

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA ORGÂNICA

Tese

**Estudo e Desenvolvimento do Modelo Teórico de
Inibição da Enzima Tripanotiona Redutase de
Leishmania spp. por uma Classe de *N,N'*-
difenilbenzamidinas**

Marco Antonio Soares de Souza

2007



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

**ESTUDO E DESENVOLVIMENTO DO MODELO TEÓRICO DE
INIBIÇÃO DA ENZIMA TRIPANOTONA REDUTASE DE
LEISHMANIA SPP. POR UMA CLASSE DE *N,N'*-
DIFENILBENZAMIDINAS**

MARCO ANTONIO SOARES DE SOUZA

Sob a Orientação da Professora

Aurea Echevarria Aznar Neves

e Co-orientação do Professor

Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna

<p>Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Área de Concentração em Química Orgânica</p>

Seropédica, RJ

Março de 2007

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

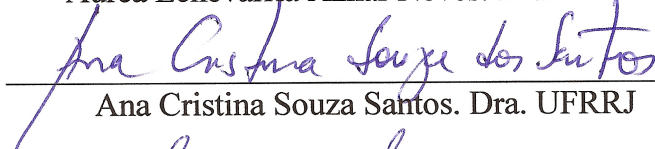
MARCO ANTONIO SOARES DE SOUZA

**Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica, área de
Concentração em Química Orgânica, como requisito parcial para obtenção do grau
de Doutor em Ciências**

TESE APROVADA EM 31/03/2007



Aurea Echevarria Aznar Neves. Dra. UFRRJ



Ana Cristina Souza Santos. Dra. UFRRJ



Leonor Laura Pinto Leon. Dra. FIOCRUZ



Jose Daniel Figueroa Villar. Dr. IME



Marco Edilson Freire de Lima. Dr. UFRRJ



João Batista Neves da Costa. Dr. UFRRJ (Suplente)

547

S729e

T

Souza, Marco Antonio Soares de, 1967-
Estudo e desenvolvimento do modelo teórico de inibição da enzima tripanotona redutase de *Leishmania ssp.* Por uma classe de N,N'- difenilbenzamidas / Marco Antonio Soares de Souza - 2007.

105f. : il.

Orientador: Aurea Echevarria Aznar Neves.

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

Bibliografia: f. 81-961.

1. Química orgânica - Teses. 2. Inibidores enzimáticos - Teses. 3. *Leishmania* - Inibidores - Teses. I. Echevarria, Aurea. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica. III. Título.

Bibliotecário: _____

Data: ___/___/___

RESUMO

SOUZA, Marco Antonio Soares de. **Estudo e Desenvolvimento do Modelo Teórico de Inibição da Enzima Tripanotiona Redutase de *Leishmania* spp. por uma Classe de *N,N'*-difetilbenzamidinas**. 2007. 103p. Tese (Doutorado em Química Orgânica). Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007

Este trabalho teve como proposta central, o estudo e a criação de um modelo teórico de inibição da tripanotiona redutase de *Leishmania spp* para um total de sete *N,N'*-difetilbenzamidinas, monossustituídas por grupamentos: H, NO₂, CH₃, OCH₃, CN, Br e Cl. Os compostos foram sintetizados através de rota específica, sendo posteriormente avaliados para uma possível atividade biológica frente a algumas espécies de microorganismos, em especial tripanossomatídeos, onde esta classe de moléculas apresentou resultados bastante interessantes. O composto metóxi-derivado demonstrou ser altamente promissor, pois associa uma alta atividade contra o parasita aliada à baixa citotoxicidade para o hospedeiro. Estudos de inibição enzimática, realizados no Laboratório de Bioquímica de Tripanossomatídeos da Fundação Oswaldo Cruz (RJ), demonstraram que esta classe de amidinas apresenta capacidade inibitória da enzima tripanotiona redutase, fundamental ao mecanismo de defesa do parasita contra as células do sistema imunológico do hospedeiro. Levantamentos da literatura indicam ser esta enzima um alvo molecular estratégico para o desenvolvimento de drogas ativas contra tripanossomatídeos. A partir de dados experimentais de atividade biológica e modelos estruturais obtidos por técnicas de cristalografia de raio-x e modelagem molecular, foram estabelecidas algumas hipóteses na tentativa de elucidar o mecanismo de inibição destes compostos frente à enzima. A primeira hipótese envolveu a possibilidade de ataque nucleofílico ao carbono amidínico por um grupamento sulfeto de Cis 52 presente no sítio ativo da enzima. Porém impossibilidades estéricas e termodinâmicas demonstraram ser esta hipótese pouco provável. A partir da constatação de que compostos aromáticos costumam sofrer, em sistemas biológicos, processos de epoxidação por enzimas como a citocromo P₄₅₀ epoxidase, por exemplo, estudamos a possibilidade de ser um derivado epoxidado, da molécula ministrada ao parasita, o responsável pela formação de um complexo covalentemente ligado à enzima. Dados obtidos por modelagem molecular utilizando o método semi-empírico PM3, apresentaram resultados satisfatórios a esta hipótese indicando, para os modelos gerados, quais são os aminoácidos envolvidos na formação do complexo enzima-inibidor, além da constatação de que a formação da ligação covalente apresenta entalpias favoráveis da ordem de aproximadamente -20 kcal.mol⁻¹ para as amidinas epoxidadas estudadas.

Palavras-Chave: Amidinas. *Leishmania*. Tripanotiona Redutase. Modelagem Molecular

ABSTRACT

SOUZA, Marco Antonio Soares de. **Study and Development of Theoretical Model of Inhibition of the Enzyme Trypanothione Reductase of *Leishmania* spp. by a Class of *N,N'*-diphenilbenzamidines**. 2007. 103 p. (Doctor Scientiae in Organic Chemistry). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

The present work aims to study and develop a theoretical model for the inhibition of trypanothione reductase from *Leishmania spp* by seven *NN'*-diphenilbenzamidines, monosubstituted with the following groups: H, NO₂, CH₃, OCH₃, CN, Br e Cl. Compounds were synthesized through a specific route and lately evaluated for a biological activity for some species of microorganisms, particularly trypanosomatids, showing interesting results. The methoxy-derived compound seemed to be very promising, due to its high activity against parasite plus its low cytotoxicity for the host. Studies of enzymatic inhibition, performed in the Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos da Fundação Oswaldo Cruz (RJ) showed that this class of amidines has inhibitory activity for trypanothione-reductase, essential to the parasite defense against cells of host immune system. Records in literature indicate this enzyme to be a strategical molecular target for the development of drugs against trypanosomatids. From experimental data of biological activity and structural models obtained from x-ray crystallography and molecular modeling, two hypothesis were set in order to elucidate the mechanism of enzyme inhibition by these compounds. The first one involved the possibility of a nucleophilic attack to the amidinic carbon by a sulfide group of Cis 52 presented in the enzyme active site. Nevertheless, stericals and thermodynamical disabilities showed that this is an improbable hypothesis. Considering that, in biological systems, aromatic compounds are usually submitted to epoxidation by enzymes such as, for example, cytochrome P₄₅₀ epoxidase, we studied the possibility of an epoxidated derivative of the original molecule exposed to parasite be the one involved in the formation of a covalently bounded complex to the enzyme. Data obtained from molecular modeling using semi-empirical method PM3 showed results that support this hypothesis indicating which amino acids are involved in the formation of enzyme-inhibitor complex for the developed models, additionally it was detected that the formation of covalent bound showed a favorable enthalpy of nearly -20 kcal.mol⁻¹ for the studied epoxidated amidines.

Keywords: Amidines. *Leishmania*. Trypanothione Reductase. Molecular Modeling.

“Antes de saber qual seria o assunto da minha escolha, já havia me decidido a ser um professor”

Erwin Schrödinger

AGRADECIMENTOS

Antes de qualquer coisa gostaria de agradecer a Deus por me conceder a benção de ter chegado até aqui.

Também serei eternamente grato à Professora Aurea Echevarria pelo estímulo, compreensão e apoio constantes, sem os quais esta jornada, com certeza, não teria sido concluída. Além de servir como exemplo e inspiração de uma vida dedicada à ciência e ao próximo.

Agradeço ao Professor Carlos Maurício Sant'Anna pela co-orientação, ensinamentos, e pronto atendimento sempre que necessário.

À Dra Leonor Leon pelo acesso ao Laboratório de Bioquímica de Tripanossomatídeos (FIOCRUZ-RJ-BR) sem o qual uma parte importante, e fundamental, deste trabalho não teria sido realizada.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica da UFRRJ, em particular aos Professores Aurélio Baird Buarque Ferreira e Ceres Gomes que, ainda na graduação, me estimularam nos caminhos da pesquisa e da docência. Parte do que sou hoje, como profissional, devo a vocês dois.

À minha mulher, e companheira de todas as horas, Miliane, que me ajudou com seu apoio incondicional e nas revisões deste trabalho.

Aos meus filhos, Tiago e Isabela, que me dão a certeza de que minha existência tem valido a pena.

Sou imensamente grato a Christine, Katarina, Mário Sérgio, Rodney e Sandro, meus ex-alunos na graduação, que me enchem de orgulho ao trilharem o caminho da Pós-Graduação em Química Orgânica. Vocês (e todos os meus alunos) são, de fato, meu maior estímulo na busca do conhecimento e atualização constantes.

Não posso deixar de expressar meu agradecimento a todos os funcionários do Departamento de Química da UFRRJ, em particular ao Aldir, Áurea (*in memoriam*), Carlão, Eli, Fábio, Maurício, Osmar e Rui, pela cordialidade, apoio e, principalmente, bom humor, sempre presentes nestes vinte anos de convivência.

E, finalmente, faço uma menção especial aos amigos da Rural e da Pós-Graduação em Química Orgânica: Aninha, Carlos Alberto, Christian, Dari, Edson, Hélio Júnior, Irineu, Javier, Márcia, Moisés, Miguel e Walter. Saibam que a amizade e admiração que nutro por vocês é incondicional e perene.

ÍNDICE GERAL

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	6
2.1 A Doença e o Parasita.....	6
2.2 A Quimioterapia.....	15
2.3 Mecanismos de Defesa do Parasita.....	18
(o papel da Tripanotiona Redutase e da Citocromo P ₄₅₀)	
2.4 As Amidinas.....	22
2.4.1 Principais Atividades Biológicas das Amidinas.....	23
2.4.2 Síntese das <i>N,N'</i> -Difenil-4-R-Benzamidinas.....	25
2.4.3 Considerações Gerais Sobre Compostos Biologicamente Ativos.....	26
2.5 A Modelagem Molecular.....	27
2.5.1 Mecânica Molecular.....	28
2.5.2 Métodos Quânticos.....	34
2.5.3 Programas e Abordagens Utilizadas em Modelagem Molecular.....	35
2.5.4 Banco de Dados Sobre Estrutura de Proteínas.....	38
3 OBJETIVOS.....	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1 Síntese das Amidinas.....	41
4.2 Ensaios Biológicos.....	41
4.3 Modelagem Molecular.....	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1 Ensaios Biológicos e Busca de Correlações com Efeitos Eletrônicos.....	45
5.2 Modelagem das <i>N,N'</i> -Difenil-4-R-Benzamidinas para Construção do.....	51
Modelo de Interação Ligante X Receptor	

5.3 Construção do Modelo de Interação Ligante / Receptor.....	57
5.3.1 Construção do Modelo Teórico, por Modelagem e Homologia, da Enzima Tripanotiona Redutase de <i>Leishmania Donovan</i>	57
5.3.2 Construção do Modelo Teórico de Inibição da Tripanotiona..... Redutase de <i>Leishmania</i> spp. A Partir da Adição Nucleofílica ao Derivado Epoxidado	60
6 CONCLUSÕES.....	80
7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	81
8 ANEXOS.....	97

1 INTRODUÇÃO

Segundo a ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS, 2002), “*Saúde* é o estado que nos capacita a levar uma vida social e economicamente produtiva. Além disso, saúde é um direito humano básico”.

Existe, na atualidade, uma imensa lacuna entre as expectativas do homem moderno e as possibilidades apresentadas pela ciência no desenvolvimento de tecnologias e avanços científicos capazes de melhorar a sua qualidade de vida.

A ciência moderna trabalha limitada por três fatores: probabilidade, possibilidade e previsibilidade. O fator probabilidade apresenta-se como uma variável independente do tempo, sendo possível especular, por exemplo, que é muito provável que o homem possa vir a colonizar Marte, porém a possibilidade de que isto venha a ocorrer depende das tecnologias que deverão ser desenvolvidas, ao longo do tempo, para dar suporte a tal empreitada.

A previsibilidade passa a ser um fator no qual o tempo serve como parâmetro de mínimo e máximo. É previsível que, com a exponencial redução de tempo entre as novas descobertas e avanços científicos, dentro de dez anos tal viagem seja empregada. Portanto, baseados nestas premissas, podemos afirmar que o principal fator limitante, para a ciência moderna, é a POSSIBILIDADE.

A possibilidade para que novos avanços sejam empregados para o bem estar do ser humano depende das condições criadas para que os indivíduos voltados ao desenvolvimento da ciência realizem novas descobertas, avanços científicos e tecnológicos.

Baseado numa projeção, que na grande maioria das vezes é demasiada otimista, o homem moderno espera que tais descobertas sejam apresentadas à humanidade em espaços de tempo muito reduzidos em relação ao tempo real para que tais avanços sejam, de fato, aplicáveis para a promoção do seu bem estar.

Assim, vivemos uma era em que o “previsível” e o “provável” assumem ares de “possível”, porém, no mundo físico real, manipulável e humano, nem sempre o previsível e o provável tornam-se possíveis.

Cada avanço demanda um enorme esforço (excetuando-se as descobertas acidentais), e a soma de incontáveis pequenas descobertas, muitas vezes prováveis de serem previstas e tornadas possíveis, geram resultados aplicáveis.

Ao homem da nossa era resta a expectativa de que esta ciência gere avanços que possam promover melhorias na sua qualidade de vida, principalmente nos aspectos materiais como: saúde, moradia, transporte, etc, e emocionais como: espiritualidade, equilíbrio mental, estabilidade econômica, etc.

Assim, enfatizando-se o aspecto “saúde”, algumas indagações devem ser feitas por aqueles que dedicam suas vidas à produção do conhecimento científico:

_Como utilizar esta ciência, exclusivamente, para promoção de bem estar do ser humano?

_Quais devem ser os fatos *prováveis* e *previsíveis* que devem ser priorizados no desenvolvimento da ciência, para que reais *possibilidades* venham a emergir?

_Como reduzir o tempo das novas descobertas para atender a imensa expectativa do homem moderno quanto aos avanços científicos capazes de promoverem a melhoria da sua qualidade de vida?

_Como tornar esta ciência mais próxima do ser humano para que, de fato, as descobertas científicas venham a ser utilizadas em prol do seu bem individual e/ou comunitário e não ao contrário, independente de classe social, etnia, etc?

_Qual o limite de tempo que devemos achar razoável para que determinados avanços estejam ao alcance do homem?

Com certeza estas não são questões simples de serem respondidas, porém, graças aos avanços observados em determinadas áreas, algumas indagações, se não respondidas, podem ao menos ser consideradas dentro de parâmetros razoáveis e reais, uma vez que determinados instrumentais vêm tornando *possíveis* inúmeras descobertas passíveis de aplicabilidade.

Uma área da ciência em particular, dentro da Química, que vem se destacando nas últimas décadas, pelos seus avanços e pela sua relevância na promoção da saúde humana, é a Química Medicinal.

Uma das principais premissas desta ciência baseia-se na busca e compreensão dos fatores químicos e físico-químicos que determinam os mecanismos de ação dos compostos ativos frente a sistemas biológicos (BARREIRO, 2002).

Dados como os modos de interação de biomacromoléculas com compostos potencialmente bio-ativos, mecanismos de ação, biodisponibilidade, metabolismo, etc., vêm de encontro a um dos objetivos centrais da Química Medicinal, que consiste na busca

de “alvos” moleculares capazes de apresentar interações específicas e seletivas a um determinado organismo.

Entende-se por “alvo” qualquer biomolécula que possa apresentar diferenciação em sua função celular a partir da interação desta com outra molécula produzida fora do organismo (KOROLKOVAS, 1988).

Técnicas de QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) buscam avaliar, quantitativamente, como variações estruturais dentro de uma mesma classe de compostos, interferem no comportamento biológico de um determinado fármaco (VANHOUTTE, 1997). Paralelamente, estudos de Modelagem Molecular desenvolvem modelos teóricos capazes de elucidar quimicamente o mecanismo de ação destes compostos (MONTANARI, 1998).

A partir do momento que se conhece a estrutura da molécula receptora na célula, se torna mais fácil propor estruturas análogas à de um fármaco, ou classe de compostos testada, que sejam, pelo modelo teórico, capazes de interagir quimicamente com mais eficiência e seletividade com a molécula alvo existente na célula.

A junção dos dados obtidos pelas técnicas de QSAR, com os modelos sugeridos pela química teórica (via Modelagem Molecular), culminando com a proposta para síntese de substâncias que sejam potencialmente mais ativas, é que chamamos modernamente (em resumo e sem considerar alguns outros aspectos) de “Planejamento Racional de Fármacos” (BARREIRO, 2002).

Graças à evolução da informática, a Modelagem Molecular tornou-se mais uma ferramenta disponível aos químicos para o estudo da estrutura molecular, caracterizada pela capacidade de produzir uma grande quantidade de informações a um baixo custo. Os métodos de modelagem molecular mais amplamente utilizados são baseados nos modelos da **mecânica molecular** e da **mecânica quântica**, dentre os quais destacam-se, pela capacidade de obter informações eletrônicas de sistemas com um número elevado de átomos, típicos dos problemas da Química Medicinal, os métodos **semi-empíricos**.

Nos últimos anos, foram desenvolvidas técnicas que permitem a construção de modelos de interação ligante-receptor mais simples, que não necessitam levar em consideração todos os átomos do sistema e que podem ser operadas em equipamentos de baixo custo. Uma dessas técnicas, chamada modelagem de **pseudo-receptores** (SANT’ANNA *et al.*, 1999), baseia-se no conceito de que apenas uma região relativamente pequena da biomacromolécula é responsável pela interação efetiva com o ligante, sendo esta região denominada sítio ativo.

Para se aplicar essa técnica na avaliação da ação de inibição de uma substância sobre uma determinada enzima, por exemplo, a primeira etapa consiste na busca de informações sobre o sítio ativo da enzima (aminoácidos componentes e sua distribuição espacial) a partir de dados da literatura e de bancos de dados de acesso público, como o *Protein Data Bank* (PDB). Conhecendo-se estas informações estruturais, os principais aminoácidos do sítio ativo são isolados para a construção do pseudo-receptor.

Uma vez identificados os aminoácidos fundamentais, e tendo como ponto de partida classes de compostos, reconhecidamente inibidores da enzima, ou ainda o próprio substrato, inicia-se o estudo propondo o(s) mecanismo(s) de inibição do(s) fármaco(s) frente à biomacromolécula, buscando-se um modelo mais eficiente de interações para as classes de compostos propostos na teoria.

A Modelagem Molecular, portanto, assume seu papel de “catalisadora” em um processo que, segundo dados obtidos da literatura, demanda um tempo e custo médios, para o desenvolvimento de novos fármacos, em torno de 10 anos e 20 milhões de dólares, respectivamente, gastos em pesquisa básica e aplicada, sendo uma boa parte destes recursos gastos em ensaios de atividade, muitas vezes conduzidos de forma quase aleatória (KOROLKOVAS, 1988).

Estes dados sinalizam um problema de extrema gravidade que se resume no baixo interesse da Indústria Farmacêutica mundial no financiamento de projetos que busquem o desenvolvimento de fármacos capazes de “curar” moléstias tidas, por diversos fatores, como doenças que afetam populações de baixa renda. Portanto, técnicas que busquem a redução dos valores, normalmente gastos na pesquisa e produção de novos medicamentos, devem ser muito bem recebidas pela comunidade científica mundial, em sua grande maioria composta por indivíduos comprometidos com uma ciência que não seja delimitada por barreiras econômicas ou sociais e voltada à promoção do bem estar do ser humano na sua totalidade.

A associação da Modelagem Molecular à Química Medicinal, pode reduzir substancialmente o tempo e o custo no desenvolvimento de novos medicamentos, pois, como ferramenta, a Modelagem pode apresentar parâmetros que otimizem os processos de triagem quanto às substâncias biologicamente ativas, além de permitir a criação de modelos capazes, numa situação ideal, de simular os mecanismos de interação fármaco↔receptor, servindo como suporte para orientação na síntese de compostos com

maior capacidade de interação com o ligante e que poderão ser, potencialmente, mais ativos.

Neste trabalho buscamos desenvolver um modelo teórico para interação de uma classe específica de *N,N'*-difeníl-4-R-benzamidinas onde R= H, Me, MeO, NO₂, Br, Cl e CN, frente à enzima tripanotiona redutase, existente em tripanossomatídeos.

O composto metóxi-substituído, assim como os outros seis derivados, apresentou-se ativo, frente à *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma evansi* (dois gêneros de tripanossomatídeos) tendo seu potencial destacado em razão das baixas doses biologicamente ativas, bem como por sua baixa citotoxicidade, quando comparado ao principal fármaco atualmente utilizado contra estes parasitas, a pentamidina, servindo, portanto, como estrutura de partida para a construção de modelo de interação fármaco↔receptor (GOMES-CARDOSO *et al*, 1998 (a) e (b)).

A síntese, os ensaios biológicos e os trabalhos de Modelagem Molecular foram desenvolvidos pela parceria estabelecida entre o Laboratório de Síntese Orgânica da Professora Dra. Áurea Echevarria (UFRRJ-RJ-BR), Laboratório de Bioquímica de Tripanossomatídeos da Professora Dra. Leonor Leon (FIOCRUZ-RJ-BR) e o Laboratório de Modelagem Molecular do Professor Dr. Carlos Maurício R. de Sant'Anna (UFRRJ-RJ-BR), respectivamente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A DOENÇA E O PARASITO

A doença determinada por parasitos do gênero *Leishmania sp* denomina-se leishmaniose e atinge cerca de dois milhões de indivíduos, anualmente, ao redor do mundo (Figura 1) (OPS/OMS, 2006). Está presente em todos os continentes, exceto na Antártida e na Oceania, e em praticamente todos os estados brasileiros.

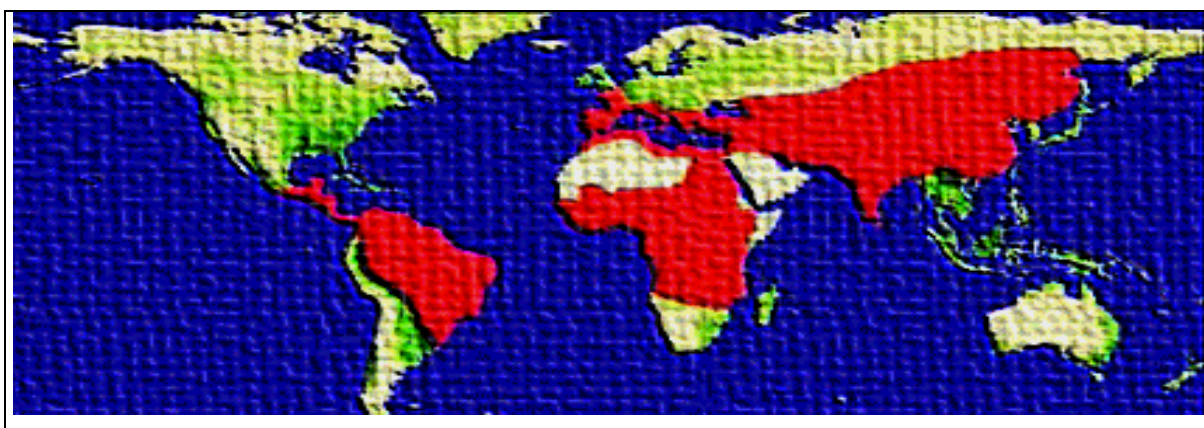


Figura 1: Distribuição da Leishmaniose ao redor do mundo (em vermelho) (<http://geo.arc.nasa.gov/sgc/health/sensor/diseases/leish.html>) – acessado em 02/2007

A leishmaniose é uma das mais importantes parasitoses existentes em todo o planeta, dada a sua capacidade de disseminação, bem como pelo polimorfismo de suas manifestações clínicas, associado às condições gerais de saúde e sócio-econômicas do hospedeiro, sendo classificada como a segunda causa de morte entre as doenças parasitárias, após a malária. Suas principais manifestações patológicas, as formas reconhecidas como *tegumentar* (ou cutânea) e *visceral* (também conhecida como Calazar) são as mais comumente observadas na América do Sul, incluindo-se o Brasil, sendo a forma visceral potencialmente mortal se não tratada por um período que varia, em média, de um a dois anos após o aparecimento dos sintomas (SOUZA, 2000).

Por definição, a leishmaniose tegumentar é uma enfermidade polimórfica da pele e das mucosas, caracterizada pela presença de lesões ulcerosas, indolores, únicas ou múltiplas (forma cutânea simples), lesões nodulares (forma difusa) ou lesões cutâneo-mucosas (forma cutâneo-mucosa) que afetam regiões nasofaríngeas concomitante ou após

uma infecção cutânea inicial. Esta última é desfigurante e pode ser fatal por acometimento respiratório secundário (SOUZA, 2000).

Historicamente, descrições da leishmaniose cutânea podem ser encontradas no primeiro século d.C., na Ásia Central. As lesões encontradas nos doentes eram referidas de acordo com a região em que ocorriam, como ferida de Balkh, nome de uma cidade do Norte do Afeganistão, Botão de Aleppo, na Síria, e Botão de Bagdá, no Iraque. Esta doença era conhecida por viajantes como Botão-do-Oriente (GENARO, 1997).

Na América, a doença é relatada em cerâmicas peruanas e colombianas da época pré-colombiana (400 a 900 d.C.), tendo sido documentada em potes sob a forma de faces humanas com mutilações do nariz e dos lábios, muito semelhante às encontradas na leishmaniose cutâneo-mucosa (GOLDMAN, 1983).

As primeiras descrições clínicas datam do século XVI e foram feitas por Oviedo, em 1535, e por Pizarro, em 1571, que se referiam a uma doença que destruía o nariz e cavidades bucais de índios na encosta da Cordilheira dos Andes. Em 1764, Bueno publicou observações mostrando que, no Peru, a leishmaniose cutânea era transmitida pela picada de flebotomíneos. A primeira observação dos parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* foi feita por Cunningham, em 1885, em casos de leishmaniose visceral na Índia (HERRER, 1975).

No Brasil, a leishmaniose cutânea era conhecida por Cerqueira desde 1855 através da comparação de lesões da pele similares ao Botão-do-orientes. Em 1908, durante a construção da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil, em São Paulo, ocorreram numerosos casos, principalmente na cidade de Bauru, ficando conhecida como Úlcera-de-Bauru (NEVES, 2005).

Gaspar Viana introduziu o tártaro emético como tratamento inédito das leishmanioses em 1912, e durante muito tempo este foi o único fármaco utilizado como agente terapêutico das leishmanioses tegumentares (RATH, 2003; BERMAN, 1988)

Cerqueira, em 1920, e Beurepaire-Aragão, relataram evidências da transmissão envolvendo flebotomíneos. Ao mesmo tempo, o papel destes vetores foi evidenciado no Velho Mundo (GENARO, 1997).

Segundo estimativa da OMS, a cada ano ocorrem aproximadamente 1 milhão e meio de novos casos de leishmaniose cutânea no mundo (OPS/OMS, 2006). Durante a guerra do Irã-Iraque, cerca de 1 milhão de pessoas apresentaram quadros clínicos de leishmaniose tegumentar, uma vez que a área do conflito estava localizada em região de

alta transmissão da doença. No Brasil, segundo relatório do Sistema de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, no período de 1980 a 2006, ocorreram 610.268 casos notificados de Leishmaniose Tegumentar (vide Anexo 1a)

Estes exemplos de alta incidência da doença, com grande número de indivíduos com lesões incapacitantes, desfigurantes e algumas vezes fatais, como nas leishmanioses viscerais, levaram a OMS a incluir esta doença entre as seis mais importantes endemias do mundo.

Segundo considerações da Organização Pan-Americana de Saúde (OPS) e Organização Mundial de Saúde (OMS), as leishmanioses são enfermidades de impacto nas áreas menos favorecidas, afetando setores mais vulneráveis da população. Isto gera uma distorção absurda no conceito doença↔grupo sócio-econômico, pois, baseados nessa conclusão, podemos supor, e de fato isto é observado, que indivíduos de maior poder aquisitivo não só são menos susceptíveis a parasitoses como apresentam maiores possibilidades de cura. Também pode-se concluir que, por ser a leishmaniose uma parasitologia transmitida por picada de inseto, indivíduos pertencentes a uma classe econômica mais elevada possuem mecanismos de controle destes vetores mais sofisticados e eficientes.

Este fato acaba por classificar, em nível global, a leishmaniose como uma patologia típica de populações pobres, existindo, portanto, um mínimo interesse por parte das indústrias farmacêuticas no financiamento de projetos voltados ao desenvolvimento de fármacos contra a doença. Desse modo, o aumento, nos últimos anos, da incidência notificada, da letalidade e das áreas geográficas envolvidas, é motivo de preocupação (OPS/OMS, 2006).

Uma ocorrência pouco usual de leishmaniose, em soldados que retornaram da Guerra do Golfo, foi relatada à época do conflito. Embora portadores de *L. tropica*, espécie causadora de típicas *úlceras localizadas*, tais indivíduos, provavelmente devido ao estresse a que foram submetidos, desenvolveram uma forma *viscerotrópica* da doença (WILSON, 1993).

Hoje, reconhece-se que fatores como desnutrição e estresse, comumente observados em populações de baixa renda, são, se não agravantes, fortes indicadores de gravidade nos portadores de leishmaniose (PEARSON *et al.*, 1992).

Dentre as inúmeras espécies de *Leishmania* descritas, algumas foram identificadas como causadoras da leishmaniose cutânea em humanos (GRIMALD & TESH, 1993),

pertencentes aos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* (LAISON & SHAW, 1987). A espécie *L. braziliensis*, juntamente com *L. tropica*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis* formam o complexo que comumente causa a leishmaniose tegumentar. *L. braziliensis* apresenta ampla distribuição geográfica e a maior prevalência no País, principalmente fora da região amazônica (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994).

As regiões mais atingidas são as áreas peri-urbanas, com características rurais, geralmente em encostas de morros, onde o meio ambiente sofreu alterações. A doença é predominante entre a população de baixa renda, que vive em habitações precárias em saneamento (MARZOCHI *et al.*, 1985).

A distribuição geográfica da *Leishmania*, como de outros agentes infecciosos disseminados através de um vetor, é o resultado da interação dinâmica entre vetores, reservatórios, parasitas e fatores ambientais. A movimentação dos indivíduos e as transformações exercidas sobre o ambiente determinam a introdução de novos grupos geneticamente relacionados provenientes de áreas diferentes em uma determinada região predispondo a ocorrência de surtos (SARAVIA *et al.*, 1998).

Atualmente, as medidas de controle utilizadas assumem características mais abrangentes, envolvendo estratégias relacionadas ao conhecimento das espécies dos parasitas, dos vetores, das possíveis fontes de infecção, aspectos clínicos, distribuição geográfica, fatores históricos e sócio-econômicos envolvidos. No entanto, ainda há necessidade de maior integração entre os diversos serviços de saúde e de melhor adaptação das tecnologias utilizadas para diagnóstico, tratamento e profilaxia (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994).

A participação de animais domésticos no ciclo epidemiológico da Leishmaniose Tegumentar (LT) é discutida desde o início do século quando PEDROSO (1913) e BRUMPT & PEDROSO (1913) relataram as primeiras observações de cães naturalmente infectados com LT no estado de São Paulo. Entretanto, durante vários anos esses animais foram considerados hospedeiros acidentais (PESSOA & BARRETO, 1948) ou mesmo, pouco suscetíveis à infecção (FORATTINII *et al.*, 1973). Contudo, outros estudos demonstraram a presença de cães infectados em áreas endêmicas tanto de LT (COUTINHO *et al.*, 1981) como Leishmaniose Visceral (MARZOCHI *et al.*, 1985, COUTINHO *et al.*, 1985). Atualmente, acredita-se no envolvimento dos animais domésticos, tais como cães e cavalos, como fonte de infecção (SCHUBACH *et al.*, 1998), além de raposas em ambiente selvagem.

Do mesmo modo, a participação humana na epidemiologia das infecções vem sendo avaliada, como demonstra um estudo desenvolvido por SCHUBACH *et al.* (1998), onde dois indivíduos, submetidos ao tratamento padrão utilizando-se os fármacos de primeira escolha e devidamente recuperados das lesões clínicas, foram investigados por longos períodos pós-cura, tendo sido possível isolar formas parasitárias das cicatrizes das lesões. Concluiu-se que indivíduos, clinicamente sãos, albergam parasitos intracelulares latentes, mas potencialmente virulentos e, o mais importante, que a quimioterapia de eleição não pode ser considerada como 100% eficiente.

No Brasil os principais vetores transmissores da leishmaniose cutânea são insetos do Gênero *Lutzomyia*, da subfamília *Phlebotominae*, conhecidos popularmente como “mosquito palha”, “asa-branca”, “bi(a)rigui”, “bererê” ou “tatuquira” (Figura 2), sendo comumente encontrado em algumas regiões do país, e endêmico de matas fechadas e de vegetação variada. Seu ciclo de vida é curto e seus hábitos bem definidos (MELBY *et al.*, 1992).

Os vetores mudam de acordo com a espécie de *Leishmania*:

- Os vetores de *Leishmania amazonensis* são: *Lu. flaviscutellata*, a *Lu. reducta* e a *Lu. olmeca* nociva (Amazonas e Rondônia), insetos que têm hábitos noturnos, vôo baixo e são pouco antropofílicos.
- Os vetores de *Leishmania guyanensis* são: *Lu. anduzei*, *Lu. whitmani*, e *Lu. umbratilis* que é o principal vetor, costumando pousar durante o dia em troncos de árvores e atacar o homem em grande quantidade quando perturbado.
- Para *Leishmania braziliensis*, quando em áreas silvestres, o único vetor demonstrado transmissor foi o *Psychodopigus wellcomei*, encontrado na Serra dos Carajás, altamente antropofílico, picando o homem mesmo durante o dia e com grande atividade na estação das chuvas já em ambientes modificados, rural e peri-domiciliar, os vetores mais frequentes são *Lu. whitmani*, *Lu. intermedia* e *Lu. migonei*.

A Leishmaniose Visceral (LV), forma mais grave da doença, é uma zoonose causada por parasitos pertencentes ao Gênero *Leishmania*, complexo *Leishmania donovani*, que está representado pelas espécies *L. (Leishmania) donovani*, *L. (L.) archibaldi*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi*, sendo que nas Américas, a *Leishmania*

(Leishmania) chagasi é a espécie incriminada como causadora da doença. A LV está presente nos quatro continentes, apresentando uma estimativa de incidência anual de 500.000 casos. A grande maioria dos casos tem sido relatada em regiões do leste Africano, Índia e Brasil. No Brasil, ocorre em 20 estados, situados em quatro das cinco regiões geográficas do País (DESJEUX, 2004). No período compreendido entre os anos de 1984 a 2004, o número de casos de LV registrado foi de 60.889, com uma incidência de 2 casos para cada 100.000 habitantes, apresentando uma tendência ao crescimento (vide Anexo 1b). Sua maior incidência encontra-se no Nordeste, com 67 % do total das notificações (BRASIL, 2003)

No Brasil, a *Lutzomyia longipalpis* é considerada a principal espécie transmissora da *L. (L.) chagasi*, e mais recentemente, a *Lutzomyia cruzi* foi incriminada como vetor no Estado de Mato Grosso do Sul (SANTOS, 1998). Seu habitat é o domicílio e o peridomicílio humano onde se alimenta de sangue do cão, do homem, de outros mamíferos e aves. As fêmeas têm hábitos antropofílicos, pois necessitam de sangue para desenvolvimento dos ovos. Durante a alimentação, introduzem no hospede, através da saliva, um peptídeo que se considera um dos mais potentes vasodilatadores conhecidos. Após 8 a 20 dias do repasto, as leishmanias evoluem no tubo digestivo destes mosquitos, que estarão aptos a infectar outros indivíduos.



Figura 2: “mosquito palha” – família: *Psychodidae*; ordem: *Díptera*; gênero: *Lutzomyia*. Também conhecido como: ”asa-branca”, “bi(a)rigui”, “bererê” ou “tatuquira”

Embora popularmente conhecidos como “mosquitos” estes insetos pertencem à mesma ordem das mosca, em razão de sua morfologia.

Existem aproximadamente 700 espécies de flebotomíneos das quais cerca de 70 são consideradas capazes de transmitir doenças aos seres humanos. As espécies pertencentes ao gênero *Lutzomyia* possuem um ciclo de vida ainda pouco estudado.

O gênero *Leishmania* spp. (ROSS, 1903), agrupa espécies de protozoários unicelulares pertencentes à família *Trypanosomatidae* e à ordem *Kinetoplastida*, encontrados na forma flagelada promastigota no trato digestivo do hospedeiro invertebrado, insetos da subfamília *Phlebotominae*, e na forma amastigota, sem flagelo livre, como parasita intracelular obrigatório do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados (WILSON, 1993; WOLDAY *et al.*, 1997). As morfologias amastigota e promastigota são ilustradas na Figura 3.

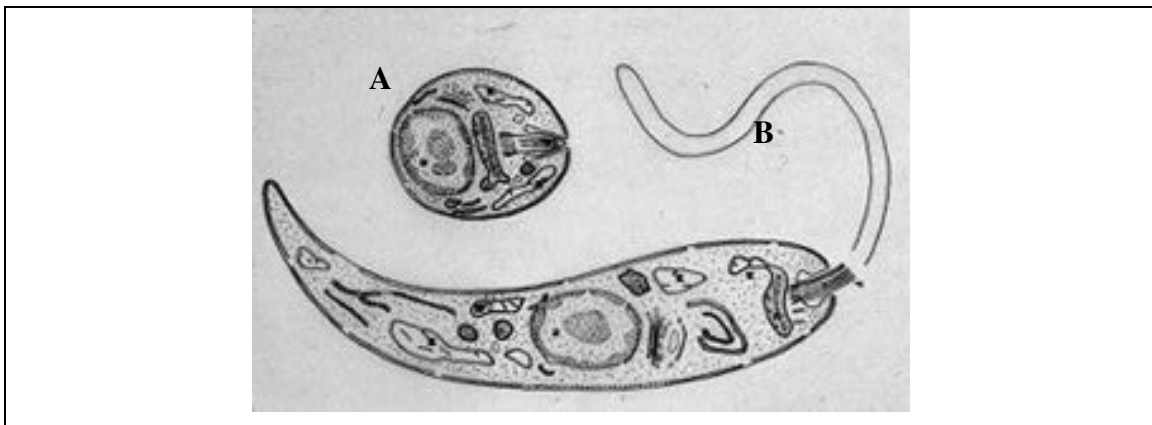


Figura 3: Leishmania - A – Forma amastigota; B – Forma promastigota

O ciclo de disseminação do parasito envolve uma correlação direta entre o homem↔reservatório↔vetor. No aspecto epidemiológico da leishmaniose visceral, os cães domésticos têm um papel fundamental porque são os reservatórios domésticos da doença. No meio silvestre os cachorros-do-mato e, principalmente, as raposas desempenham esta função. O vetor da doença, conforme já detalhado, é a fêmea dos flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*.

Os reservatórios normalmente são acometidos por um parasitismo cutâneo intenso. Cães e raposas são excelentes fontes de infecção para os flebotomíneos e, portanto, mantêm os ciclos tanto em ambiente domiciliar como silvestre, respectivamente.

Os cães foram encontrados infectados em todos os focos de doença humana e constituem o principal elo de transmissão. As raposas fazem o papel de reservatórios silvestres. O papel do ser humano, cães, raposas e flebotomíneos pode ser ilustrado na Figura 4.

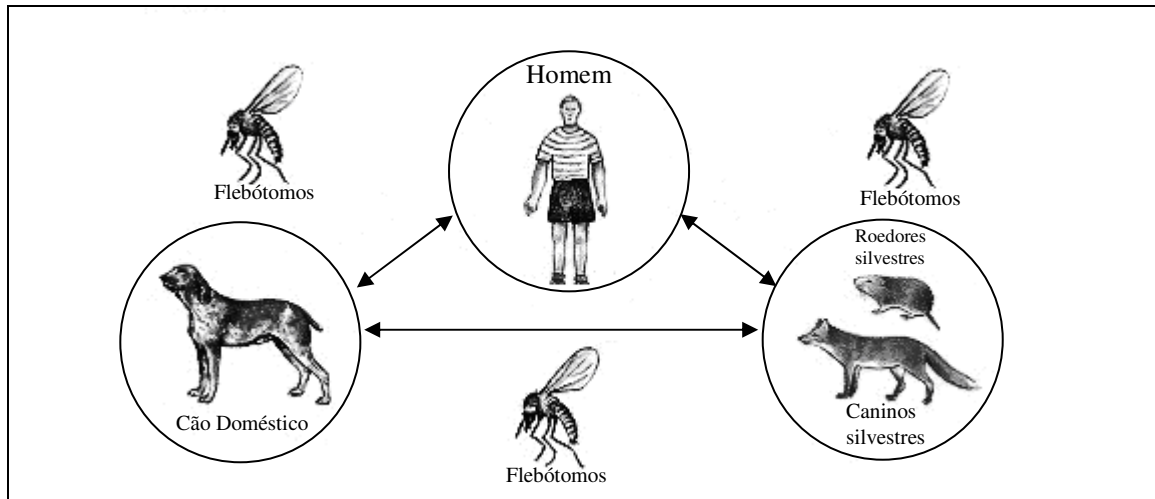


Figura 4: Ciclo de transmissão da Leishmaniose envolvendo Homem↔Reservatório↔Vetor

As formas amastigotas são ingeridas durante o repasto sanguíneo do vetor, e transformam-se nas formas promastigotas no intestino do inseto (Figura 5).

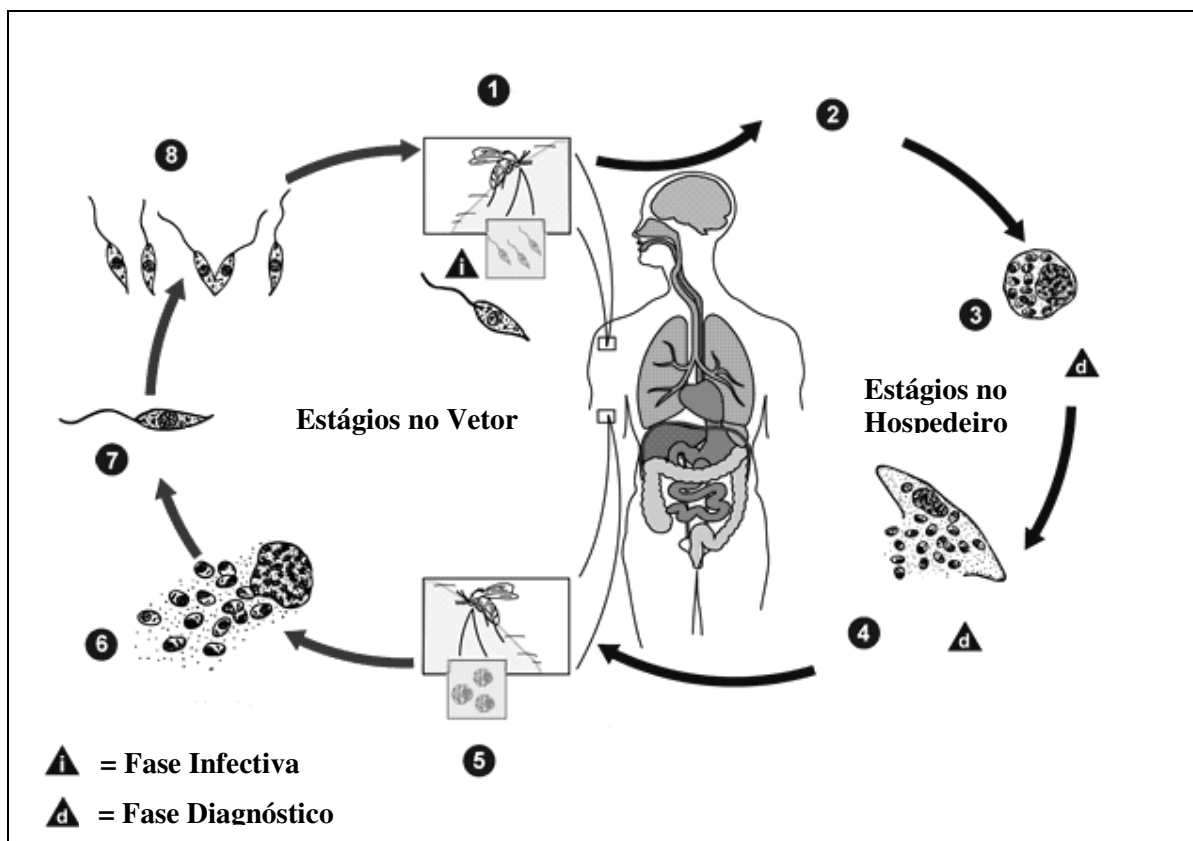


Figura 5: Ciclo biológico do parasita

- O Inseto vetor injeta o parasita na sua morfologia infectiva (promastigota), durante o repasto sanguíneo **1**;
- A forma promastigota é fagocitada por macrófagos do hospedeiro **2**;
- No interior do macrófago a leishmania transforma-se em amastigota **3**;
- As formas amastigotas multiplicam-se infectando outros grupos celulares afetando tecidos diferentes, dependendo espécie de Leishmania **4**, originando as manifestações clínicas da leishmaniose;
- O flebotomíneo torna-se infectado ao ingerir macrófagos do hospedeiro, infectados com as formas amastigotas, durante as refeições de sangue (**5**, **6**);
- No intestino do vetor, os parasitas diferenciam-se nas formas em promastigotas **7**, que se multiplicam e migram ao probóscide do inseto **8**.

As formas promastigotas constituem uma população heterogênea. Na fase exponencial de crescimento são formas não-infectivas, denominadas procíclicas, facilmente destruídas por células do sistema imune do hospedeiro, como, por exemplo, os macrófagos (RUSSELL & TALAMAS-ROHANA, 1989; PIMENTA *et al.*, 1992). Posteriormente

se diferenciam em formas metacíclicas, de fase estacionária, resistentes e altamente infectivas para macrófagos.

A diferença entre ambas está relacionada ao aumento da expressão e do comprimento da cadeia do lipofosfoglicano (LPG), molécula de superfície do parasito que possui participação fundamental no processo infeccioso (SACKS, 1992; WILSON, 1993; SARAIVA *et al.*, 1995). Acredita-se que durante a diferenciação da forma promastigota procíclica em promastigota metacíclica, o LPG sofra extensas modificações, que incluem o alongamento da molécula, devido ao aumento significativo do número de unidades de oligossacarídeos fosfatados, e ao aumento da expressão da arabinopirranose, em lugar da β -galactopirranose na extremidade terminal da cadeia de açúcares (SACKS *et al.*, 1990; MCCONVILLE *et al.*, 1992; SCHLEIN, 1993). O alongamento do LPG impede o ataque, por células do sistema imune do hospedeiro, à membrana celular do parasito, explicando a alta resistência das formas metacíclicas à lise mediada por este sistema (PUENTES *et al.*, 1988, 1991).

A redução dos resíduos de galactose terminais e o alongamento do comprimento flagelar nas formas metacíclicas controlam negativamente a adesão específica dos promastigotas em desenvolvimento ao intestino do inseto vetor (PIMENTA *et al.*, 1992; SCHLEIN, 1993). A capacidade de aderência das formas procíclicas ao intestino do vetor parece ser um mecanismo seletivo desenvolvido para retenção destas e a inoculação apenas das formas infectivas, metacíclicas, do protozoário no hospedeiro vertebrado, durante o repasto sanguíneo (SCHLEIN, 1993).

2.2 A QUIMIOTERAPIA

A primeira conduta terapêutica contra a leishmaniose foi introduzida em 1912 pelo médico brasileiro Gaspar Vianna, com o uso do tártarato emético (tártarato duplo de sódio e antimônio). Por muito tempo, esta foi a única opção de tratamento (RATH *et al.*, 2003).

Em seguida, foram utilizados os antimoniais trivalentes, que foram substituídos pelos pentavalentes por serem, estes, menos tóxicos (RATH *et al.*, 2003).

Atualmente, os antimoniais pentavalentes consistem na medicação de primeira escolha para o tratamento de leishmaniose tegumentar americana. Existem dois tipos: o

estibogliconato de sódio (Pentostan®) e o antimoniato de *N*-metilglicamina (Glucantime®), sendo este último o único disponível no Brasil (LEÃO, 1997; FRÉZARD, 2005), Figura 6.

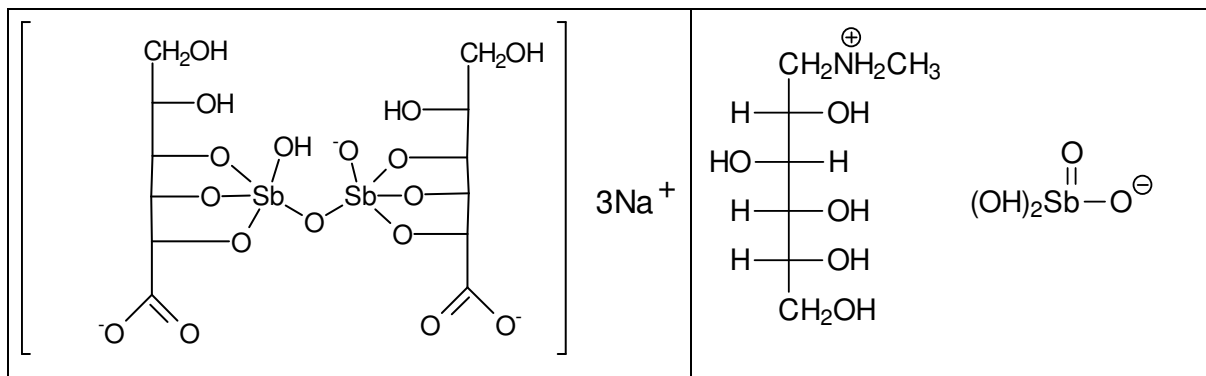


Figura 6: Estruturas do Pentostan® e Glucantime®, respectivamente

A pentamidina (Pentacarinat®) tem sido utilizada com sucesso no tratamento da leishmaniose por *Leishmania guyanensis*, sendo adotada como segunda opção ou até mesmo primeira, como no tratamento de crianças (BODLEY, 1995) Figura 7.

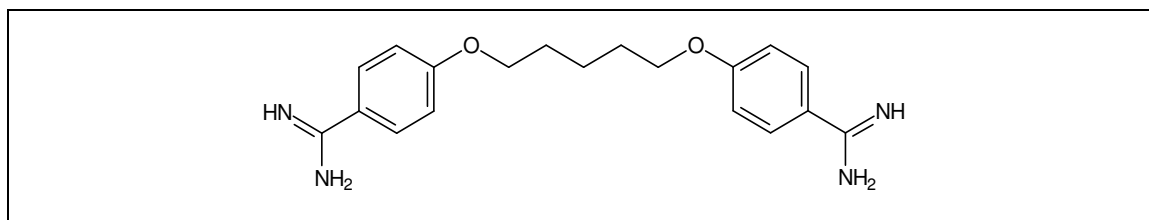


Figura 7: Estrutura da pentamidina.

O uso de isotianato (em vez de mesilato) de pentamidina é mais indicado por causar menos efeitos colaterais. Seus principais efeitos colaterais são dores, indurações e abscessos no local da aplicação, náuseas, vômitos, adinamia (fadiga muscular), mialgia, cefaléia, hipotensão, lipotímia (desmaios), entre outros. É contra-indicada em gestantes, portadores de diabetes, insuficiência renal, insuficiência hepática e doenças cardíacas (FERNANDES, 1997).

A anfotericina B (Fungizon®), Figura 8, é empregada quando não se obtém resposta ao tratamento com os compostos antimoniais. Devido à sua toxicidade, o paciente

deve permanecer hospitalizado durante o tratamento. Algumas formulações alternativas deste antibiótico estão disponíveis, porém ainda é observada uma grande incidência de alteração das funções renais em 80% dos indivíduos tratados (SOTO, 2004).

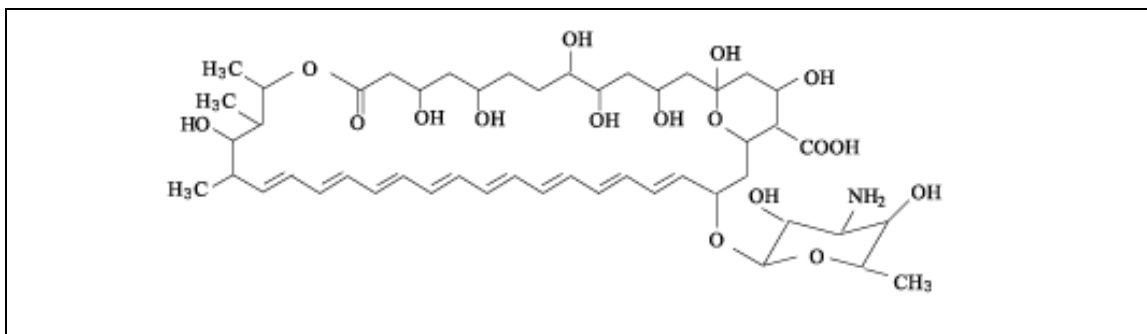


Figura 8: Estrutura da anfotericina B.

Mais recentemente o alquilfosfolípídeo miltefosina, inicialmente utilizado como anti-tumoral (UNGER *et al.*, 1989), começou a ser empregado, com sucesso para tratamento da leishmaniose visceral na Índia (GELB & HOL, 2002). Entretanto, apesar da excelente eficácia, este antibiótico apresenta alguns efeitos colaterais graves, incluindo teratogenicidade, em cerca de 60% dos pacientes tratados com a dose mínima recomendada (KAMINSKY, 2002), Figura 9.

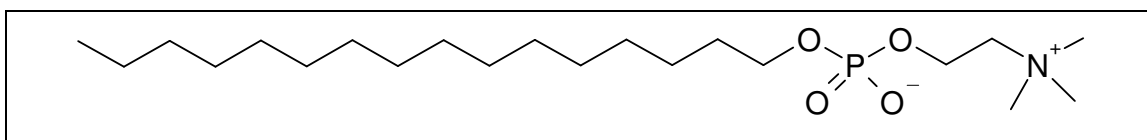


Figura 9: Estrutura da Miltefosina

O antimoniato de *N*-metilglicamina (Glucantime®), é o único medicamento anti-leishmaniose disponível no Brasil e apresenta diversos efeitos colaterais, como artralgia, mialgia, inapetência, náuseas, vômitos, epigastralgia, dor abdominal, febre, prurido, fraqueza, cefaléia, tontura, insônia, entre outros. Pode causar alterações eletrocardiográficas e nefrotoxicidade. É contra-indicado na gravidez, por ser abortivo, e em casos de cardiopatia, nefropatia, hepatopatia, doença de Chagas e tuberculose pulmonar. Nos casos de varicela, herpes zoster e malária, elas devem ser tratadas antes de iniciar ou continuar o tratamento (LEÃO, 1997). Em função destes severos efeitos

colaterais, é um fármaco que possui uma série de restrições à sua utilização (BEZERRA,2004)..

Para agravar este quadro de restrição ao uso deste fármaco, alguns autores têm descrito cepas de *Leishmania* resistentes ao Glucantime® e há casos de pacientes refratários ao tratamento. Há algumas evidências sobre uma relação entre o sucesso da terapia e o estado imunitário do doente (SOUZA, 2000), o Glucantime não agiria senão naqueles casos em que o macrófago estaria ativado. A favor deste ponto de vista ocorre o fato de que pacientes imunodeprimidos em geral são refratários ao tratamento. Por esse motivo a OMS tem estimulado as pesquisas com drogas alternativas, sendo propostos multicentros de investigações no Mediterrâneo e África para leishmaniose visceral e na América do Sul para leishmaniose tegumentar, visto que a associação do vírus da AIDS com a leishmaniose tem elevado sua casuística (OPS/OMS, 2006).

2.3 MECANISMOS E DEFESA DO PARASITA (o papel da Tripanotiona Redutase e enzimas do complexo Citocromo P₄₅₀)

Neste tópico serão discutidos alguns aspectos inerentes às estratégias de defesa do parasita na sua forma amastigota, infectante das células do hospedeiro.

Conforme descrito anteriormente, a primeira etapa infectiva da *Leishmania* spp consiste na infecção de macrófagos ativados no momento da picada do inseto vetor. A diferenciação da forma promastigota metacíclica para a amastigota no ambiente intracelular pode ser caracterizada como um mecanismo de defesa, neste caso em particular, um modo de adaptação evolutiva (NEVES, 2005). A membrana celular na forma amastigota apresenta proteínas de superfície capazes de neutralizar quimicamente a ação tóxica da célula do sistema imune.

As principais formas de neutralização, contra agressões externas, adotadas pelos tripanossomatídeos são análogas a muitas das estratégias de detoxicação observadas em células eucarióticas de mamíferos. Mecanismos de oxidação, clivagem, neutralização de radicais livres e transformações diversas, são comuns nestas espécies. No entanto, assumem papel fundamental os mecanismos de redução, via conjugação das substâncias

agressoras ao parasita, promovidos pela molécula tripanotiona (N^1, N^8 -bis(glutathionil)espermidina) (CAMUS *et al*, 1995).

A principal função desta biomacromolécula é atuar como anti-oxidante permitindo, por exemplo, no caso das leishmânias, que substâncias oxidantes liberadas pelos macrófagos, células que albergam o parasita em mamíferos, sejam neutralizadas.

A glutathiona (L- γ -glutamyl-L-cisteinilglicina) desempenha papel semelhante em células do hospedeiro (JANES, 1990). No entanto, a enzima responsável pela sua síntese, a glutathiona redutase, muito embora apresente uma boa homologia equivalente no parasita, a tripanotiona redutase, diferenciam-se estruturalmente em seus sítios ativos, pois ambas são extremamente dependentes de seus substratos específicos (STOLL *et al*, 1997; D`SILVA, 2000).

A tripanotiona redutase (TR) é uma flavoproteína dissulfeto redutase específica de tripanossomatídeos, fundamental para a sobrevivência do parasita (ZHANG, 1993; KELLY, 1993; DUMAS, 1997).

É uma enzima tetramérica capaz de transportar hidrogênios redutores de moléculas de FAD (flavina dinucleotídeo) para a forma oxidada da tripanotiona, usando, para esta finalidade, uma ponte de dissulfeto entre duas cisteínas presentes no sítio ativo da enzima. O mecanismo exato de transmissão destes hidrogênios não é detalhado na literatura. Sua atuação baseia-se na redução da tripanotiona gerando um contínuo fornecimento do antioxidante na sua forma ativa (reduzida) (KURIYAN, 1990).

O mecanismo de redução da tripanotiona oxidada, em comparação à glutathiona oxidada, possibilita entender a razão pela qual as enzimas, embora apresentem funções semelhantes, bem como boa homologia, sejam substrato-específicas. (ABOAGYE, 1992)

Nas duas formas, uma importante diferença consiste na presença de um grupamento carregado positivamente na tripanotiona (FAERMAN, 1996). As formas reduzidas apresentam grandes diferenças conformacionais e estruturais, sendo, de fato, moléculas com um alto grau de diferenciação estrutural. A Figura 10 ilustra os mecanismos de redução da tripanotiona em comparação à glutathiona.

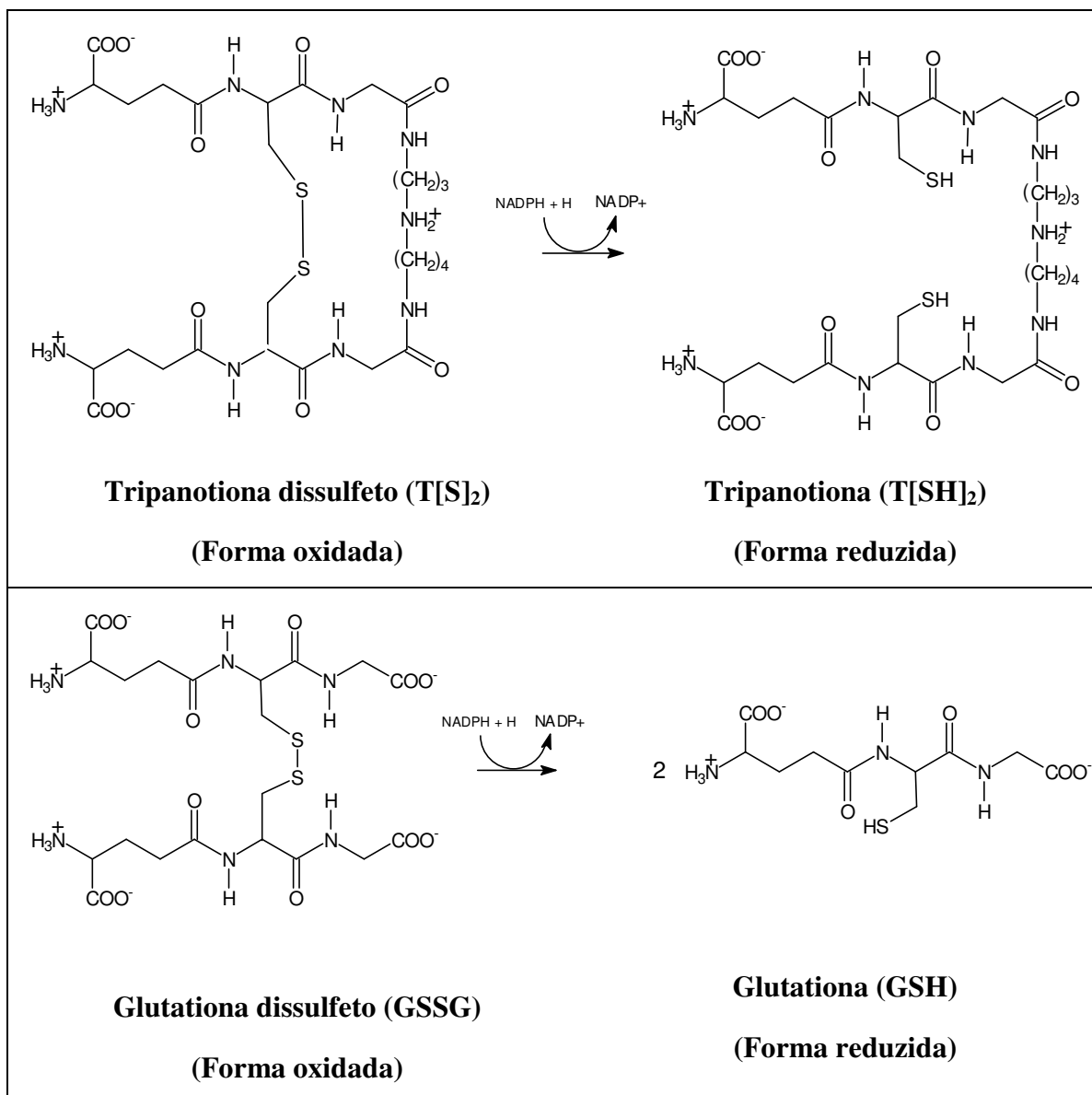


Figura 10: Diagrama esquemático de redução da Tripanotona e da Glutaciona a partir de suas estruturas oxidadas

Muito embora, as enzimas apresentem boa homologia, artigos da literatura sinalizam a grande especificidade da tripanotona redutase (TR), em relação ao seu substrato, em tripanossomatídeos (HUNTER, 1992; AUMERCIER, 1994; CENAS, 1994; MARSH, 1997)

Também encontramos dados na literatura comparando as diferenças estruturais entre a TR e a sua análoga em mamíferos, a glutaciona redutase (GR) (BENSON, 1992).

A TR teve sua estrutura elucidada por SHAMES *et al* em 1988, apresentando pequenas variações na seqüência de aminoácidos em relação às espécies-específicas de tripanossomatídeos (TAYLOR, 1994).

TAYLOR *et al* (1994) também compararam o alto grau de homologia desta enzima para espécies distintas de tripanossomatídeos, destacando as sensíveis diferenças em relação à sua análoga no hospedeiro. Tal observação merece destaque em razão da possibilidade do desenvolvimento de substâncias capazes de apresentar um amplo espectro de ação contra diversos tripanossomatídeos patogênicos como, por exemplo, o *Trypanosoma cruzi*, agente da Doença de Chagas, e *Trypanosoma evansi*, agente da Doença das Cadeiras, de importância em eqüídeos (GOMES-CARDOSO *et al*, 1999).

Os aminoácidos responsáveis pela atividade catalítica da TR são conhecidos (BAILEY, 1993), sendo extremamente importantes as Cisteínas 52 e 57, por estarem diretamente envolvidas no mecanismo de transferência dos hidrogênios redutores da flavina dinucleotídeo para a tripanotiona oxidada.

A estrutura tridimensional da enzima tripanotiona redutase de *Crithidia fasciculata*, bem como de outras espécies de tripanossomatídeos, está disponível no *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/>) (BAILEY, 1993) podendo se constatar, através da literatura, um elevado grau de homologia entre as enzimas desta espécie e de *Leishmania spp*.

A hipótese para o desenvolvimento de estruturas com capacidade de inibição seletiva da TR foi sinalizada inicialmente por HOL em 1986, tendo como objetivo o desenvolvimento de fármacos direcionados ao parasita, minimizando sensivelmente efeitos colaterais advindos de interações com a GR no hospedeiro. Ao longo do tempo diversos trabalhos sinalizaram a TR como alvo estratégico para desenvolvimento de fármacos com potencial atividade anti-tripanosomatídeos (FAIRLAMB, 1985; FAIRLAMB, 1990; WALSH, 1991; HUNTER, 1997; GARFOTH, 1997; CHAN, 1998; BONSE 1999 Bonze, 2000; KRAUTH-SIEGEL, 2003, CASTRO-PINTO, 2004).

Porém, a abordagem pautada na utilização da modelagem molecular como ferramenta útil a este objetivo, no estudo da TR, é bem mais recente, sendo o presente trabalho um dos pioneiros.

Outro mecanismo químico de defesa do parasito, usualmente descrito, baseia-se na ação de enzimas oxidativas dependentes do complexo Citocromo P₄₅₀, capazes de aumentar a polaridade de compostos lipossolúveis via mecanismos de oxidação como hidroxilação e epoxidação (MONTELLANO, 1995).

A Figura 11 ilustra o processo de formação de óxidos de arenos (epóxidos formados em anéis aromáticos) por intermédio da Cit P₄₅₀ (MONTELLANO, 1995).

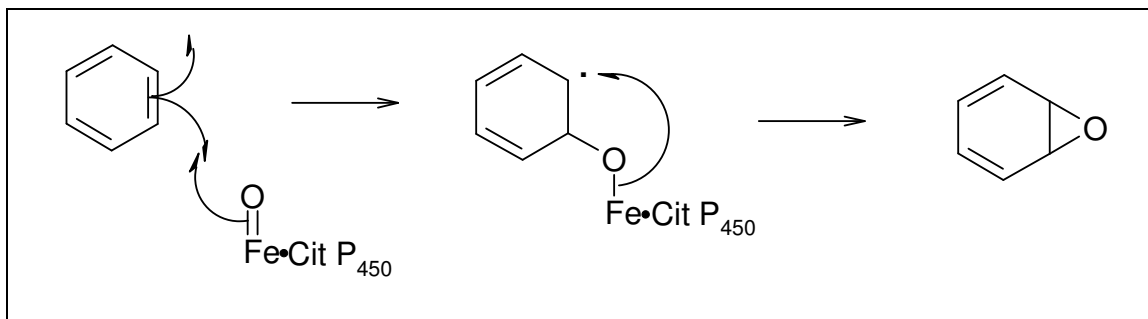


Figura 11: Formação de óxidos de arenos por intermédio da Cit P₄₅₀.

2.4 AS AMIDINAS

As amidinas são compostos orgânicos caracterizados pela presença dos grupamentos C=N e C-N, que proporcionam propriedades específicas das funções azometina e amina, respectivamente.

A ligação C-N possui um caráter parcial de ligação dupla, devido ao efeito de ressonância envolvendo os grupamentos C=N e C-N, conforme a Figura 12.



Figura 12: Efeito de ressonância envolvendo a classe das amidinas.

Quando ligados a anéis aromáticos, núcleos amidínicos apresentam grande conjugação, interligando efeitos eletrônicos à distância entre os grupos posicionados em R, R₁, R₂ e R₃ (OSZCZAPOWICZ, 1986). Tais efeitos podem ser avaliados comparando-se o caráter eletrofílico do carbono amidínico com as constantes de Hammett, por exemplo (EXNER, 1972)

Analisando-se em termos de atividade biológica, não podemos ignorar a relevância destes efeitos sobre mecanismos de interação específicos ligante↔receptor.

A adequada análise de parâmetros estruturais e eletrônicos desta classe de compostos, na busca de eventuais centros reativos na molécula, deve levar em consideração, portanto, os efeitos conjugados entre diferentes anéis aromáticos mono ou poli-substituídos.

2.4.1 PRINCIPAIS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS AMIDINAS

Os compostos amidínicos apresentam uma ampla gama de atividades biológicas correlacionadas. Dentre os compostos amidínicos, com atividade biológica relatada, a pentamidina e o Berenil® (Figura 7, agentes terapêuticos anti-tripanosomas africanos) são os mais representativos.

As diamidinas aromáticas apresentam atividade tripanocida, antifúngica, antibacteriana, antiviral e antitumoral (BERMAN, 1988).

Existem correlações estabelecidas entre a estrutura da pentamidina e sua atividade frente a *Plasmodium falciparum*, *L. mexicana* e *L. amazonensis* (BELL, 1990).

BASSELIN *et al.* (1997) descreveram que a pentamidina, utilizada na clínica contra casos de leishmanioses resistentes aos antimoniais pentavalentes, apresenta bons resultados em pacientes imunodeprimidos.

Diversos cloridratos da classe das difenilbenzamidinas, particularmente com substituintes metoxila na posição *orto* e *para* dos anéis aromáticos ligados diretamente ao nitrogênio da função amidina, apresentam atividade anestésica local e a benzamidina cloro-*para*-substituída apresenta atividade antitumoral e anti-HIV (ECHEVARRIA *et al.*, 1996).

As diamidinas interferem na síntese de poliaminas, inibindo a utilização de S-adenosil-L-metionina por inibirem enzimas como a ornitina descarboxilase e a espermidina sintetase, impedindo, assim, a síntese de moléculas importantes para a manutenção da vida do parasito (BACHARACH *et al.*, 1979; BASSELIN *et al.*, 1997). Além disso, elas são capazes de se ligar ao DNA em regiões ricas em seqüências A – T (adenina – timina) (BERNAM, 1997).

A pentamidina, usada no tratamento da leishmaniose cutânea, apresentou-se menos tóxica do que os antimoniais pentavalentes, embora tenham sido observados alguns efeitos

adversos expressivos, como mialgias, dor no local da administração, náuseas, dores de cabeça e hipotensão (BASSELIN, 1997). Entretanto, para o tratamento da leishmaniose visceral, sendo necessária a administração de altas doses de pentamidina, os efeitos tóxicos observados são maiores do que os apresentados pelos antimoniais pentavalentes, havendo exacerbação dos efeitos já citados e a incidência de taquicardia e hiperglicemia (BERMAN, 1988).

Em 1996, o grupo de pesquisa de BANERJEE (1996) propôs o encapsulamento de pentamidina em lipossomas revestidos por açúcares como forma de melhorar o direcionamento do fármaco para as células-alvo, aproveitando os processos de endocitose mediada por receptores.

Os trabalhos de CANTO-CAVALHEIRO *et al.* (1997, 2000) demonstraram o efeito anti-tripanosomatídeos de diversos compostos da classe das *N,N'*-difênil-*R*-benzamidinas, em testes realizados contra formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. Tais derivados apresentaram baixa atividade frente ao *T. cruzi* para as duas formas estudadas, mas em relação à atividade anti-*Leishmania*, alguns dos derivados, apesar de mostrarem variação quanto à atividade para ambas as formas evolutivas de *L. amazonensis*, apresentaram-se altamente eficazes, em especial os compostos bromo e metóxi-substituído (CANTO-CAVALHEIRO *et al.*, 2000). Posteriormente, TEMPORAL *et al.* (2002) descreveram que a metoxiamidina não apresenta toxidez para a célula hospedeira e, na concentração equivalente ao seu valor CE_{50} , impede a interiorização de *L. amazonensis*.

O derivado *N,N'*-difênil-4-metoxi-benzamidina foi também estudado quanto à sua atividade frente a proteína quinase A, envolvida na etapa de fosforilação do cAMP de *Leishmania amazonensis* na forma evolutiva de promastigotas, contendo grande quantidade de formas metacíclicas, e amastigotas axênicas, mostrando efeito inibitório (GENESTRA, *et al.*, 2001). Além disso, este derivado metoxilado mostrou-se também ativo na interação macrófago-parasito envolvendo a produção de óxido nítrico (NO), especificamente na enzima óxido nítrico sintase (cNOS) produzida por *L. amazonensis*, em comparação com a pentamidina, indicando menor atividade desta (TEMPORAL *et al.*, 2005). GENESTRA e colaboradores (2005) também demonstraram o efeito da *N,N'*-difênil-4-metoxi-benzamidina na produção do óxido nítrico pela *L. amazonensis*, sendo que na forma de promastigotas, o derivado amidínico inibiu a produção em 23,53%, enquanto que a pentamidina apenas em 3,78%. Na forma de amastigotas, a metóxi-amidina inibiu significativamente em 52,95% a produção do radical NO pelos parasitos, enquanto que a

pentamidina, de forma não-significativa, 25,29%, indicando a maior eficiência do derivado amidínico por essa via de ação.

2.4.2 SÍNTESE DAS *N,N'*-DIFENIL-4-R-BENZAMIDINAS

Os compostos utilizados neste trabalho foram sintetizados por SANTOS (1993). O esquema a seguir descreve as etapas de síntese utilizadas para a preparação das *N,N'*-difetil-4-R-benzamidinas (Figura 13).

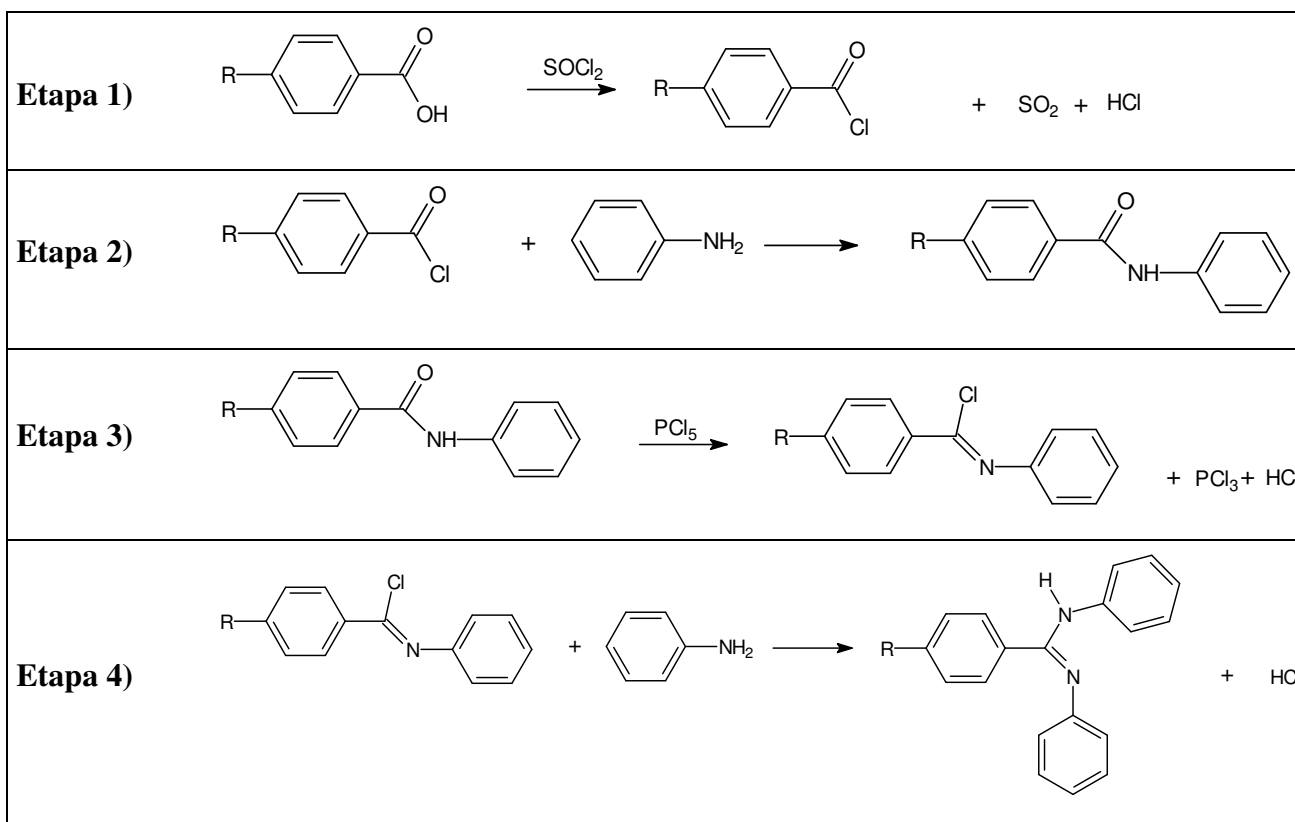


Figura 13: Sequência de síntese dos compostos *N,N'*-difetil-4-R-benzamidinas

2.4.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE COMPOSTOS BIOLÓGICAMENTE ATIVOS

O conhecimento a respeito dos mecanismos de interação molecular que resultam no que chamamos de atividade biológica, constitui-se no principal foco da química medicinal (FOYE, 1974).

São consideradas biologicamente ativas todas as substâncias capazes de promover qualquer tipo de alteração na “rotina” normal de funcionamento de um organismo, podendo resultar no mau funcionamento ou no ajuste de vias metabólicas comprometidas.

Há uma prática ocidental em que se classificam produtos dotados de atividade biológica em três categorias: Droga, Fármaco e Medicamento (KOROLKOVAS, 1982).

Entende-se por Droga, toda a matéria prima mineral, vegetal ou animal da qual se pode extrair um ou mais princípios biologicamente ativos.

Fármaco é a substância química estruturalmente definida capaz de produzir atividade biológica útil, seja como preventivo, curativo ou agente de diagnóstico.

Medicamento pode ser considerado o mesmo que fármaco, no entanto há uma sutil distinção, pois trata-se de um fármaco na sua forma preparada para ser administrado ao paciente.

Podemos ainda classificar os fármacos em duas categorias: estruturalmente inespecíficos e estruturalmente específicos.

Define-se como estruturalmente inespecífico, o fármaco que baseia sua atividade biológica unicamente a partir de suas propriedades físico químicas como coeficiente de partição e pKa, por exemplo.

Os anestésicos de ação central são casos clássicos desta categoria de fármacos, pois seu mecanismo de ação envolve alterações na conformação de membranas celulares alterando seus mecanismos de interação molecular, sem, no entanto, haver uma interação específica fármaco x receptor como ocorre nos estruturalmente específicos.

A classe dos fármacos estruturalmente específicos compreende a maioria dos medicamentos conhecidos, e seu efeito biológico deriva de interações diretas e seletivas entre o fármaco e uma biomacromolécula alvo, denominada receptor.

Existem várias teorias sobre interações específicas fármaco x receptor, porém, e de forma geral, baseiam-se na orientação e seletividade de interações entre o fármaco e um receptor específico.

A interação de um fármaco com seu sítio receptor, em um organismo, define seus mecanismos farmacodinâmicos de ação (BARREIRO, 2001), e envolve diretamente forças

intermoleculares como: ligações de hidrogênio, interações dipolares, iônicas e de Van der Waals, além de fatores estéricos.

Dentre as inúmeras estratégias e abordagens adotadas pela Química Medicinal, para o desenvolvimento de fármacos, uma das mais eficientes é a associação das técnicas que correlacionam estrutura com atividade biológica (BARREIRO, 1991).

O conhecimento de todos os parâmetros estruturais de um composto candidato a fármaco é fundamental para que se possa elucidar, de forma direta, os seus possíveis mecanismos de ação e a correta observação experimental, direcionada à compreensão de quais são os possíveis bioreceptores de um composto biologicamente ativo, associada às informações estruturais dos mesmos, é uma poderosa ferramenta para o desenvolvimento racional de fármacos, permitindo ao químico medicinal correlacionar todas as variáveis farmacodinâmicas que possam ser responsáveis pelo mecanismo de ação do fármaco.

Uma vez identificadas estas variáveis pode-se partir para uma abordagem teórica, propondo-se, através de modelos, a construção de estruturas moleculares possivelmente mais eficientes e específicas, em termos de interação com o bioreceptor desejado. Assim, assume este papel a Modelagem Molecular, cujo foco central quando direcionada à Química Medicinal, é exatamente o desenvolvimento de rotinas de cálculo, bem como a construção de modelos moleculares específicos, capazes de elucidar (ou auxiliar na elucidação) os mecanismos específicos de interação ligante ↔ receptor.

2.5 A MODELAGEM MOLECULAR

A técnica conhecida como Modelagem Molecular fundamenta-se, em termos gerais, no estudo de interações atômicas, intra e intermoleculares, via simulação de parâmetros estruturais e eletrônicos, em ambiente computacional.

O avanço tecnológico, principalmente com o desenvolvimento dos microcomputadores, possibilitou a difusão da química teórica e da modelagem molecular por toda comunidade química, permitindo, a um baixo custo, a realização de estudos teóricos de propriedades termodinâmicas, efeitos isotópicos, estados de transição, análise espectroscópica, cinética, QSAR, etc. (SILVA, 2003) Os métodos comumente aplicados na

Modelagem Molecular podem ser classificados em três tipos: *ab initio*, **semi-empírico** e **empírico**.

Os métodos empíricos são baseados na mecânica clássica, sendo também conhecidos como métodos de **mecânica molecular**. Os métodos **semi-empírico** e *ab initio* são classificados como métodos quânticos, pois sua fundamentação está baseada na mecânica quântica.

A seguir detalharemos os principais fundamentos dos métodos empírico, semi-empírico e *ab initio*, respectivamente.

2.5.1 MECÂNICA MOLECULAR

Trata-se de um método baseado em modelos de mecânica clássica. São utilizadas funções analíticas que incluem parâmetros ajustáveis, permitindo uma melhor representação de determinadas propriedades moleculares, como geometria, energia conformacional, calor de formação, etc.. (LEACH, 1998)

Este tipo de abordagem usa uma função de energia potencial, de maneira simples e analítica, descrevendo as interações entre um grupo de átomos específicos relacionados entre si por um sistema de coordenadas.

Ao contrário dos métodos quânticos, em mecânica molecular não se tratam explicitamente dos elétrons dos átomos.

O fundamento principal baseia-se, em que as ligações químicas possuem comprimentos e ângulos “naturais”. Adicionalmente, são incluídas interações estéricas (potenciais de van der Waals) e eletrostáticas.

As estruturas podem ser consideradas, como um conjunto de esferas de diferentes tamanhos conectadas entre si por molas de diferentes comprimentos e forças, sendo o tratamento matemático do sistema, baseado em um oscilador harmônico segundo a lei de Hooke.

O conjunto de valores otimizados de comprimentos e ângulos de ligação, torções (ângulo diedro) e interações entre átomos não ligados, junto com suas funções de potencial e parâmetros correspondentes, denomina-se **campo de força**.

Um dos métodos pioneiros nesta área foi o campo de força MM2, desenvolvido por ALLINGER (1977), sendo aplicado a moléculas pequenas, e alterado em 1989 (chamado a

partir daí por MM+) também por Allinger, que expandiu o método para peptídeos. O MM2 foi desenvolvido para trabalhos voltados a resultados mais apurados de certas classes de compostos e não desenvolvido para cálculos genéricos, porém menos precisos, que poderiam ser aplicados a quaisquer situações da química orgânica.

Atualmente podem ser citados vários tipos de métodos que usam campos de forças, como o AMBER, OPLS e BIO+. (WEINER *et al*, 1984; CORNELL *et al* 1995)

Cada método usa características específicas para descrição dos potenciais entre os átomos, porém todos eles se baseiam em três pontos fundamentais para seus cálculos: a forma funcional, os tipos de átomos e os grupos de parâmetros.

A forma funcional é a função que descreve a energia potencial. Esta descrição energética parte do principal fundamento envolvido nos métodos de mecânica molecular onde são considerados tipos de átomos e não de elementos químicos.

Este conceito leva em conta o ambiente atômico, considerando fatores tais como hibridização, cargas formais e ligantes vizinhos. A análise fundamental associada a esta idéia é que o ambiente químico é único para um átomo dentro de uma molécula e, por isso, nas análises energéticas os átomos não são considerados isoladamente e sim levando em conta o grupamento dos quais fazem parte.

Desta forma são levadas em conta as energias de ligação, do ângulo de ligação, do ângulo diedro, assim como energias de van de Waals, eletrostáticas, etc.

Somando as diferentes contribuições, obtém-se uma função do tipo:

$$E_{\text{total}} = \Sigma (E_{\text{ligação}} + E_{\text{ângulo}} + E_{\text{torção}} + E_{\text{vdWalls}} + E_{\text{eletrônica}} + \dots) \quad (\text{Equação 1})$$

Como exemplo, podemos citar um dos campos de força, característicos em mecânica molecular mais utilizados em estudos com proteínas, o AMBER (Assisted Model Building and Energy Refinement). Neste campo, os termos da Equação que caracteriza o somatório final de todas as energias envolvidas, correspondem à soma dos seguintes termos a seguir:

Energia de estiramento: É uma função quadrática, associada ao tamanho das ligações, onde a constante de ligação está medida em kcal.mol⁻¹ por Å² (comprimento da ligação em Å ao quadrado) e pode ser representada pela Equação (2).

$$E_{\text{ligação}} = \sum_{\text{ligação}} K_r (r - r_o)^2 \quad (\text{Equação 2})$$

Uma vez definido o valor da constante K_r , esta fornece um bom parâmetro da tendência de dois átomos permanecerem em sua distância de referência r_0 . Esta tendência será tão maior quanto maior o valor de K_r .

Energia de deformação dos ângulos de ligações: É um termo associado às deformações nos valores dos ângulos de ligação entre três átomos consecutivos escolhidos. A função harmônica que descreve esta energia é mostrada na Equação 3.

$$E_{\text{ângulos}} = \sum_{\text{ângulo}} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (\text{Equação 3})$$

Valores maiores de K_θ determinam uma grande tendência dos átomos permanecerem num ângulo de equilíbrio θ_0 .

Energia dos ângulos diedros: É a energia associada aos ângulos formados por quatro átomos consecutivos, e sua tendência de permanecer em conformações que conferem mínimos de energia.

$$E_{\text{diedro}} = \sum_{\text{diedro}} \frac{V_n}{2} - [1 + \cos(n\phi - \phi_0)] \quad (\text{Equação 4})$$

Na Equação 4, V_n corresponde à constante associada à barreira de energia conformacional, de um sistema específico. Quanto maiores forem as possibilidades conformacionais, mais complexa fica sua composição.

Energia de van der Waals: É a energia associada às interações não ligantes, atrativas e repulsivas, entre 2 átomos a uma distância de R . A Equação 6 mostra a relação de energia para esta forma funcional.

$$E_{\text{van der Walls}} = \sum_{ijEvdW} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} \right] \quad (\text{Equação 5})$$

Este potencial é também referido como Lennard-Jones, onde o primeiro termo é positivo e tem a função de descrever as forças repulsivas em distâncias pequenas e o segundo termo é negativo e tem a função de descrever as forças atrativas de distâncias mais longas.

A_{ij} e B_{ij} são os parâmetros que determinam as formas com que os pares átomos irão interagir de maneira não – ligante. O tratamento matemático é dado pelas Equações 6 e 7.

$$A_{ij} = \left(\frac{r_i^*}{2} + \frac{r_j^*}{2} \right)^{12} \sqrt{\epsilon_i \epsilon_j} \quad (\text{Equação 6})$$

$$B_{ij} = 2 \left(\frac{r_i^*}{2} + \frac{r_j^*}{2} \right)^6 \sqrt{\epsilon_i \epsilon_j} \quad (\text{Equação 7})$$

Onde $r_i^*/2$ é a metade da distância de separação de dois átomos e, ϵ_i está associado ao posicionamento de menor energia para o átomo i em relação ao átomo j e vice versa.

Potencial Eletrostático: Este termo, mostrado pela Equação 8, descreve as interações eletrostáticas clássicas para dois átomos não ligados, com cargas q_i e q_j e separados por uma distância R_{ij} .

$$E_{\text{eletrostático}} = \sum_{ij \text{Eeletrostático}} \left(\frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right) \quad (\text{Equação 8})$$

Também podem ser considerados, dependendo do campo de força utilizado, os valores relativos às ligações de hidrogênio, que são contabilizados, no campo de força AMBER, da seguinte forma:

Ligações de Hidrogênio: É o termo que determina as contribuições importantes das ligações de hidrogênio, e é descrito pela Equação 9.

$$E_{\text{ligações de hidrogênio}} = \sum_{ij \text{Elig.deH}} \left(\frac{C_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{R_{ij}^{10}} \right) \quad (\text{Equação 9})$$

Os valores 12 e 10 foram sugeridos por Linnus Pauling, porém existem outras formas funcionais possíveis de serem usadas.

A energia total corresponde à medida da tensão intramolecular em comparação com uma molécula hipotética de geometria ideal, sendo obtida, ao final, de acordo com a Equação 2.

Mediante o uso dos campos de força, são calculados geralmente a energia potencial e a geometria molecular, além de:

- Frequências vibracionais (infravermelho e raman);
- População de moléculas em diferentes estados;
- Calor de formação, ΔH_f ;
- Entropia das diferentes populações moleculares;

Os diferentes termos da Equação (1) adquirem diversas formas, segundo a complexidade do método (campo de força) e/ou modelo utilizados.

As funções de potencial são transferíveis de molécula a molécula, de forma que, para um tipo de ligação considerado, C-H por exemplo, assume-se que as mesmas características são transferíveis para qualquer molécula (CLARK, 1985).

O propósito, portanto, de um programa de mecânica molecular é determinar a estrutura e energia otimizadas de uma molécula, baseando-se em modelos mecânicos definidos por campos de força. É fundamental, neste método, que a entrada de dados no programa deve definir a estrutura molecular inicial para o composto estudado, com conectividades estabelecidas e ligações estáveis, inviabilizando a utilização da mecânica molecular como método para análise de perfis de reação, por exemplo.

Isto implica em adotar-se, por exemplo, coordenadas para cada um dos átomos assim como definir as ligações entre eles. Quanto às ligações, são definidas atendendo-se estritamente à valência clássica. Por exemplo, para átomos de carbono, podem ser dos seguintes tipos, sp , sp^2 ou sp^3 , sendo cada um definido por um campo de força diferente, que considere as capacidades de formação de ligações químicas específicas, associadas ao seu estado de hibridização.

O primeiro passo nos cálculos de mecânica molecular é, portanto, determinar as distâncias interatômicas, ângulos de ligação e ângulos de torção (diedro) para a geometria inicial. Os valores obtidos serão os utilizados pelas diferentes funções de potencial para calcular uma energia potencial inicial, que corresponde à soma das energias potenciais calculadas para cada ligação, ângulo de ligação, ângulo diedro. (URAY-2001)

Durante a otimização da estrutura, os parâmetros são variados para se encontrar um mínimo de energia correspondente ao ΔH_f do confômero mais estável mais próximo da geometria inicial.

2.5.2 MÉTODOS QUÂNTICOS

Ao contrário da mecânica molecular, os métodos quânticos baseiam-se na solução direta da Equação de Schrödinger. (LEVINE, 1986)

$$\mathbf{H}\Psi = \mathbf{E}\Psi$$

(Equação 10)

Nesta Equação (10) o Hamiltoniano \mathbf{H} é um operador que, aplicado sobre uma função que descreve um dado sistema de partículas, a função de onda Ψ , produz a energia total deste sistema, \mathbf{E} , multiplicada pela própria função de onda.

Nos métodos quânticos, **semi-empírico** e *ab initio*, o tratamento matemático torna-se mais complexo, em comparação à mecânica molecular, associando, principalmente parâmetros quânticos e termodinâmicos às forças de atração e repulsão atômicas.

Uma diferença fundamental entre os métodos semi-empírico e *ab initio* reside no fato de que, no método semi-empírico, adotam-se Hamiltonianos simplificados em relação ao Hamiltoniano molecular exato, sendo adotados dados experimentais ou parâmetros (que possam se ajustar aos dados experimentais), como condições de contorno, para solução das equações. (SZABO & OSTLUND, 1989)

No método *ab initio*, o Hamiltoniano é composto por todos os parâmetros matemáticos associados ao sistema, sem informações prévias derivadas de dados empíricos. Trata-se, portanto, de um método teórico muito mais refinado, porém limitado em função da complexidade matemática, que se torna maior à medida que aumentamos o sistema molecular estudado.

No nível semi-empírico, um dos diversos tratamentos matemáticos disponíveis é o NDDO (Neglect of Diatomic Differential Overlap) que serviu de base para três modificações: o MNDO (Modified Neglect of Diatomic Overlap), AM1 (Austin Model 1) e PM3 (Parametric Method 3) (LAECH, 1998). Os métodos AM1 e PM3 são, de fato, duas modificações do MNDO desenvolvido e modificado em diversos trabalhos por DEWAR *et al.* (1977) e por DAVIS *et al.* (1981). O PM3 é uma reparametrização do AM1 e foi desenvolvido por STEWART (1989).

De fato, cada método tem certas especificações, vantagens e desvantagens, cabendo uma criteriosa análise de seus fundamentos para adotar o melhor sistema de soluções de acordo com as características moleculares a serem analisadas. (DINUR, 1991)

O custo computacional nos métodos *ab initio* ainda o limita a estudos de sistemas moleculares relativamente simples e compostos por poucos átomos, inviabilizando a

utilização desta técnica para estudos teóricos em sistemas biológicos, por exemplo. Sendo assim, o método quântico amplamente aceito e mais difundido para este fim é o semi-empírico, pela sua simplicidade de uso e rapidez na obtenção de resultados, mesmo em sistemas mais complexos.

Independente do método utilizado, a modelagem molecular visa a obtenção de dados em ambiente de simulação computacional, necessitando, portanto, de correlações empíricas para atestar a validade dos resultados teóricos obtidos (BARREIRO *et al*, 1997).

2.5.3 PROGRAMAS E ABORDAGENS UTILIZADAS EM MODELAGEM MOLECULAR

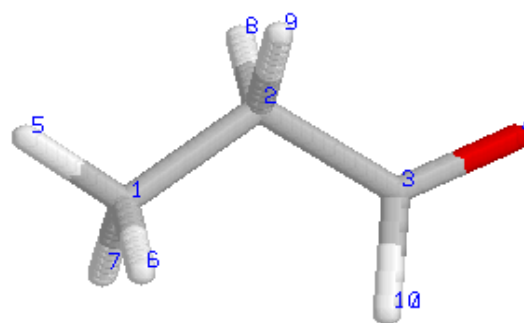
Não é nossa intenção descrever todos os programas e estratégias possíveis de serem utilizadas em modelagem molecular, apenas apresentar algumas considerações e informações úteis.

Independente do método adotado deve-se dispor de um mecanismo capaz de transcrever a estrutura molecular de forma precisa, como arquivo de leitura e entrada de dados. No presente trabalho priorizamos a representação no modelo de coordenadas internas, segundo o qual, adota-se um determinado átomo como centro de um sistema de coordenadas, determinando a posição de todos os outros em relação a este.

Este método é extremamente eficiente, pois permite representar qualquer estrutura como uma matriz de $M \times N$ elementos, onde “M” representa as linhas e “N” as colunas.

Nos arquivos de entrada de dados do MOPAC, as linhas representam os dados relativos aos átomos específicos e nas colunas as relações entre distância, ângulo e diedro entre estes. O cruzamento entre as informações relativas às variações da geometria molecular, é feito a partir de colunas que indicam parâmetros otimizáveis ou não. Assim, no MOPAC, o algoritmo de cálculo é interpretado considerando todos os efeitos associados às posições dos átomos de uma determinada molécula, sendo realizada a otimização de sua estrutura a partir de uma rotina de cálculos iterativos.

Desta maneira, uma molécula como o propanal, por exemplo, pode ser representada da seguinte forma:



Sendo:

Átomo		Distância	*	Ângulo	*	Diedro	*	Relações de Conectividade		
1	C	0.00000	0	0.00000	0	0.00000	0	0	0	0
2	C	1.53315	1	0.00000	0	0.00000	0	1	0	0
3	C	1.51773	1	113.12837	1	0.00000	0	2	1	0
4	O	1.21025	1	123.05098	1	178.3755	1	3	2	1
5	H	1.11450	1	110.91380	1	-179.96574	1	1	2	3
6	H	1.11428	1	111.18812	1	-60.21200	1	1	2	3
7	H	1.11428	1	111.20779	1	60.31198	1	1	2	3
8	H	1.11567	1	108.00989	1	121.75775	1	2	3	1
9	H	1.11564	1	108.10080	1	-121.88793	1	2	3	1
10	H	1.11527	1	117.15415	1	-1.80894	1	2	3	1

A interpretação da matriz se dá pela correlação entre os parâmetros de localização espacial entre os átomos, conforme a descrição abaixo:

- O átomo 1 (C) corresponde ao ponto zero do eixo de coordenadas x,y,z;
- O átomo 2 (C) está a 1.53315 Å de distância de 1;
- O átomo 3 (C) está a 1.51773 Å de distância de 2, fazendo 113.12837 graus de ângulo com 1;
- O átomo 4 (O) está a 1.21025 Å de distância de 3, fazendo 123.05098 graus de ângulo com 2 e 178.3755 graus de diedro com 1;

- As três últimas colunas apresentam as relações de conectividade entre os componentes da matriz;
- Os indicadores “0” e “1” nas colunas assinaladas com * (asterisco) correspondem aos parâmetros que podem ser otimizados na modelagem. O valor “0” (zero) indica um parâmetro que não pode ser analisado ou que não queremos analisar (otimizar), o valor “1” exatamente o oposto.

A otimização de estruturas pelo método semi-empírico, independente do Hamiltoniano utilizado, gera uma matriz de dados permitindo a análise de parâmetros estruturais e geométricos correlacionando-se distâncias, interações, geometrias de estados de transição, etc.

Os cálculos semi-empíricos, realizados pelo programa MOPAC, são desenvolvidos a partir de palavras-chave que definem os parâmetros necessários à otimização da estrutura, bem como as informações desejadas nos arquivos de saída.

Existem, essencialmente, três classe de palavras chave utilizadas pelo MOPAC:

- Aquelas que controlam aspectos substanciais do cálculo, isto é, que afetam o valor final da entalpia de formação do composto;
- Aquelas que determinam quais os dados calculados que deverão ser fornecidos nos arquivos de saída;
- Aquelas que definem as rotinas de cálculo, mas que não afetam diretamente o valor final da entalpia de formação.

As palavras-chave utilizadas neste trabalho, de acordo com as necessidades inerentes a cada situação, estão descritas na seção de Materiais e Métodos.

Os programas de modelagem molecular utilizados foram os seguintes:

- PCMODEL para Windows, ver. 5.13, desenvolvido pela Serena Software, utilizado para a criação das matrizes e pré otimização pelo método da Mecânica Molecular. Este programa utiliza o campo de força MMX.

- Swiss-pdbviewer, ver. 3.7, desenvolvido pela GlaxoSmithKline. Utilizado para análise da estrutura de proteínas.
- Mopac 6.0 (Frank J. Seiler Research Laboratory - United States Air Force Academy). A partir da utilização dos Hamiltonianos MNDO, MINDO/3, AM1 e PM3, desenvolve os cálculos semi-empíricos obtendo uma quantidade significativa de resultados como: variações de entalpia, geometria mais estável, orbitais moleculares, momentos de dipolo, energias de HOMO e LUMO, espectro vibracional, etc. Permite ainda o estudo de reações químicas otimizando geometrias de estados de transição.
- Raswin Molecular Graphics, ver. 2.6, desenvolvido por R. Sale. Este programa é utilizado para visualização e tratamento gráfico tridimensional das estruturas, sendo uma ferramenta bastante útil para análise visual de conformações e interações à distância, permitindo a exportação das estruturas como arquivos de imagem.
- BabelWin, Ver 1.03, desenvolvido por Jeffrey J. Gosper – Brunel University. Aplicativo que converte diferentes tipos de arquivo permitindo a interface entre os diferentes programas de modelagem molecular;
- Chem2Pac, software desenvolvido por Márcio Cyrillo – Unicamp, que combina numa única interface, os programas Rasmol, Mopac e Babel, bem como outros aplicativos úteis.
- PC SPARTAN PRO, desenvolvido pela Wavefunction Inc.

2.5.4 BANCO DE DADOS SOBRE ESTRUTURA DE PROTEÍNAS

O Banco de Dados de Proteínas (PDB, do inglês *Protein Data Bank*) é mantido pelo Laboratório Nacional Brookhaven, Upton, New York, e permite baixar estruturas de proteínas, elucidadas por diferentes métodos, incluindo raios-X e modelagem teórica. Também é possível acessar através de links indicados pelo site (<http://www.rcsb.org/pdb/>)

praticamente todo o ferramental de softwares necessário ao desenvolvimento de pesquisas em Modelagem Molecular.

3 OBJETIVOS

Os principais objetivos deste trabalho são:

- Avaliação da atividade biológica frente a tripanossomatídeos, em particular *Leishmania amazonensis*, para a classe de *N,N'*-difênil 4-R-benzamidas, onde R= H, Me, MeO, NO₂, Cl, Br e CN;
- Estudar a correlação entre a estrutura química e a atividade biológica para esta série de amidas;
- Realizar a modelagem molecular, por homologia, do sítio ativo da enzima Tripanotiona redutase de *Leishmania donovani* e, por extrapolação, considerar o sítio ativo da enzima válido para simulações na espécie *Leishmania amazonensis*;
- Procurar elucidar o possível mecanismo de ação desta classe de compostos frente ao parasito;
- Desenvolver um modelo teórico de interação entre Fármaco \leftrightarrow Receptor, para as amidas testadas, frente a enzima tripanotiona redutase;
- Encontrar correlações matemáticas entre parâmetros teóricos e as atividades biológicas observadas

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE DAS AMIDINAS

As amidinas da serie *N,N'*-difeníl-4-R-benzamidinas foram previamente sintetizadas e caracterizadas por SANTOS (1993).

4.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS

ENSAIOS BIOLÓGICOS ANTI-LEISHMANIA

Para os ensaios anti-leishmania, a *Leishmania amazonensis* (cepa MHMOM/BR/H/LTB0016) foi utilizada na forma de promastigotas em meio Schneider a 25^oC suportado com 10% (v/v) de soro fetal bovino à pH 7,2. Os parasitas foram colocados em câmara de Neubauer e ajustados à concentração de 2.10⁶ promastigotas/mL para os ensaios.

Os derivados amidínicos foram adicionados às culturas na faixa de concentração de 320 a 10µg/mL solubilizados em DMSO (1,6 % v/v). Após 24 h de incubação, os parasitos foram contados e comparados com os controles, sendo a pentamidina utilizada como fármaco de referência. Os testes foram realizados em triplicata.

4.3 MODELAGEM MOLECULAR

CÁLCULOS PARA A MODELAGEM MOLECULAR

Os cálculos teóricos, envolvendo amidinas, sítio ativo (SA) da TR e complexo amidina/SA, desenvolvidos neste trabalho foram realizados utilizando-se os métodos semi-empíricos AM1 e PM3, programa MOPAC (ver 6.0). Os gradientes obtidos para os compostos estudados ficaram todos abaixo de 0,2 kcal/rad ou Å. A criação das matrizes para realização dos cálculos, foi efetuada utilizando-se o programa PCMODEL PARA WINDOWS (ver 5.1).

A adoção do melhor Hamiltoniano, para análise da reação de ataque nucleofílico de um sulfeto sobre anel de epóxido, foi precedida de uma comparação de resultados entre dados da literatura do método *ab initio* com os semi-empíricos AM1 e PM3.

A estrutura cristalográfica da enzima T.R. da *Crithidia fasciculata* foi obtida a partir do *Protein Data Bank*. (BAILEY, 1994).

A seqüência dos aminoácidos da T.R. de *Leishmania donovani* foi obtida através do trabalho de TAYLOR *et al* (1994).

Através do programa Swiss PDB Viewer (V.3.7) e campo de força GROMOS96, modelou-se, por homologia, a estrutura teórica da T.R. da *Leishmania donovani* a partir da estrutura, determinada por difração de raios-X, da mesma enzima de *Crithidia fasciculata* (outro tripanossomatídeo), sendo realizada a substituição dos aminoácidos específicos. A cada alteração de aminoácido, realizada uma a uma, a geometria da enzima foi otimizada.

As abreviaturas dos aminoácidos analisados foi adotada conforme descrito em STRYER (1996) (Anexo 2).

Ao final foram efetuadas 114 alterações de aminoácidos específicos e, finalmente, toda a estrutura foi, de novo, otimizada. As seqüências a seguir demonstram (em amarelo) os aminoácidos que se diferenciam nas respectivas espécies, sendo **1A** pertencente à *Crithidia fasciculata* e **2B** a seqüência para *Leishmania donovani*:

```

1A   1 MSRAYDLVVI GAGSGGLEAG WNAASLHKKR VAVIDLQKHH GPPHYAALGG
2B   1 MSRAYDLVVL GAGSGGLEAG WNAAVTHKKK VAVVDVQATH GPPALVALGG
      *****. *****. *****..***. ***.*.*..* ***...*****

1A  51 TCVNVGCVPK KLMVTGANYM DTIRESAGFG WELDRESVRP NWKALIAAKN
2B  51 TCVNVGCVPK KLMVTGAQYM DLIRESGGFG WEMDRESLCP NWKTLIAAKN
      *****. *****. ** *.*****.*** **.*****..* ***.*****

1A 101 KAVSGINDSY EGMFADTEGL TFHQGWGALQ DNHTVLVRES ADPNSAVLET
2B 101 KVNSINESY KSMFADTEGL SFHMGFGALQ DAHTVVVRKS EDPHSDVLET
      *.*..***.** ..*****.***.*.***** *.***.**.* .**.*.*****
  
```

1A 151 LDTE**Y**IL**L**IAT GSWPQ**H**LG**I**E GD**DL**CITSNE AFYL**DE**APKR **A**LCVGGGY**I****S**
2B 151 LDTE**T**IL**I**IAT GSWPQ**R**LG**V**P GD**EF**CITSNE AFYL**ED**APKR **M**LCVGGGY**I****A**
 *******.******.**** *******.******.** ****.******* *******.*********.*********.**

1A 201 **I**EFAGIFN**A**Y **K**ARGG**Q**VD**L**A YRGD**M**ILR**G**F D**S**ELR**K**Q**L**T**E** Q**L**RANGIN**V**R
2B 201 **V**EFAGIFN**G**Y **K**PCGG**Y**VD**L**C YRGD**L**ILR**G**F D**E**TV**R**Q**E**L**T**K Q**L**GANGIR**R**VR
.*******.*** ***.******.******.** *******.******* ***...*****..*****.** ****.*********.****

1A 251 T**H**ENP**A**K**V**TK N**A**DG**T**R**H**V**F** **E**S**G**A**E**A**D**Y**D****V** VMLAIGRVPR S**Q**T**L**Q**L**D**K**AG
2B 251 T**N**LNP**T**K**I**TK N**E**DG**S**N**H**V**H**F **N**D**G**T**E**E**D**Y**D****Q** VMLAIGRVPR S**Q****A**L**Q**L**D**KAG
 ..**.*****.*****.**** ***.*****..*****.*****.** ***..*****.*****.*********.** ********** ****.*******

1A 301 V**E**VAKNGA**I**K VDAYS**K**T**N**V**D** NIYAIGD**V**T**D** RVMLTPVAIN EGA**A**F**V**D**T**V**F**
2B 301 V**R**TGKNGA**V**Q VDAYS**N**T**S**V**D** NIYAIGD**V**T**N** RVMLT**P**VAIN EGA**C**L**L**E**T**V**F**
 ...******..** *******.*****.**** ************.** ********** ****.....****

1A 351 **A**NKPRATDHT KVACAV**F**SIP P**M**GV**C**G**Y**V**E**E **D**AAK**K**Y**D**Q**V**A VY**E**SSFTPL**M**
2B 351 **G**GKPRATDHT KVACAV**V**SIP P**I**GS**C**G**M**T**E**E **E**AAK**N**Y**E**T**V**A VY**A**SS**F**TPL**M**
..***** ********** ***.*****.*****..**** ***.*******.*****..**** ****.*******

1A 401 HNISGS**T**Y**K**K FM**V**R**I**V**T**N**H**A **D**GEVLGVH**M**L **G**D**S**S**P**E**I**I**Q**S V**A**I**C**L**L**K**M**GAK
2B 401 HNISGS**K**H**K**D FM**I**R**I**I**T**N**E**S **N**GEVLGVH**M**L **A**D**S**A**P**E**I**I**Q**S V**G**I**C****M**K**M**GAK
 *******..*****.** ****.*****.*****.******..** ********** **..*****.******* ***.*****.*******

1A 451 ISDF**Y**N**T**IG**V** HPTSA**E**E**L**C**S** MRTPAY**F**Y**Q**K GKR**V**E**K**I
2B 451 ISDF**H**S**T**IG**V** **H**P**T**S**A****E**E**L**C**S** MRTPAY**F**Y**E**S GKR**L**E**K**L
 *******..******* ********** ************..** *****.******.**

Observação: Ocorre 77% de identidade entre a TR de *Chritidia fasciculata* e a mesma enzima em *Leishmania donovani*.

Em verde são assinalados os aminoácidos que apresentaram interações específicas com as amidinas epoxidadas.

A conversão entre os diferentes tipos de arquivos gerados para entrada/saída de dados e compatibilização entre os programas RasWin, Swiss PDB Viewer e Mopac foram realizados através do programa BabelWin (V.1.03).

Para o desenvolvimento do modelo de interação ligante x receptor foram utilizados os softwares PC SPARTAN-PRO, Swiss PDB Viewer (V.3.7), Chem2Pac e MOPAC (V.6.0), sendo utilizado para os cálculos semi-empíricos o Hamiltoniano PM3.

O tratamento gráfico das estruturas, bem como as análises pertinentes as distâncias interatômicas e forças intermoleculares, foi realizado através do programa Raswin Molecular Graphics, ver. 2.6.

As rotinas de cálculos do método semi-empírico envolveram as seguintes palavras chave no programa MOPAC (V.6.0), utilizadas de acordo com as necessidades específicas de cada análise (STEWART, 1990): **AM1 e PM3; PRECISE; NOLOG; NOINTER; GRAD; EF; HESS=1; CHARGE; MMOK; GEO-OK; SADDLE; XYZ; FORCE; TS; STEP; T=XH (X HORAS).**

Todos os cálculos para variações de entalpia foram realizados pela Equação clássica:

$$\Delta H_r = (\sum H_f \text{ produtos}) - (\sum H_f \text{ reagentes}) \quad \text{Equação:12}$$

Sendo os calores de formação (H_f) dos compostos estudados, calculados pelo método semi-empírico PM3.

As comparações entre as interações dos aminoácidos presentes no Sítio Ativo da TR e as amidinas epoxidadas, foram realizadas a partir da análise das distâncias interatômicas.

A estimativa das interações entre os átomos da biomacromolécula e o ligante, foram obtidas através das distâncias observadas e pela diferença de cargas em interações iônicas e dipolares.

Os cálculos de correlações polinomiais e múltiplas foram realizados com auxílio do programa ORIGIN 6.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIOS BIOLÓGICOS E BUSCA DE CORRELAÇÕES COM EFEITOS ELETRÔNICOS

Os derivados da classe das *N,N'*-difênil-4-R-benzamidinas onde R = H, OMe, Me, NO₂, CN, Cl e Br (Anexo 3), foram ensaiados frente a *Leishmania amazonensis*, na forma evolutiva de promastigotas, apresentando atividade anti-parasitária significativa, especialmente para R = OMe, Br, Cl e NO₂ (CANTO-CAVALHEIRO *et al*, 1997). Em função dos resultados obtidos mostrou-se, ao longo do tempo e em colaboração com o grupo de pesquisa coordenado pela Dra. Leonor Leon do Laboratório de Bioquímica de Tripanossomatídeos (Departamento de Imunologia da FIOCRUZ), importante a investigação do mecanismo de ação dessa classe de substâncias.

Assim, as amidinas tiveram suas estruturas modeladas utilizando o programa MOPAC 6.0 e método semi-empírico AM1, possibilitando o cálculo dos parâmetros eletrônicos teóricos, tais como, momento dipolar (μ), os coeficientes dos orbitais de fronteira HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) e LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) e os calores de formação (ΔH_f).

A Tabela 1 apresenta os valores de DL₅₀ (dose da amidina que mata 50% dos parasitos no ensaio) obtidos para os derivados *N,N'*-difênil-R-benzamidínicos frente a *L. amazonensis*, os parâmetros eletrônicos calculados, bem como os valores de constantes empíricas de Hammett dos substituintes, σ_p , as constantes duais considerando os efeitos eletrônicos de ressonância e indutivo σ_I , σ_R , respectivamente, e de Swain e Lupton, F e R (BASTOS-CENEVIVA,1984), que foram utilizados para a investigação das possíveis correlações entre a atividade anti-leishmania e os efeitos eletrônicos.

Tabela 1: Valores de DL₅₀ (μM), μ, H_f, energias de HOMO e LUMO e constantes dos substituintes de Hammett, duais e Swain e Lupton.

R	DL₅₀ (μM)	μ	H_f (kcal/mol)	Energia do HOMO (eV)	Energia do LUMO (eV)	σ_p	σ_I	σ_R	F	R
Br	22	2,53	115,43	-8,68	-0,46	0,26	0,44	-0,16	0,72	*
OMe	29	1,57	72,21	-8,54	-0,19	-0,28	0,27	-0,42	0,54	*
NO₂	44	6,31	114,48	-8,94	-1,26	0,81	0,65	0,15	1	1
Cl	55	2,40	103,36	-8,67	-0,40	0,24	0,46	-0,18	0,72	-0,24
CN	390	5,47	141,37	-8,74	-0,64	0,70	0,56	0,08	0,9	0,71
Me	444	1,85	102,34	-8,54	-0,20	-0,14	-0,05	-0,13	-0,01	-0,41
H	772	1,98	110,33	-8,59	-0,13	0	0	0	0	0

Obs.: * Valores desconhecidos

Os resultados obtidos para a atividade anti-leishmania foram interessantes, particularmente para os derivados onde R = OMe (DL₅₀=29μM) e R = Br (DL₅₀ = 22μM), apesar de menos ativos do que a pentamidina (DL₅₀=0,46μM). A pentamidina apresenta uma série de efeitos colaterais (CROFT, 1999) e é altamente tóxica aos macrófagos, células do sistema imunológico que hospedam os parasitos. Ao contrário, as benzamidinas, apresentaram baixa toxicidade contra os macrófagos matando apenas os parasitos em seu interior com exceção da amidina bromo-substituída (TEMPORAL *et al*, 2002).

A Figura 14 apresenta os valores de DL₅₀ (μM) em função da natureza dos substituintes.

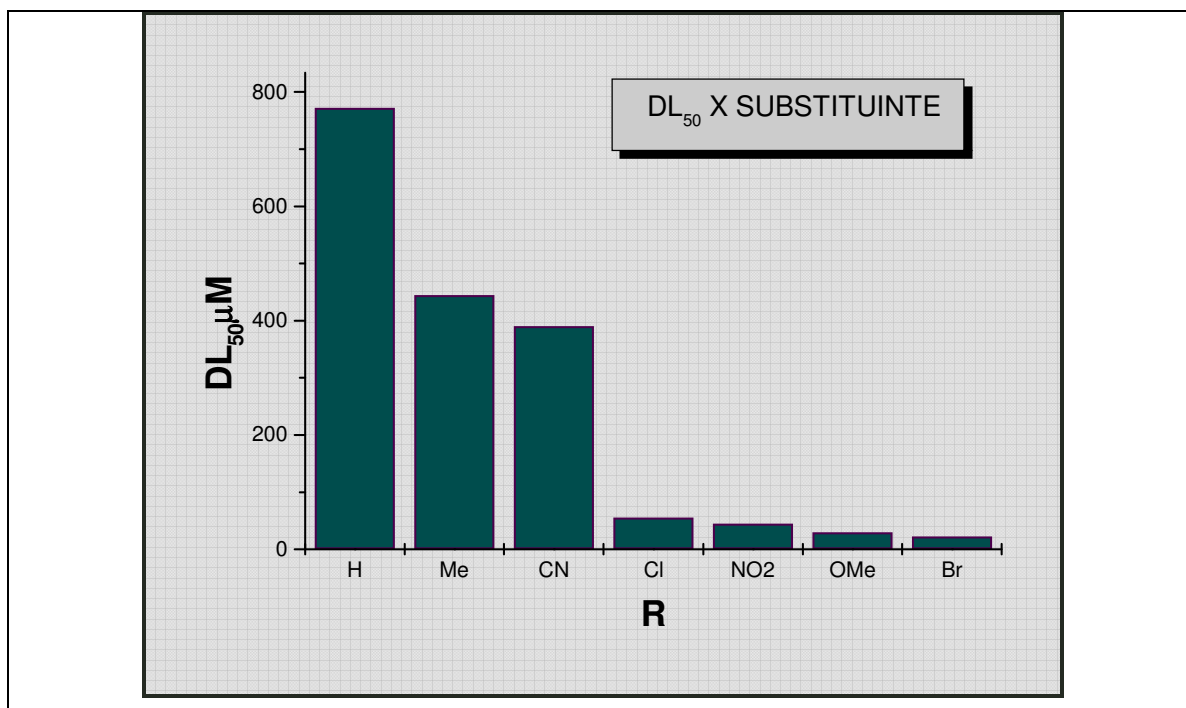


Figura 14: Valores de DL₅₀ (µM) das *N,N'*-difenil-4-R-benzamidas ensaiadas frente a *Leishmania amazonensis*

Os valores obtidos através dos cálculos teóricos para os parâmetros μ , Hf, HOMO e LUMO foram correlacionados com os parâmetros eletrônicos tabelados, σ_p , σ_I e σ_R , F e R, observando-se boas correlações polinomiais de segundo grau para:

$\sigma_p \times \mu \Rightarrow$	$\mu = (1,845 \pm 0,083) + (1,751 \pm 0,354)\sigma_p + (4,702 \pm 0,551)\sigma_p^2$ $(r=0,997; r^2=0,995; sd=0,169; n=7)$
-----------------------------------	---

$F \times \mu \Rightarrow$	$\mu = (1,897 \pm 0,258) - (7,749 \pm 1,364)F + (12,377 \pm 1,461)F^2$ $(r=0,987; r^2=0,975; sd=0,317; n=7)$
----------------------------	--

$\sigma_i \times \text{LUMO} \Rightarrow$	$\text{LUMO} = (-0,136 \pm 0,068) + (1,329 \pm 0,530)\sigma_i - (4,462 \pm 0,900)\sigma_i^2$ $(r=0,975; r^2=0,951; sd=0,108; n=7)$
---	--

Estas análises nos permitiram avaliar a confiabilidade dos cálculos teóricos realizados, pois são correlacionados valores teóricos (calculados pelo método AM1), com constantes empíricas.

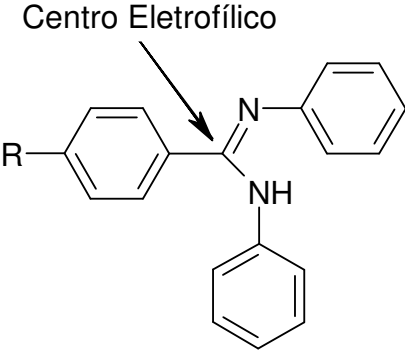
No entanto, a correlação entre os parâmetros eletrônicos calculados com os valores de DL₅₀ obtidos experimentalmente, não forneceram relações satisfatórias indicando que outros efeitos estariam contribuindo para a atividade biológica, tais como o efeito estérico e/ou hidrofóbico. (BASTOS, 1984).

Além dos baixos valores para os coeficientes de correlação, a susceptibilidade aos efeitos eletrônicos apresentou-se insatisfatória, indicando pouca sensibilidade a esses parâmetros, corroborando com a hipótese de que outros fatores deveriam estar envolvidos.

Esses resultados mostraram claramente a necessidade pela busca de novas propostas teóricas, para o melhor entendimento da correlação entre a estrutura química e a atividade biológica das *N,N'*-difênil-4-R-benzamidinas frente a *Leishmania amazonensis*.

Estudos teóricos demonstraram que o carbono amidínico, independente dos substituintes, é o centro mais eletropositivo nesta classe de amidinas, apresentando a distribuição de cargas indicada na Tabela 2, segundo o Hamiltoniano AM1:

Tabela 2: Cargas calculadas sobre os carbonos amidínicos.

R	Centro Eletrofílico	Carga sobre o carbono amidínico
Br		+0.1701
OMe		+0.1809
NO ₂		+0.1558
Cl		+0.1723
CN		+0.1650
Me		+0.1725
H		+0.1708

A partir destes resultados, foi formulada a hipótese de que o provável mecanismo envolvido na atividade anti-leishmania poderia incluir a inibição da enzima tripanotona redutase.

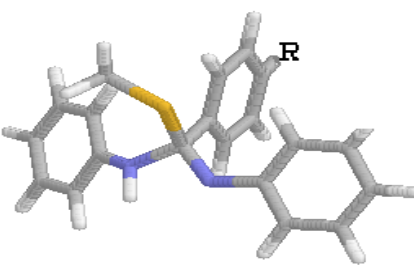
O estudo da estrutura da biomacromolécula tripanotona redutase, a partir de dados da literatura (BORGES, 1995) indicou a possibilidade de que a interação dessas substâncias ocorresse via ataque nucleofílico do grupamento sulfeto do resíduo Cis 52 (presente no sítio ativo da enzima), ao carbono amidínico.

Tal hipótese é apoiada pela elevada carga positiva, observada no carbono amidínico do composto com maior atividade biológica, a amidina metóxisubstituída.

Para este estudo foram simuladas reações de adição de um metilsulfeto (CH_3S^-) ao carbono amidínico, determinando-se as variações de entalpia para estas adições, bem como analisando-se as estruturas conformacionais originadas após a adição do sulfeto.

Estudos teóricos visando avaliar a viabilidade termodinâmica de um ataque nucleofílico diretamente ao carbono amidínico demonstraram, no entanto, que os valores entálpicos relativos à esta adição não seriam, em geral, favoráveis. (Tabela 3).

Tabela 3: Comparações entre valores de DL_{50} e ΔH_r (kcal.mol⁻¹) para a adição do sulfeto ao carbono amidínico da série de N,N'-difenilbenzamidinas.

	R	DL₅₀ (μM)	H_f (kcal.mol ⁻¹)	ΔH_r (kcal.mol⁻¹) Adição sulfeto ao carbono amidínico
	Br	22	115,43	+26,94
OMe	29	72,21	+10,27	
NO₂	44	114,48	-0,18	
Cl	55	103,36	+10,17	
CN	390	141,37	+28,72	
Me	444	102,34	+32,17	
H	772	110,33	+ 31,20	

A partir desses resultados, observou-se não haver nenhuma correlação entre as atividades biológicas e os valores das entalpias de reação, além do que, apenas o nitro derivado apresentou uma ligeira variação de entalpia favorável, contra um valor demasiado elevado para os compostos mais ativos, que foram as amidinas bromo e metóxisubstituídas, respectivamente.

Além do mais, dados da literatura sugerem que o sítio ativo da TR (BAILEY, 1993) apresenta pequena mobilidade em termos conformacionais, cabendo ao substrato o ajuste conformacional para o correto funcionamento da atividade catalítica da enzima. Pudemos também observar, que as dimensões do sítio ativo da TR não permitem a aproximação

especial deste centro eletrofílico ao sulfeto da Cis 52, gerando um fator estérico que pode ser considerado definitivo para descartar esta possibilidade. Esta análise foi realizada a partir das distâncias interatômicas entre os aminoácidos próximos à Cis 52 comparando-se com a conformação da amidina após a adição do sulfeto.

Apesar de um único resultado (amidina nitro substituída) indicar que o ataque nucleofílico sugerido não é uma hipótese a ser descartada, a simples observação das conformações e distâncias interatômicas entre os aminoácidos do sítio ativo, permitiu-nos deduzir não ser este o principal meio de inativação da enzima.

A partir da constatação de que não foi observada correlação direta entre os valores de ΔH_f , calculados, e a atividade anti-leishmania (correlacionando-se com os valores de DL_{50}) pela indicação da inviabilidade entálpica de um ataque nucleofílico diretamente sobre o carbono amidínico, a hipótese de que a forma ativa capaz de inibir a enzima não seja, de fato, a amidina diretamente, mas sim um possível derivado metabólico da mesma, foi investigada.

Dados da literatura suportam a hipótese de que uma enzima da classe das Citocromo P_{450} , a Cit P_{450} epoxidase, presente em tripanossomatídeos, seria capaz de promover a epoxidação de qualquer um dos anéis aromáticos existentes nas N,N' -difeníl-4-R-benzamidinas estudadas, permitindo-nos a proposta de ser este derivado epoxidado a forma ativa frente a tripanotiona redutase (TR) (JOSEPHY, 1997; MONTELLANO, 1995).

A Figura 15 ilustra a nossa proposta básica representando a formação de um anel aromático epoxidado, pela Cit P_{450} epoxidase.

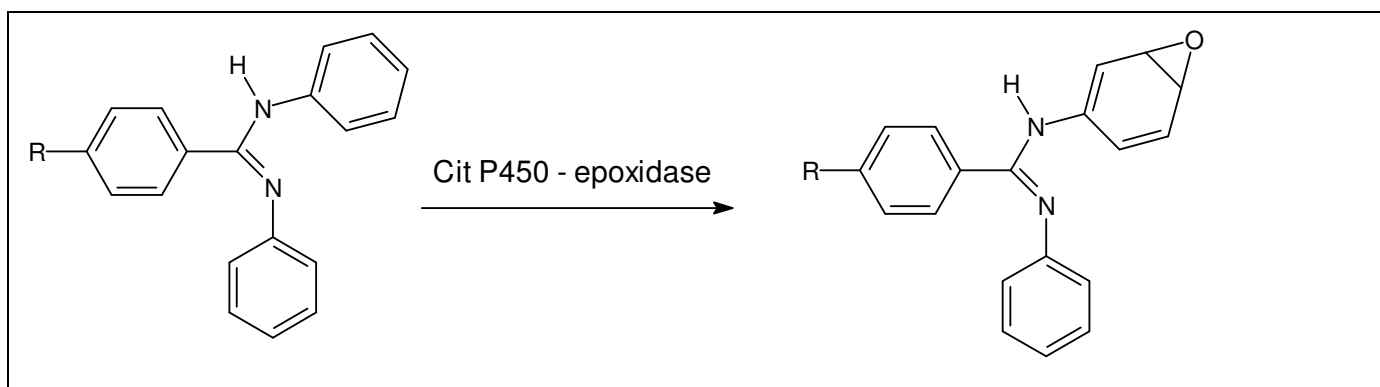


Figura 15: Exemplo de epoxidação de anel aromático em N,N' -DIFENIL-4-R-BENZAMIDINAS

O mecanismo de adição de sulfeto, ao anel epoxirânico, foi então proposto uma vez que, possivelmente, os derivados epoxidados seriam capazes de inativar a enzima a partir

de uma ligação covalente com a cisteína 52 presente no sítio ativo da TR e fundamental para a atividade da mesma.

5.2 MODELAGEM DAS *N,N'*-DIFENIL-4-R-BENZAMIDINAS PARA CONSTRUÇÃO DO MODELO DE INTERAÇÃO LIGANTE / RECEPTOR

A partir da hipótese sugerida no item anterior buscamos avaliar quais seriam os Hamiltonianos mais adequados para este tipo de estudo. Elegemos os Hamiltonianos AM1 e PM3 para análise.

No intuito de encontrar Hamiltoniano que melhor se adaptaria à reação em questão, buscou-se na literatura dados de estudos *ab-initio* envolvendo aberturas de anéis de epóxidos por ataques de sulfeto (GRONERT, 1995; LAITINEN, 1998).

Na ausência de dados envolvendo sistemas com esta natureza, optamos por comparar a abertura de um anel tioepóxido, e verificar, por analogia, a viabilidade do método, para ataques envolvendo anéis de epóxido.

SCOTT (1995) demonstrou que a entalpia da reação descrita na Figura 16, bem como a energia do estado de transição, obtidas através de cálculos *ab-initio*, desenvolvidos utilizando-se o programa GAUSSIAN92, foram, respectivamente, $\Delta H_r = -14,3 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para o produto de adição e $\Delta H_{ET} = 5,1 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para o estado de transição.

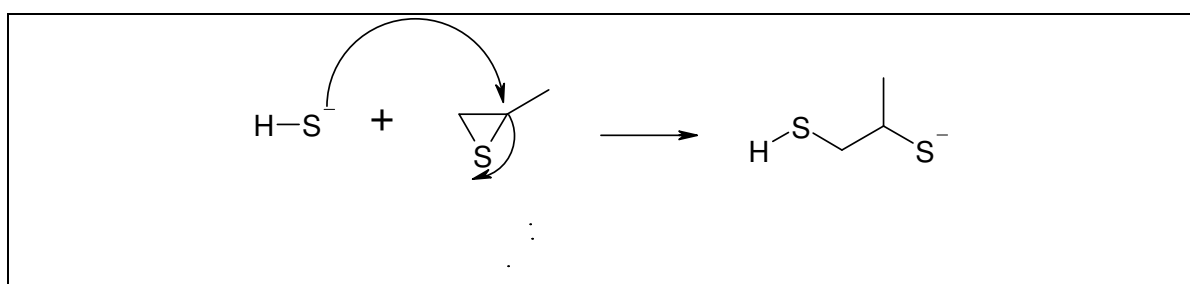


Figura 16: Ataque de sulfeto de hidrogênio a anel tioepóxido

A distância calculada por SCOTT entre os átomos de enxofre e o centro eletrofílico, no estado de transição, foram de 2,54 Å para o sulfeto nucleófilo e de 2,06 Å para o enxofre do anel tioxirano.

Os cálculos desenvolvidos com os Hamiltonianos AM1 e PM3 apresentaram os resultados indicados na Tabela 4.

Tabela 4: Comparações entre valores de ΔH_f (teórico) calculados por AM1 e PM3, respectivamente

Hamiltonianos	ΔH_f (kcal.mol ⁻¹)	ΔH_f (kcal.mol ⁻¹)
	Aduto	Estado de transição
AM1	-29,34	0.038
PM3	-29,19	1.98

A Figura 17 detalha a estrutura definida do Estado de Transição desta reação, calculada pelo método PM3 envolvendo o hidrosulfeto e o anel tioepóxido.

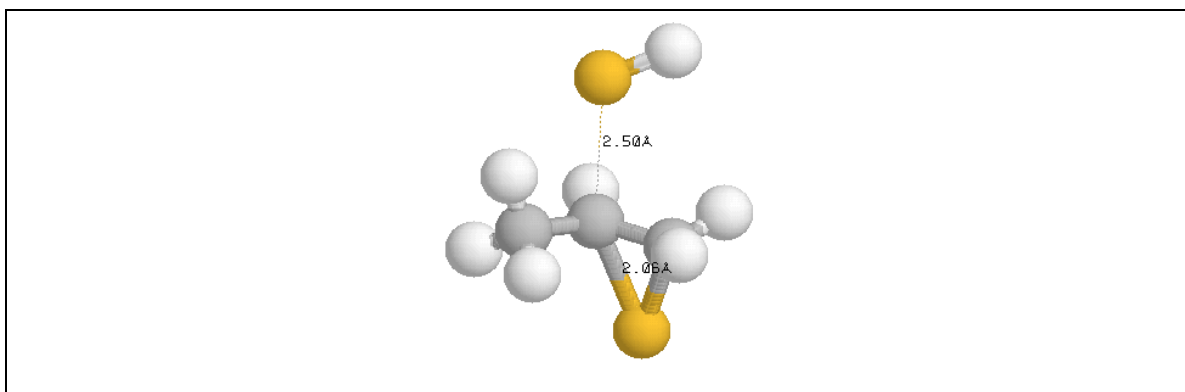


Figura 17: Estado de transição da reação envolvendo adição nucleofílica de um sulfeto à um anel tioxirano

Comparando-se os valores de calor de formação obtidos pelo método PM3, bem como as distâncias interatômicas observadas, com os relatados por Scott, chegamos à conclusão de que o melhor Hamiltoniano para estudos envolvendo adições nucleofílicas de ânion sulfetos, é o PM3.

Também foi simulada a abertura de um anel epoxirânico, correspondente a um benzeno epoxidado, pela adição nucleofílica de um metil sulfeto, através de cálculos usando o PM3, conforme a Figura 18.

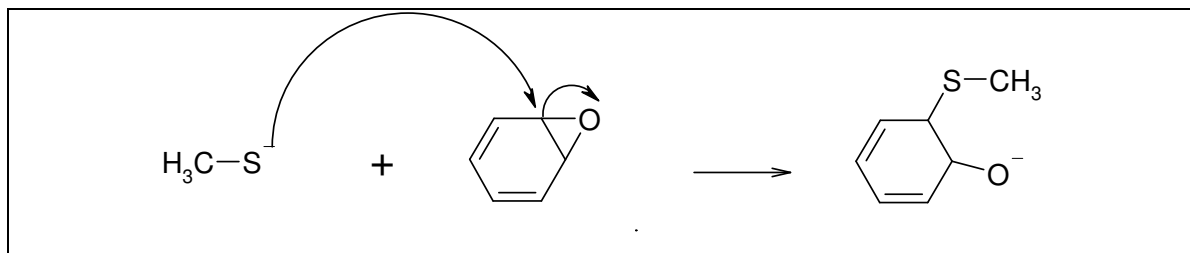


Figura 18: Exemplo de ataque nucleofílico de sulfeto a anel epoxidado

Os cálculos para as reações de abertura do anel pelo metil-sulfeto foram realizados utilizando-se as palavras-chave POINT=M e STEP=N, e indicando a aproximação do sulfeto ao anel epoxirânico. Após o ataque nucleofílico, o sistema foi otimizado livremente, apresentando $\Delta H_r = -17,96 \text{ kcal.mol}^{-1}$. O estado de transição também pôde ser calculado apresentando $\Delta H_r = 7,98 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

Tais resultados indicam que o processo é favorecido termodinamicamente.

Através dos estudos teóricos, buscando verificar a viabilidade termodinâmica deste processo nas amidinas *N,N'*-dissubstituídas, analisamos as possibilidades de epoxidação em todas as posições possíveis dos anéis aromáticos amidínicos, gerando 63 estruturas diferentes, sem considerar, no entanto, os possíveis tautômeros.

A Figura 19 representa as 63 possibilidades, resultantes das combinações entre estas nove estruturas e sete grupamentos R distintos, de diferentes derivados epoxidados:

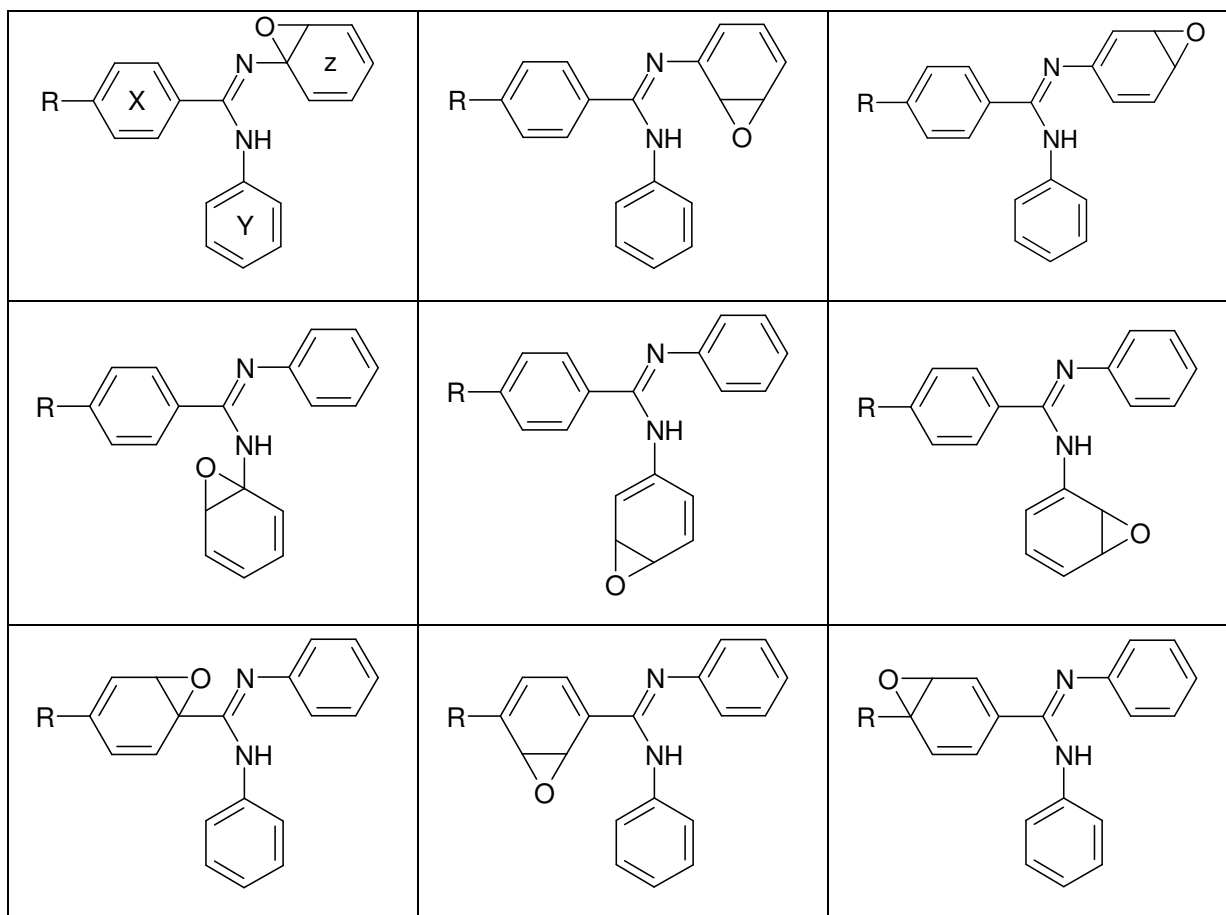


Figura 19: Combinações possíveis entre posições epoxidadas e substituintes (R= NO₂,Br,Cl,MeO,CN,Me,H), gerando, no total, 63 estruturas diferentes. A primeira estrutura apresenta o sistema de identificação dos anéis utilizado neste trabalho.

Foram então analisadas as 126 reações da adição nucleofílica citada, determinando-se todos os valores possíveis de ΔH_r , conforme ilustrado no exemplo a seguir:

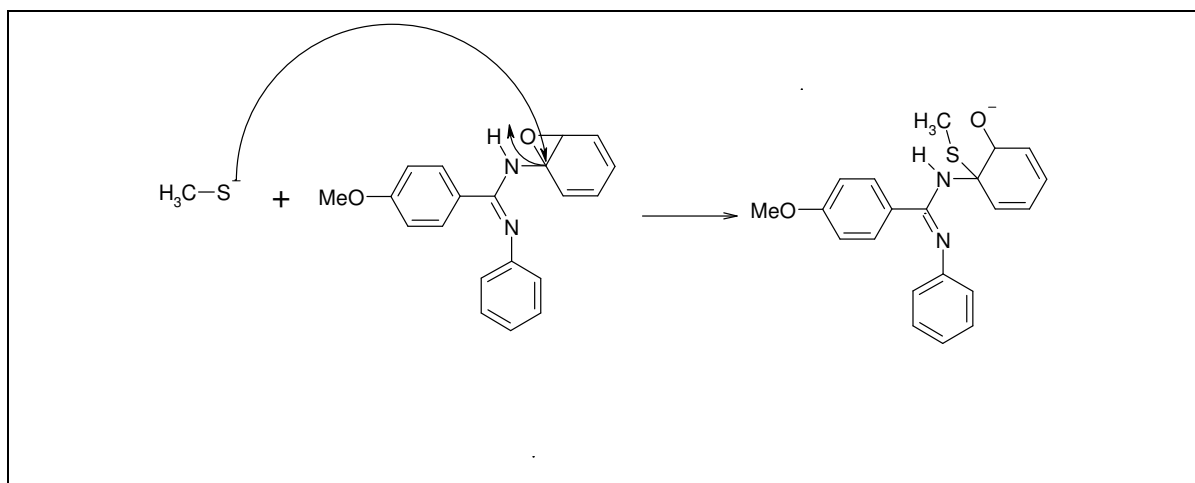


Figura 20: Ataque de sulfeto ao composto Moyo12 (consultar Anexo 4)

O ataque de um ânion sulfeto foi então avaliado para cada uma das 63 estruturas diferentes, simulando a abertura do anel epóxido nas duas possíveis direções. (Anexo 4)

O Anexo 5 apresenta uma tabela com todos os valores calculados bem como as 126 estruturas relacionadas.

Para cada um dos derivados selecionamos aqueles que apresentaram a maior viabilidade entálpica para o processo em questão definindo-se, por comparação e relevância, a estrutura com maior potencial para a construção de um modelo envolvendo o sítio ativo da enzima TR. É interessante destacar que, dentre as 126 estruturas propostas, a que apresentou uma das melhores viabilidades entálpicas e se mostrou mais promissora foi, exatamente, um metoxi-derivado, que, conforme descrito por GOMES-CARDOSO *et al* (1998), é reconhecidamente inibidor da TR.

A Figura 21 representa a estrutura escolhida para a construção do modelo proposto:

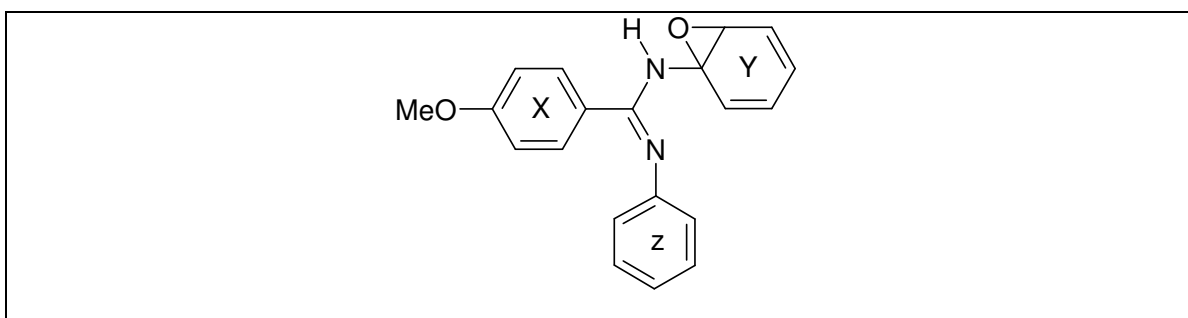


Figura 21: Composto Moyo (consultar Anexo 4)

A entalpia de reação (ΔH_r) calculada para a adição ilustrada na Figura 22, foi de $-43,32 \text{ kcal.mol}^{-1}$, indicando forte tendência entálpica de ocorrência.

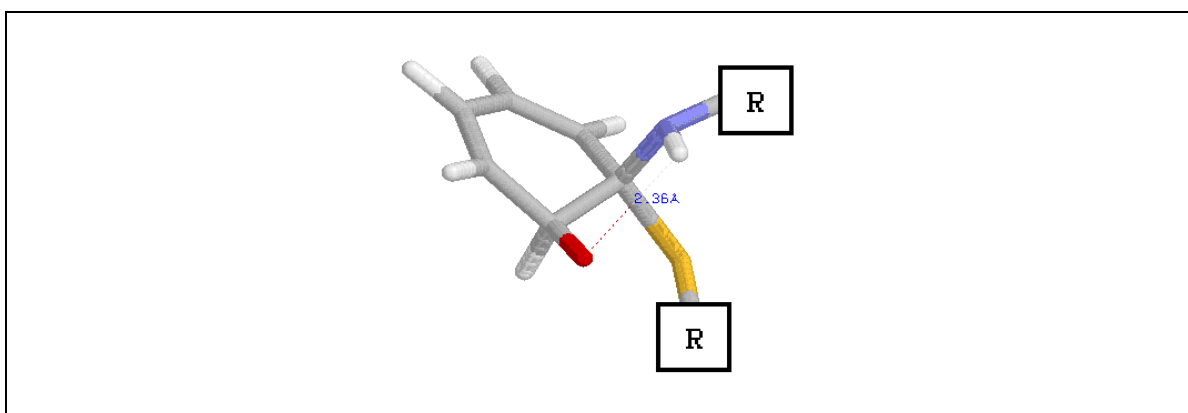


Figura 22: Ligação de hidrogênio intramolecular entre O⁻ e H-N após a abertura do anel epóxido

Avaliando-se a abertura do anel epóxido podemos observar a formação de um ligação de hidrogênio, intramolecular, entre a hidrogênio amínico e o ânion O^- .

Esta interação favorece a abertura do anel epóxido estabilizando a carga negativa do oxigênio, sendo, provavelmente, um dos efeitos de estabilização mais relevantes desta estrutura. Tal constatação direcionou as análises posteriores no sentido de identificar possíveis interações semelhantes entre aminoácidos presentes no sítio ativo da TR e o complexo formado pela adição do sulfeto da Cis 52 ao anel epóxido.

Todos os valores de ΔH_r para os 126 casos analisados foram termodinamicamente favoráveis, apresentando variações exotérmicas de entalpia que oscilaram entre $-16,17 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e $-126,48 \text{ kcal.mol}^{-1}$, respectivamente, nos seguintes casos ilustrados a seguir.

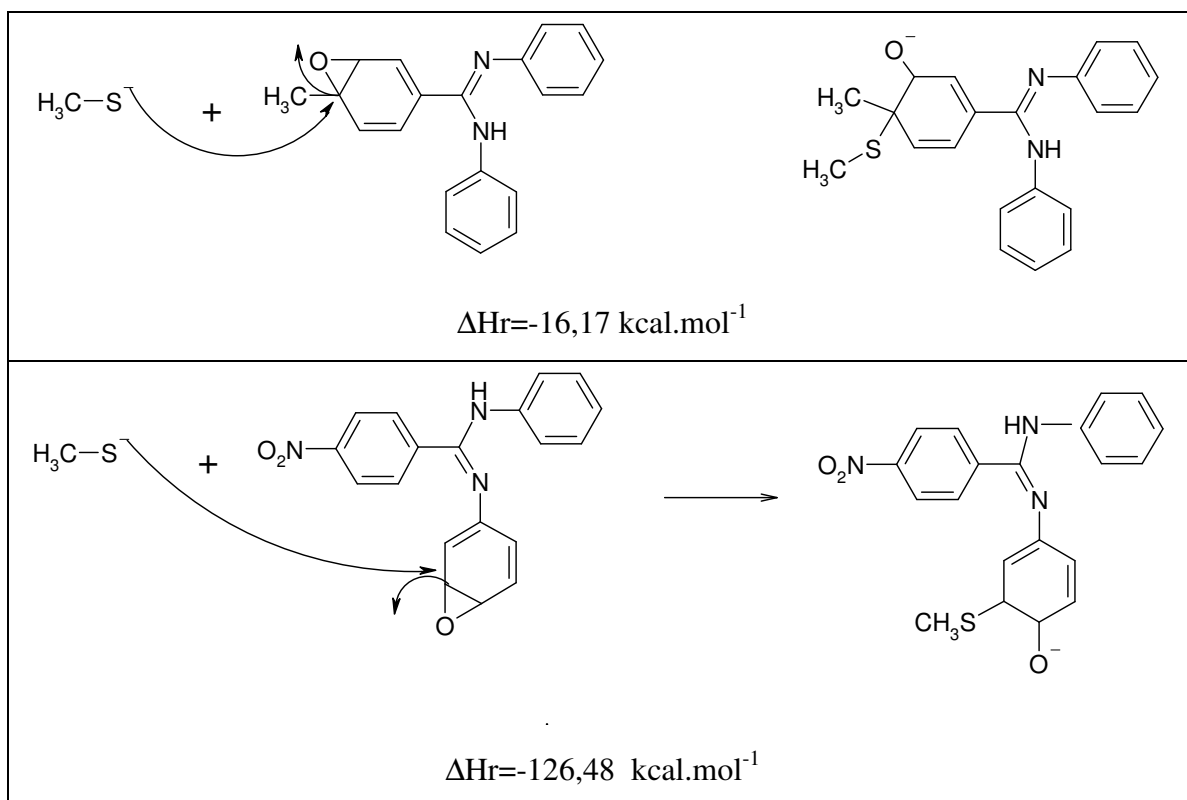


Figura 23: Valores máximo e mínimo de ΔH_r nas reações de adição do sulfeto ao anel epoxirana para os 126 compostos avaliados

Apesar do melhor resultado corresponder a um nitro derivado, escolhemos, em função de apresentar a mais promissora atividade biológica observada, o derivado metóxi-substituído.

A amidina metóxi-substituída foi então modelada dentro do sítio ativo da TR, visando estabelecer quais seriam as outras interações possíveis entre o composto e as cadeias laterais dos aminoácidos presentes no sítio ativo, além da adição covalente do sulfeto da Cis 52.

5.3 CONSTRUÇÃO DO MODELO DE INTERAÇÃO LIGANTE X RECEPTOR

5.3.1 CONSTRUÇÃO DO MODELO TEÓRICO, POR MODELAGEM E HOMOLOGIA, DA ENZIMA TRIPANOTIONA REDUTASE DE *Leishmania donovani*

A melhor fonte disponível para obtenção de estruturas tridimensionais de proteínas, na atualidade, é o site do *Protein Data Bank*. No entanto, a única estrutura disponível para “download” da enzima Tripanotiona Redutase, é a da espécie *Crithidia fasciculata*, também um tripanossomatídeo.

O sequenciamento dos aminoácidos da TR de *Leishmania donovani* é relatado por Taylor *et al* (1994). Neste mesmo trabalho, os autores apresentam as correlações de homologia entre TRs de diferentes espécies de tripanossomatídeos em comparação com a glutationa redutase, presente em seres humanos. Os organismos considerados são: *Crithidia fasciculata*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma congolense* e *Trypanosoma brucei*.

Consideramos, respaldados pela literatura, que descreve uma total homologia dos aminoácidos do sítio ativo da TR entre diferentes espécies de *Leishmania*, que a construção de um modelo de inibição da TR pelas, *N,N'*-difetil-4-R-benzamidinas, estudado para *L. donovani* poderia ser válido para *L. amazonensis*, ou mesmo para qualquer outra espécie de *Leishmania*.

A Tripanotiona Redutase é uma enzima de estrutura quaternária, apresentando dois domínios e contendo cerca de 490 aminoácidos por domínio. O sítio ativo (SA) desta enzima possui pouca liberdade conformacional, conforme relatado por BAILEY. (1993), bem como uma grande homologia entre as diferentes espécies de tripanossomatídeos.

A partir do trabalho de MARTIN (1994), e com a utilização do programa Swiss PDB Viewer (V.3.7), modelou-se a estrutura teórica da TR da *Leishmania donovani* a partir da

estrutura, determinada por difração de raio-X, da mesma enzima existente na *Crithidia fasciculata*, por substituição dos aminoácidos específicos e otimização por mecânica molecular (campo de força GROMOS96).

O tempo computacional do cálculo foi de 48 hs, e o total de homologia entre estas duas enzimas é de cerca de 77%.

HUNTER *et al* (1992) descreve que o sítio ativo da TR apresenta grande homologia entre as diferentes espécies de tripanossomatídeos, em contraste com a GR, sinalizando, dentre outros aspectos relevantes, a importância dos aminoácidos Cis 52 e Cis 57, envolvidos diretamente na redução da Tripanotiona oxidada.

Uma análise criteriosa foi realizada comparando-se a disposição espacial dos aminoácidos presentes no sítio ativo das duas enzimas, constatando-se que o mesmo permaneceu, com os aminoácidos do sítio ativo, sem alteração de suas posições.

A Figura 24 representa a estrutura da tripanotiona redutase da *Leishmania* obtida por modelagem teórica a partir de homologia baseada na estrutura cristalográfica da TR da *Crithidia fasciculata*. Destacamos o substrato e as moléculas de FAD (em rosa).

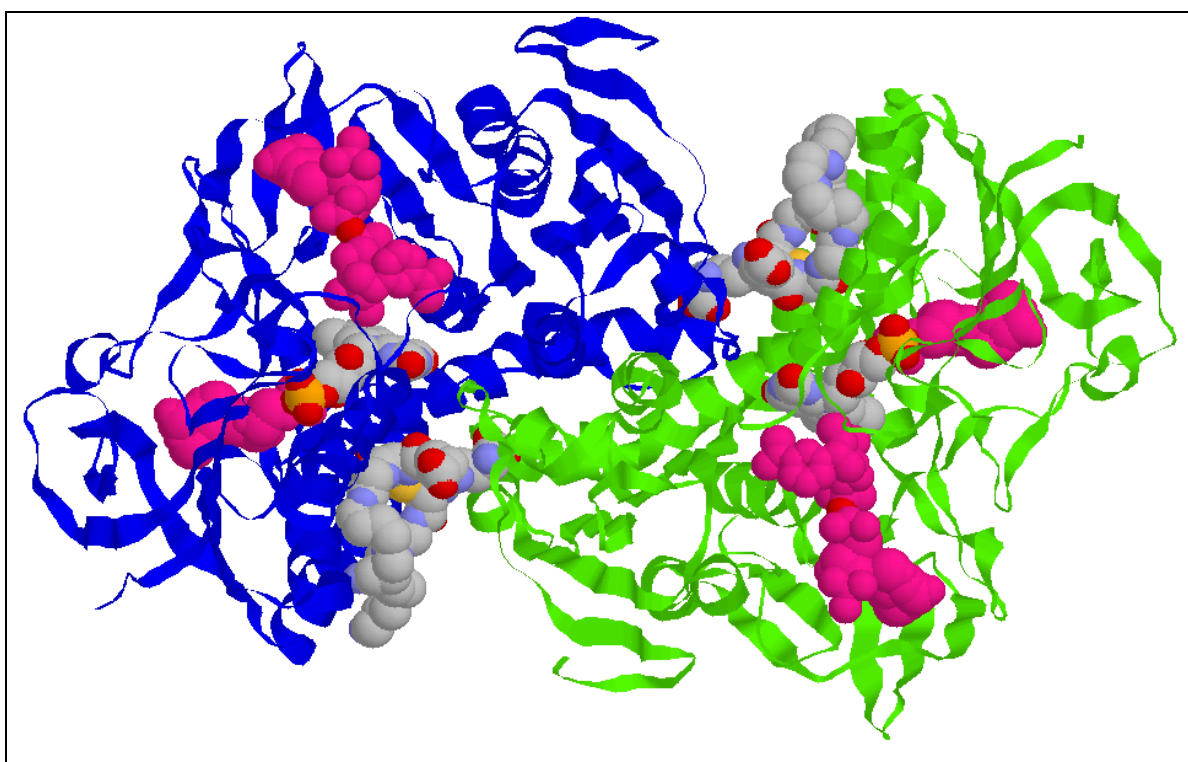


Figura 24: TR redutase com dois domínios, representados em verde e azul, e seus ligantes

Procedemos à seleção do sítio ativo da enzima a partir da distância de 8,0 Å do substrato, com auxílio do programa Rasmol, ver. 2.6., obtendo a seguinte estrutura, contendo 46 aminoácidos selecionados:

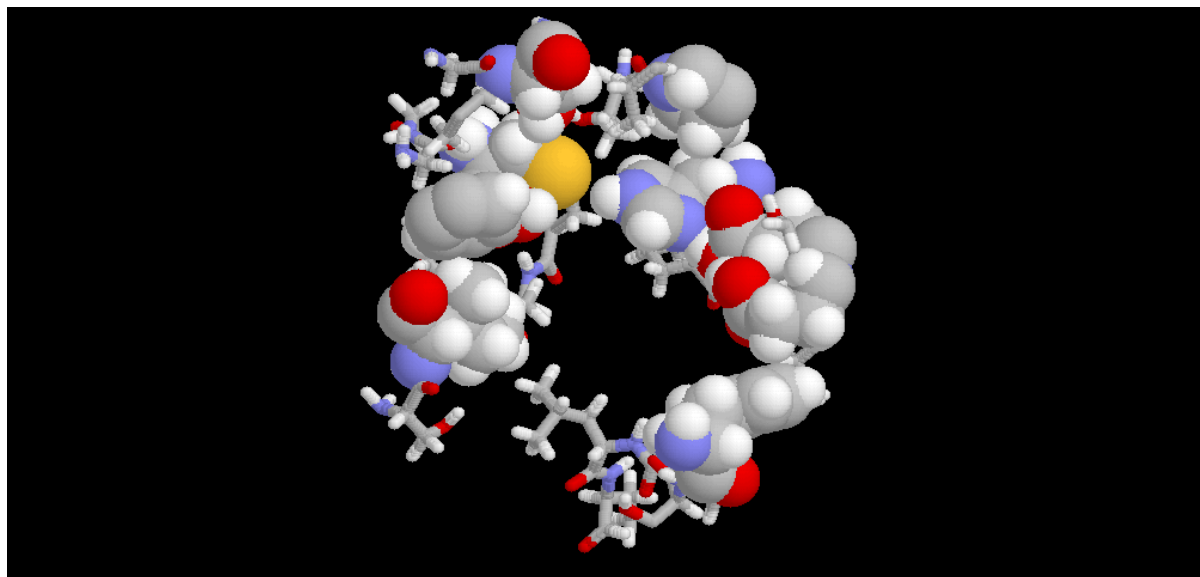


Figura 25: Sítio ativo recortado, com destaque para os aminoácidos Cis 52, Val 53, Val 58, Ileu 106, Pro 336, His 461, Pro 462, Glu 466 e Glu 467, que mais tarde se mostraram fundamentais ao modelo proposto

A tabela a seguir descreve os aminoácidos selecionados.

Tabela 5: 46 aminoácidos distantes até 8,0 Å do substrato da TR

Gli 13	Cis 52	Met 113	Val 460
Ser 14	Val 53	Fen 114	His 461
Gli 15	Cis 57	Asp 116	Pro 462
Gli 16	Val 58	Tre 335	Tre 463
Leu 17	Ser 105	Pro 336	Ser 464
Glu 18	Ile 106	Ile 339	Ala 465
Ala 19	Asn 107	Fen 366	Glu 466
Gli 20	Glu 108	Tre 397	Glu 467
Trp 21	Ser 109	Pro 398	Cis 469
Asn 22	Tir 110	Leu 399	Ser 470
Gli 49	Lis 111	Met 400	
Gli 50	Ser 112	Gli 459	

Uma vez definidos os aminoácidos capazes de interagir diretamente com o substrato da enzima, iniciamos a construção do modelo teórico de interação Inibidor/SA da TR

5.3.2 CONSTRUÇÃO DO MODELO TEÓRICO DE INIBIÇÃO DA TRIPANOTONA REDUTASE DE *Leishmania* sp. A PARTIR DE ADIÇÃO NUCLEOFÍLICA AO DERIVADO EPOXIDADO

Consideramos, respaldados pela literatura, que descreve uma total homologia entre os aminoácidos do sítio ativo da TR entre espécies de *Leishmania*, que a construção de um modelo de inibição da TR pelas, *N,N'*-difênil-4-R-benzamidas, proposto para *L. donovani* poderia ser válido para *L. amazonensis*, ou mesmo para qualquer outra espécie de *Leishmania*.

O modelo de partida foi obtido pela inserção do composto Moyo12 (através do programa PC SPARTAN PRO) entre os aminoácidos presentes no sítio da enzima, distantes 8,0 Å do substrato da mesma. Procurou-se posicionar o anel epoxidado próximo à Cis 52, conforme estrutura mostrada na Figura 26.

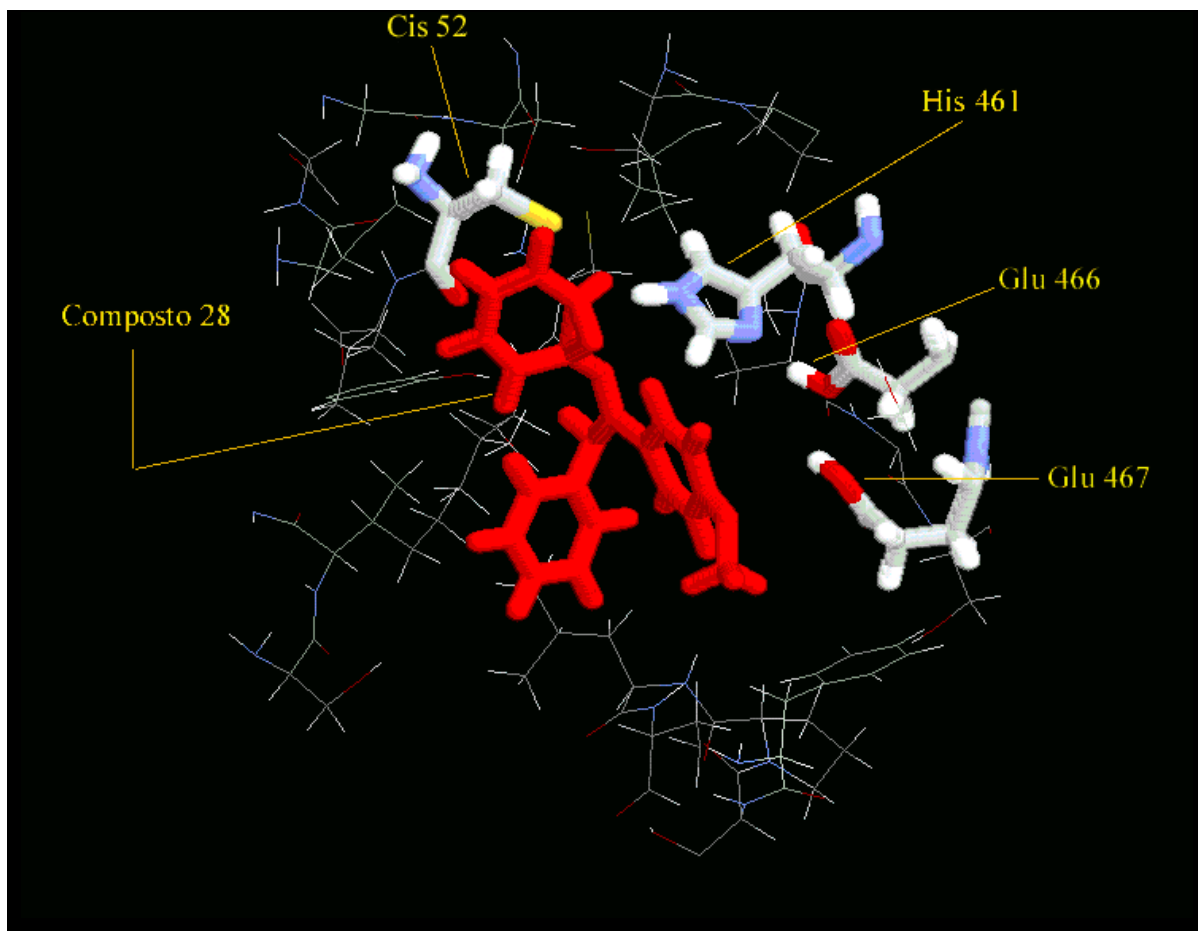


Figura 26: Composto Moyo12 posicionado entre os aminoácidos presentes no sítio ativo da TR. Destaque para os aminoácidos Cis 52, His 461, Glu 466 e Glu 467, que se mostraram fundamentais para estabilizar o aduto e interagir com o grupamento R

Dos 46 aminoácidos isolados do sítio ativo da enzima, apenas 6 (Glu 18, Glu 108, Tir 110, His 461, Glu 466 e Glu 467) possuem caráter ácido ou básico, podendo variar seus estados de protonação. Optamos por considerar, como modelo inicial, àquele que continha o ácidos protonados, bem como Tir 110 (em função do seu elevado pK_a), e a His 461 desprotonada.

Uma vez definidos os estados de protonação dos aminoácidos presentes e capazes de interação com a amidina epoxidada, o arquivo foi convertido, através do programa BabelWin, do formato PDB para a matriz característica, em coordenadas internas, do MOPAC 6.0.

Após esta primeira abordagem, procedemos a uma série de análises visando definir a quantidade de aminoácidos relevantes ao modelo pretendido, baseados no princípio de que, por possuir um sítio ativo com baixa liberdade conformacional (BAILEY,1993), apenas

aqueles com possibilidade de interação direta com o composto Moyo12 deveriam ser considerados.

O procedimento adotado consistiu em se retirar, um a um, os aminoácidos mais distantes da amidina epoxidada, otimizando-se o sistema passo a passo, até chegarmos a um modelo final contendo 11 aminoácidos.

A tabela a seguir descreve os onze aminoácidos selecionados:

Tabela 6: Os onze aminoácidos selecionados capazes de interações diretas com as amidinas

Ser 14	Leu 399
Cis 52	His 461
Val 53	Pro 462
Val 58	Glu 466
Tir 110	Glu 467
Fen 366	

O procedimento seguinte correspondeu à otimização do modelo livre, fixando-se, no entanto, os átomos envolvidos nas ligações peptídicas, e optando-se pelos mencionados estados de protonação e desprotonação dos aminoácidos presentes.

O aminoácido Glu 467 foi criteriosamente analisado, uma vez que, para qualquer um dos sete ligantes analisados, caberia a este as interações específicas com o grupamento R substituinte, sendo, portanto, um provável parâmetro de distinção entre as diferentes atividades biológicas observadas.

Foram analisadas duas possibilidades: o modelo com Glu 467 protonado e desprotonado, respectivamente.

Retirou-se então a amidina dos sítios ativos protonado e desprotonado, modelando-os para obtenção dos seus calores de formação que foram iguais a $-671,32 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e $-689,77 \text{ kcal.mol}^{-1}$, respectivamente.

As Figuras 27 e 28 ilustram os dois modelos de SA com Glu 467 protonado e desprotonado, respectivamente.

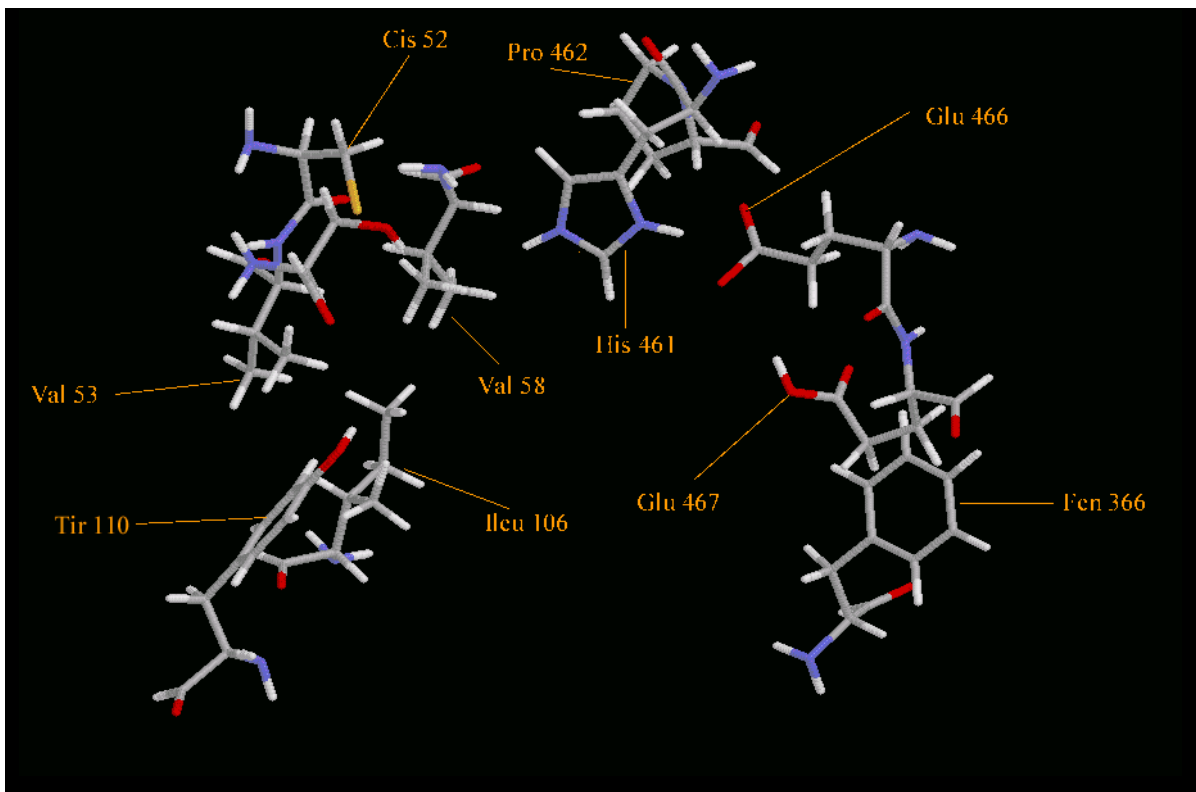


Figura 27: Sítio ativo protonado com os aminoácidos que interagem com o composto Moyo12 destacados

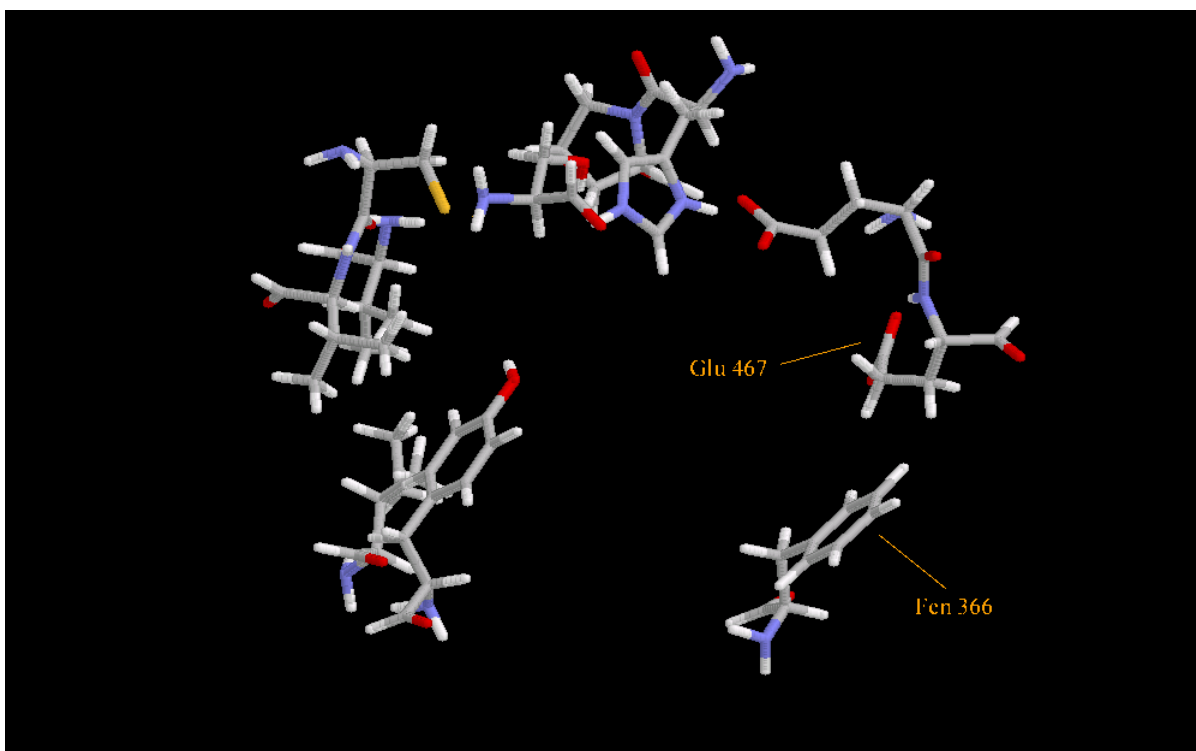


Figura 28: SA desprotonado com destaque para as mudanças de conformação de Glu 467 e Fen 366

Nos dois modelos são observadas diferenças significativas de conformação entre os aminoácidos Glu 467 e Fen 366 para os sítios protonado e desprotonado, respectivamente. A Figura 29, a seguir, representa uma sobreposição dos sítios ativos protonado (em verde) e desprotonado (vermelho), onde pode-se observar que, de fato, não ocorrem mudanças significativas na maioria dos aminoácidos presentes, com exceção da, já sinalizada, alteração das posições de Glu 467 e Fen 366:

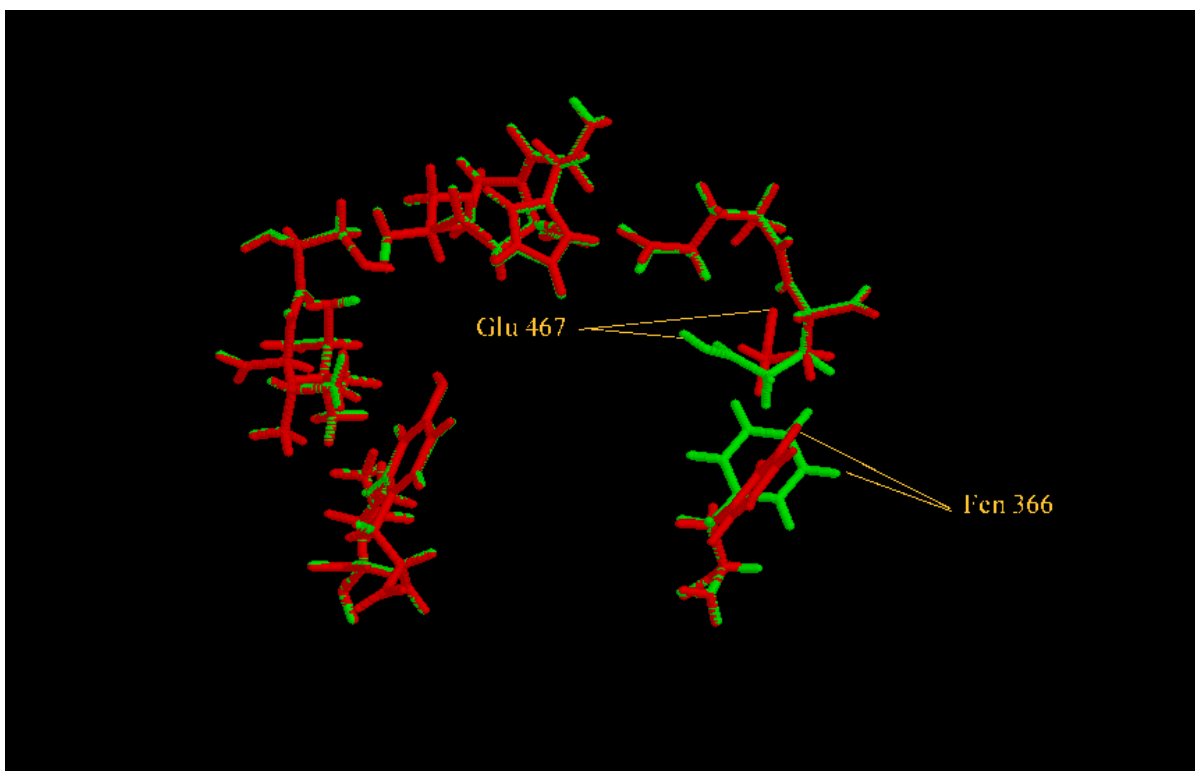


Figura 29: Sobreposição dos sítios ativos protonado (verde) e desprotonado (vermelho) com destaque para os aminoácidos que sofreram grandes diferenças de conformação.

Observamos que, no sítio ativo desprotonado, o grupo carboxilato de Glu 467 realiza uma ligação de hidrogênio estável com o grupamento NH da ligação peptídica entre os aminoácidos Glu 467 e Glu 466. Além disso, nas quatorze estruturas otimizadas, em nenhum caso o grupamento carboxilato interage com os substituintes das amidinas epoxidadas, nos levando a concluir que a única possibilidade viável de interação ocorre via Glu 467 protonado, direcionando a construção do modelo para esta condição.

A avaliação da variação da entalpia de interação (ΔH_{int}), favorável, após a inserção da amidina (28), ao sítio protonado, indica que esta possui afinidade estrutural com a cavidade do sítio ativo, não existindo barreiras de energia que impeçam a acomodação da

estrutura à cavidade. O valor de ΔH_{int} para a formação do complexo enzima / inibidor, neste caso, foi de $-20,06 \text{ kcal.mol}^{-1}$, indicando que as forças intermoleculares são estáveis e capazes de neutralizar eventuais forças de repulsão.

Vale destacar a migração espontânea do próton de Glu 466 para His 461 (Figura 30), pois, posteriormente, pode-se observar que esta migração é fundamental para estabilizar o aduto.

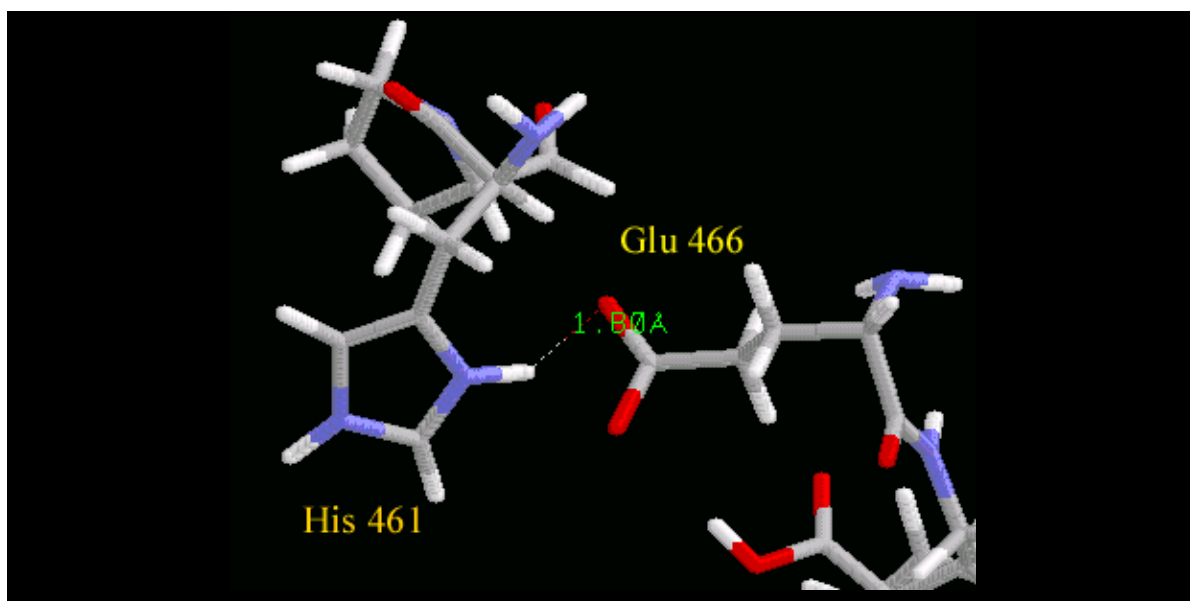


Figura 30: Migração observada do próton de Glu 466 para His 461. Observa-se a distância de $1,80 \text{ \AA}$ entre o doador e o acceptor de próton

As Figuras 31, 32, 33 e 34 representam quatro visões, de diferentes pontos de vista, do derivado epoxidado no sítio ativo da TR, sem a adição nucleofílica do sulfeto ao anel epoxirânico.

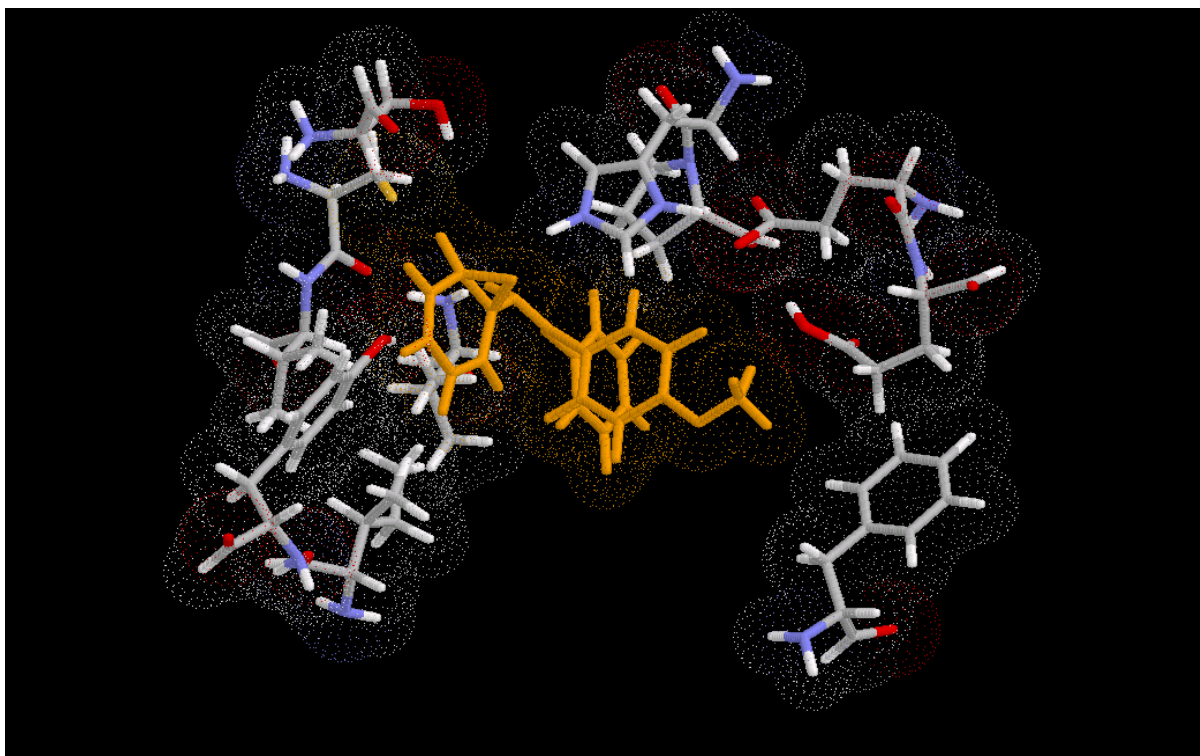


Figura 31: Modelo de interação, sem formação do aduto, do composto Moyo12 (em laranja) no SA da TR (visão 1).

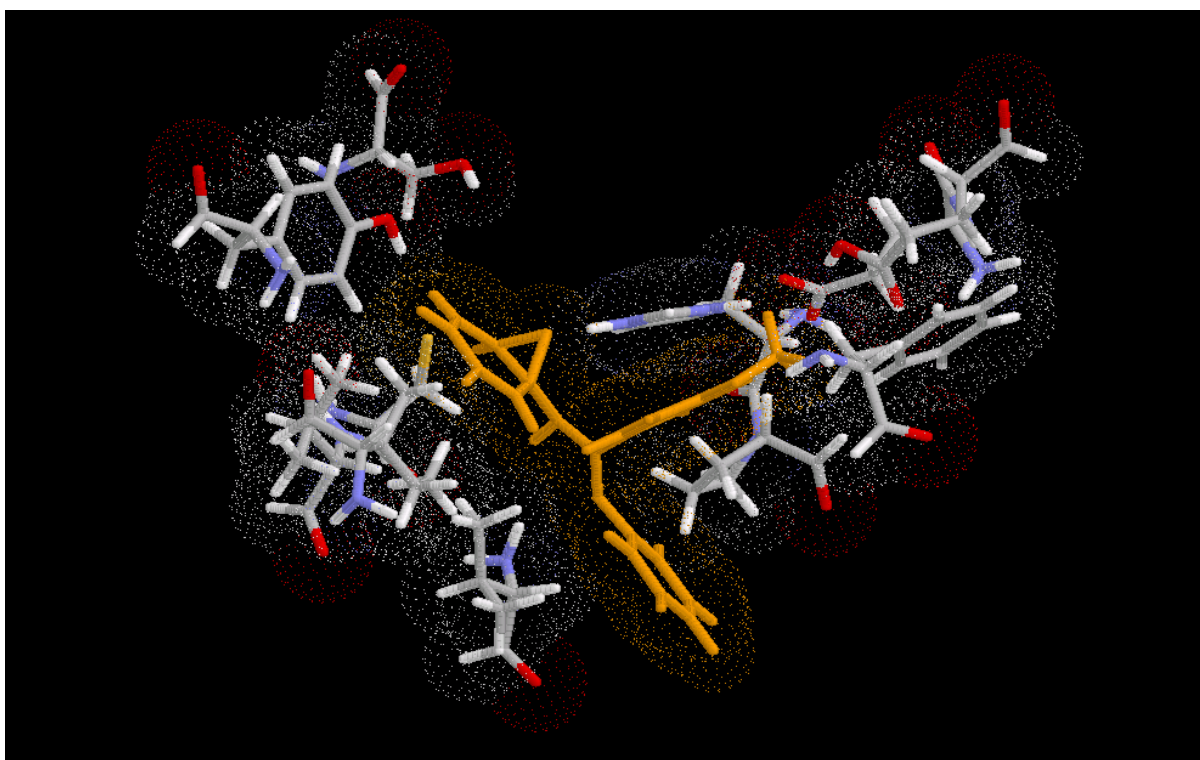


Figura 32: Modelo de interação, sem formação do aduto, do composto Moyo12 (em laranja) no SA da TR (visão 2)

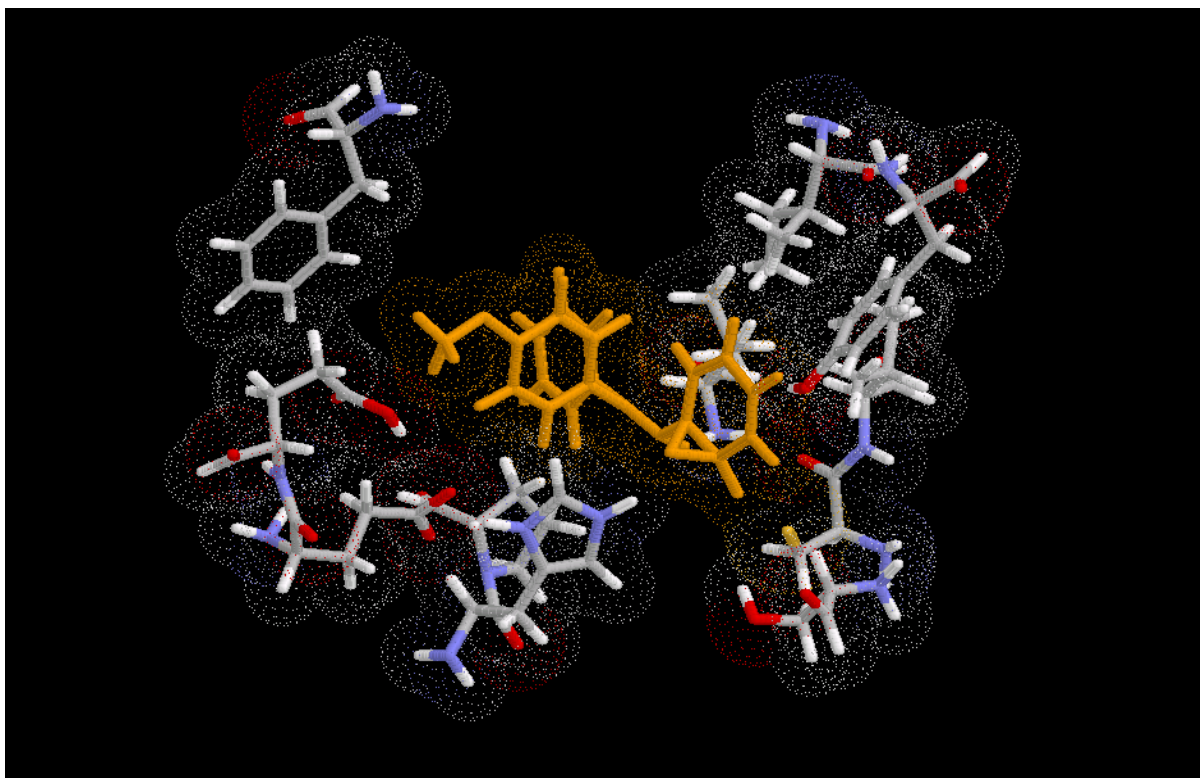


Figura 33: Modelo de interação, sem formação do aduto, do composto Moyo12 (em laranja) no SA da TR (visão 3)

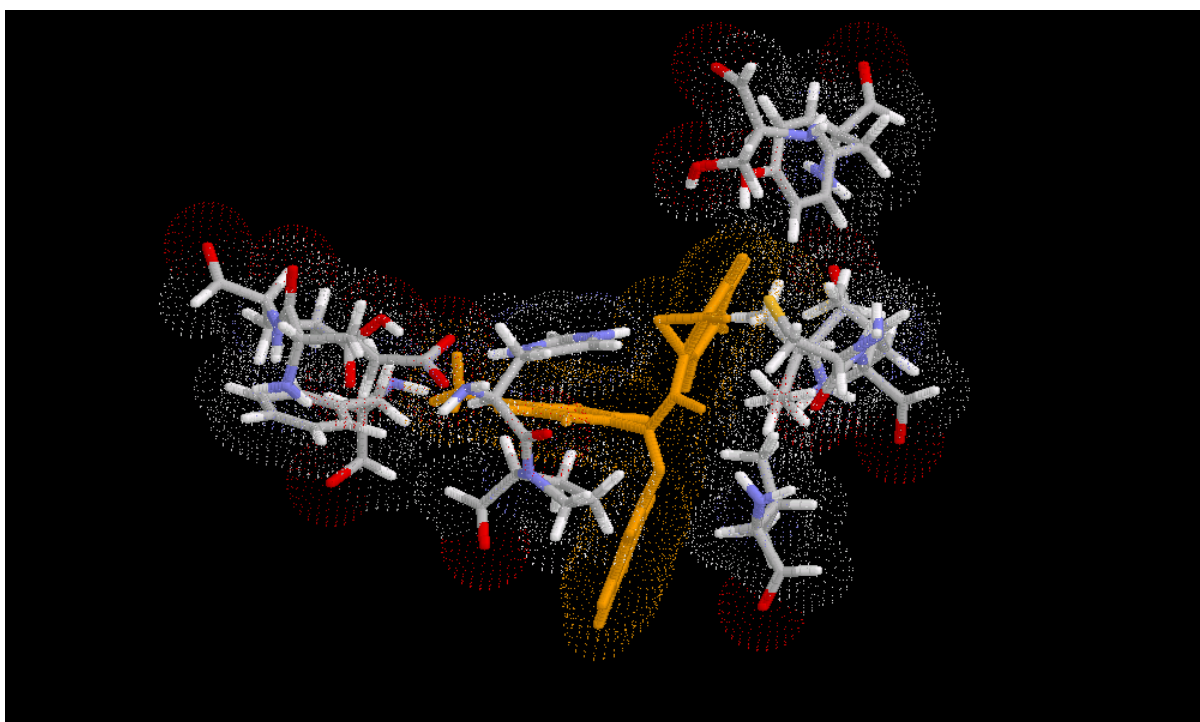


Figura 34: Modelo de interação, sem formação do aduto, do composto Moyo12 (em laranja) no SA da TR (visão 4)

A figura a seguir apresenta uma possível interação dipolar entre Glu 467 e o grupamento metoxila bem como uma ligação de hidrogênio entre este e Glu 466.

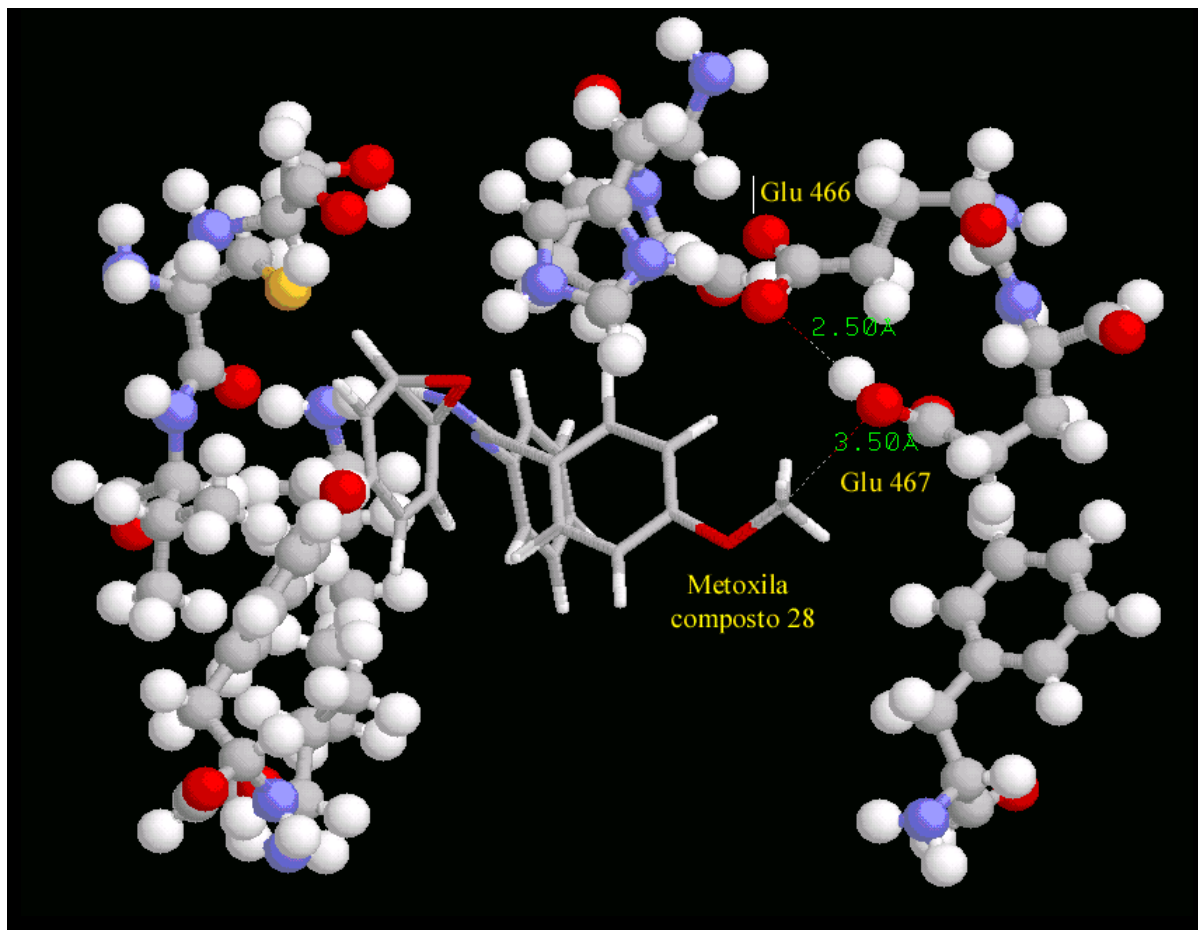


Figura 35: Possíveis interações entre Glu 467 com Glu 466 e MeO do composto Moyo12

O aminoácido Glu 467 interage por dipolos entre o oxigênio da hidroxila do ácido carboxílico e o grupo metoxila do composto Moyo12, além de realizar uma ligação de hidrogênio entre esta mesma hidroxila e o grupamento carboxilato de Glu 466. As distâncias observadas estão assinaladas em verde na estrutura. Destacamos estas interações, em particular, pois as mesmas não serão observadas quando modelamos a estrutura com Glu 466 desprotonado.

Tais observações, associadas às outras que discutiremos adiante, nos levaram à conclusão de que é, de fato, viável a possibilidade de inibição competitiva desta classe de amidinas frente à tripanotona redutase. Em outro tópico, mais adiante, demonstraremos os modelos de interação envolvendo a ligação covalente entre o anion sulfeto de Cis 52 e o anel epoxirânico.

A Figura 36 representa a estrutura do composto Moyo12 retirada do sítio ativo da enzima. As regiões em destaque indicam os locais onde ocorreram as principais interações. A numeração dos átomos corresponde à da matriz:

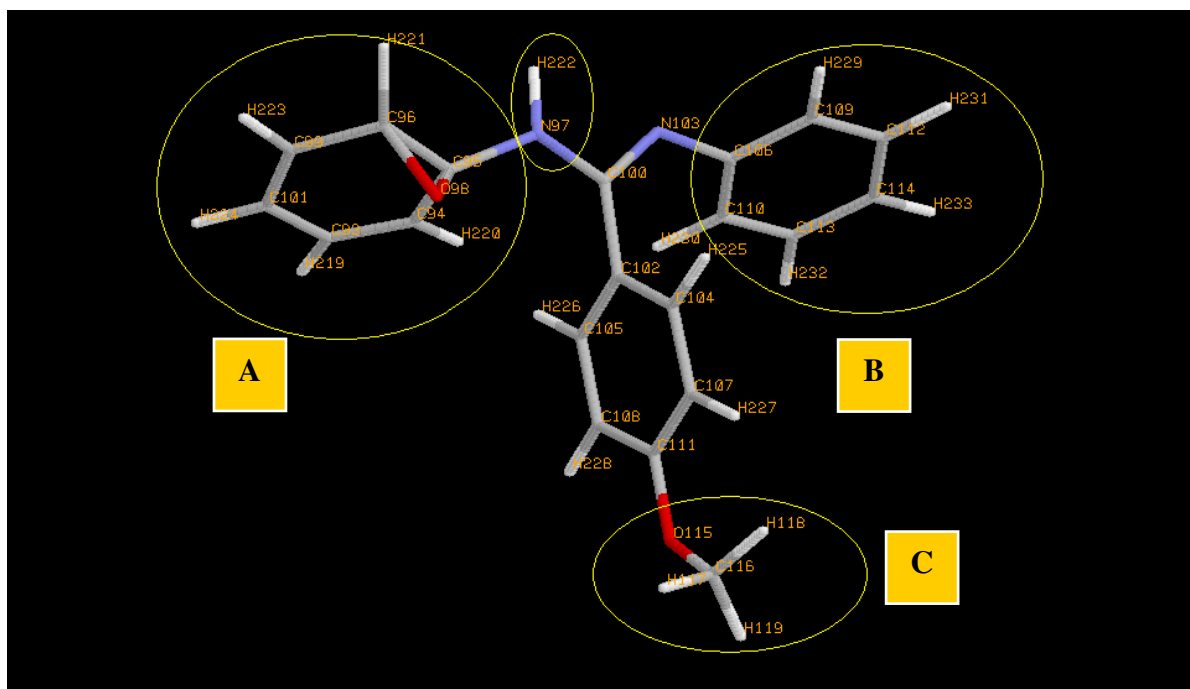


Figura 36: Regiões do composto Moyo12 que apresentaram interações com os aminoácidos do SA da TR

- Região A: apresentou interações importantes entre o anel e os aminoácidos Cis 52, Val 53, Val 58, Tir 110, His 461;
- Região B: apresentou interações importantes entre o anel e os aminoácidos Val 58 e Pro 462;
- Região C: também apresentou interações com Pro 462, porém a mais relevante e indicativa de uma provável correlação entre o grupamento R e as diferenciadas atividades biológicas encontradas foi a interação entre R (na região C) e Glu 467 protonado.
- O NH amidínico (também em destaque) realiza interação de ligação de hidrogênio com a carbonila da ligação peptídica de Cis 52 e Val 53, que se intensificou após a formação do aduto

Este padrão de interações foi comum aos quatorze sistemas estudados.

O aminoácido Fen 366, embora não apresente interações específicas com o composto amidínico, desempenha uma função de manter estabilizada a posição da cadeia lateral de Glu 467, protonado, possibilitando a este a interação com o substituinte R.

A Tabela 7 apresenta as variações de entalpia observadas para a formação do complexo não covalente para as sete amidinas epoxidadas estudadas:

Tabela 7: Valores de DL_{50} , ΔH_f das amidinas epoxidadas, ΔH_f do complexo SA X Ligante e ΔH_{int}

ΔH_f do sítio ativo livre com 11 aminoácidos = -671.32 kcal.mol⁻¹				
R	DL_{50} (μM)	ΔH_f (Kcal.mol⁻¹) Amidina epoxidada	ΔH_f (Kcal.mol⁻¹) Ligante / Sítio ativo (Sem ligação com Cis 52)	ΔH_{int}(Kcal.mol⁻¹)
Br	22	107,75	-582.46	-18,89
OMe	29	61,42	-629.96	-20,06
NO₂	44	92,22	-599.13	-20,03
Cl	55	93,21	-597.12	-19,01
CN	390	135,56	-555.82	-20,06
Me	444	90,19	-600.34	-19,21
H	772	99,67	-590.73	-19,08

Embora estes resultados sinalizem uma viabilidade entálpica para a formação do complexo, observa-se, no entanto, que não há correlação entre as variações de entalpia calculadas e as atividades biológicas relatadas.

A etapa seguinte correspondeu ao estudo da adição nucleofílica.

A reação para adição do sulfeto foi modelada, passo a passo, aproximando-se o nucleófilo do carbono epoxirânico calculando-se uma etapa de cada vez.

Uma quantidade elevada de arquivos foi gerada, sendo necessário, na maioria das vezes, interferir indicando determinadas mudanças de diedros (dentre outras medidas) para que o MOPAC direcionasse de forma correta o eixo da reação, pois etapas de equilíbrio pouco usuais (porém calculadas como viáveis termodinamicamente), interromperam os

cálculos sem o resultado esperado, que seria a abertura do anel epóxido pelo ataque do sulfeto.

A Figura a seguir ilustra uma das estruturas calculadas como estável, porém sem validade para o modelo desejado.

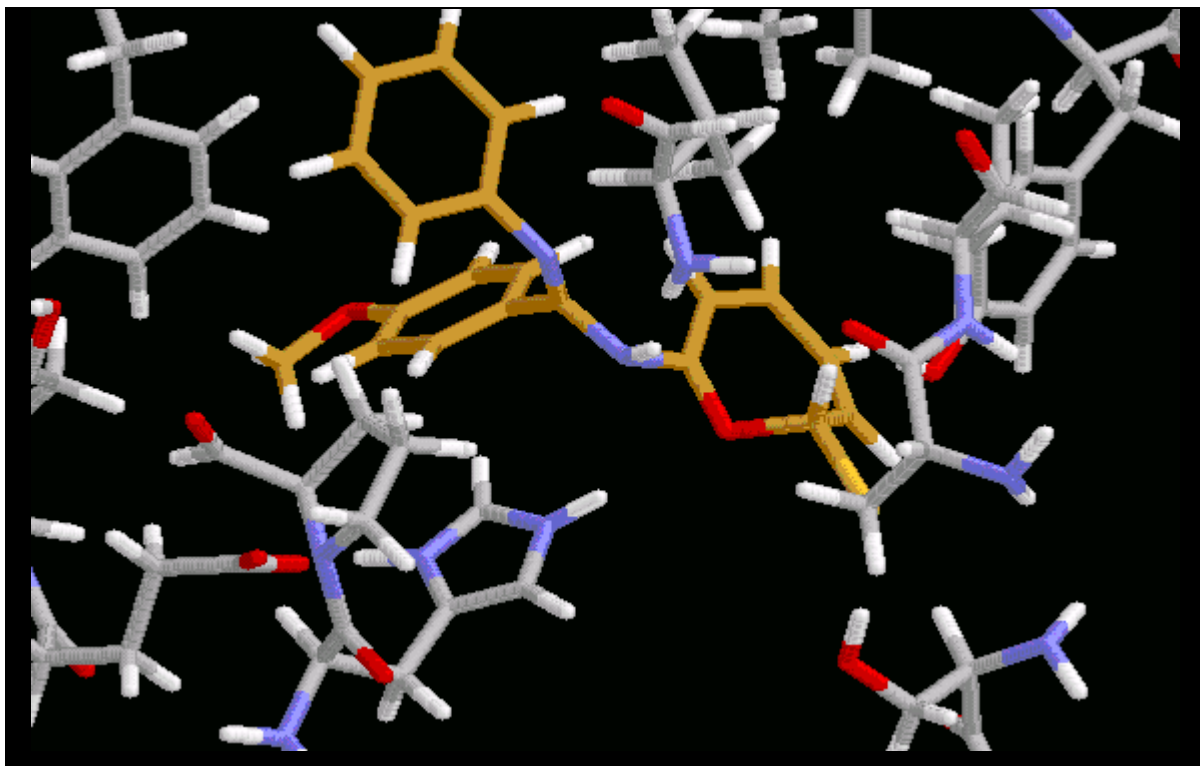


Figura 37: Estrutura da amidina ligada covalentemente ao enxofre da Cis 52, sem a abertura do anel epóxido. Obs.: a quebra ocorreu entre as ligações C-C e não C-O como esperado.

O método utilizado para contornar este problema consistiu em fixar as posições dos carbonos epoxirânicos, precedida do ataque nucleofílico. Esta estratégia apresentou resultados satisfatórios, pois a reação ocorreu conforme esperado, ou seja, deu-se a quebra da ligação C-O.

Uma vez otimizada a estrutura desta forma, procedemos a uma última otimização liberando as coordenadas da ligação C-C fixada anteriormente. Desta forma, chegamos a um modelo estável e favorável termodinamicamente. A variação de entalpia foi calculada pela Equação

$$\Delta H_r = (\Delta H_f \text{ aduto}) - (\Delta H_f \text{ complexo não covalente})$$

A entalpia de reação foi obtida considerando-se como energia do produto o aducto em sua geometria do modelo final e, como entalpia dos reagentes a de formação do complexo entre o sítio ativo e o composto Moyo12 (complexo não covalente).

A variação de entalpia calculada foi de $-2,57 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

O modelo desenvolvido permitiu-nos observar, claramente, algumas interações fundamentais, destacando-se a estabilidade obtida, após a abertura do anel de epóxido, através de ligação de entre a His 461 e o O^- , conforme havíamos previsto anteriormente. (Figura 38)

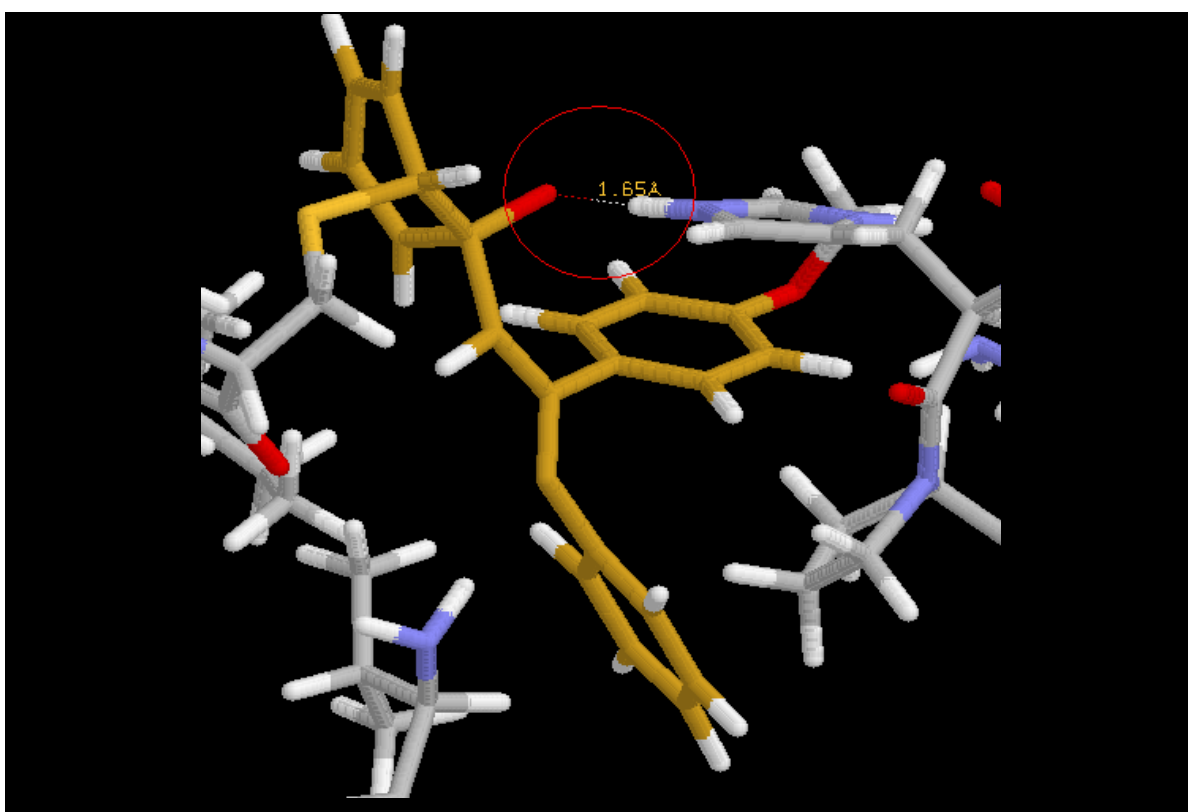


Figura 38: Ligação de Hidrogênio entre O^- da abertura do anel epóxido e NH de His 461

O grupamento metoxila faz interações dipolares com o grupamento ácido carboxílico do GLU 467, indicando um outro provável mecanismo de interação que justifica as diferentes atividades observadas entre esta classe de amidinas frente a TR, com substituintes em R, conforme ilustrado na Figura 39.

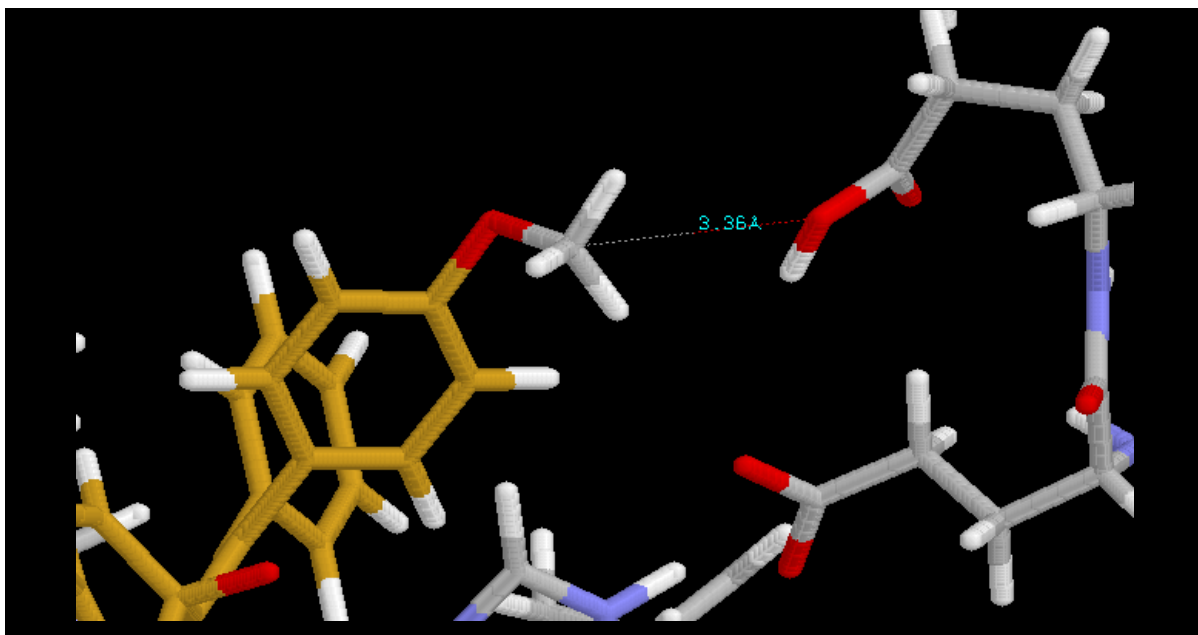


Figura 39: Interação dipolar entre o grupamento MeO e o ácido carboxílico de Glu 466

Glu 467 realiza uma interação dipolar estável com a metoxila e a fração da cadeia hidrocarbônica, por sua vez, é estabilizada por Fen 366, auxiliando o posicionamento da cadeia lateral de Glu 467, conforme ilustrado a seguir (Figura 40).

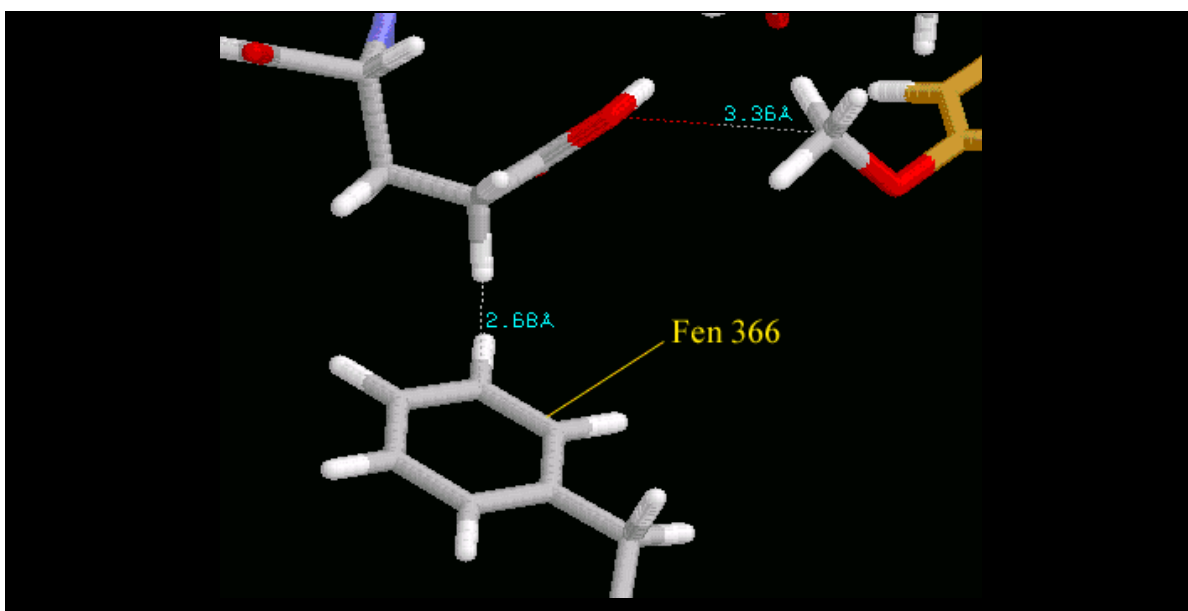


Figura 40: Estabilização da posição de Glu 467 por Fen 366

Um outro estudo foi desenvolvido avaliando-se a energia envolvida na mudança de conformação adotada pelo composto Moyo12, antes e após ocupação do sítio ativo.

Esta análise indicou que a estrutura é perfeitamente adaptável à cavidade, pois a diferença de energia observada foi de 0,49 kcal.mol⁻¹ sendo admissível que a amidina epoxidada forme interações estáveis com os aminoácidos do SA antes mesmo de ocorrer o ataque nucleofílico. O procedimento adotado consistiu em se recortar a molécula do SA e otimizá-la com os átomos fixados, calculando-se a diferença de entalpia através dos valores da amidina livre menos o obtida como citado acima.

De fato, a variação de entalpia para a formação de um complexo enzima / inibidor de caráter reversível, é mais viável do que a formação de uma ligação covalente. Tal observação leva à hipótese de que o composto Moy012 possa apresentar duas etapas e mecanismos distintos de bloqueio. Um primeiro mecanismo baseado em interações estáveis, porém de características reversíveis, e um segundo momento onde ocorre a adição covalente do sulfeto da Cis 52 ao anel de epóxido, tornando o processo característico de uma inibição irreversível.

A Figura 41 representa o modelo final, sendo indicadas algumas das principais interações observadas.

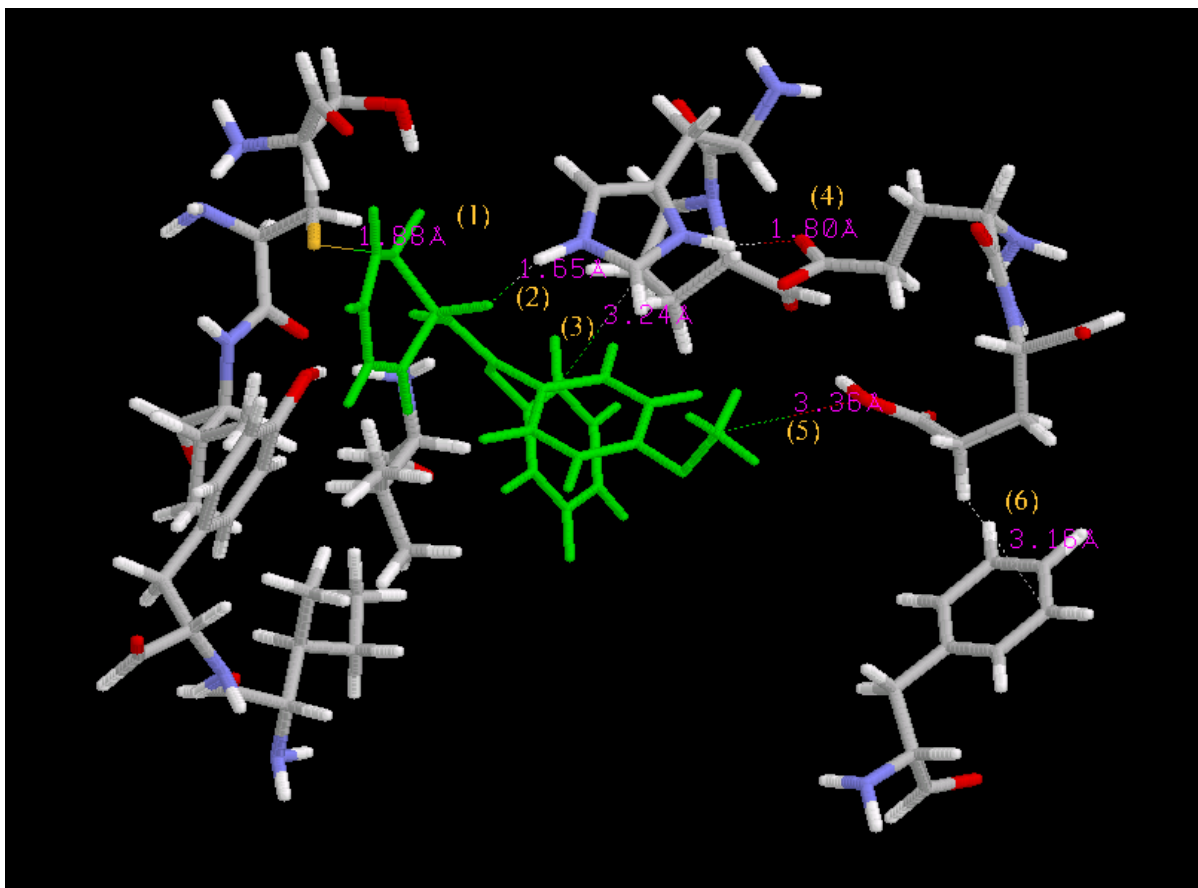


Figura 41: Principais interações observadas na interação da metoxi-amidina epoxidada com o sitio ativo da TR

- **(1)** – Formação da ligação covalente entre Cis 52 e a amidina epoxidada (em verde);
- **(2)** – Formação da ligação de hidrogênio entre O^- e NH da His 461;
- **(3)** – Interação por forças de dispersão entre o anel Y e Pro 336;
- **(4)** – Transferência do próton de Glu 467 para His 461, auxiliando na estabilidade da ligação de hidrogênio citada;
- **(5)** – Interação de Glu 466 com o grupamento R, neste caso MeO;
- **(6)** – Auxílio na conformação de Glu 466 por Fen 366, facilitando a interação deste com a metoxila (ou outros grupamentos substituintes na mesma posição)

Também destacamos, na Figura 42, a ligação de hidrogênio entre o NH amidínico e a carbonila da ligação peptídica de Cis 52 com Val 53:

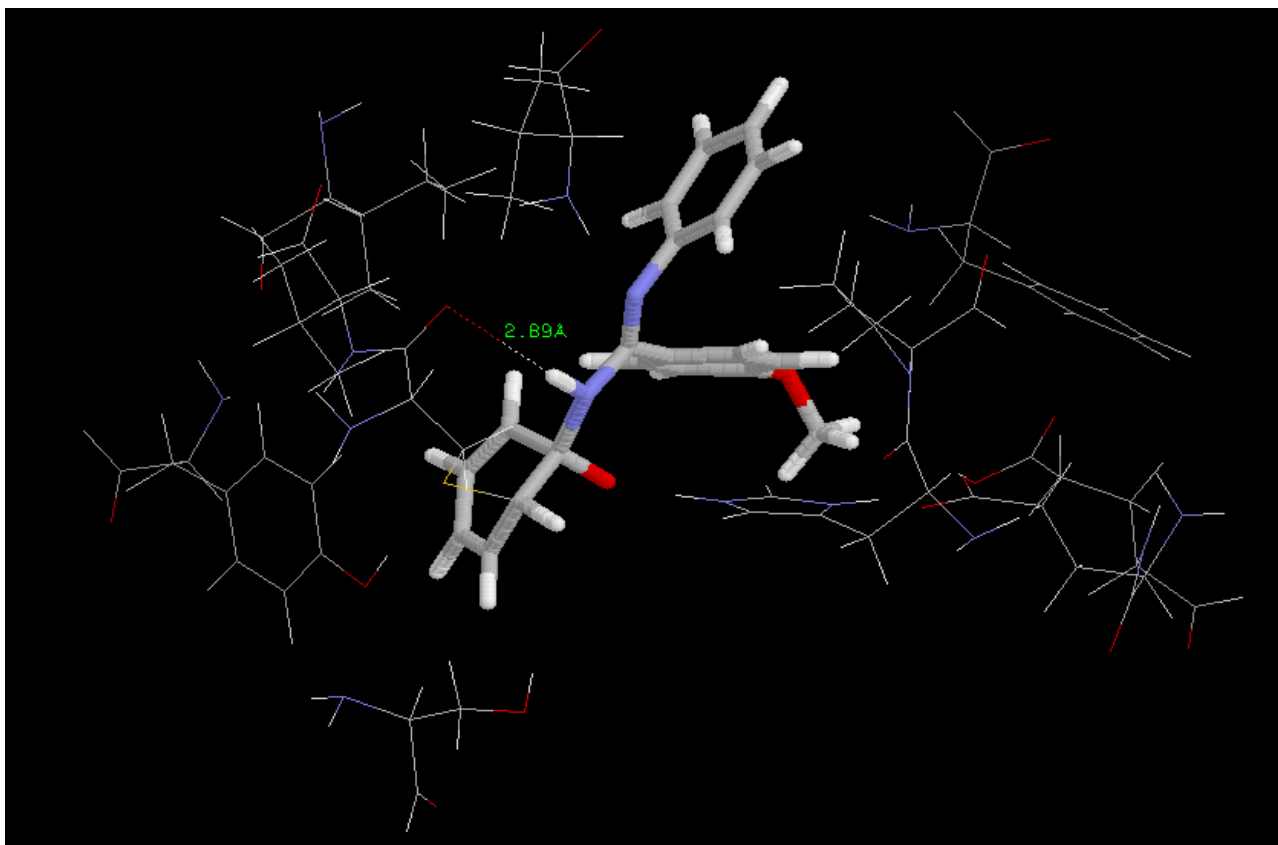


Figura 42: Formação da ligação de hidrogênio entre o NH amidínico e C=O da ligação peptídica entre Cis 52 e Val 53 (distância de 2,89 Å)

O conjunto de interações observadas, bem como a natureza das mesmas, indicou ser plenamente viável a formação do complexo amidina/SA, seguido da reação para formação do aduto.

Uma vez definido o modelo, realizamos cálculos envolvendo as sete amidinas que obtiveram atividade biológica contra *Leishmania*, procedendo a mudança, na própria matriz de cálculo, dos grupamentos substituintes.

A viabilidade entálpica da reação de adição do sulfeto ao anel epoxirânico, foi estimada pela diferença entre a entalpia de formação do aduto menos a entalpia de formação do complexo não ligado covalentemente.

A tabela a seguir apresenta os valores de ΔH_r para os sete modelos de interação possíveis, calculados a partir da ΔH_f final - ΔH_{int} .

Tabela 8: Valores de ΔH_f do complexo SA X Ligante, ΔH_f do complexo amidina X Cis 52 e ΔH_r

R	DL ₅₀ (M μ)	H _f (Kcal.mol ⁻¹)	H _f (Kcal.mol ⁻¹)	ΔH_r (Kcal.mol ⁻¹) Reação
		Sítio ativo Sem ligação com Cis 52	Complexo covalente Amidina x Cis 52	
Br	22	-582.46	-586.34	-3,88
OMe	29	-629.96	-632.53	-2,57
NO ₂	44	-599.13	-605.02	-5,89
Cl	55	-597.12	-600.75	-3,63
CN	390	-555.82	-560.27	-4,45
Me	444	-600.34	-603.36	-2,66
H	772	-590.73	-594.00	-3,27

Muito embora estes valores de ΔH_r não indiquem correlação direta entre as atividades observadas (DL₅₀) e a estabilidade termodinâmica do complexo Enzima / Inibidor, eles apontam para a comprovação de que é mesmo viável a adição de um derivado epoxidado das *N,N'*-difênil-4-R-benzamidinas estudadas ao sulfeto da Cis 52 encontrada no Sítio Ativo da TR.

Embora as variações sejam mínimas e dentro de prováveis erros experimentais, vale destacar o valor encontrado para o nitro derivado.

A presença do grupamento nitro no anel X, em função de sua forte polaridade, indica uma possível interação dipolar entre este e o aminoácido Glu 467, mais eficiente que a encontrada no grupamento MeO.

Além dos modelos teóricos de interação enzima / inibidor, procuramos, pelo método de regressões múltiplas, encontrar correlações entre parâmetros teóricos, DL₅₀ e as diversas variações de entalpia calculadas.

Obtivemos, através do programa PC Spartan Pro, os volumes moleculares, as energias de solvatação e áreas de contato para as sete amidinas e respectivos derivados epoxidados.

As tabelas 9 e 10 apresentam os parâmetros que foram submetidos à análise de correlações múltiplas para as amidinas e derivados epoxidados, respectivamente:

Tabela 9: Valores de H_f , Energias de solvatação, valores de DL_{50} , volumes moleculares e áreas das superfícies de contato das amidinas sem epoxidação

R	DL_{50} (μM)	H_f (kcal.mol^{-1})	Energia de solvatação (kcal.mol^{-1})	Volume (\AA^3)	Área superficial (\AA^2)
Br	22	104,37	-6,102	352,37	366,82
CH₃O	29	59,2	-6,891	359,05	372,26
NO₂	44	86,71	-7,407	359,39	374,35
Cl	55	90,04	-5,216	345,69	358,14
CN	390	131,45	-6,405	352,26	366,86
CH₃	444	87,63	-5,399	348	361,94
H	772	96,94	-5,642	327,82	340,26

Tabela 10: Valores de ΔH_f , Energias de solvatação, valores de DL_{50} , volumes moleculares e áreas das superfícies de contato das amidinas epoxidadas

R	DL_{50} (μM)	H_f (kcal.mol^{-1})	Energia de solvatação (kcal.mol^{-1})	Volume (\AA^3)	Área superficial (\AA^2)
Br	22	107,75	-11,289	361,81	372,89
OMe	29	61,42	-12,299	369,04	381,92
NO₂	44	92,22	-12,729	369,92	380,78
Cl	55	93,21	-10,833	355,63	367,51
CN	390	135,56	-11,908	361,9	374,56
Me	444	90,19	-10,703	357,86	371,11
H	772	99,67	-11,005	337,69	349,37

A melhor correlação obtida envolveu os valores de DL_{50} , e os parâmetros teóricos volume molecular, e áreas de contato, apresentando valor de $R = 0,96$ (R = coeficiente de correlação múltipla), segundo a Equação:

$$DL_{50} = 6643,02 (\pm 158,22) + 158,22 (\pm 40,82) B + 179,26 (\pm 47,11) C - 372,77 (\pm 75,33) D$$
$$R = 0,96$$

Onde:

B= Área do derivado epoxidado

C= Área da amidina não epoxidada

D= Volume da amidina não epoxidada

Nenhuma outra correlação apresentou um valor para R tão satisfatório, mesmo algumas com mais variáveis.

Qualquer outra combinação de três variáveis apresentou valores de R sempre inferiores a 0,80.

Esta correlação, associada à viabilidade termodinâmica do modelo proposto, nos leva a crer que a atividade observada para esta classe de *N,N'*-difênil-4-R-benzamidinas, é resultante de fatores múltiplos que estão associados a parâmetros estéricos, bem como sua metabolização a um derivado epoxidado e subsequente inibição deste frente à TR.

Novos estudos deverão ser desenvolvidos visando a síntese de novos compostos pertencentes à classe das *N,N'*-difênilbenzamidinas com estruturas otimizadas segundo o modelo proposto para consolidar sua validade.

6 CONCLUSÕES

- A classe das ***N,N'*-DIFENIL-4-R-BENZAMIDINAS** estudadas apresentou um potencial a ser explorado na busca de substâncias com atividade anti-tripanosomatídeos;
- O modelo teórico da enzima Tripanotiona Redutase da *Leishmania* mostrou uma interação entalpicamente favorável entre o derivados epoxidados e o sítio ativo da enzima
- Há uma maior probabilidade de que o mecanismo de inibição da TR pelas ***N,N'*-DIFENIL-4-R-BENZAMIDINAS** estudadas ocorra após a bio-transformação das mesmas, através dos mecanismos clássicos de destoxificação utilizados pelo parasita, envolvendo, como proposto, a peroxidação via Cit P₄₅₀ epoxidase presente no microorganismo, do que uma adição direta do sulfeto ao carbono amidínico;
- As principais interações observadas, entre os aminoácidos presentes no SA da TR e o aduto, após a adição nucleofílica do sulfeto da Cis 52 ao anel epoxirânico, se mostraram altamente estáveis;
- O melhor Hamiltoniano para estudos envolvendo mecanismos de adição de sulfeto a anéis epoxirânicos é o PM3;
- Não foi observada correlação direta entre efeitos eletrônicos das ***N,N'*-DIFENIL-4-R-BENZAMIDINAS** estudadas e as atividades biológicas observadas;
- Houve correlação satisfatória envolvendo a área do derivado epoxidado e a área mais o volume da amidina não metabolizada;
- Os fatores que determinam a atividade desta classe de ***N,N'*-DIFENIL-4-R-BENZAMIDINAS**, frente a tripanossomatídeos são complexos e não podem ser resumidos, unicamente a inibição direta da enzima TR;
- Compostos da classe das ***N,N'*-DIFENIL-4-R-BENZAMIDINAS** contendo grupamentos polares e de dimensões específicas na posição *para* do anel X, deverão ser considerados como promissores para o desenvolvimento de fármacos que visem a inibição da TR.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOAGYE-KWARTENG, T.; SMITH, K.; FAIRLAMB, A. H. Molecular characterization of the trypanothione reductase gene from *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei*: Comparison with other flavoprotein disulphide oxidoreductases with respect to substrate specificity and catalytic mechanism. **Mol. Microbiol.** 21:3089-3099, 1992.

ALLINGER, N. L. Conformational analysis 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V_1 and V_2 torsional terms. **J. Am. Chem.** 99: 8127-8134, 1977 (a).

ALLINGER, N. L.; YUH, Y. H.; LII, J. J. Molecular Mechanisms. The MM3 force field for hydrocarbons I. **J. Am. Chem.** 111: 8551-9556, 1977 (b).

AUMERCIER, M.; MEZIANE-CHERIF, D.; MOUTIEZ, M.; TARTAR, A.; SERGHERAERT, C. A microplate assay for trypanothione reductase inhibitors. **Analit. Biochem.** 223: 161-164, 1994.

BACHARACH, U.; BREM, S.; WERMAN, S.B.; SCHNUR, L.F.; EL-ON, J.; GREENBLATT, C.I. *Leishmania* spp: Effect of inhibitors on growth and on polyamine and macromolecular synthesis. **Exp. Parasitol.**, v. 48, p. 464-470, 1979.

BAILEY, S.; SMITH, K.; FAIRLAMB, A.; HUNTER, W. Substrate interactions between trypanothione reductase and N^1 -glutathionylspermidine disulphide at 0.28-nm resolution. **Eur. J. Biochem.** 213:67-75, 1993.

BAILEY, S.; FAIRLAMB, A. H.; HUNTER, W. N. Structure of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata* at 2.6Å resolution-enzyme-NADP interactions at 2.8 Å resolution. **Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.** 50: 139-154, 1994.

BANERJEE, G.; NANDI, G.; MAHATO, B.; PAKRSHI, A.; BASU, M.K. Drug delivery system: targeting of pentamidines to specific sites using sugar grafted liposomes. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 38: 145-150, 1996.

BARREIRO, E. J. Bioisosterismo: Importante estratégia de modificação molecular para o planejamento racional de medicamentos – Parte I. **Rev. Bras. Farm.** 72 (1): 2-7, 1991.

BARREIRO, E. J; SANT'ANNA, C. M. R. ; RODRIGUES, C. R. ; ALBUQUERQUE, M. G. ; ANNA, C. M. R. S. ; ALENCASTRO, R. B. . Modelagem Molecular: Uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Química Nova**, v. 20, p. 300-310, 1997.

BARREIRO, E. J ; FRAGA, C. A. M. . **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**. ARTMED, São Paulo – BR. 2001. 243 p.

BARREIRO, E.J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. **Quim. Nova**, v.25:1172-1180, 2002.

BASSELIN, M.; BADET-DENISOT, M.A.; LAWRENCE, F.; ROBERT-GERO, M. Effects of pentamidine on polyamine level and biosynthesis in wild-type pentamidine treated and pentamidine-resistant *Leishmania*. **Exp Parasitol.**, v. 85: 274-282, 1997

BASTOS-CENEVIVA, M. P. Relações lineares de energia livre e atividade farmacológica. Parte I – Equação de Hammet. **Química Nova**. 7:141-149, 1984.

BELL, C. A.; HALL, J. E.; KYLE, D. E.; GROGL, M.; OHMENG, K. A.; ALLEN, M.; TIDWELL, R. R. Structure-activity relationships of analogs of pentamidine against *Plasmodium falciparum* and *Leishmania mexicana amazonensis*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 34(7): 1381-1386, 1990.

BENSON, T. J.; MCKIE, J. H.; GARFOTH, J.; BORGES, A.; FAIRLAMB, A. H.; DOUGLAS, K. T. Rationally designed selective inhibitors of trypanothione reductase. Fennotiazines and related tricyclics as lead structures. **Biochem. J.** 286:9-11, 1992.

BERMAN, J. D. Chemotherapy for Leishmaniasis: Biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. **Rev. Infect. Dis.** 10(3):560-585, 1988.

BEZERRA, R. J. S.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Braz. J. Pharmac. Sci.** vol. 40 (2): 139-149, 2004

BODLEY, A. L.; MCGARRY, M. W.; SHAPIRO, T. Drug cytotoxicity assay for African Trypanosomes and *Leishmania species*. **J. Infect. Dis.** 172: 1157- 1159, 1995.

BONSE, S.; SANTELLI-ROUVIER, C.; BARBE, J.; KRAUTH-SIEGEL, L. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase by acridines: kinetic studies and structure-activity relationships. **J. Med. Chem.** 42:5448-5454, 1999.

BONSE, S.; RICHARDS, J. M.; ROSS, S. A.; LOWE, G.; KRAUTH-SIEGEL, L. (2,2':6',2''-Terpyridine)platinum(II) complexes are irreversible inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase but not of human glutathione reductase. **J. Med. Chem.** 43: 4812-4821, 2000.

BORGES, A.; CUNNINGHAM, M. L.; TOVAR, J.; FAIRLAMB, A. Site-directed mutagenesis of the redox-active Cysteines of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase. **Eur. J. Biochem.** 228:745-752, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2003. 122 p.

BRUMPT, E.; PEDROSO, A. Pesquisas epidemiológicas sobre a Leishmaniose Americana das florestas no estado de São Paulo. **Ann. Paul. Méd. Cir.** 1: 97-136, 1913.

CAMUS, D.; ZALIS, M. G.; VANNIER-SANTOS, M.A.; BANIC, D.M. The art of parasite survival. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 28: 399-413, 1995.

CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; ECHEVARRIA, A.; ARAÚJO, C. A. C.; BRAVO, M. F.; SANTOS, L. H. S. SANTOS; JANSEN, A. M.; LEON, L. L. The potential effects of new synthetic drugs against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Microbios**, 90:51-60, 1997.

CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; ECHEVARRIA, A.; SOUZA, M. A. S.; LEON, L. L. Effects of amidines derivatives on *Leishmania amazonensis* axenic amastigotes. **Arzneim.-Forsch./Drug Res.** 925, 2000.

CASTRO-PINTO DB, ECHEVARRIA A, GENESTRA MS, CYSNE-FINKELSTEIN L, LEON LL: Trypanothione reductase activity is prominent in metacyclic promastigotes and axenic amastigotes of *Leishmania amazonensis*. Evaluation of its potential as a therapeutic target. **J Enzyme Inhib Med Chem** 19(1):57-63, 2004.

CENAS, N.; BIRONAITE, D.; DICKANCAITE, E.; ANUSEVICIUS, Z.; SARLAUSKAS, J.; BLANCHARD, J. Chinifur, a selective inhibitor and “subversive substrate” for *Trypanosoma Congolense* trypanothione reductase. **Biochem. and Biophys. Res. Communic.** 204 (1): 224-229, 1994.

CHAN, C.; YIN, H.; GARFOTH, J.; MCKIE, J. H.; JAHOUARI, R.; SPEERS, P.; DOUGLAS, K. T.; ROCK, P.J.; YARDLEY, V.; CROFT, S. L.; FAIRLAMB, A. H. Fennotiazines inhibitors of trypanothione reductase as potential antitrypanosomal and antileishmanial drugs. **J. Med. Chem.** 41(2):148-156, 1998.

CLARK, T. A handbook of computational chemistry: A practical guide to chemical structure and energy calculations. **John Wiley & Sons. USA**, 1985. 332p.

CORNELL, W. D.; CIEPLAK, P.; BAYLY, C. I.; GOULD, I. R.; MERZ JR., K. M.; FERGUSON, D. M.; SPELLMEYER, D. C.; FOX, T.; CALDWELL, J. W.; KOLLMAN, P. A. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids and organic molecules. **J. Am. Chem.** 117: 5179-5197, 1995.

COUTINHO, S.G.; NUNES M. P. ; MARZOCHI, M.C.A. ; SOUZA, W. J. S.; AMENDOEIRA, M. R. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **J. Brás. Méd.** 41 (4): 104-116, 1981.

COUTINHO, S.G.; NUNES M.P.; MARZOCHI, M.C.A. & TRAMONTANO, N.E. A survey for cutaneous and visceral leishmaniasis among 1342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human disease occurs. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 80: 17-22, 1985.

CROFT, S. L. Pharmacological approaches to antitrypanosomal chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.94 (2):215-220, 1999.

CUNHA, A.M. & CHAGAS. E. Estudos sobre o parasito. In: Leishmaniose Visceral Americana, nova entidade mórbida do homem na América do Sul. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 32, 1937. p. 329-337.

DAVIS, L.P., GUIDRY, R.M., WILLIAMS, J.R., DEWAR, M.J.S.; RZEPA, H.S. MNDO calculations for compounds containing aluminum and boron. **J Comput Chem.** 2: 433 - 445, 1981.

DESJEUX, P., Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. & Infect. Dis.** 27: 305-318, 2004.

DEWAR, M.J.S., ZOEBISCH, E.G.; HEALY, E.F.; STEWART. AM1: A New General Purpose Quantum Mechanical Molecular Model. **J. Am. Chem. Soc.** 13:3902 - 3912. 1985

DEWAR, M., J., S.; MCKEE, M., L.. "Ground States of Molecules. 41. MNDO Results for Molecules Containing Boron". *J. Am. Chem. Soc.* 99: 5231, 1977.

DINUR, U.; HAGLER, A. T. New approaches to empirical force fields. In: FERNANDES, P. D.; ASSREUY, J. **Reviews in Computational Chemistry**. VCH Publishers, New York. Vol. 2. 1991.

D`SILVA, C.; DAUNES, S.; ROCK, P.; YARDLEY, V.; CROFT, S. L. Structure-activity study on the *in vitro* antiprotozoal activity of glutathione derivatives. **J. Med. Chem.** 43:2072-2078, 2000.

DUMAS, C.; OUELLETTE, M.; TOVAR, J.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H.; TAMAR, S.; OLIVIER, M.; Papadopoulou, B. Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. **EMBO J.** 16:2590-2598, 1997.

ECHEVARRIA, A.; SANTOS, L.H.; MILLER, J.; MAHMAD, N. Synthesis, characterization and anti-HIV activity of some 2-*p*-X-Fenyl-1,3-*N,N'*-diFenylbenzanimidines. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 6, p. 1901- 1904, 1996.

EXNER, O. In: **Advances in Linear Free Energy Relasnionhips**. CHAPMAN & SHORTER Publishers, New York.1972.

FAERMAN, C.H.; Savvides, S.N.; Breidenbach, M.A.; Ponasik, J.A.; Ripoll, D.; Krauth, R.L.; Karplus, P.A. Charge is the major discriminating factor for glutathione reductase versus trypanothione reductase inhibitors. **Bioorg. Med. Chem.** 4:1247-53, 1996.

FAIRLAMB, A. H.; BLACKBURN, P.; ULRICH, P.; CHAIT, B. T.; Cerami A. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl) spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. **Science.** 22:1485-1487, 1985.

FAIRLAMB, A. H. Future prospects for the chemotherapy of human trypanosomiasis. 1. Novel approaches to the chemotherapy of trypanosomiasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 84(5):613-617, 1990.

FERNANDES, P. D.; ASSREUY, J. Role of nitric oxide and superoxide in *Giardia lamblia* killing. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 30: 93-99, 1997.

FORATTINII, O.P., PATOLI D.B.G.; SERRA, O.P.; ROCHA E SILVA, E.O.; RABELLO, E.X. Nota breve sobre Leishmaniose Tegumentar no litoral sul do estado de São Paulo - Brasil. **Rev. Saúde Públ.** 7: 447-452, 1973.

FOYE, W.O.; **Principles of Medicinal Chemistry.** Lea and Febiger. Philadelphia, 1974. 1128 p.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D. A. Lipossomas: Propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Quim. Nova**, vol. 28 (3): 511-518, 2005

GARFOTH, J.; YIN, H.; MCKIE, J. H.; DOUGLAS, K. T.; FAIRLAMB, A. H. Rational design of selective ligands for trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Structural effects on the inhibition by dibenzazepines based on imipramines. **J. Enzyme Inhib.** 12(3):161-173, 1997.

GELB, M. H.; HOL, W. G.. **Parasitology: Enhanced: Drugs To Combat Tropical Protozoan Parasites.** **Science.** 12: 313, 2002.

GENARO, O. Leishmaniose visceral. In: NEVES, D. **Parasitologia humana.** 7.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1997. Cap.9, p.55-72.

GENESTRA, M.; ECHEVARRIA, A.; LEON, L. L.; Protein Kinase A of *Leishmania amazonensis* as a potential target for Methoxy-amidine. **Arzneim.-Forsch. Drug Res.** 51: 920-923, 2001.

GENESTRA, M.; ECHEVARRIA, A.; CISNE-FINKELSTEIN, L.; VIGNOLIO-ALVES, L.; LEON, L. L. Effect of amidine derivatives on nitric oxide production by *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. **Nitric Oxide.** 8: 1-6, 2005.

GOLDMAN, L. Pre-Colombian Leishmaniasis. **Arch Dermatol.** 119:540. 1983.

GOMES-CARDOSO, L.; ECHEVARRIA, A.; AGUIAR-ALVES, F.; JANSEN, A. M.; LEON, L. L. Comparative analysis of the efficiency of amidines derivatives on different isolates of *Trypanosoma evansi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 93:297, suppl.II, 1998 (a).

GOMES-CARDOSO, L.; ECHEVARRIA, A.; AGUIAR-ALVES, F.; CISNE-FINKELSTEIN, L.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; GENESTRA, M.; LEON, L. L. The effect of methoxy-amidine on derivatives on *Leishmania amazonensis* is associated to the trypanothione reductase activity. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 93:312, suppl.II, 1998 (b).

GOMES-CARDOSO, L.; ECHEVARRIA, A.; AGUIAR-ALVES, F.; JANSEN, A. M.; LEON, L. L. Amidines derivatives are highly effective against *Trypanosoma evansi* trypomastigotes. **Microbios**. 100:181, 1999.

GRIMALDI, JR. G.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. **Clin. Microbiol. Rev.** 6(3): 230-250, 1993.

GRONERT, S.; LEE, J. M. Gas phase reactions of methyloxirane with HO⁻ and methylthiirane with HO⁻ and HS⁻. An *Ab initio* study of addition and elimination. **J. Org. Chem.** 60:4488-4497, 1995.

HERRER, A.; CHRISTENSEN, H. A. Implications of *Phlebotomus* sand flies as vectors of bartonellosis and leishmaniasis as early as 1764. **Sci.**, 190: 154-155, 1975.

HOL, W. G. J. Protein crystallography and computer graphics-towards rational drug design. **Angewandte Chem. Int. Ed. Engl.** 28: 1358-1365, 1986.

HUNTER, W. N.; SMITH, K.; DEREWENDA, Z.; HARROP, S. J.; HABASH, J.; ISLAM, M. S.; HELLIWELL, J. R.; FAIRLAMB, A. H. Initiating a crystallographic study of trypanothione reductase. **J. Mol. Biol.** 216:235-237, 1990.

HUNTER, W. N.; BAILEY, S.; HABASH, J.; HARROP, S. J.; HELLIWELL, J. R.; ABOAGYE-KWARTENG, T.; SMITH, K.; FAIRLAMB, A. H. Active site of trypanothione reductase. A target for rational drug design. **J. Mol. Biol.** 227:322-333, 1992.

HUNTER, W. N. A structure-based approach to drug discovery; crystallography and implications for the development of antiparasite drugs. **Parasitology** 114:S17-S29, 1997.

JANES, W.; SCHULZ, G. E. Role of the charged groups of glutathione disulfide in the catalysis of glutathione reductase: crystallographic and kinetic studies with synthetic analogues. **Biochem.** 29(16):4022-4030, 1990.

JOSEPHY, D.P. **Molecular Toxicology**, Oxford University Press, 155-158. 1997.

KAMINSKY, R. Miltefosine. **Curr. Opin. Investigat. Drugs.** 4(4): 550-554, 2002.

KELLY, J. M.; TAYLOR, M. C.; SMITH, K.; HUNTER, W.; FAIRLAMB, A. Fenotype of recombinant *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi* which overexpress trypanothione reductase: sensitivity towards agents that are thought to induce oxidative stress. **Eur. J. Biochem.** 218:29-37, 1993.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, BR. 1988. 783 p.

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

KURIYAN, J.; WONG, L.; GUENTHER, B. D.; MURGOLO, N. J.; CERAMI, A.; HENDERSON, G. B. Preliminary crystallographic anaLisis of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata*. **J. Mol. Biol.** 215:335-337.

LAISON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. Peters, W. and Killich-Kendrich, R.(eds), Academic Press, 1 : 120 p, 1987.

LAITINEN, T.; ROUVINEN, J.; PERAKYLA, M. *Ab initio* quantum mechanical and density functional theory calculations on nucleophile and acid-catalyzed opening of an epoxide ring: a model for the covalent binding of epoxyalkyl inhibitors to the active site of Glicosidases. **J. Org. Chem.** 63:8157-8162, 1998.

LEACH, T. **Molecular Modelling: Principles and Applications**. Longman, Essex-England. 1998. 595p.

LEÃO, R. N. Q. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico**. Belém: Cejup/UEPA: Instituto EvandroChagas, 1997, 886 p.

LEVINE, I.N. **Quantum Chemistry**.. 3rd Ed. Alyn and Bacon. 1991. 629 p.

MARSH, I. A.; BRADLEY, M. Substrate specificity of trypanothione reductase. **Eur. J. Biochem.** 243:690-694, 1997.

MARZOCHI, M.C.A. ; SABROZA, P. C. ; TOLEDO, L. M. ; MARZOCHI, K. B. F. ; TRAMONTANO, N. C. & RANGEL, F. B. Leishmaniose visceral na cidade do Rio de Janeiro. **Cad. Saúde Públ.** 1: 5-17, 1985.

MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil. Emerging anTreopozoonosis and possibilities for their control. **Cad. Saúde Públ.** 10(supl.2): 359-375, 1994.

MCCONVILLE, M. ; TURCO, S. J. ; FERGUSON, M. A. & SACKS, D. L. Developmental modification of lipophosphoGlican during of *Leishmania major* promastigotes to na infectious stage. **EMBO J.** 11: 3593-3600, 1992.

MELBY, P. C. ; KREUTZER, R. D. ; MCMAHON-PRATT, D. ; GAM, A. A.; NEVA, F. A.. Cutaneous Leishmaniasis : Review of 59 cases seen at the National Institutes of Health. **Clin. Infect. Dis.** 15: 924-937, 1992.

MONTANARI, C. A.; TRENT, J. O.; JENKINS, T. C. Molecular recognition of B-DNA minor-groove binders: The rigid analogue approach to synthesise antileishmaniasis compounds. A molecular study. **J. Braz. Chem. Soc.** v.9(2):175-180, 1998.

MONTELLANO, P. R. O. FOYE, W.O.; **Biotransformations of Drugs and Chemicals, em Molecular Biology and Biotechnology. A Comprehensive Desk Reference R. A. Meyers.** Ed., Wiley-VCH. New York, 1995. pp 117-120.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana.** Atheneu, São Paulo. 11^a ed. 2005. 494 p.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD/ ORGANIZACIÓN MONDIALDE LA SALUD. **Informe Final de la Reunión de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas.** Rio de Janeiro, PANAFTOSA, © 2006. 152p.

OSZCZAPOWICZ, J.; RACZYNSKA, E.; OSEK, J. Amidines: XVII-Substituent-Induced chemical shifts in CNMR spectra of N²-Fenyl-Formamidines, -Acetamidines and -Guanidines. **Magn. Reson. Chem.** 24:9-14, 1986.

PEARSON, R. D. ; COX, G. ; JERONIMO, S. M. B. ; CASTRACENE, J. ; DREW, J. S. ; EVANS, T.; DE ALENCAR, J. E. Visceral Leishmaniasis : A model for infection-induced cachexia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 47(supl.): 8-15, 1992.

PEDROSO, A.M. Leishmaniose local de cão. **Ann. Paul. Med. Cir.** vol.1,p.33-39, 1913.

PESSOA, S.B. & BARRETO, M.P.. Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Educação e cultura. **Imprensa Nacional,** Rio de Janeiro, 1948, 727 p.

PIMENTA, P. F. P. ; TURCO, S. J. ; MCCONVILLE, M. H. ; LAWYER, P. G. ; PERKINS, P. V.; SACKS, D. L.. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. **Science**. 256 : 1812-1815, 1992.

PUENTES, S. M. ; SACKS, D. L. ; DA SILVA, R. P.; JO INER, K. A.. Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoGlican. **J. Exp. Med.** 167: 887-902, 1988.

PUENTES, S. M. ; DA SILVA, R. P ; SACKS, D. L. ; HAMMER, C. H. & JOINER, K. A.. Serum resistance of metacyclic *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. **J. Immunol.** 145: 4311-4316, 1991.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da Leishmaniose: Estado da arte. **Quim. Nova**, Vol. 26 (4): 550-555, 2003

ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan an futher notes on Leishman's bodies. **Br. Med. J.** 2: 1401, 1903.

RUSSELL, D.G.; TALAMAS-ROHANA, P. *Leishmania* and Macrophages: a marriage of inconvenience. **Immun. Today**. 10 (10): 328-333, 1989.

SACKS, D. L.; BRODIN, T. N.; TURCO. Developmental modification of the lipophosphoGlican from *Leishmania major* promastigotes during metacyclogenesis. **Mol. Biochem. Parasitol.** 42: 225-234, 1990.

SACKS, D. L.. The structure and function of the surface lipophosphoGlican on different developmental stages of *Leishmania* promastigotes. **Inf. Agents Dis.** 1: 200-205, 1992.

SANT`ANNA, C. M. R. ; ALENCASTRO, R. B. ; BARREIRO, E. J . Toward a Platelet-Activating Factor Pseudoreceptor: 2.Treee-dimensional Semiempirical Models for Agonist and Antagonist Binding. **J. Mol. Struct.** v. 490: 167-180, 1999.

SANTOS, L. H. S. N, N^o- **Difenilbenzamidas: Síntese, correlações de Hammet e atividade biológica.** Tese de Mestrado – UFRRJ, 1993. 112 p

SANTOS, S.O. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. **Med. Vet. Entomol.** 12: 315-317, 1998.

SARAIVA, E. M. B. ; PIMENTA, P. F. P. ; BRODIN, T. N. ; BROWTON, E. ; MODI, G. B. & SACKS, D. L. Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. **Parasitol.** 111: 275-287, 1995.

SARAVIA, N. G. ; SEGURA, I. ; HOLGUIN, A. F. ; SANTRICH, C. ; VALDERRAMA, L. & OCAMPO, C. Epidemiologic, genetic, and clinical associations among Genetically distinct populations of *Leishmania (Viannia)* in Colombia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 59 (1): 86-94, 1998.

SHAMES, S. L.; KIMMEL, B. E.; PEOPLES, O. P.; AGABIAN, N.; WALSH, C. T. Trypanothione reductase of *Trypanosoma congolense*: gene isolation, primary sequence determination and comparison to glutathione reductase. **Biochem.** 27: 5014-5019, 1988.

SCHLEIN, Y. *Leishmania* and Sandflies : Interactions in the life cycle and transmission. **Parasitol. Today**, 9(7) : 255-258, 1993.

SCHUBACH, A.; MARZOCHI, M.C.A.; CUZZI-MAIA, T.; OLIVEIRA, A.; ARAÚJO, M. L.; OLIVEIRA, A. L. C.; PACHECO, R.; MOMEN, H.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; COUTINHO, S.; MARZOCHI, K. B. F. Cutaneous scars in American Tegumentary Leishmaniasis patients : A site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonyl therapy and clinical cure. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 58 (6): 824 – 827, 1998.

SILVA, S. L. **Modelagem molecular de derivados fenilpirazólicos e flavonóides inibidores da xantina oxidase.** Tese de Doutorado – UNICAMP -SP, 2003. 173 p.

SOTO J, ARANA BA, TOLEDO J, RIZZO N, VEGA JC, DIAZ A, LUZ M, GUTIERREZ P, ARBOLEDA M, BERMAN JD, JUNGE K *et al.* Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 38(9):1266-1272, 2004.

SOUZA, M.M.S.; FREIRE, R. B.; QUEIROZ, R. P. C.; WIENEM, L. P. *Leishmania braziliensis* como modelo de imunossupressão entre indutores de imunossupressão e parasitismo. **Revista da Universidade Rural – Série Ciências da Vida**, 2000.

STOLL, V. S.; SIMPSON, S. J.; KRAUTH-SIEGEL, R. L.; WALSH, C. T.; PAI, E. F. Glutathione reductase turned into trypanothione reductase: Structural analysis of an engineered change in substrate specificity. **Biochem.** 36: 6437 – 6447, 1997.

STEWART, J. J. P. Optimisation of parameters for semi-empirical methods I. Method. **J. Comp. Chem.** 10: 209-220, 1989 (a).

STEWART, J. J. P. Optimisation of parameters for semi-empirical methods II. Applications. **J. Comp. Chem.** 10: 221-264, 1989 (b).

STEWART, J. J. P. **MOPAC MANUAL**. Frank J. Seiler Research Laboratory -United States Air Force Academy, 6^a ed. 1990

STRYER, L. **Bioquímica**. Guanabara-Koogan, RJ. 4^a ed. 1996. 1000p.

SZABO, A.; OSTLUND, N.S. **Modern Quantum Chemistry**. McGraw-Hill Publishing Co. 1989.

TAYLOR, M. C.; KELLY, J. M.; CHAPMAN, C. J.; FAIRLAMB, A. H.; MILES, M. A. The structure, organization, and expression of *Leishmania donovani* gene encoding trypanothione reductase. **Mol. and Biochem. Parasitol.** 64: 293-301, 1994.

TEMPORAL, R.M.; CISNE-FINKELSTEIN, L.; ECHEVARRIA, A.; SOUZA, M.A.S.; SILVA-GONCALVES, A. J.; LEON, L. L. Effect of amidine derivatives on parasite-macrophage interaction and evaluation of toxicity. **Arzneim.-Forsch. Drug Res.** 52: 489-493, 2002.

TEMPORAL, R.M.; ECHEVARRIA, A.; SILVA-GONCALVES, A. J.; LEON, L. L.; GENESTRA, M. Amidine derivatives and *Leishmania amazonensis*: na evaluation of the effect of nitric oxide (NO) production on the parasite-macrophage interaction. **J. Enzyme Inhib. Méd. Chem.** 20: 13-18, 2005

TOVAR, J.; WILKINSON, S.; MOTTRAM, J. C.; FAIRLAMB, A. H. Evidence that trypanothione reductase is an essential enzyme in *Leishmania* by targeted replacement of the *tryA* gene locus. **Mol. Microbiol.** 29:653-660, 1998.

TOVAR, J.; CUNNINGHAM, M. L.; SMITH, A. C.; CROFT, S. L.; FAIRLAMB, A. H. Down-regulation of *Leishmania donovani* trypanothione reductase by heterologous expression of a *trans*-dominant mutant homologue: effect on parasite intracellular survival. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 95:5311-5316, 1998.

UNGER, C.; DAMENZ, W.; FLEER, E.A.; KIM, D.J.; BREISER, A.; HILGARD, P.; ENGEL, J.; NAGEL, G.; EIBL, H. Hexadecylphosphocoline, a new ether-lipid analog. Studies on the antineoplastic activity *in vitro* and *in vivo*. **Acta Oncol.**, v. 28, p. 213-217, 1989.

URAY, G.; VERDINO, P.; BELAJ, F.; KAPPE, C. O.; FABIAN, W. M. F. Absolute Configuration in 4-Alkyl- and 4-Aryl-3,4-dihydro-2(1H)-pyrimidones: A Combined Theoretical and Experimental Investigation. **J. Org. Chem.** 66: 6685 – 6694, 2001.

VANHOUTTE, P. M. Medicinal Chemistry. The Challenges for the Future in:"**Computer-Assisted Lead Finding and Optimization. Current Tools for Medicinal Chemistry**". Van de Waterbeemd, Testa, B. e Folkers, G. Wiley-VCH, Weinheim, 1997.

WALSH, C.; BRADLEY, M.; NADEAU, K. Molecular studies on trypanothione reductase, a target for antiparasitic drugs. **Trends Biochem. Sci.** 16(8):305-309, 1991.

WEINER, S. J.; KOLLMAN, P. A.; CASE, D.A.; SINGH, U. C.; GHIO, C.; ALAGONA, G.; PROFETA, S.; WEINER, P. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. **J. Am. Chem.** 106: 765-784, 1984.

WILSON, M.E. Leishmaniasis. **Curr. Op. Infect. Dis.** 6(3): 331-341, 1993.

WOLDAY, D.; BERHE, N.; AKUFFO, H.; BRITTON, S. Leishmania-HIV interaction : Immunopathogenic mechanisms. **Microbiol. Mol. Biol.** Ver., 182-187, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Annex 3: Burden of disease in DAL. As by cause, sex and mortality stratum in WHO regions, estimates for 2001. In: The world health report. Geneva: WHO, 192-7. 2002

ZHANG, Y.; BAILEY, S.; NAISMITH, J. H.; BOND, C. S.; HABASH, J.; MCLAUGHLIN, P.; PAPIZ, M. Z.; BORGES, A.; CUNNINGHAM, M.; FAIRLAMB, A.; HUNTER, W. *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase: Crystallization, unit cell dimensions and structure solution. **J. Mol. Biol.** 233:1217-1220, 1993.

8 ANEXOS

ANEXO 1a – Leishmaniose tegumentar americana – Distribuição de casos confirmados por Unidade Federada Brasil, 1980-2005

ANEXO 1b – Leishmaniose visceral americana – Distribuição de casos confirmados por Unidade Federada Brasil, 1980-2005

ANEXO 2 - Principais aminoácidos de ocorrência natural – Símbolos, abreviaturas e valores de pK_a

ANEXO 3 - Estruturas das *N,N'*-difeníl-4-*R*-benzamidinas

ANEXO 4 - Códigos de descrição das estruturas; Padrões de identificação dos anéis, epoxidação e adição de sulfeto; Exemplos de denominação dos derivados epoxidados após a adição de sulfeto

ANEXO 5 - Valores de ΔH_r para a reação de adição de sulfeto aos derivados epoxidados

LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA - Distribuição de casos confirmados, por Unidade Federada. Brasil, 1980 - 2005*

UF/Macrorregião	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005*	Total
BRASIL	4.580	5.153	5.890	5.698	6.181	13.854	16.545	28.253	25.163	21.128	24.753	28.460	24.888	27.454	35.103	35.748	30.050	31.303	21.891	32.438	33.720	37.713	34.168	31.379	28.712	24.291	610.258
NORTE	2.115	2.879	3.282	2.748	2.705	5.935	4.777	10.185	10.209	7.385	7.318	9.358	9.720	9.739	11.308	13.117	9.887	11.058	8.078	11.201	11.140	14.389	12.488	14.183	13.297	9.893	228.252
Rorônia	301	261	659	372	33	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	1.980	2.613	2.087	2.131	1.538	42.675
Acre	41	65	65	75	154	204	403	679	364	204	59	252	403	553	372	365	490	413	280	490	503	903	1.298	1.592	1.581	1.275	13.485
Amazonas	1.355	1.357	1.281	1.272	1.352	3.454	1.641	2.528	2.532	1.250	1.733	2.590	3.424	1.982	741	1.557	988	2.290	715	2.072	1.744	2.682	2.333	3.714	2.292	1.851	50.740
Roraima	77	67	57	72	113	134	333	474	170	507	492	605	470	251	303	308	244	145	352	630	499	314	156	284	7.058
Pará	291	450	857	394	594	1.222	1.321	2.855	3.091	2.775	3.269	3.195	2.236	2.543	5.748	7.054	5.042	5.038	2.177	5.051	5.565	7.104	4.657	5.479	5.383	3.955	87.387
Amapá	127	545	323	566	515	694	380	598	590	480	185	394	475	643	895	645	553	902	892	884	592	338	393	413	1.199	517	14.748
Tocantins	5	5	5	5	5	5	5	5	412	556	302	470	581	831	736	863	642	453	821	563	732	695	594	555	462	10.289	
NORDESTE	1.513	1.488	1.872	1.283	1.808	4.417	7.377	11.373	8.882	8.898	12.428	12.020	7.140	8.218	14.428	13.887	11.393	11.888	8.455	9.112	13.078	15.857	11.548	8.802	7.732	7.148	219.910
Maranhão	42	388	246	164	353	1.623	3.274	3.724	2.369	2.195	3.109	3.926	2.027	2.858	6.252	4.725	3.794	4.634	2.355	3.005	4.488	5.245	4.739	3.988	3.123	3.158	76.895
Piauí	61	40	44	34	48	52	91	142	141	100	249	324	161	72	56	40	96	102	96	105	95	205	181	152	77	220	2.895
Ceará	909	873	1.067	840	571	836	1.829	3.919	2.453	2.746	3.848	2.852	1.358	1.453	1.928	4.252	2.793	2.787	1.490	1.372	3.043	4.040	2.405	951	2.068	1.556	54.379
Rio Grande do Norte	2	2	2	1	8	548	30	9	20	6	...	13	4	15	42	49	25	13	11	14	12	7	14	8	958
Paraíba	23	61	72	173	335	251	233	431	234	182	85	155	342	273	264	195	173	233	113	128	177	79	98	58	72	68	4.610
Pernambuco	14	17	32	29	168	259	125	274	268	258	680	474	378	436	806	891	714	867	543	979	1.149	635	675	618	733	317	12.239
Alagoas	18	20	13	27	33	9	13	84	43	36	28	54	53	71	224	114	81	144	72	155	258	155	88	85	67	58	2.005
Sergipe	16	4	3	5	8	45	70	166	34	15	54	50	24	45	46	52	19	47	34	30	58	112	68	20	7	9	1.042
Bahia	430	83	193	9	80	1.341	1.734	1.955	3.300	3.354	4.355	4.159	2.797	2.975	4.835	3.552	3.591	3.205	3.625	3.323	3.799	4.571	3.282	2.123	1.571	1.544	56.859
SUDESTE	834	698	542	699	575	844	983	1.218	2.017	2.241	2.347	3.388	3.854	4.771	3.783	2.805	2.389	2.294	2.845	3.883	2.938	2.941	3.514	3.471	2.472	2.895	69.589
Minas Gerais	421	189	125	130	251	337	444	523	1.405	1.434	1.338	2.134	2.504	2.547	2.040	1.574	1.504	1.445	1.973	2.701	1.874	1.395	2.059	1.922	1.477	1.753	36.601
Espírito Santo	62	78	124	251	224	279	257	288	273	573	670	728	722	893	490	307	244	404	545	884	548	340	222	231	143	165	10.047
Rio de Janeiro	42	70	129	135	100	103	124	71	67	83	227	319	269	495	395	241	282	302	186	269	250	217	342	251	216	287	5.475
São Paulo	109	171	164	92	...	125	138	335	271	151	112	205	359	835	837	483	339	143	140	129	255	88	891	1.057	635	459	8.545
SUL	188	195	194	159	203	420	448	680	199	318	192	139	890	819	1.351	794	616	428	453	457	850	631	1.031	936	580	405	13.315
Paraná	158	195	194	149	200	419	447	652	194	315	192	139	690	819	1.351	794	616	428	453	457	850	631	1.031	936	580	405	13.315
Santa Catarina	0	0	0	0	0	0	0	6	5	3	0	0	0	0	0	0	1	2	2	3	1	3	14	7	19	55	121
Rio Grande do Sul	0	0	0	1	3	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	8	8	8	12	49
CENTRO-OESTE	130	285	220	259	1.088	2.038	1.980	2.807	3.888	2.309	2.468	3.548	3.284	3.907	4.247	5.343	4.721	4.840	2.881	8.384	4.805	4.852	5.440	4.609	4.487	3.972	84.510
Mato Grosso do Sul	18	55	295	298	173	184	155	221	155	304	215	243	558	178	433	255	338	158	349	350	276	195	138	6.599
Mato Grosso	76	138	73	149	699	1.157	1.300	2.281	3.223	1.857	2.021	3.200	2.682	3.345	3.734	4.492	4.195	3.779	2.283	5.504	3.921	4.076	4.521	3.859	3.801	3.357	89.744
Goiás	54	147	147	83	314	585	382	353	459	285	225	191	277	345	270	281	348	414	440	532	525	535	525	443	413	441	9.005
Distrito Federal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	0	14	2	10	1	2	44	31	57	25	181
UF Ignorada	1.033	1.013	897	1.299	1.105	649	112	153	137	140	6.525

FONTE: MS/SVS, SES e SINAN a partir de 1995.

(-) Ausência de informação.

* Dados preliminares.

(5) O Estado de Tocantins foi criado em 1988. O registro de dados até esse ano era feito no Estado de Goiás.

LEISHMANIOSE VISCERAL (CALAZAR) - Distribuição de casos confirmados, por Unidade Federada, Brasil, 1980 - 2005*

UF/Mesorregião	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005*	Total	
BRASIL	184	369	1.120	1.124	2.224	2.488	1.794	1.095	818	1.889	1.944	1.510	1.870	2.570	3.428	3.885	3.248	2.570	1.977	3.824	4.858	3.848	3.102	3.178	3.368	3.203	60.989	
NORTE	0	0	0	0	99	48	12	8	23	29	36	53	89	84	118	117	133	162	112	376	388	440	438	483	539	612	4.288	
Rorônia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amazonas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	...	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Roraima	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	6	41	62	39	21	49	19	12	8	2	13	5	7	27	16	12	344	
Pará	0	0	0	0	99	49	12	8	23	23	22	12	31	33	64	20	45	43	46	188	171	200	205	224	368	338	2.224	
Amapá	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	...	0	0	0	0	0	0	0	0	
Tocantins	&	&	&	&	&	&	&	&	&	1	7	0	6	12	33	48	69	97	58	185	182	235	226	242	155	162	1.718	
NORDESTE	162	337	1.085	1.086	2.088	2.381	1.729	958	718	1.699	1.859	1.380	1.857	2.407	3.183	3.519	2.932	2.257	1.888	2.985	4.029	2.745	1.988	1.989	1.888	1.778	50.185	
Maranhão	41	159	569	422	135	38	42	172	91	61	114	575	534	263	144	116	483	724	842	477	532	789	598	563	8.484	
Piauí	11	68	244	312	435	326	125	46	47	162	201	86	196	701	778	407	239	205	185	348	404	280	234	339	342	293	7.014	
Ceará	75	176	447	443	294	475	259	116	107	169	140	150	159	248	486	490	220	130	158	421	496	396	259	167	293	317	7.081	
Rio Grande do Norte	3	15	22	51	21	32	25	20	17	71	74	147	236	132	135	93	71	115	126	276	332	154	131	65	55	50	2.489	
Paraíba	22	18	18	14	33	58	21	9	9	57	60	92	81	46	91	127	89	72	22	61	108	199	60	80	32	20	1.488	
Pernambuco	13	6	25	26	10	168	120	68	22	106	97	80	60	82	188	273	208	161	110	168	539	217	99	83	85	67	3.081	
Alagoas	8	6	15	26	23	48	64	69	22	60	56	32	40	58	71	111	103	87	35	171	285	292	134	50	59	63	1.888	
Sergipe	16	32	35	24	56	106	109	80	60	47	82	78	119	98	203	256	210	117	1	102	142	107	53	28	30	33	2.284	
Bahia	4	16	248	40	648	746	871	513	350	855	849	654	652	467	697	1.489	1.648	1.254	568	694	881	623	484	359	312	372	18.385	
SUDESTE	9	18	12	6	24	27	38	40	87	125	243	78	98	69	80	171	188	140	88	189	314	274	423	500	753	888	4.682	
Minas Gerais	...	1	4	0	9	22	30	26	52	112	226	62	95	58	88	164	166	138	88	160	218	215	309	345	603	538	3.781	
Espírito Santo	...	2	...	0	10	1	3	13	14	9	15	13	0	0	0	0	0	1	1	29	4	2	0	0	3	4	124	
Rio de Janeiro	9	12	8	5	5	4	3	1	1	4	2	1	0	1	2	7	0	1	0	0	4	1	0	3	3	3	80	
São Paulo	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	88	56	114	151	144	143	887	
SUL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Paraná	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Santa Catarina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rio Grande do Sul	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CENTRO-OESTE	3	8	18	24	11	32	17	28	10	18	18	1	18	20	35	78	15	21	88	96	148	187	255	225	288	225	1.858	
Mato Grosso do Sul	3	4	9	24	4	24	14	27	8	14	5	1	3	3	27	59	12	18	53	47	82	148	217	184	231	190	1.411	
Mato Grosso	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	26	23	14	8	11	20	22	138	
Goiás	...	2	4	0	7	8	3	1	1	2	11	0	15	17	8	19	3	3	22	22	44	25	30	30	17	11	305	
Distrito Federal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	

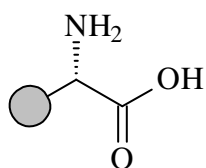
FONTE: MDS/MS, SES e SINAN a partir de 1995.

(...) Ausência de informação.

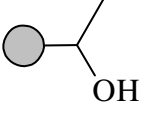
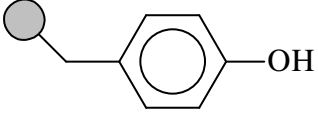
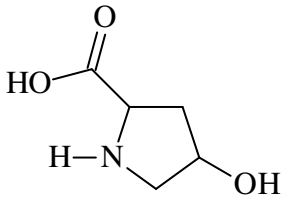
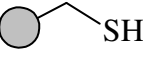
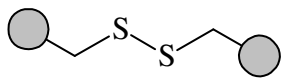
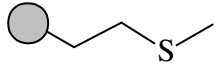
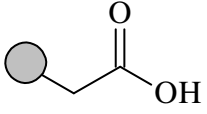
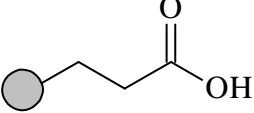
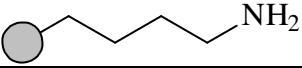
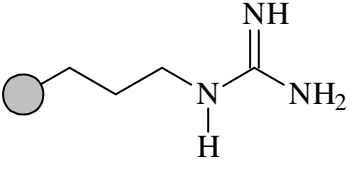
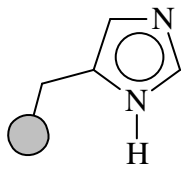
(*) O Estado de Tocantins foi criado em 1988. O registro de dados até este ano era feito no Estado de Goiás.

* Dados preliminares.

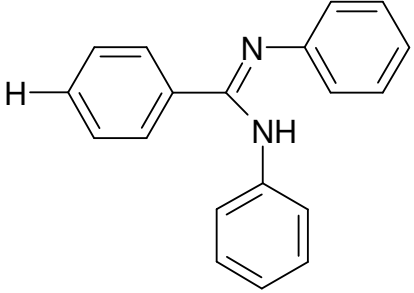
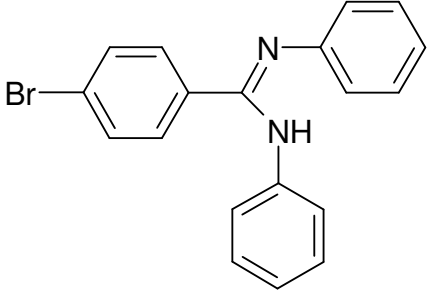
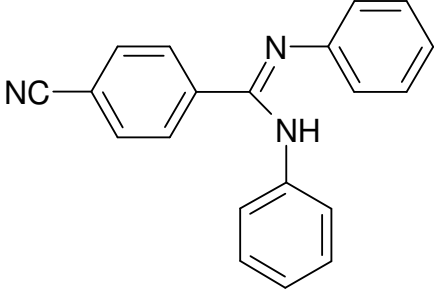
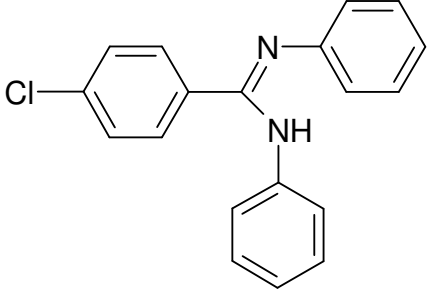
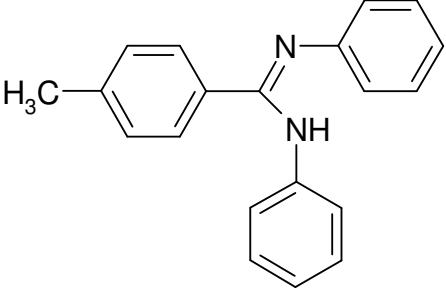
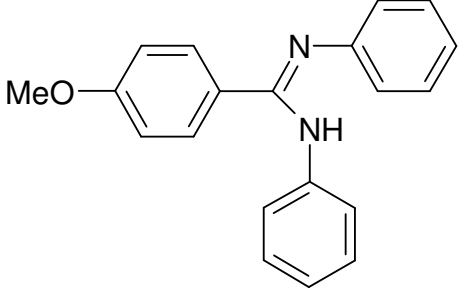
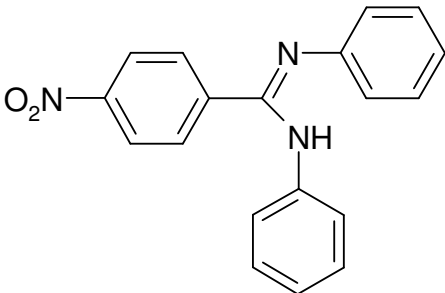
PRINCIPAIS AMINOÁCIDOS DE OCORRÊNCIA NATURAL



R	NOME	ABREVIAT.	pK _{a1} α-CO ₂ H	PK _{a2} α-NH ₃ ⁺	PK _{a3} R
	Glicina	G ou Gli	2,3	9,6	-
	Alanina	A ou Ala	2,3	9,7	-
	Valina	V ou Val	2,3	9,6	-
	Leucina	L ou Leu	2,4	9,6	-
	Isoleucina	I ou Ile	2,4	9,7	-
	Fenilalanina	F ou Fen ou Phe	1,8	9,1	-
	Asparagina	N ou Asn	2,0	8,8	-
	Glutamina	Q ou Gln	2,2	9,1	-
	Triptofano	W ou Tri ou Trp	2,4	9,4	-
	Prolina	P ou Pro	2,0	10,6	-
(ESTRUTURA COMPLETA)					
	Serina	S ou Ser	2,2	9,2	-

	Treonina	T ou Tre ou Thr	2,6	10,4	-
	Tirosina	Y ou Tir ou Tyr	2,2	9,1	10,1
 (ESTRUTURA COMPLETA)	Hidroxirolina (abundante em proteínas estruturais)	Hyp ou Hipro	1,9	9,7	-
	Cisteína	C ou Cis ou Cys	1,7	10,8	8,3
	Cistina	Cis-Cis	1,6 2,3	7,9 9,9	-
	Metionina	M ou Met	2,3	9,2	-
	Ácido aspártico	D ou Asp	2,1	9,8	3,9
	Ácido glutâmico	E ou Glu	2,2	9,7	4,3
	Lisina	K ou Lis ou Lys	2,2	9,0	10,5
	Arginina	R ou Arg	2,2	9,0	12,5
	Histidina	H ou His	1,8	9,2	6,0

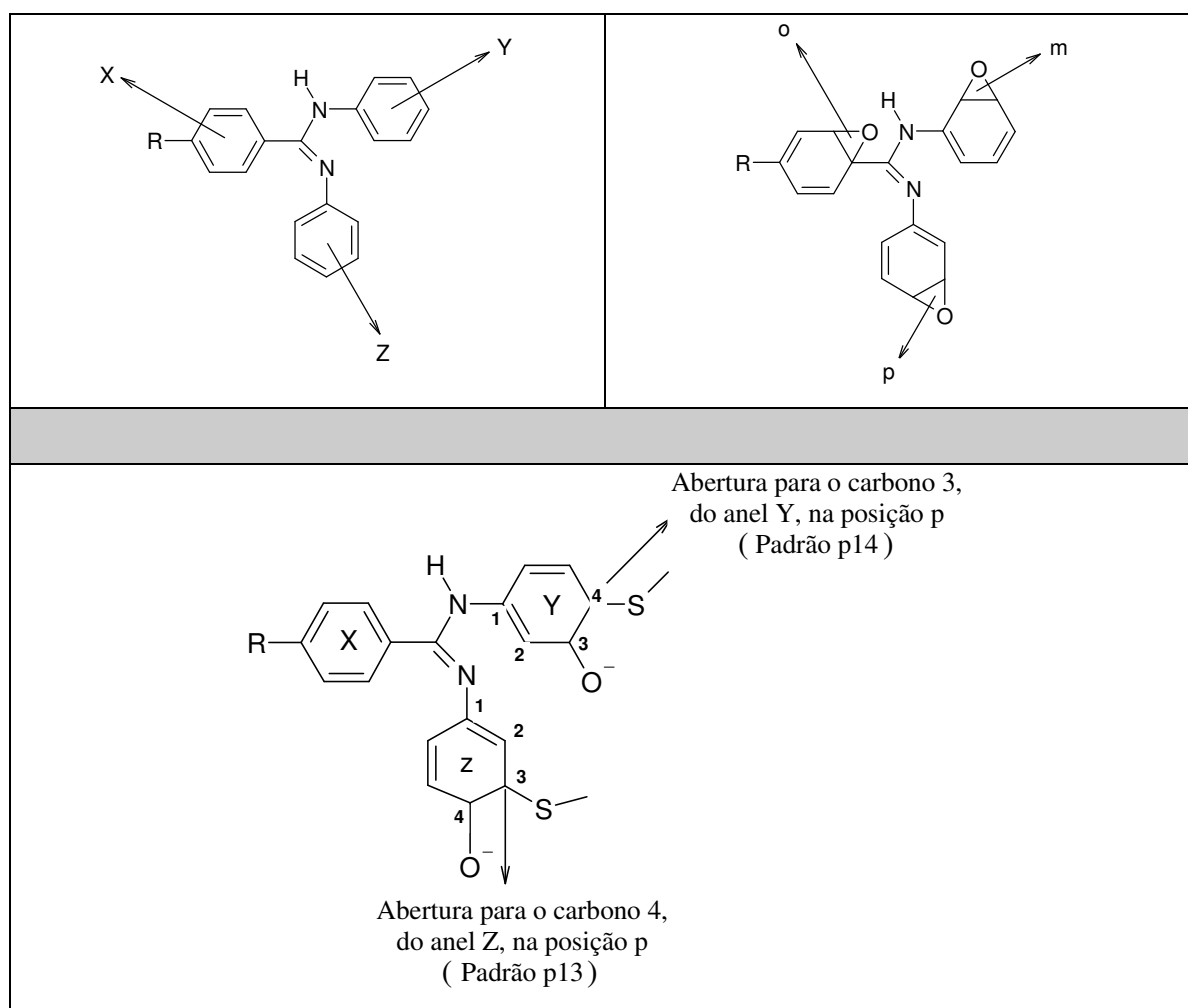
Estruturas das *N,N'*-difenil-4-*R*-benzamidinasR= H, Me, MeO, NO₂, Br, Cl e CN

 <p><i>N,N'</i>-difenilbenzamidina</p>	 <p><i>N,N'</i>-difenil-4-bromobenzamidina</p>
 <p><i>N,N'</i>-difenil-4-cianobenzamidina</p>	 <p><i>N,N'</i>-difenil-4-clorobenzamidina</p>
 <p><i>N,N'</i>-difenil-4-metilbenzamidina</p>	 <p><i>N,N'</i>-difenil-4-metóxibenzamidina</p>
 <p><i>N,N'</i>-difenil-4-nitrobenzamidina</p>	

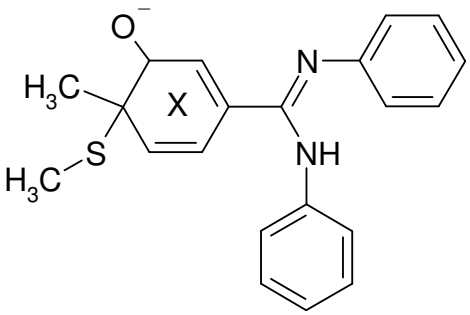
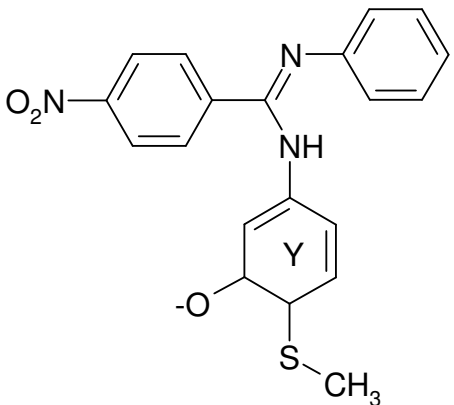
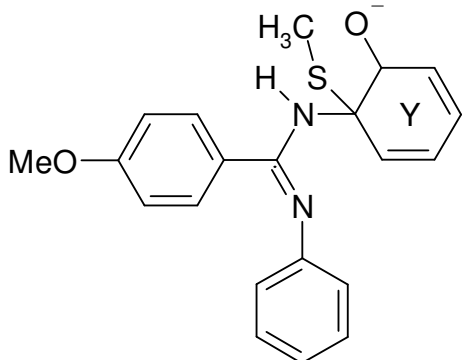
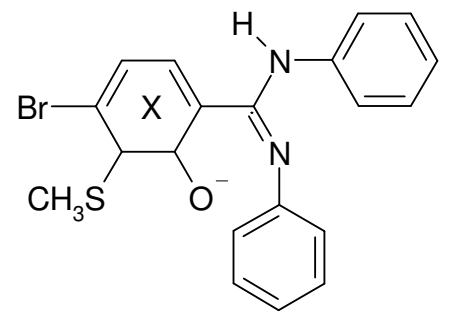
Códigos de descrição das estruturas

Substituinte R	Código
Br	Br
MeO	Mo
NO ₂	Ni
Cl	Cl
CN	Cn
Me	Met
H	A

Padrões de identificação dos anéis, epoxidação e adição de sulfeto



Exemplos de denominação dos derivados epoxidados após a adição de sulfeto:

 <p>Amidina epoxidada no anel X com abertura do epóxido no padrão <i>p</i> para o carbono3 R=Me</p>	 <p>Amidina epoxidada no anel Y com abertura do epóxido no padrão <i>p</i> para o carbono3 R=NO₂</p>
<p>Metxp13</p>	<p>Niyp13</p>
 <p>Amidina epoxidada no anel Y com abertura do epóxido no padrão <i>o</i> para o carbono2 R=MeO</p>	 <p>Amidina epoxidada no anel X com abertura do epóxido no padrão <i>m</i> para o carbono2 R=Br</p>
<p>Moyo12</p>	<p>Brxm12</p>

R = Br		R = MeO		R = NO ₂		R = Br		R = CN		R = Me		R = H	
Composto	ΔH_r	Composto	ΔH_r	Composto	ΔH_r	Composto	ΔH_r	Composto	ΔH_r	Composto	ΔH_r	Composto	ΔH_r
Brxm12	-29,27	Moxm12	-23,20	Nixm12	-33,65	Clxm12	-28,85	Cnxm12	-30,73	Metxm12	-21,74	Axm12	-22,63
Brxm13	-36,74	Moxm13	-18,45	Nixm13	-30,45	Clxm13	-34,27	Cnxm13	-38,34	Metxm13	-34,81	Axm13	-35,43
Brxo11	-30,52	Moxo11	-25,34	Nixo11	-38,40	Clxo11	-30,55	Cnxo11	-34,82	Metxo11	-25,65	Axo11	-25,50
Brxo12	-30,98	Moxo12	-27,10	Nixo12	-34,96	Clxo12	-27,74	Cnxo12	-23,03	Metxo12	-26,16	Axo12	-23,12
Brxp13	-89,55	Moxp13	-25,96	Nixp13	-44,39	Clxp13	-75,33	Cnxp13	-35,63	Metxp13	-16,17	Axp13	-24,64
Brxp14	-28,43	Moxp14	-16,48	Nixp14	-59,95	Clxp14	-23,27	Cnxp14	-52,6	Metxp14	-18,12	Axp14	-25,25
Brym12	-21,19	Moym12	-28,40	Niym12	-35,23	Clym12	-19,57	Cnym12	-38,16	Metym12	-19,92	Aym12	-29,63
Brym13	-25,24	Moym13	-37,25	Niym13	-43,57	Clym13	-26,82	Cnym13	-43,70	Metym13	-23,17	Aym13	-35,20
Bryo11	-28,85	Moyo11	-21,55	Niyo11	-28,41	Clyo11	-27,19	Cnyo11	-28,89	Metyo11	-27,25	Ayo11	-55,61
Bryo12	-34,32	Moyo12	-43,32	Niyo12	-38,37	Clyo12	-33,8	Cnyo12	-34,83	Metyo12	-32,54	Ayo12	-33,79
Bryp13	-26,76	Moyp13	-25,6	Niyp13	-35,25	Clyp13	-27,58	Cnyp13	-29,88	Metyp13	-27,67	Ayp13	-30,00
Bryp14	-30,96	Moyp14	-29,93	Niyp14	-35,56	Clyp14	-30,51	Cnyp14	-32,46	Metyp14	-28,79	Ayp14	-27,97
Brzm12	-29,56	Mozm12	-32,43	Nizm12	-39,88	Clzm12	-29,16	Cnzm12	-46,01	Metzm12	-22,03	Azm12	-23,58
Brzm13	-36,33	Mozm13	-35,44	Nizm13	-42,18	Clzm13	-38,52	Cnzm13	-39,27	Metzm13	-27,45	Azm13	-35,51
Brzo11	-22,63	Mozo11	-26,17	Nizo11	-26,86	Clzo11	-24,19	Cnzo11	-29,63	Metzo11	-23,86	Azo11	-23,50
Brzo12	-36,18	Mozo12	-33,21	Nizo12	-41,51	Clzo12	-34,79	Cnzo12	-36,56	Metzo12	-30,40	Azo12	-30,06
Brzp13	-28,39	Mozp13	-24,39	Nizp13	-118,49	Clzp13	-25,70	Cnzp13	-25,46	Metzp13	-24,39	Azp13	-25,21
Brzp14	-31,55	Mozp14	-22,56	Nizp14	-126,48	Clzp14	-19,96	Cnzp14	-30,27	Metzp14	-22,56	Azp14	-30,17

As variações de entalpia da reação (ΔH_r) foram calculadas a partir da entalpia de formação das amidinas epoxidadas, do metilsulfeto ($H_f = -22,14$), e do produto de adição deste ao anel epoxirânico, através da equação 12. Destacadas em negrito as estruturas que são citadas diretamente no texto.