	121.171165	1	2.944208	1	62	61	60	0.0000
H	0.9988048	1	115.337865	1	159.963814	1	63	61	60	0.0000
H	0.9953843	1	114.454848	1	26.543462	1	63	61	60	0.0000
H	1.0177755	1	117.465627	1	162.558031	1	90	89	88	0.0000
H	0.9926711	1	117.349243	1	12.802198	1	90	89	88	0.0000
H	0.9620275	1	120.639773	1	-51.784797	1	75	62	61	0.0000
H	0.9731475	1	87.966868	1	-162.274588	1	75	62	61	0.0000
H	0.9678280	1	96.714710	1	-172.481359	1	76	62	61	0.0000
H	0.9624744	1	98.455948	1	76.223526	1	76	62	61	0.0000
H	0.9524857	1	113.415589	1	-132.902284	1	77	75	62	0.0000
H	0.9579259	1	122.299590	1	-0.942137	1	77	75	62	0.0000
H	0.9557097	1	115.457568	1	103.236357	1	78	50	49	0.0000
H	0.9543867	1	121.095483	1	-28.979028	1	78	50	49	0.0000
H	0.9567476	1	97.370043	1	150.210284	1	79	69	67	0.0000
H	0.9606919	1	112.011958	1	-97.089524	1	79	69	67	0.0000
O	1.4101330	1	107.636996	1	120.497095	1	92	91	89	0.0000
H	0.9585327	1	105.012288	1	-145.970784	1	198	92	91	0.0000
N	1.4707478	1	109.042038	1	-148.073214	1	99	94	93	0.0000
C	1.4709065	1	120.029968	1	116.846950	1	200	99	94	0.0000
H	1.0960675	1	109.432163	1	-17.550933	1	201	200	99	0.0000
H	1.0958184	1	109.520236	1	-137.545628	1	201	200	99	0.0000
H	1.0957582	1	109.506908	1	102.407109	1	201	200	99	0.0000
C	1.4709062	1	120.004251	1	-63.199061	1	200	99	94	0.0000
H	1.0964830	1	109.503596	1	176.955811	1	205	200	99	0.0000
H	1.0957929	1	109.452238	1	56.944647	1	205	200	99	0.0000
H	1.0960059	1	109.483813	1	-63.043826	1	205	200	99	0.0000

Tamanho da ligação    flag    Ângulo da ligação    flag    Ângulo diedro (torção)    flag

**ANEXO G** → Estrutura dos aminoácidos proteínogênicos, notação (3 letras e letra única) e características estruturais pertinentes [KOOLMAN & ROEHM, 2005].

Alifáticos					Sulfurados	
Glicina (Gly, G)	Alanina (Ala, A)	Valina <sup>☆</sup> (Val, V)	Leucina <sup>☆</sup> (Leu, L)	Isoleucina <sup>☆</sup> (Ile, I)	Cisteína (Cys, C)	Metionina <sup>☆</sup> (Met, M)
H	CH <sub>3</sub>	H <sub>3</sub> C-CH   CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>   H <sub>3</sub> C-CH   CH <sub>3</sub>	H <sub>3</sub> C-C-H   CH <sub>2</sub>   CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>   SH 8.3   pKa	CH <sub>2</sub>   CH <sub>2</sub>   S   CH <sub>3</sub>
-2.4	-1.9	-2.0	-2.3	-2.2	-1.2	-1.5
Aromáticos			Cíclico	Neutros		
Fenilalanina <sup>☆</sup> (Phe, F)	Tirosina (Tyr, Y)	Triptofano <sup>☆</sup> (Trp, W)	Prolina (Pro, P)	Serina (Ser, S)	Treonina <sup>☆</sup> (Thr, T)	
CH <sub>2</sub>   	CH <sub>2</sub>    OH 10.1	CH <sub>2</sub>    anel indólico	COO <sup>-</sup>   CH   HN   H <sub>2</sub> C-CH <sub>2</sub> anel pirrolidínico	CH <sub>2</sub>   OH	H <sub>3</sub> C-C-H   OH	
+0.8	+6.1	+5.9	+6.0	+5.1	+4.9	
☆ Aminoácidos Essenciais					□ Centros Quirais	
Neutros		Ácidos		Básicos		
Asparagina (Asn, N)	Glutamina (Gln, Q)	Aspartato (Asp, D)	Glutamato (Glu, E)	Histidina (His, H)	Lisina <sup>☆</sup> (Lys, K)	Arginina (Arg, R)
CH <sub>2</sub>   CONH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub>   CH <sub>2</sub>   CONH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub>   COO <sup>-</sup> 4.0	CH <sub>2</sub>   CH <sub>2</sub>   COO <sup>-</sup> 4.3	CH <sub>2</sub>   HN   CH   HC=N 6.0 anel imidazólico	CH <sub>2</sub>   CH <sub>2</sub>   CH <sub>2</sub>   CH <sub>2</sub>   ⊕NH <sub>3</sub> 10.8	CH <sub>2</sub>   CH <sub>2</sub>   CH <sub>2</sub>   NH   C   ⊕ H <sub>2</sub> N NH <sub>2</sub> 12.5
+9.7	+9.4	+11.0	+10.2	+10.3	+15.0	+20.0

**ANEXO H-1** → Descritores simples obtidos após o atracamento das **fenotiazinas** na TR de *T. cruzi*, no sítio da **TSST**, pelo programa GOLD (CCDC Ltd.).

	PM	APO	APPO	LHL	CL	LL	DLHL	ALHL	DLO	ALO	APLO	AHE	DPO	EEPH	EEV	EA	EIPH	EIT	EIV
24	318,86	0	0	1	1	6	0	2	0	3	1	16	3	2	30,96	38,77	0	-2,04	-3,76
25	340,48	0	0	1	3	9	0	3	0	4	1	17	3	1,43	36,50	40,01	0	-5,91	-5,71
26	328,43	0	0	1	1	8	1	4	0	3	1	13	3	1,39	31,99	36,79	0	-1,99	-6,58
27	327,44	1	0	0	1	8	2	3	0	4	1	12	4	0,99	33,39	37,22	0	-5,59	-4,10
28	269,36	0	0	1	3	4	3	1	0	0	1	8	3	0,44	30,50	32,69	0	-2,38	-7,31
29	407,50	1	1	0	3	5	0	3	0	1	1	17	2	0	35,34	42,01	0	-2,39	-4,18
30	333,79	1	0	2	3	5	1	4	0	2	0	8	3	2,80	28,29	36,59	0	-2,85	-2,26
31	354,65	1	0	0	4	2	0	2	0	3	1	10	3	0	28,32	39,97	0	-0,67	1,70
32	303,81	1	0	0	3	4	3	2	1	2	1	7	3	0	30,39	34,21	0	-3,74	-3,84
33	360,90	2	0	1	1	8	0	3	0	1	1	15	3	0,13	33,47	26,06	0	-7,69	-12,41
34	334,86	1	0	1	5	6	0	3	0	5	0	14	2	0,03	30,86	6,71	0	-3,66	-32,10
35	283,34	0	0	2	4	4	0	3	0	2	0	11	1	1,31	26,71	34,63	0	-3,10	-0,29
36	325,38	2	0	0	4	6	0	4	0	5	0	17	1	0	31,79	36,78	0	-7,19	0,26
37	409,99	4	1	0	8	8	0	1	0	0	1	19	2	0	38,34	45,52	0	-1,73	-5,47
38	478,88	0	0	0	2	8	0	1	0	5	1	23	4	11,19	37,89	49,72	0	-4,05	-9,52
39	454,99	0	1	0	7	9	0	3	0	4	1	20	5	0	40,85	48,21	0	-1,96	-6,00
40	438,05	3	1	0	3	9	0	0	0	0	1	25	2	11,51	30,09	37,48	0	-3,78	-11,63
41	470,05	1	1	0	9	12	0	3	0	3	0	28	1	11,51	33,33	45,25	0	-5,60	-6,48
42	499,95	4	1	0	6	8	0	1	0	0	1	23	4	11,51	37,63	50,23	0	-4,54	-8,48
43	247,74	1	1	0	4	7	0	1	0	4	0	17	0	11,51	29,59	38,39	0	-1,43	-12,37

**Legenda:**

**PM** = peso molecular

**APO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**APPO** = átomos polares protéicos oclusos

**LHL** = ligações de hidrogênio do ligante

**CL** = choques realizados pelo ligante

**LL** = ligações livres (passíveis de sofrer rotação)

**DLHL** = doadores de ligação de hidrogênio do ligante

**ALHL** = aceptores de ligação de hidrogênio do ligante

**DLO** = doadores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**ALO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**APLO** = átomos polares do ligante oclusos

**AHE** = átomos hidrofóbicos expostos (ao solvente)

**DPO** = doadores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**EEPH** = escore externo de pontes de hidrogênio

**EEV** = escore externo de vdW

**EA** = escore de aptidão

**EIPH** = escore interno de pontes de hidrogênio

**EIT** = escore interno de torção

**EIV** = escore interno de vdW

**ANEXO H-2** → Descritores simples obtidos após o atracamento das **fenotiazinas** na TR de *L. amazonensis*, no sítio da **TSST**, pelo programa GOLD (CCDC Ltd.).

	PM	APO	APPO	LHL	CL	LL	DLHL	ALHL	DLO	ALO	APLO	AHE	DPO	EEPH	EEV	EA	EIPH	EIT	EIV
24	318,86	4	0	0	3	6	0	2	0	0	1	21	0	0	33,60	36,42	0	-3,32	-6,47
25	340,48	2	0	1	1	9	0	3	0	0	1	22	1	6	27,40	30,70	0	-8,06	-4,91
26	328,43	4	0	2	2	8	1	4	1	1	1	25	0	11,74	25,91	9,41	0	-4,98	-32,99
27	327,44	2	0	2	0	8	2	3	0	0	0	17	1	6,88	27,38	4,07	0	-9,09	-31,37
28	269,36	3	0	2	5	4	3	2	0	0	1	9	0	7,36	22,30	30,62	0	-3,72	-3,68
29	407,50	4	0	0	4	6	0	3	0	0	1	15	2	0,44	34,03	36,74	0	-2,93	-7,55
30	333,79	3	0	3	3	5	1	4	0	0	0	8	0	11,68	27,49	45,63	0	-2,31	-1,54
31	354,65	2	0	0	5	2	0	2	0	1	1	10	0	0	27,88	38,93	0	-0,67	1,26
32	303,81	1	0	1	2	4	3	2	0	0	0	16	0	6	24,06	32,40	0	-3,26	-3,42
33	360,90	3	0	0	7	8	0	3	0	1	1	29	0	0	36,04	38,34	0	-4,19	-7,03
34	334,86	4	0	1	3	6	0	2	0	0	2	18	1	3,41	33,17	34,29	0	-4,35	-10,37
35	283,34	2	0	0	9	4	0	3	0	1	1	11	1	0	34,20	43,16	0	-4,35	0,48
36	325,38	4	0	1	5	6	0	4	0	0	1	15	2	5,59	30,27	40,55	0	-6,21	-0,45
37	409,99	3	0	0	5	8	0	1	0	0	0	24	0	0	37,71	33,89	0	-4,31	-13,64
38	478,88	6	0	0	9	8	0	1	0	1	0	23	1	0	38,61	36,89	0	-2,78	-13,41
39	454,99	1	0	2	2	9	0	3	0	1	1	24	0	9,16	33,38	38,66	0	-4,43	-11,97
40	438,05	6	0	0	6	10	0	1	0	0	0	21	1	0	40,09	35,31	0	-4,67	-15,14
41	470,05	2	0	1	4	12	0	3	0	0	0	23	1	0,71	41,15	35,88	0	-9,74	-11,67
42	499,95	3	0	0	5	8	0	1	0	1	2	19	0	0	34,22	31,8	0	-1,99	-13,26
43	247,74	3	0	0	3	1	0	1	0	1	1	12	1	0	30,37	13,19	0	-1,66	-26,91

**Legenda:**

**PM** = peso molecular

**APO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**APPO** = átomos polares protéicos oclusos

**LHL** = ligações de hidrogênio do ligante

**CL** = choques realizados pelo ligante

**LL** = ligações livres (passíveis de sofrer rotação)

**DLHL** = doadores de ligação de hidrogênio do ligante

**ALHL** = aceptores de ligação de hidrogênio do ligante

**DLO** = doadores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**ALO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**APLO** = átomos polares do ligante oclusos

**AHE** = átomos hidrofóbicos expostos (ao solvente)

**DPO** = doadores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**EEPH** = escore externo de pontes de hidrogênio

**EEV** = escore externo de vdW

**EA** = escore de aptidão

**EIPH** = escore interno de pontes de hidrogênio

**EIT** = escore interno de torção

**EIV** = escore interno de vdW

**ANEXO H-3** → Descritores simples obtidos após o atracamento das **fenotiazinas** na TR de *L. amazonensis*, no sítio do **FAD**, pelo programa GOLD (CCDC Ltd.).

	PM	APO	APPO	LHL	CL	LL	DLHL	ALHL	DLO	ALO	APLO	AHE	DPO	EEPH	EEV	EA	EIPH	EIT	EIV
24	318,86	4	0	0	3	6	0	2	0	1	1	4	3	0	45,23	53,93	0	-1,86	-6,40
25	340,48	4	0	0	4	9	0	3	0	2	1	2	3	0	47,90	50,67	0	-7,35	-7,83
26	328,43	6	0	1	9	8	1	4	1	2	1	7	3	0	44,57	23,12	0	-3,43	-34,74
27	327,44	2	0	2	6	8	2	3	1	2	1	2	2	0	49,97	26,14	0	-7,73	-34,84
28	269,36	2	0	1	8	4	3	2	3	0	1	3	5	1,13	35,89	42,91	0	-3,52	-4,05
29	407,50	2	0	0	9	6	0	3	0	2	4	5	7	0	50,60	55,57	0	-4,06	-9,95
30	333,79	2	0	3	6	5	1	4	0	0	1	5	5	2,50	39,41	51,95	0	-1,83	-2,91
31	354,65	3	0	1	5	2	0	2	0	0	1	4	4	1,29	41,20	58,01	0	-0,67	0,74
32	303,81	5	0	1	9	4	3	2	3	0	1	4	6	0,63	38,20	46,36	0	-2,79	-4,01
33	360,90	5	0	1	7	8	0	3	0	2	1	4	4	0,67	43,17	47,16	0	-3,21	-9,66
34	334,86	4	0	1	5	6	0	2	0	1	2	4	3	0,55	45,15	53,22	0	-2,36	-7,05
35	283,34	4	0	1	6	4	0	3	0	2	1	4	3	0,98	41,05	52,30	0	-6,04	0,92
36	325,38	2	0	2	2	6	0	4	0	1	1	5	4	0,51	43,96	54,14	0	-5,42	-1,40
37	409,99	4	0	0	7	8	0	1	0	1	1	3	9	0	54,84	57,26	0	-1,91	-16,23
38	478,88	7	0	0	12	8	0	1	0	1	1	5	5	0	58,40	60,48	0	-4,18	-15,65
39	454,99	6	0	2	11	9	0	3	0	1	2	4	5	0,71	56,84	58,83	0	-3,42	-16,61
40	438,05	7	0	0	10	10	0	1	0	0	1	6	4	0	58,01	56,87	0	-6,20	-16,69
41	470,05	4	0	0	15	12	0	3	0	3	1	3	6	0	58,76	59,60	0	-5,10	-16,10
42	499,95	4	0	0	11	8	0	1	0	1	5	3	8	0	52,75	44,44	0	-6,87	-21,22
43	247,74	1	0	1	2	1	0	1	0	0	1	3	1	0	36,48	21,44	0	-1,72	-26,99

**Legenda:**

**PM** = peso molecular

**APO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**APPO** = átomos polares protéicos oclusos

**LHL** = ligações de hidrogênio do ligante

**CL** = choques realizados pelo ligante

**LL** = ligações livres (passíveis de sofrer rotação)

**DLHL** = doadores de ligação de hidrogênio do ligante

**ALHL** = aceptores de ligação de hidrogênio do ligante

**DLO** = doadores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**ALO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**APLO** = átomos polares do ligante oclusos

**AHE** = átomos hidrofóbicos expostos (ao solvente)

**DPO** = doadores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**EEPH** = escore externo de pontes de hidrogênio

**EEV** = escore externo de vdW

**EA** = escore de aptidão

**EIPH** = escore interno de pontes de hidrogênio

**EIT** = escore interno de torção

**EIV** = escore interno de vdW

**ANEXO I-1** → Descritores simples obtidos após o atracamento dos **mesoiônicos** em seu estado **catiônico**, na TR de *T. cruzi*, no sítio da **TSST**, pelo programa GOLD (CCDC Ltd.).

	PM	APO	APPO	LHL	CL	LL	DLHL	ALHL	DLO	ALO	APLO	AHE	DPO	EEPH	EEV	EA	EIPH	EIT	EIV
<b>44</b>	356,47	4	0	0	3	6	1	1	0	0	0	16	3	0	37,23	40,19	0	-12,42	1,41
<b>45</b>	370,49	5	0	1	2	7	1	1	0	0	0	12	3	0	40,40	40,65	0	-14,86	-0,04
<b>46</b>	386,49	7	0	0	2	8	1	2	0	1	0	17	3	0	40,94	44,21	0	-12,79	0,70
<b>47</b>	401,47	5	0	0	4	7	1	3	0	2	0	13	2	0	39,21	43,06	0	-12,85	1,99
<b>48</b>	374,46	5	0	0	5	6	1	1	0	1	0	12	4	0	37,85	40,60	0	-13,64	2,19
<b>49</b>	390,91	6	0	0	4	6	1	1	0	1	0	15	4	0	38,99	42,61	0	-13,15	2,14
<b>50</b>	367,47	3	0	1	2	6	1	1	0	0	0	14	2	0	38,50	41,65	0	-13,15	1,86
<b>51</b>	435,36	6	0	0	3	6	1	1	0	1	0	11	4	0	39,65	43,99	0	-11,09	0,57
<b>52</b>	372,47	6	0	0	3	7	2	2	1	1	0	15	3	0	38,27	39,43	0	-13,49	0,30
<b>53</b>	386,49	5	0	0	2	8	1	2	0	1	0	13	3	0,08	40,70	44,61	0	-11,63	0,19
<b>54</b>	401,47	4	0	3	1	7	1	3	0	0	1	15	3	2,08	41,24	46,65	0	-12,69	0,55
<b>55</b>	390,91	5	0	1	1	6	1	1	0	0	0	14	3	0	39,65	43,35	0	-11,99	0,82
<b>56</b>	435,36	5	0	1	1	6	1	1	0	0	0	16	4	0	40,79	44,84	0	-12,09	0,85

**Legenda :**

**PM** = peso molecular

**APO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**APPO** = átomos polares protéicos oclusos

**LHL** = ligações de hidrogênio do ligante

**CL** = choques realizados pelo ligante

**LL** = ligações livres (passíveis de sofrer rotação)

**DLHL** = doadores de ligação de hidrogênio do ligante

**ALHL** = aceptores de ligação de hidrogênio do ligante

**DLO** = doadores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**ALO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**APLO** = átomos polares do ligante oclusos

**AHE** = átomos hidrofóbicos expostos (ao solvente)

**DPO** = doadores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**EEPH** = escore externo de pontes de hidrogênio

**EEV** = escore externo de vdW

**EA** = escore de aptidão

**EIPH** = escore interno de pontes de hidrogênio

**EIT** = escore interno de torção

**EIV** = escore interno de vdW



**ANEXO I-2** → Descritores simples obtidos após o atracamento dos **mesoiônicos** em seu estado **catiônico**, na TR de *T. cruzi*, no sítio do **NADPH**, pelo programa GOLD (CCDC Ltd.).

	PM	APO	APPO	LHL	CL	LL	DLHL	ALHL	DLO	ALO	APLO	AHE	DPO	EEPH	EEV	EA	EIPH	EIT	EIV
<b>44</b>	356,46	2	0	1	5	6	1	1	0	0	1	22	4	1,69	42,70	48,08	0	-13,65	1,34
<b>45</b>	370,49	4	0	0	7	7	1	1	0	0	2	15	2	0	38,35	43,88	0	-10,43	1,58
<b>46</b>	386,49	5	0	0	7	8	1	2	0	2	0	12	1	0	43,88	45,61	0	-14,79	0,06
<b>47</b>	401,46	3	0	2	6	7	1	3	0	0	3	19	2	5,39	36,95	45,12	0	-14,13	3,05
<b>48</b>	374,45	2	0	1	9	6	1	1	0	0	1	20	4	0,89	41,98	47,78	0	-13,36	2,52
<b>49</b>	390,91	2	0	1	6	6	1	1	0	0	2	21	3	1,72	46,20	54,24	0	-12,84	1,83
<b>50</b>	367,47	5	0	1	7	6	1	1	0	1	0	12	4	1,68	43,28	43,82	0	-18,85	1,48
<b>51</b>	435,36	5	0	0	13	6	1	1	0	0	0	20	3	1.10 <sup>-4</sup>	42,61	49,20	0	-11,63	2,25
<b>52</b>	372,46	5	0	1	9	7	2	2	0	1	1	18	3	0	40,81	46,47	0	-9,41	-0,23
<b>53</b>	386,49	2	0	1	8	8	1	2	0	2	1	18	5	1,53	44,29	47,92	0	-14,92	0,41
<b>54</b>	401,46	5	0	1	7	7	1	3	0	0	3	19	3	0	42,32	45,54	0	-14,14	1,50
<b>55</b>	390,91	5	0	1	6	6	1	1	1	0	0	19	4	0	43,79	49,91	0	-11,56	1,26
<b>56</b>	435,36	4	0	1	6	6	1	1	0	0	0	19	2	0	43,69	49,81	0	-11,82	1,57

**Legenda :**

**PM** = peso molecular

**APO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**APPO** = átomos polares protéicos oclusos

**LHL** = ligações de hidrogênio do ligante

**CL** = choques realizados pelo ligante

**LL** = ligações livres (passíveis de sofrer rotação)

**DLHL** = doadores de ligação de hidrogênio do ligante

**ALHL** = aceptores de ligação de hidrogênio do ligante

**DLO** = doadores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**ALO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**APLO** = átomos polares do ligante oclusos

**AHE** = átomos hidrofóbicos expostos (ao solvente)

**DPO** = doadores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**EEPH** = escore externo de pontes de hidrogênio

**EEV** = escore externo de vdW

**EA** = escore de aptidão

**EIPH** = escore interno de pontes de hidrogênio

**EIT** = escore interno de torção

**EIV** = escore interno de vdW

**ANEXO I-3** → Descritores simples obtidos após o atracamento dos **mesoiônicos** em seu estado **neutro**, na TR de *T. cruzi*, no sítio do **NADPH**, pelo programa GOLD (CCDC Ltd.).

	PM	APO	APPO	LHL	CL	LL	DLHL	ALHL	DLO	ALO	APLO	AHE	DPO	EEPH	EEV	EA	EIPH	EIT	EIV
<b>44</b>	355,46	4	0	1	4	6	0	2	0	0	0	15	2	0,19	38,25	45,75	0	-9,61	2,56
<b>45</b>	369,48	4	0	0	5	7	0	1	0	1	0	21	3	0	41,42	47,54	0	-11,35	1,95
<b>46</b>	385,48	5	0	1	6	8	0	2	0	1	0	17	3	4,97	49,06	53,79	0	-18,68	0,05
<b>47</b>	400,45	4	0	2	7	7	0	3	0	0	2	12	2	6,42	37,17	48,33	0	-12,03	2,84
<b>48</b>	373,45	4	0	0	4	6	0	1	0	1	1	18	5	0	39,58	45,29	0	-10,84	1,72
<b>49</b>	389,90	3	0	1	8	6	0	1	0	0	1	16	5	0	41,44	48,25	0	-11,20	2,48
<b>50</b>	366,46	5	0	0	4	6	0	2	0	0	0	19	2	0	42,03	47,99	0	-10,60	0,79
<b>51</b>	434,35	6	0	0	6	6	0	1	0	0	0	17	2	0,26	43,25	50,33	0	-12,85	3,44
<b>52</b>	371,45	4	0	2	9	7	1	3	1	1	1	14	2	5,26	43,75	48,32	0	-17,20	0,11
<b>53</b>	385,48	5	0	1	4	8	0	2	0	1	0	19	2	1,13	44,75	50,40	0	-11,97	-0,28
<b>54</b>	400,45	3	0	2	13	7	0	4	0	2	3	19	1	9,77	35,82	50,33	0	-6,73	-1,97
<b>55</b>	389,90	4	0	1	7	6	0	1	0	0	0	18	4	0	42,81	49,10	0	-12,17	2,41
<b>56</b>	434,35	7	0	0	4	6	0	1	0	0	2	21	4	0	40,99	49,49	0	-9,41	2,52

**Legenda :**

**PM** = peso molecular

**APO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**APPO** = átomos polares protéicos oclusos

**LHL** = ligações de hidrogênio do ligante

**CL** = choques realizados pelo ligante

**LL** = ligações livres (passíveis de sofrer rotação)

**DLHL** = doadores de ligação de hidrogênio do ligante

**ALHL** = aceptores de ligação de hidrogênio do ligante

**DLO** = doadores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**ALO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**APLO** = átomos polares do ligante oclusos

**AHE** = átomos hidrofóbicos expostos (ao solvente)

**DPO** = doadores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**EEPH** = escore externo de pontes de hidrogênio

**EEV** = escore externo de vdW

**EA** = escore de aptidão

**EIPH** = escore interno de pontes de hidrogênio

**EIT** = escore interno de torção

**EIV** = escore interno de vdW

**ANEXO I-4** → Descritores simples obtidos após o atracamento dos **mesoiônicos**, em seu estado **catiônico**, na TR de *T. cruzi*, no sítio do **FAD**, pelo programa GOLD (CCDC Ltd.).

	PM	APO	APPO	LHL	CL	LL	DLHL	ALHL	DLO	ALO	APLO	AHE	DPO	EEPH	EEV	EA	EIPH	EIT	EIV
<b>44</b>	356,47	4	1	1	3	6	1	1	1	0	2	2	7	1,38	53,75	63,04	0	-12,36	0,12
<b>45</b>	370,49	2	1	0	8	7	1	1	1	1	1	2	11	0	59,14	68,01	0	-12,05	-1,26
<b>46</b>	386,49	4	1	1	9	8	1	2	1	1	1	2	6	0,71	57,77	61,71	0	-15,98	-2,45
<b>47</b>	401,47	2	1	3	13	7	1	3	1	0	2	2	8	1,45	56,19	67,47	0	-13,20	1,97
<b>48</b>	374,46	3	1	1	6	6	1	1	1	0	2	2	9	0	57,55	68,41	0	-12,60	1,87
<b>49</b>	390,91	3	1	0	7	6	1	1	1	1	1	2	9	0	58,32	69,24	0	-11,76	0,80
<b>50</b>	367,47	2	1	0	6	6	1	1	1	1	1	2	12	0	56,74	67,69	0	-10,14	-0,19
<b>51</b>	435,36	2	1	0	8	6	1	1	1	1	1	2	10	0	58,39	67,90	0	-12,64	0,26
<b>52</b>	372,47	2	1	2	7	7	2	2	1	1	1	2	10	0	57,99	66,32	0	-13,24	-0,18
<b>53</b>	386,49	6	1	1	7	8	1	2	1	1	2	1	11	0,03	58,35	57,75	0	-22,02	-0,48
<b>54</b>	401,47	5	1	1	6	7	1	3	1	1	2	0	10	1,37	55,73	64,22	0	-11,16	-2,62
<b>55</b>	390,91	3	1	1	6	6	1	1	1	0	1	1	7	0,85	55,59	67,35	0	-12,51	2,55
<b>56</b>	435,36	5	1	0	6	6	1	1	1	1	1	2	6	0	57,57	67,57	0	-13,28	1,69

**Legenda :**

**PM** = peso molecular

**APO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**APPO** = átomos polares protéicos oclusos

**LHL** = ligações de hidrogênio do ligante

**CL** = choques realizados pelo ligante

**LL** = ligações livres (passíveis de sofrer rotação)

**DLHL** = doadores de ligação de hidrogênio do ligante

**ALHL** = aceptores de ligação de hidrogênio do ligante

**DLO** = doadores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**ALO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**APLO** = átomos polares do ligante oclusos

**AHE** = átomos hidrofóbicos expostos (ao solvente)

**DPO** = doadores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**EEPH** = escore externo de pontes de hidrogênio

**EEV** = escore externo de vdW

**EA** = escore de aptidão

**EIPH** = escore interno de pontes de hidrogênio

**EIT** = escore interno de torção

**EIV** = escore interno de vdW

**ANEXO I-5** → Descritores simples obtidos após o atracamento dos **mesoiônicos** em seu estado **neutro**, na TR de *T. cruzi*, no sítio do **FAD**, pelo programa GOLD (CCDC Ltd.).

	PM	APO	APPO	LHL	CL	LL	DLHL	ALHL	DLO	ALO	APLO	AHE	DPO	EEPH	EEV	EA	EIPH	EIT	EIV
<b>44</b>	355,46	2	1	1	6	6	0	2	0	1	2	2	9	0,39	58,14	70,34	0	-10,83	0,84
<b>45</b>	369,48	2	1	0	9	7	0	1	0	1	2	2	9	0,49	57,01	69,17	0	-11,72	2,01
<b>46</b>	385,48	4	1	1	10	8	0	2	0	1	2	2	6	2,00	54,71	60,90	0	-17,00	0,67
<b>47</b>	400,45	5	1	2	8	7	0	3	0	1	4	0	8	5,75	57,84	69,21	0	-15,78	-0,29
<b>48</b>	373,45	3	1	1	9	6	0	1	0	0	3	2	7	1,25	55,27	69,19	0	-8,61	0,55
<b>49</b>	389,90	2	1	0	6	6	0	1	0	1	2	2	6	0,31	58,61	71,60	0	-12,18	2,89
<b>50</b>	366,46	4	1	1	8	6	0	2	0	1	2	2	11	0,95	53,83	65,42	0	-12,56	3,02
<b>51</b>	434,35	2	1	0	7	6	0	1	0	1	2	1	12	0	59,23	71,36	0	-9,96	-0,12
<b>52</b>	371,45	1	1	1	7	7	1	3	0	2	1	1	7	2	58,66	71,19	0	-13,03	1,57
<b>53</b>	385,48	5	1	1	9	8	0	2	0	1	2	1	10	1,27	48,94	56,32	0	-12,39	0,15
<b>54</b>	400,45	1	1	2	9	7	0	4	0	2	2	1	10	0,21	56,80	67,43	0	-12,08	1,20
<b>55</b>	389,90	3	1	0	6	6	0	1	0	1	2	1	9	0,75	57,34	70,20	0	-12,59	3,19
<b>56</b>	434,35	2	1	0	8	6	0	1	0	1	2	1	8	0	57,94	64,80	0	-15,35	0,48

**Legenda :**

**PM** = peso molecular

**APO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**APPO** = átomos polares protéicos oclusos

**LHL** = ligações de hidrogênio do ligante

**CL** = choques realizados pelo ligante

**LL** = ligações livres (passíveis de sofrer rotação)

**DLHL** = doadores de ligação de hidrogênio do ligante

**ALHL** = aceptores de ligação de hidrogênio do ligante

**DLO** = doadores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**ALO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**APLO** = átomos polares do ligante oclusos

**AHE** = átomos hidrofóbicos expostos (ao solvente)

**DPO** = doadores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**EEPH** = escore externo de pontes de hidrogênio

**EEV** = escore externo de vdW

**EA** = escore de aptidão

**EIPH** = escore interno de pontes de hidrogênio

**EIT** = escore interno de torção

**EIV** = escore interno de vdW

**ANEXO I-6** → Descritores simples obtidos após o atracamento dos **mesoiônicos** em seu estado **neutro**, na TR de *L. amazonensis*, no sítio da **TSST**, pelo programa GOLD (CCDC Ltd.).

	PM	APO	APPO	LHL	CL	LL	DLHL	ALHL	DLO	ALO	APLO	AHE	DPO	EEPH	EEV	EA	EIPH	EIT	EIV
<b>44</b>	355,46	5	0	0	6	6	0	2	0	2	1	18	1	0	45,57	53,84	0	-11,08	2,26
<b>45</b>	369,48	6	0	0	8	7	0	1	0	1	1	21	1	0	48,19	57,76	0	-9,71	1,20
<b>46</b>	385,48	6	0	0	7	8	0	2	0	2	2	21	1	0	50,17	57,77	0	-12,93	1,71
<b>47</b>	400,45	5	0	2	8	7	0	3	0	1	3	18	1	5,36	43,53	54,48	0	-13,41	2,67
<b>48</b>	373,45	7	0	0	7	6	0	1	0	1	2	19	1	0	45,11	53,87	0	-9,95	1,80
<b>49</b>	389,90	6	0	0	10	6	0	1	0	1	1	19	1	0	48,19	57,72	0	-11,17	2,65
<b>50</b>	366,46	5	0	0	7	6	0	2	0	1	1	19	2	0	44,39	48,52	0	-11,27	-1,25
<b>51</b>	434,35	8	0	0	4	6	0	1	0	0	2	21	1	0	48,07	57,58	0	-10,15	1,64
<b>52</b>	371,45	5	0	0	10	7	1	3	1	3	0	20	1	0	43,91	50,44	0	-10,93	0,99
<b>53</b>	385,48	6	0	0	8	8	0	2	0	1	1	19	2	0	45,62	51,24	0	-11,97	0,48
<b>54</b>	400,45	5	0	2	13	7	0	4	0	0	0	22	1	11,96	38,50	52,66	0	-12,60	0,36
<b>55</b>	389,90	6	0	0	5	6	0	1	0	1	1	22	1	0	41,51	46,39	0	-9,87	-0,81
<b>56</b>	434,35	5	0	0	11	6	0	1	0	0	1	17	2	0	44,94	52,18	0	-10,56	0,94

**Legenda :**

**PM** = peso molecular

**APO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**APPO** = átomos polares protéicos oclusos

**LHL** = ligações de hidrogênio do ligante

**CL** = choques realizados pelo ligante

**LL** = ligações livres (passíveis de sofrer rotação)

**DLHL** = doadores de ligação de hidrogênio do ligante

**ALHL** = aceptores de ligação de hidrogênio do ligante

**DLO** = doadores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**ALO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**APLO** = átomos polares do ligante oclusos

**AHE** = átomos hidrofóbicos expostos (ao solvente)

**DPO** = doadores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**EEPH** = escore externo de pontes de hidrogênio

**EEV** = escore externo de vdW

**EA** = escore de aptidão

**EIPH** = escore interno de pontes de hidrogênio

**EIT** = escore interno de torção

**EIV** = escore interno de vdW

**ANEXO I-7** → Descritores simples obtidos após o atracamento dos **mesoiônicos** em seu estado **catiônico**, na TR de *L. amazonensis*, no sítio do **FAD**, pelo programa GOLD (CCDC Ltd.).

	PM	APO	APPO	LHL	CL	LL	DLHL	ALHL	DLO	ALO	APLO	AHE	DPO	EEPH	EEV	EA	EIPH	EIT	EIV
<b>44</b>	356,46	4	0	0	6	6	1	1	1	1	1	6	6	0,26	55,57	64,66	0	-14,27	2,27
<b>45</b>	370,49	4	0	0	2	7	1	1	1	1	1	2	4	0,01	58,22	69,22	0	-14,13	3,29
<b>46</b>	386,49	4	0	1	7	8	1	2	1	1	1	4	7	6,13	56,80	67,77	0	-16,70	0,24
<b>47</b>	401,46	3	0	2	1	7	1	3	1	1	3	3	5	2,56	55,66	68,00	0	-12,66	1,57
<b>48</b>	374,45	5	0	1	9	6	1	1	1	0	1	3	4	1,21	54,50	66,79	0	-9,59	0,23
<b>49</b>	390,91	5	0	1	2	6	1	1	0	1	2	4	5	0,02	57,43	67,74	0	-12,63	1,38
<b>50</b>	367,47	4	0	1	10	6	1	1	1	0	0	3	5	1,22	55,30	68,53	0	-9,17	0,45
<b>51</b>	435,36	3	0	0	7	6	1	1	1	0	2	3	7	0,08	56,17	68,58	0	-8,90	0,17
<b>52</b>	372,46	4	0	2	6	7	2	2	1	0	1	5	6	1,36	55,04	67,63	0	-8,39	-1,03
<b>53</b>	386,49	4	0	0	6	8	1	2	1	2	1	4	5	0,87	54,49	62,75	0	-13,30	0,24
<b>54</b>	401,46	3	0	3	5	7	1	3	0	1	2	4	4	2,50	55,25	67,30	0	-13,46	2,28
<b>55</b>	390,91	4	0	1	7	6	1	1	1	0	0	4	4	1,39	55,29	67,89	0	-11,10	1,57
<b>56</b>	435,36	2	0	0	2	6	1	1	1	1	1	3	4	0	56,34	66,75	0	-11,63	0,91

**Legenda :**

**PM** = peso molecular

**APO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**APPO** = átomos polares protéicos oclusos

**LHL** = ligações de hidrogênio do ligante

**CL** = choques realizados pelo ligante

**LL** = ligações livres (passíveis de sofrer rotação)

**DLHL** = doadores de ligação de hidrogênio do ligante

**ALHL** = aceptores de ligação de hidrogênio do ligante

**DLO** = doadores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**ALO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**APLO** = átomos polares do ligante oclusos

**AHE** = átomos hidrofóbicos expostos (ao solvente)

**DPO** = doadores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**EEPH** = escore externo de pontes de hidrogênio

**EEV** = escore externo de vdW

**EA** = escore de aptidão

**EIPH** = escore interno de pontes de hidrogênio

**EIT** = escore interno de torção

**EIV** = escore interno de vdW

**ANEXO I-8** → Descritores simples obtidos após o atracamento dos **mesoiônicos** em seu estado **neutro**, na TR de *L. amazonensis*, no sítio do **FAD**, pelo programa GOLD (CCDC Ltd.).

	PM	APO	APPO	LHL	CL	LL	DLHL	ALHL	DLO	ALO	APLO	AHE	DPO	EEPH	EEV	EA	EIPH	EIT	EIV
<b>44</b>	355,46	5	0	1	3	6	0	2	0	1	0	5	4	1,10	55,99	67,44	0	-12,61	1,97
<b>45</b>	369,48	5	0	1	5	7	0	1	0	0	2	2	4	0,789	57,94	71,70	0	-10,62	1,87
<b>46</b>	385,48	5	0	1	3	8	0	2	0	1	3	3	5	6,46	60,77	69,56	0	-19,64	-0,82
<b>47</b>	400,45	3	0	2	2	7	0	3	0	1	3	3	3	7,20	59,74	71,72	0	-19,71	2,09
<b>48</b>	373,45	3	0	1	7	6	0	1	0	0	2	5	4	1,27	55,74	70,60	0	-9,53	2,23
<b>49</b>	389,9	5	0	1	6	6	0	1	0	0	2	1	3	7,84	57,86	72,01	0	-19,64	4,25
<b>50</b>	366,46	5	0	2	5	6	0	2	0	0	1	2	2	1,01	57,50	71,45	0	-10,44	1,82
<b>51</b>	434,35	6	0	1	5	6	0	1	0	0	2	2	3	1,06	58,14	71,68	0	-12,42	3,09
<b>52</b>	371,45	2	0	1	5	7	1	3	1	2	1	3	4	6	53,64	70,93	0	-7,83	-1,00
<b>53</b>	385,48	4	0	1	7	8	0	2	0	1	2	4	3	4,95	56,81	69,37	0	-12,55	-1,15
<b>54</b>	400,45	7	0	2	13	7	0	4	0	2	3	3	2	8,12	55,67	71,17	0	-13,54	0,04
<b>55</b>	389,9	5	0	1	6	6	0	1	0	0	2	2	3	8,34	55,77	69,78	0	-19,03	3,79
<b>56</b>	434,35	4	0	0	5	6	0	1	0	1	2	3	8	0	58,29	68,79	0	-11,40	0,04

**Legenda :**

**PM** = peso molecular

**APO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**APPO** = átomos polares protéicos oclusos

**LHL** = ligações de hidrogênio do ligante

**CL** = choques realizados pelo ligante

**LL** = ligações livres (passíveis de sofrer rotação)

**DLHL** = doadores de ligação de hidrogênio do ligante

**ALHL** = aceptores de ligação de hidrogênio do ligante

**DLO** = doadores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**ALO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**APLO** = átomos polares do ligante oclusos

**AHE** = átomos hidrofóbicos expostos (ao solvente)

**DPO** = doadores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**EEPH** = escore externo de pontes de hidrogênio

**EEV** = escore externo de vdW

**EA** = escore de aptidão

**EIPH** = escore interno de pontes de hidrogênio

**EIT** = escore interno de torção

**EIV** = escore interno de vdW

**ANEXO J-1** → Descritores simples obtidos após o atracamento das **amidinas** em seu estado **catiônico**, na TR de *T. cruzi*, no sítio da **TSST**, pelo programa GOLD (CCDC Ltd.).

	PM	APO	APPO	LHL	CL	LL	DLHL	ALHL	DLO	ALO	APLO	AHE	DPO	EEPH	EEV	EA	EIPH	EIT	EIV
<b>9</b>	303,39	3	0	2	3	6	2	1	1	0	0	12	1	1,05	29,61	-25,25	0	-9,86	-57,17
<b>10</b>	307,80	4	0	1	2	4	2	0	0	0	0	13	3	0	29,19	-11,99	0	-6,51	-45,62
<b>11</b>	352,26	4	0	1	2	4	2	0	0	0	0	16	2	0	29,31	-21,92	0	-6,86	-55,37
<b>12</b>	318,36	5	0	3	6	5	2	2	0	0	1	18	2	7,04	29,77	-17,11	0	-6,82	-58,26
<b>13</b>	273,36	6	0	2	4	4	2	0	0	0	0	17	3	4,49	23,05	-43,95	0	-7,45	-72,69
<b>14</b>	287,39	5	0	1	2	5	2	0	1	0	0	18	3	0	27,41	-15,07	0	-6,88	-45,87
<b>15</b>	298,37	3	0	2	4	5	2	1	0	0	0	13	1	0,49	29,17	-11,26	0	-6,52	-45,34
<b>16</b>	293,35	3	0	1	6	6	2	2	0	2	0	14	3	0,17	26,21	15,76	0	-8,37	-12,08
<b>17</b>	382,28	5	0	2	4	6	2	1	1	0	0	12	1	1,20	31,33	-28,28	0	-10,35	-62,21
<b>18</b>	289,36	1	0	2	2	5	3	1	1	0	0	14	3	1,52	30,42	-20,57	0	-7,12	-56,79
<b>19</b>	333,41	5	0	2	6	8	2	2	1	1	0	11	3	1,91	32,52	-23,56	0	-13,83	-56,35
<b>20</b>	317,37	4	0	2	1	4	2	2	1	1	0	12	2	1,86	28,36	-92,75	0	-13,87	-119,72
<b>21</b>	317,37	4	0	1	2	4	2	2	1	1	0	14	4	1,41	26,94	-85,86	0	-9,75	-114,58
<b>22</b>	347,40	5	0	1	5	6	2	3	0	2	0	15	4	0	29,20	-59,48	0	-14,04	-85,59
<b>23</b>	309,41	2	0	0	2	5	2	1	1	1	1	11	3	0	27,76	-39,48	0	-8,99	-68,65

**Legenda :**

**PM** = peso molecular

**APO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**APPO** = átomos polares protéicos oclusos

**LHL** = ligações de hidrogênio do ligante

**CL** = choques realizados pelo ligante

**LL** = ligações livres (passíveis de sofrer rotação)

**DLHL** = doadores de ligação de hidrogênio do ligante

**ALHL** = aceptores de ligação de hidrogênio do ligante

**DLO** = doadores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**ALO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**APLO** = átomos polares do ligante oclusos

**AHE** = átomos hidrofóbicos expostos (ao solvente)

**DPO** = doadores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**EEPH** = escore externo de pontes de hidrogênio

**EEV** = escore externo de vdW

**EA** = escore de aptidão

**EIPH** = escore interno de pontes de hidrogênio

**EIT** = escore interno de torção

**EIV** = escore interno de vdW



**ANEXO J-2** → Descritores simples obtidos após o atracamento das **amidinas** em seu estado **neutro**, na TR de *T. cruzi*, no sítio da **TSST**, pelo programa GOLD (CCDC Ltd.).

	PM	APO	APPO	LHL	CL	LL	DLHL	ALHL	DLO	ALO	APLO	AHE	DPO	EEPH	EEV	EA	EIPH	EIT	EIV
<b>9</b>	302,38	6	0	0	3	6	1	2	0	0	0	12	2	0	32,09	35,84	0	-9,14	0,84
<b>10</b>	306,80	5	0	0	5	4	1	1	0	1	0	14	3	0	32,86	35,75	0	-11,99	2,56
<b>11</b>	351,25	4	0	0	4	4	1	1	0	1	0	15	3	0	31,74	35,82	0	-9,59	1,76
<b>12</b>	317,35	1	0	1	4	5	1	3	0	2	1	13	1	7,01	29,99	39,99	0	-6,65	-1,59
<b>13</b>	272,35	5	0	0	3	4	1	1	0	1	0	16	3	0	29,18	33,34	0	-8,52	1,74
<b>14</b>	286,38	6	0	0	2	5	1	1	0	1	0	12	3	0	33,98	36,46	0	-12,63	2,37
<b>15</b>	297,36	6	0	1	2	5	1	2	0	0	0	14	2	0,013	29,76	34,16	0	-9,03	2,25
<b>16</b>	292,34	3	0	3	2	6	1	3	0	3	0	18	1	1,26	29,80	35,80	0	-8,57	2,13
<b>17</b>	381,27	5	0	0	4	6	1	2	0	2	0	14	2	0	34,09	38,88	0	-9,44	1,44
<b>18</b>	288,35	4	0	1	3	5	2	2	1	2	0	13	1	2,83	31,61	33,45	0	-15,37	2,53
<b>19</b>	332,40	4	0	2	1	8	1	3	0	1	0	17	2	1,79	34,60	35,99	0	-15,01	1,65
<b>20</b>	316,36	5	0	3	3	4	1	3	0	0	0	15	2	1,40	31,21	33,83	0	-12,37	1,88
<b>21</b>	316,36	5	0	2	3	4	1	3	0	1	0	14	2	2,09	32,34	37,62	0	-12,13	3,19
<b>22</b>	346,39	1	0	3	4	6	1	4	0	0	0	15	2	2,18	31,37	33,97	0	-12,76	1,41
<b>23</b>	308,40	6	0	0	3	5	1	2	1	0	1	14	4	1,07	27,45	30,05	0	-9,28	0,52

**Legenda :**

**PM** = peso molecular

**APO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**APPO** = átomos polares protéicos oclusos

**LHL** = ligações de hidrogênio do ligante

**CL** = choques realizados pelo ligante

**LL** = ligações livres (passíveis de sofrer rotação)

**DLHL** = doadores de ligação de hidrogênio do ligante

**ALHL** = aceptores de ligação de hidrogênio do ligante

**DLO** = doadores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**ALO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**APLO** = átomos polares do ligante oclusos

**AHE** = átomos hidrofóbicos expostos (ao solvente)

**DPO** = doadores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**EEPH** = escore externo de pontes de hidrogênio

**EEV** = escore externo de vdW

**EA** = escore de aptidão

**EIPH** = escore interno de pontes de hidrogênio

**EIT** = escore interno de torção

**EIV** = escore interno de vdW

**ANEXO J-3** → Descritores simples obtidos após o atracamento das **amidinas** em seu estado **catiônico**, na TR de *T. cruzi*, no sítio do **NADPH**, pelo programa GOLD (CCDC Ltd.).

	PM	APO	APPO	LHL	CL	LL	DLHL	ALHL	DLO	ALO	APLO	AHE	DPO	EEPH	EEV	EA	EIPH	EIT	EIV
<b>9</b>	303,38	1	0	2	3	6	2	1	1	0	0	17	1	7,26	26,45	-22,44	0	-8,60	-57,47
<b>10</b>	307,80	4	0	0	11	4	2	0	1	0	0	13	1	1,60	31,62	-7,42	0	-6,52	-45,98
<b>11</b>	352,25	4	0	0	11	4	2	0	1	0	0	13	2	1,68	32,49	-15,68	0	-6,85	-55,18
<b>12</b>	318,35	4	0	2	6	5	2	2	1	0	0	16	2	6,35	29,26	-19,59	0	-7,35	-58,82
<b>13</b>	273,35	4	0	0	12	4	2	0	1	0	0	14	2	0,44	30,74	-37,50	0	-7,50	-72,70
<b>14</b>	287,38	4	0	0	11	5	2	0	1	0	0	14	2	2,09	30,60	-9,34	0	-6,83	-46,68
<b>15</b>	298,36	2	0	2	6	5	2	1	1	0	0	18	0	5,98	26,72	-10,25	0	-6,26	-46,71
<b>16</b>	382,27	3	0	2	2	6	2	1	1	0	0	17	0	6,09	27,58	-26,49	0	-8,10	-62,40
<b>17</b>	289,35	2	0	0	1	5	3	1	1	0	0	20	3	0	26,74	-25,89	0	-7,60	-55,06
<b>18</b>	333,40	5	0	2	9	8	2	2	1	0	0	16	2	1,23	36,65	-15,86	0	-10,92	-56,57
<b>19</b>	317,36	2	0	1	6	4	2	2	0	1	0	14	1	6,05	25,75	-92,36	0	-13,83	-119,99
<b>20</b>	293,34	2	0	2	5	6	2	2	1	0	0	18	1	0,15	30,67	21,73	0	-8,49	-12,10
<b>21</b>	317,36	3	0	1	1	4	2	2	2	0	0	15	1	0	29,72	-83,49	0	-9,80	-114,55
<b>22</b>	347,39	2	0	2	5	6	2	3	1	0	0	21	1	2	29,84	-55,76	0	-13,51	-85,28
<b>23</b>	309,41	3	0	0	8	5	2	1	1	0	0	11	0	0	34,39	-30,26	0	-9,13	-68,41

**Legenda :**

**PM** = peso molecular

**APO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**APPO** = átomos polares protéicos oclusos

**LHL** = ligações de hidrogênio do ligante

**CL** = choques realizados pelo ligante

**LL** = ligações livres (passíveis de sofrer rotação)

**DLHL** = doadores de ligação de hidrogênio do ligante

**ALHL** = aceptores de ligação de hidrogênio do ligante

**DLO** = doadores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**ALO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**APLO** = átomos polares do ligante oclusos

**AHE** = átomos hidrofóbicos expostos (ao solvente)

**DPO** = doadores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**EEPH** = escore externo de pontes de hidrogênio

**EEV** = escore externo de vdW

**EA** = escore de aptidão

**EIPH** = escore interno de pontes de hidrogênio

**EIT** = escore interno de torção

**EIV** = escore interno de vdW

**ANEXO J-4** → Descritores simples obtidos após o atracamento das **amidinas** em seu estado **neutro**, na TR de *T. cruzi*, no sítio do **NADPH**, pelo programa GOLD (CCDC Ltd.).

	PM	APO	APPO	LHL	CL	LL	DLHL	ALHL	DLO	ALO	APLO	AHE	DPO	EEPH	EEV	EA	EIPH	EIT	EIV
<b>9</b>	302,36	3	0	1	5	6	1	2	0	2	0	15	2	2,25	32,41	38,64	0	-10,08	1,90
<b>10</b>	306,79	5	0	0	6	4	1	1	0	1	0	12	2	0	35,71	38,50	0	-14,25	3,65
<b>11</b>	351,24	2	0	1	1	4	1	1	0	1	0	13	2	1,77	30,73	37,34	0	-8,33	1,63
<b>12</b>	317,34	4	0	2	9	5	1	3	1	1	1	16	0	12	32,68	47,41	0	-11,33	1,79
<b>13</b>	272,34	3	0	0	5	4	1	1	0	1	0	15	1	0	33,26	36,33	0	-12,66	3,26
<b>14</b>	286,37	2	0	1	0	5	1	1	0	1	0	15	1	2	30,72	36,96	0	-7,97	0,69
<b>15</b>	297,35	1	0	1	1	5	1	2	1	0	0	18	3	0,10	34,89	40,30	0	-10,32	2,54
<b>16</b>	381,27	2	0	1	7	6	1	2	0	2	0	16	3	0,62	35,85	39,38	0	-11,31	0,77
<b>17</b>	288,34	3	0	3	4	5	2	2	0	1	0	12	2	11,10	26,91	37,32	0	-13,39	2,61
<b>18</b>	332,40	4	0	0	4	8	1	3	1	2	0	14	2	0,50	37,01	40,50	0	-13,08	2,18
<b>19</b>	316,35	5	0	2	13	4	1	3	0	1	0	11	1	10,62	30,89	39,66	0	-15,63	2,20
<b>20</b>	292,33	3	0	1	4	6	1	3	0	1	0	15	2	0,07	31,41	36,11	0	-10,45	3,31
<b>21</b>	316,35	4	0	2	13	4	1	3	1	1	0	15	2	9,24	23,25	31,92	0	-12,41	3,12
<b>22</b>	346,38	3	0	3	11	6	1	4	0	2	0	17	1	9,42	33,73	41,95	0	-18,09	4,23
<b>23</b>	308,40	3	0	1	2	5	1	2	0	1	1	15	2	6,06	28,49	36,53	0	-11,36	2,65

**Legenda :**

**PM** = peso molecular

**APO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**APPO** = átomos polares protéicos oclusos

**LHL** = ligações de hidrogênio do ligante

**CL** = choques realizados pelo ligante

**LL** = ligações livres (passíveis de sofrer rotação)

**DLHL** = doadores de ligação de hidrogênio do ligante

**ALHL** = aceptores de ligação de hidrogênio do ligante

**DLO** = doadores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**ALO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**APLO** = átomos polares do ligante oclusos

**AHE** = átomos hidrofóbicos expostos (ao solvente)

**DPO** = doadores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**EEPH** = escore externo de pontes de hidrogênio

**EEV** = escore externo de vdW

**EA** = escore de aptidão

**EIPH** = escore interno de pontes de hidrogênio

**EIT** = escore interno de torção

**EIV** = escore interno de vdW

**ANEXO J-5** → Descritores simples obtidos após o atracamento das **amidinas** em seu estado **catiônico**, na TR de *T. cruzi*, no sítio do **FAD**, pelo programa GOLD (CCDC Ltd.).

	PM	APO	APPO	LHL	CL	LL	DLHL	ALHL	DLO	ALO	APLO	AHE	DPO	EEPH	EEV	EA	EIPH	EIT	EIV
<b>9</b>	303,38	7	0	1	16	6	2	1	1	1	0	5	8	6,03	0,911	-59,12	0	-6,98	-59,43
<b>10</b>	307,80	3	1	2	13	4	2	0	0	0	0	2	5	0	21,03	-23,46	0	-6,44	-45,93
<b>11</b>	352,25	6	0	1	18	4	2	0	1	0	0	3	9	6,01	2,55	-56,03	0	-6,67	-58,87
<b>12</b>	318,35	4	1	2	12	5	2	2	2	0	1	2	4	2,10	25,85	-32,85	0	-10,80	-59,69
<b>13</b>	273,35	3	1	1	15	4	2	0	1	0	0	3	4	1,06	19,26	-55,09	0	-7,48	-75,16
<b>14</b>	287,38	3	1	0	14	5	2	0	2	0	0	2	7	0	38,68	-0,84	0	-6,78	-47,26
<b>15</b>	298,36	7	0	2	16	5	2	1	1	0	0	3	7	6,00	0,36	-48,74	0	-6,12	-49,13
<b>16</b>	382,27	5	1	1	16	6	2	1	2	0	0	0	6	0,98	23,24	-43,66	0	-8,74	-67,86
<b>17</b>	289,35	4	1	2	14	5	3	1	1	0	0	4	7	0,07	18,11	-38,67	0	-7,61	-56,04
<b>18</b>	333,40	6	0	1	22	8	2	2	1	2	0	5	8	5,54	-35,87	-114,56	0	-10,72	-60,07
<b>19</b>	317,36	7	0	2	15	4	2	2	1	0	0	2	9	6	12,79	-110,72	0	-13,79	-120,51
<b>20</b>	293,34	5	0	1	18	6	2	2	1	2	0	6	7	6,01	-5,43	-23,76	0	-9,62	-12,681
<b>21</b>	317,36	4	0	2	17	4	2	2	1	1	0	4	10	6	3,54	-113,45	0	-9,75	-114,58
<b>22</b>	347,39	1	1	2	19	6	2	3	1	2	0	2	4	0,039	12,08	-98,51	0	-13,39	-101,77
<b>23</b>	309,41	3	1	1	11	5	2	1	1	1	0	1	5	4,18	19,51	-60,67	0	-8,55	-83,13

**Legenda :**

**PM** = peso molecular

**APO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**APPO** = átomos polares protéicos oclusos

**LHL** = ligações de hidrogênio do ligante

**CL** = choques realizados pelo ligante

**LL** = ligações livres (passíveis de sofrer rotação)

**DLHL** = doadores de ligação de hidrogênio do ligante

**ALHL** = aceptores de ligação de hidrogênio do ligante

**DLO** = doadores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**ALO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**APLO** = átomos polares do ligante oclusos

**AHE** = átomos hidrofóbicos expostos (ao solvente)

**DPO** = doadores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**EEPH** = escore externo de pontes de hidrogênio

**EEV** = escore externo de vdW

**EA** = escore de aptidão

**EIPH** = escore interno de pontes de hidrogênio

**EIT** = escore interno de torção

**EIV** = escore interno de vdW

**ANEXO J-6** → Descritores simples obtidos após o atracamento das **amidinas** em seu estado **neutro**, na TR de *T. cruzi*, no sítio do **FAD**, pelo programa GOLD (CCDC Ltd.).

	PM	APO	APPO	LHL	CL	LL	DLHL	ALHL	DLO	ALO	APLO	AHE	DPO	EEPH	EEV	EA	EIPH	EIT	EIV
<b>9</b>	302,37	5	1	1	6	6	1	2	1	1	0	2	5	0,15	42,46	48,28	0	-11,41	1,16
<b>10</b>	306,79	3	1	0	6	4	1	1	1	1	0	0	5	0	43,62	50,90	0	-7,53	-1,55
<b>11</b>	351,24	2	1	0	6	4	1	1	1	1	0	2	8	0	45,18	53,12	0	-8,71	-0,30
<b>12</b>	317,34	5	1	0	5	5	1	3	1	3	1	0	5	0	45,33	53,55	0	-8,69	-0,09
<b>13</b>	272,34	5	1	0	5	4	1	1	1	1	0	2	6	0	40,48	47,86	0	-8,38	0,59
<b>14</b>	286,37	2	1	1	5	5	1	1	1	0	0	1	8	0	44,41	51,19	0	-9,90	0,02
<b>15</b>	297,35	3	1	0	7	5	1	2	1	2	0	0	7	0,01	44,45	52,09	0	-10,08	1,04
<b>16</b>	381,27	2	1	1	9	6	1	2	1	1	0	1	6	0,03	49,71	58,23	0	-10,97	0,81
<b>17</b>	288,34	6	0	3	14	5	2	2	0	0	0	4	9	2,68	20,44	18,87	0	-6,44	-5,48
<b>18</b>	332,40	3	1	2	9	8	1	3	1	1	0	2	10	0,05	47,04	49,77	0	-14,44	-0,52
<b>19</b>	316,35	2	1	1	6	4	1	3	1	2	0	4	8	0,12	46,73	52,17	0	-13,66	1,44
<b>20</b>	292,33	4	1	1	7	6	1	3	1	2	0	2	5	0,09	40,57	49,38	0	-7,07	0,57
<b>21</b>	316,35	3	1	1	7	4	1	3	1	2	0	3	9	0,50	45,45	51,25	0	-12,02	0,27
<b>22</b>	346,38	2	1	1	6	6	1	4	1	3	0	2	8	0,01	43,46	49,76	0	-11,31	1,31
<b>23</b>	308,40	4	1	0	8	5	1	2	1	2	0	0	7	0,28	39,07	44,58	0	-9,86	0,44

**Legenda :**

**PM** = peso molecular

**APO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**APPO** = átomos polares protéicos oclusos

**LHL** = ligações de hidrogênio do ligante

**CL** = choques realizados pelo ligante

**LL** = ligações livres (passíveis de sofrer rotação)

**DLHL** = doadores de ligação de hidrogênio do ligante

**ALHL** = aceptores de ligação de hidrogênio do ligante

**DLO** = doadores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**ALO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**APLO** = átomos polares do ligante oclusos

**AHE** = átomos hidrofóbicos expostos (ao solvente)

**DPO** = doadores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**EEPH** = escore externo de pontes de hidrogênio

**EEV** = escore externo de vdW

**EA** = escore de aptidão

**EIPH** = escore interno de pontes de hidrogênio

**EIT** = escore interno de torção

**EIV** = escore interno de vdW

**ANEXO J-7** → Descritores simples obtidos após o atracamento das **amidinas** em seu estado **catiônico**, na TR de *L. amazonensis*, no sítio da TSST, pelo programa GOLD (CCDC Ltd.).

	PM	APO	APPO	LHL	CL	LL	DLHL	ALHL	DLO	ALO	APLO	AHE	DPO	EEPH	EEV	EA	EIPH	EIT	EIV
<b>9</b>	303,38	5	0	0	1	6	2	1	2	0	0	18	1	0	36,54	-15,19	0	-9,22	-56,22
<b>10</b>	307,80	6	0	0	4	4	2	0	2	0	0	14	1	0	32,63	-8,45	0	-6,42	-46,89
<b>11</b>	352,25	5	0	0	5	4	2	0	2	0	0	16	0	0	33,98	-16,65	0	-6,85	-56,52
<b>12</b>	318,35	1	0	1	6	5	2	2	2	0	1	16	0	2	28,45	-23,94	0	-6,89	-58,17
<b>13</b>	273,35	5	0	0	4	4	2	0	2	0	0	16	0	0	32,64	-36,92	0	-7,38	-74,42
<b>14</b>	287,38	4	0	0	6	5	2	0	2	0	0	19	1	0	33,23	-7,13	0	-6,88	-45,95
<b>15</b>	298,36	4	0	0	6	5	2	1	2	0	0	16	0	0	31,65	-8,77	0	-6,53	-45,75
<b>16</b>	382,27	3	0	0	3	6	2	1	2	0	0	18	1	0	38,35	-17,88	0	-7,81	-62,80
<b>17</b>	289,35	4	0	2	5	5	3	1	1	0	0	15	0	3,84	32,92	-14,04	0	-6,90	-56,25
<b>18</b>	333,40	4	0	0	2	8	2	2	2	0	0	20	1	0	40,34	-10,19	0	-9,21	-56,45
<b>19</b>	317,36	4	0	3	5	4	2	2	0	0	0	24	1	12	19,62	-91,58	0	-13,84	-116,72
<b>20</b>	293,34	3	0	0	4	6	2	2	2	1	0	15	1	0,18	32,13	23,99	0	-8,29	-12,16
<b>21</b>	317,36	4	0	1	10	4	2	2	1	0	0	15	1	1,00	28,62	-83,97	0	-9,75	-114,58
<b>22</b>	347,39	6	0	0	5	6	2	3	2	2	0	17	1	0	37,31	-47,54	0	-13,53	-85,32
<b>23</b>	309,41	4	0	1	5	5	2	1	1	0	0	15	1	3,92	33,89	-27,40	0	-9,01	-68,91

**Legenda :**

**PM** = peso molecular

**APO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**APPO** = átomos polares protéicos oclusos

**LHL** = ligações de hidrogênio do ligante

**CL** = choques realizados pelo ligante

**LL** = ligações livres (passíveis de sofrer rotação)

**DLHL** = doadores de ligação de hidrogênio do ligante

**ALHL** = aceptores de ligação de hidrogênio do ligante

**DLO** = doadores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**ALO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**APLO** = átomos polares do ligante oclusos

**AHE** = átomos hidrofóbicos expostos (ao solvente)

**DPO** = doadores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**EEPH** = escore externo de pontes de hidrogênio

**EEV** = escore externo de vdW

**EA** = escore de aptidão

**EIPH** = escore interno de pontes de hidrogênio

**EIT** = escore interno de torção

**EIV** = escore interno de vdW

**ANEXO J-8** → Descritores simples obtidos após o atracamento das **amidinas** em seu estado **neutro**, na TR de *L. amazonensis*, no sítio da TSST, pelo programa GOLD (CCDC Ltd.).

	PM	APO	APPO	LHL	CL	LL	DLHL	ALHL	DLO	ALO	APLO	AHE	DPO	EEPH	EEV	EA	EIPH	EIT	EIV
<b>9</b>	302,37	4	0	0	2	6	1	2	1	0	0	19	2	0	34,25	38,17	0	-9,11	0,19
<b>10</b>	306,79	3	0	0	3	4	1	1	1	0	0	12	1	0	30,98	34,93	0	-10,46	2,79
<b>11</b>	351,24	3	0	0	4	4	1	1	0	0	0	12	1	0,01	30,77	35,19	0	-9,00	1,87
<b>12</b>	317,34	2	0	1	3	5	1	3	1	2	1	12	0	0	31,41	35,94	0	-7,88	0,63
<b>13</b>	272,34	4	0	0	1	4	1	1	1	0	0	14	2	0	29,77	34,22	0	-8,49	1,78
<b>14</b>	286,37	3	0	0	5	5	1	1	1	1	0	15	0	0	32,23	35,42	0	-9,31	0,43
<b>15</b>	297,35	3	0	0	5	5	1	2	0	0	0	12	1	0,09	31,07	35,24	0	-8,30	0,72
<b>16</b>	381,27	2	0	2	6	6	1	2	0	1	0	15	4	5,62	34,31	41,40	0	-14,05	2,65
<b>17</b>	288,34	3	0	0	3	5	2	2	1	1	0	11	1	0	32,93	35,23	0	-11,22	1,17
<b>18</b>	332,40	5	0	1	4	8	1	3	0	2	0	21	0	2	33,66	36,97	0	-13,80	2,48
<b>19</b>	316,35	0	0	1	4	4	1	3	1	1	0	18	2	6,49	32,16	40,85	0	-14,57	4,71
<b>20</b>	292,33	5	0	0	4	6	1	3	0	0	0	14	1	0	31,67	37,33	0	-7,57	1,35
<b>21</b>	316,35	2	0	2	4	4	1	3	0	1	0	14	4	7,15	34,06	40,78	0	-16,66	3,46
<b>22</b>	346,38	4	0	1	1	6	1	4	0	2	0	18	2	0	34,96	37,48	0	-10,10	-0,49
<b>23</b>	308,40	1	0	1	2	5	1	2	0	1	0	15	2	0,59	29,65	31,86	0	-11,32	1,82

**Legenda :**

**PM** = peso molecular

**APO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**APPO** = átomos polares protéicos oclusos

**LHL** = ligações de hidrogênio do ligante

**CL** = choques realizados pelo ligante

**LL** = ligações livres (passíveis de sofrer rotação)

**DLHL** = doadores de ligação de hidrogênio do ligante

**ALHL** = aceptores de ligação de hidrogênio do ligante

**DLO** = doadores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**ALO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**APLO** = átomos polares do ligante oclusos

**AHE** = átomos hidrofóbicos expostos (ao solvente)

**DPO** = doadores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**EEPH** = escore externo de pontes de hidrogênio

**EEV** = escore externo de vdW

**EA** = escore de aptidão

**EIPH** = escore interno de pontes de hidrogênio

**EIT** = escore interno de torção

**EIV** = escore interno de vdW

**ANEXO J-9** → Descritores simples obtidos após o atracamento das **amidinas** em seu estado **catiônico**, na TR de *L. amazonensis*, no sítio do **FAD**, pelo programa GOLD (CCDC Ltd.).

	PM	APO	APPO	LHL	CL	LL	DLHL	ALHL	DLO	ALO	APLO	AHE	DPO	EEPH	EEV	EA	EIPH	EIT	EIV
<b>9</b>	303,38	5	0	0	5	6	2	1	1	1	0	7	3	0	46,10	-2,75	0	-9,20	-56,94
<b>10</b>	307,80	2	0	0	7	4	2	0	2	0	0	2	5	0	37,33	-0,75	0	-6,53	-45,55
<b>11</b>	352,25	4	0	0	8	4	2	0	2	0	0	4	4	0	46,03	0,25	0	-6,87	-56,17
<b>12</b>	318,35	2	0	1	5	5	2	2	2	0	1	2	3	6	43,99	-0,10	0	-8,19	-58,40
<b>13</b>	273,35	5	0	0	4	4	2	0	2	0	0	5	4	0	43,81	-19,85	0	-7,49	-72,60
<b>14</b>	287,38	4	0	0	9	5	2	0	2	0	0	5	4	0	46,33	10,14	0	-6,73	-46,83
<b>15</b>	298,36	4	0	0	6	5	2	1	2	1	0	5	4	0	47,10	12,42	0	-6,52	-45,83
<b>16</b>	382,27	3	0	0	8	6	2	1	2	1	0	4	6	0,15	44,21	-10,87	0	-8,22	-63,60
<b>17</b>	289,35	5	0	0	7	5	3	1	3	1	0	6	4	0	44,03	-3,04	0	-7,62	-55,97
<b>18</b>	333,40	5	0	0	4	8	2	2	2	2	0	3	6	1.10 <sup>-4</sup>	50,94	4,49	0	-9,36	-56,18
<b>19</b>	317,36	3	0	1	7	4	2	2	2	1	0	6	5	0	41,27	-76,86	0	-13,87	-119,72
<b>20</b>	293,34	4	0	0	5	6	2	2	2	2	0	6	4	0	43,71	38,73	0	-9,57	-11,81
<b>21</b>	317,36	5	0	1	3	4	2	2	2	1	0	3	4	0	46,74	-60,08	0	-9,80	-114,55
<b>22</b>	347,39	4	0	0	3	6	2	3	2	3	0	2	4	0	48,75	-31,70	0	-13,50	-85,23
<b>23</b>	309,41	3	0	0	4	5	2	1	2	1	1	2	5	0	44,82	-15,92	0	-9,09	-68,46

**Legenda :**

**PM** = peso molecular

**APO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**APPO** = átomos polares protéicos oclusos

**LHL** = ligações de hidrogênio do ligante

**CL** = choques realizados pelo ligante

**LL** = ligações livres (passíveis de sofrer rotação)

**DLHL** = doadores de ligação de hidrogênio do ligante

**ALHL** = aceptores de ligação de hidrogênio do ligante

**DLO** = doadores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**ALO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**APLO** = átomos polares do ligante oclusos

**AHE** = átomos hidrofóbicos expostos (ao solvente)

**DPO** = doadores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**EEPH** = escore externo de pontes de hidrogênio

**EEV** = escore externo de vdW

**EA** = escore de aptidão

**EIPH** = escore interno de pontes de hidrogênio

**EIT** = escore interno de torção

**EIV** = escore interno de vdW



**ANEXO J-10** → Descritores simples obtidos após o atracamento das **amidinas** em seu estado **neutro**, na TR de *L. amazonensis*, no sítio do **FAD**, pelo programa GOLD (CCDC Ltd.).

	PM	APO	APPO	LHL	CL	LL	DLHL	ALHL	DLO	ALO	APLO	AHE	DPO	EEPH	EEV	EA	EIPH	EIT	EIV
<b>9</b>	302,37	4	0	0	4	6	1	2	1	2	0	2	5	0,04	47,03	56,43	0	-7,13	-1,15
<b>10</b>	306,79	2	0	0	2	4	1	1	1	1	0	3	6	0,15	45,94	55,61	0	-6,08	-1,62
<b>11</b>	351,24	3	0	0	2	4	1	1	1	1	0	4	4	0,23	45,11	54,87	0	-6,56	-0,83
<b>12</b>	317,34	3	0	1	3	5	1	3	1	2	1	5	2	0,19	45,76	55,07	0	-6,67	-1,36
<b>13</b>	272,34	1	0	0	2	4	1	1	1	1	0	1	8	0	43,59	51,77	0	-6,46	-1,71
<b>14</b>	286,37	3	0	2	1	5	1	1	0	0	0	1	2	0,21	45,55	54,93	0	-7,64	-0,26
<b>15</b>	297,35	4	0	2	2	5	1	2	1	0	0	3	3	0,33	44,38	54,38	0	-7,35	0,39
<b>16</b>	381,27	2	0	1	5	6	1	2	1	1	0	4	3	0,98	47,86	57,74	0	-11,28	2,24
<b>17</b>	288,34	2	0	1	5	5	2	2	0	2	0	3	1	0,16	41,57	48,75	0	-7,02	-1,55
<b>18</b>	332,40	4	0	1	3	8	1	3	1	2	0	1	4	0,25	50,54	59,99	0	-10,57	0,81
<b>19</b>	316,35	3	0	2	4	4	1	3	1	1	0	5	3	3,53	45,12	53,89	0	-11,86	0,18
<b>20</b>	292,33	2	0	1	1	6	1	3	1	1	0	3	3	0,28	44,80	54,78	0	-7,95	0,85
<b>21</b>	316,35	3	0	1	7	4	1	3	1	1	0	2	4	0,41	44,26	51,11	0	-10,78	0,63
<b>22</b>	346,38	5	0	2	4	6	1	4	0	3	0	2	2	0,27	46,92	53,35	0	-12,12	0,69
<b>23</b>	308,40	1	0	1	4	5	1	2	1	1	1	1	6	0	44,00	52,05	0	-8,89	0,45

**Legenda :**

**PM** = peso molecular

**APO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**APPO** = átomos polares protéicos oclusos

**LHL** = ligações de hidrogênio do ligante

**CL** = choques realizados pelo ligante

**LL** = ligações livres (passíveis de sofrer rotação)

**DLHL** = doadores de ligação de hidrogênio do ligante

**ALHL** = aceptores de ligação de hidrogênio do ligante

**DLO** = doadores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**ALO** = aceptores (de ligação de hidrogênio) do ligante oclusos

**APLO** = átomos polares do ligante oclusos

**AHE** = átomos hidrofóbicos expostos (ao solvente)

**DPO** = doadores (de ligação de hidrogênio) protéicos oclusos

**EEPH** = escore externo de pontes de hidrogênio

**EEV** = escore externo de vdW

**EA** = escore de aptidão

**EIPH** = escore interno de pontes de hidrogênio

**EIT** = escore interno de torção

**EIV** = escore interno de vdW

**ANEXO K** → Tabela indicando os resíduos presentes no sítio (TSST) onde foram atracadas as fenotiazinas, para realização de cálculo semi-empírico. Estão indicados ainda a quantidade de resíduos em cada recorte (N° Res.), as moléculas de água presentes nos sítios (H<sub>2</sub>O) e a carga final de cada sítio.

<b>Comp</b>	<b>N° Res.</b>	<b>Resíduos presentes no sítio (5Å)</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>Carga final</b>
<b>24</b>	18	Gly 14, Ser 15, Gly 16, Leu 18, Glu 19, Trp 22, Cys 53, Val 54, Ile 107, Tyr 111, Met 114, Thr 335, Pro 336, Ile 339, Gly 459, His 461, Glu 466, Ser 470	HOH 181, 222, 251, 397, 432	-2
<b>25</b>	20	Gly 14, Ser 15, Gly 16, Leu 18, Glu 19, Trp 22, Gly 50, Cys 53, Val 54, Ile 107, Ser 110, Tyr 111, Met 114, Thr 335, Pro 336, Ile 339, Gly 459, His 461, Glu 466, Ser 470	HOH 181, 222, 251, 328, 397, 432	-2
<b>26</b>	20	Gly 14, Ser 15, Gly 16, Leu 18, Glu 19, Trp 22, Cys 53, Val 54, Val 59, Ile 107, Ser 110, Tyr 111, Met 114, Thr 335, Pro 336, Ile 339, Gly 459, His 461, Glu 466, Ser 470	HOH 181, 222, 251, 397, 430, 432	-2
<b>27</b>	19	Gly 14, Ser 15, Gly 16, Leu 18, Glu 19, Trp 22, Cys 53, Val 54, Val 59, Ile 107, Tyr 111, Met 114, Thr 335, Pro 336, Ile 339, Gly 459, His 461, Glu 466, Ser 470	HOH 181, 222, 251, 397, 432	-2
<b>28</b>	15	Val 59, Lys 62, Ile 107, Glu 436, Phe 396, Thr 397, Pro 398, Leu 399, Lys 402, His 461, Pro 462, Thr 463, Ser 464, Glu 466, Glu 467	HOH 155, 182, 189, 200, 221, 251, 311, 397, 433	-1
<b>29</b>	18	Gly 14, Ser 15, Leu 18, Glu 19, Trp 22, Gly 45, Cys 53, Val 54, Val 59, Ile 107, Tyr 111, Met 114, Thr 335, Pro 336, Ile 339, His 461, Glu 466, Ser 470	HOH 181, 222, 251, 430, 432	-2
<b>30</b>	17	Cys 53, Val 54, Val 59, Lys 62, Ile 107, Glu 436, Phe 396, Thr 397, Pro 398, Leu 399, Lys 402, His 461, Pro 462, Thr 463, Ser 464, Glu 466, Glu 467	HOH 182, 200, 311, 397, 433	-1
<b>31</b>	15	Val 59, Lys 62, Ile 107, Glu 436, Phe 396, Thr 397, Pro 398, Leu 399, Lys 402, His 461, Pro 462, Thr 463, Ser 464, Glu 466, Glu 467	HOH 155, 182, 200, 311, 397, 433	-1
<b>32</b>	16	Val 54, Val 59, Lys 62, Ile 107, Glu 436, Phe 396, Thr 397, Pro 398, Leu 399, Lys 402, His 461, Pro 462, Thr 463, Ser 464, Glu 466, Glu 467	HOH 155, 182, 200, 397, 433	-1
<b>33</b>	18	Gly 14, Ser 15, Leu 18, Glu 19, Trp 22, Cys 53, Val 54, Val 59, Ile 107, Tyr 111, Met 114, Thr 335, Pro 336, Ile 339, Gly 459, His 461, Glu 466, Ser 470	HOH 181, 222, 251, 397, 430, 432	-2

Continua...

... Continuação

<b>Comp</b>	<b>Nº Res.</b>	<b>Resíduos presentes no sítio (5Å)</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>Carga final</b>
<b>34</b>	19	Ser 15, Cys 53, Val 59, Val 59, Lys 62, Ile 107, Tyr 111, Thr 335, Pro 336, Ile 339, Phe 396, Pro 398, Leu 399, His 461, Pro 462, Thr 463, Ser 464, Glu 466, Glu 467	HOH 181, 182, 200, 222, 251, 397, 432, 433	-1
<b>35</b>	17	Val 59, Lys 62, Ile 107, Ser 110, Glu 436, Phe 396, Thr 397, Pro 398, Leu 399, Met 400, Lys 402, His 461, Pro 462, Thr 463, Ser 464, Glu 466, Glu 467	HOH 182, 189, 200, 221, 397, 433	-1
<b>36</b>	15	Gly 14, Ser 15, Leu 18, Glu 19, Trp 22, Asn 23, Cys 53, Tyr 111, Met 114, Thr 335, Pro 336, Ile 339, His 461, Glu 466, Ser 470	HOH 181, 222, 251, 430, 432	-2
<b>37</b>	22	Gly 14, Ser 15, Gly 16, Leu 18, Glu 19, Ala 20, Trp 22, Asn 23, Cys 53, Val 54, Val 59, Ile 107, Tyr 111, Met 114, Thr 335, Pro 336, Ile 339, Gly 459, His 461, Glu 466, Cys 469, Ser 470	HOH 134, 181, 222, 251, 430, 432	-2
<b>38</b>	17	Ser 15, Leu 18, Glu 19, Trp 22, Asn 23, Cys 53, Val 54, Ile 107, Tyr 111, Met 114, Thr 335, Pro 336, Ile 339, Gly 459, His 461, Glu 466, Ser 470	HOH 181, 222, 251, 430, 432	-2
<b>39</b>	21	Gly 14, Ser 15, Gly 16, Leu 18, Glu 19, Ala 20, Trp 22, Asn 23, Cys 53, Val 54, Val 59, Ile 107, Tyr 111, Met 114, Thr 335, Pro 336, Ile 339, Gly 459, His 461, Glu 466, Ser 470	HOH 181, 222, 251, 397, 430, 432	-2
<b>40</b>	20	Gly 14, Ser 15, Gly 16, Leu 18, Glu 19, Trp 22, Asn 23, Gly 50, Cys 53, Val 54, Val 59, Ile 107, Tyr 111, Met 114, Thr 335, Pro 336, Ile 339, His 461, Glu 466, Ser 470	HOH 181, 222, 251, 328, 397, 430, 432	-2
<b>41</b>	16	Gly 14, Ser 15, Leu 18, Glu 19, Trp 22, Asn 23, Leu 27, Gly 50, Ser 110, Tyr 111, Glu 113, Met 114, Asp117, Thr 118, Thr 335, Ile 339	HOH 328, 430, 432	-3
<b>42</b>	18	Ser 15, Leu 18, Glu 19, Trp 22, Asn 23, Cys 53, Val 54, Val 59, Ile 107, Ser 110, Tyr 111, Met 114, Thr 335, Pro 336, Ile 339, His 461, Glu 466, Ser 470	HOH 181, 222, 328, 430, 432	-2
<b>43</b>	14	Gly 14, Ser 15, Leu 18, Glu 19, Trp 22, Asn 23, Thr 26, Leu 27, Gly 50, Val 54, Tyr 111, Met 114, Thr 335, Ile 339	HOH 140, 328, 432	-1