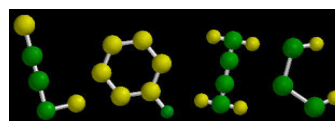
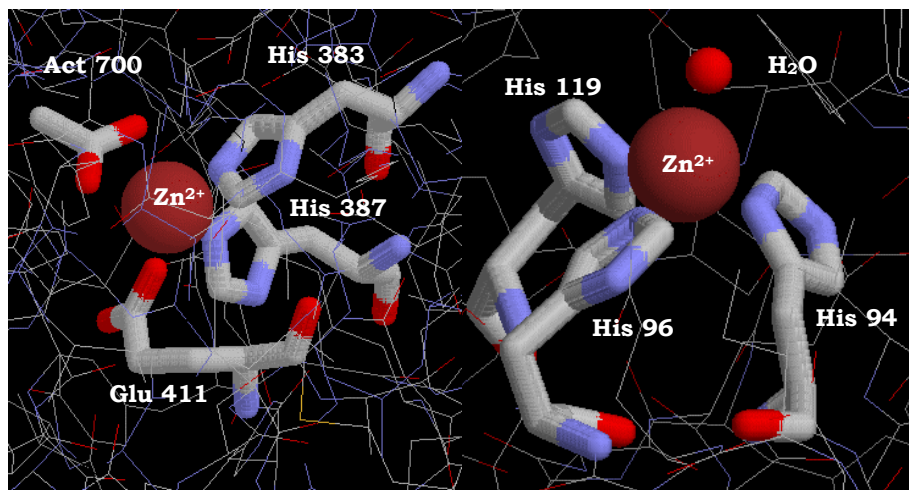




**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÂNICA**

**ESTUDOS UTILIZANDO A TEORIA DO FUNCIONAL DE DENSIDADE DA QUÍMICA DE COORDENAÇÃO DE DERIVADOS N-ACILIDRAZÔNICOS AROMÁTICOS E HETEROAROMÁTICOS CANDIDATOS A INIBIDORES DE METALOEENZIMAS ZN-DEPENDENTES.**



**LQIC-DQI-IQ-UFRJ**

***ANNA MARIA CANAVARRO BENITE***

Agosto de 2005.

**ESTUDOS UTILIZANDO A TEORIA DO FUNCIONAL DE  
DENSIDADE DA QUÍMICA DE COORDENAÇÃO DE  
DERIVADOS N-ACILIDRAZÔNICOS AROMÁTICOS E  
HETEROAROMÁTICOS CANDIDATOS A INIBIDORES DE  
METALOENZIMAS Z<sub>N</sub>-DEPENDENTES.**

***ANNA MARIA CANAVARRO BENITE***

**TESE DE DOUTORADO REALIZADA NO DEPARTAMENTO DE  
QUÍMICA INORGÂNICA DO INSTITUTO DE QUÍMICA E NO  
LABORATÓRIO DE SINTESE E AVALIAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS  
BIOATIVAS DA FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO SOB A ORIENTAÇÃO DOS  
PROFESSORES DOUTORES:**

**SÉRGIO DE PAULA MACHADO (LQIC-DQI-IQ-UFRJ)**

**&**

**ELIEZER J. BARREIRO (LASSBio-UFRJ).**

Rio de Janeiro.

Agosto de 2005.

**ESTUDOS UTILIZANDO A TEORIA DO FUNCIONAL DE DENSIDADE  
DA QUÍMICA DE COORDENAÇÃO DE DERIVADOS N-  
ACILIDRAZÔNICOS AROMÁTICOS E HETEROAROMÁTICOS  
CANDIDATOS A INIBIDORES DE METALOENZIMAS  
Z<sub>N</sub>-DEPENDENTES.**

***ANNA MARIA CANAVARRO BENITE***

**TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO DE  
QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO  
PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE  
DOUTOR EM CIÊNCIAS.**

---

*Prof. Dr.Sérgio de Paula Machado-Orientador*

---

*Prof. Dr.Eliezer J. Barreiro - Orientador*

---

*Prof. Dr.Carlos R. Maurício Sant'Anna*

---

*Prof. Dr.Icaro de Souza Moreira*

---

*Prof. Dr.José Daniel de Figueroa Villar*

---

*Prof. Dr.Roberto de Barros Faria*

---

*Prof. Dr.Juan Omar Machuca Herrera*

Rio de Janeiro  
Agosto de 2005.

BENITE, Anna Maria Canavarro

Estudos utilizando a Teoria do Funcional de Densidade da química de coordenação de derivados *N*-acilidrazônicos aromáticos e heteroaromáticos candidatos a inibidores de metaloenzimas Zn-dependentes. Rio de Janeiro, UFRJ, IQ, 2005. XI, 157p.il.

Tese: Doutor em Ciências (Química Inorgânica)

1. *N*-acilidrazonas 2. Teoria do Funcional de Densidade

3. Inibição enzimática 4. Zinco

I- Universidade Federal do Rio de Janeiro- IQ.

II- Título

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Química Inorgânica Computacional-LQIC-Departamento de Química Inorgânica do Instituto de Química e no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas-LASSBio-Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro sob orientação dos Professores Dr. Sérgio de Paula Machado e Dr. Eliezer J. Barreiro.

*“Eu poderia viver recluso numa casca de noz e me considerar rei do espaço infinito...”*

*Shakespeare, Hamlet, Ato 2, Cena 2*

***A meu eterno amor:  
Claudio R. M. Benite.***

***A minha nova razão de viver: seja  
bem-vindo Igor Canavarro Benite.***

## **AGRADECIMENTOS**

- *Aos professores Dr. Sérgio de P. Machado, Dr. Carlos Maurício R. Sant'Anna e Dr. Eliezer J. Barreiro pelas discussões, esclarecimentos e pela oportunidade de estar aprendendo esta nova linguagem que é a Química Bioinorgânica Medicinal.*
- *Aos Professores Dr. Glaucius Oliva e Dr. Eduardo Ernesto Castellano ( IFSc-USP), pela realização de cristalografia de raios-X em seu laboratório.*
- *À amiga Professora Dr.Bianca da Cunha Machado, pela minha introdução à pesquisa..*
- *Ao Professor Waldemar Silva Costa Unidade de Pesquisa Urogenital (UERJ) pelo incentivo na realização deste trabalho.*
- *Aos Professores Ana Luisa Palhares de Miranda, Carlos Alberto Manssour Fraga e Lídia Moreira pela acolhida.*
- *A todos os meus amigos do LQIC e do LASSBio que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.*
- *Ao meu porto seguro Edméa Campos de Almeida e a minha amiga e irmã Tatiana de Almeida Canavarro, pelo apoio e incentivo.*
- *Aos amigos Carolina Duarte, Heleno J. Bezerra, Débora Faoro, Jorge Tributino, Artur Kümmerle, Fernanda.Guedes e Fernanda Carla que conviveram comigo mais de perto durante a realização deste trabalho.*
- *Aos órgãos de fomento, CNPq, PRONEX, FUJB e FAPERJ pelo suporte financeiro.*
- *A Deus.*



## RESUMO

Dentro de um projeto de pesquisas que visa o planejamento racional, a síntese e a avaliação farmacológica de novos candidatos a inibidores de metaloenzimas dependentes de zinco, o LASSBio descreveu a síntese e avaliação farmacológica de novos derivados *N*-acilhidrazônicos (**1a-44**) aromáticos e heteroaromáticos.

Esta série de *N*-acilidrazonas (NAH's) que pode atuar como inibidor enzimático de toxidez relativamente baixa, foi estudada através de métodos semiempíricos e da Teoria do Funcional de Densidade, utilizando as bases BLYP/6-31G\*\* e B3LYP/6-31G\*\*.

Neste trabalho objetivamos elucidar propriedades moleculares concernentes ao mecanismo de interação de **1a-44** pelas metaloenzimas hidrolíticas: enzima conversora da angiotensina (ACE) e anidrase carbônica (CA). Para tal, as NAH's foram submetidas a estudos de correlação estruturas-propriedade (SPR) através de métodos semiempíricos. Os resultados revelam fatores geométricos e eletrônicos capazes de modular esta interação e demonstram que as NHA's são capazes de coordenar seletiva e especificamente o Zn<sup>2+</sup> tetraédrico do sítio enzimático modificando a esfera de coordenação deste íon através da formação de quelato.

A estrutura do derivado 2-tienilideno 3,4-metilenedioxibenzoilidrazida-LASSBio-294 (C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S) foi determinada por cristalografia de raios-x. Este composto cristaliza em monoclinico, grupo espacial P21/a com  $a= 8.9564(3)$ ,  $b= 12.3242(4)$ ,  $c=11.0686(4)$  Å,  $\beta =91.140(3)^\circ$  e  $Z=4$ . Baseado em estudos teóricos e nestes dados de cristalografia, para este derivado, propomos, neste trabalho um possível mecanismo molecular para a inibição de metaloenzimas Zn-dependentes por NAH's. O

mecanismo proposto envolve quelação do Zn(II) do sítio ativo enzimático através da substituição da molécula de água coordenada ao metal o que favorece o acesso do inibidor ao átomo de Zn.

Adicionalmente, as energias de interação dos complexos formados foram calculadas e corroboraram para a proposição da formação de quelatos. Estes estudos foram baseados na teoria de “dureza e maciez” de Pearson. Estes resultados podem auxiliar no planejamento racional de novas moléculas que possam atuar como inibidores de CA.

## ABSTRACT

In an ongoing research program aiming at the discovery of new candidates to Zn-dependents metalloenzymes inhibitors, the LASSBio previously described the synthesis and the pharmacological evaluation of new aromatics and heteroaromatics *N*-acylhydrazonics derivatives (**1a-44**).

This series of *N*-acylhydrazones (NAH's) derives with might be relatively nontoxic enzymatic inhibitors was studied with semiempirical and *DFT* BLYP/6-31G\*\*, B3LYP/6-31G\*\* methods.

Here we report a investigation in order to predict information's concerning the interaction of **1a-44**, by hydrolytic enzymes: angiotensin converting enzyme (ACE) and carbonic anhydrase (CA). The selected compounds were submitted to studies of structure-properties relationships (SPR) using semiempirical methods. These results rationalize electronics and geometrics factors that modulate binding to CA and shows that the NAH's are able to coordinate selectively specific metal ion  $Zn^{2+}$  tetrahedral of the enzymatic active site modifying these coordination sphere by the formation of five-membered chelate ring of  $Zn^{2+}$ .

The structure of the NAH derivative 2-thienylidene 3,4-methylenedioxybenzoylhydrazide- LASSBio-294 ( $C_{13}H_{10}N_2O_3S$ ) was determined by X-ray crystallography. The compound crystallizes in the monoclinic, P21/a space group with  $a= 8.9564(3)$ ,  $b= 12.3242(4)$ ,  $c=11.0686(4)$  Å,  $\beta =91.140(3)^\circ$  and  $Z=4$ . Based on the theoretical studies and crystallographic data for this derivative, we propose, in this work a possible mechanism for the enzyme inhibition by NAH's, which involves the

chelation of a Zn(II) in the enzyme active site with the complete displacement of a coordinated water to allow access of the inhibitor to the zinc atom. These studies were based in HSAB principle. These results can aid the rational design of new molecules that act as metalloenzymes Zn-dependents inhibitors.

# SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xviii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	xxi
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	xxvi
<b>ÍNDICE DE GRAFICOS</b> .....	xxx
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1- A QUÍMICA BIOINORGÂNICA MEDICINAL.. .....	01
1.2- METALO-BIOMOLÉCULAS: PROPRIEDADES E FUNÇÕES.....	02
1.2.1- FUNÇÕES CATALÍTICAS DOS ÍONS METÁLICOS.....	07
1.3- A QUÍMICA COMPUTACIONAL NA DESCOBERTA DE NOVOS CANDIDATOS PROTÓTIPOS DE FÁRMACOS.....	10
1.4–METAIS: ALVOS TERAPÊUTICOS EM BIOINORGÂNICA MEDICINAL.....	13
1.5- METALOENZIMAS DEPENDENTES DE ZINCO.....	17
1.5.1- ENZIMA CONVERSORA DA ANGIOTENSINA (ACE).....	20

1.5.2-O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (SRA).....	22
1.5.3- ANIDRASE CARBÔNICA (CA).....	23
1.5.4- RESSURGIMENTO DA ANIDRASE CARBÔNICA.....	26
1.6 – N-ACILIDRAZONAS E SUAS PROPRIEDADES.....	27
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	31
<b>3– METODOLOGIA</b> .....	34
3.1-ASPECTOS METODOLÓGICOS GERAIS.....	34
3.2- MÉTODOS QUÂNTICOS SEMI-EMPÍRICOS.....	37
3.2.1- CONSIDERAÇÕES SOBRE O MÉTODO DE HÜCKEL ESTENDIDO....	39
3.3- A TEORIA DO FUNCIONAL DE DENSIDADE ( <i>TFD</i> ).....	40
3.3.1- BREVE HISTÓRICO SOBRE A <i>TFD</i> .....	40
3.3.2- CONCEITOS SOBRE A <i>TFD</i> .....	42
3.3.3- TEOREMAS DE HOHENBERG-KOHN.....	43
3.3.4- AS EQUAÇÕES DE KOHN-SHAM (KS).....	46
3.3.4.1- OS FUNCIONAIS.....	48
3.3.5- O POTENCIAL QUÍMICO E A DEFINIÇÃO DE ELETRONEGATIVIDADE.....	51

3.3.6- O POTENCIAL QUÍMICO E SUAS DERIVADAS: DUREZA E MACIEZ.....	53
3.4- SOBRE A MINIMIZAÇÃO DE ENERGIA ATRAVÉS DE <i>TFD</i> .....	55
3.5- CÁLCULO DE ENERGIA DE INTERAÇÃO.....	58
<b>4 – PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	60
4.1- ANÁLISE CONFORMACIONAL DOS LIGANTES ( <b>1a-44</b> ).....	60
4.2-A OBTENÇÃO DOS DADOS ESTRUTURAIS DAS METALOEENZIMAS PARA SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL.....	61
4.3- VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA.....	64
4.4- ESTUDO DO MECANISMO DE COMPLEXAÇÃO DE METALOEENZIMAS..	64
<b>5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	67
5.1- ESTUDO TRIDIMENSIONAL DA TOPOLOGIA MOLECULAR DOS DERIVADOS <i>N</i> -ACILIDRAZÔNICOS ( <b>1a-44</b> ).....	67
5.1.1-ANÁLISE CONFORMACIONAL DOS DERIVADOS <i>N</i> - ACILIDRAZÔNICOS.....	67
5.1.2- ESTUDO DAS PROPRIEDADES ESTEREOELETRÔNICAS DOS DERIVADOS <i>N</i> -ACILIDRAZÔNICOS.....	76
5.2- ESTUDO DE SPR PARA OS DERIVADOS <i>N</i> -ACILIDRAZÔNICOS ( <b>1a-44</b> ).....	82
5.3- ESTUDO UTILIZANDO EHT DOS DERIVADOS NHA'S <b>1a-44</b> , CANDIDATOS A INIBIDORES DE METALOEENZIMAS Zn-DEPENDENTES.....	84
5.4- VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA.....	88

5.5- ESTUDO UTILIZANDO <i>TFD</i> DOS INIBIDORES DA CLASSE CARBOXIALQUIL <b>53</b> E <b>54</b> COMPLEXADOS A ACE.....	89
5.5.1- ANÁLISE DA ORIENTAÇÃO DOS INIBIDORES CARBOXIALQUIL <b>53</b> E <b>54</b> NO SÍTIO DA ACE.....	90
5.5.2- ANÁLISE DAS INTERAÇÕES DOS INIBIDORES <b>53</b> E <b>54</b> COM O $Zn^{2+}$ DO SÍTIO ATIVO DA ACE.....	91
5.5.3-COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE <i>TFD</i> E OS DADOS CRISTALOGRAFICOS DOS COMPLEXOS FORMADOS ENTRE A ACE E OS COMPOSTO <b>53</b> E <b>54</b> .....	94
5.6-ESTUDO UTILIZANDO <i>TFD</i> DOS INIBIDORES <b>55</b> E <b>56</b> COMPLEXADOS A CA.....	96
5.6.1- ANÁLISE DA ORIENTAÇÃO DOS INIBIDORES <b>55</b> E <b>56</b> NO SÍTIO DA CA.....	97
5.6.2- ANÁLISE DAS INTERAÇÕES DOS INIBIDORES <b>55</b> E <b>56</b> COM O $Zn^{2+}$ DO SÍTIO ATIVO DA CA.....	98
5.6.3-COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE <i>TFD</i> E OS DADOS CRISTALOGRAFICOS DOS COMPLEXOS FORMADOS ENTRE A CA E OS COMPOSTO <b>55</b> E <b>56</b> .....	100
5.7-ESTUDOS UTILIZANDO A <i>TFD</i> PARA OS DERIVADOS <i>N</i> -ACILIDRAZÔNICOS ( <b>1a-44</b> ) CANDIDATOS A INIBIDORES DA ACE.....	102
5.7.1-CONSTRUÇÃO DO MODELO DO SÍTIO ATIVO DA ACE.....	103
5.7.2-GEOMETRIA DE EQUILÍBRIO PARA O COMPLEXO FORMADO ENTRE O MODELO DO SÍTIO ATIVO DA ACE-NAH's.....	107
5.7.3-CÁLCULOS DAS ENERGIAS DE INTERAÇÃO DOS COMPLEXOS NAH's- ACE.....	109
5.8-ESTUDOS UTILIZANDO A <i>TFD</i> PARA OS DERIVADOS <i>N</i> -ACILIDRAZÔNICOS ( <b>1a-44</b> ) CANDIDATOS A INIBIDORES DA CA.....	111



5.8.1- CONSTRUÇÃO DO MODELO DO SÍTIO ATIVO DA CA.....	112
5.8.2- GEOMETRIA DE EQUILÍBRIO PARA OS COMPLEXOS FORMADOS ENTRE O MODELO DO SÍTIO ATIVO CA-NAH's.....	114
5.8.3- INCLUSÃO DE INIBIDORES DA LITERATURA NO MODELO DE INIBIÇÃO CA-NAH's.....	116
5.8.4- CÁLCULOS DAS ENERGIAS DE INTERAÇÃO DOS COMPLEXOS FORMADOS ENTRE O MODELO DO SÍTIO ATIVO CA-NAH's. ....	121
<b>6 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>125</b>
<b>7 – GLOSSÁRIO.....</b>	<b>129</b>
<b>8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>134</b>
<b>9 –ANEXOS DE TRABALHOS SUBMETIDOS DURANTE O PERÍODO DA REALIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO.....</b>	<b>157</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

A-Afinidade eletrônica

ACE-Enzima conversora da angiotensina

AI-Angiotensina I

AII-Angiotensina II

Al- Alumínio

AM1- Austin Model 1

Asp-Aspartato

Azm-Acetazolamida

B3LYP- Modelo Híbrido de Becke e Lee, Yang e Parr

BLYP- Modelo de Becke e Lee, Yang e Parr

CA-Anidrase carbônica

Cel-Celecoxib

Cis- Cisteína

CLOA – Combinação linear de orbitais atômicos

DNA-Ácido desoxirribonucléico

Eal- enalapril

E-Enzima

EHT-Método de Hückel Estendido

EI-Energia de Interação

FEP-Método de perturbação de energia livre

GGAs- Generalized Gradient Approximations

Glu- Glutamina

HF – Hartree Fock

His-Histidina

HK- Hohenberg-Kohn

HOMO – Orbital molecular ocupado de mais alta energia.

HSAB- Hard soft acid base principle

ICAs- Inibidores da anidrase carbônica

I-Inibidor

I-Potencial de ionização

IT- Método de integração termodinâmica

KS – KOHN-SHAM

LASSBio- Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas

LDA- Aproximação da densidade local

Lpr- lisinopril

LQIC- Laboratório de Química Inorgânica Computacional

LUMO- Orbital molecular desocupado de mais baixa energia.

LYP- Lee-Yang-Parr

MEZ- Metaloenzimas

MNDO- Modified Neglect of Diatomic Overlap

NAH's- *N*-acilidrazonas

PA – Pressão arterial

PM3-Parametric Method Number 3

PSI-Fotossistema I

PSII-Fotossistema II

RDO-Ribonucleotídeo Oxidase

RDR-Ribonucleotídeo Redutase

RMN <sup>13</sup>C – Ressonância Magnética Nuclear Carbono <sup>13</sup>C

RMN <sup>1</sup>H – Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio

SPR-Relação Estrutura-Propriedade

SRA- Sistema Renina-Angiotensina

*TFD* – Teoria do Funcional de Densidade

$\theta$  - Ângulo

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-	Algumas das principais áreas de atuação da Química Bioinorgânica Medicinal.....	02
Figura 2-	Diagrama logaritmo das concentrações relativas (mol/L) dos elementos químicos em diferentes ambientes (unidades arbitrárias).....	03
Figura 3-	Funções dos metais na constituição das metalobiomoléculas.....	04
Figura 4-	Estrutura da hemoglobina: o sítio de ligação de oxigênio é um complexo Fe-porfirina.....	05
Figura 5-	Cluster de Fe da Ferredoxina.....	06
Figura 6-	Valores percentuais comparativos entre fármacos empregados na terapêutica.....	11
Figura 7-	Representação das etapas de participação efetiva da química medicinal computacional no desenvolvimento de fármacos.....	13
Figura 8-	Mecanismo de ação de sulfonamidas e sulfonas, 2,4-diaminopirimidinas, biguanidas e triazinas e outros quimioterápicos.....	15
Figura 9-	Inibidores de metalo- $\beta$ -lactamase <sup>a</sup> e transcriptase reversa <sup>b,c</sup> .....	17
Figura 10-	Aspectos estruturais comuns em enzimas dependentes de $Zn^{2+}$ : <sup>(b)</sup> carboxipeptidase, <sup>(c)</sup> anidrase carbônica complexada a sulfato, <sup>(d)</sup> astacina.....	18

Figura 11-	Funções peptidase das enzimas dependentes de $Zn^{2+}$ .....	20
Figura 12-	Funções nuclease das enzimas dependentes de $Zn^{2+}$ .....	20
Figura 13-	Domínios estruturais da ACE somática(sACE) e ACE germinal (gACE).....	21
Figura 14-	As principais funções da ACE, e as condições-chave associadas com a expressão funcional reduzida de cada um dos domínios desta enzima.....	22
Figura 15-	Índices de mortalidade relacionada com a pressão arterial.....	23
Figura 16-	Estrutura da Anidrase Carbônica (Código no Protein Data Bank <i>PDB</i> -1CA2).....	24
Figura 17-	Mecanismo de hidrólise catalisado pela CA.....	25
Figura 18-	Fórmula estrutural geral da hidrazonas.....	28
Figura 19-	Fórmula geral das acilidrazonas.....	29
Figura 20-	Estrutura de <i>N</i> -acilidrazonas utilizadas no tratamento da <i>Thalassemia</i> .....	30
Figura 21-	Derivados <i>N</i> -acilidrazônicos avaliados neste estudo ( <b>1a-44</b> ) como novos protótipos candidatos a inibidores de metaloenzimas dependentes de $Zn^{2+}$ (ACE e CA).....	32
Figura 22-	Estruturas: (a) Inibidor seletivo da ECA, (b) Inibidor seletivo da CA.....	34
Figura 23-	Ângulos diedros, sobre os quais foram realizadas as análises conformacionais.....	61

Figura 24-	Estrutura Cristalográfica da ACE (nativa)-PDB 1O8A.....	62
Figura 25-	Estrutura Cristalográfica da CA (nativa)- PDB 1CA2.....	62
Figura 26-	Estruturas cristalográficas da ACE, co-cristalizada com lisinopropil (a) e enalapril(b). PDB-1O86 e 1UZE.....	63
Figura 27-	Estruturas cristalográficas da CA, co-cristalizada com acetazolamida (a) e celecoxib(b). PDB-2H4N e 1OQ5.....	63
Figura 28-	Estruturas das esferas de coordenação metálicas utilizadas como sondas biológicas no estudo do mecanismo de interação ACE (a) e CA(b) com derivados <i>N</i> -acilidrazônicos ( <b>1a-44</b> ).....	66
Figura 29-	Mínimos de energia para os diastereoisômeros ( <i>E</i> ) e ( <i>Z</i> ) do derivado <b>1a</b> .....	67
Figura 30-	Configuração relativa dos derivados acilidrazônicos <b>1a</b> , <b>27</b> , <b>6</b> e <b>45</b> .....	68
Figura 31-	Mínimos de energia para os diastereoisômeros <i>E</i> do derivado <b>1a</b> .....	71
Figura 32-	Alinhamento do confômero ( <b>26</b> )A com a estrutura cristalina ( <b>26</b> ) (LASSBio 294).....	76
Figura 33-	Estruturas dos derivados <b>46-50</b> .....	78
Figura 34-	Representação gráfica do HOMO para os derivados <i>N</i> -acilidrazônicos <b>1g</b> (W=OH e R=k), <b>1a</b> (W=H e R=k), <b>1b</b> (W=Cl e R=k), <b>6</b> (W=H e R=e), <b>7</b> (W=H e R=f)e <b>12</b> (W=H e R=l) candidatos a inibidores enzimáticos neste estudo.....	79

Figura 35-	Representação gráfica do HOMO dos derivados <i>N</i> -acilidrazônico onde <b>X</b> =CH=CH, <b>R</b> =NO <sub>2</sub> ( <b>51</b> ) e CH <sub>3</sub> ( <b>52</b> ) e <b>W</b> = H obtida por <i>TFD</i> .....	80
Figura 36-	Representação gráfica da superfície de energia potencial do derivado <i>N</i> -acilidrazônico ( <b>1a</b> ) obtida por <i>TFD</i> B3LYP/6-31G**.....	81
Figura 37-	Inibidores escolhidos da literatura para validação da metodologia.....	89
Figura 38-	Estruturas minimizadas e sobrepostas dos complexos de <b>53</b> e <b>54</b> , mostrando a similaridade estrutural entre estes compostos e a orientação adotada no sítio ativo da enzima, após a minimização.....	90
Figura 39-	Representação LIGPLOT da estrutura cristalográfica do complexo formado entre o composto <b>53</b> e ACE.....	92
Figura 40-	Representação LIGPLOT da estrutura cristalográfica do complexo formado entre o compostos <b>54</b> e ACE.....	93
Figura 41-	Estruturas minimizadas e sobrepostas dos complexos de <b>55</b> e <b>56</b> , mostrando a similaridade estrutural entre estes compostos e a orientação adotada no sítio ativo da enzima, após a minimização.....	97
Figura 42-	Representação LIGPLOT da estrutura cristalográfica do complexo formado entre o composto <b>55</b> e a CA.....	98
Figura 43-	Representação LIGPLOT da estrutura cristalográfica do complexo formado entre o composto <b>56</b> e a CA.....	99



Figura 44-	Esfera de coordenação metálica observada na estrutura cristalina da ACE humana, código <i>PDB</i> 1O8A.....	104
Figura 45-	Estrutura teórica proposta (otimizada por <i>TFD</i> método B3LYP/6-31G**) para o complexo formado sítio ativo metálico (biomimetizado) da ACE e os derivados NAH's..	108
Figura 46-	Esfera de coordenação metálica observada na estrutura cristalina da CA humana, código <i>PDB</i> 1CA2.....	112
Figura 47-	Estrutura teórica proposta (otimizada por <i>TFD</i> método B3LYP/6-31G**) para o complexo formado sítio ativo metálico (biomimetizado) da CA e os derivados NAH's....	115
Figura 48-	Estrutura das sulfonamidas: dorzolamida (DZA), acetazolamida (AZA), metazolamida (MZA e diclorofenamida (DCP) e dos coxibs: valdecoxib (1), celecoxib (2), SC-125(3), SC560 (4) e diclofenaco (5).....	116
Figura 49-	Utilização da técnica de hibridação molecular para a proposição de novos candidatos a protótipos de “ <i>Lyfe Style Drugs</i> ”.....	128

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1-	Alguns exemplos de catálise enzimática específica promovida por íons metálicos.....	07
Tabela 2-	Inibidores enzimáticos que exercem sua função através de ligação com metais do sítio ativo enzimático.....	16
Tabela 3-	Alguns exemplos das diferentes funções exercidas pelas metaloenzimas $Zn^{2+}$ .....	19
Tabela 4-	Dados cristalográficos para o derivado <i>N</i> -acilidrazônico <b>26</b> .....	69
Tabela 5-	Coordenadas atômicas ( $\times 10^4$ ) e parâmetros isotrópicos ( $\text{Å}^2 \times 10^3$ ). $U(eq)$ é definido como um dos três traços do tensor ortogonalizado $U_{ij}$ para o derivado <i>N</i> -acilidrazônico <b>26</b> .....	70
Tabela 6-	Comparação entre os principais ângulos de ligação ( $^\circ$ ) calculados por <i>TFD</i> método B3LYP/ 6-31G**, dos conformeros entalpicamente mais estáveis obtidos através da análise conformacional e dados de raios-X do derivado ( <b>26</b> )- LASSBio-294.....	73
Tabela 7-	Comparação entre os principais comprimentos de ligação (Å), calculados por <i>TFD</i> método B3LYP/ 6-31G**, dos conformeros entalpicamente mais estáveis obtidos através da análise conformacional e dados de raios-X do derivado ( <b>26</b> )- LASSBio-294.....	74
Tabela 8-	Entalpias de formação e comparação entre os principais ângulos diedros ( $^\circ$ ) calculados por <i>TFD</i> método B3LYP/	

	6-31G**, dos conformeros entalpicamente mais estáveis obtidos através da análise conformacional e dados de raios-X do derivado ( <b>26</b> )- LASSBio-294.....	75
Tabela 9-	IC50 para os derivados <b>46-50</b> .....	78
Tabela 10-	Avaliação da contribuição eletrônica dos diferentes substituintes W na dureza absoluta de alguns derivados <i>N</i> -acilidrazônicos selecionados.....	83
Tabela 11-	Inibidores da ACE.....	85
Tabela 12-	Distâncias teóricas( <i>TFD</i> método BLYP/6-31G**) relativas às interações entre resíduos de aminoácidos e Zn <sup>2+</sup> da ACE e os compostos <b>53</b> e <b>54</b> .....	94
Tabela 13-	Comparação entre os dados teóricos ( <i>TFD</i> B3LYP/6-31G**) e os dados cristalográficos da geometria de coordenação do íon Zn <sup>2+</sup> do sítio ativo da ACE complexado ao inibidor <b>53</b> .....	95
Tabela 14-	Comparação entre os dados teóricos ( <i>TFD</i> B3LYP/6-31G**) e os dados cristalográficos da geometria de coordenação do íon Zn <sup>2+</sup> do sítio ativo da ACE complexado ao inibidor <b>54</b> .....	95
Tabela 15-	Distâncias teóricas ( <i>TFD</i> método B3LYP/6-31G**) relativas às interações entre alguns resíduos de aminoácidos da CA e os compostos <b>55</b> e <b>56</b> .....	100
Tabela 16-	Comparação entre os dados teóricos ( <i>TFD</i> B3LYP/6-31G**) e os dados cristalográficos da geometria de	

	31G**) e os dados cristalográficos da geometria de coordenação do íon $Zn^{2+}$ do sítio ativo da CA complexado ao inibidor <b>55</b> .....	101
Tabela 17-	Comparação entre os dados teóricos ( <i>TFD</i> B3LYP/6-31G**) e os dados cristalográficos da geometria de coordenação do íon $Zn^{2+}$ do sítio ativo da CA complexado ao inibidor <b>56</b> .....	101
Tabela 18-	Geometria teórica ( <i>TFD</i> método B3LYP/6-31G**) da esfera de coordenação (biomimetizada) do $Zn^{2+}$ na ACE..	106
Tabela 19-	Dados cristalográficos da esfera de coordenação do $Zn^{2+}$ na ACE.....	106
Tabela 20-	Geometria teórica do íon $Zn^{2+}$ dos complexos NAH's-ACE( <i>TFD</i> método B3LYP/6-31G**).....	107
Tabela 21-	Energias de Interação dos complexos NAH'S-ACE (derivados selecionados) ( <i>TFD</i> método B3LYP/6-31G**)..	110
Tabela 22-	Geometria teórica da esfera de coordenação do $Zn^{2+}$ (biomimetizada) na CA( <i>TFD</i> método B3LYP/6-31G**).....	113
Tabela 23-	Dados cristalográficos da esfera de coordenação do $Zn^{2+}$ na CA.....	113
Tabela 24-	Geometria teórica do íon $Zn^{2+}$ dos complexos NAH's-CA( <i>TFD</i> método B3LYP/6-31G**).....	115
Tabela 25-	Dureza absoluta obtida por <i>TFD</i> (método B3LYP/6-31G**) frente dados de inibição <sup>a</sup> da CA para sulfonamidas e coxibs.....	118
Tabela 26-	Energias de interação obtidas por <i>TFD</i> (método B3LYP/6-31G**) para os complexos sulfonamidas-CA e	120

coxibs-CA.....

Tabela 27- Energias de Interação dos complexos formados entre os  
modelo do sítio ativo da CA-NAH'S..... 123

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Energia total do sistema em função do número de elétrons. N corresponde ao número de elétrons do sistema neutro. A inclinação das linhas tracejadas corresponde ao I e A, respectivamente, dentro da aproximação da diferença finita.....	53
Gráfico 2-	O aumento proporcional da dureza absoluta das NAH's com a reatividade atômica dos átomos propostos como sítios de coordenação NAH's-ACE.....	88
Gráfico 3-	Correlação existente entre a dureza absoluta e IC50 para os coxibs e as sulfonamidas.....	119
Gráfico 4-	Correlação existente entre as energias de interação e IC50 para os coxibs e as sulfonamidas.....	121
Gráfico 5-	Correlação existente ente a dureza absoluta dos NAH's <b>1a-44</b> e valores de EI para os complexos modelos NAH's- CA.....	124

*I  
N  
T  
R  
O  
D  
U  
Ç  
Ã  
O*

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1-A QUÍMICA BIOINORGÂNICA MEDICINAL

A Química Bioinorgânica tem como característica seu caráter multidisciplinar, que conecta a química inorgânica, a biologia, a bioquímica e a química medicinal (MONGE, *et al.*, 2000; QUE JR & BANCI, 2002). Este caráter interdisciplinar atinge disciplinas distintas, como a farmacologia, a biologia molecular, a biologia celular, a ecologia química, a química inorgânica e a química ambiental (FARRELL, 2002).

Os elementos químicos inorgânicos desempenham papéis cruciais em processos biológicos, embora se considere que muitos compostos orgânicos, usados na medicina como fármacos, não possuem mecanismo de ação puramente orgânico; alguns são ativados ou biotransformados por íons metálicos incluindo metaloenzimas (MEZ), outros têm efeito direto ou indireto de íons metálicos no metabolismo (GRAY, 1983; SADLER, 1991).

A Química Bioinorgânica estuda as funções, metabolismo e aplicações de íons inorgânicos e seus complexos em sistemas biológicos, correlacionando a atividade biológica apresentada por um sistema inorgânico com suas características estruturais e eletrônicas (BRODERICK, 2003). Está focada em dois objetivos principais:

- o estudo de elementos inorgânicos de ocorrência natural em sistemas biológicos e
- a introdução de metais(do grego “*metallon*” = minas, minerais) em sistemas biológicos através da utilização de metalofármacos (LIPPARD & BERG, 1994; WILLIAMS, 1990, \*).

---

\* Aspectos assessórios, porém relevantes, na Química Bioinorgânica Medicinal incluem o estudo dos elementos inorgânicos em nutrição e sua toxicidade, incluindo as trajetórias pelas quais estes íons, enquanto toxinas, superam os sistemas naturais de defesa e intervenção farmacêutica. Estes aspectos transcendem o escopo deste trabalho.



A Química Bioinorgânica Medicinal se desenha como nova e importante parte da química contribuindo para o desenho de novos agentes terapêuticos conforme ilustrado na Figura 1 (TAKANO *et al.*, 2001).



Figura 1- Algumas das principais áreas de atuação da Química Bioinorgânica Medicinal.

## 1.2-METALO-BIOMOLÉCULAS: PROPRIEDADES E FUNÇÕES

As informações disponibilizadas na Figura 2 indicam que os metais essenciais em biologia são relativamente mais abundantes que os outros. Surge então uma pergunta: Por que a natureza selecionou alguns metais em detrimento de outros? A atividade biológica de um elemento metálico é ditada por uma combinação de sua abundância relativa com sua biodisponibilidade. Isto explicaria, por exemplo, a pequena participação do alumínio, que é o metal mais abundante da crosta terrestre, em processos biológicos notáveis. O Al, apesar de apresentar uma abundância relativa extremamente significativa, só se encontra disponível na crosta terrestre, nos seus estados de oxidação mais altos na forma de óxidos e hidróxidos insolúveis, no pH

fisiológico 6-8, o que acarretará na baixa disponibilidade para ser incorporado ao metabolismo celular (FINNEY & O'HALLORAN, 2003).

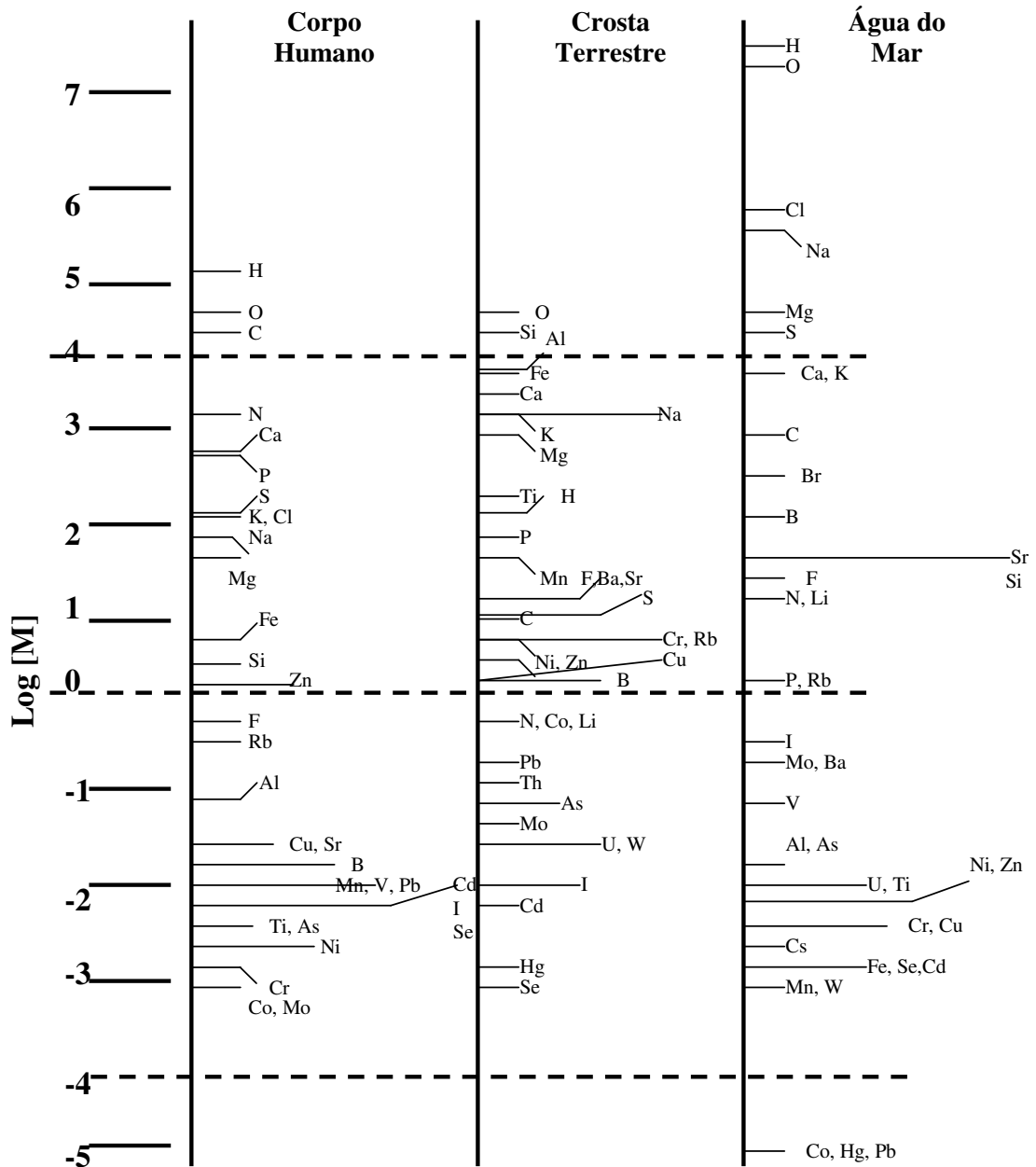


Figura 2 – Diagrama logarítmico das concentrações relativas (mol/L) dos elementos químicos em diferentes ambientes (unidades arbitrárias). Adaptado de B. Mason e C.B.

Moore. 1982. Principles of Geochemistry, 4 ed. Wiley; New York (1982).

Um outro exemplo significativo de um metal muito abundante que não apresentam função biológica expressiva é o titânio. Sua utilização biológica é limitada por conta da dificuldade de solubilizá-lo em seu estado de oxidação mais comum, isto é  $Ti^{4+}$ .

Íons metálicos, enquanto elementos essenciais, funcionam como um componente isolado ou em associação com moléculas orgânicas, e, muito freqüentemente, com uma enzima, tal como pode ser observado na Figura 3.

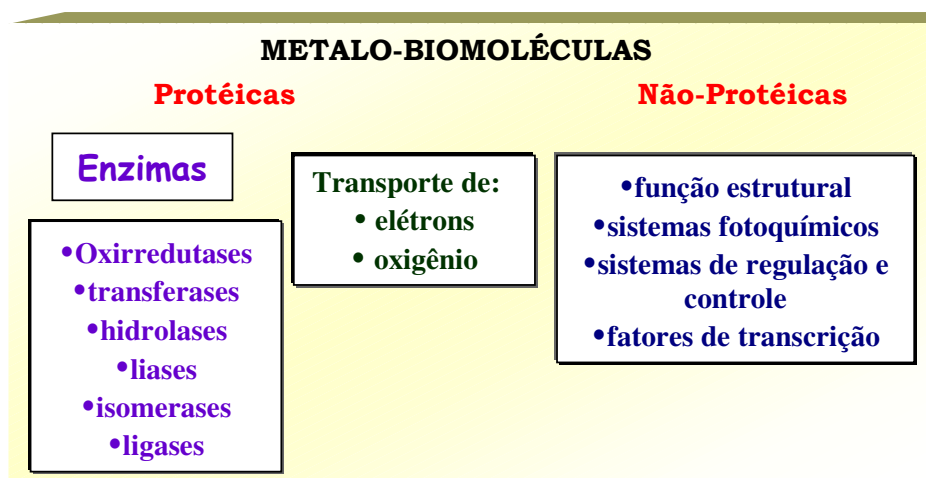


Figura 3 – Função dos metais na constituição das metalobiomoléculas.

Os metais apresentam em muitos casos participação efetiva na constituição protéica desempenhando, assim, uma ampla variedade de funções associadas com a manutenção da vida:

#### *Transporte e ativação de oxigênio*

O transporte, fixação e estocagem de oxigênio são normalmente realizados por uma proteína que contém ferro (hemoglobina, mioglobina, hemeritrinas) ou cobre (hemocianina). A ativação consiste na alteração da estrutura eletrônica e da reatividade do  $O_2$ , induzida pelo metal, fundamentalmente para possibilitar a utilização do oxigênio

pelos sistemas biológicos (SOLOMON *et al.*, 2000).

Nestas proteínas um equilíbrio é alcançado através da ligação da molécula de O<sub>2</sub> com o átomo central de ferro ou cobre, sem passar por transferência eletrônica irreversível ou redox, levando a clivagem e oxidação química concomitante da ligação O – O. Na hemoglobina e mioglobina o sítio de ligação de oxigênio é um complexo Fe – porfirina que sofre mudanças estruturais para ligar O<sub>2</sub> que pode ser observado na Figura 4. A hemocianina é encontrada em alguns moluscos e artrópodes (SOLOMON *et al.*, 2000).

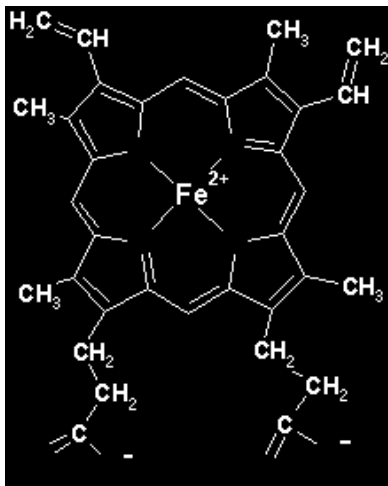


Figura 4 – Estrutura da hemoglobina: o sítio de ligação de oxigênio é um complexo Fe-porfirina.

O N<sub>2</sub> também é transportado e fixado por proteínas que contêm em seu sítio ativo, Mb, Fe ou V e o CO<sub>2</sub> por enzimas que contêm Fe ou Ni.

#### *Transporte de elétrons*

Íons metálicos em diferentes estados de oxidação Fe(II)/Fe(III) (Figura 5), Cu(I)/Cu(II), Mo(IV)/Mo(V)/Mo(VI) são utilizados pelos organismos vivos para o transporte de elétrons. Por exemplo, a transferência é efetuada de um agente redutor

para um oxidante (KHANDELWAL *et al.*, 1987).

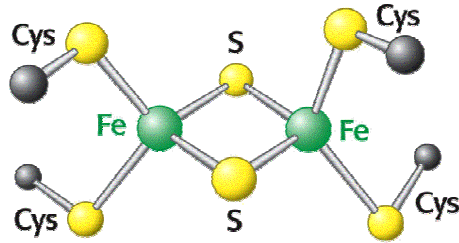


Figura 5 – Cluster de Fe da Ferredoxina.

#### *Função estrutural dos íons metálicos*

Muitas famílias de proteínas que regulam a expressão genética contêm o íon  $Zn^{2+}$ . As MEZ são uma subclasse de metaloproteínas que realizam funções catalíticas específicas. O componente metálico de uma metaloenzima pode manter a integridade estrutural da proteína; ligar-se ao substrato, co-enzima ou ambos na estrutura enzimática ou participar das reações catalíticas e sofrer redução ou oxidação durante reações de transferência de elétrons (HELLINGA, 1998).

A Tabela 1 resume algumas reações catalisadas por MEZ agrupadas por suas funções. Dentro de cada categoria existem muitos centros metálicos chaves que podem catalisar a transformação química necessária. A razão desta diversidade de metais é justificada pela história da evolução humana e também pela biodisponibilidade (CHRISTIANSON, 1997).

Tabela 1 – Alguns exemplos de catálise enzimática específica promovida por íons metálicos.

Molécula reagente	Íon metálico	Enzimas
Glicose, ribose	Co em B <sub>12</sub>	Rearranjos estruturais
CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O	Zn	Anidrase carbônica
Ésteres de fosfato	Zn	Fosfatases alcalinas
	Fe, Mn	Fosfatase ácida
N <sub>2</sub>	Mo, Fe	Nitrogenase
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Mo	Nitrato redutase
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Mo	Sulfato redutase
CH <sub>4</sub> , H <sub>2</sub>	Ni, Fe	Metanogenesi
O <sub>2</sub> → H <sub>2</sub> O	Fe	Citocromo oxidase
	Cu	Lacase
Inserção de O	Fe	Citocromo P-450
SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Fe	Redutases
H <sub>2</sub> O → O <sub>2</sub>	Mn	Geração de oxigênio em plantas
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Cl <sup>-</sup> , I <sup>-</sup>	Fe, Se	Catalase, peroxidase
H <sub>2</sub> O/urea	Ni	Urease

### 1.2.1-FUNÇÕES CATALÍTICAS DOS ÍONS METÁLICOS.

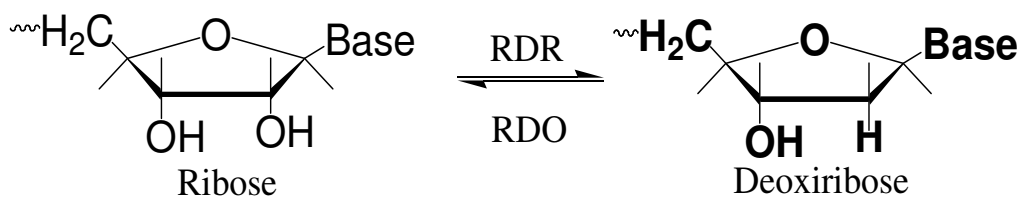
**MEZ hidrolíticas:** estas proteínas catalisam a adição ou remoção de elementos da H<sub>2</sub>O para a molécula de substrato (CAMERON & BAIRD, 2001): *e.g.* a carboxipeptidase e a anidrase carbônica que catalisam a hidrólise do ácido carbônico e apresentam em seu sítio ativo Zn<sup>2+</sup>. Nestas enzimas, o íon metálico atua promovendo a diminuição do pKa da água coordenada a ele através de átomos de oxigênio, visto que, zinco divalente não está prontamente disponível a realização de processos redox (CAMERON & BAIRD, 2001).

**MEZ protetoras:** enzimas que catalisam reações que envolvem oxidação ou redução do substrato. Estas reações estão geralmente relacionadas a um processo redox de 2 elétrons: *e.g.* a catalase e a superóxido dismutase (GRAY, 2003).

**MEZ desidrogenases:** Nos processos redox de 2 elétrons, os sítios catalíticos enzimáticos geralmente são dinucleares e estes centros metálicos funcionam como cofatores mediando transferência eletrônica.

A desidrogenação constitui um outro processo redox de 2 elétrons. A remoção de dois elétrons e dois prótons é equivalente à perda de uma molécula de H<sub>2</sub> do substrato: *e.g.* a álcool desidrogenase do fígado, que apresenta no seu sítio ativo Zn<sup>2+</sup> e catalisa a formação de acetaldeído a partir de álcool. Desidrogenases são sistemas complexos que geralmente envolvem “clusters” Fe-S e Ni (MASON *et al.*, 2003).

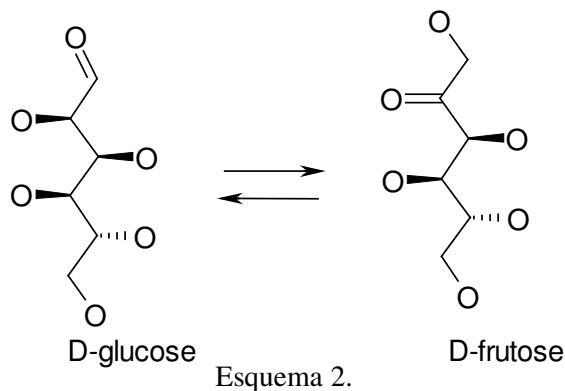
**MEZ envolvidas na formação de nucleotídeos:** as células contêm uma quantidade muito pequena de desoxinucleotídeos, os blocos para construção do DNA. Para iniciar a replicação, ribonucleotídeos são primeiro reduzidos a deoxiribonucleotídeos por uma enzima desta classe de MEZ chamadas ribonucleotídeos redutases (RDR), que removem átomos de oxigênio do substrato, sendo assim responsáveis pelo primeiro passo na biossíntese do DNA, conforme o Esquema 1 (MASON & MOORE; 1982). A ribonucleotídeo oxidase (RDO) torna esta reação reversível.



Esquema 1.

MEZ envolvidas na biossíntese de DNA também apresentam sítios catalíticos com a presença de centros metálicos dinucleares, os quais supõem-se apresentarem função inicial de geradores de radicais e logo após redução atuarem como regeneradores destes radicais (MASON & MOORE; 1982).

**MEZ envolvidas em isomerização:** muitas transformações biológicas não envolvem nenhuma mudança no estado de oxidação do substrato, mas apenas rearranjos, *e.g.*, glicose isomerase - que converte *D*-glicose em *D*-frutose (Esquema 2) e a aconitase, que converte o citrato a isocitrato no ciclo de Krebs (ácido tricarboxílico). Esta enzima é ativada pela adição de ferro como agente redutor. Mudanças no carbono 1,2 necessitam do cofator B-12 (este cofator é um complexo alquil cobalto III). (GRAY, 2003).



Freqüentemente, enzimas que necessitem da vitamina B12 ou seus derivados como cofator utilizam radicais livres presentes no meio extracelular para, através de clivagem homolítica da ligação Co-C, obterem energia para realizarem catálise.

**MEZ fixadoras de nitrogênio:** enzimas que catalisam a redução de  $\text{NO}_3^-$  (nitrato) a  $\text{NO}_2^-$  (nitrito) para absorção de  $\text{N}_2$  pelas plantas verdes, apresentam molibdênio no sítio ativo (ZHANG & LIPPARD, 2003).

**MEZ que atuam na fotossíntese:** os fotocomplexos PSI (fotossistema I) e PSII (fotossistema II) envolvidos na catálise da redução de oxigênio e uma molécula de água apresentam em seus sítios ativos cobre e ferro. Nos processos redox que envolvem muitos elétrons os íons metálicos através, de movimentação eletrônica, geram energia para criar um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana celular. Este



gradiente é convertido à energia química, usando a fosforilação de ADP a ATP e, finalmente, esta energia impulsiona processos redox (ZHANG & LIPPARD, 2003).

Em moléculas não-proteicas, as principais funções dos íons metálicos são funções estruturais. Nos organismos superiores o fosfato de cálcio participa na formação de estruturas ósseas. Nos outros organismos, a função estrutural está associada com SiO<sub>2</sub> ou carbonato de cálcio. Em sistemas fotoquímicos: PSI /PSII e sistemas de regulação e controle: contração de músculo liso, bombas sódio/potássio, regulação osmótica (ZHANG & LIPPARD, 2003).

### **1.3-A QUÍMICA COMPUTACIONAL NA DESCOBERTA DE NOVOS CANDIDATOS PRÓTÓTIPOS DE FÁRMACOS**

No início, a Química Medicinal, esteve baseada em compostos químicos pequenos, prontamente disponíveis na natureza, cuja atividade era descoberta através de observação acidental e muita sorte. Atualmente, produtos naturais representam uma pequena porcentagem do mercado farmacêutico mundial, como ilustrado na Figura 6 (CSIZMADIA & ENRIZ, 2000). O processo completo para o desenvolvimento de um agente terapêutico envolvia uma série de tentativas e erros e o mapeamento do comportamento farmacodinâmico e farmacocinético em laboratório era muito caro e demorado (WESS, 1996), fato que contrasta com a urgência na descoberta de tratamento para as doenças que assolam a humanidade.

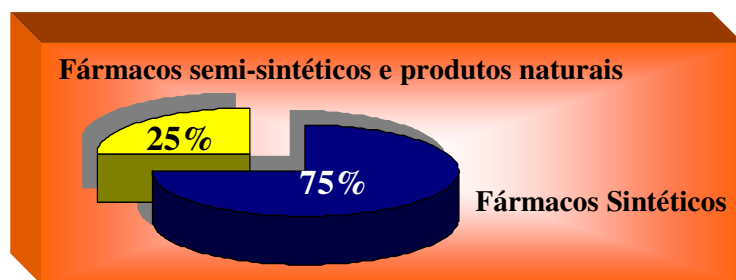


Figura 6- Valores percentuais comparativos entre fármacos empregados na terapêutica.

Os avanços alcançados em química computacional medicinal (tanto em equipamentos quanto em programas) deste o início dos anos 80, resultaram na utilização do planejamento racional na descoberta de fármacos, agora, envolvendo o elemento “design” (COHEN *et al.*, 1990; HANN, 1994). O princípio fundamental do planejamento racional de fármacos é o mecanismo de ação farmacológico (ou abordagem fisiológica) pretendido para o novo fármaco (BARREIRO *et al.*, 2001). A utilização de técnicas adequadas de química computacional, tais como ilustrado na Figura 7, pode antecipar índices relativos de reconhecimento molecular de novos protótipos, identificar diferentes níveis de contribuições farmacofóricas (HÖLTJE, 1996) e conformações bioativas na molécula do protótipo (ITAI *et al.*, 1996), mapear e construir modelos topográficos 3D de sítios de reconhecimento molecular de biorreceptores (BARREIRO *et al.*, 1997), o que permite prever e explicar, mesmo que teoricamente, as propriedades farmacodinâmicas relativas a uma série de moléculas bioativas, orientando o planejamento das modificações moleculares subsequentes, quando necessárias à modulação ou otimização de sua atividade.

Química Computacional significa experimento virtual com resultados científicos reais (HANN & GRENN, 1999). Os métodos mais utilizados em química

computacional são: 1) mecânica molecular ou método do campo de força empírico, (BOYD *et al.*, 1982; CLARK, 1985; BOURAOUI *et al.* 1990; COMBA *et al.*, 1992 e 1996; COMBA, 1993; LILJEFORS *et al.*, 1996; MOULT, 1997; GAJEWSKI *et al.*, 1998); 2) os métodos quanto-mecânicos (*ab initio* e semi-empíricos), como os métodos Hartree-Fock, que utilizam o formalismo da combinação linear dos orbitais atômicos (CLOA), com o objetivo de construir uma série de orbitais moleculares a serem ocupados pelos elétrons presentes na molécula (CLARK, 1985). Como alternativa, a Teoria do Funcional de Densidade (*TFD*) tem emergido como uma poderosa técnica para estudar os sistemas biomoleculares (principalmente os bioinorgânicos), já que pode descrever sistemas relativamente grandes (incluindo, em particular, efeitos de correlação) com um custo computacional significativamente menor que os métodos pós Hartree-Fock\* (MORGON & CUSTÓDIO, 1995). Em particular, o gradiente de correção para o funcional de troca-correlação tem sido um descritor exato para a ligação de hidrogênio, interação crucial em sistemas biológicos (SAGNELLA, *et al.*, 1996; TUCKERMAN, *et al.*, 1997; MOLTENI & PARRINELLO, 1998; ZIEGLER & SELEWSKY, 1998; CHERMETTE, 1998 BRUGE, *et al.*, 1999; SILVESTRELLI & PARRINELO, 1999; DIAZ, *et al.*, 2000; KLEIN, 2001; CARLONI & ROTH LISBERGER, 2001; SULPIZI, *et al.*, 2002; LOVELL *et al.* 2003).

---

\* Nas derivações das equações do funcional de densidade, nenhum parâmetro em princípio necessita ser ajustado ou determinado empiricamente, sob este aspecto a *TFD* pode ser considerada como uma teoria de natureza *ab initio*. O tratamento numérico, em comparação ao método HF, elimina o cálculo das inconvenientes integrais de 2 elétrons e as complicadas técnicas de introdução de correlação eletrônica que surgem nos métodos pós-HF.



Figura 7 – Representação das etapas de participação efetiva da química medicinal computacional no desenvolvimento de fármacos.

#### 1.4-METAIS : ALVOS TERAPÊUTICOS EM BIOINORGÂNICA MEDICINAL

Diversas estratégias modernas de desenho de novos protótipos são conhecidas, em função do mecanismo de ação pretendido, tais como: inibição enzimática, reversível ou não, ou agonismo/antagonismo, competitivo ou não, do receptor, que dependem do

nível de conhecimento de sua topografia (BARREIRO, *et al.*, 2002).

Inibidores enzimáticos se complexam com a enzima de maneira tal que impedem a combinação efetiva da enzima com o substrato natural. Uma vez formado, o complexo enzima- inibidor, o inibidor desempenha a função de um substrato ou bloqueia a reação catalisada pela enzima. As sulfonamidas, por exemplo, parecem atuar pelo primeiro mecanismo e os antifolatos atuam pelo segundo mecanismo, conforme Figura 8 (SILVA, 2002).

A importância da inibição enzimática como mecanismo de ação de fármacos em bioinorgânica medicinal têm sido frequentemente relatada (HELLINGA, 1998; CARUNCHIO, 2002; HAUSINGER & KUCHAR, 2004). A especificidade dos substratos enzimáticos, frequentemente atrelada ao reconhecimento molecular de uma molécula singular, oferece a possibilidade da construção de um fármaco de comportamento cinético e termodinâmico bem-definido (DONIA, 1998). Enzimas podem, ser o alvo terapêutico para fármacos bioinorgânicos, visto que metais desempenham papéis estruturais vitais para o funcionamento de muitas enzimas, tais como metaloenzimas dependentes de zinco. O acesso a um metal endógeno vital para determinada ação enzimática pode resultar na inativação enzimática. Esta mobilização pode ser conseguida através de ações tais como a coordenação de um ligante exógeno ao metal, substituição deste metal, ou ainda remoção deste metal do sítio ativo enzimático (FINNEY & O'HALLORAN, 2003).

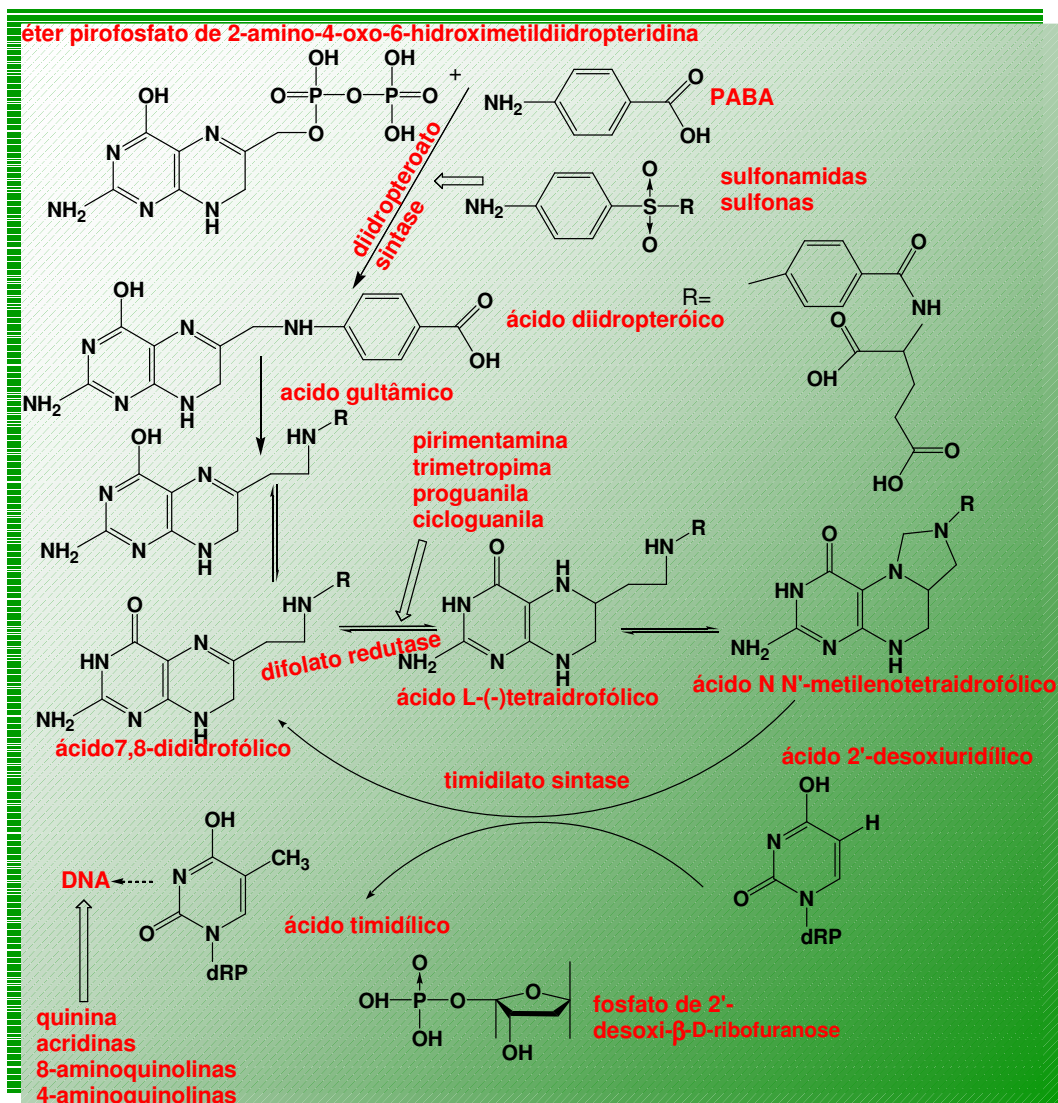


Figura 8- Mecanismo de ação de sulfonamidas e sulfonas, 2,4-diaminopirimidinas, biguanidas e triazinas e outros quimioterápicos (Adaptado de Silva, 2002).

A maioria dos inibidores enzimáticos usados como agentes terapêuticos são moléculas orgânicas, desta forma, as interações predominantemente formadas entre inibidor-enzima são as ligações de hidrogênio e as interações de van der Waals. Portanto, são esperados os indesejáveis efeitos colaterais resultantes de muitas

interações não específicas durante o tempo de permanência do fármaco no organismo. Por outro lado, um grande número de inibidores terapeuticamente ativos, exercendo suas funções através da ligação com um metal do sítio ativo enzimático, têm sido descritos na literatura, conforme tabela 2. Por exemplo: as tetraciclinas, uma família de antibióticos, amplamente utilizada como inibidor de colagenase e de outras metaloproteinases de matriz celular (TONEY *et al.*, 1998); bifenil tetrazolas (Figura 9), que interagem diretamente com o zinco do sítio ativo de metalo- $\beta$ -lactamases, substituindo uma molécula de água por uma ligação metálica (TONEY *et al.*, 1998); fosfonatos, que são descritos como inibidores competitivos da fosfotriesterase de *Pseudomonas* pela quelação de ambos átomos de zinco do centro binuclear no sítio ativo desta enzima (HONG & RAUSHEL, 1997). A quelação metálica é um outro mecanismo muito comum da ação de fármacos: o antagonismo químico (TANDON, *et al.*, 1987; DOMINGO, 1995; ORGIV & ABRAMS, 1999; RICHARDSON, 2002). Desta forma, a coordenação metálica torna-se uma promessa atrativa do ponto de vista em que este reconhecimento molecular é governado através de ligações covalentes e iônicas (LOUIE & MEADE, 1999).

Tabela 2- Inibidores enzimáticos que exercem sua função através de ligação com metais do sítio ativo enzimático.

Inibidor	Metal	Enzima inibida
tetraciclinas	Zn, Ca	Colagenases <sup>a</sup>
bifeniltetrazolas (Figura 4 <sup>a</sup> )	Zn	Metallo- $\beta$ -lactamase <sup>b</sup>
sulfonilamidas	Zn	Anidrase Carbônica <sup>c,d</sup>
Benzimidazolas (Figura 4 <sup>b,c</sup> )	Pd	Transcriptase reversa <sup>e,f</sup>
H	Zn	Enzima Conversora de Angiotensina <sup>g</sup>
tio-compostos	Zn	Dehidrogenase sorbitol <sup>h</sup>
fosfonatos	Zn	Fosfotriesterase <sup>i</sup>

<sup>abc</sup>(TONEY *et al.*, 1998) <sup>d</sup>(SUPURAN & NICOLE, 1996), <sup>e</sup>(BRUNO *et al.*, 1997), <sup>g</sup>(GOODGAME *et al.*, 1982), <sup>h</sup>(LINDSTAD & MCKINLEY-McKEE, 1996), <sup>i</sup>(HONG & RAUSHEL, 1997).

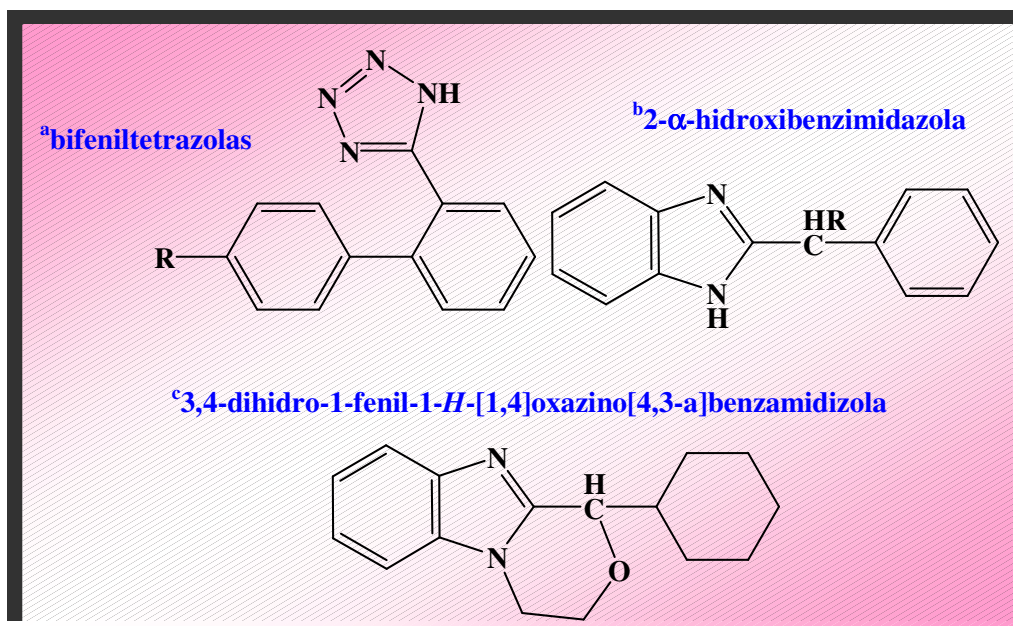


Figura 9 – Inibidores de metalo- $\beta$ -lactamase<sup>a</sup> e transcriptase reversa<sup>b,c</sup>.

### 1.5-METALOENZIMAS DEPENDENTES DE ZINCO

Com aproximadamente 2-3g por cada 70kg de peso corpóreo para manutenção de suas funções vitais, zinco, elemento essencial para o crescimento e desenvolvimento de todas as formas de vida, incluindo microorganismos, plantas e animais (VALLEE & AULD, 1993), é o segundo metal mais abundante no corpo humano (Mc-CANCE & WIDDOWSON, 1942). A primeira metaloenzima dependente de zinco, a anidrase carbônica II (CA II, EC 4.2.1.1), foi descoberta em 1940 por Keilin e Mann. Desde então, mais de trezentas enzimas pertencentes a todas as classes de enzimas foram descobertas (VALLEE & AULD, 1990; CHRISTIANSON, 1991).

Diferentemente dos outros metais da primeira série de transição,  $Zn^{2+}$  apresenta seus orbitais *d* totalmente preenchidos ( $d^{10}$ ) e, desta forma, não participa em reações redox, mas funciona melhor como ácido de Lewis aceitando par de elétrons



(WILLIAMS, 1987). A perda da atividade redox torna  $Zn^{2+}$  um íon estável em meio biológico, cujo potencial é constante. O íon  $Zn^{2+}$  é um cofator metálico ideal para reações que necessitam de um íon para funcionar como catalisador do tipo ácido de Lewis (BUTLER, 1998), tais como proteólise. Além do mais, devido aos orbitais  $d$  de camada fechada,  $Zn^{2+}$  apresentará energia de estabilização do campo cristalino igual a zero (HUHEEY *et al.*, 1993) em todos os arranjos geométricos que possa assumir, e, portanto nenhuma geometria é inerentemente mais estável que outra. Contudo, a geometria de coordenação mais comumente encontrada em metaloenzimas dependentes de  $Zn^{2+}$  é a tetraédrica, onde o metal está no centro tetraédrico, ancorado num esqueleto protéico por três resíduos de aminoácidos, com o quarto sítio sendo ocupado por uma molécula de água cataliticamente muito importante [ $\{XYZ\}Zn^{2+} - OH_2$ ], como ilustrado na Figura 10 (THORP, 1998).

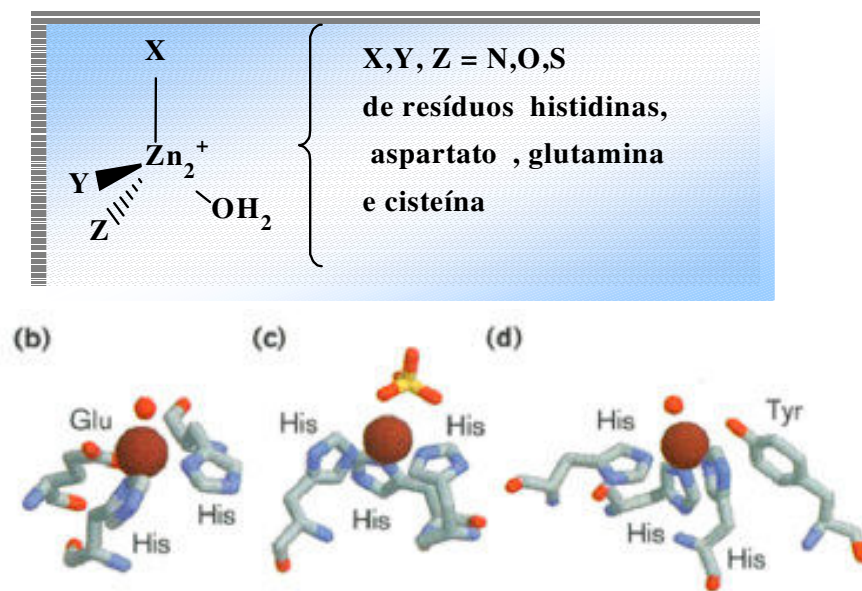


Figura 10 – Aspectos estruturais comuns em enzimas dependentes de  $Zn^{2+}$ : (b) carboxipeptidase, (c) anidrase carbônica complexada a sulfato, (d) astacina.

A despeito da similaridade dos sítios ativos, cada enzima realiza uma função diferente, conforme exemplificado na Tabela 3. É importante notar que não somente são as propriedades catalíticas de uma enzima determinadas pela natureza dos grupos doadores de ligação de hidrogênio, mas também os diferentes comprimentos de ligação entre átomos dos resíduos de aminoácidos e o íon  $Zn^{2+}$  desempenham função na modulação da reatividade do sítio ativo (COLEMAN, 1998; PARKIN, 2000).

Tabela 3 - Alguns exemplos das diferentes funções exercidas pelas metaloenzimas  $Zn^{2+}$ .

<b>X,Y,Z</b>	<b>Enzima</b>	<b>Função</b>
<b>His, His, Glu</b>	Carboxipeptidase	exopeptidase
	Termolisina	endopeptidase
	Protease neutra	endopeptidase
<b>His, His, Asp</b>	Protease da <i>Streptomyces Caespitosus</i>	endopeptidase
<b>His,His,Cis</b>	Bacteriófago T7 lisozima	clivagem da ligação amida entre <i>L</i> -alanina e <i>N</i> -acetilfuramato em polissacarídeos
<b>His, Asp, Cis</b>	Transferase farnesila	transferência da farnesila para o resíduo Cis
<b>His, Cis, Cis</b>	Álcool desidrogenase	oxidação de álcool a aldeídos e

Grande parte da importância conferida as metaloenzimas de  $Zn^{2+}$  deriva de suas atividades enquanto peptidases (Figura 11) e nucleases (Figura 12) (PARKIN, 2004). Fica então evidente que o zinco desempenha diversas funções fundamentais nos sistemas biológicos, e a compreensão detalhada destas funções requer um estudo detalhado de como a química do zinco é modulada por seu ambiente de coordenação.

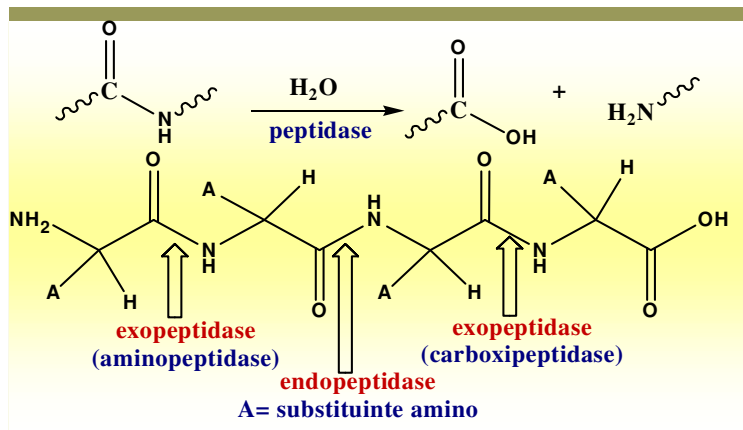


Figura 11 – Funções peptidases das enzimas dependentes de  $Zn^{2+}$ .

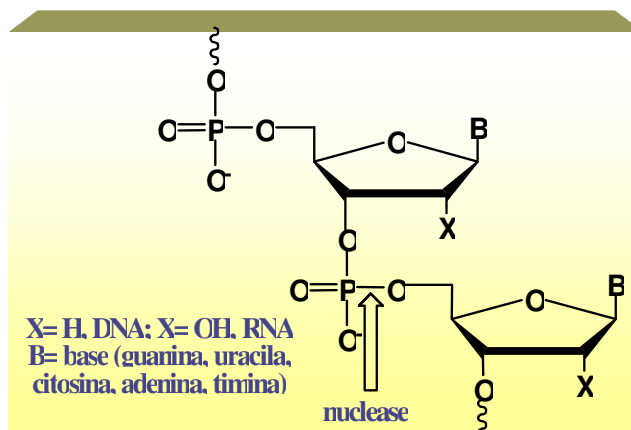


Figura 12 – Funções nucleases das enzimas dependentes de  $Zn^{2+}$ .

### 1.5.1-ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA (ACE)

Duas formas distintas da ACE são atualmente conhecidas em humanos, uma forma somática (s), que é encontrada na maioria dos tecidos, e uma isoenzima menor, a forma germinal (g), que é encontrada exclusivamente nos testículos onde desempenha papel crucial na fertilidade, conforme Figura 13 (TURNER & HOOPER, 2002). A ACE somática é composta de dois domínios *N*- e *C*- funcionalmente ativos. Ambas formas existem nas superfícies celulares, onde hidrolisam peptídeos circulantes (HOOPER,

1991).

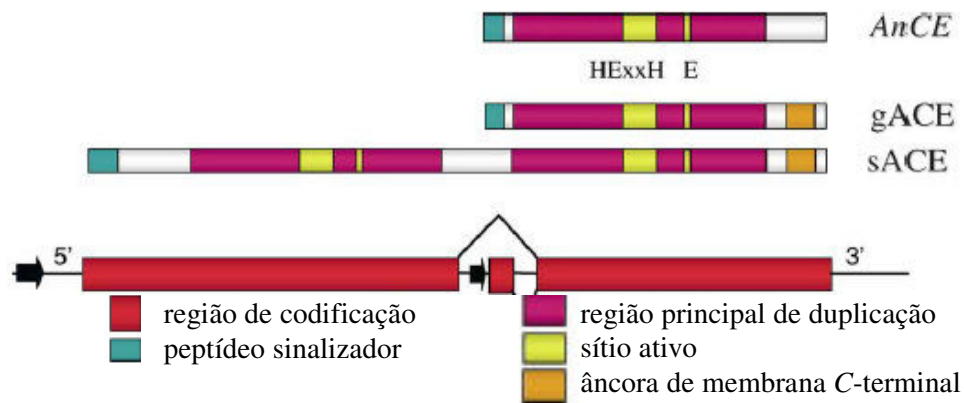


Figura 13 –Domínios estruturais da ACE somática (sACE) e ACE germinal (gACE).

A enzima conversora da angiotensina (ACE, EC 3.4.15.1) é uma metaloenzima dependente de zinco essencial no controle da pressão sanguínea, conforme Figura 14 (WARD *et al.*, 1980; COATES, 2003). Isto faz desta enzima o alvo principal para novos agentes anti- hipertensivos em potencial ( NATESH, *et al.*, 2004).

Inibidores da ACE são amplamente usados no tratamento de doenças cardiovasculares, incluindo pressão alta, doenças coronárias e renais (TABIBIAZAR *et al.*, 2001). A elucidação das bases estruturais do mecanismo de ação da enzima e o conhecimento detalhado da especificidade enzimática são fundamentais para o planejamento racional de novos inibidores da ACE.

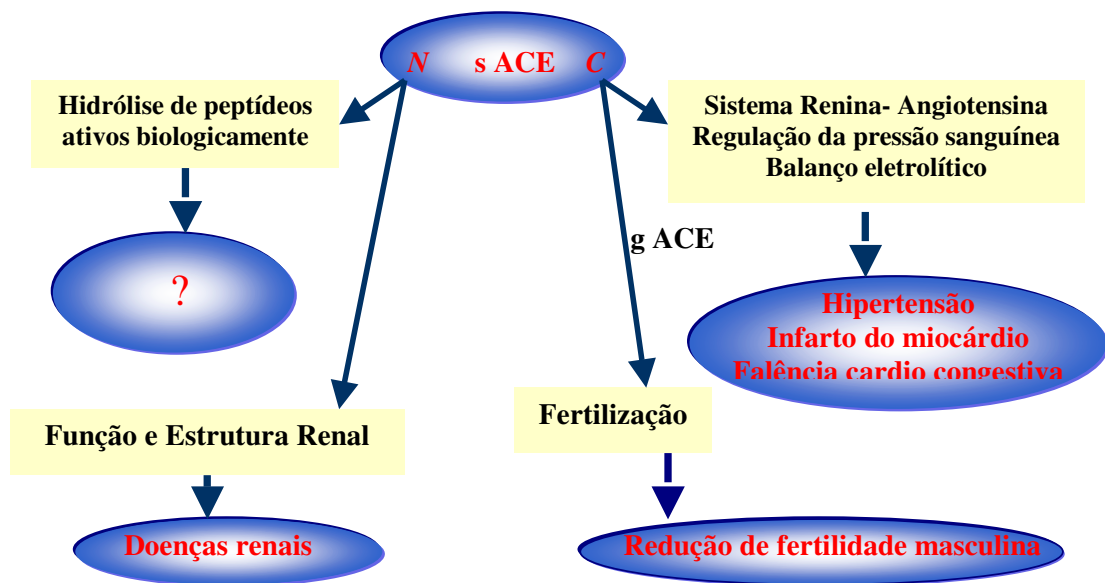


Figura 14 – As principais funções da ACE, e as condições-chave associadas com a expressão funcional reduzida de cada um dos domínios desta enzima.

### 1.5.2.- O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (SRA)

O sistema renina-angiotensina (SRA) é responsável fundamentalmente por regular a pressão arterial (PA) e a homeostase dos eletrólitos em mamíferos (TURNER & HOOPER, 2002). A ativação da cadeia enzimática que culmina com a formação de angiotensina II (AII) começa com a secreção de renina pelos rins. A ACE transforma o angiotensinogênio (produzido pelo fígado e encontrado no plasma) em angiotensina I (AI) através da clivagem da ligação Phe<sup>8</sup>-His<sup>9</sup> (SANTOS *et. al.*, 2000). Essa conversão ocorre durante a passagem da circulação nos pulmões. A AII aumenta a PA por diferentes mecanismos: a) ação vaso constritora direta; b) interação com o sistema simpático; c) exacerbação da resposta ao estímulo alfa-adrenergico ou d) crescimento das células musculares lisas devido a hipertofria muscular. A hipertensão é a patologia

cardiovascular mais comum (BRUNIER & BRUNNER, 2000), conforme ilustrado na Figura 15.

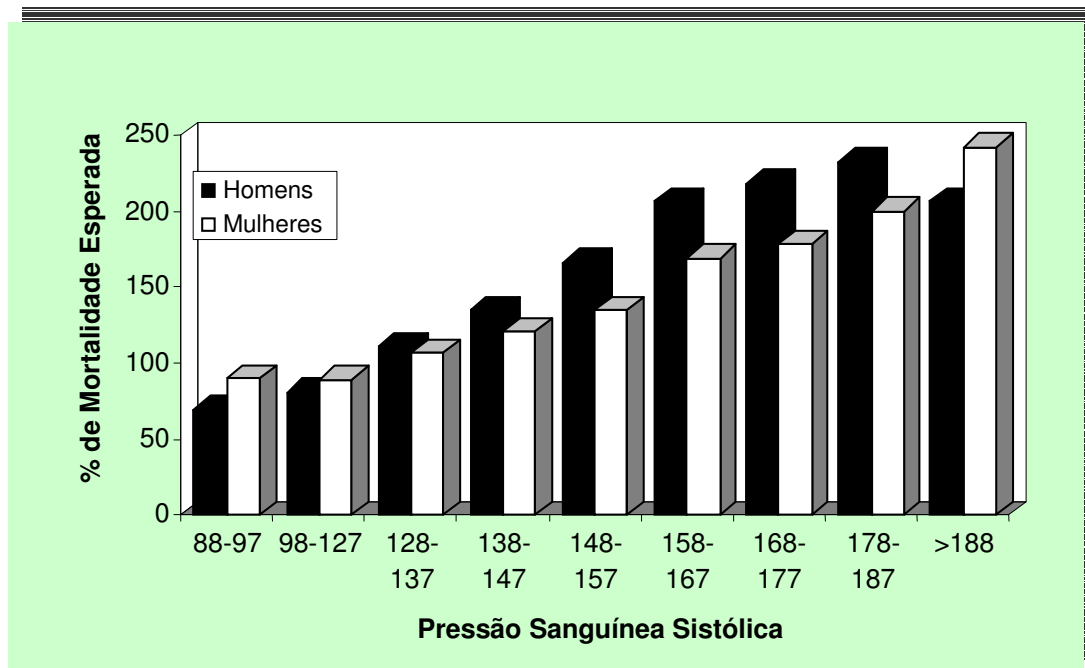


Figura 15 – Índices de mortalidade humana relacionada com pressão arterial.

### 1.5.3-ANIDRASE CARBÔNICA (CA)

A anidrase carbônica (CA; EC 4.2.1.1) (Figura 16), descoberta no início de 1933 (MELDRUM & ROUGHTON, 1933), e mais tarde purificada (KEILIN & MANN, 1940) é uma proteína de 30 kDa predominantemente encontrada nos eritrócitos e, em menor quantidade, em diferentes tipos de tecidos e organelas secretoras. A CA é responsável pela catálise reversível da hidratação de  $\text{CO}_2$  segundo a seguinte reação:  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ . A primeira reação é catalisada pela CA e a segunda ocorre instantaneamente. Dióxido de carbono é essencial para muitos importantes processos fisiológicos envolvendo trocas aniônicas (MAREN, 1988)

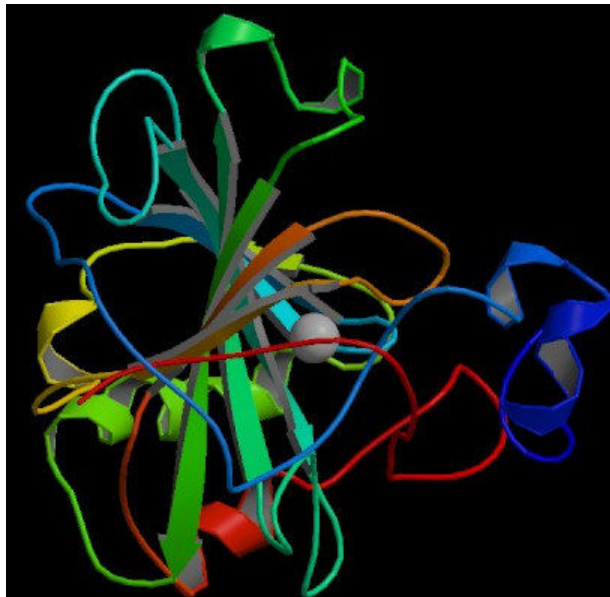


Figura 16- Estrutura da Anidrase Carbônica (Código no *Protein Data Bank PDB-1CA2*)

O sítio ativo da CA consiste em uma cavidade cônica com cerca de 15 Å de largura e 15 Å de profundidade (MUGURUMA, 1998). O átomo de Zn<sup>2+</sup> está coordenado por três anéis de imidazol provenientes de histidinas e por uma molécula de água em um ambiente de coordenação tetraédrico. A carga +2 e o pequeno raio iônico contribuem para a diminuição do pKa da água coordenada ao Zn<sup>2+</sup>, promovendo sua ionização como um ácido fraco segundo o mecanismo de reação ilustrado na Figura 17 (MERZ *et al.*, 1989; LIPTON *et al.*, 2004).

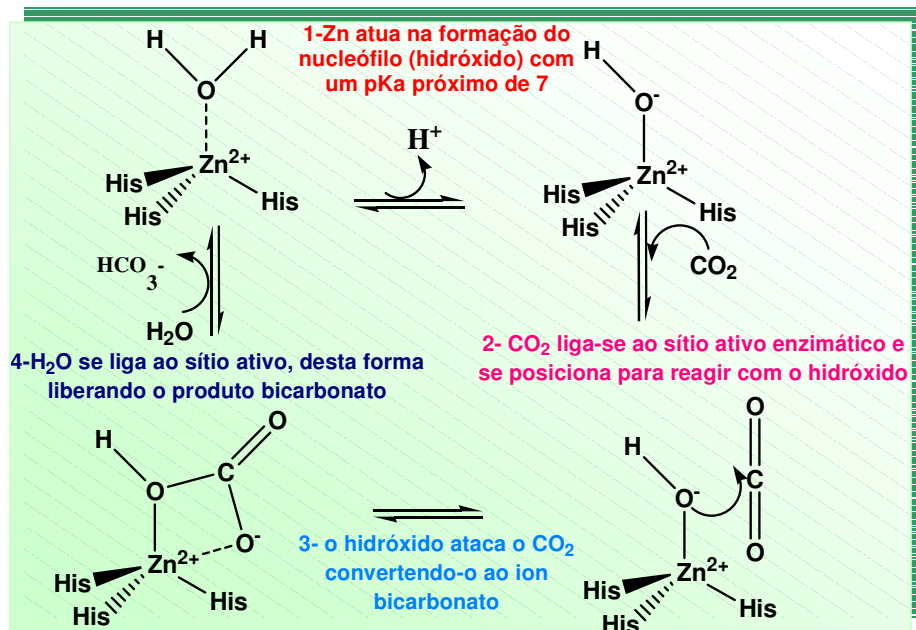


Figura 17- Mecanismo de hidrólise catalisado pela CA.

Inibidores da anidrase carbônica (ICAs) são conhecidos notoriamente como diuréticos que atuam no túbulo proximal, embora apresentem uma ação diurética apenas moderada. A CA é encontrada, sobretudo, em células do túbulo proximal, tanto no citoplasma quanto na membrana apical e basolateral. No espaço intracelular, esta enzima atua e libera o íon hidrogênio que é secretado para a luz tubular, em troca pelo sódio (HUANG, *et al.*, 1998). Uma vez na luz o  $H^+$  é responsável pela produção do  $CO_2$  em presença da anidrase carbônica presente na orla em escova da célula tubular proximal. O resultado final é a reabsorção tubular de bicarbonato de sódio e de água. Os ICAs inibem tanto a enzima citossólica quanto a ligada á membrana tubular e promovem a redução do ritmo de filtração glomerular causando aumento discreto da excreção urinária de sódio, potássio bicarbonato e fosfato (LINDSKOG, 1997).

A CA também é encontrada em células extra-renais, incluindo células dos olhos,



mucosa gástrica, pâncreas, sistema nervoso central e hemácias. A CA está envolvida na formação de bicarbonato de sódio no humor aquoso, pelos processos ciliares. Neste caso, os ICAs reduzem a formação do humor aquoso, conseqüentemente reduzindo a pressão intra-ocular e justificando o seu uso no tratamento do glaucoma e de edemas maculares (SHARIR, *et al.*, 1994; JAANUS, 1997).

#### **1.5.4-RESSURGIMENTO DA ANIDRASE CARBÔNICA**

A utilização de ICAs como diuréticos foi abandonada devido a sua ação moderada. Na última década, ICAs ressurgiram sendo amplamente utilizados como agentes terapêuticos no tratamento ou prevenção de muitas patologias (EPOSITO *et al.*, 2000; CECCHI, *et al.*, 2004; PASTOREKOVA, *et al.*, 2004). Este fato se deve principalmente à ampla distribuição de quatorze isoenzimas CA em humanos. A grande parte destas isoenzimas é enzimaticamente ativa, e desempenha papel fundamental em muitos processos fisiopatológicos incluindo doenças renais, reprodução masculina, acidose respiratória, remodelação óssea, glucogenese, transdução e formação do ácido gástrico (BRETON, 2001). Altas concentrações de CAI são expressas nas hemácias, CAII é dominante no humor aquoso dos olhos e CAIII está presente no citoplasma e células do tecido muscular. A única CA de membrana em mamíferos é a CAIV, que está ligada às membranas nos pulmões, fígado, cérebro e olhos. CAV é expressa em mitocôndrias, enquanto as isoenzimas CA VI E VII são detectadas na saliva e glândulas salivares (BAIRD, *et al.*, 1997).

CA II e CA IV estão diretamente envolvidas na hidratação do CO<sub>2</sub> (MAREN, 1984). Estudos de imunohistoquímica determinaram que CAII é a isoenzima mais abundante nos olhos, com altas concentrações encontradas em células epiteliais processos ciliares, células Muller da retina, e células fóton-receptoras (HAGEMAN, *et*

*al.* 1991). Ensaios de imunomarcção determinaram que a CAIV está localizada nas células endoteliais, na membrana plasmática e superfície exterior em ambas células epiteliais das superfícies basolaterais e apicais (HAGEMAN, *et al.*, 1991).

As recentemente identificadas isoenzimas IX e XII estão relacionadas com proliferação celular e oncogenese (TURECI, *et al.*, 1998) e agregaram um novo perfil aos ICAs, agora estudados como potenciais fármacos anti-tumorais (ZAVADA, *et al.*, 1993; PASTOREK, *et al.*, 1994).

A CA é uma metaloenzima ubíqua presente em procariotes e eucariotes, sendo classificada em cinco famílias genéticas evolucionárias distintas: a classe- $\alpha$  (presente em procariotes, algas, citoplasmas de plantas verdes e vertebrados), a classe- $\beta$  (predominantemente em bactérias, algas e cloroplastos), a classe- $\gamma$  (principalmente encontrada em *Archaea* e algumas bactérias), a classe- $\delta$  (encontrada nas espécies marinhas) e a mais recentemente isolada  $\epsilon$ -CA (encontrada em cianobactérias) (INNOCENTI, *et al.*, 2004). Estas enzimas são eficientes catalisadores da hidratação de CO<sub>2</sub>, porém a família  $\alpha$  possui uma alta versatilidade, sendo capaz de catalisar outros diferentes processos hidrolíticos tais como a hidratação do cianeto a ácido carbâmico, ou da cianamida a uréia; a hidratação de aldeídos a dióis; a hidrólise de ácidos carboxílicos, ou ácidos sulfônicos, bem como outros processos hidrolíticos menos investigados, tais como a hidrólise de derivados halogenados e outros substratos. (INNOCENTI, *et al.*, 2004, PASTOREKOVA, *et al.*, 2004).

## 1.6- N-ACILIDRAZONAS E SUAS PROPRIEDADES

Hidrazonas são azometinas caracterizadas pelo grupamento >C=N-N<. Elas são diferentes dos outros membros desta classe (iminas, oximas, etc.) pela presença de dois

átomos de nitrogênio interligados. O grupamento hidrazona ocorre em compostos orgânicos de dois tipos, conforme a Figura 18.

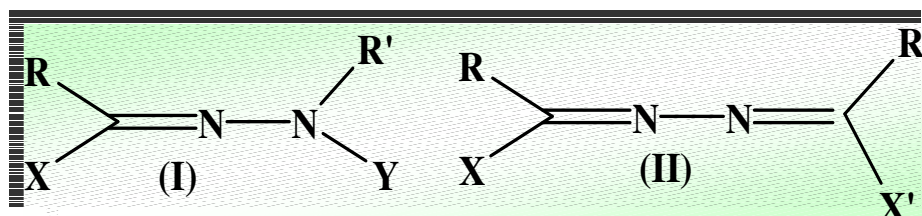


Figura 18 – Fórmula estrutural geral das hidrazonas.

Onde R e R' = H, alquila (Alq), arila(Ar), RCO, grupo heterociclíco(Ht); Y= H, Alq, Ar, Ht, RCO; X e X' = H, Alq, Ar, Ht, halogênios (Hl), OR", SR, CN, SO<sub>2</sub>R, NO<sub>2</sub>, NHNR"R", N=NR", COOR", CONR"R". O termo geral "hidrazona" é utilizado para todos os compostos que apresentam a estrutura I. Os compostos do tipo II também são chamados de azinas.

Hidrazonas fisiologicamente ativas encontram aplicações no tratamento de doenças tais como tuberculose, hanseníase e desordens mentais, e aroilidrazonas também são conhecidas por apresentarem atividade contra o bacilo da tuberculose (DONGLI, *et al.*, 1994; RICHARDSON, 2002). Estas atividades são atribuídas à formação de quelatos estáveis com metais de transição presentes no meio intra e extracelulares. Assim, muitas reações enzimáticas vitais, catalisadas por estes metais de transição, podem não acontecer na presença de hidrazonas.

Hidrazonas também agem como herbicidas, inseticidas, nematocidas, rodenticidas e reguladores do crescimento de vegetais (RICHARDSON, 1997). Elas apresentam atividade antiespasmódica, ação hipotensiva e atividade frente à leucemia, sarcomas e outros neoplasmas malignos (MORGAN, 2002; SHRIVASTAV, *et al.*,

2002; MOHAN, *et al.* 1987; DONGLI, *et al.*, 1994). As hidrazonas também são utilizadas como plastificadores e estabilizadores para polímeros e como inicializadores do processo de polimerização, antioxidantes, etc (SINGH, 1982).

A 2-metilftalazona é um efetivo esterilizante para mosca doméstica. A 3-*N*-metil-*N*-(4-cloro-1-ftalazinila) e a 3-*N*-metil-*N*-(4-oxo-1-ftalazinila) possuem atividade anti-helmíntica. A literatura relata ainda atividade antimalárica (GOKHALE, *et al.*; 2003; WALCOURT, *et al.*, 2004; O'NEILL, *et al.*, 1997; KUMAR, *et al.*, 2002), antifúngica (CARCELLI, *et al.*, 1995), antibacteriana (BACCHI, 1999), antiinflamatória (BARREIRO, *et al.*, 2002), e anti-trombótica (MABEZA, *et al.*, 1999; FRAGA, *et al.*, 2000) descrita para *N*- acilidrazonas (Figura 19).

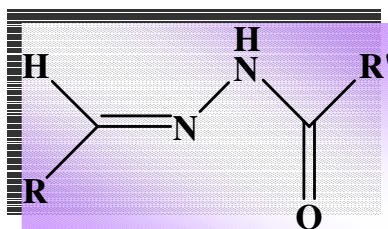


Figura 19 – Fórmula geral das acilidrazonas.

As *N*-acilidrazonas (NAH's) têm sido intensamente investigadas como candidatos a fármacos por, além de formarem quelatos estáveis com diferentes íons metálicos, apresentarem atividade farmacológica em vários quadros fisiopatológicos (BARREIRO, *et al.*, 2002; GIORGI, *et al.*, 1998; WALCOURT, *et al.*, 2004; MABEZA, *et al.*, 1999). Por exemplo, NAH's (Figura 20) têm sido estudadas como potentes fármacos para o tratamento do excesso da concentração de ferro no metabolismo apresentado por indivíduos portadores da *Thalassemia*, com resultados promissores (LANTHIER *et al.*, 1997). O que mais chama atenção para esta classe de

moléculas é a observação que a toxidez associada a agentes quelantes metálicos é menos pronunciada na presença de NAH's.

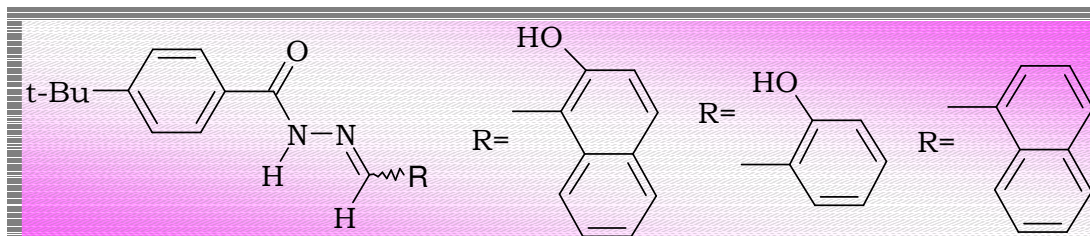


Figura 20 – Estrutura de *N*-acilidrazonas utilizadas no tratamento da  
Thalassemia. (LANTHIER et al., 1997).

Recentes estudos teóricos do LASSBio revelaram que certas NAH's (derivadas do salicilaldeído) podem ser inibidores específicos para cisteína protease (IFA, *et al.*, 2000). A possibilidade de que as NAH's também possam atuar como quelantes não tóxicos de íons metálicos divalentes em mecanismos de inibição enzimática nos levou a estudos teóricos detalhados da topologia molecular tridimensional de uma ampla classe de derivados *N*-acilidrazônicos, funcionalizados, sintetizados por nosso laboratório.

*O  
B  
J  
E  
T  
I  
V  
O  
S*

## 2. OBJETIVOS

Como descrito anteriormente, as metaloenzimas dependentes de zinco são um alvo interessante para o desenvolvimento de novos fármacos. Sendo assim, o estudo da ACE e da CA e de seus mecanismos de interação com inibidores é uma etapa crucial no desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes, sejam estes anti-hipertensivos, no caso da ACE, ou diuréticos ou ainda anti-tumorais, em se tratando da CA.

No âmbito de uma linha de pesquisa que visa o planejamento racional de fármacos, foram sintetizados no LASSBio uma série de derivados *N*-acilidrazônicos funcionalizados, ilustrados na Figura 21, que apresentaram atividades analgésicas e anti-trombóticas (MATHEUS *et al.*, 1991) e que foram identificados como potenciais quelantes metálicos não tóxicos (IFA, *et al.*, 2000). Este trabalho consiste no estudo teórico detalhado da topologia molecular tridimensional desta classe de derivados *N*-acilidrazônicos e do mecanismo de interação destes com a ACE e a CA, através de um acoplamento de técnicas de Modelagem Molecular.

Em um contexto químico-bioinorgânico-medicinal, este trabalho objetivou o uso de uma metodologia teórico-computacional que permitisse uma análise qualitativa e semiquantitativa do perfil de coordenação de ACE e AC com seus inibidores usuais, utilizando cálculos quânticos semi-empíricos e a Teoria do Funcional de Densidade (PARR & YANG, 1995). Objetivamos a simulação computacional desta série de compostos (**1a-44**), visando a inibição seletiva das enzimas ACE e AC. Esta simulação empregou numa primeira etapa, os métodos semi-empíricos AM1 (DEWAR *et al.*, 1985) e PM3 (STEWART, 1989) para estudar as conformações dos derivados (**1a-44**). Em seguida, empregamos a metodologia proposta por Dronskowski (1992), adaptada ao método de Hückel Estendido (HOFFMAN, 1963), no LQIC, para avaliar a influência

dos átomos envolvidos na complexação e na estabilidade final do complexo.

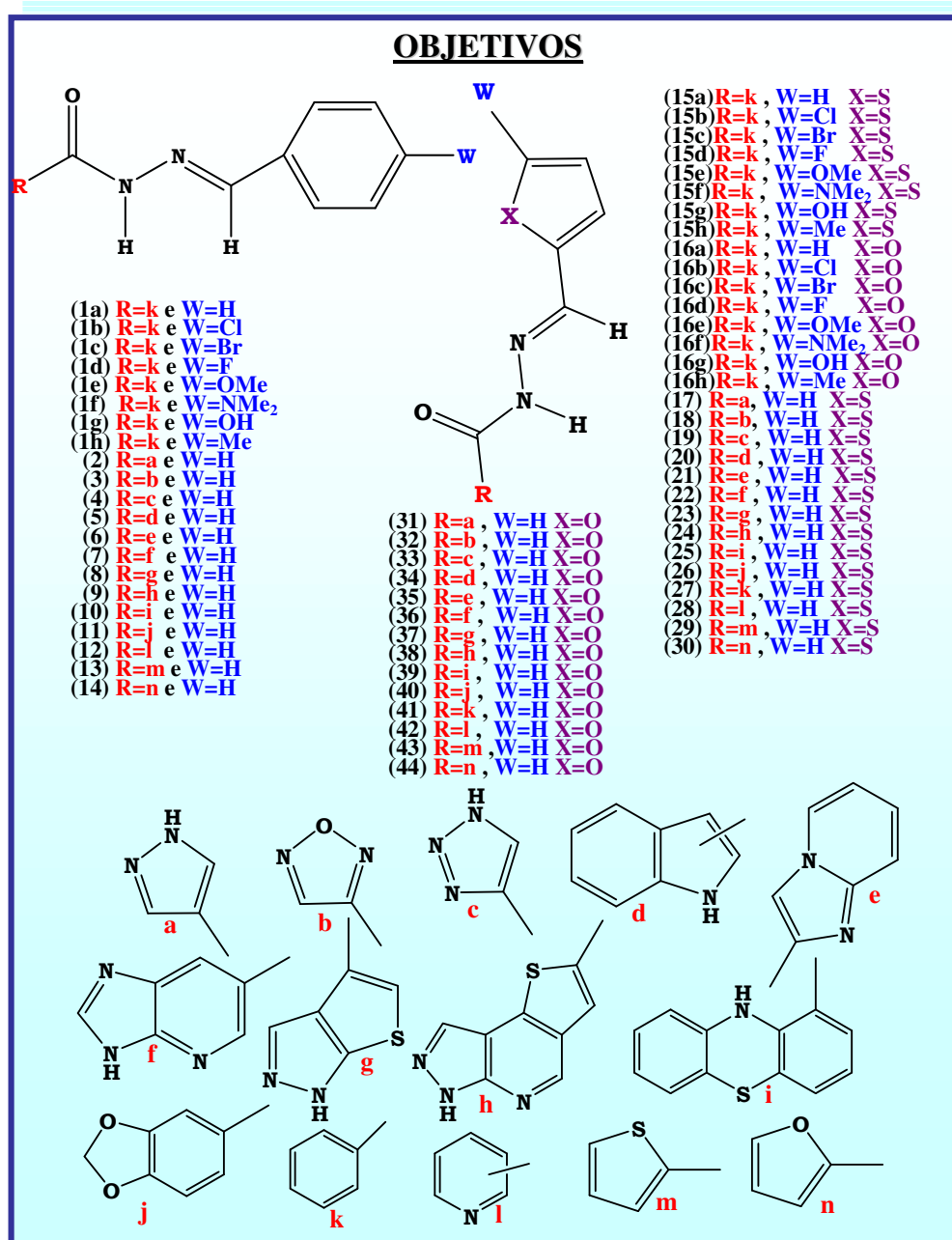


Figura 21- Derivados *N*-acilidrazônicos avaliados neste estudo (1a-44) como novos protótipos candidatos a inibidores de metaloenzimas dependentes de Zn<sup>2+</sup> (ACE e CA).



Em uma terceira etapa, utilizamos a metodologia de *TFD*, visando à descrição das interações enzima-ligante destes complexos. Uma vez descritas estas interações, buscamos compreender o processo de reconhecimento molecular da família de compostos estudada pela enzima-alvo e, deste modo, estabelecer correlações estruturais com o intuito de otimizar seu perfil de interação.

Os objetivos deste trabalho inserem-se no contexto do planejamento racional de protótipos inibidores de metaloenzimas no intuito de consolidar novas pesquisas em Química Bioinorgânica Medicinal. Inicialmente, esta análise buscou identificar importantes sítios de interação para inibição das metaloenzimas em questão. Seguindo esta metodologia, procuramos analisar ligantes desenvolvidos no LASSBio, buscando a melhoria do seu perfil farmacológico. Estudamos propriedades geométricas e eletrônicas que permitissem a estabilização destes ligantes e seus complexos e o esclarecimento de propriedades que auxiliem na aplicação da quelatoterapia como mecanismo de inibição enzimática. Além disto, foi realizado um estudo que discute efeitos eletrônicos pela análise de orbitais de fronteira, HOMO e LUMO, obtidos pela *TFD*.

Com a utilização de Modelagem Molecular como ferramenta (BARREIRO *et al.*, 1997; RODRIGUES *et al.*, 1998) se pretendeu validar qualitativamente modelos 3D, propostos como sondas para o estudo do mecanismo de complexação. Estes foram comparados a modelos existentes na literatura, visando, assim, a obtenção de parâmetros estereoeletrônicos que permitam estabelecer correlações estruturais para os compostos estudados.

*M*

*E*

*T*

*O*

*D*

*O*

*L*

*O*

*G*

*I*

*A*

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1-ASPECTOS METODOLÓGICOS GERAIS

Este trabalho utilizou a metodologia da *TFD* e cálculos quânticos semi-empíricos para avaliar o perfil de interação dos complexos formados entre as metaloenzimas dependentes de  $Zn^{2+}$  (ACE E CA) e os compostos **1a-44**. Estas estruturas foram complexadas ao sítio ativo, de modo que os complexos correspondentes pudessem ser simulados através da *TFD*. A partir da trajetória de cada complexo enzima-ligante gerado, uma série de propriedades médias foram gerada, tais como: comprimentos de ligação e energias de interação, bem como as orientações espaciais adotadas pelos compostos no sítio ativo de cada enzima estudada.

As diferentes etapas da metodologia utilizada neste trabalho estão descritas de forma resumida abaixo e a metodologia cronológica é apresentada no esquema 3:

- Realizamos um estudo tridimensional da topologia molecular dos ligantes **1a-44** visando estabelecer propriedades estereoeletrônicas capazes de governar suas interações com o  $Zn^{2+}$  do sítio ativo enzimático;
- Realizamos uma análise prévia através da metodologia *TFD*, da esfera de coordenação metálica das enzimas ACE e CA, co-cristalizadas com seus inibidores seletivos lisinopril (Figura 22a) e elanapril; e acetazolamida e celecoxib (Figura 22b) respectivamente a fim de validar a metodologia em questão;

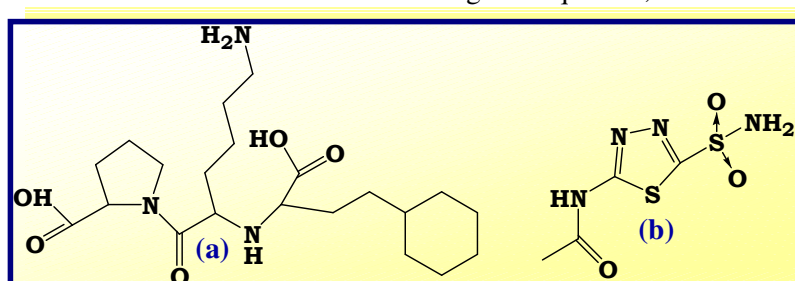
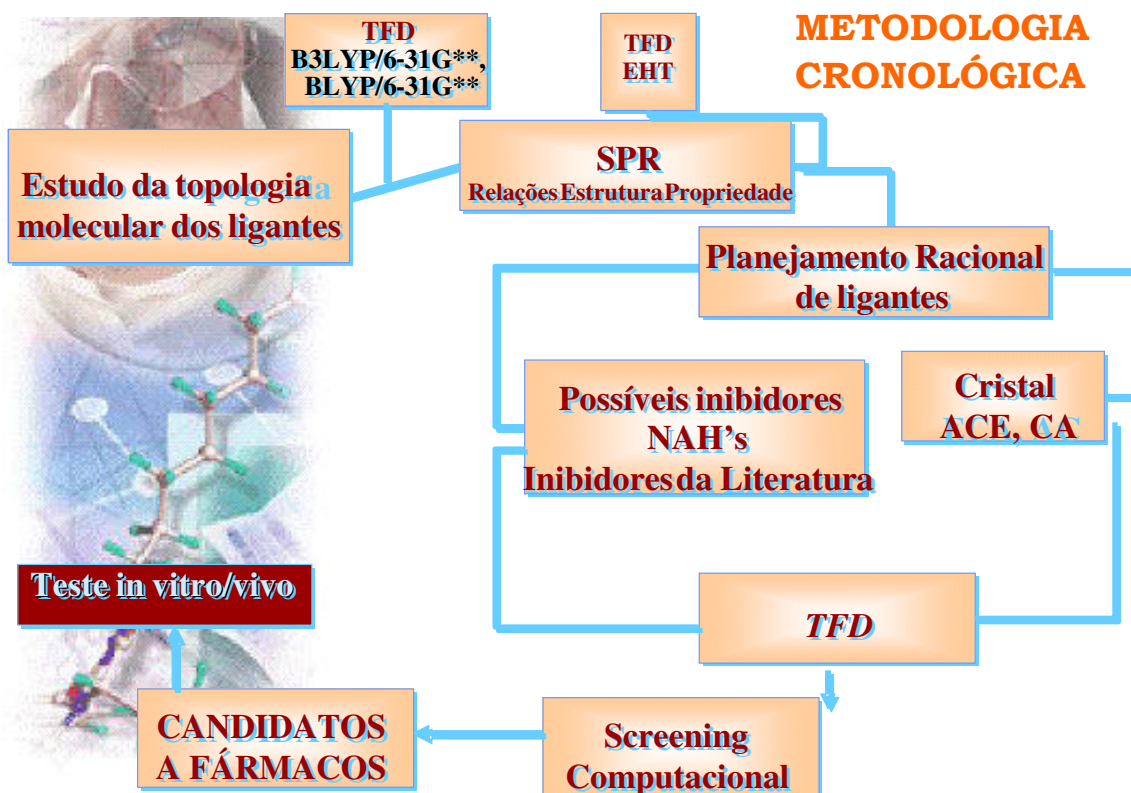


Figura 22- Estruturas: (a) Inibidor seletivo da ECA, (b) Inibidor seletivo da CA.

- A partir daí obtivemos estruturas de interação entre o domínio catalítico de ACE e CA com estes inibidores e sondas biológicas foram estabelecidas para o estudo do perfil de interação enzima-ligante (**1a-44**);
- As estruturas geradas foram otimizadas por cálculos de *TFD* e mecânica quântica no nível semi-empírico, buscando-se estabelecer uma possível correlação entre a entalpia de complexação com a atividade de cada inibidor;
- Através dos valores de entalpia obtidos, procurou-se estabelecer uma correlação com a atividade de cada possível inibidor.



Esquema 3.

Os cálculos de orbital molecular foram feitos utilizando o métodos semi-

empíricos AM1 e PM3, contido no pacote de programas SPARTAN O2 (HEHRE & LOU, 1997) para prévios estudos das propriedades estruturais do ligante e do complexo modelo respectivamente.

Para os estudos das propriedades estruturais e eletrônicas dos ligantes e modelos do complexo, foi utilizado o método da Teoria do Funcional de Densidade também contido no pacote PC SPARTAN Pro (Wavefunction Inc.).

Para os estudos de reatividade e determinação das durezas relativas e absolutas, foi adaptada para o Hückel Estendido (HOFFMAN,1963) através do programa computacional EXTEN 97, a proposta de Dronskowski (1992), que é capaz de, através da Teoria do Funcional de Densidade (PARR & YANG,1995) e da dureza máxima de Pearson *et al.*, (1963), exprimir termos de reatividade atômica relativa.

Todos os cálculos foram realizados no Laboratório de Química Inorgânica Computacional (LQIC) no departamento de Química Inorgânica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, em um Athlon 1,1GHz com 512Mb de memória RAM e 20Gb de disco rígido, utilizando o sistema operacional Windows 2000, o programa EXTEN e o pacote de programas PCSpartan Pro (Wavefunction Inc.) .No Laboratório de Síntese e Avaliação de Substâncias Bioativas (LASSBio) na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, em um PC Pentium IV 2GHz com 1GMB de memória RAM e 40Gb de disco rígido, utilizando o sistema operacional LINUX, o programa EXTEN e o pacote de programas Spartan O2 (Wavefunction Inc.)

A seguir são descritas mais detalhadamente as diversas metodologias utilizadas e as etapas deste trabalho.

### 3.2-MÉTODOS QUÂNTICOS SEMI-EMPÍRICOS

A maior parte do tempo gasto para realizar um cálculo quântico *ab initio* é invariavelmente usado no cálculo e manipulação de integrais. A forma mais óbvia de reduzir este custo computacional é, então, negligenciar ou aproximar algumas destas integrais [LEACH, 1998]. Os métodos semi-empíricos fazem, em parte, esta aproximação, tratando os elétrons de camadas internas (não de valência) como um caroço “congelado” e considerando apenas os elétrons da camada de valência explicitamente. A lógica por trás desta aproximação é que os elétrons envolvidos em ligações químicas são essencialmente aqueles das camadas de valência [LEACH, 1998].

Os cálculos semi-empíricos são baseados nas equações de Roothaan-Hall (Equação 01), onde o  $H^{core}$  passa a incorporar a energia cinética e a atração em relação ao caroço (núcleo mais as camadas internas) e não unicamente ao núcleo. As integrais envolvendo o  $H^{core}$  são geralmente substituídas por parâmetros empíricos ou calculados.

$$F_{\mu\nu} = H_{\mu\nu}^{core} + \sum_{\lambda=1}^K \sum_{\sigma=1}^K P_{\lambda\sigma} \left[ (\mu\nu | \lambda\sigma) - \frac{1}{2} (\mu\lambda | \nu\sigma) \right] \quad (\text{Eq.01})$$

O primeiro termo da Equação 01,  $H_{\mu\nu}^{core}$  é relativo à energia cinética e potencial de elétrons individuais, enquanto o segundo termo está relacionado com as interações entre os elétrons.  $P$  é conhecida como matriz de densidade, cujos elementos envolvem o produto dos coeficientes dos orbitais atômicos  $\mu$  e  $\nu$ , somados com todos os orbitais moleculares ocupados  $i$ .

Os métodos semi-empíricos mais utilizados são:

- O modelo de Austin 1 (AM1 – Austin Model 1) produzido pelo grupo de Dewar (DEWAR *et al.*, 1985). O método AM1 foi desenvolvido para eliminar os problemas com o MNDO, que superestimava as repulsões entre átomos separados por distâncias aproximadamente iguais à soma de seus raios de van der Waals. A estratégia adotada

foi a de modificar o termo núcleo-núcleo usando funções Gaussianas. Tanto funções Gaussianas atrativas quanto repulsivas foram usadas. As Gaussianas atrativas eram projetadas para superar as repulsões diretamente e eram centradas na região onde as repulsões também eram grandes. As funções Gaussianas de repulsão eram centradas em separações internucleares menores. Na parametrização original do AM1, existem quatro termos na expansão Gaussiana para carbono, três para hidrogênio e nitrogênio e dois para oxigênio (tanto as Gaussianas atrativas quanto as repulsivas eram usadas para carbono, hidrogênio e nitrogênio, mas apenas Gaussianas repulsivas eram usadas para o oxigênio).

- O método parametrizado número 3 (PM3 – Parametric Method Number 3) foi à terceira parametrização do MNDO, sendo o AM1 a segunda. O Hamiltoniano do método PM3 contém essencialmente as mesmas aproximações que as do AM1, porém os parâmetros do modelo PM3 foram derivados usando um procedimento de parametrização automático desenvolvido por J.J.P. Stewart.(1989)

Por outro lado, vários dos parâmetros no modelo AM1 foram obtidos aplicando-se conhecimento químico e “intuição”. Como consequência, alguns valores de parâmetros no AM1 e no PM3 são significativamente diferentes apesar dos dois métodos usarem a mesma forma funcional e predizerem várias propriedades estruturais e termodinâmicas com aproximadamente a mesma precisão [LEACH, 1998].

O método PM3 contém um grupo de parâmetros mais otimizados do que o MNDO e o AM1 e inclui parâmetros para compostos hipervalentes. Como os métodos MNDO e AM1, ele não considera explicitamente os orbitais *d*. Além disso, o modelo PM3 gera um resultado global melhor do que MNDO e AM1 para geometrias de ligação

de hidrogênio - tanto AM1 quanto MNDO algumas vezes geram estruturas de equilíbrio incorretas ou levam a dissociação [HEHRE, YU, KLUNZINGER, 1998].

### 3.2.1--CONSIDERAÇÕES SOBRE O MÉTODO DE HÜCKEL ESTENDIDO

O método de Hückel Estendido é um método de orbital molecular semi-empírico, que estuda propriedades eletrônicas. Este método possui parâmetros para metais, mostrando-se eficaz na interpretação de efeitos eletrônicos em vários estudos (MACHADO, 1994; PINTO, 1999; JUNQUEIRA, 1998; BENITE, 2001).

A teoria de Hückel (1931) é restrita, considerando somente a nuvem  $\pi$ . No entanto, sistemas não planares que incluem heteroátomos requerem o método do Hückel Estendido (sistemas  $\sigma$ ), que se baseia em um Hamiltoniano que contém somente termos monoelétrônicos (Equação 02).

$$H\phi_i = \epsilon_i \phi_i \quad (\text{Eq. 02})$$

onde  $H$  é um Hamiltoniano de um elétron,  $\epsilon_i$  é a energia de um elétron particular em um orbital  $i$  e  $\phi_i$  a função de onda ou orbital molecular. O método de Hückel Estendido (EHT) ignora as interações entre elétrons em diferentes orbitais moleculares, isto é, o elétron é considerado não interagindo com os demais elétrons da molécula (tratamento monoelétrônico).

O programa computacional EXTEN 97, incorpora a metodologia do Método de Hückel Estendido (EHT) e foi codificado em FORTRAN 77 em nosso laboratório. Nele a estrutura molecular é considerada através da leitura de coordenadas cartesianas, coordenadas estas que foram arquivos de saída gerados pelo método de *TDF* utilizado. Este programa utiliza um hamiltoniano efetivo (Equação 03), sem considerar as repulsões entre elétrons explicitamente.



$$H_{ij} = 0,5 K S_{ij} [(1 + H_{ii} - H_{jj}) H_{ii} + (1 - H_{ii} + H_{jj}) H_{jj}] \quad (\text{Eq.03})$$

As energias dos orbitais moleculares e as funções de onda são obtidas diretamente da diagonalização do operador hamiltoniano, diferentemente de outros métodos semi-empíricos que obtêm estas mesmas propriedades através de um sistema iterativo autoconsistente de cálculo.

### 3.3- A TEORIA DO FUNCIONAL DE DENSIDADE (*TFD*)

#### 3.3.1- BREVE HISTÓRICO SOBRE A *TFD*

A primeira tentativa de se usar a densidade eletrônica como variável básica na descrição de um sistema eletrônico foi provavelmente a Teoria de Drude. Tentativa esta que aconteceu três anos depois da descoberta do elétron por Thompson em 1897. Drude aplicou a teoria cinética dos gases a um metal, considerado como um gás homogêneo de elétrons, para desenvolver a sua teoria sob condução térmica e elétrica. A distribuição quântica de Fermi-Dirac foi utilizada por Sommerfeld para a distribuição clássica da velocidade eletrônica no modelo de Drude. Embora este modelo tenha sido considerado um grande avanço na época, continha várias simplificações que não permitiram fazer uma descrição precisa de um sólido (NAGY, 1998).

Bem mais tarde o modelo de Thomas-Fermi, propôs uma sensível melhora em relação ao modelo de Drude-Sommerfeld. Admitindo que os elétrons estão distribuídos uniformemente no espaço e usando argumentos estatísticos para aproximar a distribuição dos elétrons, Thomas e Fermi desenvolveram seu modelo para o funcional de energia conforme apresentado na equação 04. Em adição a este modelo Dirac incluiu a energia de troca para um gás de elétrons e criou o modelo Thomas-Fermi-Dirac (*TFD*). O funcional de energia ( $E$ ) de *TFD* é dado por  $\rho$  e  $r$  correspondem à densidade

eletrônica e as coordenadas, respectivamente (LABANOWSKI & ANDZELM, 1991).

$$E[\rho] = C_F \int \rho(r)^{5/3} dr + \int \rho(r)v(r)dr + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{|r_1 - r_2|} dr - C_x \int \rho(r)^{4/3} dr \quad (\text{Eq.04})$$

$$C_F = 3/10 (3\pi^2)^{2/3} \text{ e } C_x = 3/4(3/\pi)^{1/3}$$

Os termos da direita da equação correspondem à energia cinética, ao potencial externo (posição e carga dos núcleos dos átomos que formam a molécula), ao potencial de Coulomb e à energia de troca, respectivamente.

O modelo *TFD* pode ser representado pela solução da equação variacional :

$$\delta\{E_{TFD}[\rho] - \mu N(\rho)\} = 0 \quad (\text{Eq.05})$$

onde  $\mu$  é o potencial químico e  $N$  o número de partículas, é essencialmente independente do número de partículas. Porém, estes métodos não são capazes de prever ligação molecular e produzem resultados que não são precisos. O modelo de *TFD*, por sua vez, falha ao reproduzir a estrutura quântica de camadas dos átomos não permitindo previsões quantitativas. Desta forma, estes modelos de funcionais clássicos não puderam competir com os métodos autoconsistentes (DUARTE, 2001).

Em 1964, com a publicação dos teoremas de Hohenberg e Kohn, mostrando que existe um funcional de energia exato da densidade eletrônica  $E[\rho]$  e um princípio variacional exato para este funcional semelhante à equação 05, que o uso da densidade eletrônica como variável básica foi rigorosamente legitimado (NAGY, 1998).

Em 1965, Kohn e Sham propuseram uma forma de contornar o problema de se encontrar o funcional de energia exato: o método KS. Desde então a *TFD* tem cada vez mais ganhando destaque entre a comunidade científica.

A *TFD* que foi desenvolvida originalmente em física do estado sólido representa um valioso, versátil e eficiente método de mecânica-quântica para cálculos de estrutura eletrônica em sistemas químicos. Recentemente tem sido estendida também

a sistemas biológicos (ADREONI, 1998; CARLONI & ALBER, 1998; SULPIZI, *et al.*, 2002; LOVELL, *et al.*, 2003; NOODLEMAN, *et al.*, 2004).

### 3.3.2- CONCEITOS SOBRE A TFD

A entidade básica do Funcional de Densidade é a densidade eletrônica  $\rho(\mathbf{r})$ , a qual descreve a distribuição de carga em uma molécula (informação sobre o estado fundamental). Ela deve ser adotada como o “observável” quantomecânico, o que possibilita uma formulação conceitual mais acessível em termos de química descritiva. Essa consideração torna a teoria do funcional de densidade contrária ao caráter abstrato da função de onda multieletrônica total, que aparece nos outros métodos da química quântica, quando da resolução da equação de Schrödinger (MORGON & CUSTODIO, 1995).

Usando a densidade eletrônica como princípio básico, esta teoria tem várias vantagens sobre a teoria da função de onda. Uma molécula com  $N$ -elétrons requer, uma função de onda em  $3N$  dimensões para descrevê-la. A densidade eletrônica, contudo, é uma função simples da posição das três dimensões espaciais. Isto significa que a complexidade computacional dos cálculos da TFD aumenta mais lentamente com o número de átomos (e elétrons) da molécula do que no caso da utilização de função de onda (BROUGHTON, 1997).

Em termos genéricos, podemos relacionar dois aspectos para apresentar o método do funcional de densidade:

- (1) a função de onda do estado fundamental, e todas as propriedades deste estado, são funcionais da densidade eletrônica  $\rho(\mathbf{r})$ ;
- (2) a energia do estado fundamental de um sistema multieletrônico  $E_0$ , sob um dado

potencial externo  $v(r)$ , pode ser escrita como:

$$E_0[\rho(r)] = \int v(r)\rho(r)dr + F[\rho] \quad (\text{Eq. 06})$$

onde  $F$  é denominado de funcional universal de  $\rho$ , que independe do potencial externo  $v(r)$ .

Se substituirmos a função de densidade exata deste estado por uma outra função aproximada  $\tilde{\rho}$ ,  $E$  aumentará, da seguinte forma:

$$E = E[\tilde{\rho}] = \int v(r)\tilde{\rho}(r)dr + F[\tilde{\rho}] \geq E_0 = E[\rho] \quad (\text{Eq.07})$$

Observando as equações (06) e (07) faz-se necessária a pergunta: qual é a representação para a função de densidade eletrônica  $\rho$ ? Uma alternativa encontrada para a sua obtenção, é utilizar as equações de Hartree-Fock e, através de um processo de autoconsistência, determinar a melhor função  $\rho$ , que minimize a energia total do sistema.

### 3.3.3- TEOREMAS DE HOHENBERG-KOHN (HOHENBERG & KOHN, 1964)

#### Primeiro Teorema

Em 1964, Hohenberg-Kohn (HK) consideraram um sistema de  $N$ -elétrons descrito pelo Hamiltoniano não relativístico:

$$\hat{H} = \hat{T} + \hat{V}_e + \hat{U} \quad (\text{Eq.08})$$

onde  $\hat{T}$  é a energia cinética,  $\hat{V}_e$  o operador de repulsão elétron-elétron o qual inclui a repulsão Coulombiana e todos os termos não clássicos (troca e correlação) e  $\hat{U}$  é o potencial externo com respeito aos elétrons, normalmente devido às cargas dos núcleos

$Z\alpha$  :

$$\hat{U} = \sum_i \sum_{\alpha}^N - \frac{Z\alpha}{|R\alpha - r_i|} = \sum v(r_i) \quad (\text{Eq. 09})$$

Define-se a densidade eletrônica pela seguinte equação:

$$\rho(r_1) = \int \dots \int \Psi(r_1, r_2, \dots, r_n) \Psi^*(r_1, r_2, \dots, r_n) dr_2, dr_3, \dots, dr_n, \quad (\text{Eq. 10})$$

onde  $\Psi(r_1, r_2, \dots, r_n)$  é a solução do estado do Hamiltoniano.

A energia total do sistema foi definida em se supondo que o estado fundamental não é degenerado pela seguinte equação:

$$E_0 = \int \Psi \hat{H} \Psi dr_2, dr_3, \dots, dr_n = (\Psi | \hat{H} | \Psi), \quad (\text{Eq. 11})$$

ou, se o potencial externo é separado em um funcional trivial da densidade eletrônica, por

$$E_0 = (\Psi | \hat{T} + V_e | \Psi) \int \rho(r) v(r) dr \quad (\text{Eq. 12})$$

$\hat{T}$  e  $V_e$  aplica-se universalmente a todos os sistemas eletrônicos. O número de elétrons,  $N$ , e o potencial externo,  $U$ , no qual os elétrons se movem, definem completamente o sistema de muitos elétrons. O primeiro teorema então, estabelece que o potencial externo,  $\hat{U}$ , é um funcional único de  $\rho(r)$ , além de uma constante aditiva (HEHRE & LOU, 1997).

### Segundo Teorema

Estabelece que qualquer aproximação da densidade eletrônica,  $\tilde{\rho}(r)$ , de tal modo que  $\rho(r) \geq 0$  e  $\int \rho(r) dr = N$ , a energia total  $E[\rho] \geq E[\tilde{\rho}] = E_0$ .

A forma do operador de energia cinética e do operador da repulsão eletrônica é a mesma, em qualquer sistema eletrônico com um dado número de partículas e potencial externo. Assim, é possível se definir um funcional universal,

$$F[\rho] = (\Psi | \hat{T} + V_e | \Psi) \quad (\text{Eq. 13})$$

Faz-se necessário, entretanto, observar que  $\tilde{\rho}(r)$  define seu próprio  $\tilde{v}(r)$  e,

conseqüentemente, o Hamiltoniano  $\hat{H}$  e  $\psi(r_1, r_2, \dots, r_n)$ . A função  $\psi(r_1, r_2, \dots, r_n)$ , por sua vez, pode ser usada como uma função tentativa para o sistema com o potencial externo  $v(r)$ . De acordo com o princípio variacional, temos:

$$E_0 = E_0[\rho] = F[\rho] + \int v(r) \rho(r) dr \leq E_0[\tilde{\rho}] + \int v(r) \tilde{\rho}(r) dr \quad (\text{Eq. 14})$$

$E_0$  se refere ao funcional da energia total com relação ao potencial externo  $v(r)$ .

Os teoremas HK mostram como se pode determinar o estado fundamental de um sistema, com um dado potencial externo, usando a densidade eletrônica tridimensional como variável básica, ao invés de usar a função de onda de N-elétrons, que é muito mais complexa.

O que se pretende é utilizar o princípio variacional para encontrar  $\rho(r)$  em um dado potencial externo  $v(r)$ . Fica estabelecido, segundo o primeiro Teorema de Hohenberg-Kohn que se  $\tilde{\rho}(r)$  é conhecido, pode-se determinar  $v(r)$ . Entretanto, deve-se utilizar uma densidade eletrônica tentativa,  $\rho(r)$ , desta forma como podemos garantir que  $\tilde{\rho}(r)$  corresponda a um potencial fisicamente realizável?

A Teoria do Funcional de Densidade foi formulada satisfazendo a condição da  $v$ -representabilidade (potencial fisicamente realizável) através da utilização da formulação de Levy (Levy Constrained Search). Então segundo Parr e Yang (PARR & YANG, 1989):

$$F[\rho] = \left( \psi_0 \left| \hat{T} + \hat{V}_e \right| \psi_0 \right) = \min_{\psi \rightarrow \rho} \left( \psi \left| \hat{T} + \hat{V}_e \right| \psi \right) \quad (\text{Eq. 15})$$

assim, procura restrita consiste em testar todas as densidades tentativas, e para cada uma encontrar as funções de onda que minimizem e gerem aquela densidade. Substituindo a equação 14 na 15 temos:

$$E_0 = \min_{\rho} \left\{ \min_{\psi \rightarrow \rho} \left( \psi \left| \hat{T} + \hat{V}_e \right| \psi \right) + \int v(r) \rho(r) dr \right\} = \min_{\rho} E_0[\rho] \quad (\text{Eq. 16})$$

A minimização interna está restrita a todas as funções de onda,  $\psi$ , que fornece  $r$ , enquanto a minimização externa é feita sobre todos os possíveis  $\rho$ . Então a formulação de Levy é capaz de eliminar a limitação destes teoremas.

### 3.3.4-AS EQUAÇÕES DE KOHN-SHAM (KS)

As equações de Kohn-Sham, que foram formuladas em 1965 (KOHN & SHAM, 1965), nos permitem resolver de forma direta a equação de Schrödinger através de um conjunto de equações que diferem das, já bem conhecidas equações Hartree Fock (HF), pela substituição do termo do potencial de troca por um potencial mais geral de troca-correlação que é, em princípio, simples porque representa somente um funcional de densidade.

O Potencial de troca-correlação é uma forma de descrever o fato de que todos os elétrons tentam ao mesmo tempo maximizar a atração do núcleo, e minimizar a repulsão dos outros elétrons, durante sua movimentação dentro de uma molécula. Mais precisamente o potencial de troca-correlação descreve a fenda troca-correlação que é a zona em torno de cada elétron dentro da qual nenhum outro elétron é permitido.

O Esquema KS permite calcular a densidade eletrônica do estado fundamental. Todas as outras propriedades do sistema podem ser calculadas desde que os funcionais da densidade eletrônica apropriados sejam conhecidos (LABANOWSKI & ANDZELM, 1991).

Nas equações Kohn-Sham, a densidade exata do estado fundamental de um sistema de elétrons que interagem é gerada a partir da solução de um problema auxiliar do sistema de elétrons que não-interagem definido de forma a fornecer a mesma densidade do estado fundamental. A energia total de um sistema de  $n$ -elétrons pode ser

descrita segundo Kohn-Sham, 1965, sem aproximações, como:

$$E_{el} = -\frac{1}{2} \sum_i \int \phi_i(\vec{r}_1) \nabla^2 \phi_i(\vec{r}_1) d\vec{r}_1 + \sum \iint \frac{\rho(\vec{r}_1) \rho(\vec{r}_2)}{|\vec{r}_1 - \vec{r}_2|} d\vec{r}_1 d\vec{r}_2 + E_{xc} \quad (\text{Eq. 17})$$

O primeiro termo da equação (16) representa as energias cinéticas dos elétrons  $n$ , que não estão interagindo (BECKE, 1988) com mesma densidade  $\rho(\vec{r}) = \sum_i |\phi_i(\vec{r})|^2$  como o sistema verdadeiro de elétrons interagentes. O segundo termo estima as atrações elétron – núcleo e as interações de Coulomb entre as duas distribuições de cargas  $\rho(\vec{r}_1)$  e  $\rho(\vec{r}_2)$  e o terceiro termo contém a energia de troca – correlação  $E_{xc}$ , que pode ser representada em termos de troca correlação medidas esfericamente (BECKE, 1988; LUNKEN, 1982; GUNARSSON *et al.*, 1979.)  $\rho_x^{\gamma\gamma}(\vec{r}_1, s)$  como

$$E_{xc} = \sum_{\gamma} \sum_{\gamma'} -4\pi/2 \int \frac{\rho_{\gamma}(\vec{r}_1) \rho_{\gamma'}(\vec{r}_1, s)}{S} d\vec{r}_1 s^2 ds \quad (\text{Eq.18})$$

Os orbitais de um elétron  $\{\phi_i(\vec{r}_1); i=1,n\}$ , da equação 19, são soluções para o conjunto de equações de 1-elétron de Kohn – Sham (KOHN & SHAM, 1965)

$$\left[ -\frac{1}{2}\nabla^2 + \sum \frac{Z_A}{|\vec{R}_A - \vec{r}_1|} + \int \frac{\rho(\vec{r}_2)}{|\vec{r}_1 - \vec{r}_2|} d\vec{r}_2 + V_{xc}\phi_i(\vec{r}_1) \right] \phi_i(\vec{r}_1) = \epsilon_i \phi_i(\vec{r}_1) \quad (\text{Eq.19})$$

onde o potencial de troca – correlação  $V_{xc}$  é dado, segundo KOHN & SHAM, 1965, por

$$V_{xc}[\rho] = \delta \bar{E}_{xc}[\rho] / \delta \rho \quad (\text{Eq.20})$$

A função  $\bar{\rho}_x^{\gamma\gamma}(\vec{r}_1, s)$  contém todas as informações sobre troca e correlação entre elétrons interagentes, bem como a influência da correlação na energia cinética. A função  $\rho_x^{\gamma\gamma}(\vec{r}_1, s)$  pode, na prática, ser obtida através de uma solução exata da equação de Schrödinger ou de um sistema de  $n$ -elétrons (BUIJSE, 1989). O conjunto das



equações de Kohn – Sham de um elétron, é uma consequência dos valores limitados pelas soluções exatas de um sistema com muitos elétrons. Eles formam, entretanto, o ponto de partida para um tratamento aproximado em que  $\rho_x^{\gamma\gamma}(r_1, s)$  é recalculado pelo uso do modelo de funcional.

Uma observação criteriosa dos conceitos apresentados nos permite constatar que a descrição do potencial de troca KS difere levemente da descrição HF, porque a primeira é um funcional da densidade exato, enquanto que a segunda é um funcional dos orbitais, e também porque os orbitais KS e HF que são necessários como intermediários para os cálculos não são totalmente idênticos (CHERMETTE, 1998). O mesmo pode ser expresso em relação à descrição do potencial de correlação KS que, de acordo com as definições, deve ser maior (mais negativo) que HF.

As equações Kohn-Sham, em princípio, são exatas uma vez que incorporam totalmente os efeitos da correlação eletrônica (troca-correlação) e a solução dessas equações equivale formalmente a resolver exatamente o problema variacional da *TFD*. Enfim, as equações KS vão além da aproximação HF e ainda, oferecem uma grande vantagem: o potencial de troca-correlação é local.

A forma da função exata para determinar o funcional de troca-correlação não é conhecida em detalhes, contudo, um número de propriedades de  $\bar{\rho}_x^{\gamma\gamma}(\vec{r}_1, \vec{s})$  pode ser deduzida através de várias considerações (LUNKEN *et al.*, 1982; GUNNARSSON *et al.*, 1979).

#### 3.3.4.1-OS FUNCIONAIS

Os funcionais de energia troca-correlação tem sido classificados por Ziegler (ZIEGLER, 1991) dentro de três gerações.

- A primeira geração de funcionais é a aproximação da densidade local (LDA). Esta aproximação envolve o funcional de Dirac para troca, o qual nada mais é que o funcional proposto por Dirac em 1927 (DUARTE, 2001) para o então nomeado modelo de Thomas-Fermi-Dirac. Para a energia de correlação, algumas parametrizações foram propostas, começando no início dos anos 80 com a proposta por Vosko et al. (VOSKO, et al., 1980), Perdew e Zunger (PERDEW & ZUNGER, 1981): aproximação  $X\alpha$ , onde a correlação é uma aproximação fornecida pelo percentual da energia de troca.
- A segunda geração de funcionais usa ambos a densidade e seus gradientes. Entretanto, um simples gradiente de expansão, testado no início dos anos 70 por Sham e Herman *et al.* (HERMAN *et al.*, 1969), não obteve sucesso, e muitos esforços foram feitos para elucidar este assunto. Levy, Perdew, e outros mostraram que várias relações, que podem ser agrupadas dentro de regras sumárias, propriedades de proporção, podem ser expressas pela LDA, mas não um simples gradiente de expansão. Desta forma, faz-se necessária à parametrização do gradiente de expansão de maneira a melhor satisfazer estas relações. O primeiro funcional de energia gradiente-corrigido foi proposto em 1986 por Becke (BECKE, 1986) e Perdew e Wang (PERDEW & WANG, 1986) para troca e Perdew (PERDEW, 1986) para correlação. Os funcionais mais populares nos dias atuais são estes de Becke e Perdew para troca e correlação. Seguindo Perdew, existem todos os outros freqüentemente chamados aproximações generalizadas de gradiente (GGAs do inglês Generalized Gradient Approximations).
- A terceira geração dos funcionais de energia troca-correlação é a geração de funcionais “além de GGA”. Eles compreendem várias opções, oferecendo maior exatidão através de um aumento na sofisticação e no custo dos recursos computacionais. Os mais importantes destes são os funcionais híbridos, e os funcionais que são

dependentes da densidade, seus gradientes e seus laplacianos (ZIEGLER, *et al.*, 1988). Os funcionais híbridos são funcionais de energia que contém ambas a troca *TFD* (por exemplo, uma parte LDA e uma parte GGA) e um tipo de troca Hartree Fock calculada para os orbitais. A justificativa para esta aproximação parte do então nomeado esquema de conexão adiabática primeiro definido por Lagreth e Perdew (LAGRETH & PERDEW, 1977) em 1977, mas introduzida praticamente por Becke em 1993 (PERDEW, 1993), e generalizada dentro de um funcional híbrido no qual o peso de várias contribuições para a energia de troca-correlação total é obtido por um ajuste de um conjunto de dados referentes à energia. Em 1998, o funcional híbrido mais popular era o funcional B3LYP, disponível num primeiro momento apenas no pacote de programas Gaussian que introduzia esta família de funcionais. Este podia ser definido como:

$$E_{XC} = \alpha_0 E_{HF} + \alpha_1 E_{X(LSD)} + \alpha_2 E_{X(GGA)} + \alpha_3 E_C \quad (\text{Eq. 21})$$

relembrando que a energia de troca-correlação é definida por tudo aquilo relacionado ao potencial de energia, energia cinética e energia eletrostática, onde : (i)  $E_{HF}$  define a energia de troca pura, exemplo, similar a Hartree-Fock, calculada com os orbitais KS; (ii)  $E_{X(LSD)}$  define a energia de troca local, a partir da troca de Dirac; (iii)  $E_{X(GGA)}$  define os gradientes de correção para a energia de troca, chamados de forma Be88; (iv)  $E_C$  define o gradiente de correlação corrigido, chamado de funcional de Lee-Yang-Parr (LYP) (LEE, *et al.*, 1988). A equação 21, com  $\alpha_1 = 1 - \alpha_0$ , é a forma clássica adotada nos funcionais híbridos mais utilizados, de maneira a manter a troca de Dirac para o gás de elétrons. O funcional B3LYP é capaz de fornecer um conjunto de resultados razoáveis para compostos de coordenação, embora os funcionais “*TFD* puro”, por exemplo, que não contem a troca pura (segunda geração de GGAs) que são menos

exatos para termoquímica orgânica, sejam de comparada eficiência para a maioria dos compostos organometálicos.

### 3.3.5-O POTENCIAL QUÍMICO E A DEFINIÇÃO DE ELETRONEGATIVIDADE

O papel central que ocupam o número de elétrons  $N$  e a densidade eletrônica na Teoria do Funcional de Densidade é uma grande vantagem do método. Pois, é muito mais difícil relacionar função de onda de muitos elétrons com a estrutura e a reatividade molecular que quantidades observáveis mais simples tais como  $\rho(r)$  e o número de elétrons  $N$ . A *TFD* permite definir importantes conceitos químicos relacionados com a estrutura e a reatividade química de moléculas. Serão descritos agora os conceitos mais importantes de *TFD*:

Ao se estabelecer o princípio estacionário na *TFD*, o multiplicador de Lagrange ( $\mu$ ) foi relacionado ao potencial químico,

$$\mu = \left[ \frac{\partial E}{\partial N} \right]_{\nu} \quad (\text{Eq. 22})$$

Portanto,  $\mu = \mu ( N, \nu)$  mede a tendência dos elétrons de escaparem de um sistema em equilíbrio . Se aproximar a definição do potencial químico mostrado na equação acima pela diferença finita (Gráfico 01), chega-se a

$$\mu = - \chi_M = - (I+A)/2 \quad (\text{Eq. 23})$$

onde  $I$  e  $A$  correspondem ao potencial de ionização e a afinidade eletrônica, para que seja levado em conta o fato de que o potencial externo é mantido constante conforme equação 23. O gráfico 01 mostra a definição de  $I$  e  $A$ , e como estas grandezas podem ser usadas para estimar a primeira e a segunda derivada da energia em relação ao número de elétrons.

Esta é a mesma definição de eletronegatividade introduzida por Mulliken, em 1934 (NAGY, 1998). O conceito de eletronegatividade é importante em *TFD*, porque uma vez que ele é o potencial químico, desempenha um importante papel no princípio variacional.

Sanderson propôs em 1954 (SANDERSON, 1971) o princípio da igualação da eletronegatividade: “quando dois ou mais átomos, inicialmente possuindo eletronegatividades diferentes, ligam-se para formar um composto, suas eletronegatividades tornam-se ajustadas a um valor intermediário dentro do composto”, ou seja, o potencial químico em um sistema em equilíbrio é igual em toda a parte. Quando duas moléculas se aproximam, o potencial químico deve ser igualado para os dois sistemas em equilíbrio. O potencial químico (eletronegatividade) é uma propriedade de estado do sistema e pode ser calculada via *TFD*, segundo a Equação 24. A transferência de elétrons entre duas moléculas é dirigida pelas diferenças do potencial químico. O formalismo *TFD* leva rigorosamente ao conceito de eletronegatividade e ao princípio de igualação da eletronegatividade, mesmo embora todos estes conceitos tenham sido formulados sobre uma base empírica no passado (FRITSCHÉ & KOLLER, 2003).

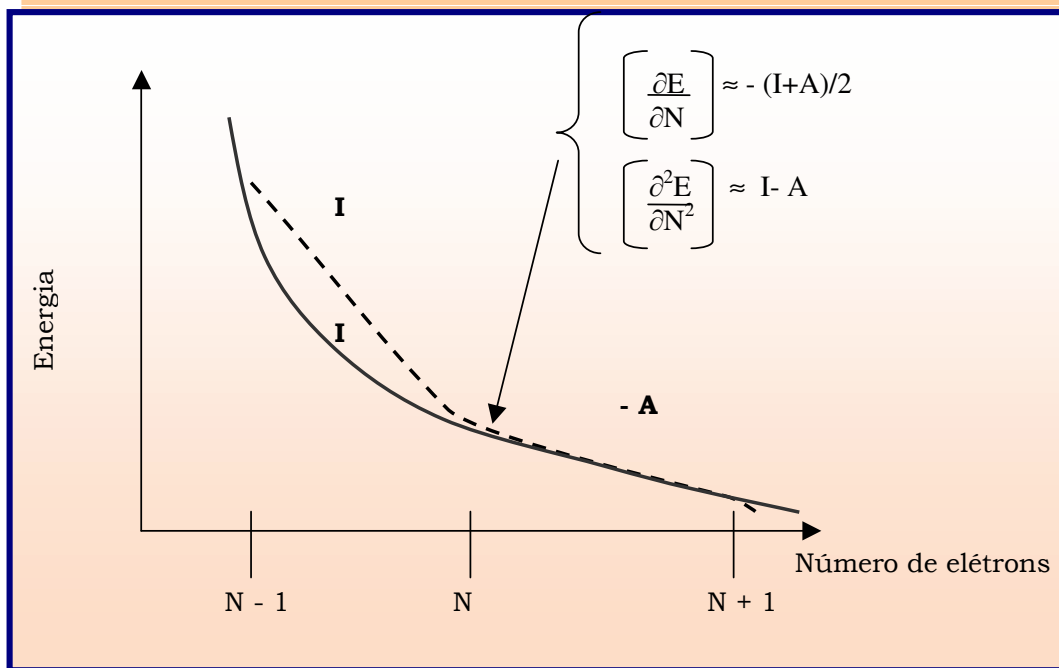


Gráfico 01 – Energia total do sistema em função do número de elétrons, N

corresponde ao número de elétrons do sistema neutro. A inclinação das linhas tracejadas corresponde ao I e A, respectivamente, dentro da aproximação da diferença finita.

### 3.3.6-O POTENCIAL QUÍMICO E SUAS DERIVADAS: DUREZA E MACIEZ

A equação diferencial que descreve um sistema eletrônico quando este muda de um estado fundamental para o outro é:

$$dE = \mu dN + \int \rho(r) \delta v(r) dr \quad (\text{Eq. 24})$$

A energia total é um funcional do número de elétrons N e do potencial externo  $v(r)$ , ou seja  $E = E[N, v]$ . Logo, podemos escrever a equação diferencial total de energia E que relaciona a mudança do sistema de um estado fundamental para um outro:

$$dE = \left[ \frac{\partial E}{\partial N} \right]_{v(r)} dN + \int \left[ \frac{\partial E}{\partial v(r)_N} \right] \delta v(r) dr \quad (\text{Eq. 25})$$

Comparando as equações 24 e 25, obtêm-se as seguintes igualdades:

$$\mu \left[ \frac{\partial E}{\partial N} \right]_{v(r)} = \text{constante} \quad (\text{Eq. 26})$$

$$\left[ \frac{\partial E}{\partial v(r)} \right]_N = \left[ \frac{\partial E}{\partial v(r)} \right]_P = \rho(r) \quad (\text{Eq. 27})$$

Importantes conceitos químicos surgem a partir das equações 24, 25, 26 e 27:

### Dureza

$$\eta = \left[ \frac{\partial \mu}{\partial N} \right]_{v(r)} = \left[ \frac{\partial^2 E}{\partial N^2} \right]_{v(r)} \quad (\text{Eq. 28})$$

Se utilizarmos a aproximação da diferença finita conforme o gráfico 1, chegamos à equação:

$$\eta = I - A \quad (\text{Eq. 29})$$

Esta definição é a mesma que a sugerida por Pearson em 1963 (PEARSON, 1963). Toro-Labbé *et al.* mostraram como o potencial químico e a dureza variam com o ângulo de torção da molécula. Embora eles tenham usado em seus cálculos a aproximação da diferença finita, ou seja,

$$\eta = \frac{1}{2} (E_L - E_H) \quad (\text{Eq. 30})$$

onde  $E_L$  e  $E_H$  correspondem as energias do LUMO e HOMO, respectivamente, os resultados se comportaram como o esperado. A dureza apresenta um máximo onde se encontra os mínimos de energia na superfície de energia potencial.

### Maciez (contrário de dureza)

$$S \left[ \frac{\partial N}{\partial \mu} \right]_{v(r)} = 1/I - A \quad (\text{Eq. 31})$$

O princípio enunciado por Pearson: “ácidos macios preferem bases macias, ácidos duros preferem bases duras”, também chamado princípio HSAB (do inglês: Hard Soft Acid Base Principle) também está contemplado dentro da *TFD*.

### 3.4- SOBRE A MINIMIZAÇÃO DE ENERGIA ATRAVÉS DE *TFD*

A equação básica do funcional de densidade é dada pela expressão 32:

$$[-\frac{1}{2}\nabla^2 + V_c(r) + V_{xc}(r)] \Psi_i = \epsilon_i \Psi_i \quad (\text{Eq. 32})$$

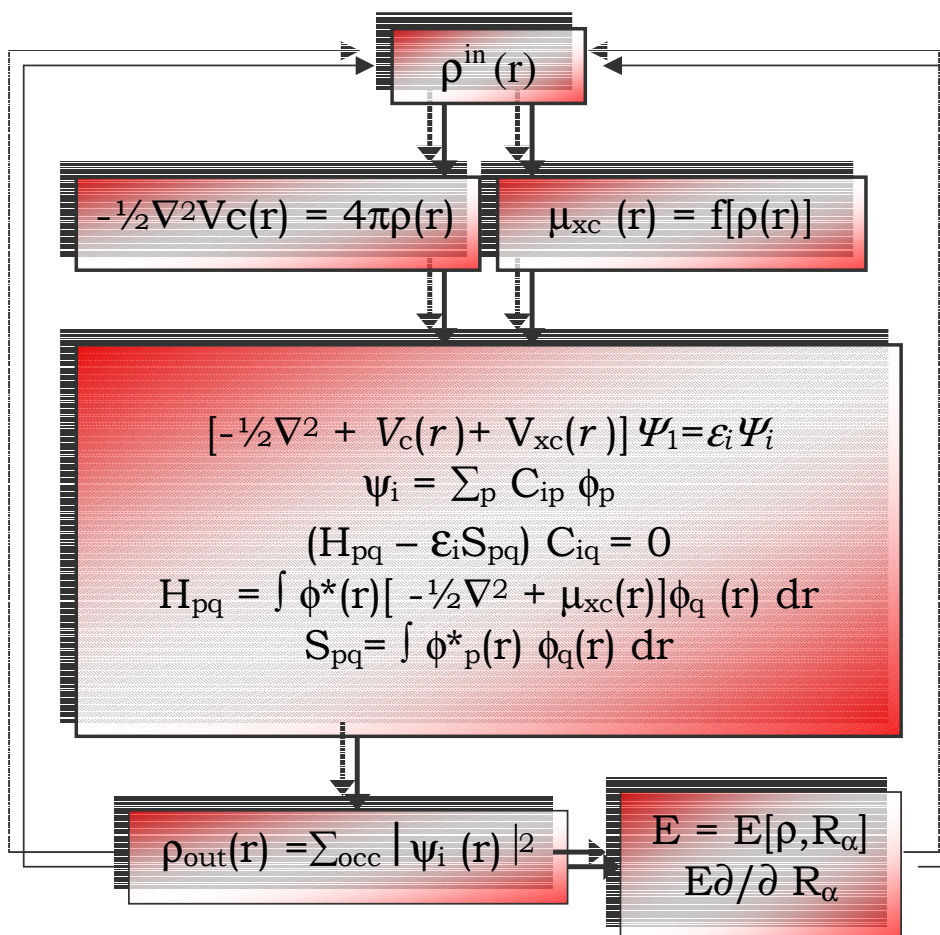
e tem que ser resolvida em um sistema iterativo de campo-auto-consistente (SCF), com procedimento (Esquema 4) similar ao que é usado na teoria Hartree-Fock. Este procedimento começa com uma densidade inicial correspondente a um certo arranjo geométrico do núcleo. Usualmente, a densidade inicial é construída por uma superposição das densidades atômicas.

O operador de Coulomb das equações do *TFD* pode ser avaliado tanto explicitamente, pela resolução da equação de Poisson, quanto pelo cálculo das integrais de Coulomb para um dado conjunto de bases, usando uma densidade adequada. O procedimento formal é regularmente usado em cálculos de estado sólido, quando os cálculos do potencial de Coulomb envolvem adição sobre o número de pontos de integração total (LABANOWSKI & ANDZELM, 1991).

O Esquema 4 tem como entidade fundamental que governa o sistema iterativo a densidade eletrônica, que define os pontos de início e fim do procedimento do sistema auto-consistente. Este procedimento é empregado no programa DMOI (DELLEY, 1990), no qual funções de bases numéricas são utilizadas. No caso das funções de base do tipo Gaussiana, também é conveniente seguir o mesmo procedimento. O cálculo do potencial de troca-correlação é de fato feito em uma grade tipicamente numérica, em



espaço real e os resultados são então, ajustados ou expressos através de forma analítica conveniente (LABANOWSKI & ANDZELM, 1991).



Esquema 4– Esquema do sistema auto consistente usado na solução das equações de Kohn-Sham.

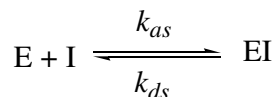
No procedimento padrão, as equações do método *TFD* são resolvidas expandindo-se as funções de onda de uma partícula (orbitais moleculares) variadamente, dentro de um conjunto de bases, como será discutido a seguir. Uma vez calculados os elementos da matriz de recobrimento e o Hamiltoniano, os autovalores e autovetores são encontrados da diagonalização da matriz H-eS. Seguindo um princípio

Aufbau (usando, por exemplo, estatísticas Fermi – Dirac), os orbitais são ocupados e uma nova densidade é formada. Isto completa um ciclo do procedimento SCF. Neste ponto, esquemas de aceleração de convergência são usados para criar uma nova densidade inicial (input) para densidades iniciais prévias (input) e finais (output). Após a autoconsistência ser atingida, a energia total para esta geometria, com as correspondentes propriedades moleculares, podem ser calculadas. Se a meta é uma otimização geométrica, os gradientes de energia são avaliados e usados na escolha de uma nova geometria. Um novo ciclo SCF é então iniciado com a nova geometria. Neste ponto, o ciclo SCF pode ser iniciado com a densidade SCF da geometria anteriormente definida, desde que esta geometria não tenha variado muito (MORGON & CUSTÓDIO, 1995).

Em geral, a grande vantagem da metodologia *TFD* sobre os métodos *ab initio* padrões está no ganho em velocidade computacional e espaço em memória. Considerando-se um sistema arbitrário qualquer modelado com  $n$  funções de base, o esforço computacional no estudo deste sistema utilizando-se *TFD* aumenta na ordem de  $n^3$ , enquanto que para os métodos Hartree-Fock aumenta em  $n^4$  ou  $n^5$  para técnicas de interação de configuração. Em contraste com métodos semi-empíricos, o hamiltoniano na *TFD* é bem definido e suas características não são obscurecidas por freqüentes e aproximações no procedimento computacional. Assim, este método é particularmente útil no estudo de grandes sistemas moleculares, descrevendo-se realisticamente sistemas orgânicos, inorgânicos, metálicos e semicondutores (MORGON & CUSTÓDIO, 1995).

### 3.5- CÁLCULO DE ENERGIA DE INTERAÇÃO

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



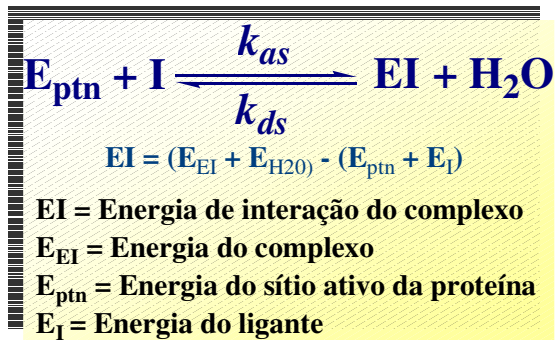
onde EI é o complexo enzima-inibidor e  $k_{as}$  é a constante de associação do complexo, definida pela relação  $k_{as} = [EI]/[E][I]$ . A constante de dissociação do complexo,  $k_{ds}$ , é o inverso de  $k_{as}$ . Estas constantes se relacionam com a variação da energia livre  $\Delta G$  da reação de acordo com a Equação 32.

$$\Delta G = -RT \ln k_{as} = RT \ln k_{ds} \quad (\text{Eq. 33})$$

Farmacologicamente, a constante  $k_{ds}$  é denominada  $K_i$  (originalmente definida nas reações enzimáticas como a constante de inibição enzimática). Assim:

$$\Delta G = RT \ln K_i \quad (\text{Eq.34})$$

Os métodos de perturbação da energia livre (FEP) e de integração termodinâmica (IT) são ferramentas utilizadas para o cálculo teórico de energia livre de interação relativa (MORGON & CUSTÓDIO, 1995). Procedimentos que são computacionalmente caros, porém efetivos quando as estruturas dos complexos são conhecidas. Outra vantagem dos modelos de FEP e IT é que ambos consideram explicitamente o solvente. Entretanto, estes procedimentos não são geralmente adequados a um modelo em Química Bioinorgânica Medicinal, que deve ser simples e de desenvolvimento rápido. Um procedimento alternativo e computacionalmente muito menos custoso pode ser adaptado ao nosso caso como mostrado no Esquema 5.



Esquema 5.

A energia de interação foi obtida pela diferença entre o valor da energia calculado do complexo enzima-inibidor e da água e a soma dos valores de energia calculados do sítio ativo da proteína e do ligante, ambos na mesma conformação do complexo.

*P  
A  
R  
T  
E  
E  
X  
P  
E  
R  
I  
M  
E  
N  
T  
A  
L*

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1- ANÁLISE CONFORMACIONAL DOS LIGANTES (1a-44)

Os processos biológicos envolvendo macromoléculas dependem de sua capacidade em interagir e discriminar uma determinada molécula (MURCKO & MURCKO, 1995). Portanto, informações sobre a estrutura química desta molécula auxiliam o planejamento racional de novos compostos bioativos, com adequado perfil de interação com o bioreceptor, eleito como alvo terapêutico.

A análise conformacional foi realizada para nos certificarmos de que estávamos trabalhando com uma conformação de energia mínima, na tentativa de identificação da conformação bioativa do ligante, objetivando posterior extrapolação para a conformação bioativa de novas moléculas que atuem como inibidores enzimáticos. Porém, faz-se necessário lembrar que nem sempre a geometria mais estável do ligante será a geometria presente no complexo formado.

A fim de se reunir dados que ajudassem a inferir a configuração da ligação C=N nos derivados acilidrazônicos, realizamos a análise conformacional com o método semi-empírico AM1, já que o mesmo é bem parametrizado para moléculas orgânicas, com o derivado estruturalmente mais simples (Estrutura **1a**, onde **R**= C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> e **W** = H), visando economizar tempo e custos computacionais.

Nesta etapa do trabalho, consideramos quatro ângulos diedros:  $\theta_1$ ,  $\theta_2$ ,  $\theta_3$  e  $\theta_4$  (Figura 23). Exploramos inicialmente incrementos de 10° e 30°, mas como a entalpia de formação variou muito pouco, adotamos um incremento maior, de 60°, para a análise conformacional.

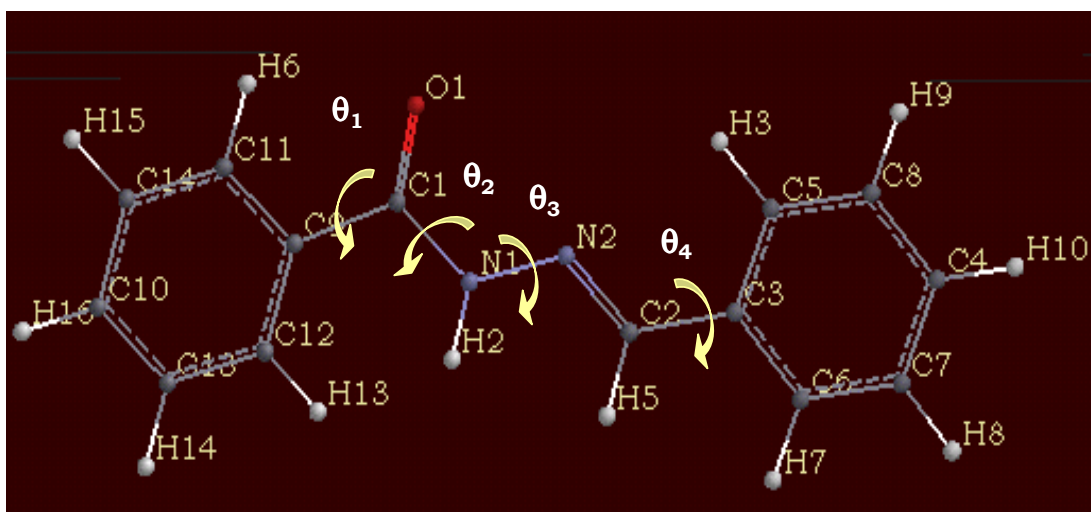


Figura 23- Ângulos diedros, sobre os quais foram realizadas as análises conformacionais.

#### 4.2-A OBTENÇÃO DOS DADOS ESTRUTURAIS DAS METALOENZIMAS PARA SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL

Inicialmente as estruturas cristalográficas nativas da ACE (Figura 24) (NATESH *et. al*, 2003), e de CA (Figura 25) (ERIKSSON *et. al*, 1988), foram obtidas do *Protein Data Bank* (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb>) com os respectivos códigos 1O8A e 1CA2.

As estruturas cristalográficas da ACE, co-cristalizada com lisinopril (Figura 26a) (NATESH *et. al*, 2003) e elanapril (Figura 26b) (NATESH *et. al*, 2004), e de CA, co-cristalizada com acetazolamida (Figura 27a) (CHAKRAVARTY *et. al*, 1985) e celecoxib (Figura 27b) (WEBER *et al.*, 2004), também foram obtidas PDB, com os respectivos códigos 1O86, 1UZE, 1AZM e 1OQ5.

As estruturas homodiméricas da ACE; dos complexos ACE-lisinopril e ACE-elanapril e a estrutura da CA e seus complexos CA-acetazolamida e CA-celecoxib foram simplificadas a monômeros. Realizamos, em seguida, a adição de átomos de hidrogênio, uma vez que os mesmos não estão inclusos na estrutura obtida do PDB.

Esta adição foi realizada automaticamente através do programa Spartan para a enzima inteira.

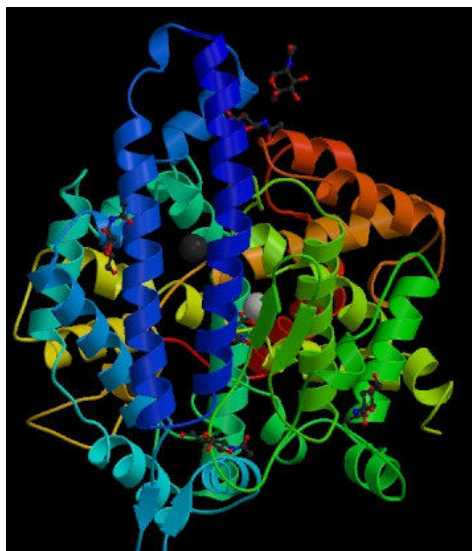


Figura 24-Estrutura Cristalográfica da ACE (nativa)-PDB 1O8A.

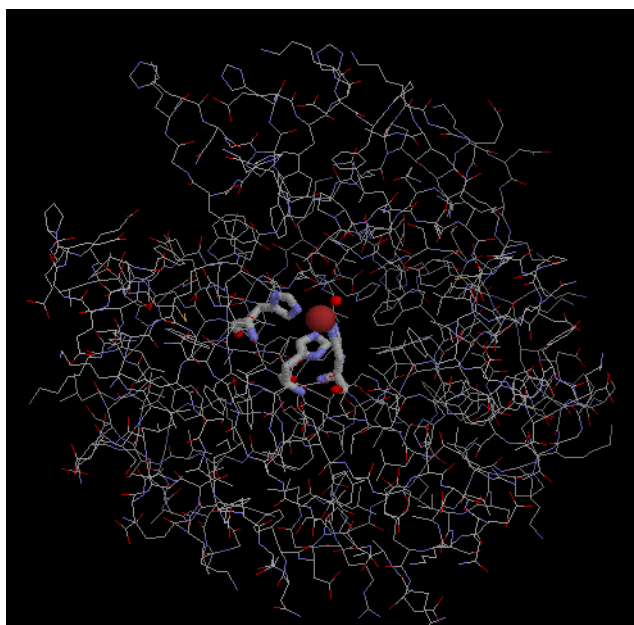


Figura 25-Estrutura Cristalográfica da CA (nativa)-PDB 1CA2.



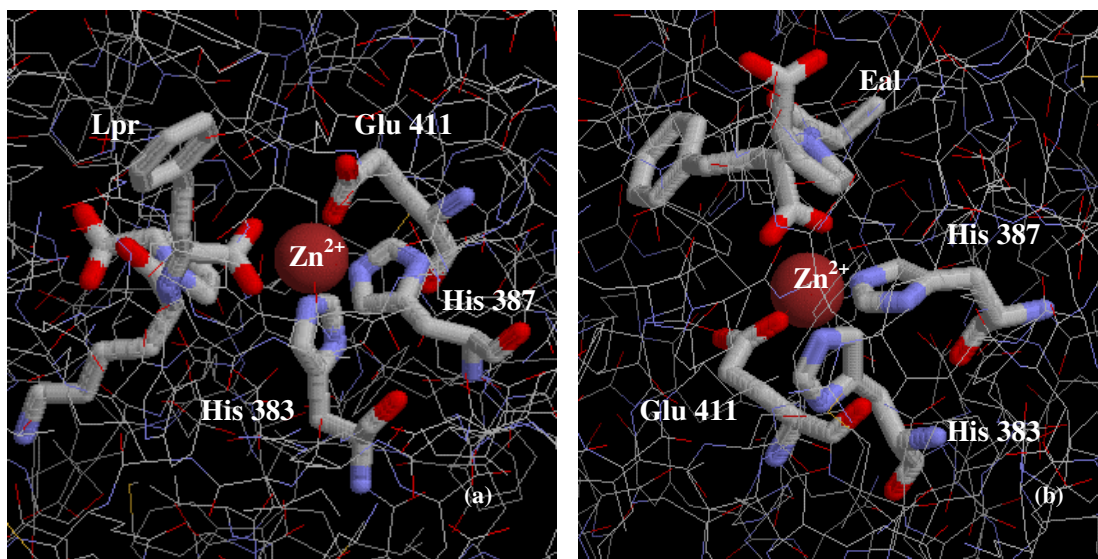


Figura 26- Estruturas cristalográficas da ACE, co-cristalizada com lisinopril-lpr (a) e elanapril-eal (b). PDB-1O86 e 1UZE.

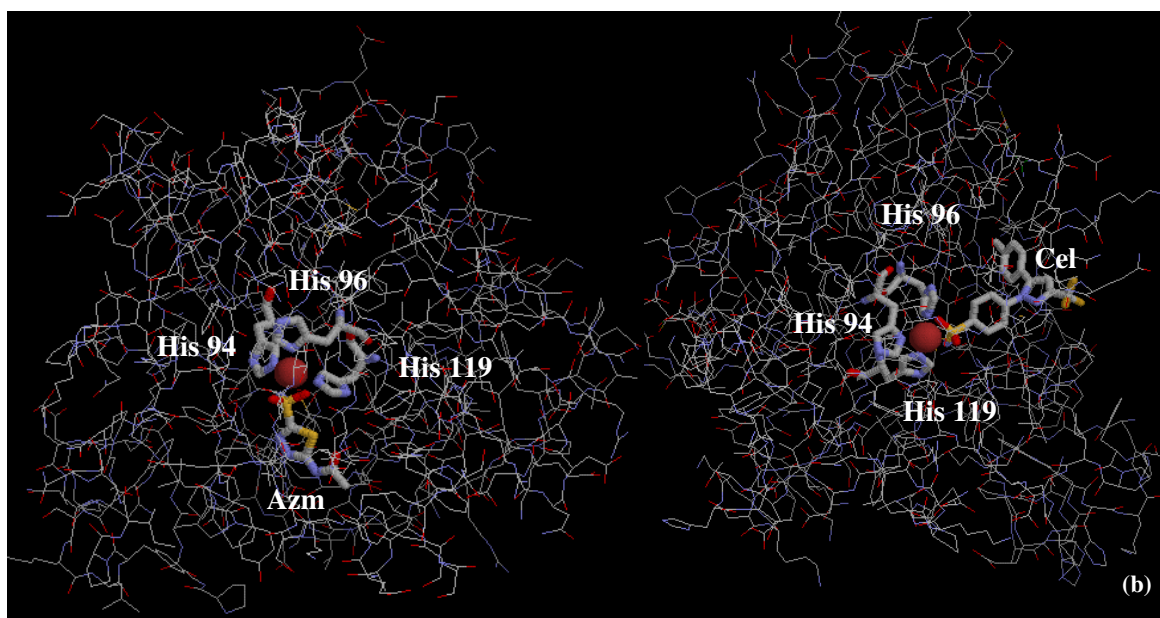


Figura 27- Estruturas cristalográficas da CA, co-cristalizada com acetazolamida-Azm(a) e celecoxib-Cel (b).PDB- 1AZM e 1OQ5.

Em seguida, os átomos pesados (carbono, nitrogênio, oxigênio e enxofre) das estruturas das enzimas nativas e dos complexos foram fixados e os átomos de hidrogênio foram minimizados pelo método *TFD* B3LYP/6-31G\*\*. Eliminadas quaisquer repulsões oriundas da adição de átomos de hidrogênio ou da própria cristalografia, os complexos foram submetidos a um corte por resíduos em sua estrutura de modo a reduzir o custo computacional das simulações a serem realizadas. Este processo nos permite simplificar o objeto de simulação, reduzindo o número de graus de liberdade do sistema (VAN GUNSTEREN & BERENDSEN, 1990 e KARPLUS & PETSKO, 1990). Este corte na estrutura das enzimas, ao redor do sítio ativo, correspondeu a um cubo com 15 Å de aresta (Figura 28a e 28b). É importante destacar que o sítio ativo destas enzimas localiza-se aproximadamente no centro de cada monômero, onde está localizado o íon  $Zn^{2+}$ , de forma que a simplificação estrutural realizada com o corte da proteína não influenciou no sítio de ligação dos inibidores.

#### **4.3-VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA**

De modo a permitir a validação da metodologia utilizada, as interações avaliadas nos complexos formados entre ACE-lisinopril e ACE-elanapril, CA-acetazolamida e CA-celecoxib descritas pela simulação através da *TFD* foram comparadas às interações observadas nas respectivas estruturas cristalográficas dos referidos complexos (VIDGREN *et al.*, 1990; NATESH *et al.*, 2003).

#### **4.4-ESTUDO DO MECANISMO DE COMPLEXAÇÃO METALOENZIMAS**

Como descrito anteriormente, a quelação metálica representa uma das estratégias de inibição enzimática que consiste no planejamento de moléculas que contenham em

sua estrutura um grupamento funcional capaz de quelar o átomo metálico presente no sítio ativo da enzima. O papel dos íons metálicos na estrutura e função de proteínas, ácidos nucleicos e hormônios peptídeos é fundamental, embora muitas vezes desconhecido no nível molecular. As principais hipóteses acerca dos princípios que regem a seletividade e especificidade de macromoléculas por um determinado metal estão frequentemente baseadas em teorias qualitativas e semiempíricas, tais como o princípio HSAB (ácidos e bases “duros” e “macios”) de Parr e Pearson (PEARSON & PARR, 1963), e a série Irving-Williams para constantes de estabilidade de íons divalentes (HUHEEY *et. al.*, 1993).

A avaliação da influência de cada substituinte **W** na dureza total dos ligantes, através da análise da diferença de energia entre os orbitais HOMO e LUMO, calculadas por *TFD*, foi eleita como descritor para realizar um “*screening*” virtual dos derivados *N*-acilidrazônicos estudados. A escolha da dureza como descritor para o planejamento racional se justifica porque a dureza é uma propriedade direta do mecanismo de interação proposto entre o composto bioativo ligante (derivados NAH's estudados) e o alvo farmacológico (enzimas envolvidas em processos fisiopatológicos) (PEARSON & PARR, 1963; HUHEEY *et. al.*, 1993).

Adicionalmente a entalpia de complexação foi obtida para os complexos que foram escolhidos para validação da metodologia, pela diferença entre o calor de formação calculado do complexo e a soma dos calores de formação calculados do sítio ativo da proteína e do ligante, ambos na mesma conformação do complexo (Esquema 5). A mesma metodologia foi utilizada para todos os inibidores, utilizando-se apenas os aminoácidos capazes de fazer interações diretas com o inibidor e o metal do sítio ativo

como sonda biológica para investigação do perfil de interação enzima-possíveis inibidores NAH's.

O corte por resíduos visou manter a integridade da esfera de coordenação metálica e adotar esta esfera como sonda biológica para investigar o mecanismo de interação derivados *N*-acilidrazônicos com ACE e CA (Figura 28a e 28b). Para a ACE nativa, os aminoácidos incluídos foram: histidina 383, histidina 387 e glutamina 411 e ainda um resíduo acetato 700 como artefato da cristalização. Para a CA nativa os aminoácidos: histidina 94, histidina 96 e histidina 119 e ainda uma molécula de água. Nas estruturas dos complexos com os inibidores foram incluídos os inibidores.

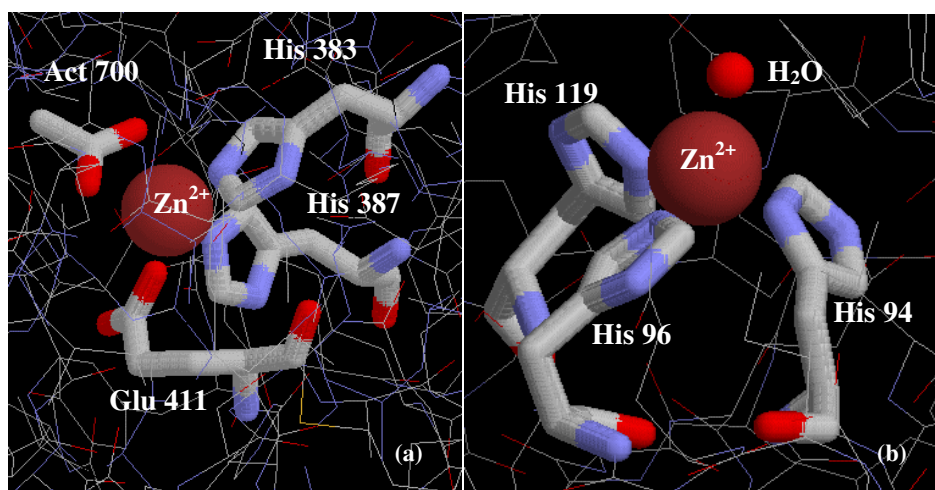


Figura 28- Estruturas das esferas de coordenação metálicas utilizadas como sondas biológicas no estudo do mecanismo de interação ACE (a) e CA(b) com derivados *N*-acilidrazônicos (**1a-44**)

*R*  
*E*  
*S*  
*U*  
*L*  
*T*  
*A*  
*D*  
*O*  
*S*  
*E*

*D*  
*I*  
*S*  
*C*  
*V*  
*S*  
*S*  
*Ã*  
*O*

## 5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ESTUDO TRIDIMENSIONAL DA TOPOLOGIA MOLECULAR DOS DERIVADOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS (1a-44)

#### 5.1.1 ANÁLISE CONFORMACIONAL DOS DERIVADOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS

As conformações das formas diastereoisoméricas (*Z* e *E*) de **1a-44** (Figura 21) foram calculadas pelo método semiempírico AM1. Os diastereoisômeros dos derivados com configuração *E* foram cerca de 1-6kcal/mol mais estáveis dos que os com configuração *Z* (Figura 29), estando em concordância com dados experimentais. Os diastereoisômeros *E* foram os produtos principais na síntese de derivados *N*-acilidrazônicos sintetizados em nosso laboratório (LIMA *et al.*, 2002; RIBEIRO *et al.*, 1998; IFA *et al.*, 2000).

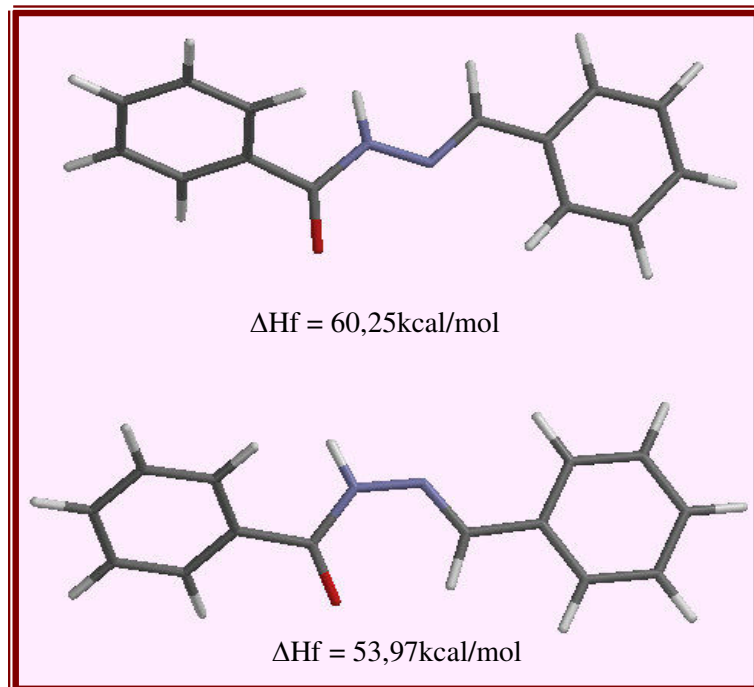


Figura 29 – Mínimos de energia para os diastereoisômeros (*E*) e (*Z*) do derivado **1a**.

Trabalhos descritos na literatura também confirmaram a diastereosseletividade deste processo. Palla e colaboradores (PALLA, G. *et al.*, 1982 & 1986) realizaram um estudo de RMN- $H^1$  e de  $C^{13}$  em derivados hidrazônicos (**1a**) e (**27**) (Figura 30) e concluíram que o diastereoisômero com configuração relativa *E* foi predominantemente formado em ambos os casos.

Estudos de RMN- $H^1$  e espectrometria de massa acoplada a cromatografia gasosa de alta resolução, permitiram inferir que os derivados acilidrazônicos pirazólicos (**6**) e (**45**) (Figura 30), sintetizados por nosso grupo de pesquisas (FREITAS *et al.*, 1991), também apresentaram preferencialmente a configuração relativa *E* (PEREIRA *et al.*, 1998).

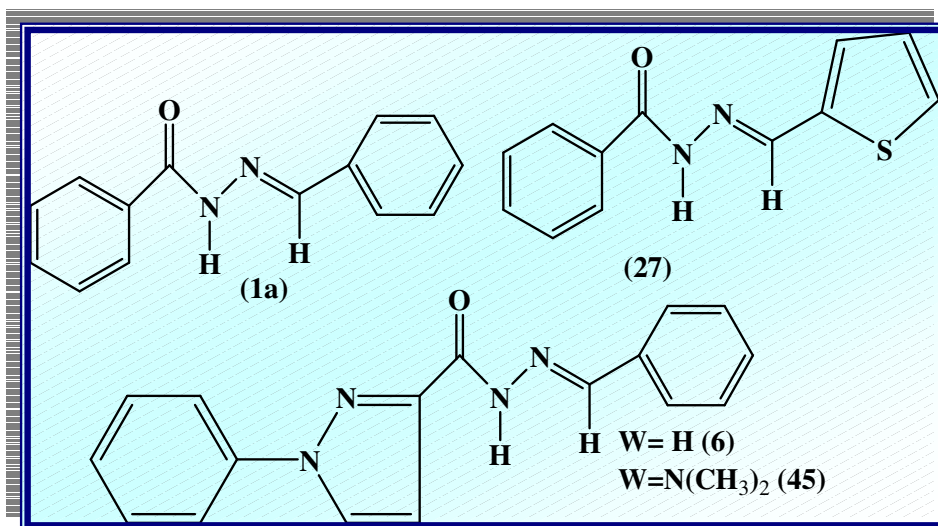


Figura 30- Configuração relativa dos derivados acilidrazônicos **1a**, **27**, **6** e **45**.

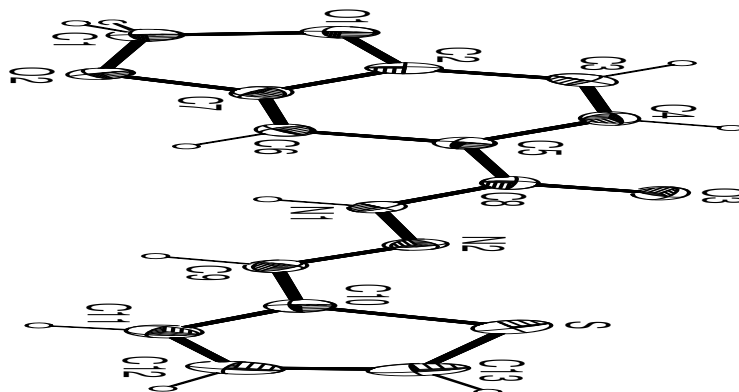
Recentemente, em nosso laboratório, cristais do derivado **26** (Figura 21) 2-tienilideno 3,4-metilenodioxibenzoilidrazida -LASSBio-294 foram obtidos e elucidados através de cristalografia de raios-X, apresentando também a configuração *E*, conforme ilustrado nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 – Dados cristalográficos para o derivado *N*-acilidrazônico **26\***.

Fórmula empírica	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S
Peso molecular	274.29
Temperatura	120(2) K
Comprimento de onda	0.71073 Å
Sistema Cristalino, grupo espacial	Monoclinico, P2 <sub>1</sub> /a, No. 14
Cela unitária	a = 8.9554(3) Å b = 12.3242(4) Å β= 91.140(3)° c = 11.0686(4) Å
Volume	1221.52(7) Å <sup>3</sup>
Z, Densidade calculada	4, 1.491 mg/m <sup>3</sup>
Coefficiente de Absorção	0.270 mm <sup>-1</sup>
F(000)	558
Tamanho do Cristal	0.20 x 0.10 x 0.10 mm
Faixa θ para coleta de dados	2.47 a 25.00°
Índices limitantes	-10 ≤ h ≤ 10, -14 ≤ k ≤ 14, -13 ≤ l ≤ 13
Reflexões coletadas	13304 / 2153 [R(int) = 0.0667]
Completeness to theta = 25.00	95.1 %
Max. e min. de transmissão	0.9735 e 0.9480
Método de refinamento	matriz dos mínimos quadrados F <sup>2</sup>
Dados / limites / parametros	2153 / 0 / 182
Melhor ajuste em F <sup>2</sup>	1.059
Índice R final [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0383, wR2 = 0.0950
R índices (todos os dados)	R1 = 0.0485, wR2 = 0.1033
Maior diferença do pico	0.211 e -0.365 e.Å <sup>-3</sup>



Tabela 5 – Coordenadas atômicas ( $\times 10^4$ ) e parâmetros isotrópicos ( $\text{Å}^2 \times 10^3$ ).  $U(\text{eq})$  é definido como um dos três traços do tensor ortogonalizado  $U^{ij}$  para o derivado **26\***.



	x	y	z	$U(\text{eq})$
S	7815(1)	5212(1)	556(1)	30(1)
O(1)	2508(2)	-1749(1)	4293(1)	34(1)
O(2)	1547(2)	-10(1)	4521(1)	33(1)
O(3)	7373(1)	1602(1)	2603(1)	26(1)
N(1)	5256(2)	2580(1)	2280(1)	22(1)
N(2)	6078(2)	3438(1)	1829(1)	21(1)
C(1)	1252(2)	-1137(2)	4698(2)	30(1)
C(2)	3493(2)	-1002(2)	3850(2)	25(1)
C(3)	4861(2)	-1184(2)	3354(2)	27(1)
C(4)	5552(2)	-272(2)	2990(2)	24(1)
C(5)	5076(2)	771(2)	3103(2)	20(1)
C(6)	3674(2)	941(2)	3624(2)	21(1)
C(7)	2930(2)	33(2)	3983(2)	23(1)
C(8)	5999(2)	1681(2)	2652(2)	20(1)
C(9)	5369(2)	4338(2)	1723(2)	22(1)
C(10)	6109(2)	5283(2)	1248(2)	24(1)
C(11)	5486(2)	6339(2)	1278(2)	27(1)
C(12)	6608(3)	7076(2)	762(2)	36(1)
C(13)	7837(3)	6581(2)	339(2)	36(1)

\* Obtido por Professor Eduardo E. Castellano-Laboratório de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural, IFSC, USP.

A análise conformacional do isômero *E* para todos os compostos estudados revelou quatro mínimos de energia local, apresentados na Figura 31.

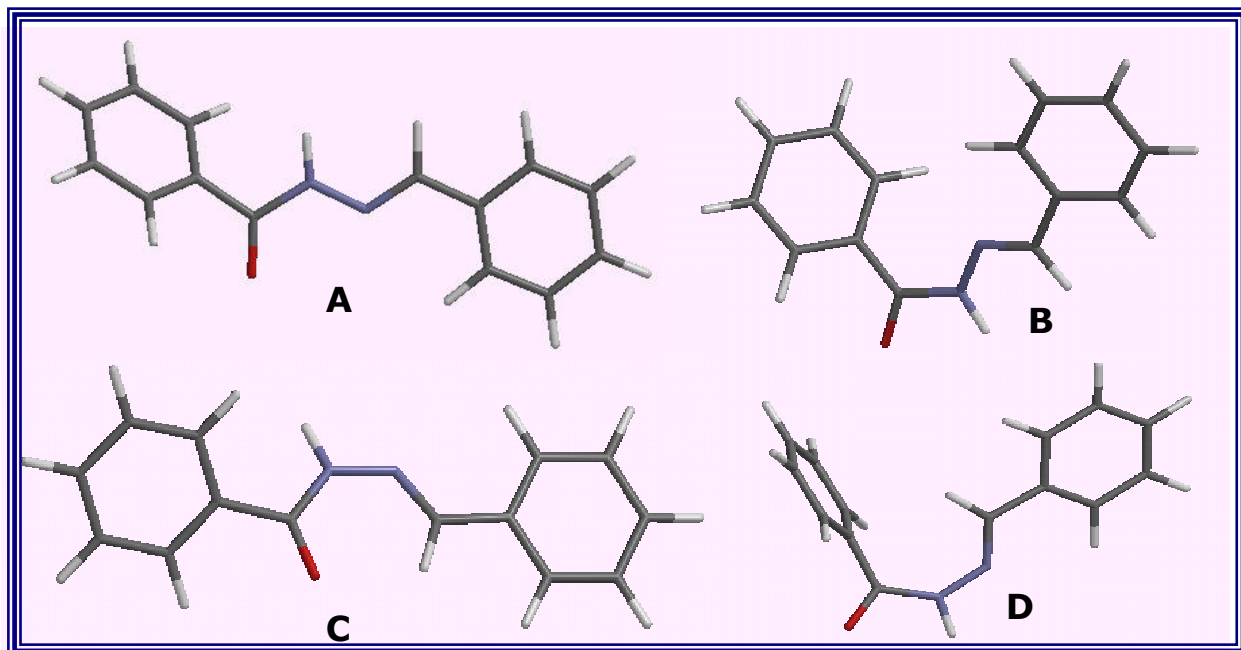


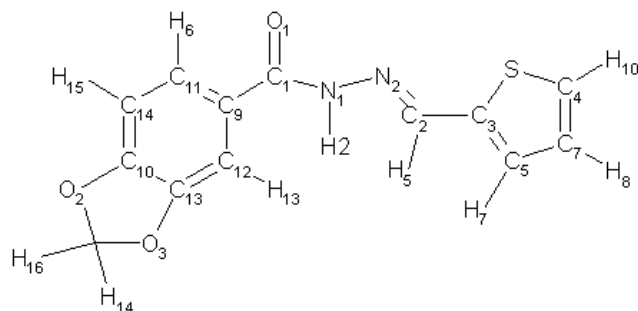
Figura 31- Mínimos de energia para os diastereoisômeros *E* do derivado **1a**.

Em geral, comprimentos e ângulos de ligação envolvendo átomos de carbono são mais rígidos que estes parâmetros envolvendo íons metálicos. As geometrias de coordenação são variáveis dentro de uma extensão de valores bem maiores que comprimentos e ângulos de ligação de estruturas covalentes, de natureza orgânica. Os graus de liberdade necessários, dentro de uma estrutura ligante para acomodar o íon metálico, são obtidos sempre através de rearranjos conformacionais, que são nada mais que variações nos ângulos de torção da estrutura do ligante.

O fato dos ângulos ligante-metal-ligante variem sobre uma faixa muito maior, do que os parâmetros correspondentes para moléculas orgânicas, indicam que a química de

coordenação é principalmente ditada pelo ligante (COMBA & HAMBLEY, 1995; COMBA *et al.*, 1999; 1999). Sendo assim, a estrutura de um composto de coordenação e, portanto, sua termodinâmica e propriedades eletrônicas, estão fortemente influenciadas pela estrutura do ligante. Tendo em vista estas observações, as estruturas dos confôrmeros A, B, C e D dos derivados (**1a-44**) foram otimizados por *TFD* B3LYP/6-31G\*\* objetivando estabelecer a possível conformação “bioativa” do ligante. Desta forma, os principais ângulos, comprimentos de ligação e ângulos diedros, teóricos, obtidos para o derivado **26** foram comparados com dados experimentais e estão compilados nas Tabelas 6, 7 e 8, bem como a entalpia de formação dos mínimos de energia obtidos na análise conformacional de  $\theta_1$ ,  $\theta_2$ ,  $\theta_3$ , e  $\theta_4$ .

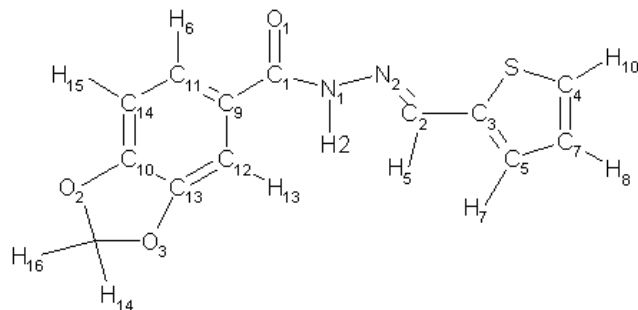
Tabela 6- Comparação entre os principais ângulos de ligação ( $^{\circ}$ ) calculados por *TFD* método B3LYP/ 6-31G\*\*, dos confôrmeros entalpicamente mais estáveis obtidos através da análise conformacional e dados de raios-X do derivado **(26)**- LASSBio-294.



Ângulo de ligação	(26)A	(26)B	(26)C	(26)D	Raios-x
C <sub>9</sub> -C <sub>1</sub> -N <sub>1</sub>	116,87	114,85	116,03	114,83	116,72
C <sub>1</sub> -N <sub>1</sub> -H <sub>2</sub>	119,65	121,06	117,70	120,03	119,14
O <sub>1</sub> -C <sub>1</sub> -N <sub>1</sub>	121,73	122,40	121,96	122,04	121,79
C <sub>1</sub> -N <sub>1</sub> -N <sub>2</sub>	118,79	120,48	131,02	121,03	118,42
H <sub>2</sub> -N <sub>1</sub> -N <sub>2</sub>	122,01	118,42	111,10	117,05	122,44
N <sub>1</sub> -N <sub>2</sub> -C <sub>2</sub>	116,43	120,32	124,38	120,06	115,66
N <sub>2</sub> -C <sub>2</sub> -H <sub>5</sub>	111,35	112,51	121,39	118,06	113,31
N <sub>2</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>3</sub>	121,67	133,71	123,04	130,05	120,36
C <sub>3</sub> -C <sub>2</sub> -H <sub>5</sub>	126,98	113,78	114,18	114,05	126,33

**Maiores valores das diferença médias encontradas : A 1,7%, B 9%, C 10% e D 9,7%.**

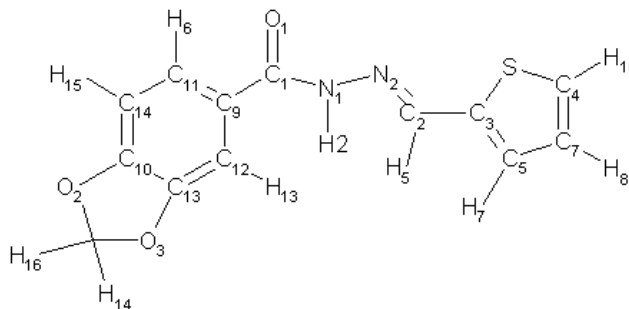
Tabela 7 – Comparação entre os principais comprimentos de ligação (Å), calculados por *TFD* método B3LYP/ 6-31G\*\*, dos confôrmeros entalpicamente mais estáveis obtidos através da análise conformacional e dados de raios-X do derivado (26)- LASSBio-294.



Comprimento de ligação	(26)A	(26)B	(26)C	(26)D	Raios-x
C <sub>1</sub> – C <sub>9</sub>	1,491	1,505	1,490	1,490	1,492
C <sub>1</sub> – O <sub>1</sub>	1,232	1,216	1,245	1,235	1,234
C <sub>1</sub> – N <sub>1</sub>	1,349	1,392	1,403	1,412	1,345
N <sub>1</sub> – N <sub>2</sub>	1,393	1,360	1,328	1,332	1,392
N <sub>1</sub> – H <sub>2</sub>	1,012	1,035	1,033	1,041	1,011
N <sub>2</sub> – C <sub>2</sub>	1,280	1,294	1,307	1,305	1,272
C <sub>2</sub> – H <sub>5</sub>	1,110	1,018	1,113	1,016	1,096
C <sub>2</sub> – C <sub>3</sub>	1,470	1,483	1,467	1,482	1,470

**Maiores valores das diferença médias encontradas : A 1,3%, B 7%, C 4,3% e D 7,3%.**

Tabela 8 – Entalpias de formação e comparação entre os principais ângulos diedros ( $^{\circ}$ ) calculados por *TFD* método B3LYP/ 6-31G\*\*, dos conformeros entalpicamente mais estáveis obtidos através da análise conformacional e dados de raios-X do derivado (**26**)- LASSBio-294.



Ângulos diedros	(26)A	(26)B	(26)C	(26)D	Raios-x
C <sub>3</sub> -C <sub>2</sub> -N <sub>2</sub> -N <sub>1</sub>	-179,02	-2,27	-179,43	-2,31	-179,25
H <sub>5</sub> -C <sub>2</sub> -N <sub>2</sub> -N <sub>1</sub>	0,73	177,65	0,44	178,53	0,75
N <sub>2</sub> -N <sub>1</sub> -C <sub>1</sub> -O <sub>1</sub>	0,13	-4,41	0,73	-4,42	0,13
H <sub>2</sub> -N <sub>1</sub> -C <sub>1</sub> -O <sub>1</sub>	-179,12	173,32	175,29	173,31	-179,88
H <sub>2</sub> -N <sub>1</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>9</sub>	1,46	-6,92	-4,03	-7,03	1,34
H <sub>2</sub> -N <sub>1</sub> -N <sub>2</sub> -C <sub>2</sub>	13,19	-4,87	-178,31	-4,97	13,79
C <sub>1</sub> -N <sub>1</sub> -N <sub>2</sub> -C <sub>2</sub>	-174,69	172,92	-3,47	173,05	-166,22
<b><math>\Delta H_f</math> (kcal/mol)</b>	<b>60,25</b>	<b>58,13</b>	<b>53,97</b>	<b>58,56</b>	

De fato, podemos considerar que as conformações A, B, C e D não apresentem diferenças significativas em termos energéticos e que todas podem estar presentes no meio biológico. Entretanto, a conformação A apresenta maior similaridade estrutural com a estrutura resolvida por raios-X e, adotando este critério, assumimos que a estrutura cristalina pode ser a conformação “bioativa”, visto que esta última não precisa ser a conformação mais estável. As estruturas A e cristal foram sobrepostas e podemos observar o alinhamento dos propostos grupamentos farmacofóricos na Figura 32.

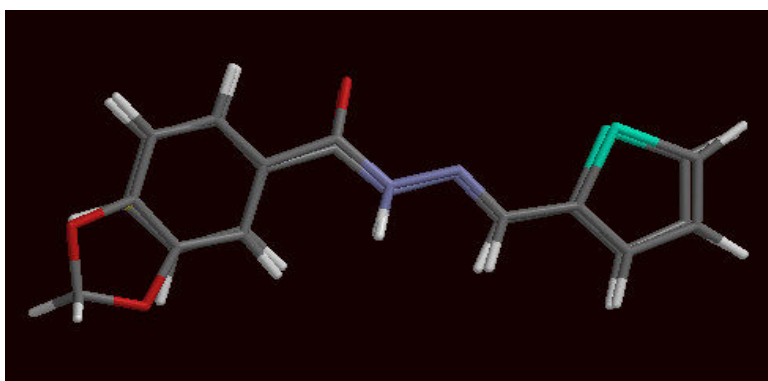


Figura 32– Alinhamento do confômero (26)A com a estrutura cristalina (26) (LASSBio 294).

### 5.1.2 ESTUDO DAS PROPRIEDADES ESTEREOELETRÔNICAS DOS DERIVADOS *N*-ACILIDRAZÔNICOS

Reações enzimáticas típicas envolvem formação e rompimento de interações químicas. Frequentemente, o íon metálico presente no sítio ativo enzimático pode atuar como mediador de transferência de elétrons ou prótons (COMBA *et al.*, 1999). As principais interações envolvendo reações enzimáticas (substrato-enzima) são as interações de van der Waals, eletrostáticas, ligação de hidrogênio e interações

hidrofóbicas. Objetivando analisar a influência dos substituintes **R** e **W** (Figura 21), nas possíveis interações químicas (especificidade, labilidade e estabilidade) dos complexos NAH's–metais, realizamos o estudo das propriedades estereoeletrônicas através da análise de orbitais de fronteira, HOMO e LUMO, obtidos pela *TFD*.

A partir da estrutura do confôrmero (**26**)A foram construídas as estruturas (**1b-h,2-14,15a-h,16a-h,17-44**) otimizadas por *TFD*. O diagrama de contorno dos orbitais HOMO para os derivados **1g** (W=OH e R=k), **1a** (W= H e R=k), **1b** (W=Cl e R=k), **6** (W=H e R=e), **7** ( W=H e R=f) e **12** ( W=H e R=l) pode ser observado na figura 34.

A Figura 34 é a representação gráfica do orbital molecular ocupado de mais alta energia (HOMO) para os derivados *N*-acilidrazônicos (**1g, 1a, 1b, 6, 7 e 12**) . A análise da representação gráfica do HOMO permitiu evidenciar que os substituintes **R** não têm participação na constituição da função de onda que descreve este orbital. Em contraste, os substituintes **W**, apresentaram contribuições expressivas na constituição desta função de onda.

Cabe ressaltar, que o derivados *N*-acilidrazônicos, representados esquematicamente pela Figura 34 são análogos da classe de derivados **46-50** sintetizados no LASSBio (Figura 33) que além de apresentarem atividade anti-tumoral (Tabela 9) (BARREIRO *et al.*, 2002), vem sendo estudados como potenciais inibidores da ribonucleotídeo redutase.



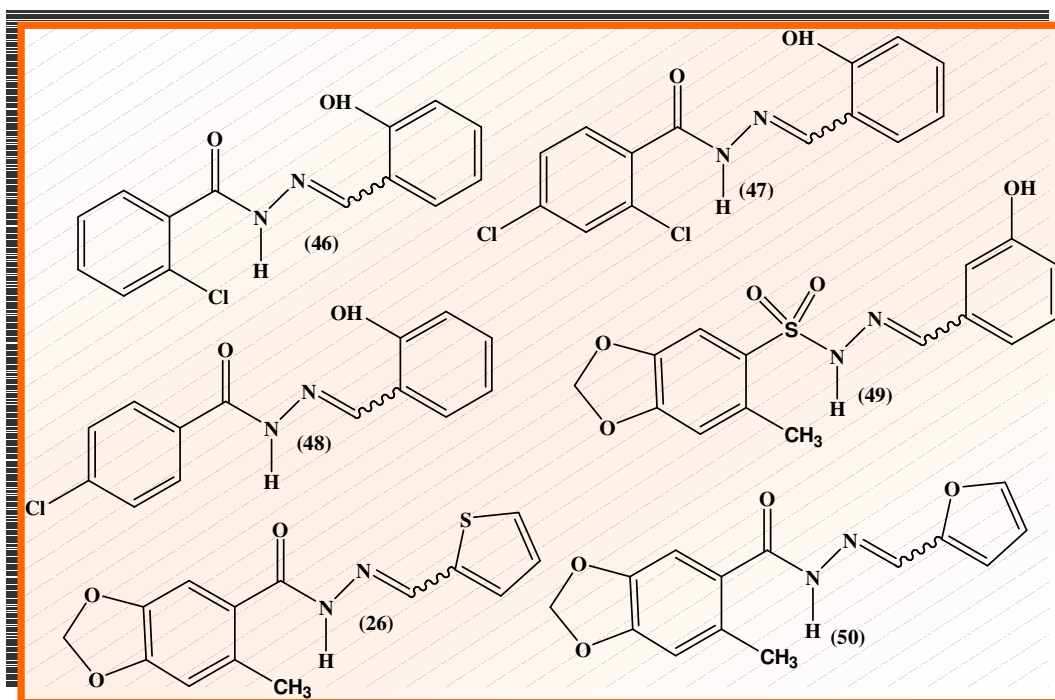


Figura 33- Estruturas dos derivados **46-50**.

Tabela 09- IC<sub>50</sub> para os derivados **46-50**.

Composto	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>
<b>(26)</b> – LASSBio 294	Inotrópico positivo
<b>(46)</b> – LASSBio 466	3,52
<b>(47)</b> – LASSBio 467	8,96
<b>(48)</b> – LASSBio 431	283,9
<b>(49)</b> – LASSBio 578	>300
<b>(50)</b>	Inotrópico negativo

<sup>a</sup>IC<sub>50</sub> = concentração ativa do inibidor produzindo 50% de inibição da atividade anti-tumoral *in vitro*.

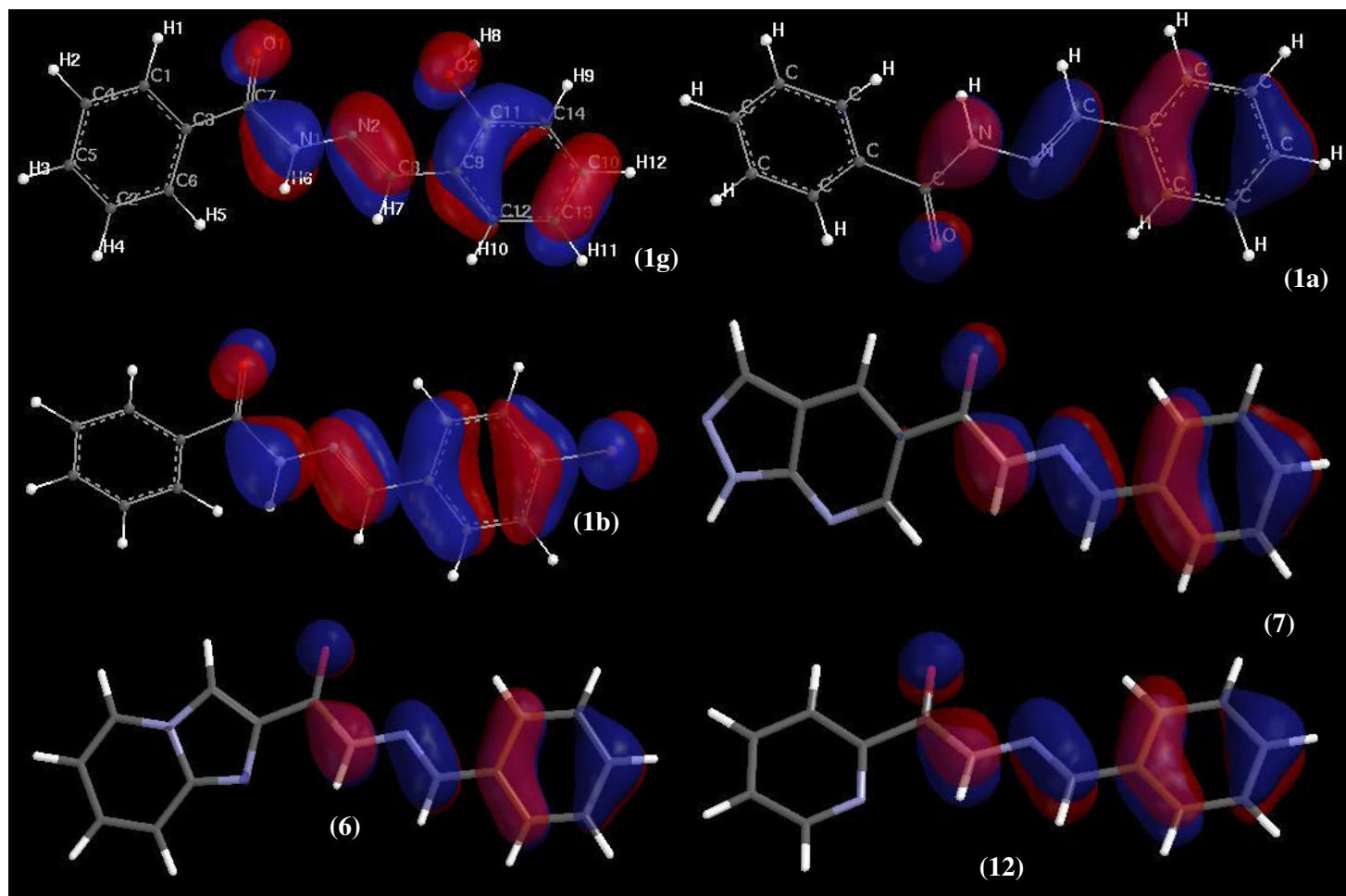


Figura 34- Representação gráfica do HOMO para os derivados *N*-acilidrazônicos **1g** (W=OH e R=k), **1a** (W= H e R=k), **1b** (W=Cl e R=k), **6** (W=H e R=e), **7** ( W=H e R=f) e **12** ( W=H e R=l) candidatos a inibidores enzimáticos neste estudo.

Para evitar qualquer dúvida quanto à participação dos substituintes **R** na constituição da função de onda que descreve o HOMO do ligante, dois outros substituintes ( $R = \text{NO}_2$  e  $\text{CH}_3$ ) presentes nos derivados **51** e **52**, capazes de retirar e doar, respectivamente, densidade eletrônica foram otimizados por *TFD* método BLYP/6-31G\*\* e novamente não foi observada a participação dos substituintes **R** na constituição do HOMO do ligante, conforme Figura 35.

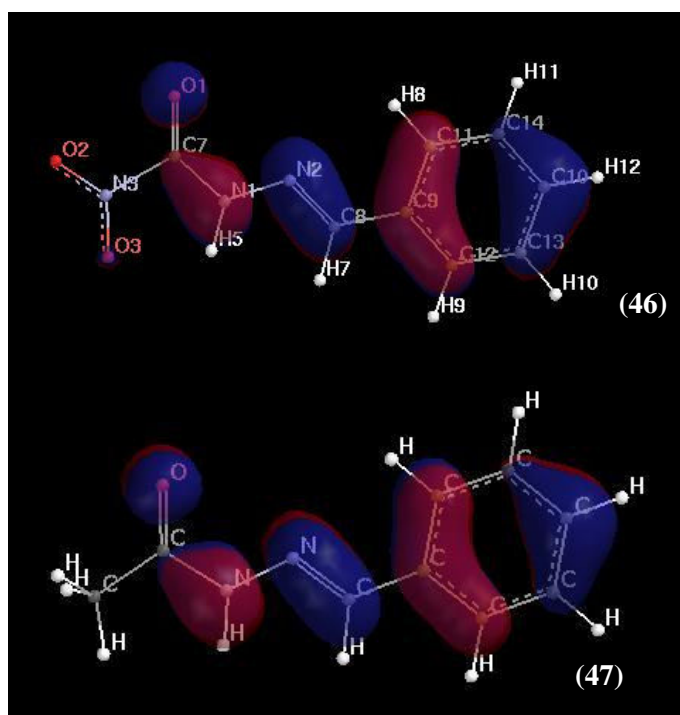


Figura 35- Representação gráfica do HOMO dos derivados *N*-acilidrazônicos onde **X**=  $\text{CH}=\text{CH}$  e **R** =  $\text{NO}_2$  (**51**) e  $\text{CH}_3$  (**52**) e **W** = H obtida por *TFD*.

O mapa da superfície de energia potencial também foi gerado por *TFD*, conforme figura 36. Este se mostrou similar para todos os derivados (**1a-44**) e não somente evidenciou a distribuição de cargas nas moléculas, como também revelou que os possíveis sítios de coordenação das *NAH*'s podem ser os átomos de *O* da carbonila e

*N(imínico)* da hidrazona.

O valor do potencial eletrostático (a energia de interação entre um ponto com carga positiva, o núcleo e os elétrons da molécula) é representado através da utilização de cores. As cores próximas ao vermelho correspondem a potenciais negativos, enquanto as cores próximas do azul a potenciais positivos. Como esperado, os átomos de *O* da carbonila e *N(imínico)* da hidrazona (os átomos mais eletronegativos da molécula) são vermelhos no mapa da superfície de energia potencial (Figura 36).

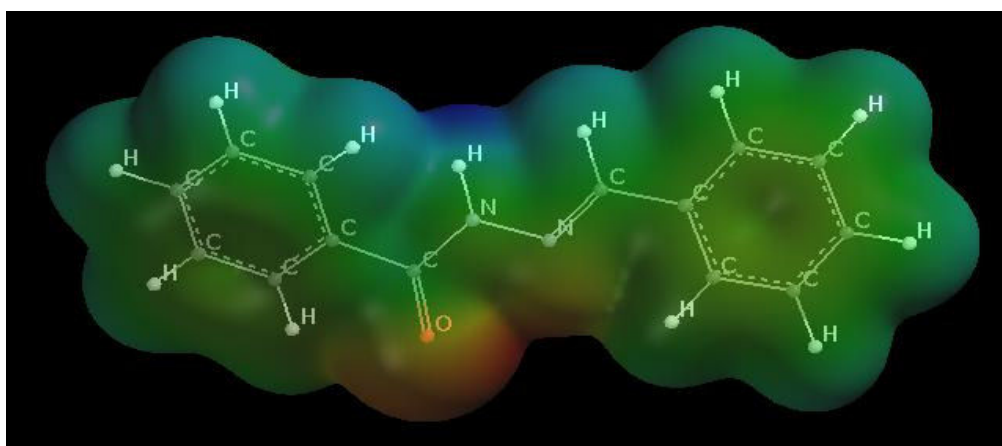


Figura 36- Representação gráfica da superfície de potencial eletrostático do derivado *N*-acilidrazônico (**1a**) obtida por *TFD B3LYP/6-31G\*\**.

Segundo o mapa a densidade eletrônica, entre todos os átomos da estrutura, está mais concentrada sobre o *O* e o *N* e, por isso, eles seriam os pontos mais prováveis de interação com espécies eletrofílicas (são os únicos átomos da estrutura que tem um par de elétrons solitários em posição para atuar como doadores para um átomo aceptor). O zinco, por sua vez, é um ácido na fronteira da dureza (COLEMAN, 1998). Desta forma, ambos átomos de *N* e *O* podem interagir com este metal.

Uma vez que as interações dos sítios de coordenação das NAH's com o íon metálico acontecerão através dos pares eletrônicos isolados destes átomos (*O* da carbonila e *N imínico* da hidrazona), é necessário o alinhamento espacial destes pares de forma a facilitar a quelação. Esse fato corrobora que o confômero A, apesar de não ser o mais estável, porém o mais estruturalmente parecido com a estrutura cristalográfica do derivados 26 deva ser aquele envolvido na coordenação como o metal do sítio ativo enzimático, ou seja, o provável confômero “bioativo”.

## **5.2. ESTUDOS DE SPR PARA OS DERIVADOS N-ACILIDRAZÔNICOS (1a-44)**

A avaliação da influência de cada substituinte **W** na dureza absoluta dos ligantes, através da análise da diferença de energia entre os orbitais HOMO e LUMO, calculadas por *TFD*, foi eleita como descritor para estudos SPR dos derivados *N*-acilidrazônicos estudados. A escolha da dureza como descritor para o planejamento racional de candidatos a inibidores de metaloenzimas Zn-dependentes, se justifica porque a dureza é uma propriedade direta do mecanismo de interação entre o composto “bioativo” ligante (derivados NAH's estudados) e o alvo farmacológico (enzimas envolvidas em processos fisiopatológicos).

Os resultados, dispostos na Tabela 10, permitiram evidenciar que existe uma tendência: substituintes capazes de doar densidade eletrônica contribuem para o aumento significativo da dureza total de cada espécie ligante.

Tabela 10 – Avaliação da contribuição eletrônica dos diferentes substituintes W na dureza absoluta de alguns derivados *N*-acilidrazônicos selecionados.

COMPOSTOS	W	DUREZA ABSOLUTA- $\eta$ (eV)
<b>1a</b>	H	3,30
<b>1b</b>	Cl	2,92
<b>1c</b>	Br	2,91
<b>1d</b>	F	2,96
<b>1e</b>	OMe	3,78
<b>1f</b>	NMe <sub>2</sub>	3,41
<b>1g</b>	OH	3,79
<b>1h</b>	Me	3,60
<b>15a</b>	H	4,21
<b>15b</b>	Cl	3,97
<b>15c</b>	Br	3,94
<b>15d</b>	F	3,96
<b>15e</b>	OMe	4,63
<b>15f</b>	NMe <sub>2</sub>	4,24
<b>15g</b>	OH	4,65
<b>15h</b>	Me	4,42
<b>16a</b>	H	4,13
<b>16b</b>	Cl	3,86
<b>16c</b>	Br	3,83
<b>16d</b>	F	3,87
<b>16e</b>	OMe	4,52
<b>16f</b>	NMe <sub>2</sub>	4,98
<b>16g</b>	OH	4,62
<b>16h</b>	Me	4,01

### 5.3. ESTUDO EHT DOS DERIVADOS NAH'S 1a-44, CANDIDATOS A INIBIDORES DE METALOENZIMAS Zn-DEPENDENTES

As metaloenzimas objetos deste estudo são a enzima conversora da angiotensina e a anidrase carbônica. Assim, serão relatados aqui os estudos referentes a ACE e no item 5.8 discutiremos de maneira detalhada estes para a CA.

Como descrito anteriormente, a ACE está diretamente envolvida, tanto com a homeostase da pressão arterial quanto com o controle das doenças cardiovasculares. Sua principal função é catalisar a hidrólise da ligação peptídica Phe8-His9 (Figura 11) da angiotensina I, fornecendo a angiotensina II, octapeptídeo ativo no controle da pressão arterial, que possui uma unidade dipeptídeo carboxi-terminal His-Leu (SANTOS *et al.*, 2000). Neste contexto, diversos inibidores potentes têm sido desenvolvidos para ACE (Tabela 11) (COHEN, 1985; UNGER *et al.*, 1990; NATESH *et al.*, 2004). Embora estes inibidores atuem de forma seletiva, muitos estudos indicam que os mesmos não apresentam a especificidade desejada (SWAAN, 1995; TABIBIAZAR, 2001), o que pode explicar alguns dos indesejáveis efeitos colaterais (tosse seca, alteração do paladar e reações de hipersensibilidade, tais como erupção cutânea e edema angioneurótico). Em indivíduos com insuficiência renal crônica, podem induzir hiperpotassemia. Em pacientes com hipertensão renovascular bilateral ou com rim único, podem promover redução da filtração glomerular com aumento dos níveis séricos de uréia e creatinina. observados com suas utilizações clínicas (SWAAN, 1995; TABIBIAZAR, 2001).

Os derivados **1a-44** objetos deste estudo apresentam similaridades estruturais com o grupo amida presente nos substratos da ACE, conforme pode ser observado nas Figuras 11 e 21. Esta similaridade sugere que os derivados NAH's em questão possam se comportar como inibidores competitivos.

Por outro lado, ACE cliva ligações peptídicas utilizando o mecanismo de catalise geral ácido-base, onde a reação catalisada é termodinamicamente favorecida, porém cineticamente estável. A estabilidade cinética deve-se a deslocalização da dupla ligação da ligação peptídica (UNGER *et al.*, 1990).

Tabela 11- Inibidores da ACE.

Classe	Fármaco	$IC_{50}$ (nM) <sup>a</sup>
Sulfidril	Captopril <sup>d</sup>	21
	Pivalopril <sup>d</sup>	17
	Rentiapril <sup>d</sup>	7
	Zofenopril <sup>d</sup>	8
Carboxialquil	Benazepril <sup>c</sup>	5
	Cilazapril <sup>c</sup>	1,4
	Delapril <sup>c</sup>	40
	Enalapril <sup>c</sup>	3
	Indolapril <sup>c</sup>	2,6
	Indalapril <sup>c</sup>	800
	Lisinopril <sup>b</sup>	11
	Pentopril <sup>b</sup>	4,8
Fosforila	Ceranopril <sup>b</sup>	36
	Fosinopril <sup>b</sup>	11

<sup>a</sup> $IC_{50}$  = concentração ativa do inibidor produzindo 50% de inibição da ACE *in vitro*.

<sup>b</sup>COHEN(1985); <sup>c</sup>ONDETTI(1998); <sup>d</sup>UNGER *et al.* (1990) .

A teoria acido-base “duros” e “macios” (HSAB) foi proposta a mais de trinta



anos atrás por Pearson (PEARSON, 1963) com o objetivo de prever a estabilidade e reatividade em uma reação ácido-base típica. Parr *et al.*, (PARR & YANG, 1995) tem utilizado a *TFD* para fornecer as bases teóricas e um método para quantificar o princípio HSAB. No estudo da reatividade e seletividade química, se faz necessário que se investigue propriedades quantitativas que caracterizem estas propriedades locais. Em 1983, Parr e Pearson (PARR & PEARSON, 1983) introduziram o conceito de dureza absoluta  $\eta$ , que é definido em termos do potencial de ionização  $I$  e da afinidade eletrônica  $A$  de um sistema de acordo com

$$\eta = (I - A) \geq 0 \quad (\text{Eq. 34})$$

A dureza também pode ser quantificada em relação à densidade eletrônica dos orbitais moleculares de fronteira e desta forma pode ser associado à seletividade química

$$\eta = \frac{1}{2} (E_L - E_H) \quad (\text{Eq. 35})$$

onde  $E_L$  e  $E_H$  são as energias de LUMO e HOMO, respectivamente. Neste caso, a dureza representa um máximo onde os mínimos de energia da superfície de energia são encontrados.

Em 1992 Dronskowski (DRONSKOWSKI, 1992) propôs que a dureza pode ser obtida em função do somatório do que foi definido como incremento de reatividade atômica  $\check{\zeta}_R$

$$\eta = \sum_R \check{\zeta}_R \quad (\text{Eq. 36})$$

onde a definição do incremento de reatividade atômica, que é um valor de energia

medido em eV, incorpora as somas e diferenças da chamada população de Hamilton. A população de Hamilton combina ambas contribuições atômicas e ligantes (DRONSKOWSKI, 1992). Valores negativos indicam átomos ou ligações reativas por conta de seu papel no decréscimo na dureza do cristal. Ao contrário, valores positivos podem ser encontrados nas partes inertes da estrutura.

Por razões de conveniência, a fim de normalizarmos os valores, foi introduzido o índice de reatividade atômica relativa  $\Xi_R$ , dado pela expressão 37

$$\Xi_R \cong \frac{\xi_R - \xi_{\max}}{\xi_{\min} - \xi_{\max}} \quad (\text{Eq. 37})$$

onde todos os índices são normalizados entre “0” (átomo mais inerte ou **min**) e “1” (átomo mais reativo ou **max**). Esta proposta, que é capaz de expressar os termos de reatividade atômica relativa descritos na equação 37 utilizando *TFD* (PARR & YANG, 1995) e a dureza máxima de Pearson (PEARSON, 1983), foi adaptada a EHT (HOFFMAN, 1963) através do programa computacional EXTEN 04 no LQIC.

A avaliação anterior da dureza dos derivados **1a-44** (item 5.2) demonstrou existir uma correlação entre a natureza eletrônica dos substituintes em **W** e a dureza destes derivados. Estes resultados sugerem que a dureza é realmente uma propriedade intrínseca à seletividade destes ligantes frente as metaloenzimas Zn-dependentes. Desta forma, realizamos novo estudo SPR para avaliar a contribuição pontual destes substituintes (**W**) na densidade eletrônica dos prováveis sítios de coordenação com o  $\text{Zn}^{2+}$  das metaloenzimas, previamente sugeridos neste estudo (átomos de *O* da carbonila e *N* 2 da hidrazona, item 5.1.2). Este estudo foi realizado através do cálculo dos índices de reatividade atômica ( $\Xi_R$ , equação 37) por EHT.

O gráfico 2 mostra que existe um aumento proporcional da reatividade atômica

dos átomos propostos como sítios de coordenação da NAH's com as metaloenzimas com a dureza absoluta destes ligantes.

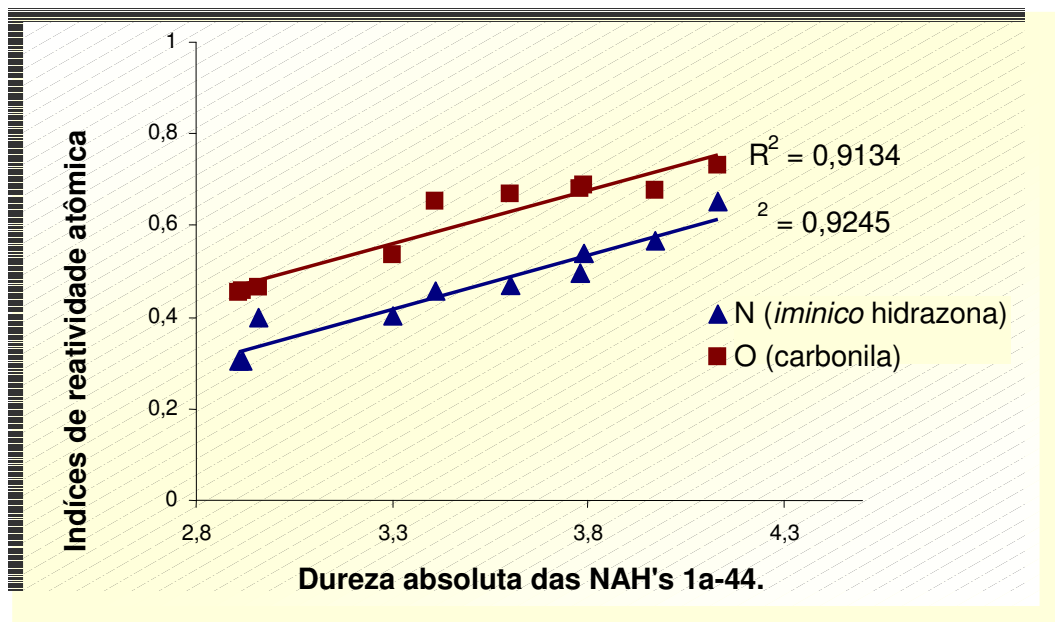


Gráfico 2. O aumento proporcional da dureza absoluta das NAH's com a reatividade atômica dos átomos propostos como sítios de coordenação NAH's-ACE.

#### 5.4. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA O ESTUDO DOS COMPLEXOS

Apresentaremos inicialmente os resultados das simulações utilizando a *TFD* referentes ao estudo dos compostos da literatura (53-56 Figura 37), no sentido de validar tanto a metodologia quanto a abordagem das análises utilizadas. Esta abordagem será aplicada aos compostos previamente sintetizados no LASSBio os quais, por sua vez, nos permitirão traçar um perfil relativo à interação receptor-ligante para a série com o intuito de maximizar a interação com a ACE e a CA.

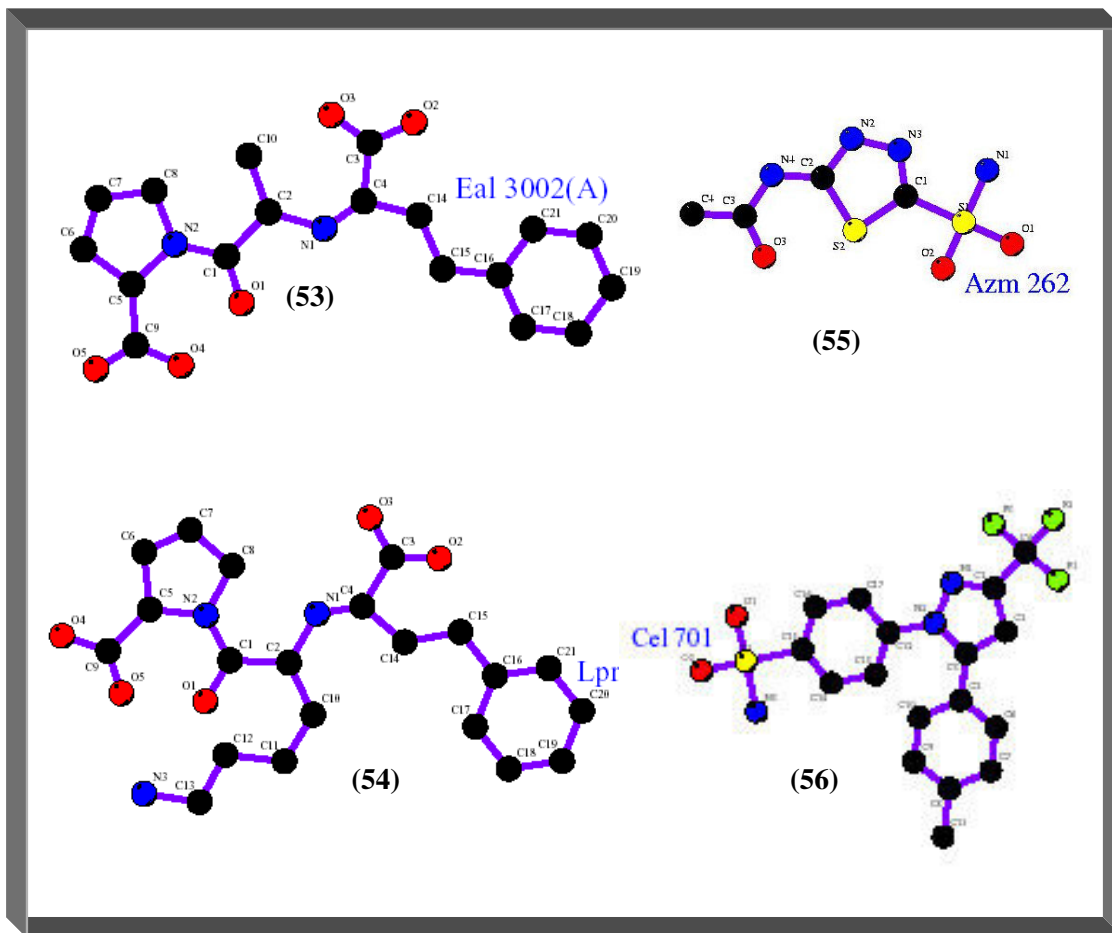


Figura 37- Inibidores escolhidos da literatura (ONDETTI *et al.*, 1998; COHEN *et al.*, 1985; NATESH *et al.*, 2003 e 2004) para validação da metodologia.

## 5.5 ESTUDOS UTILIZANDO TFD DOS INIBIDORES DA CLASSE CARBOXIALQUIL 53 E 54 COMPLEXADOS A ACE

Selecionamos dois inibidores da classe carboxialquila: enalapril, (1-((2S)-2-[[[(1S)-1-carboxi-3-fenilpropil] amino] propanoil]-L-prolina) (53) (Figura 37), com  $IC_{50} = 3nM$  e lisinopril, (N2-[(S)-1-carboxi-3-fenilpropil]-L-lisil]-L-prolina) (54) (Figura 37) com  $IC_{50} = 11nM$  (ONDETTI *et al.*, 1998; COHEN *et al.*, 1985). Os complexos obtidos

com estes compostos foram submetidos à simulação pela *TFD* de modo a nos oferecer dados sobre o alinhamento e sobre as interações com os resíduos de aminoácidos e o zinco do sítio ativo da enzima. Estes dados serão discutidos nos próximos itens de maneira detalhada.

### 5.5.1 ANÁLISE DA ORIENTAÇÃO DOS INIBIDORES CARBOXIALQUIL **53** E **54** NO SÍTIO ATIVO DA ACE

Na Figura 38 estão descritos os compostos **53** e **54** após a minimização de seus complexos com o modelo do sítio ativo da ACE através da *TFD* método B3LYP/6-31G\*\*. Podemos observar que estes compostos possuem orientações bastante semelhantes no sítio ativo da ACE.

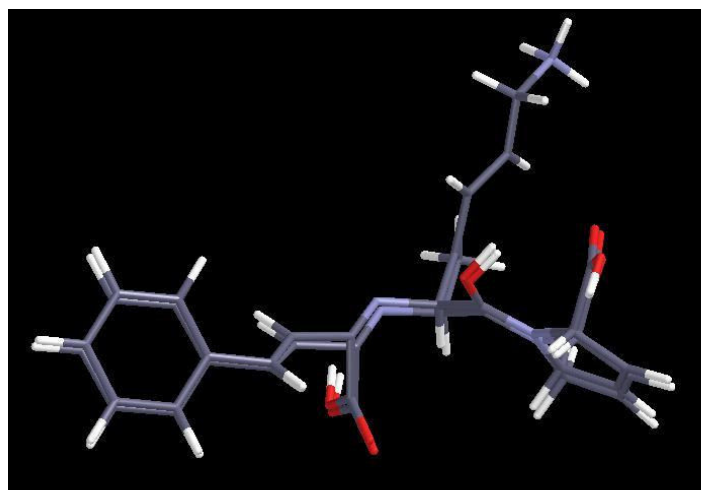


Figura 38 - Estruturas minimizadas e sobrepostas dos complexos de **53** e **54**, mostrando a similaridade estrutural entre estes compostos e a orientação adotada no sítio ativo da enzima, após a minimização.

## 5.5.2 ANALISE DAS INTERAÇÕES DOS INIBIDORES **53** E **54** COM O $Zn^{2+}$ DO SÍTIO ATIVO DA ACE

As interações dos compostos **53** e **54**, com cada um dos resíduos de aminoácidos da ACE foram, caracterizadas em termos de distâncias (Tabela 12). Estas interações serão primeiramente descritas e, em seguida, vamos discutir apenas as interações com  $Zn^{2+}$  do sítio comparativamente entre os complexos de **53** e **54** com a ACE. Estes resultados teóricos foram obtidos utilizando a *TFD* método B3LYP/6-31G\*\*.

A figura 39 permite a comparação entre as distâncias teóricas (*TFD* método B3LYP/6-31G\*\*) relativas às interações entre resíduos de aminoácidos da ACE (Tabela 12) e o composto **53**, com estas distâncias obtidas por cristalografia de raios-x.

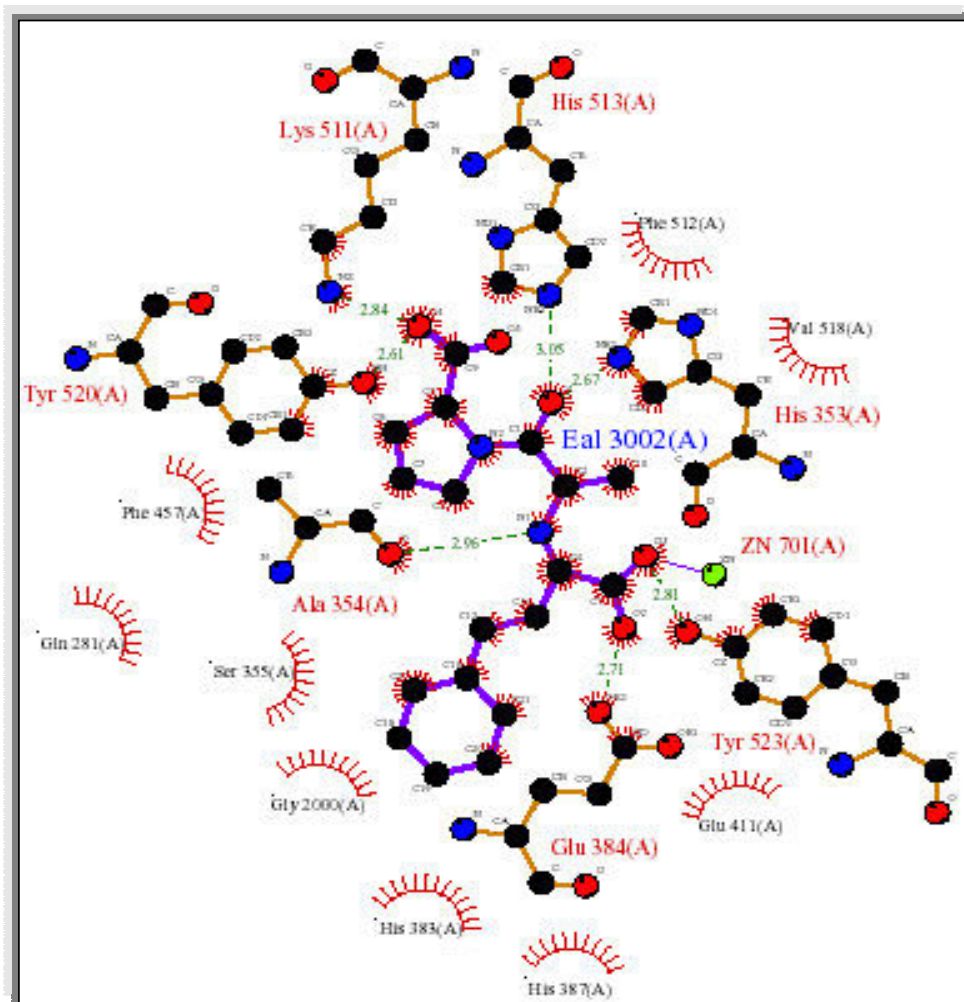


Figura 39- Representação com o LIGPLOT da estrutura cristalográfica do complexo formado entre o composto **53** e ACE (NATESH *et al.*, e 2004).

A figura 40 permite a comparação entre as distâncias teóricas (*TFD* método B3LYP/6-31G\*\*) relativas às interações entre resíduos de aminoácidos da ACE (Tabela 12) e o composto **54**, com estas distâncias obtidas por cristalografia de raios-x.

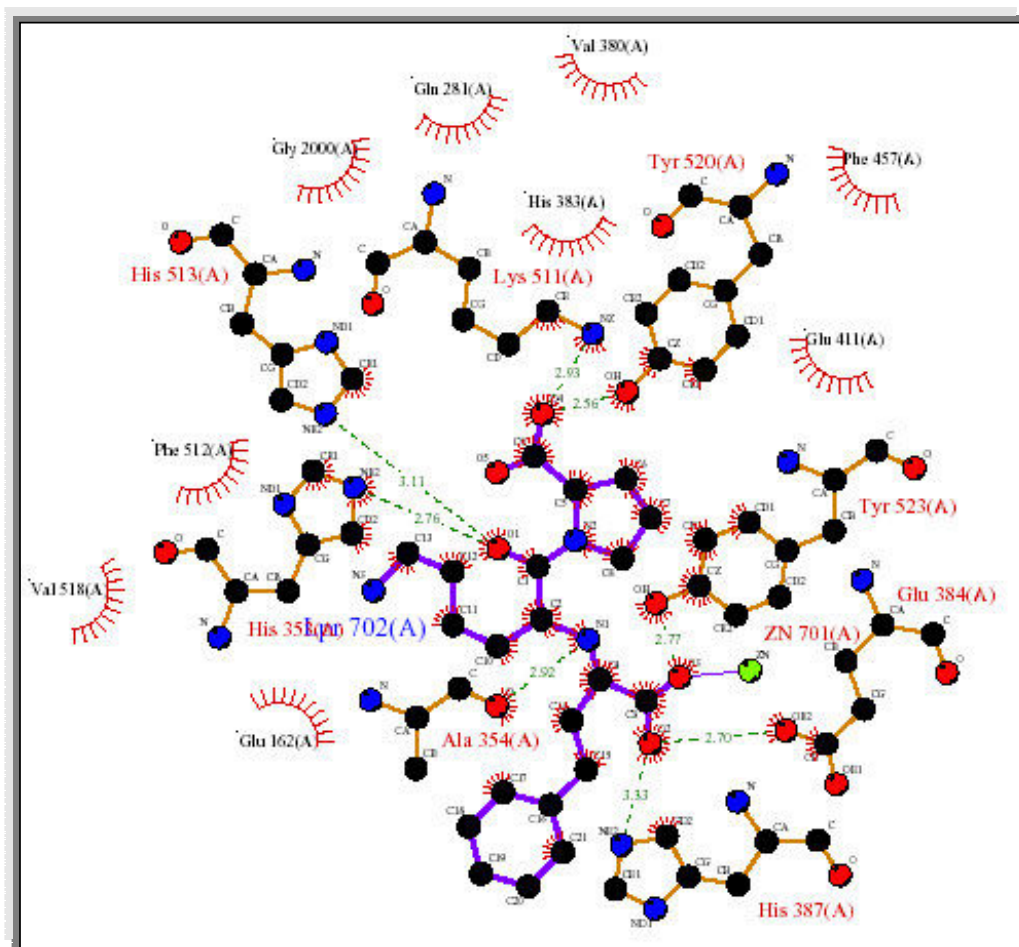


Figura 40- Representação com o LIGPLOT da estrutura cristalográfica do complexo formados entre o composto **54** e ACE (NATESH *et al.*, 2003).



Tabela 12- Distâncias teóricas (*TFD* método B3LYP/6-31G\*\*) relativas às interações entre resíduos de aminoácidos da ACE e os compostos **53** e **54**.

<b>RESÍDUOS</b>	<b>COMPOSTO 53 (Å)</b>	<b>COMPOSTO 54(Å)</b>
<b>Lys 511</b>	2,82	2,90
<b>Tyr 520</b>	2,60	2,53
<b>Ala 354</b>	2,92	2,90
<b>Glu 384</b>	2,69	2,68
<b>Tyr 523</b>	2,81	2,75
<b>His 353</b>	2,60	2,75
<b>His 513</b>	3,05	3,09

### 5.5.3 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE *TFD* COM OS DADOS CRISTALOGRAFÍCOS DOS COMPLEXOS FORMADOS ENTRE A ACE E OS COMPOSTOS 53 E 54.

Após o estudo utilizando *TFD* do complexo de **53** e **54** com a ACE, realizamos a comparação com os dados cristalográficos descritos previamente (NATESH *et al.*, 2003 e 2004) visando estabelecer uma comparação entre os resultados obtidos pelas diferentes metodologias. Deve-se ter em mente que poderão ocorrer divergências nesta comparação em função da característica específica de cada abordagem; o cristal, como estrutura rígida, é influenciado pelo empacotamento das moléculas, enquanto que a *TFD* é influenciada pela flutuação da densidade eletrônica da estrutura. A comparação envolveu os dados da Figuras 38, 39 e 40, Tabelas 12, 13 e 14 (páginas 90, 92, 93, 94 e 96 respectivamente).

Tabela 13– Comparação entre os **dados teóricos** (TFD BLYP/6-31G\*\*) e os **dados cristalográficos\*** da geometria de coordenação do íon Zn<sup>2+</sup> do sítio ativo da ACE complexado a estrutura **53**.

53	Comprimento de ligação X- Zn <sup>2+</sup> (Å)	Comprimento de ligação X- Zn <sup>2+</sup> (Å)	Ângulos (°)							
			X-Zn-O <sub>2</sub> (Eal)	X-Zn-O <sub>3</sub> (Eal)	X-Zn-383	X-Zn-383	X-Zn-387	X-Zn-387	X-Zn-411	X-Zn-411
O <sub>3</sub> eal	2,03	2,01	51	53	112	116	123	125	101	103
O <sub>2</sub> eal	2,53	2,65			95	98	90	93	152	155
N His 383	1,98	2,01					102	109	84*	90
N His 387	1,95	2,01							102	106
O Glut 411	1,79*	1,89								

\*Valor da maior diferença média encontrada: a) comprimento de ligação- 5% b) ângulo de ligação 6%

Tabela 14– Comparação entre os **dados teóricos** (TFD BLYP/6-31G\*\*) e os **dados cristalográficos\*** da geometria de coordenação do íon Zn<sup>2+</sup> do sítio ativo da ACE complexado a estrutura **54**.

54	Comprimento de ligação X- Zn <sup>2+</sup> (Å)	Comprimento de ligação X- Zn <sup>2+</sup> (Å)	Ângulos (°)							
			X-Zn-O <sub>2</sub> (Lpr)	X-Zn-O <sub>3</sub> (Lpr)	X-Zn-383	X-Zn-383	X-Zn-387	X-Zn-387	X-Zn-411	X-Zn-411
O <sub>3</sub> lpr	2,06	2,14	52	53	114	117	121	123	97	99
O <sub>2</sub> lpr	1,58	2,60			95	98	90	90	150*	152
N His 383	1,98	2,04					108	109	93	93
N His 387	1,99*	2,07							110	110
O Glut 411	1,99	1,99								

\*Valor da maior diferença média encontrada: a) comprimento de ligação- 4% b) ângulo de ligação 3%

As interações mais significativas realizadas pelo composto **53 e 54** com o  $Zn^{2+}$  no sítio ativo da ACE, segundo dados de cristalografia de raios-X (NATESH *et al.*, 2003 e 2004) são as interações dos átomos de *O* dos resíduos carboxilatos que estão bem posicionados a 2,1Å e a 2,6 Å do átomo de  $Zn^{2+}$ , tabelas 13 e 14. Estas interações foram identificadas nos estudos de *TFD*. Portanto, estes resultados permitiram validar o modelo de *TFD* e a capacidade do mesmo em reproduzir o comportamento molecular dos complexos simulados.

Uma vez que a metodologia de *TFD* foi testada com sucesso no estudo de inibidores da literatura (NATESH *et. al*, 2003 e 2004), realizamos o estudo com os compostos **1a-44**, propostos como candidatos a inibidores da ACE que será apresentado no item **5.7**.

## **5.6 ESTUDOS UTILIZANDO *TFD* DOS INIBIDORES 55 E 56 COMPLEXADOS A CA**

Selecionamos um inibidor da classe das sulfonamidas: a acetazolamida (5-acetamido-1,3,4-tiadiazola-2-sulfonamida) (**55**) (Figura 37), com  $IC_{50} = 12$  nM e um inibidor da classe dos coxibs : o celecoxib, (4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-yl] benzenosulfonamida) (**56**) (Figura 37) com  $IC_{50} = 21$  nM (WEBER *et al.*, 2004), por possuir um grupamento  $-SO_2NH_2$  típico dos inibidores clássicos da CA. Os complexos obtidos com estes compostos foram submetidos à simulação pela *TFD* de modo a nos oferecer dados sobre o alinhamento e sobre as interações com os resíduos de aminoácidos e o zinco do sítio ativo da enzima. Estes dados serão discutidos a seguir.

### 5.6.1 ANÁLISE DA ORIENTAÇÃO DOS INIBIDORES 55 E 56 NO SÍTIO DA CA

Na Figura 41 estão descritos os compostos **55** e **56** após a minimização de seus complexos com a CA. Podemos observar que estes compostos possuem orientações bastante semelhantes no sítio ativo da CA.

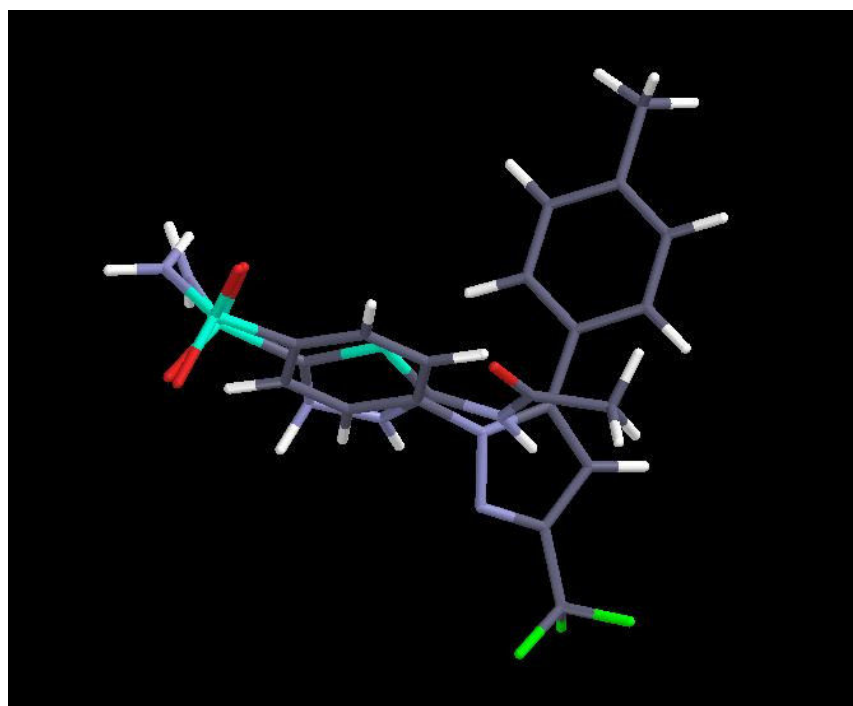


Figura 41 - Estruturas minimizadas e sobrepostas dos complexos de **55** e **56**, mostrando a similaridade estrutural entre estes compostos e a orientação adotada no sítio ativo da enzima, após a minimização.

## 5.6.2 ANÁLISE DAS INTERAÇÕES DOS INIBIDORES 55 E 56 COM O SÍTIO ATIVO DA CA

As interações dos compostos **55** e **56**, com cada um dos resíduos de aminoácidos da CA foram, caracterizadas em termos de distâncias (Tabela 15). Estas interações serão primeiramente descritas e, em seguida, vamos discutir apenas as interações com  $Zn^{2+}$  do sítio comparativamente entre os complexos de **55** e **56** com a CA. Estes resultados teóricos foram obtidos utilizando a *TFD* método B3LYP/6-31G\*\*.

A figura 42 permite a comparação entre as distâncias teóricas (*TFD* método B3LYP/6-31G\*\*) relativas às interações entre resíduos de aminoácidos da CA (Tabela 15) e o composto **55**, com estas distâncias obtidas por cristalografia de raios-x.

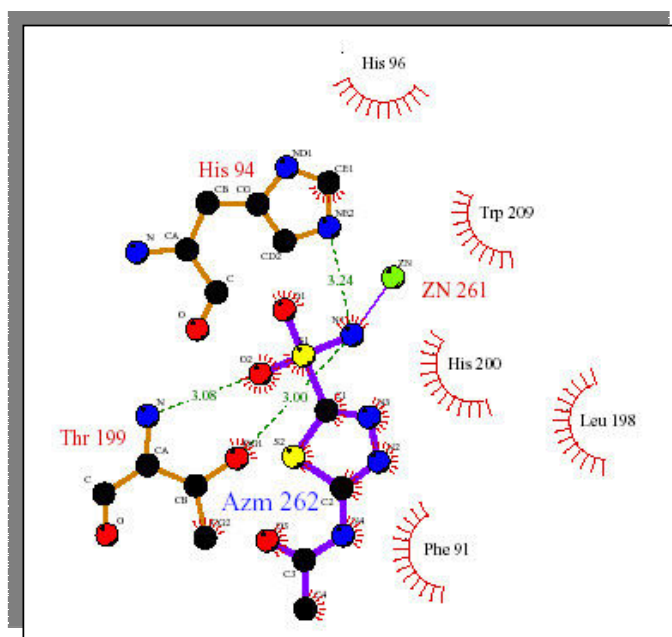


Figura 42- Estrutura cristalográfica do complexo formado entre o composto **55** e a CA

(VIDGREN *et al.*, 1990).

A figura 43 permite a comparação entre as distâncias teóricas (*TFD* método B3LYP/6-31G\*\*) relativas às interações entre resíduos de aminoácidos da CA (Tabela 15) e o composto **56**, com estas distâncias obtidas por cristalografia de raios-x.

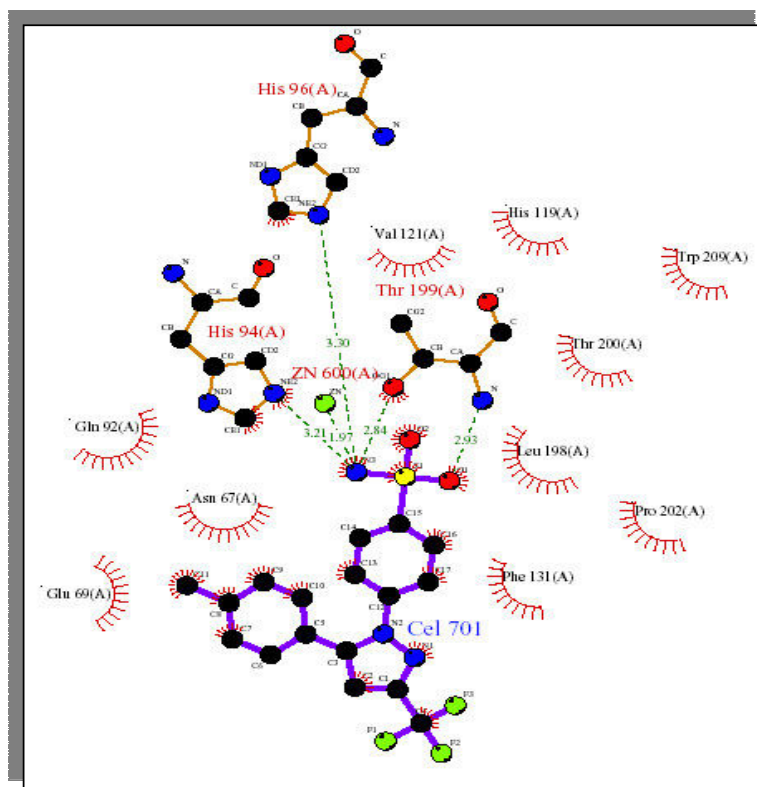


Figura 43- Estrutura cristalográfica do complexo formado entre o composto **56** e a CA (WEBER *et al.*, 2004).

Tabela 15- Distâncias teóricas (*TFD* método B3LYP/6-31G\*\*) relativas às interações entre alguns resíduos de aminoácidos da CA e os compostos **55** e **56**.

<b>RESÍDUOS</b>	<b>COMPOSTO 55 (Å)</b>	<b>COMPOSTO 56(Å)</b>
Tyr 199	2,99	3,78
Leu 198	3,65	3,53
Gln 92	2,72	3,00
Phe 131	3,41	2,96
His 94	3,10	3,21
His 96	3,03	3,28

### **5.6.3 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE *TFD* COM OS DADOS CRISTALOGRAFICOS DO COMPLEXO ENTRE A CA E OS COMPOSTOS 55 E 56**

Após o estudo utilizando *TFD* do complexo de **55** e **56** com a CA, realizamos a comparação com os dados cristalográficos descritos previamente (VIDGREN *et al.*, 1990; WEBER *et al.*, 2004) visando estabelecer uma comparação entre os resultados obtidos pelas diferentes metodologias. A comparação envolveu os dados das Figuras 41, 42 e 43 (páginas 97, 98 e 99, respectivamente) e das Tabelas 15 , 16 e 17 (páginas 100 e 101 respectivamente).

Tabela 16– Comparação entre os **dados teóricos** (TFD BLYP/6-31G\*\*) e os **dados cristalográficos\*** da geometria de coordenação do íon  $Zn^{2+}$  do sítio ativo da CA complexado a estrutura **55**.

55	Comprimento de ligação X- $Zn^{2+}$ (Å)	Comprimento de ligação X- $Zn^{2+}$ (Å)	Ângulos (°)							
			X-Zn-O(Azm)	X-Zn-O(Azm)	X-Zn-94	X-Zn-94	X-Zn-96	X-Zn-96	X-Zn-119	X-Zn-119
N Azm	1.89	1.90	46	49	74*	79	169	172	85	85
O Azm	3.16	3.20			101	104	120	124	114	113
N His 94	1.99	1.99					110	108	113	112
N His 96	1.99	1.99							93	96
N His 119	1.95*	1.98								

\*Valor da maior diferença média encontrada: a) comprimento de ligação- 1% b) ângulo de ligação 3%

Tabela 17– Comparação entre os **dados teóricos** (TFD BLYP/6-31G\*\*) e os **dados cristalográficos\*** da geometria de coordenação do íon  $Zn^{2+}$  do sítio ativo da CA complexado a estrutura **56**.

56	Comprimento de ligação X- $Zn^{2+}$ (Å)	Comprimento de ligação X- $Zn^{2+}$ (Å)	Ângulos (°)							
			X-Zn-O <sub>3</sub> (Cel)	X-Zn-O <sub>3</sub> (Cel)	X-Zn-383	X-Zn-383	X-Zn-387	X-Zn-387	X-Zn-411	X-Zn-411
N Cel	1.94	1.97	50*	53	86	85	105	108	83	85
O Cel	2.99	3.0			110	108	159	167	116	118
N His 94	1.98	1.99					101	105	111	113
N His 96	1.98	1.99							97	99
N His 119	2,02*	2.07								

\*Valor da maior diferença média encontrada: a) comprimento de ligação- 2% b) ângulo de ligação 5%



As interações mais significativas realizadas pelo composto **55** e **56** com o  $Zn^{2+}$  no sítio ativo da CA, segundo dados de cristalografia de raios-X (VIDGREN *et al.*, 1990; WEBER *et al.*, 2004) são as interações dos átomos de *O* e *N* dos resíduos sulfonamidas que podem ser observados nas tabelas 16 e 17. Estas foram identificadas nos estudos de TFD. Portanto, estes resultados permitiram validar o modelo de TFD e a capacidade do mesmo em reproduzir o comportamento molecular dos complexos simulados.

Uma vez que a metodologia de TFD foi testada com sucesso no estudo de inibidores da literatura (VIDGREN *et al.*, 1990; WEBER *et al.*, 2004), realizamos o estudo dos compostos **1a-44** propostos como candidatos a inibidores da CA que será apresentado no item **5.8**.

## **5.7. ESTUDOS UTILIZANDO A TFD PARA OS DERIVADOS 1a-44 CANDIDATOS A INIBIDORES DA ACE**

Por conta da atividade enzimática da ACE estar diretamente relacionada com a presença do  $Zn^{2+}$  em seu sítio ativo (LANTHIER *et al.*, 1997), a química de coordenação deste com o inibidor é de grande interesse. Nesta etapa, efetuamos um estudo da interação do  $Zn^{2+}$  do sítio ativo enzimático com os derivados **1a-44**, objetivando investigar a contribuição das propriedades estruturais e eletrônicas observadas anteriormente na química de coordenação envolvendo a formação destes complexos. E, desta forma, inferir um provável mecanismo de coordenação para a formação destes complexos. Este estudo foi realizado utilizando a TFD através dos métodos BLYP/6-31G\*\* e B3LYP/6-31G\*\*. A identificação da natureza exata desta interação para um candidato a inibidor (possível fármaco) é a chave para controlar sua

especificidade e, portanto, reduzir os indesejáveis efeitos colaterais.

### 5.7.1 CONSTRUÇÃO DO MODELO DO SÍTIO ATIVO DA ACE

Como descrito em 5.7, as principais ferramentas computacionais utilizadas neste estudo são ambos os métodos de potencial híbrido (B3LYP) e potencial “puro” de troca-correlação (BLYP) da *TFD*. Estes podem ser utilizados para simulações em sistemas relativamente grandes com acurácia para cálculos de estruturas, propriedades e energias (LI *et al.*, 1999 & NOODLEMAN *et al.*, 2003). Estes se aplicam a complexos de metais de transição (LOVELL, *et al.*, 2003 & GOSH *et al.*, 2003), e a acurácia quantitativa típica destes métodos é suficientemente capaz de identificar e sistematizar aspectos energéticos importantes das metaloenzimas.

Frente à natureza das interações enzima-inibidor, é crucial que se determine propriedades inibitórias inerentes ao mecanismo de reação destas moléculas. Estes estudos teóricos apresentam certa dificuldade em sua realização, por conta, de somente um pequeno número de átomos representativos poderem ser utilizados nestes sistemas. Desta maneira, a construção de modelos dos sítios ativos enzimáticos é necessária: sistemas pequenos capazes de representar os sítios funcionais e estruturais destas enzimas. Estes modelos são importantes, pois tornam mais amenos os estudos estruturais e de mecanismo do que nas enzimas propriamente ditas. Desta forma, é possível examinar uma variedade de fatores que influenciam a química de coordenação nestes sistemas.

O sítio ativo, utilizado neste trabalho, inclui a primeira esfera de coordenação do metal que foi descrita detalhadamente no item 4.2 (Figura 28a) e pode ser observada novamente na figura 44 : os aminoácidos His 383, His 387, Glu 411, e um íon acetato

(Act 700 artefato do meio de cristalização) onde uma molécula de água é originalmente encontrada (NATESH *et al.*, 2003).

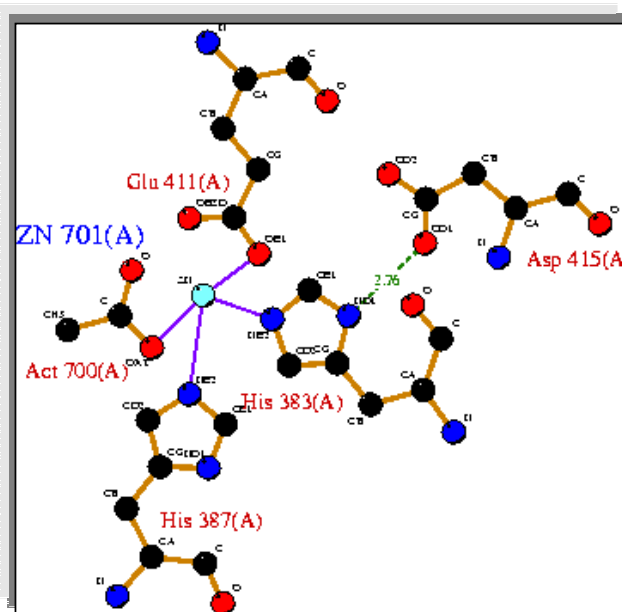
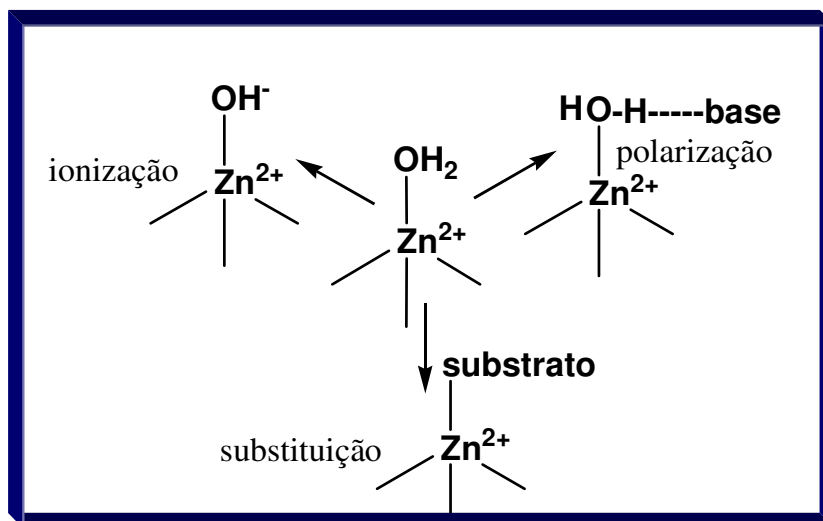


Figura 44- Esfera de coordenação metálica observada na estrutura cristalina da ACE humana, código *PDB* 1O8A.

Com o objetivo de minimizar o tempo e custos computacionais, a esfera de coordenação metálica observada na Figura 44 foi biomimetizada através do uso de imidazolas para representar as histidinas, ácido acético para representar o glutamato e a molécula de H<sub>2</sub>O foi mantida em sua posição original (admitindo estado de protonação neutro).

A ligação zinco-água é um componente crítico para este sítio catalítico em metaloenzimas dependentes de Zn<sup>2+</sup>, porque este pode ser ou ionizado pelo hidróxido ligado ao zinco (como no caso da CA), ou polarizado por uma base usual (como na

ACE) para gerar um nucleófilo para catalise ou, por último, substituir o substrato (como no caso das fosfatases alcalinas) (Esquema 6) (McCALL *et. al.*, 2000). O  $Zn^{2+}$  ativa a água através de ionização, polarização, ou simplesmente deslocamento. Este mecanismo é determinado pela influência direta dos ligantes do  $Zn^{2+}$  (VALLEE & AULD, 1993). Sendo assim, o mecanismo utilizado por muitos fármacos na inibição da ACE é freqüentemente descrito em função da substituição ou deslocamento desta molécula de  $H_2O$  (NATESH, 2004).



Esquema 6

Para verificar a validade da biomimetização utilizada neste estudo, o sítio ativo modelo foi submetido à otimização por *TFD* e os resultados foram comparados com os dados de cristalografia nas tabelas 18 e 19.

Tabela 18– Geometria teórica da esfera de coordenação (biomimetizada) do Zn<sup>2+</sup> na ACE (TFD método B3LYP/6-31G\*\*).

X	Distância até o		Ângulos (°)	
	Zn (Å)	X-Zn-383	X-Zn-387	X-Zn-411
H <sub>2</sub> O	2,03	116	122	96
N His 383 (imidazol)	1,98		103	103*
N His 387(imidazol)	1,95			107
O Glut 411(ácido acético)	1,89*			

Tabela 19 – Dados cristalográficos da esfera de coordenação do Zn<sup>2+</sup> na ACE (NATESH *et al.*, 2003).

X	Distância até o		Ângulos (°)	
	Zn (Å)	X-Zn-383	X-Zn-387	X-Zn-411
H <sub>2</sub> O	2,09	118	127	99
N His 383	2,01		106	108
N His 387	2,05			105
O Glut 411	1,97			

\*Valor da maior diferença média encontrada: a) comprimento de ligação- 4%

b) ângulo de ligação 4%

Os dados apresentados nas tabelas 18 e 19 são similares, o que demonstra que o modelo biomimetizado adotado foi uma boa escolha. Desta forma, os derivados **1a-44** foram substituídos na posição da molécula H<sub>2</sub>O (ligados ao Zn<sup>2+</sup> pelo átomo de *N imínico* da hidrazona), de acordo com dados da literatura e submetidos à otimização geométrica utilizando o método B3LYP/6-31G\*\*, o que será descrito no item **5.7.2** de maneira detalhada.

## 5.7.2 GEOMETRIA DE EQUILÍBRIO PARA O COMPLEXO FORMADO ENTRE O MODELO DO SÍTIO ATIVO DA ACE-NAH's

Os resultados teóricos mostram que o átomo de *N(iminico)* da hidrazona substitui a molécula de água, encontrada na estrutura nativa, com uma diferença de 0,13Å de diferença na posição (Tabela 20) constituindo o quarto ligante, e o átomo de *O* da carbonila aparece como o quinto ligante (Figura 45) num ambiente de coordenação que indica que a geometria tetraédrica não mais é refletida mais sim um ambiente bipiramidal trigonal. Neste caso, a desprotonação da enzima-Zn-H<sub>2</sub>O (para formar enzima-Zn-OH-), o que fornecer um nucleófilo forte dentro do sítio ativo enzimático, esta comprometido e conseqüentemente ocorrerá à perda de atividade enzimática.

Tabela 20– Geometria teórica do íon Zn<sup>2+</sup> dos complexos NAH's- ACE (*TFD* método B3LYP/6-31G\*\*)\*.

X	Distância até		Ângulos (°)		
	o zinco (Å)	X-Zn-N(Inh.)	X-Zn-383	X-Zn-387	X-Zn-411
O (Inh.)	2,03	80	92	132	84
N(Inh.)	1,96		118	126	99
N His 383	1,98			103	113
N His 387	1,95				117
O Glut 411	1,89				

\* Os resultados apresentados são para o derivado estruturalmente mais simples: derivado 1a.

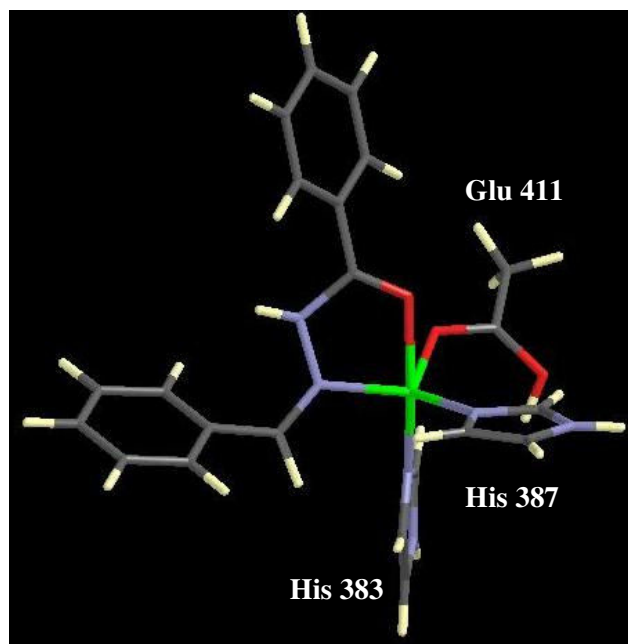


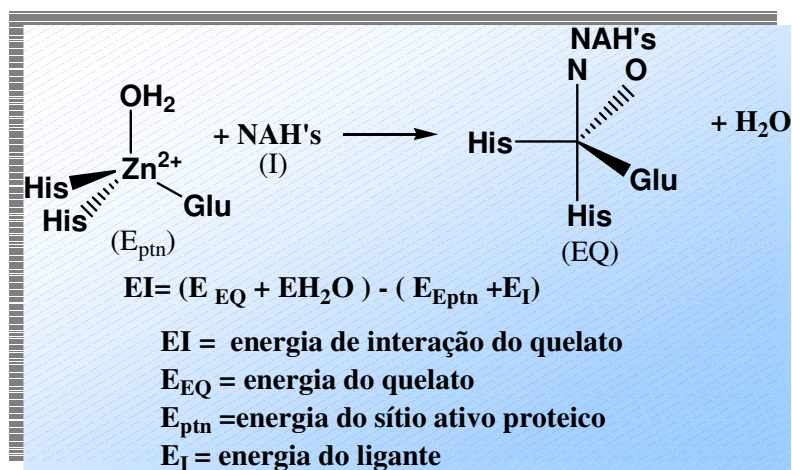
Figura 45- Estrutura teórica proposta (otimizada por *TFD* método B3LYP/6-31G\*\*) para o complexo formado sítio ativo metálico (biomimetizado) da ACE e os derivados NAH's.

Os resultados teóricos permitiram evidenciar um novo ambiente de coordenação, no qual os derivados **1a-44** atuam como ligantes bidentados apresentando as distâncias Zn-O (carbonila) e Zn-N (hidrazona) de 2.3 e 1.9 Å (Tabela 20), respectivamente. A proximidade espacial destes átomos demonstra a existência da quelação do átomo de zinco. Observação que está de acordo com dados experimentais previamente relatados para o mecanismo de inibição da termolisina (metaloenzima Zn- dependentes análoga a ACE) por hidroxamatos (HOLMES & MATTHEWS, 1981), carboxilas (MONZINGO & MATTHEWS, 1984) ou  $\alpha$ -mercaptoacildipeptídeos (GAUCHER *et al.*, 1999).

### 5.7.3 CÁLCULO DAS ENERGIAS DE INTERAÇÃO DOS COMPLEXOS

#### NAH's -ACE (MODELO DO SÍTIO ATIVO)

Uma vez verificado que as NAH's podem atuar como inibidores da ACE através da formação de quelatos, as energias de interação para esta complexação (Esquema 7) foram calculadas e são apresentadas na Tabela 21. O objetivo desta simulação computacional foi identificar as contribuições das características estruturais e eletrônicas observadas nos resultados anteriores na formação destes quelatos.



Esquema 7.



Tabela 21- Energias de Interação dos complexos NAH'S-ACE (derivados selecionados)

(TFD método B3LYP/6-31G\*\*)..

COMPOSTO	W	ENERGIA DE INTERAÇÃO (au)
<b>1a</b>	H	-0,33
<b>1b</b>	Cl	-0,25
<b>1c</b>	Br	-0,22
<b>1d</b>	F	-0,21
<b>1e</b>	OMe	-0,43
<b>1f</b>	NMe <sub>2</sub>	-0,46
<b>1g</b>	OH	-0,49
<b>1h</b>	Me	-0,48
<b>2a</b>	H	-0,75
<b>2b</b>	Cl	-0,60
<b>2c</b>	Br	-0,58
<b>2d</b>	F	-0,61
<b>2e</b>	OMe	-0,81
<b>2f</b>	NMe <sub>2</sub>	-1,1
<b>2g</b>	OH	-0,84
<b>2h</b>	Me	-0,83
<b>3a</b>	H	-0,95
<b>3b</b>	H	-0,94
<b>4a</b>	H	-0,92
<b>4b</b>	H	-0,90

Ambos resultados teóricos, geométricos e de energia, demonstram um novo ambiente de coordenação da ACE-NAH's com a quelação do átomo de Zn<sup>2+</sup>. Os valores das energias de interação calculadas apresentadas na Tabela 21 confirmam a formação do complexo. E, demonstram que as propriedades eletrônicas dos derivados **1a-44** (a natureza eletrônica dos substituintes em **W**) influenciam diretamente a estabilidade final

dos complexos ACE-NAH's formados. Este fato pode ser observado visto que o aumento da dureza dos ligantes NAH's é diretamente proporcional ao aumento nos valores das energias de interação dos complexos formados com a ACE.

## 5.8. ESTUDOS UTILIZANDO A TFD PARA OS DERIVADOS 1a-44 CANDIDATOS A INIBIDORES DA CA

Como já descrito em 1.5.3, a CA foi à primeira enzima Zn-depedente descoberta, uma hidrolase responsável pela catalise da hidratação do produto final do metabolismo aeróbico, o CO<sub>2</sub>, permitindo sua rápida remoção como sub-produto da respiração e ainda facilitando seu transporte no sangue na forma de bicarbonato (LINDSKOG, 1997).

O Zn<sup>2+</sup> do sítio ativo da CA está coordenado por três anéis imidazolas provenientes das histidinas, e uma molécula de água em um ambiente de coordenação tetraédrico, conforme pode ser melhor observado no item 4.2 (figura 28b). É apresentado no esquema 6 que o zinco pode ativar a molécula de água através de ionização, polarização ou simplesmente substituição pela molécula do substrato. No caso da CA, Zn<sup>2+</sup> (ácido duro) é capaz de baixar o pKa da água coordenada e promover sua ionização como um ácido fraco  $Zn-OH_2 \xrightarrow{Zn^{2+}} Zn-OH^+ + H^+$ . Este mecanismo será determinado pela influência direta dos ligantes coordenados a este íon (LIPTON *et. al.*, 2004).

Efetuamos, então o estudo da interação do Zn<sup>2+</sup> do sítio ativo enzimático com os derivados 1a-44, objetivando investigar a contribuição das propriedades estruturais e eletrônicas, observadas anteriormente na química de coordenação envolvendo a formação destes complexos. Este estudo foi realizado utilizando a TFD através dos

métodos BLYP/6-31G\*\* e B3LYP/6-31G\*\*.

### 5.8.1 CONSTRUÇÃO DO MODELO DO SÍTIO ATIVO DA CA

O sítio ativo, utilizado neste estudo, inclui a primeira esfera de coordenação do metal (figura 28b) e pode ser observada novamente na figura 46 : os aminoácidos His 96, His 94, His 119, e uma molécula de água (ERIKSSON *et al.*, 1988).

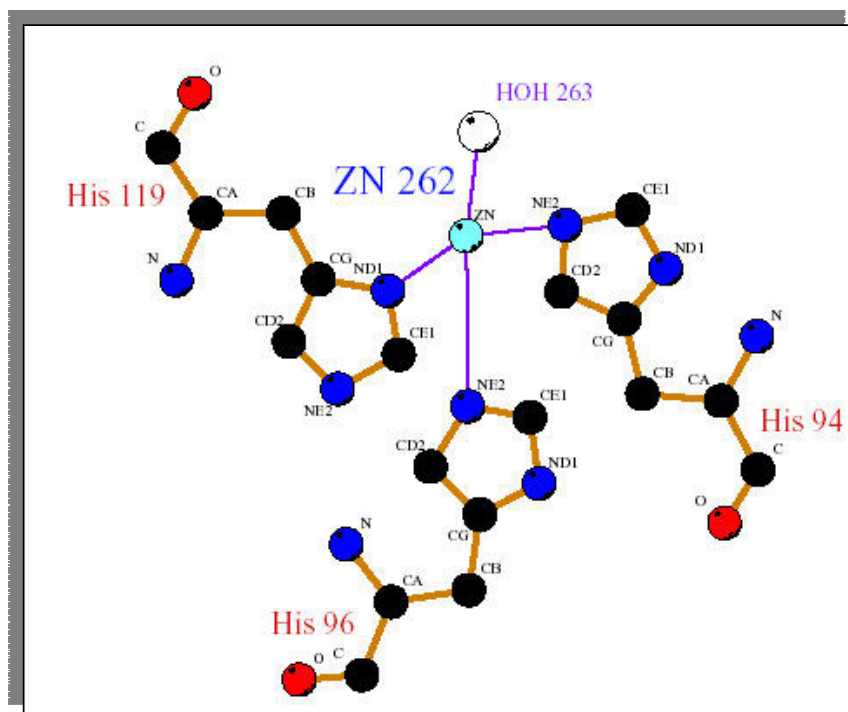


Figura 46- Esfera de coordenação metálica observada na estrutura cristalina da CA humana, código *PDB* 1CA2.

Ainda nesta etapa, com o objetivo de minimizar o tempo e custos computacionais, a esfera de coordenação metálica observada na figura 46 foi biomimetizada através do uso de anéis imidazolas para representar as histidinas.

Novamente, verificamos a validade da biomimetização utilizada, submetendo o sítio ativo modelo à otimização por *TFD* e comparando os resultados com os dados de cristalografia de raios-x conforme as tabelas 22 e 23.

Tabela 22– Geometria teórica da esfera de coordenação do  $Zn^{2+}$  (biomimetizada) na CA (*TFD* método B3LYP/6-31G\*\*).

X	Distância Zn- ligante (Å)	Ângulos (°)		
		X-Zn-94	X-Zn-96	X-Zn-119
H <sub>2</sub> O	2,03	102*	112	109
N His 94 (imidazol)	1,98		103	110
N His 96(imidazol)	1,99*			103
N His 119 (imidazol)	1,89			

Tabela 23 – Dados cristalográficos da esfera de coordenação do  $Zn^{2+}$  na CA (ERIKSSON *et al.*, 1988).

X	Distância Zn- ligante (Å)	Ângulos (°)		
		X-Zn-94	X-Zn-96	X-Zn-119
H <sub>2</sub> O	2,08	107	113	112
N His 94	1,99		107	113
N His 96	2,10			101
N His 119	1,91			

\*Valor da maior diferença média encontrada: a) comprimento de ligação- 5%

b) ângulo de ligação 4%

A análise dos dados apresentados nas tabelas 21 e 22 demonstra, que o modelo biomimetizado adotado foi uma boa escolha. Desta forma, os derivados **1a-44** foram substituídos na posição da molécula H<sub>2</sub>O (ligados ao Zn<sup>2+</sup> pelo átomo de *N imínico* da hidrazona), de acordo com dados da literatura e submetidos à otimização geométrica utilizando o método B3LYP/6-31G\*\*, o que será descrito no item **5.8.2** de maneira detalhada.

### **5.8.2 GEOMETRIA DE EQUILÍBRIO PARA OS COMPLEXOS FORMADOS ENTRE O MODELO DO SÍTIO ATIVO DA CA-NAH's**

Os resultados teóricos demonstram um ambiente de coordenação similar ao encontrado para a ACE, onde o átomo de *N* da hidrazona aparece substituindo a molécula de água encontrada na estrutura nativa com uma diferença de 0,3Å de diferença na posição (Tabela 24) constituindo o quarto ligante e o átomo de *O* da carbonila aparece como o quinto ligante (Figura 45) num ambiente de coordenação que bipiramidal trigonal. Neste caso, a desprotonação da enzima-Zn-H<sub>2</sub>O também esta comprometida e conseqüentemente ocorrera à perda de atividade enzimática. A substituição da molécula de H<sub>2</sub>O que está diretamente envolvida no mecanismo enzimático compromete a atividade da CA. Observação que sugere o fato dos derivados NAH's poderem atuar também como possíveis inibidores da CA. A especificidade por uma ou outra enzima será ditada pelo reconhecimento molecular destes ligantes. Pois não só há capacidade em ligar-se ao sítio ativo está em evidência em se tratando atividade enzimática.

Tabela 24 – Geometria teórica do íon  $Zn^{2+}$  dos complexos NAH's- CA (*TFD* método B3LYP/6-31G\*\*).

X	Distância até o zinco (Å)	Ângulos (°)			
		X-Zn-N(Inh.)	X-Zn-94	X-Zn-96	X-Zn-119
O (Inh.)	2,15	79	88	162	89
N(Inh.)	2,11		116	124	113
N His 94	2,03			108	99
N His 96	2,11				113
N His 119	2,05				

A geometria de coordenação calculada mostra uma distorção no ambiente tetraédrico, com o átomo de *O* da carbonila das NAH's estando a uma distância de 2,15 Å do átomo de Zn, conforme Figura 47. Observamos que o átomo de N das NAH's é capaz de ocupar o lugar da  $H_2O$  na estrutura nativa da CA.

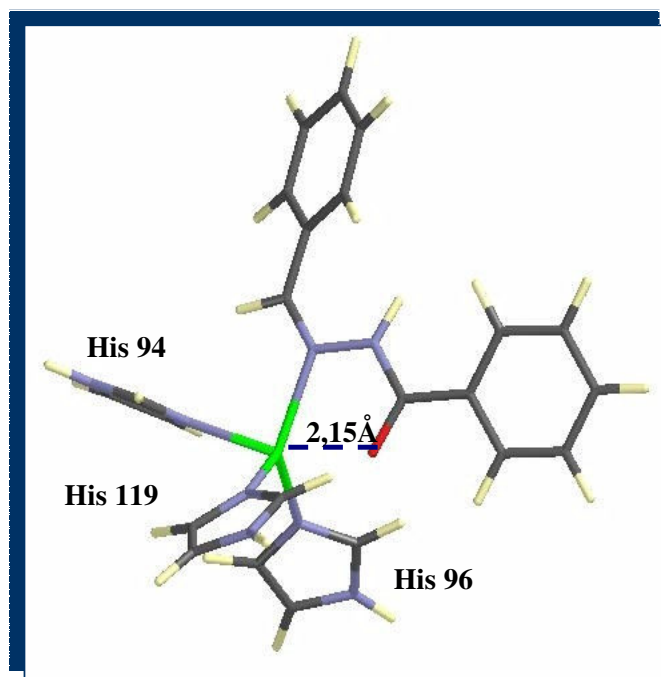


Figura 47- Estrutura teórica proposta (otimizada por *TFD* método B3LYP/6-31G\*\*) para o complexo formado sítio ativo metálico (biomimetizado) da CA e os derivados NAH's.

### 5.8.3 INCLUSÃO DE INIBIDORES DA LITERATURA NO MODELO DE INIBIÇÃO NAH's -CA

Resultados prévios (item 5.3) demonstraram que a dureza é uma propriedade que pode governar a especificidade e seletividade das NAH's por zinco. A fim de investigar se esta seria uma propriedade capaz de interferir também na atividade dos derivados propostos como candidatos a inibidores da CA, incluímos nesta investigação duas classes de inibidores da CA cujo perfil de atividade está relatado na literatura: as sulfonamidas (VIDGREN *et al.*, 1990; CECCHI *et al.*, 2004, PASTOREKOVA *et al.*, 2004) e os coxibs (WEBER *et al.*, 2004), ilustrados na Figura 48.

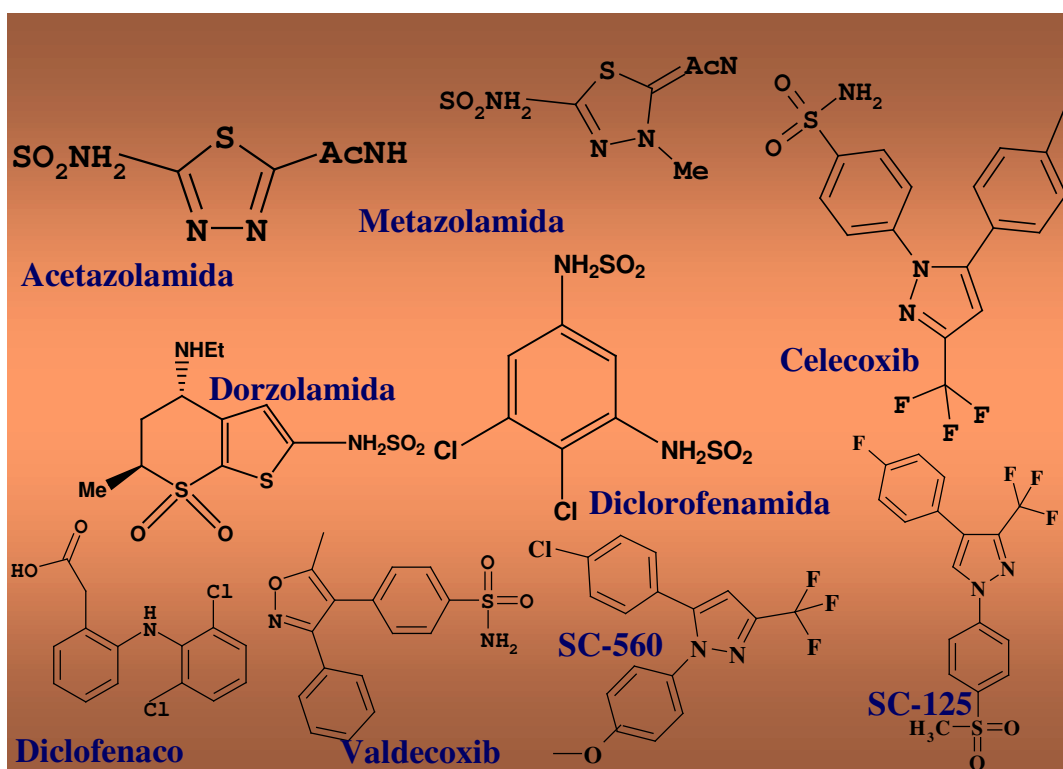


Figura 48 - Estrutura das sulfonamidas : dorzolamida (DZA), acetazolamida (AZA), metazolamida (MZA e diclorofenamida (DCP) e dos coxibs: valdecoxib (1), celecoxib (2), SC-125(3), SC550 (4) e diclofenaco (5).

A inclusão de compostos da literatura nesta investigação se deve ao fato da avaliação farmacológica dos derivados **1a-44** ainda não ter sido realizada. E, enquanto estudo teórico, visando planejamento racional, este trabalho objetiva oferecer subsídios para que estas avaliações possam ser realizadas com o mínimo de custos possível, ou seja, fornecendo o maior número de características que corroborem para o perfil de atividade proposto.

As sulfonamidas são utilizadas extensivamente para o tratamento de glaucoma, edema macular, diversas desordens neuro-musculares, e ainda são investigadas como potenciais fármacos anti-tumorais (PASTOREKOVA *et al.*, 2004).

Os coxibs são fármacos antiinflamatórios não estereoidais (AINES) usualmente conhecidos por inibirem seletivamente a ciclooxigenase-2 (COX-2). Weber e colaboradores (WEBER *et al.*, 2004) observaram que as arilsulfonamidas, presentes nesta classe de fármacos, é um grupo comum em muitos inibidores da CA e realizaram um estudo administrando coxibs no tratamento de glaucoma em coelhos. Seus estudos demonstraram serem os coxibs capazes de inibir a CAII através da mobilização do zinco do sítio ativo através da ligação com o resíduo sulfonamida presente em suas estruturas.

Os valores de dureza absoluta para os inibidores da literatura foram calculados segundo a metodologia descrita em **5.2** e são apresentadas na Tabela 25. Quando comparadas com estes valores calculados para os derivados **1a-44** (Tabela 13), podemos notar que estes expressam a mesma ordem de grandeza. Fato que corrobora a proposição destes derivados NAH's como candidatos a inibidores da CA.



Tabela 25- Dureza absoluta obtida por *TFD* frente dados de inibição<sup>a</sup> da CA para sulfonamidas e coxibs (WEBER *et al.*, 2004).

<b>Inibidor</b>	<b><math>\eta</math></b>	<b>IC50(nM)<sup>a</sup>CAII</b>
AZA	5,78	12
MZA	5,65	14
DZA	5,96	9
DCP	4,01	38
1	3,78	43
2	4,96	21
3	2,27	> 100 $\mu$ M
4	2,65	> 100 $\mu$ M
5	2,96	> 100 $\mu$ M

<sup>a</sup> os inibidores foram incubados com as enzimas 15 minutos antes do ensaio.

<sup>b</sup> erros na faixa de 5-10% do valor informado, par três determinações.

O gráfico 3 mostra que existe uma correlação entre a dureza absoluta das duas classes de inibidores da CA, as sulfonamidas e os coxibs (Figura 48), e IC<sub>50</sub> destes compostos.

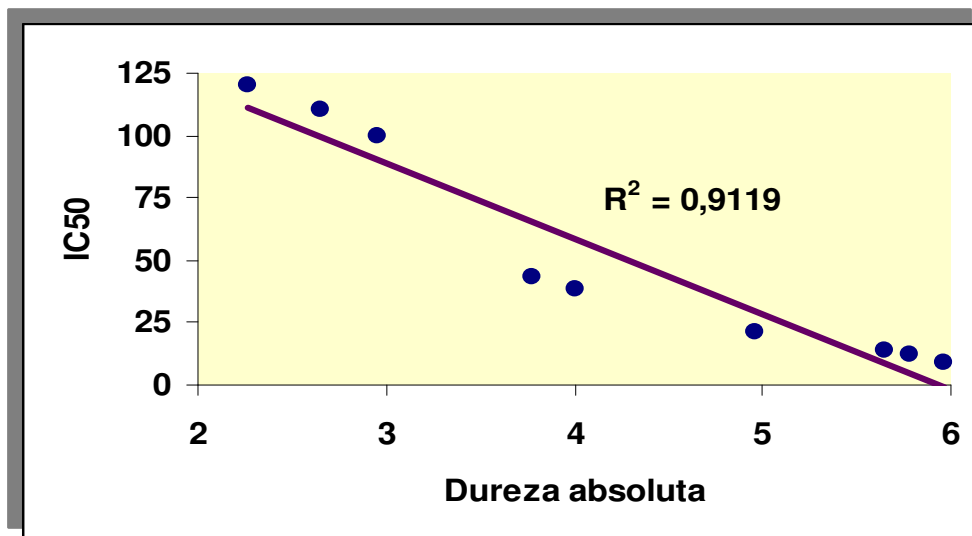
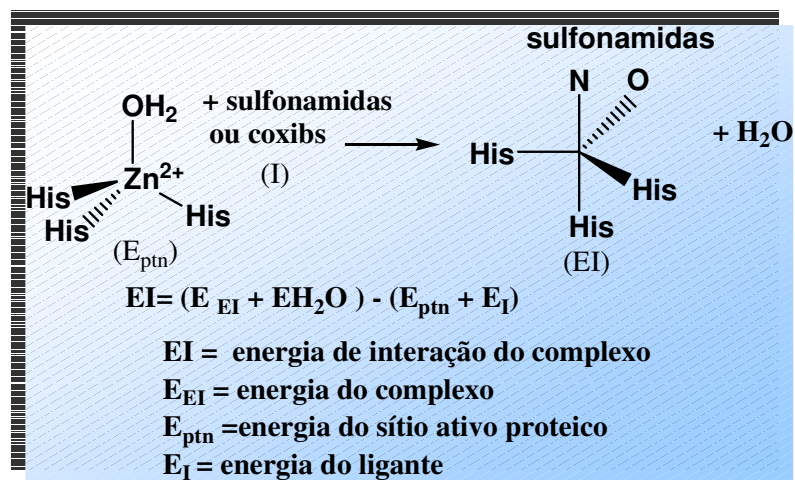


Gráfico 3- Correlação existente entre a dureza absoluta e IC50 para os coxibs e as sulfonamidas.

Estes inibidores têm seu mecanismo de ação associado com a ligação das sulfonamidas presentes em suas estruturas com o metal do sítio ativo. Estudos de RMN demonstraram que sulfonamidas ligam-se via *N* desprotonado ao  $Zn^{2+}$ . Apesar de não existir a evidência experimental, vários autores apontam para a possibilidade de sulfonamidas atuarem como ligantes bidentados (por meio *N* e de um átomo de *O*) frente ao zinco do sítio ativo (FERRER *et al.*, 1992). Com o objetivo de verificar a possível formação de quelatos para os complexos sulfonamidas, coxibs- CA as energias de interação para os representantes destas classes avaliados neste estudo foram calculadas segundo o esquema 8 e são apresentadas na Tabela 26 .



Esquema 8.

Tabela 26 – Energias de interação obtidas por *TFD* para os complexos sulfonamidas-CA e coxibs-CA.

Inibidor	Energia de interação (au)
AZA	-18,6
MZA	-17,5
DZA	-19,3
DCP	-12,3
1	-11,1
2	-15,8
3	-6,5
4	-6,3
5	-5,2

O gráfico 4 demonstra que existe uma correlação entre a energia de interação calculada para as duas classes de inibidores da CA, as sulfonamidas e os coxibs (Figura 48), e IC<sub>50</sub> destes compostos.

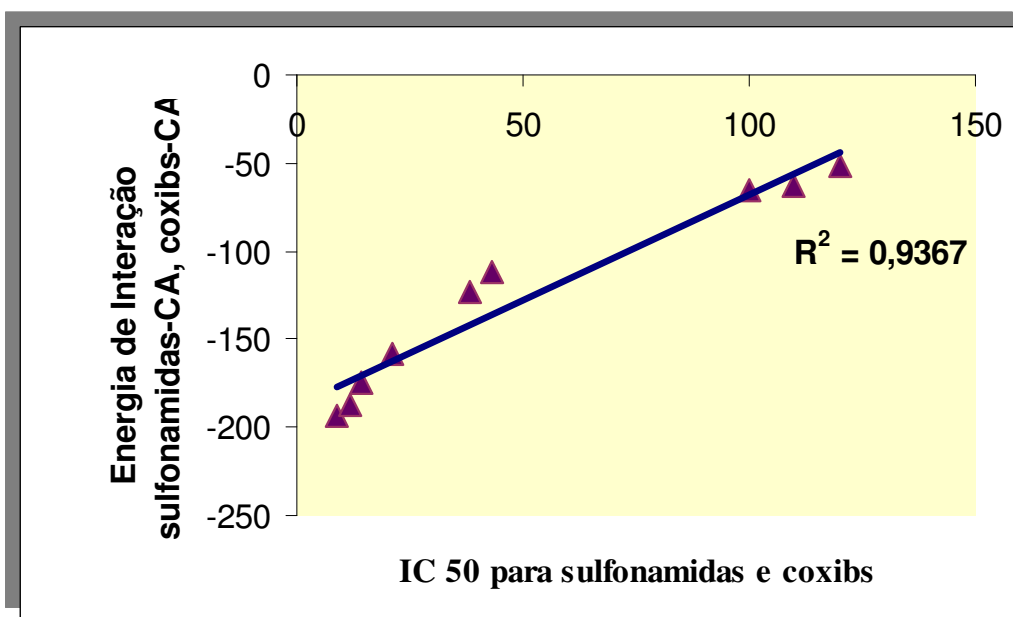
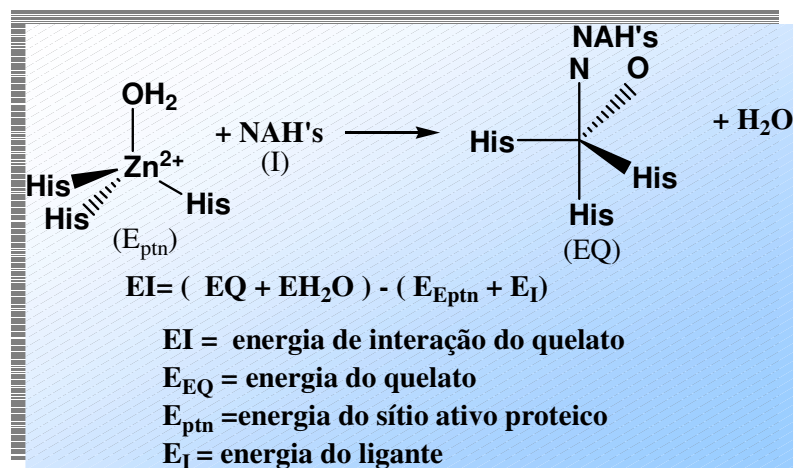


Gráfico 4- Correlação existente entre as energias de interação e IC<sub>50</sub> para os coxibs e as sulfonamidas.

#### 5.8.4 CÁLCULO DAS ENERGIAS DE INTERAÇÃO DOS COMPLEXOS NAH's-CA

As energias de interação para a complexação NAH's-CA foram calculadas segundo o esquema 9 e são apresentadas na Tabela 27. O objetivo desta simulação computacional foi identificar as contribuições das características estruturais e eletrônicas, observadas nos resultados anteriores, na formação destes possíveis quelatos.



Esquema 9.

Os valores das energias de interação calculadas apresentadas na Tabela 27 demonstram que as propriedades eletrônicas dos derivados **1a-44** (a natureza eletrônica dos substituintes em **W**) influenciam diretamente a estabilidade final dos complexos CA-NAH's formados.

Ambos resultados teóricos, geométricos e de energia, demonstram um novo ambiente de coordenação da CA-NAH's com a quelação do átomo de  $Zn^{2+}$ . As EI para os complexos NHA's-CA mostram um aumento, quando temos em **W** substituintes capazes de doar densidade eletrônica.

Tabela 27. Energias de Interação dos complexos NAH'S-CA.

COMPOSTO	W	ENERGIA DE INTERAÇÃO (au)
1a	H	-4,33
1b	Cl	-3,22
1c	Br	-3,21
1d	F	-3,21
1e	OMe	-6,00
1f	NMe <sub>2</sub>	-6,50
1g	OH	-6,85
1h	Me	-6,79
2a	H	-5,53
2b	Cl	-4,30
2c	Br	-4,32
2d	F	-4,33
2e	OMe	-6,65
2f	NMe <sub>2</sub>	-6,90
2g	OH	-6,70
2h	Me	-6,50
3a	H	-7,47
3b	H	-7,42
4a	H	-7,40
4b	H	-7,45

No gráfico 5 podemos observar que existe correlação entre EI e a dureza absoluta para os complexos NAH-CA. Este fato pode ser observado visto que o aumento da dureza dos ligantes NAH's é diretamente proporcional ao aumento nos valores das energias de interação dos complexos formados com a CA.

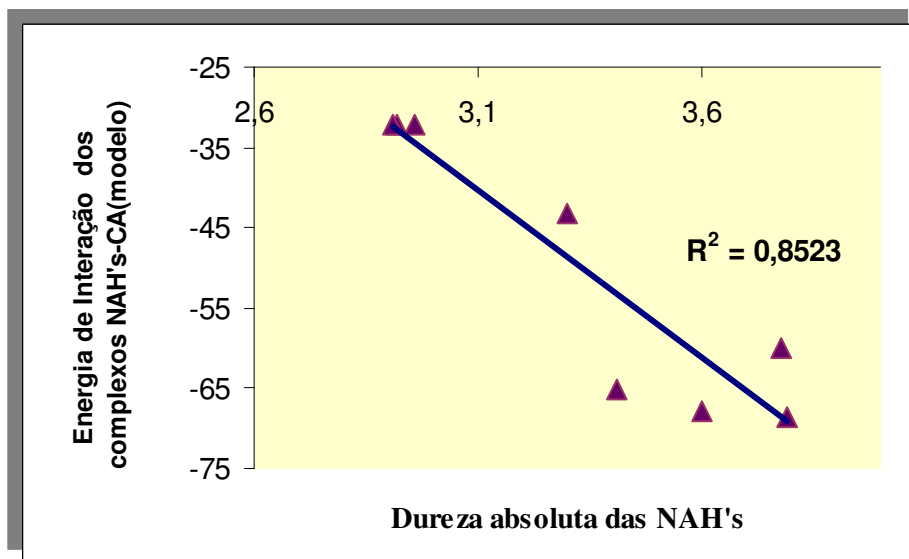


Gráfico 5- Correlação existente ente a dureza absoluta dos NAH's **1a-44** e valores de EI para os complexos NAH's- CA.

---

\* Os resultados apresentados são dos oito compostos mais simples que garantiram a representatividade das substituições em W..

C  
O  
N  
C  
L  
U  
S  
O  
E  
S  
E

P  
E  
R  
S  
P  
E  
C  
T  
I  
V  
A  
S



## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A conformação mais estável de **1a-44** obtida por AM1 demonstram que os possíveis sítios de coordenação com o íon metálico são o átomo de *O* da carbonila e o átomo de *N(imínico)* da hidrazona.

Os resultados obtidos por estudos de SPR para os derivados **1a-44** revelaram que as modificações estruturais nos substituintes em **W** podem determinar a especificidade das NAH's, aumentando seu caráter de base de Lewis. Os substituintes em **W** parecem influenciar diretamente no perfil de atividade desejado e nossos resultados sugerem seu envolvimento na natureza eletrônica dos sítios de coordenação dos ligantes, afetando, desta forma, a labilidade e estabilidade dos complexos metal-NHA's. Para os substituintes em **R** não se verificou nenhum tipo de contribuição. Além disto, foi possível concluir que o mecanismo de coordenação envolvendo metaloenzimas Zn-dependentes e NAH's pode ser compreendido em termos do princípio HSBA.

Podemos concluir que existe correlação significativa entre as energias de interação calculadas para os complexos NAH-CA, NAH-ACE e a dureza destes ligantes. Adicionalmente os substituintes em **W**, capazes de doar densidade eletrônica, contribuem para o aumento da EI dos complexos.

As energias de interação obtidas, com o estudo das interações entre os compostos **1a-44** e o sítio metálico da ACE e CA, não puderam ser correlacionadas diretamente com o perfil de atividade desejado. Entretanto, inibidores da CA (**55** e **56**) cujo perfil de atividade está descrito na literatura, foram incluídos nas simulações e a correlação entre IC<sub>50</sub> e dureza destes compostos é observada. Para estes inibidores foram obtidas as energias de interação, através da *TFD*, para a complexação com CA. Foi constatada a existência da correlação entre energia de interação e IC<sub>50</sub> destes

compostos. Fato que permite extrapolar a existência da correlação entre energia de interação e atividade para os derivados NAH's estudados.

As simulações computacionais realizadas revelam fatores geométricos e eletrônicos capazes de modular esta interação, demonstrando que as NHA's são capazes de coordenar seletiva e especificamente o  $Zn^{2+}$  tetraédrico do sítio enzimático modificando a esfera de coordenação deste íon através da formação de anel quelato de cinco membros. A quelação do  $Zn^{2+}$  do sítio ativo enzimático parece ocorrer através de um mecanismo de substituição da molécula de água coordenada a este metal de forma a permitir o acesso do candidato a inibidor. Visto que o mecanismo de quelação bloqueia o íon metálico essencial a atividade catalítica desempenhada por ACE e CA, desta forma estas perdem sua atividade. Fato que sugere que NAH's podem ser potenciais candidatos a inibidores por conta de sua habilidade em coordenar Zn através ligações covalentes e iônicas. Estes resultados podem auxiliar no planejamento racional de novas moléculas que atuem como inibidores de CA.

Os modelos biomiméticos utilizados nos estudos *TFD* foram avaliados em termos de qualidade estatística, preditividade, rapidez e reprodutibilidade utilizando inibidores da literatura. Estes modelos exibiram boa capacidade preditiva com tempo computacional relativamente pequeno e foram capazes de gerar informações úteis no planejamento racional de novos e seletivos ligantes NAH's. Apesar das simulações quânticas não incluírem efeitos de solvatação e o ambiente protéico como um todo, elas revelaram aspectos significativos das estruturas eletrônicas para os complexos metaloenzimas-NAH's.

A combinação de métodos semiempíricos com a *TFD* demonstrou ser uma metodologia versátil no estudo de mecanismo de coordenação proposto neste trabalho e

a dureza absoluta funcionou como um bom descritor dos sítios de coordenação para os ligantes **1a-44** e seus complexos com as NAH's.

Em função destes resultados tem-se como perspectiva a avaliação farmacológica em ensaios *in vitro* de alguns dos derivados que exibiram os maiores valores de dureza absoluta de modo a verificarmos seu potencial como inibidores de metaloenzimas Zn-dependentes, como sugerido neste trabalho.

Como mencionado anteriormente em **5.8.3**, os coxibs recentemente descritos na literatura como inibidores da CA são também conhecidos inibidores seletivos da COX-2 (ou seja, AINES). Tal comportamento está relacionado com a presença do grupamento sulfonamida na estrutura destes compostos (WEBER *et al.*, 2004). Desta forma, surge ainda como perspectiva deste estudo à utilização da técnica de hibridação molecular (Figura 49) como ferramenta para proposição de novos compostos capazes de atuarem simultaneamente em dois alvos moleculares: a COX e a CA, apresentando uma só cinética. Tais compostos são considerados protótipos de “*LYFE STYLE DRUGS*” (GILBERT *et.al.*, 2004) e estão diretamente relacionados com a qualidade de vida que se pretende proporcionar a indivíduos longevos.

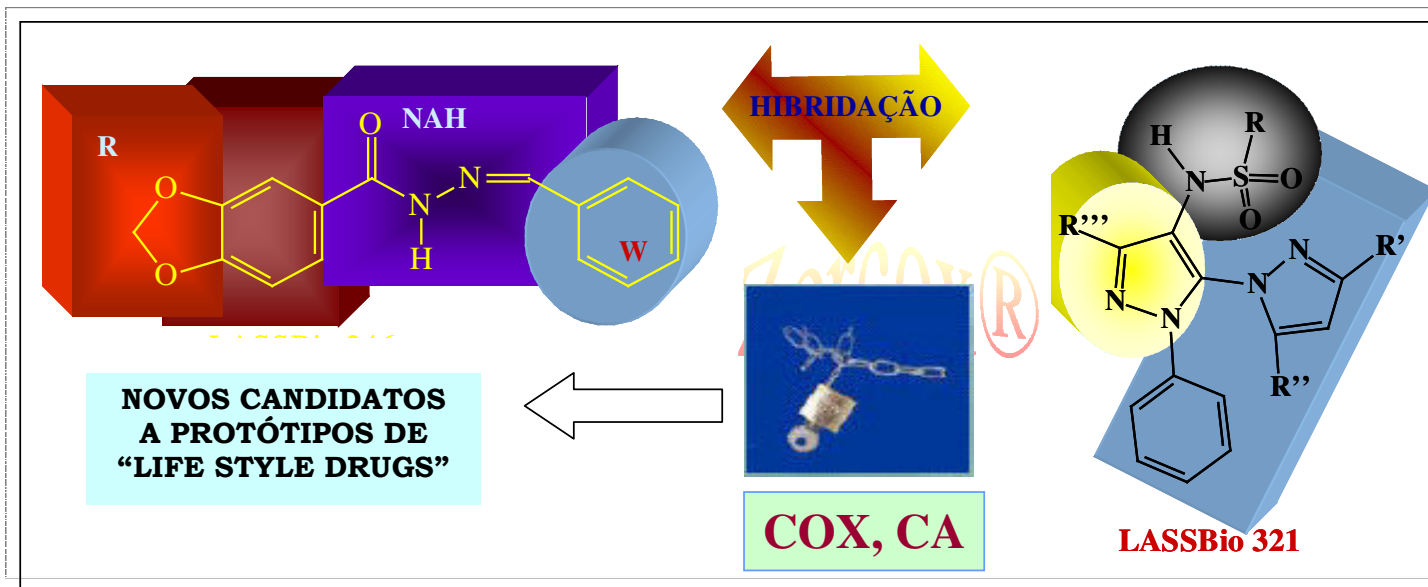


Figura 49 – Utilização da técnica de hibridação molecular para a proposição de novos candidatos a protótipos de “Lyfe Style Drugs”.

*G  
L  
O  
S  
S  
Á  
R  
I  
O*

## 7.GLOSSÁRIO\*

**Análise Conformacional:** consiste na exploração dos arranjos espaciais (formas) energeticamente favoráveis de uma molécula (conformações). Na análise utiliza-se mecânica molecular, dinâmica molecular, cálculos químico-quânticos ou análise de dados estruturais determinados experimentalmente por RMN ou cristalografia de raios-X, por exemplo.

**Cálculos *ab initio*:** são cálculos mecânico-quânticos que usam equações exatas, sem aproximações, que envolvem a população eletrônica total da molécula.

**Cálculos AM1:** são cálculos semi-empíricos de orbital molecular desenvolvidos na Universidade de Austin no Texas (AM1= *Austin Model 1*). Estes cálculos envolvem os elétrons de valência dos átomos da molécula. Eles são um desenvolvimento dos cálculos MNDO.

**Cálculos de Hückel Estendido:** são cálculos de orbital molecular (MO) semi-empíricos de nível baixo de aproximações.

**Cálculos de Orbital Molecular (MO, do inglês *Molecular Orbital*):** são cálculos mecânicos-quânticos baseados na equação de Schrödinger, que podem ser subdivididos em métodos semi-empíricos e *ab initio*.

**Cálculos mecânicos-quânticos:** são cálculos de propriedades moleculares baseados na equação de Schrödinger que levam em conta as interações entre os elétrons em uma mesma molécula.

**Cálculos MNDO:** são cálculos semi-empíricos de orbital molecular (MO), que usam como aproximação uma negligência modificada de recobrimento diatômico (diferencial).

**Cálculos PM3:** (do inglês *Parametric Method 3*) é um programa de cálculo semi-empírico de orbital molecular largamente usado.

**Combinação Linear de Orbitais Atômicos:** (LCAO, do inglês *Linear Combination of Atomic Orbitals*) é um método matemático usado em cálculos mecânico-quânticos. Este método expressa a aproximação da função do orbital molecular como sendo uma combinação linear de orbitais atômicos escolhidos como função de base.

**Energia do Orbital Molecular Desocupado de Menor Energia:** (LUMO, do inglês *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) é obtida por cálculos de orbital molecular e representa a afinidade eletrônica de uma molécula ou a sua reatividade como eletrófilo.

**Energia do Orbital Molecular Ocupado de Maior Energia:** (HOMO, do inglês *Highest Occupied Molecular Orbital*) é obtida por cálculos de orbital molecular e se relaciona com o potencial de ionização de uma molécula e com sua reatividade como nucleófilo.

**Mecânica Molecular:** é o cálculo das características geométricas e de energia de entidades moleculares baseado em funções de potencial empíricas, cuja forma é tomada da mecânica clássica. O método pressupõe que as funções de potencial possam ser

transferidas dentro de um conjunto de moléculas semelhantes. Uma suposição é feita sobre os comprimentos e ângulos “naturais” de ligação, cujos desvios resultam em tensão de ligação e tensão angular, respectivamente. As forças de Van der Waals e eletrostáticas também são levadas em conta.

**Método de Hückel Estendido:** um método mecânico-quântico semi-empírico com todos os elétrons de valência que usa as mesmas aproximações, menos a aproximação p e a negligência das integrais de recobrimento, da teoria do orbital molecular de Hückel. O método reproduz relativamente bem às formas e a ordem dos níveis de energia dos orbitais moleculares. A consideração do recobrimento torna possível a desestabilização líquida causada pela interação de dois orbitais duplamente ocupados.

**Métodos mecânico-quânticos *ab initio*:** são baseados no uso da equação de Schrödinger completa para tratar todos os elétrons de um sistema químico.

**Métodos Semi-Empíricos:** são cálculos de orbital molecular que usam vários graus de aproximação e que usam apenas elétrons de valência.

**Minimização de Energia:** é um procedimento matemático para localizar as conformações estáveis (mínimos de energia) de uma molécula, determinadas por cálculos de mecânica molecular ou mecânico-quânticos.

**Minimização de Energia:** é um procedimento matemático para localizar as conformações mais estáveis (mínimos de energia) de uma molécula, determinadas por cálculos de mecânica molecular ou mecânico-quânticos .



**Modelagem Molecular:** é a investigação das estruturas e das propriedades moleculares usando a química computacional e as técnicas de visualização gráfica visando fornecer uma representação tridimensional, sob um conjunto de circunstâncias.

**Orbital de fronteira:** os orbitais moleculares que envolvem o HOMO e LUMO de uma dada entidade. No caso de uma entidade molecular com número ímpar de elétrons, quando o seu HOMO é ocupado por um único elétron, tal orbital molecular é denominado orbital molecular unicamente ocupado (SOMO, do inglês *Singly Occupied Molecular Orbital*). Dependendo das propriedades de seu parceiro reativo, o SOMO de uma dada espécie pode funcionar como HOMO ou LUMO. A importância especial dos orbitais de fronteira é devida ao fato de que uma grande variedade de reações químicas ocorre em uma posição e em uma direção onde a sobreposição do HOMO e do LUMO dos respectivos reagentes é máxima.

**Planejamento de Fármacos:** inclui não apenas o planejamento do ligante, mas também a farmacocinética e a toxicidade, que estão na maior parte das vezes além das possibilidades do planejamento auxiliado pela estrutura ou por computador. Todavia, ferramentas quimiométricas apropriadas, que incluem planejamento experimental e estatística multivariada, podem ser valiosas no planejamento e avaliação de experimentos e resultados farmacocinéticos e toxicológicos.

**Planejamento de Ligantes:** usa informações estruturais sobre o alvo ao qual os ligantes devem se ligar, frequentemente tentando maximizar a energia de interação.

**Protein Data Bank (PDB):** é um banco de dados de proteínas mantido no Laboratório

Nacional Brookhaven, Upton, New York, que contém estruturas de raios-X de dezenas de milhares de proteínas.

**Química Computacional:** é uma disciplina que usa métodos matemáticos para o cálculo de propriedades moleculares e para a simulação do comportamento molecular. Também inclui, por exemplo, o planejamento de sínteses, a pesquisa de bancos de dados e a manipulação de bibliotecas combinatoriais.

**Receptor:** é uma proteína ou um complexo de proteínas localizado no interior ou na superfície de uma célula, que reconhece especificamente e interage com um composto que atua como um mensageiro molecular (neurotransmissor, hormônio, fármaco, etc). Em um sentido mais amplo, o termo receptor é frequentemente usado como sinônimo para qualquer sítio específico de ligação de fármacos (em oposição a não específico, como a ligação às proteínas do plasma), também incluindo ácidos nucléicos, tais como o DNA.

**Teoria do orbital molecular:** um método da mecânica quântica molecular que usa funções de um elétron (orbitais) como uma aproximação pra a função de onda total.

**Topologia molecular:** é a descrição do modo pelo qual os átomos estão ligados em uma molécula.

---

\* Definições obtidas de Sant' Anna 2002.

*R  
E  
F  
E  
R  
Ê  
N  
C  
I  
A  
S*

*B  
I  
B  
L  
I  
O  
G  
R  
Á  
F  
I  
C  
A  
S*

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREONI, W.,(1998).Density-Functional Theory and Molecular Dynamics: A New Perspective for Simulations of Biological Systems. *Persp. Drug Discov. Des.*,9, 161-167.
- BACCHI, A.; CARCELLI, M.; PELAGATTI, P.; PELIZI, C.; PELIZZI, G.; ZANI, F.,(1999). Antimicrobial and Mutagenic Activity of Some Carbono and Thiocarbonohydrazone Ligands and their Copper(II), Iron(II), and Zin(II) Complexes. *J. Inorg. Biochem.*, 75, 123-133.
- BAIRD, T.T. Jr.; WAHEED, A.; OKUYAMA, T.; SLY, W.S.; FIERKE, C.A.,(1997). Catalysis and inhibition of human carbonic anhydrase IV. *Biochemistry*, 36, 2669-2678.
- BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M.; MIRANDA, A.L.P.; RODRIGUES, C.R., (2002). A química medicinal de *N*-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos. *Quím. Nova*, 25, 129-148.
- BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M.; RODRIGUES, C.R.; MIRANDA, A.L.P., (2001). Estratégias em Química Medicinal para o planejamento de fármacos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37, 269-292
- BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M.; RODRIGUES, C.R.; MIRANDA, A.L.P., (1997). Molecular modeling: A tool for rational drug design in medicinal chemistry. *Brazilian . Quím. Nova*, 29, 300-310.
- BECKE, A.D., (1988). Correlation of inhomogeneous electron gas: A coordinate – space model *J. Chem. Phys.* 88(22) 1053-1062.
- BECKE, A.D.,(1986) Completely numerical calculations on diatomic molecules in the loca-density approximation. *J. Chem. Phys.*, 84, 8524.

- BENITE, A.M.C. (2001). Modelagem Molecular de Sideróforos com sítio de coordenação  $\alpha$ -hidroxicarboxilatos utilizando a Teoria do Funcional de Densidade. Tese – Mestrado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, 145p.
- BIJUSE, M.; BAERENDS, E. J. SNIJDERS, J. G. ,(1989). *Phys. Rev.* A40:4090.
- BOURAOUI, A.; FATHALLAH, M.; BLAIVE, B. & GALLO (1990), R. Design and Molecular Mechanics Calculations of New Iron Chelates. *J.Chem.Soc. Perkin Trans.,2*, 1211-1214.
- BOYD, D.B. & LIPKOWITZ, K.B. (1982). Molecular Mechanics: the Method and Its Underlying Philosophy. *J. Chem. Educ.*, 59:269-274.
- BRETON, S., (2001). The Cellular Physiology of Carbonic Anhydrases. *JOP. J. Pancreas*, 2, 159-164.
- BRODERICK, J.B.; COUCOUVANIS, D.,(2003). Bionorganic chemistry. *Curr. Opinion in Chemical Biology*, 7, 157-159.
- BROUGHTON, H. B., (1997), Molecular Modeling. *Curr. Opi. Chem. Biol.* 1: 392–398.
- BRUGE, F.; BERNASCONI, M.; PARRINELLO, M., (1999).Density-Functional Study of Hydration of Ammonium in Water Clusters. *J. Chem. Phys.*, 110, 4734-4736.
- BRUNO G, CUSUMANO M, GIANNETTO A, ZAPPALA M, NICOLOO F, ROMEO R.,(1997). Synthesis and characterization in solid and solution of trans-dichloro-1-(2', 6'-difluorophenyl)-1H, 3H-thiazolo [3,4-a]-benzimidazole(tri-n-propylphosphine)-palladium(II)": a palladium(II) complex of a ligand with anti-HIV properties. *J. Inorg. Biochem.*,65, 97-102.
- BURNIER, M.; BRUNNER, H. R., (2000). Angiotensin II receptor antagonists. *Lancet*,

355,637-645.

BUTLER, A., (1998). Acquisition and utilization of transition metal ions by marine organisms. *Science*, 281, 207-209.

CAMERON, B.R.; BAIRD, I., (2001). Metals in Medicine: a review of the symposium. *J. Inorg. Biochem.*, 83, 233-236.

CARCELLI, M.; MAZZA, P.; PELIZZI, C.; PELIZZI, G.; ZANI, F., (1995). Antimicrobial and Genotoxic Activity of 2,6-Diacetylpyridine Bis (Acylhydrazones) and Their Complexes with Some First Transition Series Metal Ions. X-Ray Crystal Structure of a Dinuclear Copper (II) Complex. *J. Inorg. Biochem*, 57, 43-62.

CARLONI, P.; ALBER, F., (1998). Density-Functional Theory Investigations of Enzyme-Substrate Interactions. *Persp. Drug Discov. Des.*, 9, 169-179.

CARLONI, P.; ROTH LISBERGER, U., (2001). Theoretical Biochemistry-Processes and Properties of Biological Systems, Eriksson, L.A. (Ed.), Elsevier, Amsterdam.

CARUNCHIO, V., (2002). Metal complexes: from pioneers to the GTC. *Polyhedron*, 21, 1313-1318.

CECCHI, A.; WINUM, J.; INNOCENTI, A.; VULLO, D.; MONTERO, J.; SCOZZAFAVA, A.; SUPURAN, C.T., (2004). Carbonic anhydrase inhibitors: synthesis and inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II and IX with sulfonamides derived from 4-isothiocyanatobenzamide. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 5775-5780.

CHAKRAVARTY, S.; YADAVA, V.S.; KUMAR, V.; KANNA, K.K., (1985). Drug Protein- Interactions at the molecular-level- A study of sulfonamide carbonic-anhydrase complexes. *J. Biosciences* 8, 491-498.

- CHERMETTE, H.,(1998).Density Functional Theory: A Powerful Tool for Theoretical Studies in Coordination Chemistry. *Coord. Chem. Rev.*, 178, 699-721
- CHERMETTE,H.,(1998).Density Functional Theory: A Powerful Tool for Theoretical Studies in Coordination Chemistry. *Coord. Chem. Rev.*, 178, 699-721
- CHRISTIANSON, D.W., (1991).The structural biology of zinc. *Adv. Prot. Chem.*, 42, 281-335.
- CHRISTIANSON, D.W., (1997). Structural Chemistry and Biology of Manganese Metalloenzymes. *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, 67, 217-252.
- CLARK, T., (1985) *A handbook of computational chemistry. A practical guide to chemical structure and energy calculations.* Jonh Wiley & Sons, New York.330p.
- COATES, D., (2003). The angiotensin converting enzyme (ACE). *Inter. J. Biochem. & Cell Biol.*, 35, 769-773.
- COHEN, N. C.(1985) *Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design*, Academic Press Inc.,USA
- COHEN, N.C.; BLANEY, J.M.; HUMBLET, C; GUND, P. & BARRY, D.C., (1990) Molecular Modeling Software and Methods for Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* 33:883-894.
- COLEMAN, J. E., (1998). Zinc Enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2, 222-234.
- COLLE, R. & SALVETTI, O., (1975). Approximate Calculation of the Correlation Energy for the Closed Shells. *Theoret. Chim Acta (Berl.)* 37: 329-334.
- COMBA, P. & BERNHARDT, P.V., (1992). Molecular Mechanics Calculations of Transition Metal Complexes. *Inor.Chem.*,31:2638-2644.
- COMBA, P. & ZIMMER, M., (1996). Inorganic Molecular Mechanics. *J. Chem. Educ.*73 (2): 108-110.

- COMBA, P., (1993).The relation between ligand structures, coordination stereochemistry, and electronic and thermodynamic properties.*Coord. Chem. Rev.*123:1-48.
- COMBA, P., (1999). Strains and Stresses in Coordination Compounds. *Coord. Chem. Rev.* 182: 343-371.
- COMBA, P., (1999).Metal ion Selectivity and Molecular Modeling. *Coord. Chem. Rev.*185: 81-98.
- COMBA, P., HAMBLEY T.W. (1995) Molecular Modeling of Inorganic Compounds. Weinheim: VCH,197p.
- CSIZMADIA, I.G.; ENRIZ, R.D., (2000). The Role of Computational Medicinal Chemistry in the Drug Discovery Process. *J. Mol. Struct. (Theochem)*, 504: ix-x.
- DELLEY, B., (1990).An all-electron numerical method for solving the local density functional for polyatomic molecules. *J Chem. Phys.*, 92: 508-517.
- DEWAR, M.J.S.; SOEBISCH, E.G.; HEALY, E.F.; STEWART, J.J.P., (1985). AM1: A new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 3902-3909.
- DIAZ, N.; SUAREZ,D.; MERZ, K.M.M.,(2000).Zinc Metallo-Betalactamase from *Bacteroides Fragilis*: A quantum Chemical Study on Model Systems of the Active Site. *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 4197-4208.
- DOMINGO, J.L., (1995). Prevention by chelating agents of metal-induced developmental toxicity. *Reprod. Toxicol. Rev.*, 9, 105-113.
- DONGLI, C.; HANDONG, J.; HONGYUN, Z.; DEJI, C.; JINA, Y.; JIAN, L.B.,(1994).Studies on Acetylferrocenyl Nicotinoyl and Isonicotinoyl Hydrazones and Their Coordination Compounds with Transition Metals-II. *Polyhedron*, 13,



57.

DONIA, A. M., (1998). Thermal stability of transition-metal complexes. *Thermochim. Acta*, 320, 187-199.

DRONSKOWSKI R. (1992). Theoretical Increments and Indices for Reactivity, Acidity and Basicity within Solid-State Materials. *J. Am. Chem. Soc.*, 114:7230-7244.

DUARTE, H.A., (2001). Índices de Reatividade Química a partir da Teoria do Funcional de Densidade: Formalismo e Perspectivas. *Quim. Nova*, 24, 4, 501-508.

EPOSITO, E.X.; BARAN, K.; KELLY, K.; MADURA, J.D., (2000). Docking of sulfonamides to carbonic anhydrase II and IV. *J. Mol. Graphics Mod.*, 18, 283-289.

ERIKSSON, A.E.; JONES, T.A.; LILJAS, A.,(1988). Refined structure of human carbonic anhydrase II at 2.0 Å resolution. *Proteins* 4, 274-282.

FARRELL, N.,(2002). Biomedical uses and applications of inorganic chemistry. An overview. *Coord. Chem. Rev.*, 232, 1-4.

FERRER, S.; HAASNOOT, J.G.; GRAAFF, R.A.G.; REEDIJK, J.,(1992). Synthesis, crystal structure and properties of two acetazolamide (5-acetamido-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide) complexes: bis(5-acetamidato-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide-*O*)bis(1,2-ethanediamine) copper(II) and bis(5-acetamidato-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide-*N*) bis (1,3-propanediamine) copper (II); an unusually weak ambidentate anionic ligand. *Inorg. Chim. Acta*, 192, 129-138.

FINNEY, L. A.; O'HALLORAN, T.V., (2003). Transition Metal Speciation in the Cell: Insights from the Chemistry of Metal Ion Receptors. *Science*, 300, 931-936.

FINNEY, L.A.; O'HALLORAN, T.V.,(2003). Transition Metal Speciation in the Cell: Insights from the Chemistry of Metal Ion Receptors. *Science*, 300, 931-936.

- FRAGA, A.G.M.; RODRIGUES, C.R.; MIRANDA, A.L.P.; BARREIRO, E.J.;  
FRAGA, C.A.M.,(2000). Synthesis and Pharmacological Evaluation of Novel  
Heterotricyclic Acylhydrazone Derivatives, Designed as PAF Antagonists.
- FREITAS, A.C.C.(1991). Síntese e Avaliação Farmacológica de Derivados Pirazólicos  
Funcionalizados, Inibidores de Enzimas da Cascata do Ácido Araquidônico, Rio  
de Janeiro, 1991, Dissertação (Doutorado em Química Orgânica)-IQ/UFRJ.
- FRITSCHÉ, L.; KOLLER, J.,(2003).Potentials in Density Functional Theory and the  
Importance of Sum Rules.*J. Solid State Chem.*, 176, 652-670.
- GAJEWSKI, J.J.; GILBERT, K.E.; KREEK, T.W., (1998). General Molecular  
Mechanics Approach to Transition Metal Complexes. *J. Comp. Chem.* 19 (10):  
1167-1178.
- GAUCHER, J.F.; SELKTI, M.; TIRABOSCHI, G.; PRANGÉ, T.; ROQUES, B.P.;  
TOMAS, A.; FOURNIÉ-ZALUSKI, M.C. (1999). Crystal Structures of  $\alpha$ -  
Mercaptoacyldipeptides in the Thermolysin Active Site: Structural Parameters for  
a Zn Monodentation or Bidentation in Metalloendopeptidases. *Biochemistry*, 38,  
12569-1256.
- GILBERT, D.; WALLEY, T.; NEW, B.(2004). Lifestyle medicines.*BMJ*, 321, 1341-  
1345.
- GIORGI, G.; SAVINI, L.; CHIASSERINI, L.; NENCINI, C.; PELLERANO,  
C.,(1998).Chelating Properties of New Series of Heterocyclhydrazones. X-ray  
Crystallography and Mass Spectrometry of their Metal Complexes. *Polyhedron*,  
17, 3851.
- GOKHALE, N.H.; PADHYE, S.B.; CROFT, S.M.; KENDRICK, H.D.; DAVIES, W.;  
ANSON; C.E.; POWELL, A.K.,(2003).Transition Metal Complexes of

- Buparvaquone as Potent New AntiMalarial Agents. 1. Synthesis, X-ray Crystal-Structures, Electrochemistry and Antimalarial Activity Against *Plasmodium Falciparum*. *J. Inorg. Biochem.*, 95, 249.
- GOODGAME, M.; PIGGOT, B.; THORPE, S., (1982). Metal complexes of the virus inhibitor 3,4-dihydro-1-phenyl-1-*H*-[1,4]-oxazino[4,3,9] benzimidazole. *Inorg. Chim. Acta*, 67, 91-94.
- GOSH, P.; BILL, E.; WEYHERMULLER, T.; NEESE, F.(2003) Noninnocence of the Ligand Glyoxal-bis(2-mercaptoanil). The Electronic Structures of [Fe(gma)]<sub>2</sub>, [Fe(gma)(py)]·py, [Fe(gma)(CN)]<sup>1-/0</sup>, [Fe(gma)I], and [Fe(gma)(PR<sub>3</sub>)<sub>n</sub>] (*n* = 1, 2). Experimental and Theoretical Evidence for "Excited State" Coordination. *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 1293-1308.
- GRAY, H.B., (1983). Bioinorganic Electron Transfer Processes. *Inorg. Chim. Acta* , 79, 50-51.
- GRAY, H.B., (2003). Biological inorganic chemistry at the beginning of the 21<sup>st</sup> century. *PNAS*, 100, 3563-3568.
- GUNNARSSON, O.; JONSON, M.; LUNDQUIST, B. I., (1979).Description of Exchange and Correlation Effects in Inhomogeneous Electron Systems. *Phys.Rev.*, B20:3136-3164.
- HAGEMAN, G.S.; ZHU, X.L.; WAHEED, A.; SLY, W.S., (1991). Localization of carbonic anhydrase IV in a specific capillary bed of the human eye. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88, 2716-2720.
- HANN, M.; GREEN, R., (1999). Chemoinformatics – a New Name for an Old Problem? *Curr. Opinion in Chemical Biology*, 3, 379-383.
- HANN, M.M., *Considerations for the use of computational chemistry techniques by*

- medicinal chemists*. In: KING, F.D., ed. Medicinal Chemistry Principles and Practice. London:RSC, 1994.
- HAUSINGER, R.P.; KUCHAR, J., (2004). Biosynthesis of Metal Sites. *Chem. Rev.*, 104, 509-525.
- HEHRE, W.J.; LOU, L., (1997). A guide to Density Functional Calculations in SPARTAN. Wavefunction, Inc. USA, 82p.
- HELLINGA, H., (1998). The construction of metal centers in proteins by rational design. *Folding & Design*, 3, R1-R8.
- HELLINGA, H.W., (1998). The construction of metal centers in proteins by rational design. *Folding & Design*, 3, R1-R8.
- HEHRE, W.J.; YU, J.; KLUNZINGER, P.E.; LOU, L., (1998) A brief guide to molecular mechanics and quantum chemical calculations, Wavefunction Inc, USA, 1-97.
- HERMAN, F.; vanDYKE, J.P.; ORTENBURGER, I.B., (1969). *Phys. Rev. Lett.*, 22, 807.
- HOFFMAN, R.E. (1963). An Extended Hückel Theory. I. Hydrocarbons. *J. Chem. Phys.*, 39(6) : 1397-1412.
- HOHENBERG, P.C.; KOHN, W., (1964). Inhomogeneous Electron Gas. *Phys. Rev.* 136, B864-B887.
- HOLMES, M.A.; MATTHEWS, B.W. (1981). Binding of hydroxamic acid inhibitors to crystalline thermolysin suggests a pentacoordinate zinc intermediate in catalysis. *Biochemistry*, 20, 6912-6920.
- HÖLTJE, H. D. **Pharmacophore identification and receptor mapping**. In WEMUTH, C.G., ed. The practice of medicinal chemistry. New York: Academic Press, 1996.
- HONG SB, RAUSHEL FM., (1997). Inhibitors directed towards the binuclear metal center of phosphotriesterase. *J. Enzyme Inhib.*, 12, 191-203.

- HOOOPER, N.M., (1991). Angiotensin converting enzyme: implications from molecular biology for its physiological functions. *Int. J. Biochem.*, 23, 7, 641-647.
- HUANG, S.; XUE, Y.; SAUER-ERIKSSON, E.; CHIRICA, L. ; LINDSKOG, S. ; JONSSON, B.,(1998). Crystal Structure of Carbonic Anhydrase from *Neisseria gonorrhoeae* and its Complex with the Inhibitor Acetazolamide. *J. Mol. Biol.*, 283,301-310.
- HUHEEY, J.E.; KEITER, E.A.; KEITER, R.L. *Inorganic Chemistry: Principles of Structure and Reactivity*, 4<sup>th</sup> ed., vol. 1. Harper Collins College Publishers, New York, 1993.
- IFA, D. R., RODRIGUES, C. R., DE ALENCASTRO, R. B., FRAGA, C. A. M. & BARREIRO, E. J. (2000). A possible molecular mechanism for the inhibition of cysteine proteases bysalicylaldehyde *N*-acylhydrazones and related compounds *J. Mol. Struct.*, 505, 11.
- INNOCENTI, A.; ZIMMERMAN, S.; FERRY, J.G.; SCOZZAFAVA, A.; SUPURAN, C.T., (2004). Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the zinc and cobalt  $\gamma$ -class enzyme form the archaeon *Methanosarcina thermophila* with anions. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 3327-3331.
- ITAI, A. *Computer-assisted new lead design*. In: COHEN, N, C., ed. Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design. New York: Academic Press, 1996.
- JAANUS, S. D., (1997). New medical therapies for glaucoma. *Clinical Eye and Vision Care*, 9, 131-1333.
- JUNQUEIRA, G.M.A (1998). Estudo Teórico de Ligantes Ácidos Hidroxâmicos e seus Complexos com Fe(III) de alto spin, Análogos de Sideróforos. Tese – Mestrado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química , 128p.

- KARPLUS, M. & PETSKO, G. A. (1990). Molecular dynamics simulations in biology  
*Nature*, 347, 631.
- KEILIN, D.; MANN, T., (1940). Carbonic anhydrase: purification and nature of the enzyme. *Biochem. J.*, 34, 1163-1176.
- KHANDELWAL, S.; KACRU, D.N.; TANDON, S.K., (1987). Influence of Metal Chelators on Metalloenzymes. *Toxicol. Lett.*, 37, 213-219.
- KLEIN, M.L., (2001). Chemistry- Water on the move. *Science*, 291, 2106-2107.
- KOHN, W.; SHAM, L.J.,(1965). Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Phys. Rev.* 140, 1133.
- KUMAR, A.; NGUYEN, K.T.; SRIVATHSAN, S.; ORNSTEIN, B.; TURLEY, S.; HIRSH, I.; DEHUA, P.; HOL, W.G.J.,(2002).Crystals of Peptide Deformylase from *Plasmodium falciparum* Reveal Critical Characteristics of the Active Site for Drug Design.*Structure*,10, 357-367.
- LABANOWSKI, J.K.; ANDZELM, J. W., (1991) *Density Functional Methods in Chemistry*, Spring-Verlag, New York.443p.
- LANGRETH, D.C.; PERDEW, J.P.(1977) Beyond the local-density approximation in calculation of ground-state electronic properties. *Phys. Rev. B*,15, 2884.
- LANTHIER, C.M.; PARNIAK, M.A.; DMITRIENKO, G.I.,(1997). Inhibition of Carboxypeptidase A by N-(4-t-Butylbenzoyl)-2-hydroxy-1-naphthaldehyde Hydrazone. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*,12, 1557-1562.
- LEACH, A. R. (1998) *Molecular Modelling Principles and Applications*, Longman, Cingapura.
- LEE, C.; YANG, W.; PARR, R.G.,(1988). Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula Into a Functional of The Electron Density. *Phys. Rev.*

*B*,37, 785-789.

- LI, R.; CHEN, X.; GONG, B.; SELZER, P.M.; LI, S.; DAVIDSON, E.; KURZBAN, G.; MILLER, R.E.; NUZUM, E.O.; MCKERROW, J.H.; FLETTERICK, R.J.; GILLMOR, S.A.; CRAIK, C.S.; KUNTZ, I.D.; COHEN, F.E.; KENYON, G.L. (1996). Structure-based design of parasitic protease inhibitors. *Bioorg Med Chem. Bioorg. Med. Chem.* 4 1421-1427.
- LILJEFORS, T.; NORRBY, P.; GUNDERTOFTE, K. & PETTERSSON, I., (1996). A comparison of Conformational Energies Calculated by Several Molecular Mechanics Methods. *J. Comp. Chem.* 17(4): 429-449.
- LIMA, P.C.; AVERY, M.A.; TEKWANI, B.L.; ALVES, H.M.; BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M.(2002). Synthesis and biological evaluation of new imidazo[1,2-*a*]pyridine derivatives designed as mefloquine analogues. *II Farmaco*, 57, 825-832.
- LINDSKOG, S., (1997). Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase. *Pharmacol. Ther.*, 74, 1-20.
- LINDSKOG, S.,(1997). Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase. *Pharmacol. Ther.*, 74, 1-20.
- LINDSTAD, R.I.; MCKINLEY-McKEE, J.S.,(1996) Reversible inhibition of sheep liver sorbitol dehydrogenase by thiol compounds. *Eur. J. Biochem.*, 241, 142-148.
- LIPPARD, S.J.; BERG, J.M.; *Principles of bioinorganic chemistry*; Unniversity Science Books; California, USA, 1994, p16.
- LIPTON, A.S.; HECK, R.W.; ELLIS, P.D., (2004). Zinc solid-state NMR Spectroscopy of Human Carbonic Anhydrase: Implications for the Enzymatic Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 4735-4739.

- LIPTON, A.S.; HECK, R.W.; ELLIS, P.D.,(2004). Zinc Solid-State NMR Spectroscopy of Human Carbonic Anhydrase: Implications for the Enzymatic Mechanism. *J.Am.Chem.Soc.*, 126,4735-4739.
- LOUIE, A. Y.; MEADE, T.J., (1999). Metal Complexes as Enzyme Inhibitors. *Chem. Rev.* 99, 2711-2734.
- LOVELL, T.; HIMO, F.; HAN, W.; NOODLEMAN, L., (2003).Density Functional Methods Applied to Metalloenzymes. *Coord. Chem. Rev.* 238-239, 211-232.
- LUNKEN, W. L.; BERATAN, D. N., (1982). *Theoret. Chim. Acta.* 61:265.
- MABEZA, G.F.; LOYEVSKY, M.; GORDEUK, V.R.; WEISS, G.,(1999).Iron Chelation Therapy for Malaria: A Review. *Pharmacol. Ther.*, 81, 53.
- MACHADO, B.C.(1994). Parametrização do Campo de Força empírico para enolatos de Lítio. Tese – Mestrado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química , 88p.
- MAREN, T.H., (1984). The general physiology of reactions catalyzed by carbonic anhydrase and their inhibition by sulfonamides. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 429, 568-579.
- MAREN, T.H., (1988). The kinetics of  $\text{HCO}_3^-$  synthesis related to fluid secretion, pH control and  $\text{CO}_2$  elimination. *Annu. Rev. Physiol.*, 50, 695-717.
- MASON, B.; MOORE, C.B.; Principles of Geochemistry, 4 ed.Wiley; New York 1982.
- MATHEUS, M. E.; OLIVEIRA, L.F.; FREITAS, A.C.C.,(1991). Antinociceptive property of new 4-acyl-arylhydrazone pyrazole compounds. *Braz J. Med. Biol. Res.*, 24, 1219-1222.
- McCALL, K.A.; HUANG, C.; FIERKE, C.A., (2000). Function and Mechanism of Zinc Metalloenzymes. *Zinc and Health*, 1437S-1446S.



- McCANCE, R.A.; WIDDOWSON, E.M., (1942).The absorption and excretion of zinc. *Biochem. J.*, 36, 692-696.
- MELDRUM, N.U.; ROUGHTON, F.J.W., (1933). Carbonic anhydrase: its preparation and properties. *J. Physiol.*, 80, 113-142.
- MERZ, K.M.Jr.; HOFFMANN, R.; DEWAR, M.J.S., (1989). Mode of Action of Carbonic anhydrase. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 5636-5649.
- MOHAN, M.; GUPTA, N.S.; CHANDRA, L.; JHA, N.K., (1987).Synthesi, Characterization and Antitumor Properties of Some Metal Complexes of 3- and 5-Substituted Salicylaldehyde 2-Pyridinylhydrazones. *J. Inorg. Biochem.*, 31, 7.
- MOLTENI, C.; PARRINELLO, M.,(1998).Glucose in aqueous Solution by First Principles Molecular Dynamics. *J.Am. Chem. Soc.*,120, 2168-2171.
- MONGE, A.; CHORGHAE, M.; ERHARDT, P.W.; GANELLIN, C.R.; KOGA, N.; LINDBERG, P.; PERUN, T.J.; TOPLISS, J.G.; TRIVEDI, B.K.; WERMUTH, C.G., (2000). Medicinal Chemistry in the development of cocieties. *Eur. J. Med. Chem.*, 35, 1121-1125.
- MONZINGO, A.F.; MATTHEWS, B.W. (1984) Binding of N-carboxymethyl dipeptide inhibitors to thermolysin determined by X-ray crystallography: a novel class of transition-state analogues for zinc peptidases *Biochemistry*, 23, 5724-5729.
- MORGAN, L.R.; JURSIĆ, B.S.; HOOPER, C.L.; NEUMANN, D.M.; THANGARAJ, K.; LeBLANC, B., (2002).Anticander Activity for 4,4'-Dihydroxybenzophenone-2,4-dinitrophenylhydrazone (A-007) Analogues and Their Abilities to Interact with Lymphoendothelial Cell Surface Markers. *Curr. Opinion in Chemical Biology*, 7, 1.
- MORGON, N.H. & CUSTODIO, R., (1995). Teoria do Funcional de Densidade.

*Química Nova*, 18(1), 44-55.

MOULT, J., (1997). Comparison of database potentials and molecular mechanics force fields. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 7: 194-199.

MUGURUMA, C.,(1999). Ab initio MO study on the catalytic mechanism in the active site of carbonic anhydrase. *Teochem.*, 461,439-452.

MURKO, A.; MURCKO, M. A.,(1995). Computational methods to Predict Binding Free Energy in Ligand-Receptor Complexes. *J.Med. Chem.*, 38, 4953-4967.

NAGY,A., (1998). Density Functional. Theory and Application to Atoms and Molecules. *Phys. Rep.*, 298, 1-79.

NATESH, R.; SCHWAGER, S.; STURROCK, E.; ACHARYA, K.,(2003). Structure of the Human Angiotensinf-Converting Enzyme-Lsinopril Complex. *Nature* 421, 551-554 .

NATESH, R.; SCHWAGER, S.L.U.; EVANS, H.R.; STURR, D.; ACHARYA, K.R.,(2004). Structural Details on the Binding Antihypertensive Drugs Captopril and Enalaprilat Human Testicular Angiotensin I-Converting Enzyme. *Biochemistry* 43, 8718-8724.

NATESH, R.; SCWAGER, S.L.U.; EVANS, H.R.; STURROCK, E.D.; ACHARYA, K.R.,(2004) *Biochemistry*, 43, 8718-8724.

NOODLEMAN, L.; LOVELL, T.; HAN W.; LI, J.; HIMO, F.(2004). Quantum Chemical Studies of Intermediates and Reaction Pathways in Selected Enzymes and Catalytic Synthetic Systems. *Chem. Rev.*104, 459-508

NOODLEMAN, L.; LOVELL, T.; HAN, W.G.; LIU, T.; TORRES, R.A.; HIMO,F. *In Comprehensive Coordination Chemistry II*. From Biology to Nanotechnology, Vol.2. Fundamentals, Lever A.B. Elsevier: New York,2003, 491-510.

- O'NEILL, P.M.; WILLOCK, D.J.; HAWLWY, S.R.; BRAY, P.G.; STORR, R.C.;  
WARD, S.A.; PARK, B.K., (1997). Synthesis, Antimalarial Activity, and  
Molecular Modeling of Tebuquine Analogues. *J. Med. Chem.*, 40, 437-448.
- ONDETTI, M.A. *Circulation Suppl.* I-77, I-74, I-78.
- ORGIV, C.; ABRAMS, M.J., (1999). Medicinal Inorganic Chemistry: Introduction.  
*Chem. Rev.* 99, 2201-2203.
- PALLA, G.; PREDIERE, G.; DOMIANO, P. (1986). Conformational Behaviour and  
E/Z Isomerization of N-acyl and N-aroylhydrazones, *Tetrahedron.*, 42, 3649-  
3654.
- PALLA, G.; PREDIERE, G.; VIGNALI, C. (1982). Conformational Study on *N*-  
Acylhydrazones of Aromatic Aldehydes by NMR Spectroscopy, *Gaz. Chim. Ital.*,  
112, 339-341.
- PARKIN, G., (2000). The bioinorganic chemistry of zinc: synthetic analogues of zinc  
enzymes that feature tripodal ligands. *Chem. Commun.*, 2000, 1971-1985.
- PARKIN, G., (2004). Synthetic Analogues Relevant to the Structure and Function of  
Zinc Enzymes. *Chem. Rev.*, 104, 699-767.
- PARR, R.G. & YANG, W. (1995). Density-Functional Theory of the Electronic  
Structure of Molecules. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 46:701-728.
- PARR, R.G.; YANG, W., (1989). Density Functional Theory of Atoms and Molecules,  
Oxford Science Publications, New York.
- PASTOREK, J.; PASTOREKOVA, S.; CALLEBAUT, I.; MORNON, J.P.; ZELNIK,  
V.; OPAVSKY, R., (1994). Cloning and characterization of Mn, a human tumor-  
associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a  
putative helix-loop-helix DNA binding segment. *Oncogene*, 9, 2877-2888.

- PASTOREKOVA, S.; CASINI, A.; SCOZZAFAVA, A.; VULLO, D.; PASTOREK, J.; SUPURAN, C.T., (2004). Carbonic anhydrase inhibitors: The first selective, membrane-impermeant inhibitors targeting the tumor-associated isozyme IX. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 869-873.
- PEARSON, R.G. & PARR, R. G. (1983). Absolute Hardness: Companion Parameter to Absolute Electronegativity. *J. Am. Chem. Soc.*, 105:7512-7516.
- PERDEW, J.P., (1986) Density-functional approximation for the correlation energy of the inhomogeneous electron gas. *Phys. Rev. B*, 33, 8822.
- PERDEW, J.P.; WANG, Y., (1986). Exchange potentials in density-functional theory. *Phys. Rev. B*, 33, 8800.
- PERDEW, J.P.; ZUNGER, A., (1981). Self-Interaction Correction to Density-Functional Approximations for Many Electron Systems, *Phys. Rev. B*, 23, 5048-5079.
- PERDEW, J.P.; ZUNGER, A., (1993). Self-Interaction Correction to Density-Functional Approximations for Many Electron Systems, *Phys. Rev. B*, 23, 5048-5079.
- PEREIRA, A.S.; CARDOSO, J.N.; AQUINO NETO, F.R.; VIOLANTE, F.A.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. (1998). Diastereometric Analysis of Acylhydrazones by High Resolution Gas Chromatography, *Analytical Letters*, *in press*.
- PINTO, M. F. V. (1999). Estudo teórico da complexação entre Fe(III) de alto spin e ligantes do tipo orto-dihidroxibenzeno através do acoplamento Mecânica Molecular– Orbital Molecular. Tese – Mestrado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, 99p.
- QUE JR, L.; BANCI, L., (2002). Bioinorganic Chemistry. *Curr. Opinion in Chemical Biology*, 6, 169-170.

- RIBEIRO, I.G.; SILVA, K.C.M.; PARRINI, S.C.; MIRANDA, A.L.P.; FRAGA, C.A.M., BARREIRO, E.J. (1998). Synthesis and antinociceptive properties of new structurally planned imidazo[1,2-a]pyridine 3-acylhydrazone derivatives. *E. J. Med. Chem*, 33, 225-235.
- RICHARDSON, D.R., (1997). Cytotoxic Analogs of the Iron(III) Chelator Pyridoxal Isonicotinoyl Hydrazone: Effects of Complexation with Copper (II), Gallium(III), and Iron(III) on Their Antiproliferative Activities. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997, 41, 2061.
- RICHARDSON, D.R., (2002). Iron chelators as therapeutic agents for the treatment of cancer. *Crit.Rev. Oncol. Hematol.*, 42, 267-281.
- RICHARDSON, D.R., (2002). Iron Chelators as Therapeutic Agents for the Treatment of Cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 42, 267.
- RODRIGUES, C.R., BARREIRO, E.J.; ROMEIRO, N.C.; ALBUQUERQUE, M.G.; SANT'ANNA, C.M.R.; ALENCASTRO, R.B.; DA MOTTA NETO, J.D., (1998). On the Modeling of Some anti-inflammatory and Anti-thrombotic Drugs by AM1. *Molecular Engineering*, 7, 473-490.
- SADLER, P.J., (1991). Metals in Medicine: Design and mechanism of action. *Adv. Inorg. Chem.*, 36, 1-48.
- SAGNELLA, D.E.; LAASONEN, K.; KLEIN, M.L., (1996). Ab initio Molecular Dynamics Study of Proton Transfer in a Polyglycine Analog of the Ion Channel Gramicidin A. *Biophys. J.*, 71, 1172-1178.
- SANDERSON, R.T. (1954) Chemical Bounds and Bound Energy. *J. Chem. Educ.* 31, 238-251.
- SANTOS, R.A.S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.; ANDRADE, S.P., (2000).

- Angiotensin-(1-7): an update. *Regul; Pept.*, 91, 45-62.
- SHARIR, M.; PIERCE JR., W.M.; CHEN, D.; ZIMMERMAN, T.J., (1994).  
Pharmacokinetics, Acid-Base Balance and Intraocular Pressure Effects of  
Ethyloxaloylazolamide- A Novel Topically Active Carbonic Anhydrase Inhibitor.  
*Exp. Eye Res.*, 58, 107-116.
- SHRIVASTAV, A.; SINGH, N.K.; SINGH, S.M.,(2002). Synthesis, Characterization  
and Antitumor Studies of Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II),Cu(II) and Zn(II)  
Complexes of *N*-Salicyloyl-*N'*-*o*-hydroxythiobenzhydrazide. *Bioorg. Med. Chem.  
Lett.*,10, 887-895.
- SILVA, P., *Farmacologia*. Ed. Guanabara Koogan S.A.. Rio de Janeiro: 2002.
- SILVESTRELLI, P.L.; PARRINELLO,M.,(1999).Structural, Electronic and Bonding  
Propeties of Liquid Water from First Principles. *J. Chem Phys.*, 111, 3572-3580.
- SINGH, R.B., (1982). Hydrazones as analytical Reagents: A Review. *Talanta*, 29, 77-  
84.
- SOLOMON, E. I.; BRUNOLD, T.C.; DAVIS, M.I.; KEMSLEY, J.N.; LEE, S.;  
LEHNERT, N.; NEESE, F.; SKULAN, A. J.; YANG, Y.; ZHOU, J.(2000).  
Geometric and Electronic Structure/Function Correlations in Non-Heme Iron  
Enzymes. *Chem. Rev.*, 100, 235-349.
- STEWART, J.J.P.. (1989a) Optimization of Parameters for Semiempirical Methods. I.  
Method. *J. Comput. Chem.*, 10: 209-220
- STEWART, J.J.P.. (1989b)Optimization of Parameters for Semiempirical Methods. II.  
Applications *J. Comput. Chem.*, 10: 221-264
- SULPIZI, M.; FOLKERS,G.; ROTH LISBERGER, U.; CARLONI, P.; SCAPOZZA, L.,  
(2002).Applications of Density Functional Theory-Based Methods in Medicinal

- Chemistry. *Quant. Struct-Act. Relat.*, 21, 173-181.
- SULPIZI, M.; FOLKERS, G.; ROTH LISBERGER, U.; CARLONI, P.; SCAPOZZA, L., (2002). Applications of Density Functional Theory-Based Methods in Medicinal Chemistry. *Quant. Struct-Act. Relat.*, 21, 173-181.
- SUPURAN, C.T.; NICOLAE, A.; POPESCU, A., (1996). Carbonic anhydrase inhibitors. Part 35. Synthesis of Schiff bases derived from sulfanilamide and aromatic aldehydes: the first inhibitors with equally high affinity towards cytosolic and membrane-bound isozymes. *Eur. J. Med. Chem.*, 31, 431-438.
- SWAAN, P.W.; STEHOUWER, M.C.; TUKKER, J.J., (1995). Molecular mechanism for the relative binding affinity to the intestinal peptide carrier. Comparison of three ACE-inhibitors: enalapril, enalaprilat and lisinopril. *Biochim. Biophys. Acta*, 1236, 31-38.
- TABIBIAZAR, R.; JAMALI, A.H.; ROCKSON, S.G., (2001). Formulating Clinical Strategies for Angiotensin Antagonism: A Review of Preclinical and Clinical Studies. *Amer. J. Med.*, 110, 471-479.
- TAKANO, Y.; KUBO, S.; ONSIHI, T.; ISOBE, H.; YOSHIOKA, Y.; YAMAGUCHI, K., (2001). Theoretical studies on the magnetic interaction and reversible dioxygen binding of the active site in hemocyanin. *Chem. Phys. Lett.*, 335, 395-403.
- TANDON, S.K.; KHANDELWAL, S.; KACHRU, D.N., (1987). Influence of metal chelators on metalloenzymes. *Toxicol. Lett.*, 37, 213-219.
- THORP, H.H., (1998). Bioinorganic chemistry and drug design : here comes zinc again. *Chem. Biol.*, 5, R125-R127.
- TONEY JH, FITZGERALD PM, GROVER-SHARMA N, OLSON SH, MAY WJ, SUNDELOF JG, VANDERWALL DE, CLEARY KA, GRANT SK, WU JK,

- KOZARICH JW, POMPLIANO DL, HAMMOND GG., (1997). Antibiotic sensitization using biphenyl tetrazoles as potent inhibitors of *Bacteroides fragilis* metallo-beta-lactamase. *Chem. Biol.*,5, 185-96.
- TUCKERMAN, M.E.; MARX, D.; KLEIN, M.L.; PARRINELLO, M.,(1997). On the Quantum Nature of the Shared Proton in Hydrogen Bonds. *Science*, 275, 817-820.
- TURECI, O.; SAHIN, U.; VOLLMAR, E.; SIEMER, S.; GOTTERT, E.; SEITZ, G., (1998). Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning anhydrase gene that is over expressed in some renal cell cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 7608-7613.
- TURNER, A.J.; HOOPER, N.M.,(2002). The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends. Pharmacol. Sci.*,23, 177-183.
- UNGER, T.; GRUBER, M.G. In *Pharmacology of Anti-hypertensive Therapeutics* (Edited by Ganten D. and Mulrow P.J.), Converting Enzyme Inhibitors, Springer, Berlin, 1990, pp 379-481.
- VALLEE, B. L.; AULD, D.S., (1990). Active-zinc ligands and activated H<sub>2</sub>O of zinc enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 220-224.
- VALLEE, B. L.; AULD, D.S., (1993). New perspectives on zinc biochemistry: cocatalytic sites in multi-zinc enzymes. *Biochemistry*, 32, 6493-6500.
- VAN GUNSTEREN, W. F. & BERENDSEN, H. J. C. (1990). Computer simulations of molecular dynamics: methodology, applications, and perspectives in chemistry *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 29, 992.
- VIDGREN, J.; LILJAS, A.; WALKER, N.P.C.(1990). Refined structure of the acetazolamide complex of human carbonic anhydrase II at 1.9Å.
- VIDGREN, J.; LILJAS, A.; WALKER, N.P.C.,(1990). Refined structure of the



- acetazolamide complex of human carbonic anhydrase II at 1.9Å. *Int. J. Biol. Macromol.*, *12*, 342-344.
- VOSKO, S.H.; WILK, L.; NUSAIR, M.(1980). Exchange potentials in density-functional theory.*Can. J. Phys.*, *58*,1200.
- WALCOURT, A.; LOYEVSKY, M.; LOVEJOY, D.B.; GORDEUK, V.R.; RICHARDSON, D. R.,( 2004 ).Novel Aroylhydrazone and Thiosemicarbazone Iron Chelators with Anti-Malarial Activity Against Chloroquine-Resistant and – Sensitive Parasites. *Inter. J. Biochem. Cell Biol.*, *36*, 401.
- WARD, P.E.; SHERIDAN, M.A.; HAMMON, K.J.; ERDOS, E.G.,(1980). Angiotensin I Converting Enzyme (kininaseII) of the Brush Border of Human and Swine Intestine. *Biochem. Pharmacol.*, *29*, 1525-1529.
- WEBER, A.; CASINI, A.; HEINE,A.; KUHN, D. ; SUPURAN, C.T. ; SCOZZAFAVA, A. ; KLEVE, G. (2004). Unexpected Nanomolar Inhibition of Carbonic Anhydrase by COX-2-Selective Celecoxib : New Pharmacological Opportunities Due to Related Binding Site Recognition. *J. Med. Chem.* *47*, 550-557.
- WESS, G., (1996).Challenges for Medicinal Chemistry. *Perspective*, *12*, 529.
- WILLIAMS, R.J.P., (1987). The biochemistry of zinc. *Polyhedron*, *6*, 61-69.
- WILLIAMS, R.J.P.,(1990). Bio-inorganic chemistry: its conceptual evolution. *Coord. Chem. Rev.*, *100*, 573-610.
- ZAVADA, J.; ZAVADOVA, Z.; PASTOREKOVA, S.; CIAMPOR, F.; PASTOREK, J.; ZELNIK, V., (1993). Expression of MaTu-MN protein in human tumor cultures and in clinical specimens. *Int. J. Cancer*, *54*, 268-274.
- ZHANG, C.X.; LIPPARD, S.J.,(2003). New metal complexes as potential therapeutics. *Curr. Opinion in Chemical Biology*, *7*, 1-9.

- ZIEGLER, M.; vonZELEWSKY, A., (1998). Charge-Transfer Excite State Properties of Chiral Transition Metal Coordination Compounds Studied by Spectroscopy. *Coord. Chem. Rev.*, 177, 257-300.
- ZIEGLER, T., (1991). Approximate Density Functional Theory as a Practical Tool in Molecular Energetics and Dynamics. *Chem. Rev.* 91: 651-667.
- ZIEGLER, T.; CHENG, W.; BAERENDS, E. J. & RAVENEK, W., (1988). Theoretical Study on the Difference in the Relative Strengths of Metal- Hydrogen and Metal-Methyl Bonds in Complexes of Early Transition Metals and Complexes of Middle to Late Transition Metals. *Inor. Chem.*,27, 3458-3464.