

Universidade Federal de São Carlos

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Telurooxetanas: estudos cristalográficos, modelagem molecular e cálculos de *docking* para aplicação biológica.

Stella Hernandez Maganhi *

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Química, área de concentração Química Inorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector

Co-orientadora: Profa. Dra. Ignez Caracelli

*** Bolsista Fapesp/ processo nº 2006/04912-0**

São Carlos - SP

2009

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

M188te

Maganhi, Stella Hernandez.

Telurooxetanas : estudos cristalográficos, modelagem molecular e cálculos de docking para aplicação biológica / Stella Hernandez Maganhi. -- São Carlos : UFSCar, 2009. 83 f.

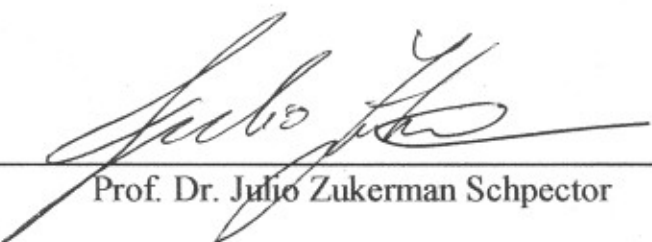
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Docking. 2. Telúrio. 3. Raio x - difração. 4. Inibidor de cisteino protease. I. Título.

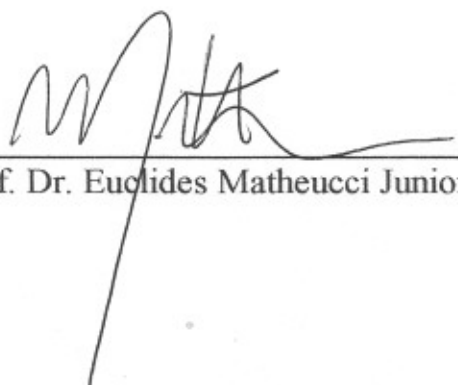
CDD: 548 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Mestrado

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado da candidata **Stella Hernandez Maganhi**, realizada em 10 de fevereiro de 2009:*


Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector


Prof. Dr. Rodrigo Luiz Oliveira Rodrigues Cunha


Prof. Dr. Euclides Matheucci Junior

Aos meus pais,
Matheus e Lucia, pelo constante apoio, amor,
carinho e amizade que nunca me faltaram.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Julio Zukerman-Schpector e à Profa. Dra. Ignez Caracelli pela orientação, incentivo, dedicação e amizade concedida.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Luiz Oliveira Rodrigues Cunha pelas amostras utilizadas no trabalho, bem como os testes biológicos fornecidos para complementar este trabalho.

À todos os professores que ajudaram na minha formação e às secretárias da PPG-Química da UFSCar.

Aos amigos do LaCreMM e BioMat : Denis da Silva Corrêa, Eliane Mari de Oliveira, Cristiane Cabral de Melo, Lucas Sousa Madureira, Luciane Benedita Duarte Pivetta, Maurício Angel Vega Teijido, Paulo Roberto Gabbai Armelin, Sergio Ricardo Pizano Rodrigues.

À Fapesp pela bolsa concedida.

Ao meu irmão Fábio pela amizade e companheirismo.

Às minhas amigas Ana Carolina, Carla Graziella, Daniela, Eliane, Mariana, Marina, Nathália, Patrícia e Renata que se tornaram uma verdadeira família para mim.

Aos meus queridos amigos de São Carlos: Dalyde, Danilo, Kênia, Maiara, Natália, Sérgio, Rafeis, Fábio, Rodrigo, Taícia.

À todos que de uma certa maneira me ajudaram na realização deste trabalho.

Sumário

Índice de Figuras.	vi
Índice de Tabelas.	ix
Resumo.	x
Abstract.	xi
Símbolos e Abreviações.	xii
1. Introdução.	1
1.1. Cisteíno-Proteases.	1
1.2. Catepsina B.	1
1.2.1. Características da Catepsina B.	2
1.3. Interações em Proteínas.	5
1.3.1. Interação C-H...O.	5
1.3.2. Interação C-H... π .	7
1.4 Estudos estruturais por difração de raio X.	8
1.4.1 Coleta de dados.	9
1.4.2 Determinação da estrutura.	11
1.4.3 Refinamento da estrututa.	12
1.5 Química Supramolecular.	13
1.6 Compostos de Telúrio.	14
1.6.1. Compostos de Telúrio(IV) como inibidores.	15
1.7. Desenvolvimento de novos inibidores.	16
1.8 <i>Docking</i> .	18
1.8.1. Algoritmos de <i>Docking</i> .	19
1.8.2 Algoritmos Genéticos.	20
1.9 Programa Gold.	21
2. Objetivos.	23
3. Procedimento Experimental.	24
3.1. Determinação da Estrutura Cristalográfica.	24
3.2. Modelagem Molecular de Telurooxetanas.	25
3.3. Posicionamento dos Hidrogênios.	25

3.4. Preparação do ligante.	26
3.5. Preparação da macromolécula.	26
3.6. Cálculos de <i>docking</i> de compostos de Telúrio em Catepsina B.	28
3.6.1. Visualização Gráfica.	29
4. Resultados e Discussão.	31
4.1 Determinação das estruturas cristalográficas.	31
4.1.1 Composto(1) : (3E)-2-cloro-3-(clorometilidene)-2-(4-metoxifenil)-1-oxa-2λ ⁴ -tellurapiro [3,6]decano.	31
4.1.2. Composto(2) : (3E)-2-cloro-3-(clorometilidene)-2 λ ⁴ - 4-tellurapiro[3,5]nonano	40
4.2 Resultados do estudo de docking.	46
4.2.1 Validação da Metodologia – <i>Redocking</i> .	46
4.2.2 Estudos de <i>docking</i> - Telurooxetanas.	49
4.2.2.1 Cálculos realizados com os ligantes neutros.	50
4.2.2.1.1 Discussão dos resultados obtidos para os ligantes neutros.	53
4.2.2.2 Cálculos realizados com a retirada do haleto ligado ao átomo de Te dos ligantes.	53
4.2.2.2.1 Discussão dos resultados obtidos para os ligantes carregados.	57
4.2.3 Comparação das conformações das moléculas cristalográficas ou modelada com as obtidas por docking antes e depois da retirada do haleto .	60
4.2.4 Modelagem e Estudos de <i>docking</i> de algumas telurooxetanas a partir da análise anterior.	62
4.2.4.1 Cálculos realizados com os ligantes neutros.	63
4.2.4.1.1. Discussão dos resultados obtidos para os ligantes neutros.	65
4.2.4.2 Cálculos realizados com a retirada do haleto ligado ao átomo de Te dos ligantes.	65
4.2.4.3 Discussão dos resultados obtidos para os ligantes carregados.	68
4.2.5 Comparação das conformações das moléculas modeladas com as obtidas por docking antes e depois da retirada do haleto.	69
4.2.6 Análise comparativa dos resultados para os ligantes.	71
5. Conclusões.	76
6. Referências Bibliográficas.	78

Índice de Figuras

Figura 1.1 A Catepsina B é um monômero funcional enquanto a estrutura cristalográfica 1gmy apresenta três moléculas em sua unidade assimétrica (Greenspan et al., 2001).	2
Figura 1.2 Esquema de protonação da His199.	3
Figura 1.3 Alguns resíduos de aminoácidos do sítio ativo da Catepsina B: Cys29, His199 e Asn219 que fazem parte da tríade catalítica, mais o aminoácido coadjuvante Gly74.	4
Figura 1.4 (a) Representação de uma ligação de hidrogênio. A-C é uma ligação simples ou dupla; (b) e (c) são parâmetros para interações do tipo X-H... π ; (d) parâmetros para interações do tipo halogênio...O. A ligação O-A é dupla (Panigrahi e Desiraju, 2007).	7
Figura 1.5 Os parâmetros de uma interação C-H... π . O centro de massa é representado pelo ponto X. Em vermelho estão desenhados os parâmetros geométricos utilizado para identificar a interação C-H... π : as distâncias entre o átomo de carbono e o centro do sistema π (d_{C-X}), o ângulo formado (\angle_{C-H-X}) e a distância da projeção da posição do átomo de hidrogênio no plano π e o centro de massa do anel (d_{Hp-X}) (Brandl et al., 2001).	8
Figura 1.6 Etapas para determinação de estruturas por difração de raio X.	9
Figura 1.7 Molécula AS-101.	16
Figura 1.8 Fluxograma de um AG básico (adaptado de Miranda, 200).	20
Figura 3.1 Cloro-telurooxetana (1) e bromo-cloro-telurooxetana (2).	24
Figura 3.2 Telurooxetanas obtidas a partir de modelagem molecular.	25
Figura 3.3 Inibidor dipeptidil nitrila complexado com a Catepsina B 1gmy.	27
Figura 3.4 Complexo cristalográfico 1gmy da Catepsina B humana com dipeptidil nitrila.	27
Figura 3.5 Validação do estudo de <i>docking</i> a partir da mudança das coordenadas do ligante cristalográfico (dipeptidil nitrila) que após o cálculo de docking retorna à sua posição inicial.	28
Figura 4.1 Estrutura da cloro-telurooxetana (1).	31
Figura 4.2 Projeção da cloro-telurooxetana com anel de sete membros (composto 1) com os átomos identificados.	32
Figura 4.3 Dímero centrossimétrico da cloro-telurooxetana.	33
Figura 4.4 Synthons da cloro-telurooxetana.	34
Figura 4.5 Poliedro de coordenação em torno do átomo de Te, a base pentagonal é formada pelos átomos C1, Cl, O1, O1", os espaço vazio entre Cl2 e O1" corresponde ao par de elétrons isolados (1-x, -y, 1-z).	35
Figura 4.6 Estrutura da bromo-cloro-telurooxetana.	40
Figura 4.7 Projeção da bromo-cloro-telurooxetana numerada.	40
Figura 4.8 Synthons bromo-cloro-telurooxetana.	41
Figura 4.9. Poliedro de Coordenação em torno do átomo de Te, a base pentagonal é formada pelos átomos C1, Cl, O1, O1' e o par de elétrons isolados (-x, -y, 1-z).	42
Figura 4.10 Estrutura da dipeptidil nitrila numerada.	47

Figura 4.11 Validação do método de <i>docking</i> : A molécula em destaque corresponde às coordenadas cristalográficas da molécula retirada do pdb; as moléculas superpostas são os resultados de <i>docking</i> .	48
Figura 4.12 Algumas interações entre a dipeptidil nitrila e alguns resíduos da Cat. B.	49
Figura 4.13 Estruturas das telurooxetanas analisadas.	50
Figura 4.14 Interação entre a molécula cloro-telurooxetana neutra e resíduos da Catepsina B. As distâncias de ligação estão indicadas na Tabela 4.13.	51
Figura 4.15 Interação entre a molécula bromo-cloro-telurooxetana neutra e resíduos da Catepsina B. As distâncias de ligação estão indicadas na Tabela 4.13.	52
Figura 4.16 Interação entre a molécula bromo-telurooxetana neutra e resíduos da Catepsina B. As distâncias de ligação estão indicadas na Tabela 4.13.	52
Figura 4.17 Observa-se a ligação covalente entre o Te da molécula cloro-telurooxetana e o SG-Cyx29 no sítio ativo da Catepsina B.	54
Figura 4.18 Interações entre a molécula cloro-telurooxetanada qual se retirou o haleto e resíduos da enzima Catepsina B.	55
Figura 4.19 Interações entre a molécula bromo-cloro-telurooxetanada qual se retirou o haleto e resíduos da enzima Catepsina B.	55
Figura 4.20 Observa-se a orientação da molécula bromo-cloro-telurooxetana na enzima Catepsina B.	56
Figura 4.21 Interações entre a bromo-telurooxetana com a retirada do haleto e resíduos da Catepsina B.	56
Figura 4.22 Propostas de mecanismo para compostos de Te(IV): mecanismos associativo (a) e dissociativo (b).	58
Figura 4.23 Esquema de inibidor modificante.	58
Figura 4.24 Superposição do cloro-telurooxetana (1): A molécula cristalográfica em azul e a orientação do ligante escolhido em verde, à esquerda com o ligante neutro e à direita com a retirada do cloro.	60
Figura 4.25 Superposição do bromo-cloro-telurooxetana (2) : A molécula cristalográfica em azul e orientação do ligante escolhido em verde, à esquerda com o ligante neutro e à direita com a retirada do cloro.	61
Figura 4.26 Superposição do bromo-telurooxetana (3): A molécula modelada em azul e a orientação do ligante escolhido no sítio em verde, à esquerda com o ligante neutro e à direita com a retirada do cloro.	61
Figura 4.27 Estruturas das telurooxetanas analisadas.	62
Figura 4.28 Interações entre a molécula cloro-bromo-telurooxetana neutra e resíduos da Cat B. As distâncias de ligação estão indicadas na Tabela 4.17.	63
Figura 4.29 Interações entre a molécula cloro-telurooxetana neutra e resíduos da Cat. B. As distâncias de ligação estão indicadas na Tabela 4.17.	64
Figura 4.30 Interações entre a molécula bromo-telurooxetana neutra e resíduos da Cat. B. As distâncias de ligação estão indicadas na Tabela 4.17.	64

Figura 4.31 Interações entre a cloro-bromo-telurooxetana com a retirada do haleto e resíduos da Cat B. As distâncias de ligação estão indicadas na Tabela 4.18.	66
Figura 4.32. Interações entre a cloro-telurooxetana com a retirada do haleto e resíduos da Cat B. As distâncias de ligação estão indicadas na Tabela 4.18.	67
Figura 4.33 Interações entre a bromo-telurooxetana com a retirada do haleto e resíduos da Cat B. As distâncias de ligação estão indicadas na Tabela. 4.18.	67
Figura 4.34 Superposição da cloro-bromo-telurooxetana (4): A molécula modelada em azul e a orientação escolhida do ligante no sítio em verde, à esquerda com o ligante neutro e à direita com a retirada do cloro.	69
Figura 4.35 Superposição da cloro-telurooxetana (5): A molécula modelada em azul e a orientação escolhida do ligante no sítio em verde, à esquerda com o ligante neutro e à direita com a retirada do cloro.	70
Figura 4.36 Superposição da bromo-telurooxetana (6): A molécula modelada em azul e a orientação escolhida do ligante no sítio em verde, à esquerda com o ligante neutro e à direita com a retirada do cloro.	70
Figura 4.37 Ligantes estudados neste trabalho.	71
Figura 4.38 Superposição dos ligantes contendo anel de 6 membros na entrada do sítio ativo da Catepsina B: o ligante verde é o composto 2 (átomo de Cl ligado ao Te), o ligante azul é o composto 3 (átomo de Br ligado ao Te), o ligante vermelho é o composto 5 (átomo de Cl ligado ao Te).	72
Figura 4.39 Superposição dos ligantes contendo anel de 7 membros na entrada do sítio ativo da Catepsina B: o ligante amarelo é o composto 1 (átomo de Cl ligado ao Te), o ligante laranja é o composto 4 (átomo de Br ligado ao Te), o ligante roxo é o composto 6 (átomo de Br ligado ao Te).	73
Figura 4.40 Superposição dos ligantes contendo anel de 6 membros com a retirada do haleto e formação da ligação Te-S: o ligante verde é o composto 2 (átomo de Br ligado ao átomo C2), o ligante azul é o composto 3 (átomo de Br ligado ao átomo C2), o ligante vermelho é o composto 5 (átomo de Cl ligado ao átomo C2).	74
Figura 4.41 Superposição dos ligantes contendo anel de 7 membros com a retirada do haleto e formação da ligação Te-S: o ligante amarelo é o composto 1 (átomo de Cl ligado ao átomo C2), o ligante laranja é o composto 4 (átomo de Cl ligado ao átomo C2), o ligante roxo é o composto 6 (átomo de Br ligado ao átomo C2).	75

Índice de Tabelas

Tabela 4.1 Interações secundárias da cloro–telurooxetana.	33
Tabela 4.2. Dados cristalográficos e de refinamento da cloro–telurooxetana (1).	36
Tabela 4.3. Coordenadas atômicas fracionárias e fatores de deslocamentos atômicos isotrópicos equivalentes do composto (1).	37
Tabela 4.4. Distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação do composto (1).	38
Tabela 4.5. Fatores de deslocamento atômicos anisotrópicos do composto (1).	39
Tabela 4.6. Coordenadas fracionárias dos átomos de hidrogênio do composto (1).	39
Tabela 4.7 Dados cristalográficos e de refinamento da bromo-cloro-telurooxetana (2).	43
Tabela 4.8 Coordenadas atômicas fracionárias e fatores de deslocamentos atômicos isotrópico equivalentes do bromo-cloro-telurooxetana (2).	44
Tabela 4.9 Distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação do bromo-cloro-telurooxetana (2).	44
Tabela 4.10 Fatores de deslocamento atômicos anisotrópicos do bromo-cloro-telurooxetana (2).	45
Tabela 4.11 Coordenadas fracionárias dos átomos de hidrogênio do bromo-cloro-telurooxetana (2).	46
Tabela 4.12 Principais distâncias entre os resíduos de catepsina B e os átomos do ligante cristalográfico dipeptidil nitrila.	48
Tabela 4.13 Principais distâncias entre os resíduos de catepsina B e os átomos das moléculas nas orientações selecionadas para os ligantes neutros.	51
Tabela 4.14 Principais distâncias entre os resíduos de catepsina B e os átomos das orientações selecionadas para os ligantes sem o haleto ligado ao Te.	54
Tabela 4.15 Constantes de segunda ordem para a inibição da Cat B pelos compostos de Te (IV) (Extraído de Cunha et al. 2005).	59
Tabela 4.16 Escores gerados para as orientações escolhidas que se ligam à proteína.	59
Tabela 4.17 Principais distâncias entre os resíduos de catepsina B e os átomos das orientações selecionadas para os ligantes neutros.	63
Tabela 4.18 Principais distâncias entre os resíduos de catepsina B e os átomos das orientações selecionadas para os ligantes sem o haleto ligado ao Te.	66
Tabela 4.19 Escores gerados para as orientações escolhidas que se ligam à proteína.	68

Resumo

“Telurooxetanas : estudos cristalográficos, modelagem molecular e cálculos de *docking* para aplicação biológica”.

Este trabalho é composto de 4 capítulos. No capítulo 1 encontra-se uma descrição dos problemas abordados aqui, começando com as características da proteína, a sua importância biológica e social, as interações responsáveis tanto pela sua estrutura como pela formação de complexos proteína-ligante; também há uma breve descrição dos compostos de telúrio seguido da apresentação dos fundamentos dos métodos experimentais utilizados, ou seja, cristalografia e *docking*.

No capítulo 2, os objetivos deste trabalho são apresentados.

O Capítulo 3 inclui os procedimentos experimentais que foram utilizados para determinar as estruturas cristalinas e moleculares, a modelagem dos compostos que não têm estrutura cristalográficas, bem como do *docking* molecular.

No capítulo 4 são descritos e discutidos os resultados. As estruturas cristalinas das telurooxetanas (3E)-2-cloro-3-(clorometilidene)-2-(4-metoxifenil)-1-oxa-2 λ^4 -tellurapiro [3,6]decano (**1**) e de (3E)-2-cloro-3-(clorometilidene)-2 λ^4 - 4-tellurapiro[3,5]nonano (**2**), mostram que o poliedro de coordenação ao redor do átomo de Te é uma pseudo-bipirâmide pentagonal. O *synthon* supramolecular é diferente nos dois casos, apesar de o átomo Te, em ambos os casos, realizar uma interação secundária com um haleto. Os resultados de *docking* para todos os compostos de telúrio estudados mostraram que estes formam complexos com a catepsina B através da formação de uma ligação covalente entre o Te e S da Cys29 da enzima. As diferenças nos valores dos escores de *docking* e no número de interações são devidos, principalmente, o tamanho da cadeia de carbono.

Finalmente as conclusões e as perspectivas podem ser encontrados.

Abstract

“Telurooxetanes : crystallographic studies, molecular modeling and docking for biological applications”.

This work is composed of 4 chapters. In Chapter 1 is a description of the problems addressed here, starting with the characteristics of the protein, its biological and social importance, and the interactions responsible for both its structure and the formation of ligand-protein complexes, there is also a brief description of Te(IV) compounds followed by the presentation of the grounds of the experimental methods used, namely crystallography and docking.

In Chapter 2 the objectives of this work are presented.

Chapter 3 includes the experimental procedures that were used to determine the crystal and molecular structures, the modeling of the compounds that did not have crystallographic structure, as well as the molecular docking.

In Chapter 4 are described and discussed the results. The crystal structures of the telluroxetanes (3E)-2-chloro-3-(chloromethylidene)-2-(4-methoxyphenyl)-1-oxa-2 λ^4 -tellurasp[3.6]decane (**1**) and of (3E)-2-chloro-3-(chloromethylidene)-2-(4-methoxyphenyl)-1-oxa-2 λ^4 -tellurasp[3.5]nonane (**2**) show that the coordination polyhedron around the atom of Te is a pseudo-pentagonal bipyramid. The supramolecular synthon is different in the two cases, in spite that the Te atom makes a secondary interaction with a halide, in both cases. The docking results for all tellurium compounds have shown that these ligands form complexes with Cathepsin B through the formation of a covalent bond between the Te and S of Cys29 of the enzyme. The differences in the values of scores from the docking and the number of interactions are due, mainly, the size of the carbon chain.

Finally the conclusions and outlook can be found.

Símbolos e Abreviações

Cat B	Catepsina B
EC	enzyme class
Te(IV)	Telúrio (IV)
As-101	Telurato de tricloro(dioxietileno O,O') de amônia
AG	Algoritmo genético
GOLD	<i>Genetic Optimisation for Ligand Docking</i>
RMSD	Desvio médio quadrático
Σr_{vdW}	Soma do raio de van der Waals
pdb	<i>protein data bank</i>
CSD	<i>Cambridge Structural Database</i>

1. Introdução

1.1 Cisteíno-proteases

As proteases, enzimas que atuam na hidrólise das ligações peptídicas, são divididas em quatro famílias com base no seu resíduo catalítico e em seu mecanismo de ação. Assim, enquanto serino-proteases utilizam como nucleófilo a hidroxila do resíduo da serina e as aspartil-proteases, e metaloproteases possuem carboxilatos ativos como grupo funcional, cisteíno-proteases possuem como nucleófilo um tiol no sítio ativo (Albeck et al., 1998). Cisteíno-proteases lisossomais são abundantes nas células e têm um importante papel na proteólise intracelular (Watanabe et al., 2006). As mais abundantes são as da família da papaína, enzima encontrada no mamão, sendo uma importante parte desta família composta pelas proteases lisossomais que são constituídas por 11 catepsinas humanas (B, H, L, S, C, K, O, F, V, X e W) (Turk B. et al, 2000).

Dentre estas proteinases, a catepsina B é a mais abundante e a mais estudada (Musil et al., 1991).

1.2 Catepsina B

A catepsina B (CatB) (EC 3.4.22.1), importante membro das proteases lisossomais está envolvida na degradação e processamento de proteínas (Watanabe et al., 2006), sendo a única da família das catepsinas que atua como endopeptidase e exopeptidase (Zeng et al., 2006). Além disso, estas cisteíno-proteases lisossomais podem participar da invasão tumoral pela degradação de componentes da matriz extracelular (Buck et al., 1992). A presença da CatB em membrana plasmática resulta em dissolução focal das proteínas da matriz extracelular permitindo a invasão das células tumorais. Investigações clínicas mostraram que a presença de CatB é um forte indicador do prognóstico e diagnóstico de câncer. A inibição de enzimas da família de cisteíno-proteases é muitas vezes suficiente para interromper a invasão de vários tipos de células humanas (Cunha et al., 2005).

Em vista dos fatos descritos fica claro que o desenvolvimento de novos inibidores para a Catepsina B tem primordial importância na pesquisa de novos agentes quimioterápicos.

1.2.1 Características gerais da Catepsina B

A Catepsina B (Figura 1.1) possui cadeia polipeptídica homóloga às das enzimas papaína e actinidaína, de 30 kDa (Zeng et al., 2006) e apresenta formato de disco com diâmetro de 50 Å e espessura de 30 Å constituída por dois domínios distintos esféricos (lóbulos) denominados L e R, que interagem entre si (Musil et al., 1991). Em tecidos de mamíferos, estes domínios são duas cadeias de 47 e 205 resíduos de aminoácidos denominadas cadeia leve e pesada, respectivamente, ligadas covalentemente por uma ponte dissulfeto (Musil et al., 1991).

Os dois lóbulos formam um bolso ligante longo e estreito onde está localizada a tríade catalítica composta pelos resíduos Cys29, His199 e Asn219. Ao lado da Cys29 encontram-se os subsítios Sn' (utilizando-se a nomenclatura Sn e Sn' de Schechter e Berger), caracterizado por um loop oclusão com duas histidinas, e do outro lado o subsítio Sn (n = 1, 2) (Watanabe et al., 2006).

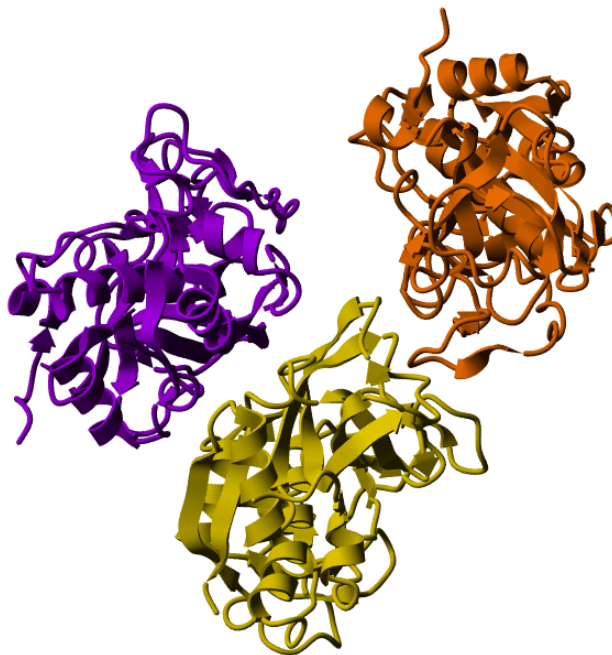


Figura 1.1. A Catepsina B é um monômero funcional enquanto a estrutura cristalográfica 1gmy apresenta três moléculas em sua unidade assimétrica (Greenspan et al., 2001).

O subsítio S1 corresponde a uma região cercada por hidroxilas e é composta principalmente pelos resíduos Gln23, Gly27, Cys29, Gly74 e Gly198 (Watanabe et al., 2006). O subsítio S2 é composto pelos resíduos Pro76, Ala173, Gly198, Ala200 e Glu 245 (Figura 1.2) (Watanabe et al., 2006) e o resíduo principal do subsítio S3 é a Tyr75 (Watanabe et al., 2006). O subsítio S1' é composto por um bolso hidrofóbico rodeado pelos resíduos Val176, Leu181, Met196, His199 e Trp121 e, finalmente, o subsítio S2' é formado por um espaço rodeado pelos resíduos Gln23, Gly24, His110, His111, Gly121 e Trp221 (Watanabe et al., 2006).

A Catepsina B apresenta atividade ótima em meio levemente ácido (pH = 5,0) e sua atividade torna-se menor em valores de pH alcalino, atua como endopeptidase, ou seja, clivando ligações peptídicas dentro da cadeia, com relativa especificidade e uma leve preferência por resíduos básicos e atua também como exopeptidase, na hidrólise da extremidade da parte carbóxi da cadeia (carboxipeptidase). Possui 14 resíduos de cisteína, sendo que 12 deles estão envolvidos em ligações dissulfeto. A Cys29 e a Cys240 estão desemparelhadas. A Cys 29 é topologicamente equivalente a outras cisteínas pertencentes à cisteíno-proteases, mas a Cys 240 aparece apenas na Catepsina B, não apresentando equivalente na papaína (Musil et al., 1991).

No sítio ativo, o tiol e o imidazol das cadeias laterais da Cys29 e His199 formam um par iônico quando o intervalo de pH varia entre 4,0 e 8,5. A quebra da ligação do substrato é mediada pelo ataque nucleofílico do S⁻ da Cys 29 seguida pela protonação da His199 (Pan et al., 2005):

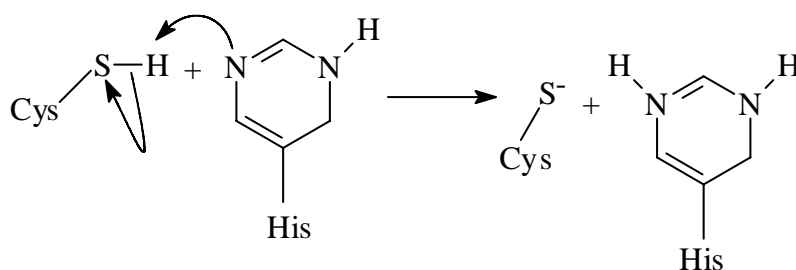


Figura 1.2. Esquema de protonação da His199

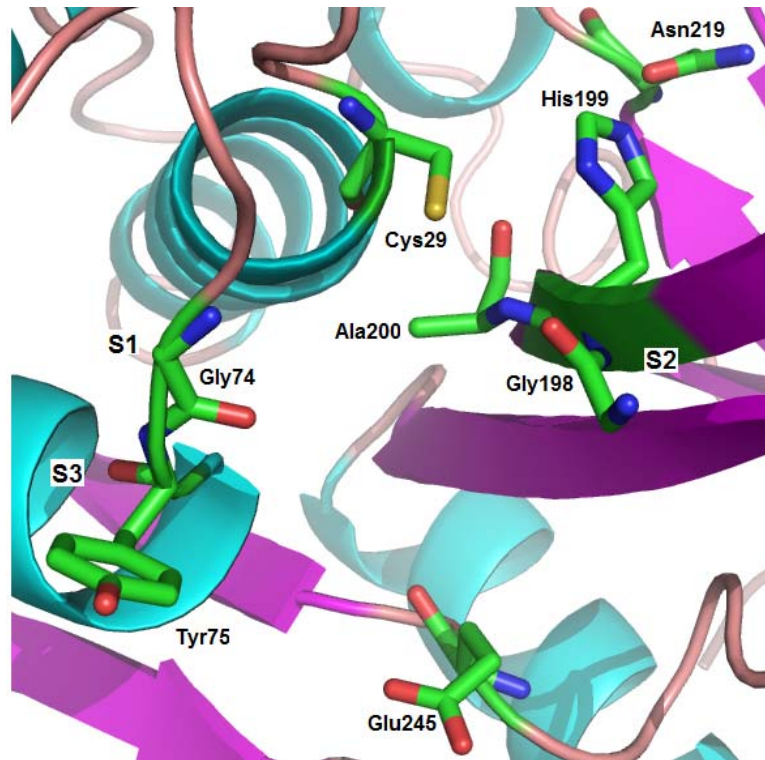


Figura 1.3 Alguns resíduos de aminoácidos do sítio ativo da Catepsina B: Cys29, His199 e Asn219 que fazem parte da tríade catalítica, mais o aminoácido coadjuvante Gly74.

Como visto anteriormente, a Catepsina B está relacionada a algumas doenças tais como, metástase (Sloane et al., 1986), doenças inflamatórias (Pan et al., 2005), distrofia muscular (Katunuma et al, 1987) e enfisema pulmonar (Johnson e Travis, 1977). Alguns inibidores estudados se apresentam como potentes inibidores de cisteíno-proteases, porém não possuem preferência por uma delas (Yamamoto et al, 1991). Assim, o estudo de novos inibidores específicos deve ser desenvolvido mediante o entendimento de como ocorre a inibição da enzima¹.

¹ Há vários mecanismos pelo qual um inibidor enzimático pode atuar. Em uma inibição do tipo competitiva o inibidor compete diretamente com o substrato no sítio de ligação (Voet, 1995). Na inibição não competitiva o inibidor se liga diretamente ao complexo enzima-substrato, mas não na enzima livre. Há um terceiro tipo de inibição denominada mista onde o inibidor pode ligar-se tanto na enzima livre quanto no complexo enzima-substrato.

1.3 Interações em Proteínas

Embora a estrutura primária de uma proteína seja determinada por sua estrutura covalente, isto é, sua seqüência de aminoácidos unidas por ligações peptídicas, as forças responsáveis pelo enovelamento (“*fold*ing”) e sua estabilização são principalmente de natureza não covalente. Estas interações não covalentes incluem ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas (Brandl et al., 2001).

O conceito de ligação de hidrogênio foi originalmente introduzido por Latimer e Rodebush (1920) com sendo simplesmente uma interação que ocorre quando “o átomo de hidrogênio está ligado a dois ou mais átomos”.

As ligações de hidrogênio ocorrem de maneira onipresente na formação de elementos de estrutura secundária tais como α -hélices, onde a cadeia polipeptídica assume conformação helicoidal permitindo, simultaneamente, ângulos conformacionais e um padrão favorável de ligações de hidrogênios na cadeia peptídica (Voet, 1995) e folhas β , onde as ligações de hidrogênio ocorrem entre cadeias polipeptídicas vizinhas (Voet, 1995), e no fato de que quase todo potencial do doador e acceptor de ligação de hidrogênio da proteína está normalmente envolvido em interações intra e inter-moleculares, como por exemplo, entre a proteína e um inibidor (Brandl et al., 2001; Rajagopal e Vishveshwara, 2005). Estas interações são altamente direcionais e a energia eletrostática é geralmente o termo de maior contribuição para sua estabilidade (Derewenda et al., 1995). As ligações de hidrogênio chamadas clássicas incluem os sistemas O-H...O, N-H...O e O-H...N. As chamadas não clássicas são: C-H...O, O-H... π , e C-H... π (Brandl et al., 2001). Um outro tipo de interação muito importante é a que ocorre entre anéis aromáticos: empilhamento π - π .

1.3.1 Interação C-H...O

Enquanto as ligações de hidrogênio do tipo O-H...O ou N-H...O vem sendo estudadas por décadas, o mesmo não pode ser dito sobre as interações C-H...O que somente a algum tempo vem ganhando a aceitação de ser uma genuína ligação de hidrogênio (Desiraju, 1991; Scheiner et al, 2001).

As ligações C-H...O fazem contribuições energeticamente favoráveis para a estabilidade da proteína bem como para as interações ligante-proteína (Yan et al., 2007).

Em retrospecto, Ramachandran sempre considerou que as ligações de hidrogênio C-H...O existem e contribuem significativamente para a estabilidade de biomoléculas (Desijaru, 1991).

Para a identificação destas interações é necessário a utilização de critérios tais como distância doador/aceptor e o ângulo C-H...O (Figura 1.3). A distância C...O é um dos atributos importantes para determinar a existência deste tipo de ligação e deve-se ser menor que a soma dos raios de van der Waals do carbono e do oxigênio. Assim, se o raio de van der Waals do átomo de oxigênio é 1,40 Å e o do átomo de carbono ligado ao hidrogênio é de 1,85 Å, a distância C...O deve ser em menor que 3,25 Å para se ter uma interação deste tipo (Yan et al., 2007).

Ainda a distância de doador/aceptor é uma condição necessária mais não suficiente, pois como mencionado estas interações são direcionais de forma que o ângulo ao redor do átomo de hidrogênio deve ser o mais linear possível. Nestas interações a variação do ângulo aceita está entre 100° e 180° (Derewenda et al., 1995).

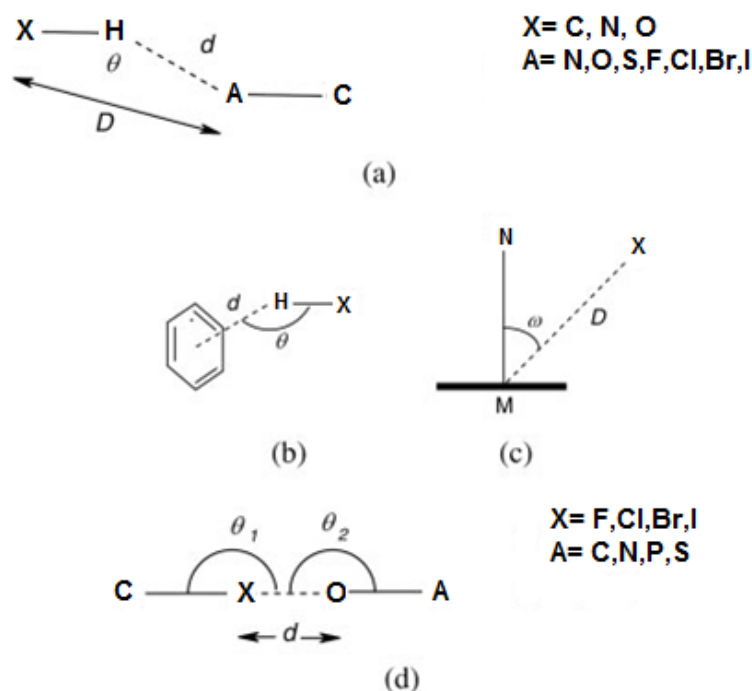


Figura 1.4 (a) Representação de uma ligação de hidrogênio. A-C é uma ligação simples ou dupla; (b) e (c) são parâmetros para interações do tipo X-H... π ; (d) parâmetros para interações do tipo halogênio...O. A ligação O-A é dupla (Panigrahi e Desiraju, 2007).

1.3.2 Interação C-H... π

A interação C-H... π que ocorre em proteínas é estável tanto em solventes polares como em não polares e sua energia de estabilização global é de cerca de 0,5 kcal/mol por interação o que é suficiente para fazer dela um contribuinte potencialmente importante na estabilização total da proteína, que em muitos casos não é mais que poucas kcal/mol. Um fato que deve ser destacado é que estas interações foram descritas primeiro em proteínas na formação de complexos de proteínas com ligantes ou cofatores como o grupo heme, piridoxal-5-fosfato, carboidratos, e nas interações entre cadeias laterais vizinhas em torno de uma ligação peptídica *cis* (Brandl et al., 2001).

Brandl e colaboradores (2001) numa análise das interações C-H... π nas estruturas depositadas no Protein Data Bank observaram que a maioria delas apresentavam uma distância dc-x mostrada (Figura 1.4) de 3.6 Å e que para incluir 96% de todos os dados encontrados esta distância deveria ser ampliada a 4.5 Å.

Como no caso das outras interações envolvendo o átomo de hidrogênio o ângulo \angle_{C-H-X} é importante e o valor mínimo aceito é de 120° .

Neste caso particular é necessário introduzir um terceiro parâmetro: $d_{H\pi-X}$, que é a distância entre o átomo de hidrogênio projetada no plano π e o centro de massa do plano π (Figura 1.3.2.1.). Este parâmetro define o círculo ao redor do centro de massa do sistema e assegura que o átomo de hidrogênio envolvido na interação está realmente localizado acima ou abaixo do plano π e não em algum lugar na lateral, o que permite excluir interações $\pi\dots\pi$ (Brandl et al., 2001).

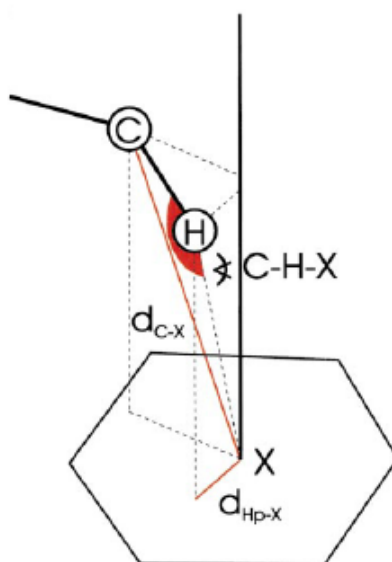


Figura 1.5 Os parâmetros de uma interação C-H... π . O centro de massa é representado pelo ponto X. Em vermelho estão desenhados os parâmetros geométricos utilizado para identificar a interação C-H... π : as distâncias entre o átomo de carbono e o centro do sistema π (d_{C-X}), o ângulo formado (\angle_{C-H-X}) e a distância da projeção da posição do átomo de hidrogênio no plano π e o centro de massa do anel ($d_{H\pi-X}$) (Brandl et al., 2001).

1.4 Estudos estruturais por difração de raio X

A determinação e análise das estruturas tridimensionais por difração de raio X têm por objetivos essenciais o conhecimento da estrutura molecular e cristalina dos materiais. Através desta metodologia podem-se determinar as posições relativas de todos os átomos que constituem a molécula (estrutura molecular) e a posição relativa de todas as moléculas que constituem a cela unitária (estrutura cristalina)

(Giacovazzo et al., 2002). Pode-se, portanto, estabelecer os ângulos e as distâncias inter-atômicas na molécula, bem como as interações intermoleculares que permitem a formação do cristal. Estes últimos estudos são conhecidos como Química Supramolecular, a química além da molécula (Seção 1.5).

A determinação de estruturas cristalinas por difração de raio x compreende uma série de etapas fundamentais que pode ser resumido no esquema abaixo (Sheldrick, 1982):

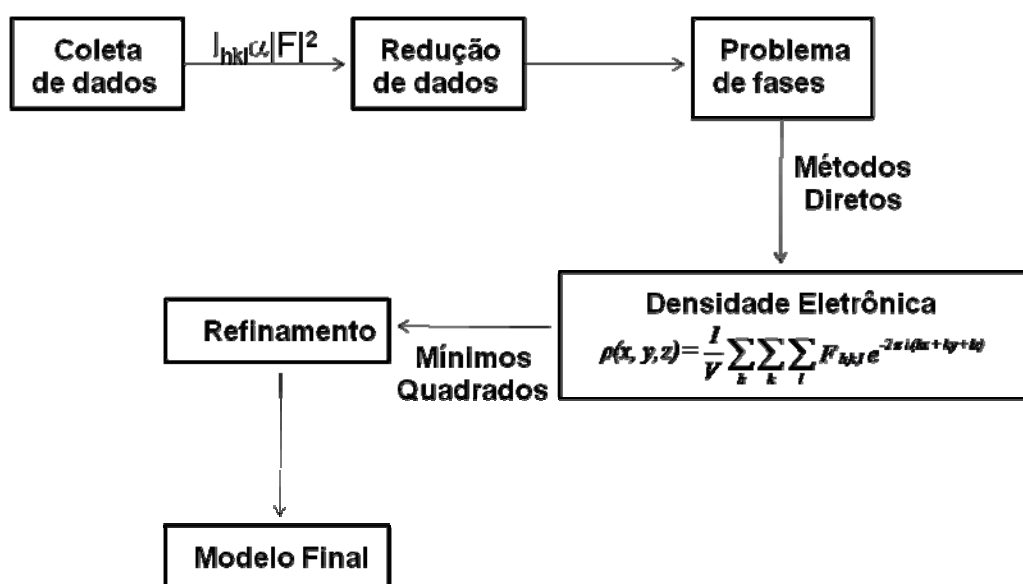


Figura 1.6 Etapas para a determinação de estruturas por difração de raio x.

1.4.1 Coleta de Dados

A coleta de dados é o procedimento pelo qual se obtêm as medidas das intensidades dos feixes difratados.

No estudo da difração de raio X demonstra-se que existe a seguinte relação entre o padrão de difração (F_{hkl}) e o objeto que o produz (ρ_{xyz}) (Giacovazzo et al., 2002) :

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_{h,k,l} e^{-2\pi i (hx + ky + lz)} \quad (1)$$

onde F_{hkl} , o Fator de Estrutura, é uma quantidade complexa:

$$F_{hkl} = |F_{hkl}| e^{i\alpha_{hkl}} \quad (2)$$

A interpretação dos dados de difração começa pela determinação dos parâmetros da cela unitária e pelos índices (h, k, l) de cada pico de difração observado resolvendo a seguinte equação (Giacovazzo et al., 2002):

$$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \left(\frac{2 \sin \theta}{\lambda} \right)^2 = h^2 (a^*)^2 + k^2 (b^*)^2 + l^2 (c^*)^2 + 2hka^*b^* \cos \gamma^* + 2klb^*c^* \cos \alpha^* + 2lhc^*a^* \cos \beta^* \quad (3)$$

Em seguida, é necessário a determinação dos fatores de estrutura à partir das intensidades observadas:

$$I_{obs}(h, k, l) = \nu \kappa^2 C_{hkl} |F_{hkl}^{obs}|^2 \quad (4)$$

onde ν é a multiplicidade, κ é um fator de escala tal que $F_{000} = N$ (número de elétrons na cela unitária) e C_{hkl} corresponde às correções de Lorentz, polarização, absorção, extinção e correção da dispersão anômala (Giacovazzo et al., 2002).

A única medida experimental é a da intensidade dos feixes difratados, que como mostrado na equação (4) é proporcional a $|F_{hkl}|^2$, entretanto para utilizar a eq. (1) é necessário tanto o módulo quanto a fase do fator de estrutura (eq. (2)), mas toda informação sobre a fase, α_{hkl} , é perdida o que impossibilita a determinação da estrutura a partir das medidas diretas das intensidades, este problema é conhecido como o “problema das fases”. Assim, as fases devem ser calculadas e então as coordenadas dos átomos dentro da cela unitária deverão ser estimadas. Um dos fatos relevantes que distinguem a cristalografia é que o padrão de difração é diferente para cada molécula. Ou seja, se as moléculas possuem fragmentos iguais, por exemplo, grupos fenila, isto não significa que partes do padrão de difração serão semelhantes. Até o presente momento não tem sido obtido o mesmo padrão de difração para moléculas diferentes.

1.4.2 Determinação da estrutura

Como mencionado acima o problema a ser resolvido é a determinação das fases dos fatores de estrutura. Para isso tira-se vantagem do fato das fases (α_{hkl}) estarem condicionadas pelas propriedades da densidade eletrônica. As condições mais importantes são: a) a densidade eletrônica somente pode ser positiva ou nula em cada ponto da cela unitária; b) os átomos podem ser considerados pontuais. Em geral, a solução do problema das fases em cristalografia de pequenas moléculas é obtida pelos chamados Métodos Diretos.

Os Métodos Diretos são chamados dessa forma pois estão baseados na obtenção de informação das fases diretamente das intensidades dos feixes difratados. São relações matemáticas e estatísticas que permitem reconhecer que existe informação nas intensidades, por exemplo, em geral acontece que se $|F_h|$, $|F_{h'}$ e $|F_{h-h'}|$ correspondem a reflexões intensas, suas fases estarão relacionadas por: $\alpha_h \approx \alpha_{h'} - \alpha_{h-h'}$ (Azzároff, 1968).

O uso destas relações e de outras levaram aos mais sofisticados códigos de resolução de estruturas, como sejam os desenvolvidos por George Sheldrick (SHELX) (Sheldrick, 1990; Sheldrick, 1997) e por Altomare e colaboradores (SIR92) (Altomare et al, 1993;). Estes algoritmos foram utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

1.4.3 Refinamento da estrutura

A estrutura aproximada, calculada a partir de um primeiro conjunto de fases, deve ser refinada de forma iterativa, de forma a obter o melhor modelo possível, ou seja, a melhor concordância entre os fatores de estrutura observados experimentalmente e os calculados com o modelo estrutural. Para isso, é definida uma função erro (Altomare et al, 1993) :

$$Q = \sum_{hkl} \omega_{hkl} [\Delta |F_{hkl}|]^2 \quad \text{onde} \quad \Delta |F| = |F^{obs}| - |F^{calc}| \quad (5)$$

Os parâmetros estruturais que podem ser refinados são: a) coordenadas das posições atômicas; b) parâmetros de deslocamento atômico, que de certa forma simulam a vibração dos átomos ao redor da sua posição de equilíbrio, que podem ser até 6 por átomo. Quanto melhor a qualidade dos dados coletados mais parâmetros podem ser refinados. Isto porque o método de refinamento utilizado é o dos mínimos quadrados que exigem uma sobre determinação do problema, ou seja, um elevado número de reflexões por parâmetro. O modelo se refina minimizando a função $Q(p_1, \dots, p_n)$ com relação aos parâmetros $p_1 \dots p_n$.

A qualidade dos resultados é analisada utilizando os chamados índices de discordância, que avaliam a diferença entre o modelo calculado e o modelo que deu lugar ao padrão de difração, ou seja, a molécula. Os índices geralmente utilizados são:

$$R = \frac{\sum (|F^{obs}| - |F^{calc}|)}{\sum (|F^{obs}|)} \quad R_w = \frac{\sum (|F^{obs}|^2 - |F^{calc}|^2)}{\sum (|F^{calc}|^2)} \quad (6)$$

1.5 Química Supramolecular

A Química Supramolecular é definida como a "química dos arranjos moleculares e das ligações intermoleculares" (Atwood, et al 1996; Lehn, 1990; Lehn, 1995; Steed e Atwood, 2000), seu interesse está em estudar entidades de grande complexidade que resultam da associação de duas ou mais espécies químicas mantidas unidas por forças intermoleculares.

São as forças intermoleculares que levam a formação de estruturas supramoleculares; estas podem ser ligações secundárias (Alcock, 1972,1993), ligações de hidrogênio (Aakeroy, 1997; Braga e Grepioni, 1999; Braga et al 1998), interações doador-aceptor (tipo ácido-base de Lewis) ou interações iônicas. Estas forças são importantes na formação de complexos "host-guest", no controle de estados de agregação e são fundamentais para o que é hoje conhecido como "crystal engineering", ou seja, a síntese de compostos com propriedades físicas e químicas pré-determinadas (Zukerman-Schpector e Haiduc, 2001).

A formação de estruturas supramoleculares é um processo espontâneo ("self-assembly") e não em etapas, envolvendo o processo conhecido como "reconhecimento molecular".

Em química supramolecular ao menos três níveis de organização estrutural podem ser distinguidos:

a) *estrutura primária*: nível molecular (átomos conectados covalentemente formando moléculas);

b) *estrutura secundária*: as supermoléculas ou os arranjos supramoleculares baseados em conexões intermoleculares não-covalentes dos tectons moleculares (um tecton é definido como alguma molécula cujas interações são dominadas por forças associativas particulares que induzem auto-arranjo de uma cadeia organizada (Simard et al., 1991).

c) *estrutura terciária*: resultado da organização no estado sólido (empacotamento cristalino) dos arranjos supramoleculares ou supermoléculas (Haiduc e Edelman, 1999). Estas últimas, por sua vez, podem associar-se para produzir gigantescas estruturas supramoleculares altamente ordenadas (Fyfe e Stoddart, 1997).

No presente trabalho uma ênfase particular será dada ao estudo da química supramolecular de compostos de Te(IV), o que supõe um estudo detalhado e criterioso das projeções dos empacotamentos moleculares obtidos.

1.6 Compostos de Telúrio

O telúrio é encontrado na natureza associado a minérios do grupo dos sulfetos, perfazendo uma abundância relativa de aproximadamente $10^{-7}\%$ da crosta terrestre (Faoro, 2006).

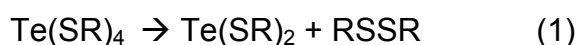
Wöhler (1840) e Mallet (1851) foram os primeiros a introduzir o átomo de telúrio em uma molécula orgânica produzindo o telureto de dietila. A partir daí, os compostos orgânicos de telúrio têm sido explorados com grande interesse. Seu caráter bifílico, ou seja, sua capacidade de acomodar cargas negativas ou positivas faz com que seja possível a obtenção de várias moléculas orgânicas deste elemento podendo ser classificadas como espécies eletrofílicas ou nucleofílicas (Faoro, 2006).

A coordenação ao redor do Te (IV) em compostos contendo haletos e grupos orgânicos com fórmula $R\text{TeX}_3$, $R_2\text{TeX}_2$ e $R_3\text{TeX}$ é bastante variada e tem sido descrita pela primeira vez de forma compilada por Zukerman-Schpector e Haiduc (2001). Estes compostos mostram uma grande versatilidade na geração de estruturas supramoleculares através de interações secundárias do tipo $\text{Te}\dots\text{X}$ e $\text{Te}\dots\text{O}$ (Haiduc e Zukerman-Schpector, 2001; Zukerman-Schpector et al., 2002) e as menos comuns $\text{Te}\dots\pi$ (Zukerman-Schpector e Haiduc, 2002). Classicamente, a partir do trabalho de Ziolo e Troup (1983), o poliedro de coordenação ao redor do telúrio (IV), em compostos contendo o grupo C_2TeX_2 , era sempre descrito como sendo uma pseudo-bipirâmide trigonal com os átomos de cloro ocupando as posições axiais e os átomos de carbono e o par isolado de elétrons ocupando as posições equatoriais. Deve ser apontado que esta geometria está em concordância com a teoria de repulsão dos pares eletrônicos na camada de valência (VSEPR) (Gillespie e Hargittai, 1991). Uma análise mais detalhada mostrou que se as interações secundárias fossem levadas em consideração, os poliedros de coordenação podiam

apresentar uma variedade muito grande de formas, chegando a antiprismas quadrados mono-encapuzados (Zukerman-Schpector e Haiduc, 2001).

As interações $\text{Te}\dots\pi$ foram relatadas pela primeira vez por Zukerman-Schpector e Haiduc (2002), onde foram identificados compostos no qual a distância entre o átomo de telúrio e a centróide de uma face do anel fenila é menor que a soma dos raios de van der Waals. Em geral, compostos contendo interações $\pi\dots\pi$ entre dois anéis fenila paralelos sua distância interplanar (centróide – centróide) é em torno de 3.3 – 3.8 Å, o que sugere que a espessura da metade do anel está entre 1.7 – 1.9 Å. Portanto, se o raio de van der Waals do telúrio é de 2.2 Å e a espessura da metade do anel fenílico é tomada como sendo 1.8 Å, então uma distância entre o telúrio e a centróide do anel benzênico menor que 4.0 Å pode ser considerada uma interação $\text{Te}\dots\pi\text{-C}_6\text{H}_5$ (Zukerman-Schpector e Haiduc, 2002).

Compostos de Te(IV) tais como TeX_4 ou Te(OR)_4 interagem rapidamente com nucleófilos tais como alcoóis, tióis, carboxilatos, etc, gerando $(\text{Nu})_4\text{Te}$. É possível modificar os ligantes, ou eventualmente, hidrolisar para TeO_2 em solução aquosa. Ao contrário da regra geral, compostos do tipo Te(SR)_4 sofrem desproporcionamento de acordo com a reação (Albeck et al., 1998).



1.6.1 Compostos de Te(IV) como inibidores enzimáticos.

O composto AS-101 (Figura 1.6) é um imunomodulador com potencial para aplicações terapêuticas e toxicidade mínima (Kalechman et al, 1998), entre suas variadas aplicações, atua também como inibidor de cisteínoproteases. Essa ação foi atribuída ao ataque nucleofílico dos grupos SH da proteína ao átomo de Te(IV) do AS-101 baseado na reatividade de haletos de telúrio (IV) com nucleófilos que leva a produtos de substituição nucleofílica. Muitos outros compostos de telúrio exibem diferentes atividades biológicas, como, por exemplo, compostos com a forma R_2TeCl_n exibem atividade anti-helmíntica enquanto íons de telúrio (TeO_3^{2-}) induzem alterações na membrana do eritrócito (Albeck et al., 1998). Outra atividade envolve ligação covalente entre o tiol e o telúrio em vários estados de oxidação, com

exceção de Te(VI). Assim, as evidências sugerem que muitas atividades biológicas de organotelúrios são diretamente relacionadas com sua especificidade química com tióis (Albeck et al., 1998).

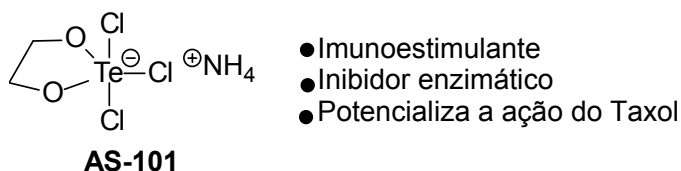


Figura 1.7. Molécula AS-101

Em 2005 Cunha e colaboradores relataram os primeiros exemplos de telurooxetanas avaliadas como inibidores de cisteíno-proteases *in vitro*. Assim, neste trabalho serão estudadas as diferenças e similaridades de algumas moléculas da família das telurooxetanas e seu modo de interação com a enzima catepsina B.

1.7 Desenvolvimento de novos inibidores

As interações ligante-receptor são centrais em inúmeros processos biológicos como transdução de sinais, regulação fisiológica, transcrição de genes e reações enzimáticas. Estas interações acontecem pela formação de complexos macromoleculares (proteína-proteína ou proteína-DNA) e complexos de pequenas moléculas com macromoléculas (Lybrand, 1995).

Como várias proteínas regulam processos bioquímicos-chave pela interação com pequenas moléculas, as proteínas receptoras geralmente são alvo de estudos para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (Basso et al., 2005). Seguindo o princípio da quimioterapia proposto por Paul Ehrlich tais agentes terapêuticos devem apresentar uma toxicidade seletiva, agindo contra o microorganismo e sendo relativamente inócuos ao hospedeiro. De acordo com este princípio e sabendo que agentes infecciosos como vírus, bactérias, fungos ou protozoários codificam e carregam seus próprios (e cruciais) ácidos nucleicos e enzimas, estas macromoléculas obviamente representam bons alvos para a intervenção, quando não possuem equivalentes no organismo de mamíferos (Kuntz, 1992).

Como as técnicas de identificação, clonagem, expressão e purificação de proteínas e DNA se desenvolveram enormemente nas últimas décadas, tornando comuns os ensaios *in vitro* altamente específicos, uma grande variedade de inibidores específicos pôde ser desenvolvida (Rosamond e Allsop, 2000).

Uma possibilidade para a formulação de prováveis inibidores foi desenvolvida baseando-se no conhecimento da estrutura do receptor (alvos moleculares definidos) e é conhecida como *structure-based drug design*. A abordagem baseada na estrutura do receptor pressupõe como bons inibidores aqueles que têm boa complementaridade química e estrutural com o sítio de ligação no receptor (Rosamond e Allsop., 2000).

Métodos computacionais podem ser utilizados para propor e testar a ligação da molécula sugerida no sítio ativo do receptor e avaliar a qualidade do complexo formado.

A análise teórica-computacional da interação do ligante com o receptor geralmente é feita utilizando-se a metodologia de *docking* molecular. Vários exemplos de *docking* molecular são descritos na literatura. Simulações de *docking* já foram utilizadas no Laboratório de Cristalografia, Estereodinâmica e Modelagem Molecular – LaCrEMM, entre outros estudos, para a modelagem de novos inibidores anti-chagásicos utilizando as proteínas tripanotiona redutase e glutathione redutase como alvo (Vega-Tejido et al., 2006), onde se faz uma análise das interações envolvidas na ligação de pequenas moléculas com proteínas e relaciona-se com dados de atividade.

Hoje estudos de *docking* tem sido utilizados não só para o estudo de complexos formados entre proteínas e pequenas moléculas, como também tem sido amplamente utilizado para o estudo de proteína-proteína, DNA-pequenas moléculas, DNA-proteínas. Neste contexto, alguns inibidores de proteases têm sido desenvolvidos a partir do método de *docking* como, por exemplo, o desenvolvimento de inibidores contra cisteínas parasitárias (Desai et al, 2006) dentre eles a cruzaina, proteína presente na *Trypanosoma cruzi* (Romeiro et al, 2009) e as proteases aspartáticas plasmepsina I, II e IV presentes no parasita *plasmodium falciparum* (Ersmark et al, 2006) causador da malária.

1.8 Docking

Predizer o modo de ligação e a afinidade de interação de um composto quando este interage com o sítio de ligação de uma proteína, reside no coração do desenho de novas estruturas (Verdonk et al., 2004).

Nos últimos anos, técnicas computacionais como o *docking* molecular foram desenvolvidas para a predição da estrutura (ou estruturas) de complexos intermoleculares formados entre duas ou mais moléculas e têm sido amplamente empregadas no estudo das interações molécula alvo-ligante. Geralmente as moléculas que formam este complexo são uma proteína e um ligante pequeno. Quando ligado à proteína, o ligante tem sua conformação alterada afetando a função da macromolécula.

As informações estruturais obtidas do complexo modelado teoricamente podem auxiliar no esclarecimento do mecanismo molecular de reconhecimento, e podem até indicar como a estrutura de um ligante ou receptor pode ser modificada para melhorar sua função biológica, ou quais as características necessárias para o desenho de novos compostos que aumentem ou inibam suas funções (Hou et al., 1999). Este método é uma área de imenso interesse para a indústria farmacêutica (Hartshorn, 2007).

Atualmente, existem alguns programas computacionais que permitem realizar estudos de *docking* molecular. A propriedade mais importante que tais programas devem possuir é a habilidade de reproduzir os resultados experimentais, geralmente cristalográficos.

O *docking* molecular é realizado com auxílio de programas computacionais que utilizam diferentes algoritmos de *docking*. A utilização dos programas permite gerar um grande número de complexos ligante-receptor, classificando-os de acordo com os mais variados índices e parâmetros. Cabe ao pesquisador, com auxílio de programas gráficos, identificar aqueles cujas interações ligante-receptor sejam mais efetivas. Estes algoritmos utilizam os dados da estrutura tridimensional de um determinado receptor para: (i) caracterizar o sítio de ligação; (ii) colocar o possível ligante neste sítio, e (iii) avaliar a qualidade do acoplamento (Krumrine et al., 2003).

O número de programas computacionais disponíveis para realização de estudos de *docking* é grande e vem crescendo. Muitos algoritmos possuem partes comuns em sua metodologia com graus diferentes de complexidade e com uma diversidade de técnicas que permitem enfrentar de forma eficiente problemas na identificação de possíveis inibidores baseado no conhecimento da estrutura do receptor (*structure-based drug design*) (Taylor et al., 2002).

Os estudos de docking, normalmente iniciam com a validação do processo realizando, quando possível, estudos a partir da estrutura cristalográfica do complexo, processo este denominado *redocking*. Inicialmente remove-se o ligante da estrutura cristalográfica. Toma-se o receptor e o ligante e realiza-se o *docking*, com o intuito de reproduzir a orientação e conformação cristalográfica. Em termos de precisão de *docking*, um desvio quadrático médio (rmsd) de 1,0 – 3,0 Å entre a estrutura cristalográfica e o complexo virtual pode ser geralmente considerado um cálculo de *docking* realizado com sucesso e cuja metodologia está validada (Erickson et al., 2004).

1.8.1 Algoritmos de *Docking*

O algoritmo de *docking* pode ser dividido de acordo com a flexibilidade molecular gerada no cálculo de *docking*: ambos proteína e ligante são rígidos, ligante flexível e proteína rígida e proteína e ligante flexíveis (Jones e Willett, 1995a).

Um bom algoritmo de busca deve explorar exhaustivamente todas as formas de ligação entre ligante e receptor. As principais técnicas para este método disponíveis atualmente são: mecânica molecular, método de Monte Carlo, algoritmo genético, método baseado em fragmentos (*fragment-based method*), método de complementaridade de pontos, método da distância geométrica, entre outros (Taylor et al., 2002). O método utilizado no presente trabalho é o de algoritmo genético.

1.8.2 Algoritmo Genético

O algoritmo genético (AG) também tem sido utilizado como uma ferramenta de otimização. Neste método, é necessária a geração de uma população inicial. A essência dos AG está na evolução da população através de operações genéticas tais como mutações, crossover e migrações de modo que se obtenha uma população final, otimizada e adequada à situação pré-definida. Graus de liberdade são codificados em genes ou em uma seqüência binária e a coleção de genes, ou cromossomos, é atribuída a uma adequação baseado em uma função score (Taylor et al., 2002).

A estrutura básica de um AG está apresentada na forma de fluxograma na Figura 1.7.

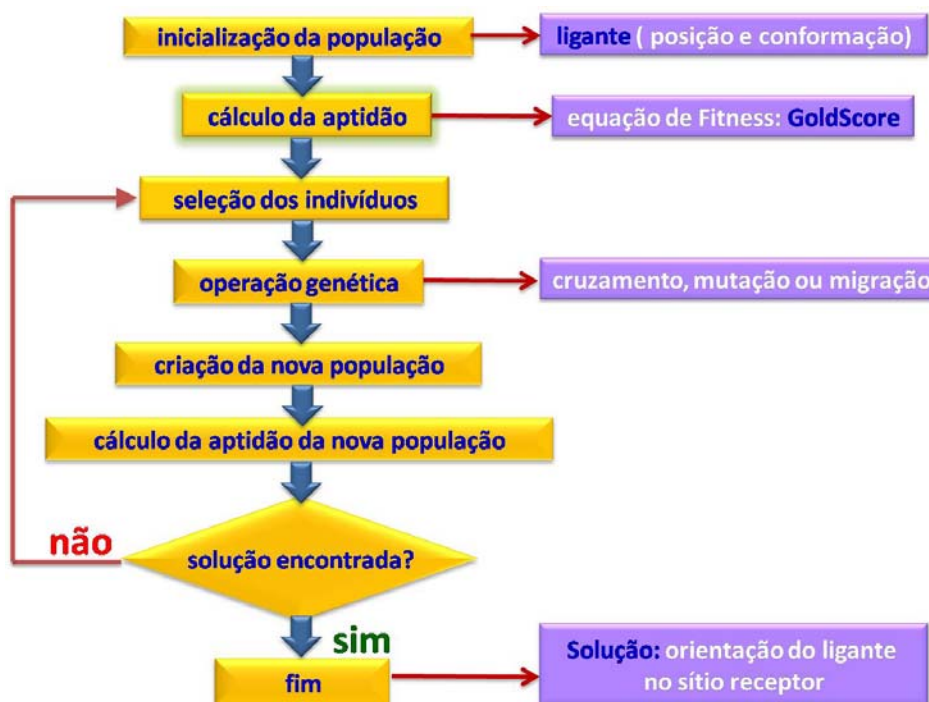


Figura 1.8. Fluxograma de um AG básico (adaptado de Miranda, 2000).

1.9 Programa GOLD

O programa GOLD (**G**enetic **O**ptimisation for **L**igand **D**ocking) (Jones et al., 1995, 1997) é um programa baseado em algoritmo genético, que realiza cálculos de *docking* permitindo a flexibilização dos ligantes.

O programa GOLD utiliza um algoritmo genético na busca de uma população de possíveis soluções utilizando operadores genéticos (mutações, *crossovers* e migrações) para obter uma população final, trabalhando com a otimização de uma função *Fitness* pré-definida, o GoldScore ou o ChemScore. O uso desta função *Fitness* permite que o *docking* seja realizado com flexibilização dos ligantes e das hidroxilas da macromolécula. Desta forma, o programa GOLD opera com um método de ajuste do ligante ao sítio, considerando os aspectos conformacional e de energia do ligante e da macromolécula. A função pré-definida compreende quatro componentes (Jones et al., 1995, 1997):

- (a) energia de ligação de hidrogênio do complexo receptor-ligante;
- (b) energia de ligação de van der Waals;
- (c) energia de ligação de hidrogênio intramolecular do ligante;
- (d) energia de van der Waals interna do ligante

O programa realiza uma seleção interna dos resultados do *docking* com base na função *Fitness* e no escore escolhido (GoldScore ou ChemScore). Os cálculos de *docking* em geral estão planejados para obter 10 saídas em cada etapa de cálculo. Porém pode ser alterado para obtenção de mais ou menos saídas. Quando fornece menos saídas que o solicitado, é porque o valor de RMSD – o desvio médio quadrático, do inglês *root mean square deviation*, entre os ligantes é muito pequeno, de forma que o programa considera que as saídas são iguais.

A função escore utilizada, **GoldScore**, baseada em campo de força e é constituída de quatro componentes:

- S(hb_ext): energia de ligação de hidrogênio entre do complexo proteína-ligante;
- S(vdw_ext)): energia de van der Waals entre proteína-ligante;
- S(vdw_int): energia de van der Waals no ligante;
- S(hb_int): energia de ligação de hidrogênio intramolecular do ligante.

O escore vdw_ext é multiplicado por um fator de 1,375 quando o escore total é calculado. Isto é uma correção empírica para induzir a proteína-ligante ao contato hidrofóbico. O resultado final é fornecido em kcal/mol (Annamala, Inampudi, Guruprasad, 2007).

$$Fitness = S(hb_ext) + 1.3750 * S(vdw_ext) + S(hb_int) + S(vdw_int)$$

O campo de força (mecânica molecular) utilizado no programa GOLD é o Tripos **5.2** Force Field (Clark, Cramer, van Opdenbosch, 1989).

Cada complexo é calculado utilizando uma população inicial de 500 indivíduos dividido em cinco sub-populações iguais, e com a migração de cromossomos individuais entre as sub-populações. Em um único cálculo de AG utiliza-se 100000 operações genéticas (Taylor et al., 2002).

2 Objetivos

Os objetivos fundamentais desta dissertação são :

- Determinação de estruturas cristalinas e moleculares de compostos de telúrio (IV), da família das telurooxetanas;
- Estudos dos arranjos supramoleculares e dos poliedros de coordenação do Te(IV) nas estruturas estudadas.
- Estudos da formação de complexos ligante-enzima (“*docking*”) destes compostos com a Catepsina B humana.

3 Procedimento Experimental

No estudo dos compostos de telúrio, nos casos em que foi possível a obtenção de cristais (Figura 3.1), as estruturas foram determinadas por difração de raio X; quando não, a estrutura foi modelada (Figura 3.2).

A enzima catepsina B, de código pdb 1gmy, foi avaliada, para determinação de parâmetros a serem adotados nos cálculos de docking. O primeiro passo foi o redocking, conforme descrito na Seção 3.6., para a validação dos parâmetros escolhidos.

Finalmente, os cálculos de docking foram realizados com os ligantes descritos na primeira parte, e são apresentados os resultados obtidos dessa simulação computacional.

3.1 Determinação das estruturas cristalográficas

Os compostos foram sintetizados pelo Prof. Rodrigo L.O.R. Cunha (UFABC), no laboratório do Prof. João V. Comasseto do Instituto de Química da USP (Cunha et al, 2005).

O cristal foi montado no difratômetro CAD-4 e as intensidades dos feixes difratados foram medidas usando-se a técnica de varredura $\theta - 2\theta$ com a radiação $K\alpha$ do Molibdênio ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) monocromatizada por cristal de grafite.

As estruturas cristalográficas dos compostos (1) e (2) (Figura 3.1) foram resolvidas por métodos diretos (Altomare et al., 1993) e refinadas por mínimos quadrados com a matriz completa de F^2 utilizando-se o programa SHELXL 97 (Sheldrick, 1998).

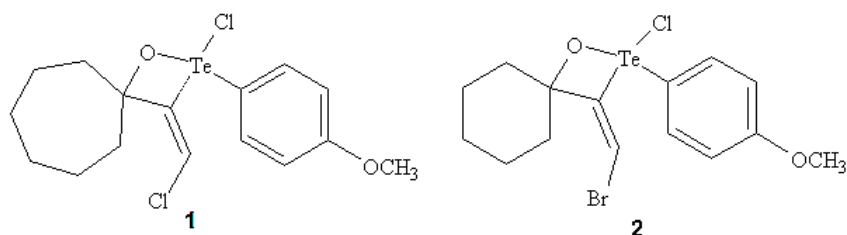


Figura 3.1 Cloro-telurooxetana (1) e bromo-cloro-telurooxetana (2).

3.2. Modelagem Molecular de uma Telurooxetana

A terceira estrutura desta família foi obtida a partir da modelagem molecular utilizando-se o método DFT e base de cálculo B3LYP/Ahlichs + HW-ECP (Vega-Teijido et al., 2004) com o programa GAUSSIAN98 (Frisch et al., 1998), tendo como ponto de partida estruturas cristalográficas depositadas no Cambridge Structural Database (CSD).

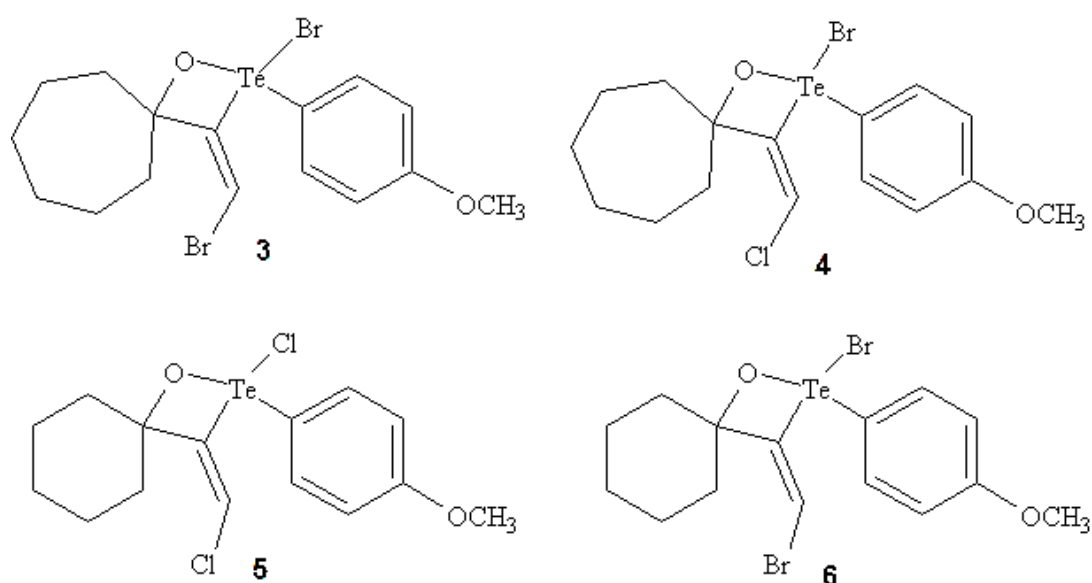


Figura 3.2 Telurooxetanas obtidas a partir de modelagem molecular

3.3. Posicionamento dos Hidrogênios

As posições dos hidrogênios, tanto para as estruturas cristalográficas quanto para a modelada, foram otimizadas utilizando-se o método descrito por Vega-Teijido e colaboradores (2004).

3.4. Preparação do ligante

O estudo de *docking* exige o conhecimento das coordenadas estruturais dos ligantes, que neste caso foram obtidas dos dados cristalográficos para (1) e (2) e por modelagem molecular para (3).

As estruturas, tanto cristalográficas quanto a modelada, foram levadas ao formato mol2 que é o utilizado pelo programa GOLD.

3.5. Preparação da macromolécula – Catepsina B.

As coordenadas cristalográficas da catepsina B (cat B) humana foram obtidas no Protein Data Bank (pdb), com código 1gmy. A estrutura foi determinada com 2.15 Å de resolução. A unidade assimétrica deste cristal contém 3 moléculas independentes complexadas com seus respectivos inibidores. Dois destes complexos estão em contato um com o outro o que leva a algumas preocupações em utilizá-los para o estudo de *docking* já que o empacotamento do cristal pode influenciar na ligação do inibidor (Greenspan et al, 2001). Entretanto, o terceiro complexo enzima-inibidor cristalizado está “isolado” podendo ser utilizado para o estudo, já que do ponto de vista funcional a molécula é um monômero.

Assim, para o presente estudo foi considerada a cadeia C que está complexada com dipeptidil nitrila (Figura 3.3.). O complexo é apresentado na Figura 3.4.

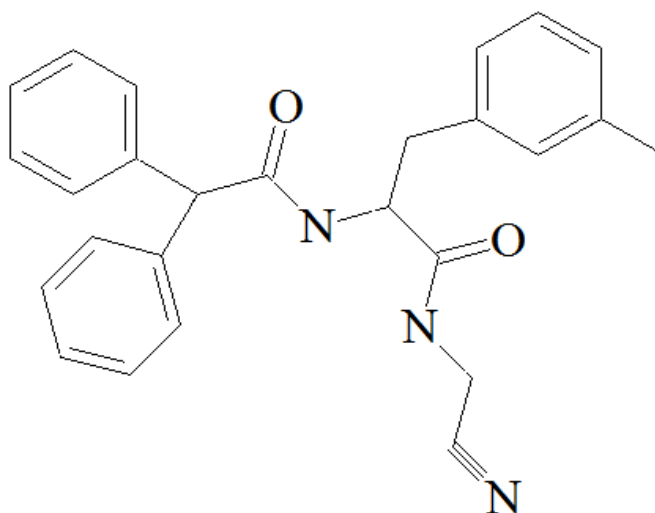


Figura 3.3 Inibidor dipeptidil nitrila complexado com a Catepsina B 1gmy

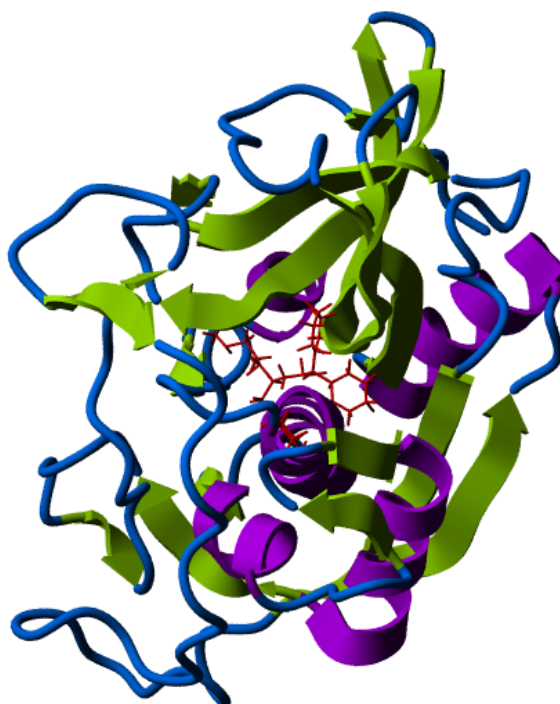


Figura 3.4 Complexo cristalográfico 1gmy da Catepsina B humana com dipeptidil nitrila

Na preparação do arquivo de entrada da macromolécula, as moléculas de água, presentes no arquivo depositado no PDB, foram removidas, uma vez que não foram observadas interações entre o ligante e a enzima. Como as coordenadas cristalográficas obtidas do PDB não contém hidrogênios, então é necessário

adicioná-los levando-se em consideração a protonação dos resíduos presentes no sítio ativo. Assim, a CatB na sua forma ativa tem o enxofre da Cys29 desprotonado, ou seja, na forma S^- e a His199 encontra-se protonada. Para adicioná-los, foi utilizada a subrotina *addprh* do programa DOCK 3.5 (Kuntz et al., 1982).

A molécula foi salva em formato mol2, arquivo de entrada do programa, e que permite caracterizar o tipo de átomo utilizado como doador ou acceptor de hidrogênios.

3.6. Cálculos de *docking* de compostos de Telúrio em Catepsina B.

Primeiramente, fez-se a validação da metodologia realizando o *docking* da molécula dipeptidil nitrila retirada da estrutura cristalográfica depositada no PDB; para isso, foi necessária a alteração de suas coordenadas de modo que o ligante se posicionasse em outro local antes do cálculo de *docking*, e que, após o cálculo, retornasse à mesma orientação que tinha no cristal (Figura 3.5). Validado o método iniciaram-se os cálculos com os ligantes de telúrio.

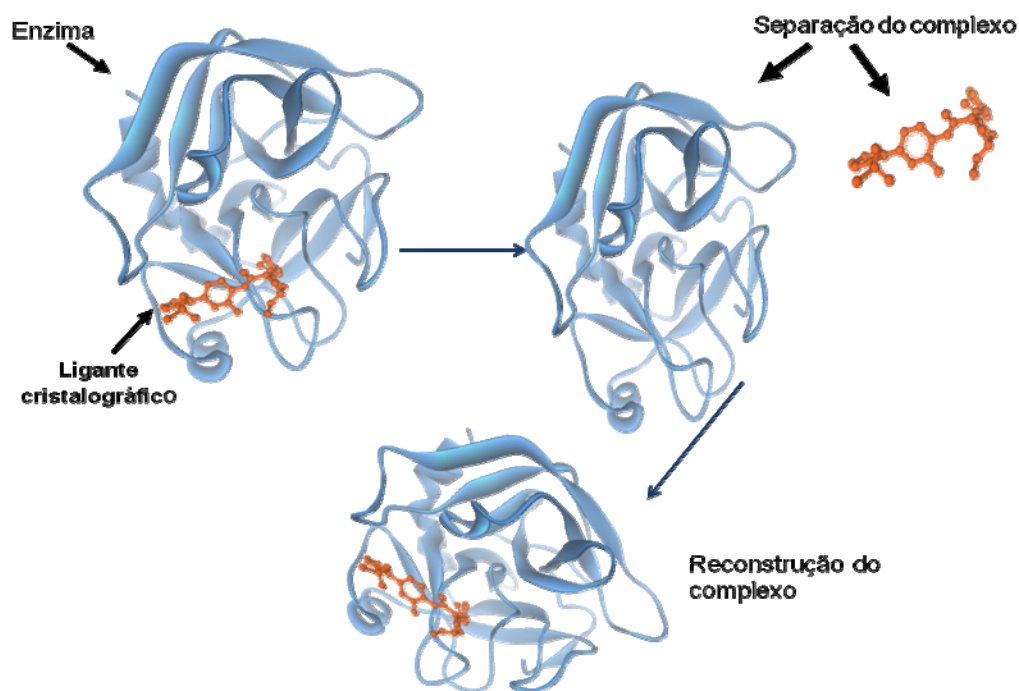


Figura 3.5. Validação do estudo de *docking* a partir da mudança das coordenadas do ligante cristalográfico (dipeptidil nitrila) que após o cálculo de *docking* retorna à sua posição inicial.

Para os cálculos de docking definiu-se um raio de 10 Å para a esfera de trabalho, ao redor da Cys29 como sítio receptor do ligante.

Posteriormente faz-se uma análise em tela gráfica observando-se as orientações dos ligantes obtidas através de cálculos, bem como das interações entre átomos dos ligantes e do receptor, selecionando-se então a orientação mais favorável para a formação do complexo.

De acordo com dados experimentais, a enzima se liga covalentemente às telurooxetanas (Cunha et al., 2005) de forma que o estudo de *docking* buscou avaliar as interações existentes entre o ligante e a proteína para promover a formação do complexo covalente entre a Cys29 e o telúrio dos ligantes. Desta forma, primeiramente, o *docking* foi executado com os ligantes neutros; em seguida, o halogênio ligado ao átomo de telúrio foi removido e um segundo cálculo de *docking* foi executado a partir da posição obtida anteriormente.

Os complexos com a mesma orientação foram agrupados e o grupo contendo a maior percentagem de repetições e melhores escores, foi selecionado. Para análise e seleção do complexo representativo de cada grupo utilizou-se o programa gráfico O (Jones, 1978, 1991) de forma a avaliar as interações entre o receptor e o ligante.

3.6.1. Visualização Gráfica.

Utiliza-se a visualização gráfica em cada passo do trabalho. Na escolha do receptor, na análise das estruturas cristalográficas envolvidas no trabalho (complexos, receptores e ligantes), na escolha do sítio receptor e na análise dos resultados dos cálculos de *docking*.

Os programas de *docking* geram muitas saídas. Cabe ao pesquisador através da investigação visual, determinar a validade ou não dos resultados. Em geral, o primeiro passo é o de verificar quantas saídas de um mesmo cálculo são iguais ou diferentes quanto à sua orientação e/ou conformação, separar em grupos por similaridades de orientação, analisar as interações receptor-ligante, verificar quais são as interações, se são desejáveis ou não. A partir disso cabe ao pesquisador decidir qual será a orientação escolhida.

Os programas gráficos utilizados para sistema Windows, todos tipo software livre, foram: programa “O” (Jones e Kjeldgaard, Jones, 1982); DS VISUALIZER™; VEGA ZZ 2.1.0 (Pedretti, Villa, Vistoli, 2002, 2003, 2004); MERCURY CSD 1.4.2 - Department of Chemistry of Cambridge University e Pymol (DeLano W. 2004) .

4 Resultados e discussão

As estruturas foram resolvidas por métodos diretos (SIR92, Altomare et al. 1993) e refinadas com matriz completa (SHELXL, Sheldrick, 1997). Os cálculos geométricos e as projeções gráficas foram feitas utilizando-se os programas WinGX (Farrugia, 1999), ORTEP3 (Farrugia, 1997) e POVRay™.

4.1 Determinação das Estruturas Cristalográficas

4.1.1 Composto (1) : (3E)-2-cloro-3-(cloromethylidene)-2-(4-metoxifenil)-1-oxa-2 λ^4 -telluraspino [3,6]decano.

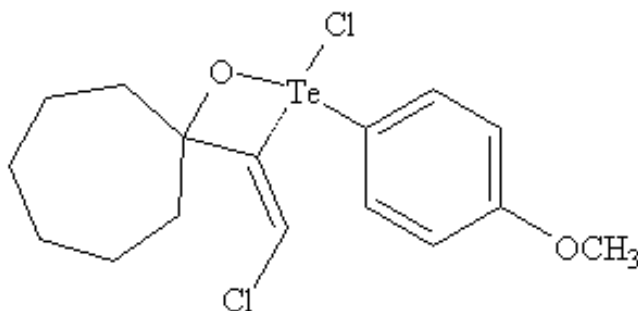


Figura 4.1 Estrutura da cloro-telurooxetana (1)

A síntese e origem do composto **1** estão descritas no artigo de Rodrigo L.O.R. Cunha et al. (2004), a Figura 4.2 mostra a projeção do composto.

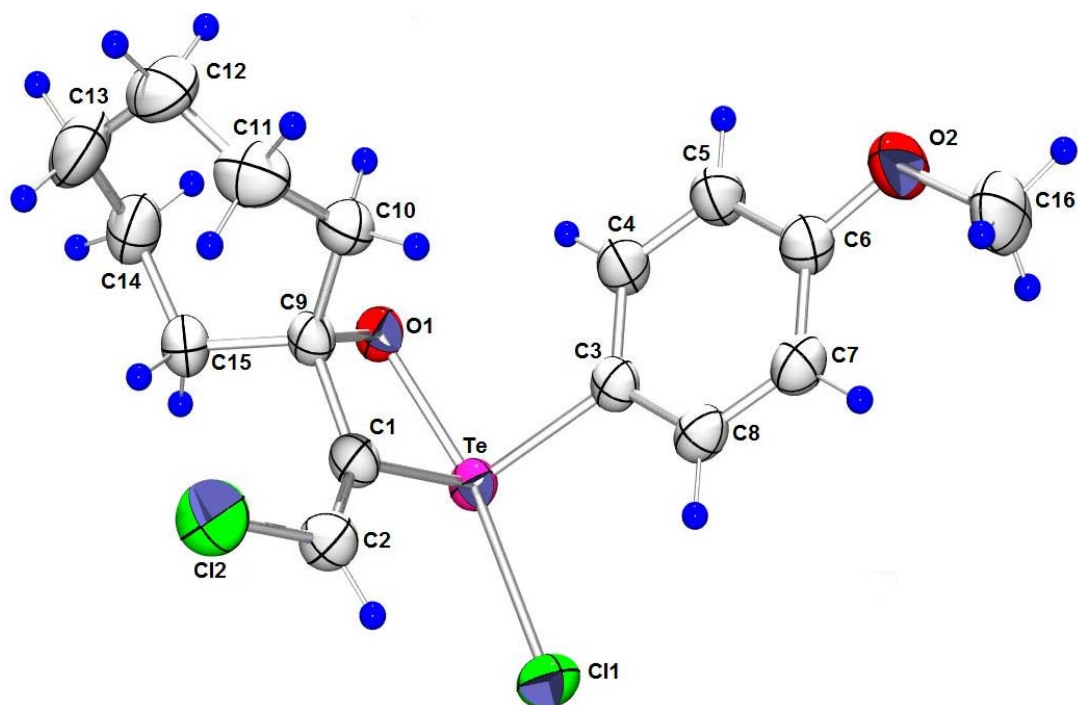


Figura 4.2. Projeção da cloro-telurooxetana com anel de sete membros (1) com os átomos identificados.

O Te^{IV} apresenta uma configuração primária de pseudo-bipirâmide trigonal formada por quatro ligações, sendo duas com átomos de carbono, uma com o átomo de cloro e uma com o átomo de oxigênio e uma par de elétrons isolados. Os átomos C1, C3 juntamente com o par de elétrons ocupam a posição equatorial enquanto os átomos Cl1 e O1 estão em posição axial; estes dados estão em total concordância com a Teoria de Repulsão dos Pares Eletrônicos de Valência (VSPER: Gillespie, 1972).

Uma análise detalhada mostrou que as interações secundárias levam o composto a formar dímero centrossimétricos (Figura 4.3).

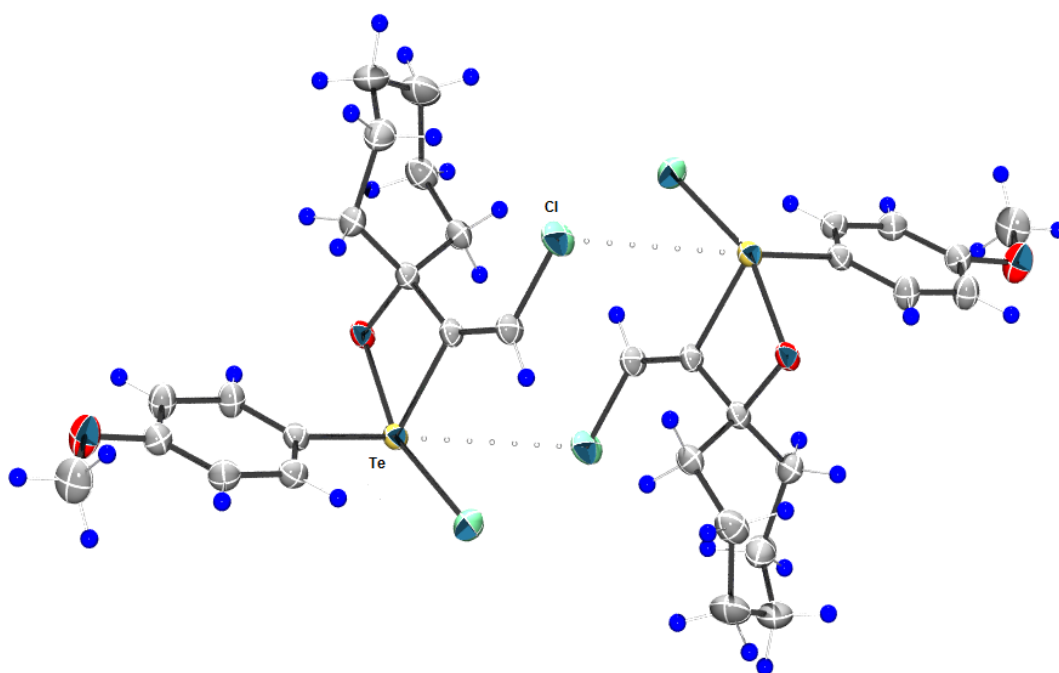


Figura 4.3. Dímero centrossimétrico da cloro-telurooxetana.

Esta interação juntamente com outras apresentadas na Tabela 2, unem 4 moléculas formando o synthon (Figura 4.4). A translação supramolecular ocorre ao longo do eixo z.

Tabela 4.1 Interações secundárias da cloro-telurooxetana.

D...A	H...A	D-H...A	Op. simetria
C10...O2 3,677(6)	H10...O2 2,75	C10-H10A...O 161	-x+2,-y,-z+1
C4...O1 3,397(4)	H4...O1 2,83	C4-H4...O1 120	-x+1,-y,-z+1
Te...Cl1 3,849(4)			2-x,-y,1-z

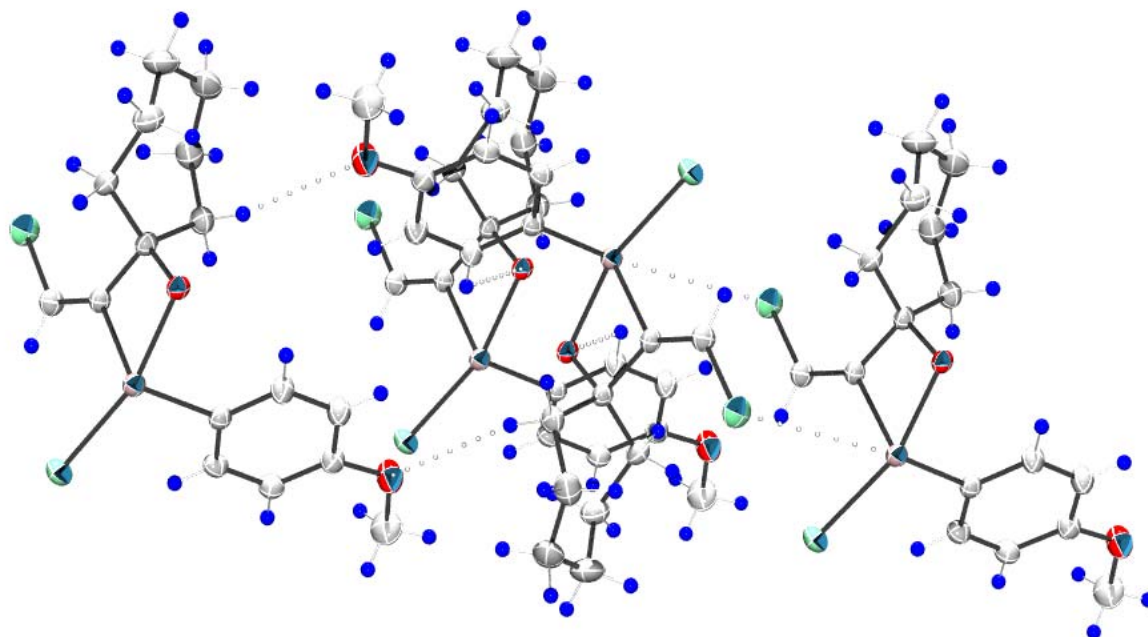


Figura 4.4 Synthron da cloro-telurooxetana (1)

Mas é bem conhecido o fato do Te(IV) fazer interações secundárias (Zukerman & Haiduc, 2001). Neste caso o telúrio faz duas ligação secundárias com átomos de oxigênio e de cloro de moléculas vizinhas, de forma que levando-se em consideração estas interações a coordenação pode ser descrita como uma pseudo-bipirâmide pentagonal, onde os átomos Cl1' e C3 ocupam a posição axial, os átomos, Cl2, C1 e O1 e O1" ocupam a posição equatorial e na quinta posição encontra-se o par de elétrons isolados (Figura 4.5).

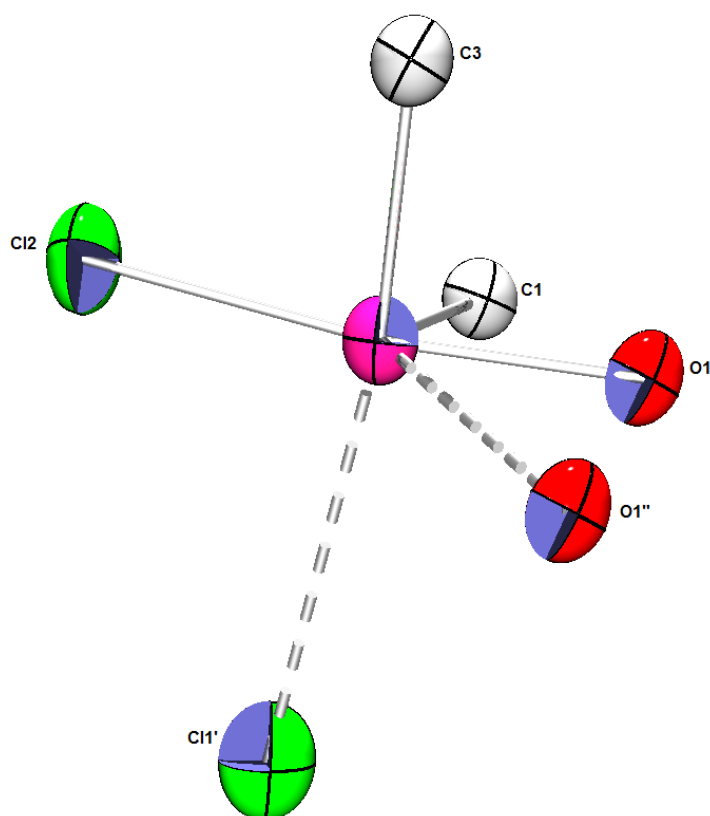


Figura 4.5 Poliedro de Coordenação em torno do átomo de Te, a base pentagonal é formada pelos átomos C1, Cl, O1, O1'', o espaço vazio entre Cl2 e O1'' corresponde ao sítio ocupado pelo par de elétrons isolados (1-x, -y, 1-z).

Um resumo dos dados cristalográficos e do refinamento pode ser encontrado na Tabela 4.2. Na Tabela 4.3 encontram-se as coordenadas fracionais dos átomos não-H, na Tabela 4.4 as distâncias e ângulos de ligação encontrados, na Tabela 4.5 parâmetros de deslocamento atômico anisotrópico e na Tabela 4.6 as coordenadas dos átomos de hidrogênio.

Tabela 4.2 Dados cristalográficos e de refinamento da telurooxetana (1)

Fórmula empírica	$C_{16}H_{20}Cl_2O_2Te$
Peso fórmula	442,82
Temperatura	293,2
$\lambda(MoK_{\alpha})$	0,71073Å
Sistema cristalino	monoclínico
Grupo espacial	$P2_1/a$
Dimensões da cela unitária	$a = 9,3921(6) \text{ \AA}$ $b = 21,026(7) \text{ \AA}$ $c = 9,447(8) \text{ \AA}$ $\beta = 111,62(6)^\circ$
Volume	$1734,4(5) \text{ \AA}^3$
Z	4
Densidade (calculada)	$1,9281 \text{ Mg/m}^3$
Coefficiente de absorção (μ)	$2,597 \text{ mm}^{-1}$
Varredura	$\omega/2\theta$
F(000)	872
Tamanho do cristal	0,20x0,20x0,10 mm
$\theta_{min}, \theta_{max}$	$2,3^\circ, 30^\circ$
Variação dos índices	$-13 \leq h \leq 12$ $0 \leq k \leq 29$ $0 \leq l \leq 13$
Reflexões Coletadas	5313
Reflexões independentes	5031 [R(int) = 0,015]
Reflexões observadas	
$[I \geq 2\sigma(I)]$	4036
Dados/restrições/parâmetros	5031/0/191
Índice R final $[I \geq 2\sigma(I)]$	$R1 = 0,030, wR2 = 0,0104$
Índice R (todos os dados)	$R1 = 0,049, wR2 = 0,120$
Máx. e mín. $\Delta\rho$ final	0,971; -0,984(e/Å ³)

Tabela 4.3 Coordenadas atômicas fracionárias e fatores de deslocamentos atômicos isotrópicos equivalentes do Composto (1).

Átomo	x	y	z	U(eq)
Te	0,55547 (2)	-0,06547 (1)	0,68442 (2)	0,03623(9)
C11	0,76995 (13)	0,02964 (5)	1,17175 (9)	0,0617(3)
C12	0,57529 (12)	0,16113 (4)	0,85752 (11)	0,0551(2)
O1	0,58650 (25)	0,02630 (10)	0,63149 (22)	0,0381(4)
O2	1,11542 (33)	0,15041 (15)	0,52181 (37)	0,0637(7)
C1	0,66111 (32)	-0,00753 (15)	0,87700 (31)	0,0364(6)
C2	0,69378 (38)	0,02303 (16)	1,02059 (35)	0,0435(6)
C3	0,75079 (34)	0,09638 (14)	0,63976 (32)	0,0369(6)
C4	0,79179 (44)	0,06196 (15)	0,53516 (43)	0,0462(7)
C5	0,91335 (42)	0,08174 (18)	0,49688 (43)	0,0488(8)
C6	0,99694 (38)	0,13573 (16)	0,56624 (36)	0,0436(7)
C7	0,95777 (39)	0,16903 (16)	0,67299 (40)	0,0453(7)
C8	0,83558 (37)	0,14917 (14)	0,70905 (36)	0,0417(6)
C9	0,66649 (34)	0,05135 (14)	0,78521 (33)	0,0358(5)
C10	0,82864 (41)	0,06907 (16)	0,79837 (47)	0,0478(8)
C11	0,91194 (47)	0,12016 (22)	0,91591 (45)	0,0621(10)
C12	0,87015 (59)	0,18775 (22)	0,85809 (60)	0,0739(13)
C13	0,71237 (65)	0,21069 (21)	0,83404 (64)	0,0817(15)
C14	0,57954 (49)	0,16883 (18)	0,73626 (50)	0,0581(9)
C15	0,56973 (38)	0,10579 (15)	0,81171 (39)	0,0434(7)
C16	1,19807 (51)	- 0,20717 (23)	0,58169 (57)	0,0717(12)

Tabela 4. 4 Distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação do Composto (1).

Cl(1) - C(2)	1,739(3)		
C(16) - O(2)	1,422(5)		
C(11) - C(12)	1,521(7)		
C(11) - C(10)	1,536(5)		
C(2) - C(1)	1,317(4)		
C(12) - C(13)	1,494(7)		
C(7) - C(8)	1,377(5)		
C(7) - C(6)	1,384(5)		
O(2) - C(6)	1,362(4)		
C(10) - C(9)	1,528(4)		
C(13) - C(14)	1,528(6)		
C(8) - C(3)	1,382(4)		
C(1) - C(9)	1,523(4)		
C(1) - Te	2,109(3)		
C(6) - C(5)	1,398(5)		
Cl(2) - Te	2,5555(9)		
C(9) - O(1)	1,465(3)		
C(9) - C(15)	1,538(4)		
C(15) - C(14)	1,524(5)		
C(3) - C(4)	1,389(4)		
C(3) - Te	2,130(3)		
C(5) - C(4)	1,383(5)		
Te - O(1)	2,041(2)		
C(12) - C(11) - C(10)	113,5(3)	C(1) - C(9) - C(15)	111,5(2)
C(10) - C(9) - C(15)	115,9(3)	C(1) - C(2) - Cl(1)	123,9(3)
C(14) - C(15) - C(1)	115,5(3)	C(13) - C(12) - C(11)	117,8(4)
C(8) - C(3) - C(4)	119,5(3)	C(6) - O(2) - C(16)	117,1(3)
C(8) - C(3) - Te	122,6(2)	C(9) - C(10) - C(11)	117,2(3)
C(4) - C(3) - Te	117,8(2)	C(12) - C(13) - C(14)	116,7(4)
C(4) - C(5) - C(6)	119,8(3)	C(7) - C(8) - C(3)	120,9(3)
C(15) - C(14) - C(13)	113,3(4)	C(2) - C(1) - C(9)	138,0(3)
C(5) - C(4) - C(3)	120,1(3)	C(2) - C(1) - Te	127,1(2)
O(1) - Te - C(1)	66,49(10)	C(9) - C(1) - Te	94,71(17)
O(1) - Te - C(3)	91,65(10)	O(2) - C(6) - C(7)	125,2(3)
C(1) - Te - C(3)	100,45(11)	O(2) - C(6) - C(5)	114,9(3)
O(1) - Te - Cl(2)	156,58(6)	C(7) - C(6) - C(5)	119,9(3)
C(1) - Te - Cl(2)	90,14(8)	O(1) - C(9) - C(1)	99,2(2)
C(3) - Te - Cl(2)	91,24(8)	O(1) - C(9) - C(10)	107,5(2)
C(9) - O(1) - Te	99,46(16)	C(1) - C(9) - C(10)	113,2(3)
C(8) - C(7) - C(6)	119,8(3)	O(1) - C(9) - C(15)	108,1(2)

Tabela 4.5 Fatores de deslocamentos atômicos anisotrópicos do composto (1).

	U11	U22	U33	U23	U13	U12
Te	0,04148(13)	0,03497(13)	0,03169(12)	-0,00214(6)	0,01283(9)	-0,00222(7)
C11	0,0815(6)	0,0669(6)	0,0287(3)	-0,0049(3)	0,0109(4)	-0,0093(5)
C12	0,086(3)	0,062(2)	0,079(3)	-0,022(2)	0,037(3)	-0,035(2)
O1	0,0510(12)	0,0366(1)	0,0259(9)	-0,0005(8)	0,0131(8)	0,0019(9)
O2	0,0597(1)	0,0636(2)	0,079(2)	0,0201(1)	0,0391(1)	0,0210(1)
C1	0,0395(14)	0,0409(14)	0,0289(12)	-0,0011(10)	0,0128(11)	-0,0002(11)
C2	0,0506(17)	0,0453(16)	0,0322(14)	0,0018(12)	0,0126(12)	-0,0008(13)
C3	0,0418(14)	0,0368(14)	0,0312(13)	-0,0023(10)	0,0123(11)	0,0003(11)
C4	0,0530(19)	0,0466(18)	0,0426(17)	0,0122(12)	0,0219(15)	0,0133(13)
C5	0,0539(19)	0,0491(17)	0,0493(19)	0,0105(15)	0,0259(16)	0,0105(15)
C6	0,0453(16)	0,0443(16)	0,0405(15)	0,0022(13)	0,0150(13)	0,0040(13)
C7	0,0475(16)	0,0378(15)	0,0486(18)	0,0050(13)	0,0152(14)	0,0045(13)
C8	0,0491(16)	0,0354(14)	0,0384(15)	0,0045(11)	0,0136(13)	0,0014(12)
C9	0,0406(14)	0,0369(13)	0,0297(12)	-0,0022(10)	0,0129(11)	0,0009(11)
C10	0,0452(18)	0,0505(19)	0,052(2)	-0,0024(14)	0,0225(15)	-0,0039(13)
C11	0,058(2)	0,078(3)	0,048(2)	-0,0096(18)	0,0159(17)	-0,023(2)
C12	0,086(3)	0,062(2)	0,079(3)	-0,022(2)	0,037(3)	-0,035(2)
C13	0,116(4)	0,041(2)	0,093(4)	-0,015(2)	0,044(3)	-0,013(2)
C14	0,073(2)	0,0450(19)	0,054(2)	-0,0011(16)	0,0209(2)	0,0078(2)
C15	0,0464(2)	0,0413(2)	0,0443(2)	-0,0047(12)	0,0188(13)	0,0047(12)
C16	0,062(2)	0,070(3)	0,085(3)	0,015(2)	0,030(2)	0,029(2)

Tabela 4.6 Coordenadas fracionárias dos átomos de hidrogênio do composto (1).

	x	y	z	U(eq)
H2	0,6750	-0,0646	1,0425	0,052
H4	0,7374	-0,0256	0,4908	0,055
H5	0,9395	-0,0592	0,4252	0,059
H7	1,0138	-0,2047	0,7202	0,054
H8	0,8097	-0,1716	0,7810	0,050
H10a	0,8240	0,0835	0,6992	0,057
H10b	0,8905	0,0308	0,8226	0,050
H11a	0,8876	0,1142	1,0063	0,075
H11b	1,0215	0,1145	0,9450	0,075
H12a	0,9425	0,2163	0,9296	0,089
H12b	0,8849	0,1916	0,7621	0,089
H13a	0,6997	0,2525	0,7875	0,098
H13b	0,7046	0,2157	0,9330	0,098
H14a	0,4843	0,1919	0,7144	0,070
H14b	0,5911	0,1603	0,6401	0,070
H15a	0,4635	0,0924	0,7747	0,052
H15b	0,6015	0,1128	0,9205	0,052
H16a	1,2486	-0,2032	0,6900	0,108
H16b	1,2730	-0,2142	0,5364	0,108
H16c	1,1284	-0,2425	0,5591	0,108

4.1.2 Composto (2): (3E)-2-cloro-3-(clorometilidene)-2 λ^4 - 4-telluraspino[3,5]nonano

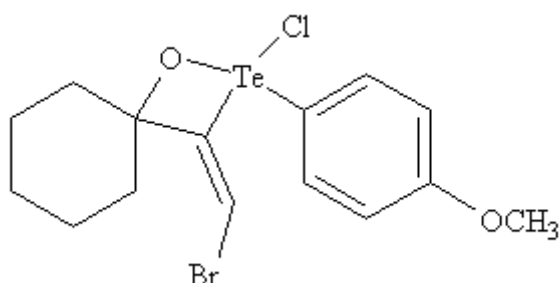


Fig. 4.6 Estrutura da bromo-cloro-telurooxetana

A síntese e origem do composto (2) estão descritas no artigo de Rodrigo L.O.R. Cunha et al (2004), a Figura 4.7 mostra a projeção do composto.

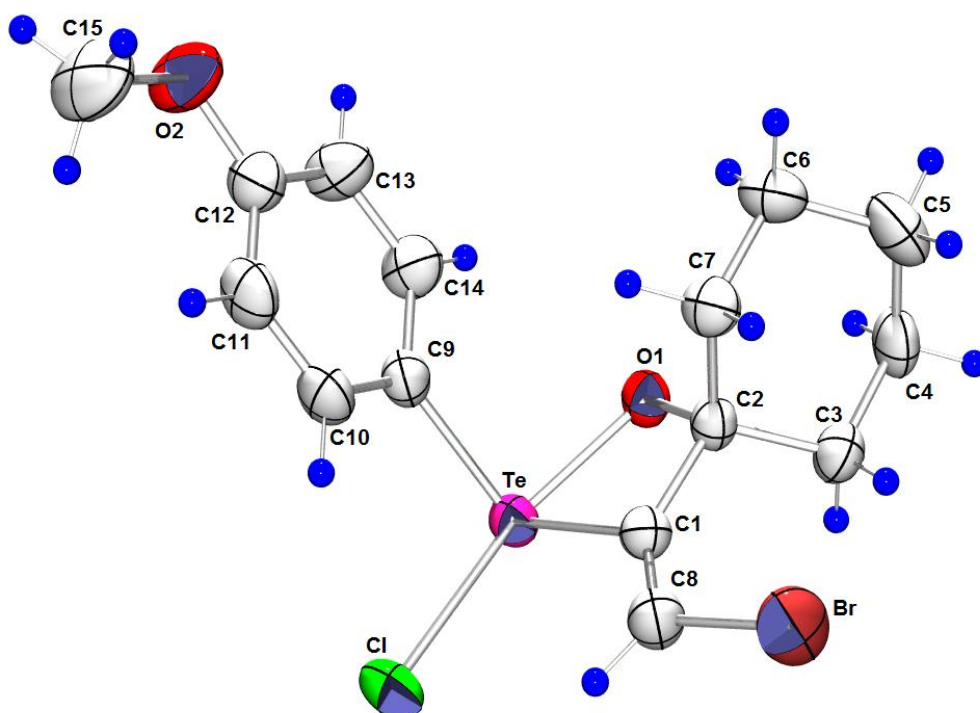


Figura 4.7 Projeção da bromo-cloro-telurooxetana com os átomos numerados.

A análise da estrutura primária da molécula permite concluir que a coordenação ao redor do átomo de Te^{IV} é, como no caso anterior, uma pseudo-bipirâmide trigonal com os átomos C1, C9 juntamente com o par de elétrons em posição equatorial e os átomos Cl e O1 em posição axial.

A análise da química supramolecular da bromo-cloro-telurooxetana mostra que esta se arranja em dímeros centrossimétricos, onde o synthon (Figura 4.8) é formado por quatro moléculas relacionadas pelas interações secundárias do Te com um átomo de bromo ($\text{Te}\dots\text{Br}^{\text{i}} = 3,918 \text{ \AA}$; $i = 1-x, -y, 1-z$) de uma molécula vizinha e com um átomo de oxigênio de outra molécula ($\text{Te}\dots\text{O}^{\text{ii}} = 2,908 \text{ \AA}$; $ii = 1-x, 2-y, 2-z$).

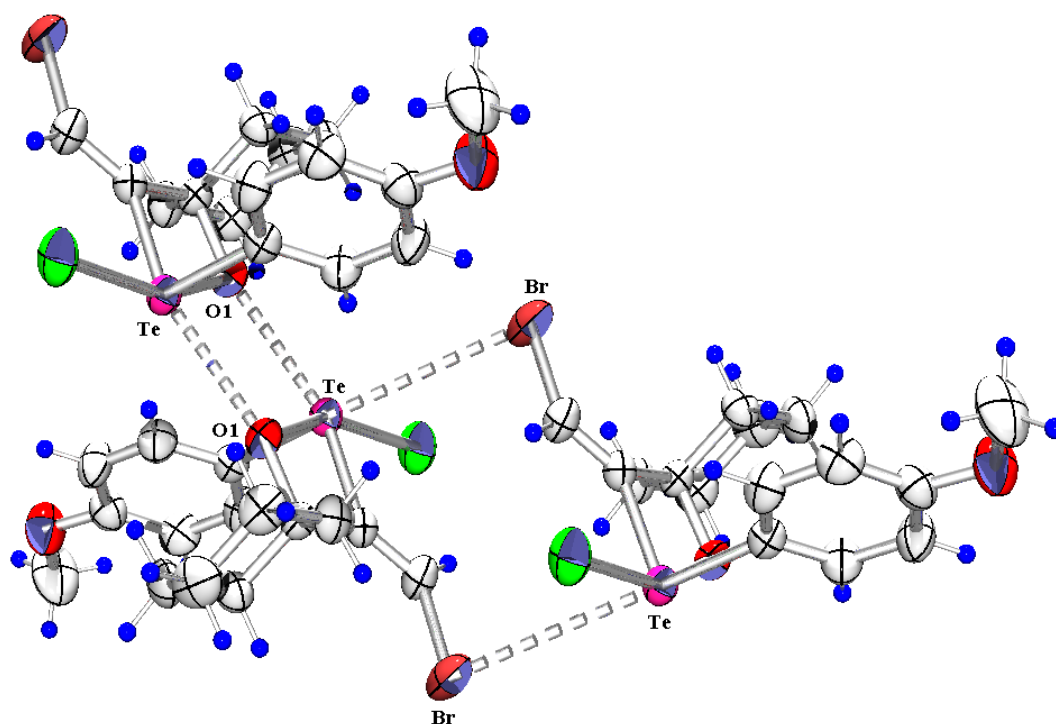


Figura 4.8 Synthon da bromo-cloro-telurooxetana

Novamente a coordenação em torno do átomo de Telúrio deve ser interpretada levando em consideração as interações secundárias, de forma que apresenta geometria de pseudo-bipirâmide de base pentagonal com o átomo C(9) e Br' em posição axial e os átomos C1, Cl, O1 e O1' juntamente com o par de elétrons

isolados em posição equatorial.

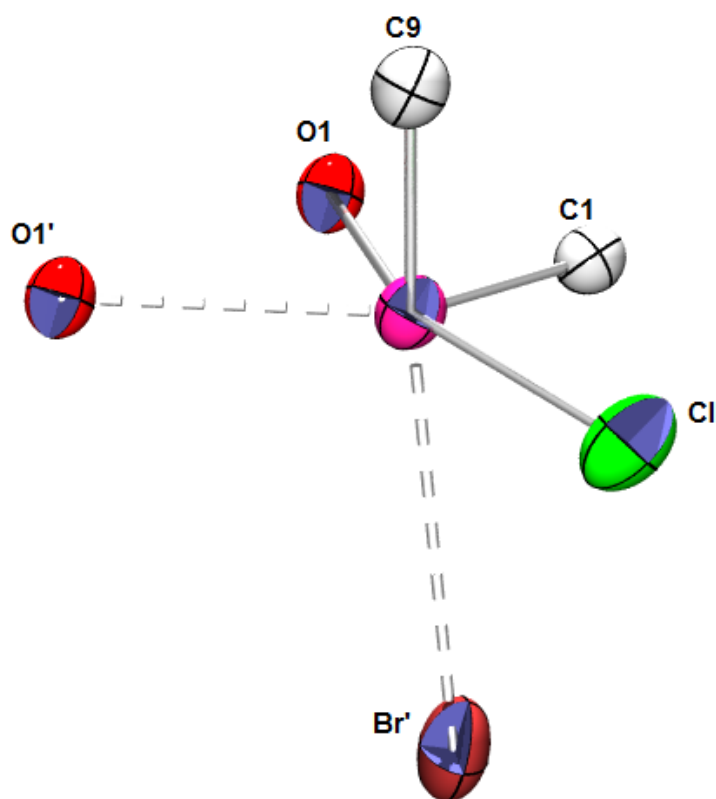


Figura 4.9 Poliedro de coordenação em torno do átomo de Te, a base pentagonal é formada pelos átomos C1,Cl, O1, O1' e o par de elétrons isolados (op. simetria: $-x, -y, 1-z$)

Um resumo dos dados cristalográficos e do refinamento pode ser encontrado na Tabela 4.7. Na Tabela 4.8 encontram-se as coordenadas fracionais dos átomos não-H, na Tabela 4.9 as distâncias e ângulos de ligação encontrados, na Tabela 4.10 parâmetros de deslocamento atômico anisotrópicos e na Tabela 4.11 as coordenadas dos átomos de hidrogênio.

Tabela 4.7 Dados cristalográficos e de refinamento da bromo-cloro- telurooxetana (2)	
Fórmula empírica	C ₁₅ H ₁₈ ClBrO ₂ Te
Peso fórmula	473,25
Temperatura	293,2 K
λ (MoK α)	0,71073Å
Sistema cristalino	triclínico
Grupo espacial	P $\bar{1}$
Dimensões da cela unitária	a=9,253(2) Å b=9,901(1) Å c=10,15(9) Å α =96,08(2)° β = 92,62(1)° γ = 116,37(1)°
Volume	824,68(3)Å ³
Z	2
Densidade Calculada	1,906 Mg/m ³
Coefficiente de absorção (μ)	4,386 mm ⁻¹
Varredura	$\omega/2\theta$
F(000)	456
Tamanho do cristal	0,20x0,20x0,10 mm
θ_{\min} , θ_{\max}	2,5°; 26°
Variação dos índices	-10 ≤ h ≤ 10 0 ≤ k ≤ 12 -12 ≤ l ≤ 12
Reflexões Coletadas	3503
Reflexões Independentes	3299 [R(int) = 0,014]
Reflexões Observadas	
[I≥2 σ (I)]	2847
Dados/Restrições/Parâmetros	3999/0/182
Índice R final [I≥2 σ (I)]	R1 = 0,024, wR2 = 0,086
Índice R (todos os dados)	R1 = 0,035 wR2 = 0,095
Máx. e mín. $\Delta\rho$ final	0,334; -0,550 (e/Å ³)

Tabela 4.8 Coordenadas atômicas fracionárias e fatores de deslocamentos atômicos isotrópicos equivalentes do Bromo-Cloro – Telurooxetana.

Átomo	x	y	z	U(eq)
Te	0,21000 (3)	0,06928 (2)	0,63491 (2)	375 (1)
Br	0,71457 (5)	0,29037 (6)	0,42970 (5)	637 (2)
C1	0,40901 (15)	0,10188 (14)	0,82929 (10)	591 (5)
O1	0,13576 (29)	0,09244 (27)	0,44838 (23)	390 (10)
O2	0,10240 (44)	0,61807 (35)	0,87690 (34)	681 (15)
C1	0,40158 (44)	0,16954 (38)	0,51715 (34)	374 (13)
C2	0,29389 (41)	0,17296 (37)	0,40279 (31)	341 (13)
C3	0,29929 (52)	0,08870 (45)	0,26974 (37)	462 (16)
C4	0,18462 (54)	0,09398 (47)	0,16096 (36)	504 (18)
C5	0,21912 (63)	0,25531 (56)	0,14683 (41)	637 (22)
C6	0,21293 (56)	0,34085 (49)	0,27880 (43)	541 (18)
C7	0,32757 (49)	0,33667 (40)	0,38876 (38)	443 (16)
C8	0,55410 (48)	0,20503 (46)	0,54590 (38)	462 (17)
C9	0,19024 (45)	0,26484 (41)	0,71926 (33)	393 (14)
C10	0,05810 (50)	0,28104 (44)	0,67214 (41)	503 (17)
C11	0,03161 (52)	0,40069 (46)	0,72762 (44)	543 (17)
C12	0,13955 (52)	0,50550 (43)	0,82930 (39)	477 (17)
C13	0,27462 (53)	0,49301 (48)	0,87391 (39)	509 (15)
C14	0,29876 (52)	0,37123 (48)	0,81907 (38)	493 (16)
C15	0,20919 (83)	0,73048 (60)	0,98087 (59)	893 (31)

Tabela 4.9 Distâncias (Å) e ângulos (°) de ligação do Bromo-cloro-telurooxetana.

Te - O(1)	2,056(2)		
Te - C(1)	2,108(4)		
Te - C(9)	2,120(4)		
Te - Cl	2,5296(10)		
Br - C(8)	1,889(4)		
O(1) - C(2)	1,447(4)		
O(2) - C(12)	1,355(5)		
C(12) - C(13)	1,371(6)		
O(2) - C(15)	1,418(5)		
C(12) - C(11)	1,378(5)		
C(13) - C(14)	1,386(6)		
C(3) - C(4)	1,518(5)		
C(3) - C(2)	1,526(4)		
C(2) - C(1)	1,509(5)		
C(2) - C(7)	1,533(5)		
C(7) - C(6)	1,522(5)		
C(14) - C(9)	1,508(6)		
C(8) - C(1)	1,304(6)		
C(5) - C(4)	1,508(6)		
C(5) - C(6)	1,526(6)		
C(11) - C(10)	1,382(5)		
C(9) - C(10)	1,374(5)		
O(1) - Te - C(1)	66,28(12)	O(1) - C(2) - C7	110,0(3)
O(1) - Te - C(9)	90,86(11)	C(1) - C(2) - C(7)	111,1(3)
C(1) - Te - C(9)	100,26(13)	C(3) - C(2) - C(7)	110,7(3)
O(1) - Te - Cl	156,88(8)	C(6) - C(7) - C(2)	111,5(3)
C(1) - Te - Cl	90,75(10)	C(9) - C(14) - C(13)	120,6(4)
C(9) - Te - Cl	90,72(10)	C(1) - C(8) - Br	123,5(3)

Resultados e Discussão

C(2) - O(1) - Te	98,36(18)	C(4) - C(5) - C(6)	111,1(3)
C(12) - O(2) - C(15)	118,1(4)	C(7) - C(6) - C(5)	111,4(3)
O(2) - C(12) - C(13)	124,6(4)	C(12) - C(11) - C(10)	119,9(4)
O(2) - C(12) - C(11)	115,2(4)	C(10) - C(9) - C(14)	119,5(3)
C(13) - C(12) - C(11)	120,2(4)	C(12) - C(13) - C(14)	119,5(4)
C(10) - C(9) - Te	116,9(3)	C(14) - C(9) - Te	123,6(3)
C(4) - C(3) - C(2)	111,5(3)	C(9) - C(10) - C(11)	120,3(4)
O(1) - C(2) - C(1)	100,7(3)	C(5) - C(4) - C(3)	111,7(3)
O(1) - C(2) - C(3)	109,1(3)	C(8) - C(1) - C(2)	138,3(4)
C(1) - C(2) - C(3)	114,8(3)	C(2) - C(1) - Te	94,2(2)
C(8) - C(1) - Te	127,4(3)		

Tabela 4.10 Fatores de deslocamentos atômicos anisotrópicos do composto (2).

	U11	U22	U33	U23	U13	U12
Te	0,03683(16)	0,04306(16)	0,03398(15)	0,00602(10)	0,00171(10)	0,01944(11)
C1	0,0621(6)	0,0814(7)	0,0448(5)	0,0126(5)	-0,0073(5)	0,0424(6)
Br	0,0381(2)	0,0866(3)	0,0658(3)	0,0187(2)	0,0111(2)	0,0253(2)
O1	0,0359(1)	0,0456(1)	0,0328(1)	0,0003(1)	-0,0008(1)	0,0175(1)
O2	0,070(2)	0,0560(2)	0,077(2)	-0,0185(2)	-0,0143(17)	0,0352(16)
C1	0,0390(19)	0,0395(17)	0,0363(18)	0,0041(14)	0,0022(14)	0,0206(15)
C2	0,0323(16)	0,0382(16)	0,0304(16)	0,0019(13)	0,0025(13)	0,0154(14)
C3	0,053(2)	0,051(2)	0,039(2)	-0,0026(16)	0,0040(17)	0,0294(19)
C4	0,055(2)	0,063(2)	0,0294(18)	-0,0020(17)	0,0013(16)	0,025(2)
C5	0,065(3)	0,080(3)	0,044(2)	0,022(2)	-0,002(2)	0,029(2)
C6	0,057(3)	0,054(2)	0,060(3)	0,0131(19)	-0,002(2)	0,032(2)
C7	0,047(2)	0,0387(18)	0,044(2)	0,0008(15)	-0,0023(16)	0,0182(16)
C8	0,041(2)	0,062(2)	0,041(2)	0,0076(17)	0,0044(16)	0,0281(18)
C9	0,0400(19)	0,0469(19)	0,0326(17)	0,0063(15)	0,0046(15)	0,0206(16)
C10	0,046(2)	0,046(2)	0,052(2)	-0,0074(17)	-0,0086(18)	0,0190(17)
C11	0,041(2)	0,053(2)	0,066(3)	-0,008(2)	-0,0113(19)	0,0244(18)
C12	0,053(2)	0,0434(19)	0,045(2)	0,0027(16)	-0,0001(17)	0,0220(18)
C13	0,050(2)	0,054(2)	0,038(2)	-0,0046(17)	-0,0117(17)	0,0178(19)
C14	0,049(2)	0,064(2)	0,0370(19)	0,0031(18)	-0,0069(17)	0,029(2)
C15	0,108(5)	0,060(3)	0,092(4)	-0,035(3)	-0,030(4)	0,045(3)

Tabela 4.11 Coordenadas fracionárias dos átomos de hidrogênio do composto (2).

	x	y	z	U(eq)
H3a	0,4090	0,1345	0,2446	0,055
H3b	0,2698	-0,0166	0,2792	0,055
H4a	0,1954	0,0443	0,0771	0,060
H4b	0,0738	0,0385	0,1816	0,060
H5a	0,1398	0,2542	0,0803	0,076
H5b	0,3256	0,3078	0,1167	0,076
H6a	0,2425	0,4459	0,2683	0,065
H6b	0,1031	0,2953	0,3037	0,065
H7a	0,3152	0,3856	0,4724	0,053
H7b	0,4386	0,3933	0,3691	0,053
H8	0,5856	0,1874	0,6280	0,055
H10	-0,0139	0,2112	0,6026	0,060
H11	-0,0589	0,4105	0,6964	0,065
H13	0,3495	0,5656	0,9404	0,061
H14	0,3893	0,3615	0,8502	0,059
H15a	0,2655	0,6883	1,0312	0,134
H15b	0,1482	0,7637	1,0382	0,134
H15c	0,2864	0,8156	0,9435	0,134

4.2 Resultados dos estudos de *docking*

4.2.1. Validação da Metodologia – *Redocking*.

A validação do cálculo de *docking* foi realizada tomando as coordenadas do ligante cristalográfico dipeptidil nitrila as quais foram tratadas de forma que a ocorrer a perda a informação sobre a sua posição original (o chamado *redocking*) como apresentado na Seção 3.6 de Procedimento experimental.

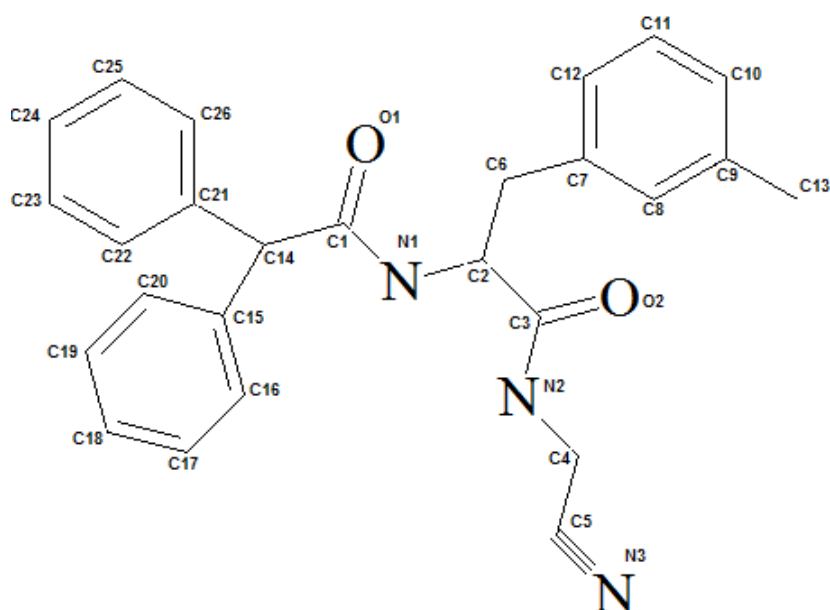


Figura 4.10 Estrutura da dipeptidil nitrila numerada.

Após a mudança das coordenadas o cálculo de *docking* foi realizado, tendo como receptor a enzima de 1gmyc e como ligante a estrutura apresentada na Figura 4.10. Os resultados obtidos do cálculo mostraram boa concordância com a estrutura cristalográfica original (Figura 4.11).

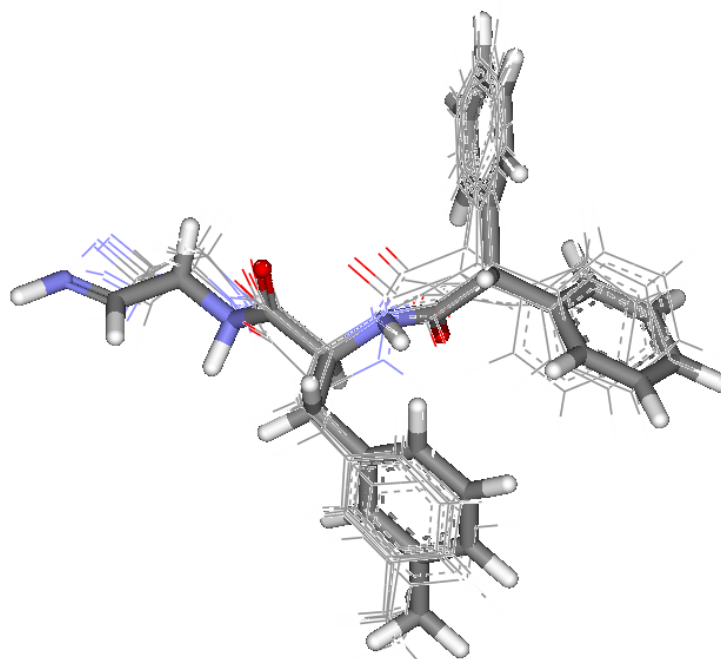


Figura 4.11 Validação do método de *docking*: A molécula em destaque corresponde às coordenadas cristalográficas da molécula retirada do pdb; as moléculas superpostas são os resultados de *docking*.

Realizou-se também uma análise das interações que a molécula dipeptidil nitrila realiza com a enzima catepsina B (Tabela 4.12, Figura 4.12):

Tabela 4.12 Principais distâncias entre os resíduos de catepsina B e os átomos do ligante cristalográfico dipeptidil nitrila.

C5 – SG-Cys29	1,82 Å	H10 – OE2- Glu 245	3,20 Å	HN3 – ND1 – His 19	2,97 Å
H2A – O – Gly 198	2,61 Å	H12 – O – Gly74	2,17 Å		
H8 – N – His 19	2,60 Å	H22 – Ct – Tyr 75*	2,61 Å		

*Ct= Centróide.

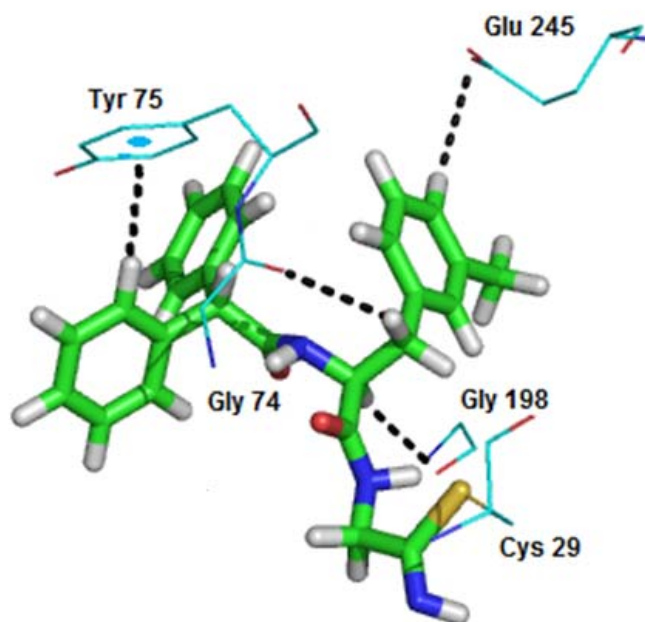


Figura 4.12 Algumas interações entre a dipeptidil nitrila e alguns resíduos da Cat. B.

4.2.2 Estudos de *docking* - Telurooxetanas.

Como mencionado anteriormente, os cálculos de docking foram realizados em duas etapas (Seção 3.6): uma com o ligante neutro e outra com o ligante sem o haleto ligado ao átomo de telúrio. Primeiramente, os ligantes estudados foram:

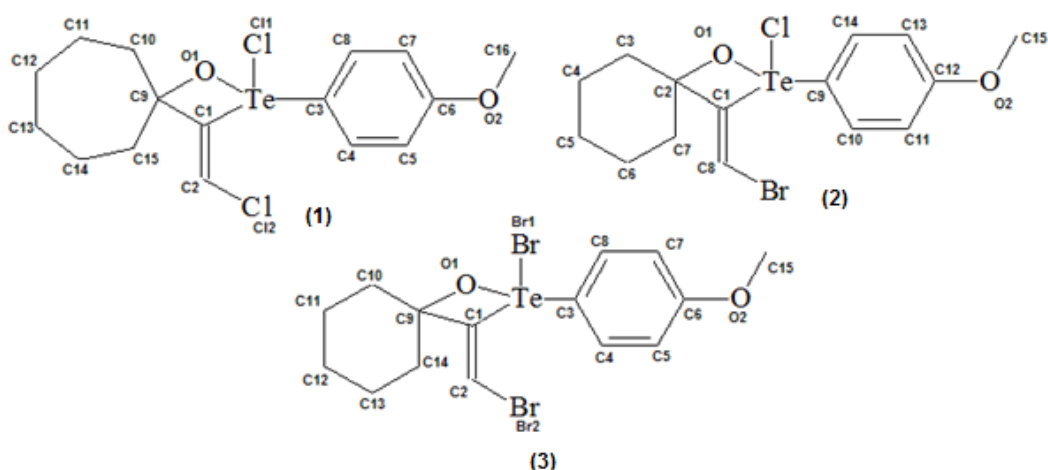


Figura 4.13 Estruturas das telurooxetanas analisadas.

ligante 1: molécula cristalográfica de cloro-telurooxetana

ligante 2: molécula cristalográfica de bromo-cloro-telurooxetana.

ligante 3: molécula modelada de bromo-telurooxetana.

4.2.2.1. Cálculos realizados com os ligantes neutros.

Nesta primeira etapa, foram observadas as interações entre a orientação selecionada de cada ligante e o sítio receptor, verificando-se em todos os casos que a distancia de ligação Te (ligantes) – SG-Cyx29 (Cat B) é de cerca de 5,5 Å. Outras interações também foram observadas e são apresentadas na Tabela 4.13.

As Figuras 4.14, 4.15 e 4.16, mostram as orientações selecionadas na Tabela 4.14 dentro do sítio escolhido da enzima CatB onde pode ser observadas as interações entre os resíduos de aminoácidos e os ligantes neutros. A partir da análise, foi possível observar que os ligantes realizam interações com alguns resíduos que fazem interações com a dipeptidil nitrila; dentre eles os resíduos Gly74 e Tyr75.

Tabela 4.13 Principais distâncias entre os resíduos de catepsina B e os átomos das moléculas nas orientações selecionadas para os ligantes neutros

cloro-telurooxetana (Composto 1)		bromo-cloro-telurooxetana (Composto 2)		bromo-telurooxetana (Composto 3)	
Te – SG-Cyx29	5,36 Å	Te – SG-Cyx29	5,29 Å	Te – SG-Cyx29	5,62 Å
H12 – O-Glu245	2,07 Å	H3 – O-Asn72	2,37 Å	H3 – O-Asn72	2,88 Å
H17 – Ct-Tyr75*	2,46 Å	H8 – Ct-Tyr75*	2,99 Å	H9A – Ct-Tyr75*	2,58 Å
H20 – O-Gly74	1,87 Å	H15 – N-Gly74	2,58 Å	H9B – O-Gly74	2,45 Å

*Ct = centróide

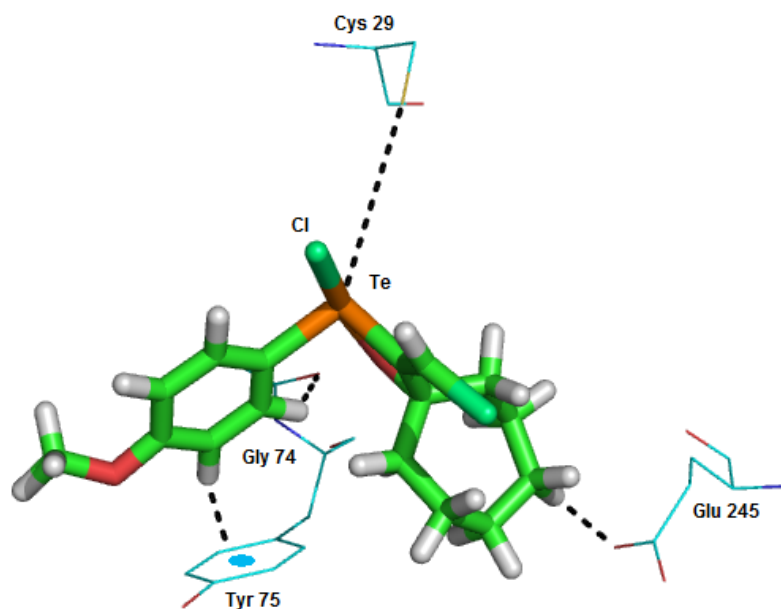


Figura 4.14. Interação entre a molécula cloro-telurooxetana neutra e resíduos da Cat B. As distâncias de ligação estão indicadas na Tabela 4.13.

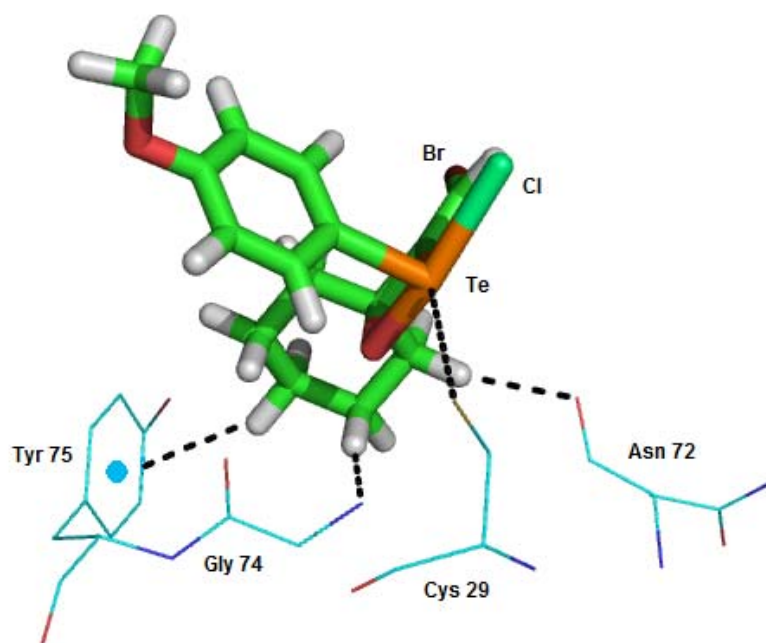


Figura 4.15 Interação entre a molécula bromo-cloro-telurooxetana neutra e resíduos da Cat B. As distâncias de ligação estão indicadas na Tabela 4.13.

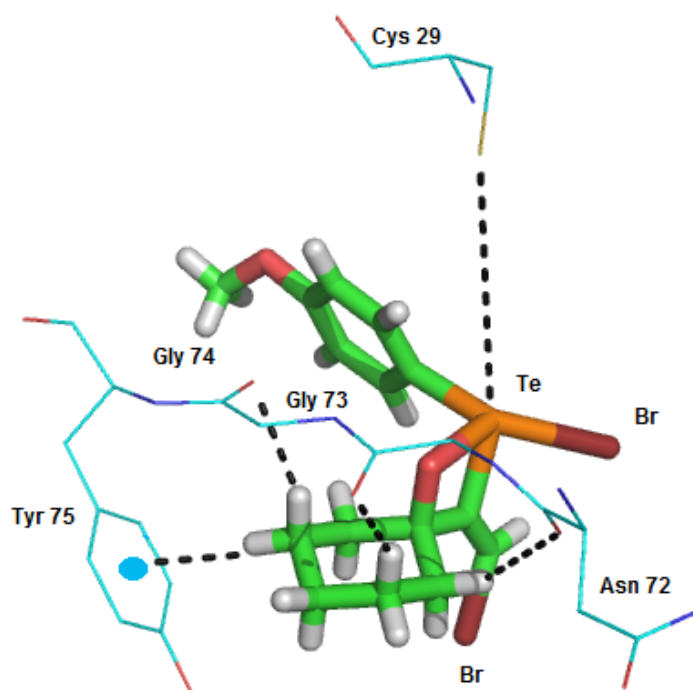


Figura 4.16 Interação entre a molécula bromo-telurooxetana neutra e resíduos da Cat B. As distâncias de ligação estão indicadas na Tabela 4.13.

4.2.2.1.1. Discussão dos Resultados obtidos para os ligantes neutros.

A partir da análise realizada é possível observar que os 3 compostos estudados fazem interações com os resíduos Gly74, Gly73 e Asn72 localizados no subsítio S1, e a Tyr75 do subsítio S3, localizada na entrada do sítio ativo. Todos estes resíduos estão situados de um mesmo lado da Cys29.

A cloro-telurooxetana, por possuir um anel de 7 membros e, conseqüentemente, ser maior que os outros dois compostos faz mais uma interação com o Glu245. Todos os compostos ficam posicionados no sítio ativo que está localizado entre os dois domínios L e R da proteína; é possível observar que a cloro-telurooxetana faz interações com os dois domínios, “bloqueando” sua entrada na interface do sítio ativo, enquanto que os outros dois compostos interagem apenas com o domínio L da proteína ficando com parte da molécula “solta” para adentrar no sítio ativo.

É possível observar também que o átomo de Te dos três ligantes posicionaram-se em frente à cisteína catalítica.

4.2.2.2 Cálculos realizados com a retirada do haleto ligado ao átomo de Te dos ligantes.

Nesta situação, foi possível obter a formação de uma ligação covalente Te-S, o que resultaria na inibição da enzima. Assim, a distância de ligação Te-SG Cys29 é igual a 2,8 Å, que é uma distância compatível com o tamanho da ligação covalente Te-S (dados obtidos do CSD – Cambridge Structural Database).

O inibidor dipeptidil nitrila, além da ligação covalente com a Cys29, também faz interações com outros resíduos como mostrado na tabela abaixo (Tabela 4.14) dentre eles a His199.

Tabela 4.14 Principais distâncias entre os resíduos de catepsina B e os átomos das orientações selecionadas para os ligantes sem o haleto ligado ao Te.

cloro-telurooxetana (Composto 1)		bromo-cloro-telurooxetana (Composto 2)		bromo-telurooxetana (Composto 3)	
Te – SG-Cyx29	2,86 Å	Te – SG-Cyx29	2,80 Å	Te – SG-Cyx29	2,72 Å
O2 – HD1-His199	2,23 Å	Br – HD1-His199	3,51 Å	Br–HD1-His199	3,39 Å
H5 – O-Gly74	3,17 Å	H3 –O-Glu122	2,83 Å	H3–O-Glu122	2,77 Å
H8 – O-Glu122	2,12 Å	H4 –O-Gly198	2,49 Å	H4–O-Gly198	2,47 Å
H11B – O-Met196	2,18 Å	H5 –N-Gly198	2,77 Å	H5–N-Gly198	2,96 Å
H12B– O-Gly197	2,51 Å	H6 – N-Ala200	2,44 Å	H6–N-Ala200	2,62 Å
		H12 –O-Gly74	2,77 Å	H12–O-Gly74	2,74 Å
		H15–O-Asn72	2,36 Å	H15–O-Asn72	2,40 Å
				H17–O-Glu245	3,07 Å

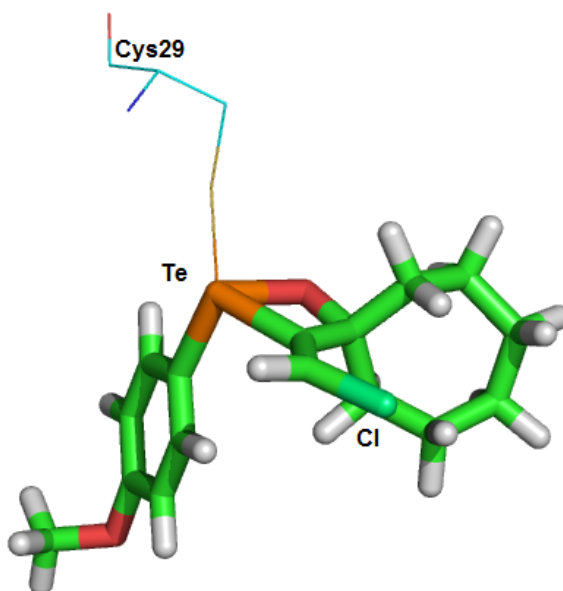


Figura 4.17 Observa-se a ligação covalente entre o Te da molécula cloro–telurooxetana e o SG-Cyx29 no sítio ativo da Catepsina B.

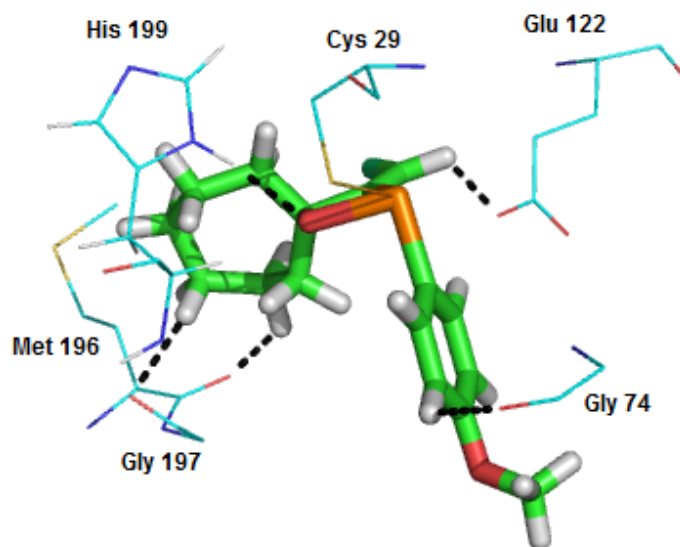


Figura 18 Interações entre a molécula cloro-telurooxetana da qual se retirou o haleto e resíduos da enzima Catepsina B.

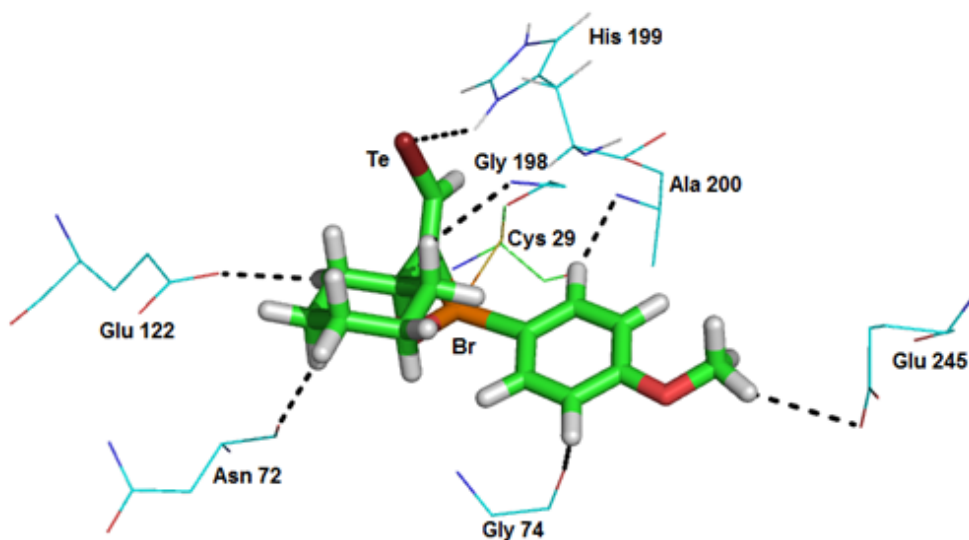


Figura 4.19 Interações entre a molécula bromo-cloro-telurooxetanada qual se retirou o haleto e resíduos da enzima Catepsina B.

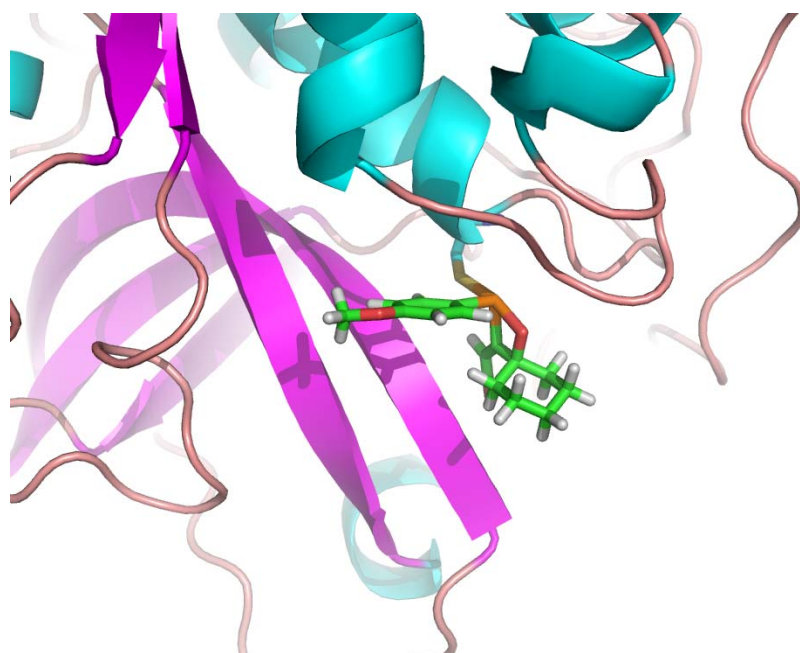


Figura 4.20. Observa-se a orientação da molécula bromo-cloro-telurooxetana na Cat B

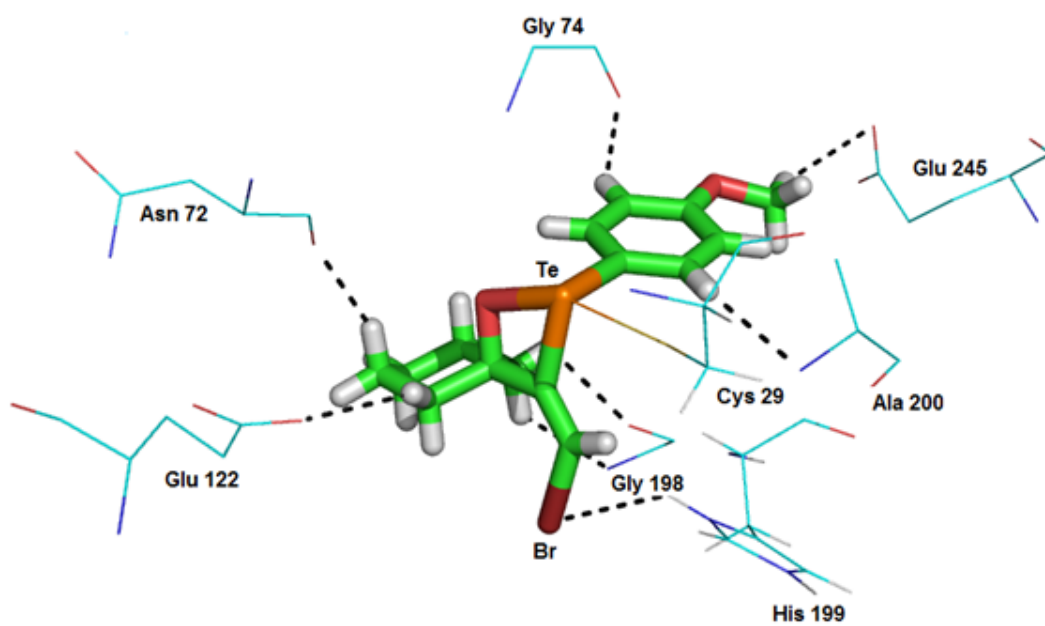


Figura 4.21 Interações entre a bromo-telurooxetana com a retirada do haleto e resíduos da Cat B.

4.2.2.2.1. Discussão dos Resultados obtidos para os ligantes carregados

Todos os ligantes fazem interações no subsítio S2, composto pela Gly198, Ala200 e Glu245, além destas interações, o composto Cloro – Telurooxetana interage com o subsítio S1' que consiste de um espaço cercado por resíduos hidrofóbicos: Met196 e His199. A His199, participante da tríade catalítica do composto está protonada de modo que o ambiente proposto está sendo fiel ao o ambiente real da enzima em seu pH ótimo assim, a interação com este resíduo é de grande importância na inibição da Cat B.

A inativação da Cat B pelos inibidores estudados deve-se ao caráter nucleofílico do resíduo tiol localizado no sítio ativo combinado ao caráter eletrofílico do átomo de telúrio (Cunha et al., 2005). A ligação covalente é então formada pelo ataque nucleofílico ao átomo de Te(IV) pelo enxofre da enzima seguido da saída do íon haleto ligado ao telúrio. O mecanismo pelo qual o Te(IV) interage com o nucleófilo ainda é pouco entendido, mas é mostrado com algumas similaridades com seu correspondente ao fósforo. Considerando o mecanismo associativo, tipo Sn2, pode considerar-se que enquanto compostos de Te(IV) são geralmente pentavalentes (incluindo o par de elétrons isolados em posição equatorial) permitindo assim a adição de outro ligante no plano equatorial. No mecanismo dissociativo, tipo Sn1, o composto de Te (IV) pode compensar o surgimento de uma carga positiva durante a dissociação do ligante pelo par de elétrons isolados em posição equatorial (Albeck et al., 1998).

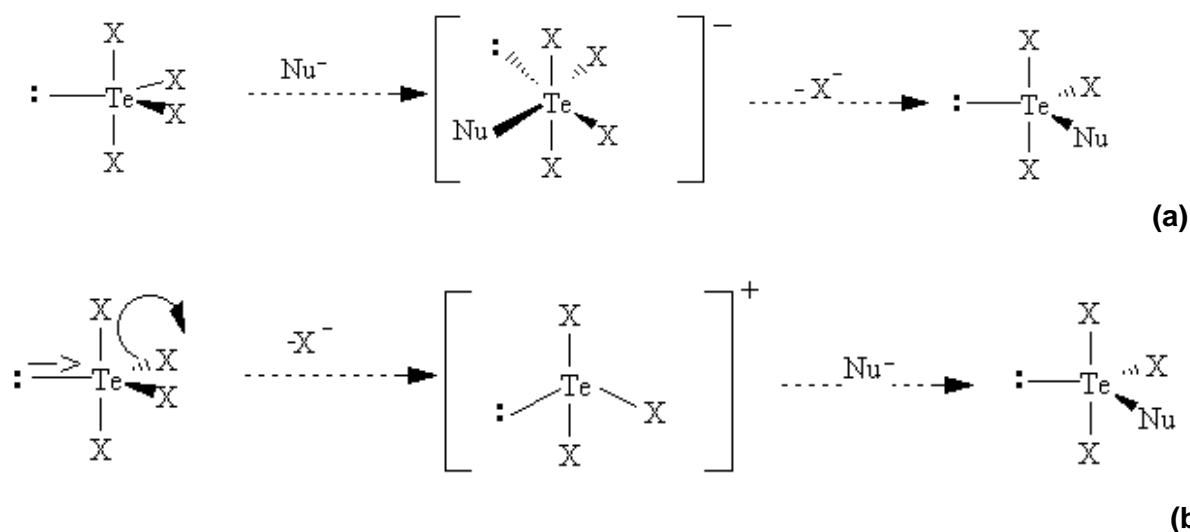


Figura 4.22 Propostas de mecanismo para compostos de Te(IV): (a) mecanismo associativo e (b) dissociativo (Albeck et al, 1998).

De acordo com a hipótese acima, a reatividade das telurooxetanas frente à Cat B deve-se ao telúrio ser considerado um ácido de Lewis. A substituição da saída do íon é preferível à abertura do anel de 4 membros como o modelo de reação sugere (Cunha et al., 2005).

O tipo de inibição ocorrido é considerado uma interação irreversível, assim, o inibidor é denominado *modificante* da enzima (Figura 4.23.) (Silverman, 1992; Voet, 1995).

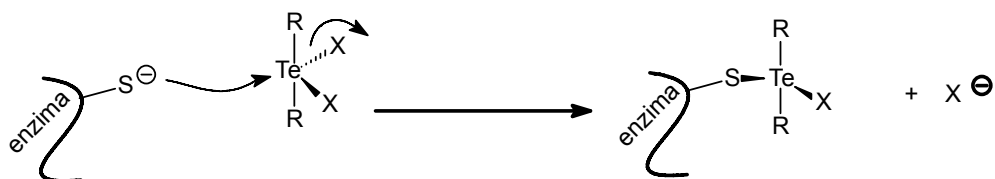


Figura 4.23 Esquema de inibidor modificante (Cunha, 2008).

Na Tabela 4.15 podem ser vistas as constantes de inibição da Cat B com os compostos de Te (Cunha et al., 2005).

Tabela 4.15 Constantes de segunda ordem para a inibição da Cat B pelos compostos de Te (IV) (Extraído de Cunha et al. 2005).

Telurooxetana	Inibição Catepsina B (k_2 , $\times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
Cloro	1,6 ± 0,1
Bromo-Cloro	36 ± 3
Bromo	7,7 ± 0,9

Como dito anteriormente, o volume do anel de 7 membros impede a entrada efetiva do composto cloro-telurooxetana fazendo que este seja um inibidor menos reativo que os outros estudados. Comparando-se os dois anéis de 6 membros percebe-se maior eficácia na inibição do composto contendo o cloro ligado ao telúrio que pode ser atribuída às modificações eletrônicas de cada composto em sua saída, com a retirada do haleto o ligante torna-se idêntico não havendo grandes modificações em suas interações com os resíduos.

O critério de seleção para a escolha da orientação dos ligantes no sítio ativo baseia-se no número de repetições de orientações geradas; assim o grupo de orientações com maior repetição é selecionado; além disso, deve haver um sentido químico nesta escolha. Dentre o grupo selecionado, a orientação escolhida é a de menor energia total do complexo formado (escore gerado pelo programa GOLD).

Tabela 4.16 Escores gerados para as orientações escolhidas que se ligam à proteína (kcal/mol)

	cloro- telurooxetana (Composto 1)	bromo-cloro- telurooxetana (Composto 2)	bromo- telurooxetana (Composto 3)
Escore	- 30,68	- 30,74	- 33,27

É possível observar pela Tabela 4.16 de valores gerados que todas as orientações escolhidas são da mesma ordem de grandeza, o que é compatível com

os dados de teste biológicos, já que todos ligantes se ligam covalentemente à enzima.

4.2.3 Comparação das conformações das moléculas cristalográficas ou modelada com as obtidas por docking antes e depois da retirada do haleto.

Realizou-se também uma análise conformacional dos compostos cristalográficos e o modelado e seus respectivos resultados de docking (primeiro e segundo passo):

- Cloro-telurooxetana (1)

Na análise observa-se que o ligante tem sua conformação cristalográfica praticamente inalterada na primeira etapa de docking; porém, ao se ligar com o S⁻ do sítio ativo, torce seu anel fenila para se encaixar no estreito canal da proteína (Figura 4.24).

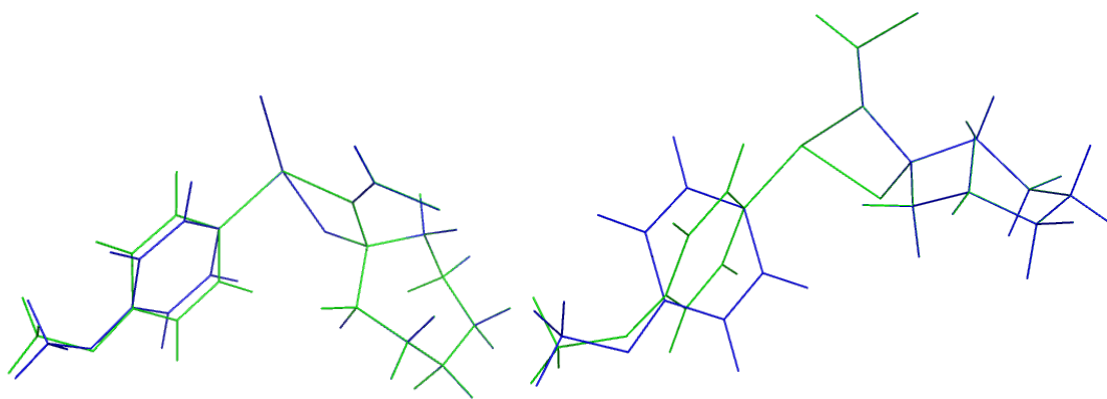


Figura 4.24 Superposição do cloro–telurooxetana (1): A molécula cristalográfica em azul e a orientação do ligante escolhido em verde, à esquerda com o ligante neutro e à direita com a retirada do cloro.

- Bromo-cloro-telurooxetana (2)

É possível observar na Figura 5.4.2 que ocorre uma torção do anel do ligante neutro para entrar na proteína que em seguida volta ao seu estado conformacional de mais baixa energia, ou seja, a conformação cristalográfica, ao se ligar com a proteína.

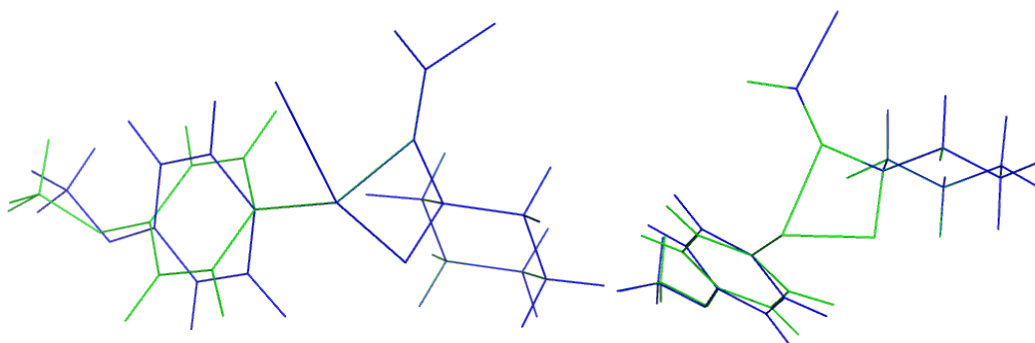


Figura 4.25 Superposição do bromo-cloro-telurooxetana (2) : A molécula cristalográfica em azul e orientação do ligante escolhido em verde, à esquerda com o ligante neutro e à direita com a retirada do cloro.

- Bromo-telurooxetana (Composto 3)

O composto bromo-telurooxetana como ligante neutro torce seu anel benzênico para entrar na Cat B, retornando à conformação modelada quando perde o bromo para ligar-se ao enxofre.

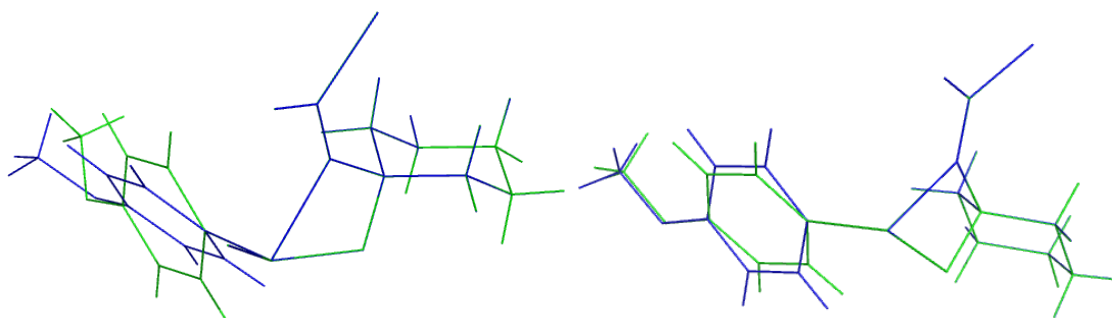


Figura 4.26 Superposição do bromo-telurooxetana (3): A molécula modelada em azul e a orientação do ligante escolhido no sítio em verde, à esquerda com o ligante neutro e à direita com a retirada do cloro.

4.2.4 Modelagem e Estudos de *docking* de algumas telurooxetanas a partir da análise anterior.

Com base no estudo da formação de complexos das telurooxetanas anteriores em comparação com seus testes biológicos, foram realizadas também a modelagem molecular das seguintes telurooxetanas:

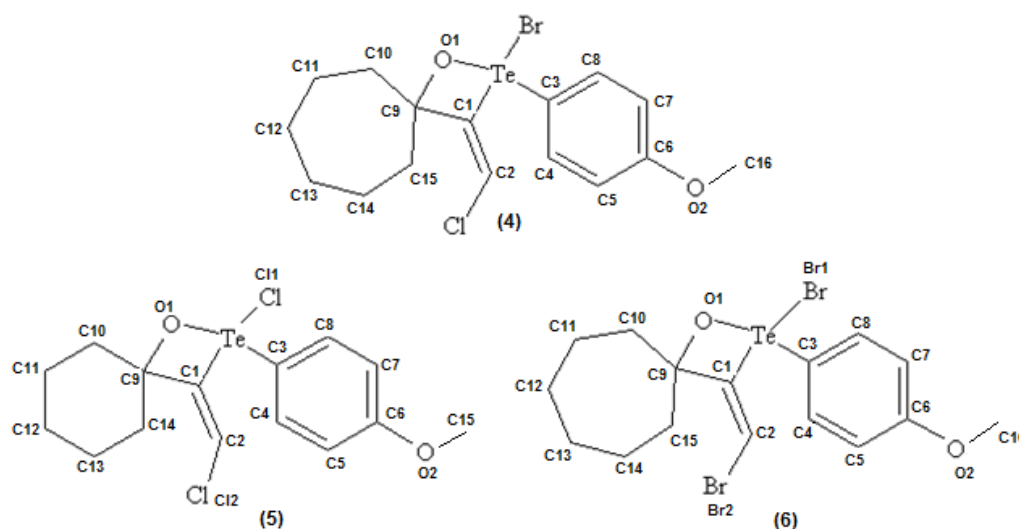


Figura 4.27 Estruturas das telurooxetanas analisadas.

ligante 4: molécula modelada cloro-bromo-telurooxetana;

ligante 5: molécula modelada cloro-telurooxetana;

ligante 6: molécula modelada bromo-telurooxetana.

4.2.4.1. Cálculos realizados com os ligantes neutros.

Como para os ligantes analisados anteriormente, foram observadas as interações entre a orientação selecionada de cada ligante e o sítio receptor. Verificou-se em todos os casos que a distancia de ligação Te (ligantes) – SG-Cyx29 (Cat B) é de cerca de 5,60 Å. Outras interações também foram observadas e são apresentadas na Tabela 4.17.

Tabela 4.17 Principais distâncias entre os resíduos de catepsina B e os átomos das orientações selecionadas para os ligantes neutros

cloro-bromo-telurooxetana (Composto 4)		cloro-telurooxetana (Composto 5)		bromo-telurooxetana (Composto 6)	
Te – SG-Cyx29	5,62 Å	Te – SG-Cyx29	5,63 Å	Te – SG-Cyx29	5,61 Å
H5 – Ct-Tyr75*	2,71 Å	H10 – O-Asn72	2,51 Å	H5 – Ct-Tyr75*	2,65 Å
H4 – O-Gly74	2,17 Å	H11B – N-Gly74	2,43 Å	H13A – O-Glu245	3,06 Å
H12A-OE1-Glu245	3,20 Å	H12A – Ct-Tyr75*	3,00 Å	H15A- O-Gly74	2,74 Å
		H13A – N – Asp69	3,50 Å		

*Ct = centróide

As Figuras 4.28, 4.29 e 4.30, mostram as orientações dos ligantes dentro do sítio escolhido da enzima Cat B.

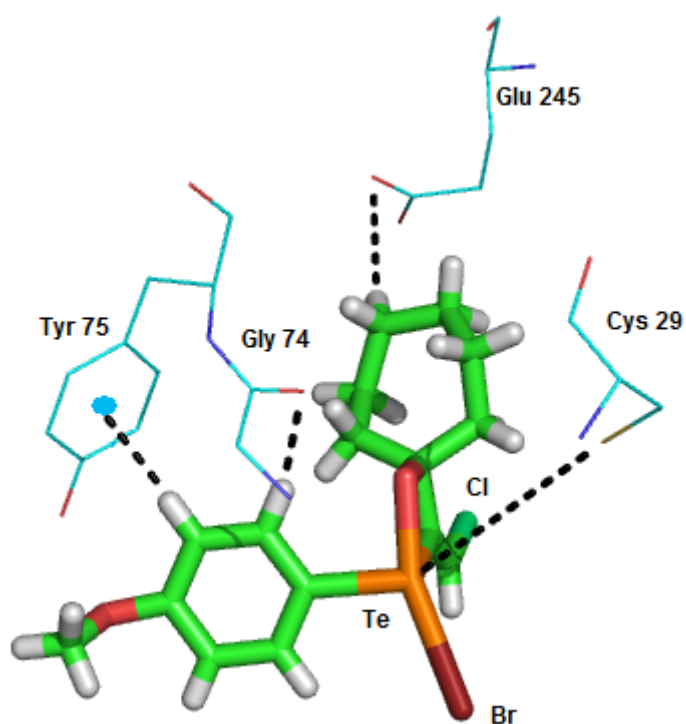


Figura 4.28 Interações entre a molécula cloro-bromo-telurooxetana neutra e resíduos da Cat B. As distâncias de ligação estão indicadas na Tabela 4.17

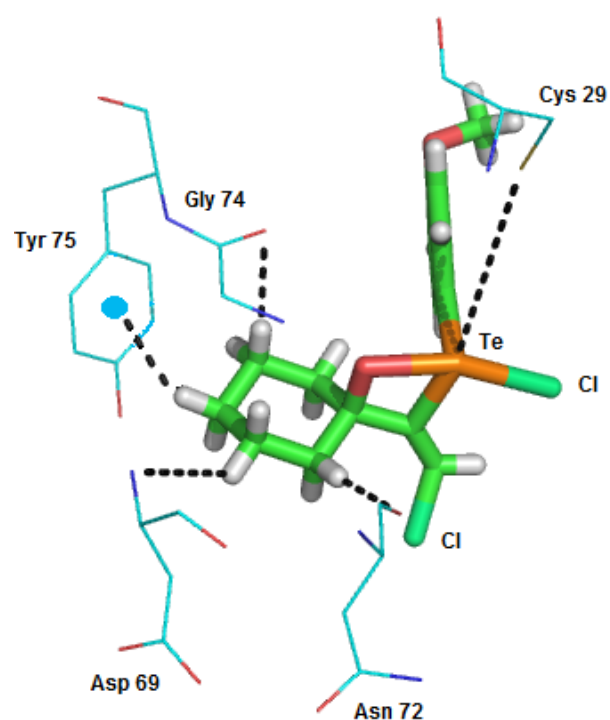


Figura 4.29 Interações entre a molécula cloro- telurooxetana neutra e resíduos da Cat. B. As distâncias de ligação estão indicadas na Tabela 5.5.1.1.

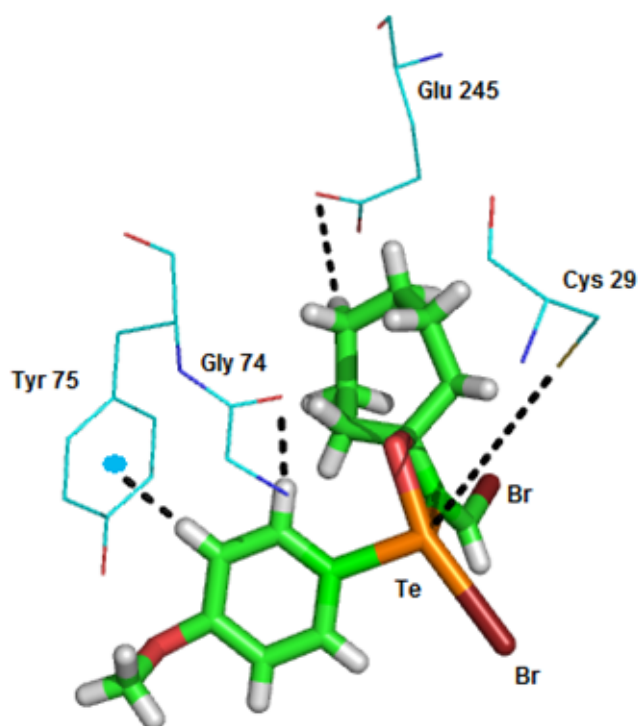


Figura 4.30 Interações entre a molécula bromo- telurooxetana neutra e resíduos da Cat B. As distâncias de ligação estão indicadas na Tabela 4.17

4.2.4.1.1 Discussão dos Resultados obtidos para os ligantes neutros.

Os 3 compostos estudados fazem interações com os resíduos Gly74 e Asn72 localizados no subsítio S1, e a Tyr75, do subsítio S3, localizada na entrada do sítio ativo.

A cloro-bromo-telurooxetana e a bromo-telurooxetana, que são caracterizadas pelo anel de 7 membros e, conseqüentemente, são maiores que o outro composto estudado nesta seção, faz mais uma interação com o Glu245, o que também foi observado para o composto cristalográfico contendo um anel de 7 membros (cloro-telurooxetana). Todos os compostos ficam posicionados no sítio ativo que está localizado entre os dois domínios L e R da proteína; é possível observar que os inibidores maiores fazem interações com os dois domínios, “bloqueando” sua entrada na interface do sítio ativo, enquanto que o outro inibidor, um pouco menor, interage apenas com um lado da proteína ficando com o anel fenila “solto” no sítio ativo.

Além disso, as três moléculas modeladas posicionaram o átomo de Te em frente à Cys 29.

4.2.4.2 Cálculos realizados com a retirada do haleto ligado ao átomo de Te dos ligantes.

Obteve-se a formação de uma ligação covalente Te-S a uma distância igual a 2,8 Å, o que indicaria a possibilidade de inibição, desta maneira, da enzima. Como mencionado anteriormente, este valor de distância é compatível com o tamanho da ligação covalente Te-S (informações obtidas do CSD).

Na Tabela 4.18 é possível observar que, além da formação da ligação covalente, obteve-se, nos três ligantes estudados, interações com alguns resíduos presentes no sítio ativo.

Tabela 4.18 Principais distâncias entre os resíduos de catepsina B e os átomos das orientações selecionadas para os ligantes sem o haleto ligado ao Te.

cloro-bromo-telurooxetana (Composto 4)		cloro-telurooxetana (Composto 5)		bromo-telurooxetana (Composto 6)	
Te - SG-Cyx29	2,89 Å	Te - SG-Cyx29	2,79 Å	Te - SG-Cyx29	2,85 Å
H2-N-Ala200	2,69 Å	Cl -HD1-His199	3,10 Å	O2-HB2-His199	3,00 Å
C4-C5- HD1-His199	2,20 Å	H8 - N-Ala200	2,47 Å	H4-O-Glu122	2,95 Å
H15 - O-Gly74	2,00 Å	H10A -O-Gly198	2,43 Å	H8-O-Gly198	2,58 Å
H16B-O-Gly197	2,40 Å	H13B-O-Asn72	2,16 Å	H15A-O-Met196	2,98 Å
		H14A -O-Glu122	2,90 Å	H16A-O-Asn72	2,38 Å
		H15C -O-Glu245	2,79 Å		

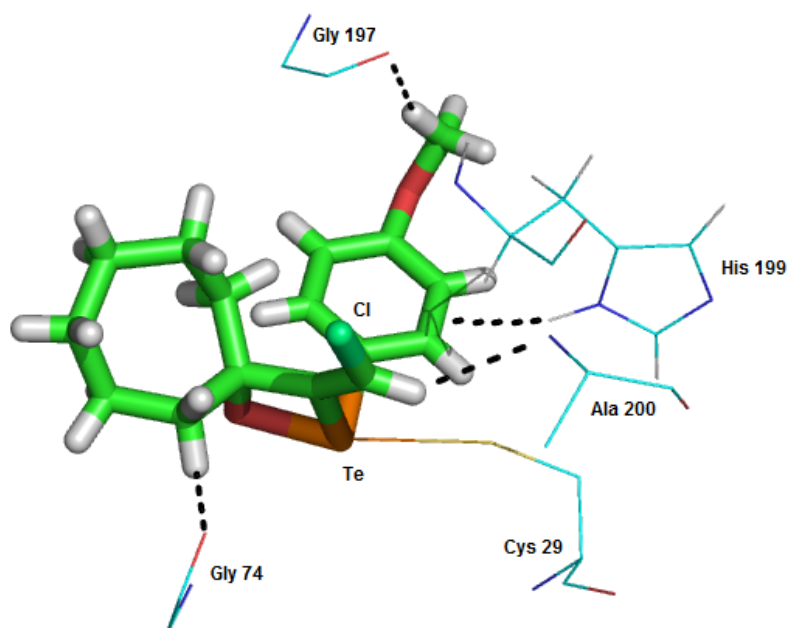


Figura 4.31 Interações entre a cloro-bromo-telurooxetana com a retirada do haleto e resíduos da Cat B. As distâncias de ligação estão indicadas na Tabela 4.18

O hidrogênio HD1 (His 199) forma uma ligação de hidrogênio com os elétrons π da dupla ligação do anel fenila entre os carbonos C4 e C5.

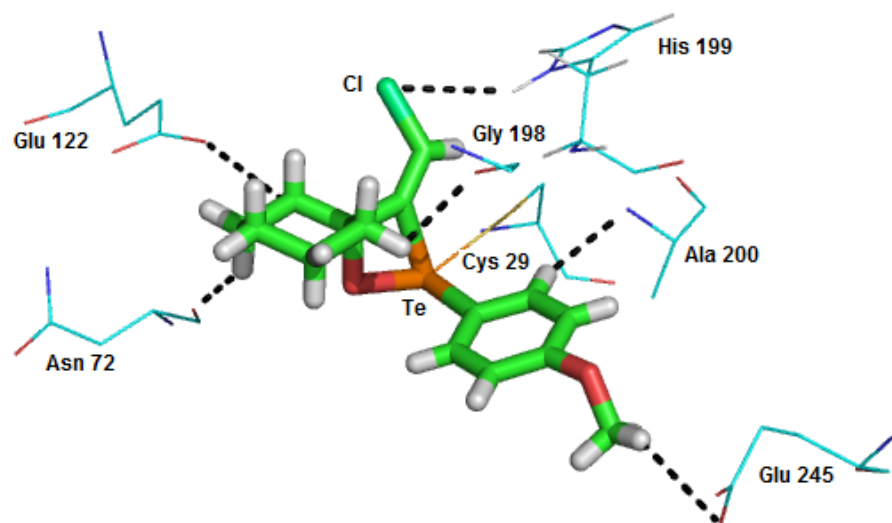


Figura 4.32 Interações entre a cloro-telurooxetana com a retirada do haleto e resíduos da Cat B. As distâncias de ligação estão indicadas na Tabela 4.18.

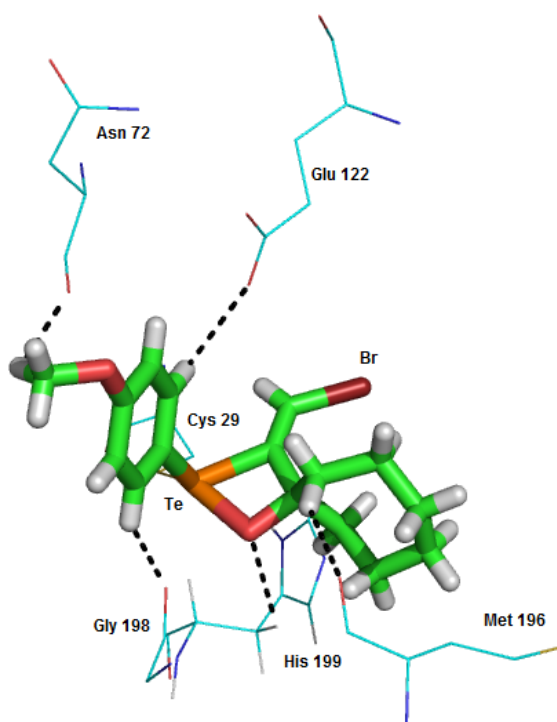


Figura 4.33 Interações entre a bromo-telurooxetana com a retirada do haleto e resíduos da Cat B. As distâncias de ligação estão indicadas na Tabela 4.18.

4.2.4.3 Discussões dos Resultados obtidos para os ligantes carregados

Todos os ligantes analisados se posicionaram a uma distância de cerca de 2,80 Å de distância do S-Cys29, distância compatível com uma ligação covalente Te-S.

Como para os ligantes analisados anteriormente, todos os compostos fazem interações no subsítio S2, composto pela Gly198, Ala200 e Glu245. A His 199 protonada, participante da tríade catalítica do composto, faz interação com os três compostos. Além disso, como observado para o ligante cristalográfico de 7 membros, os dois ligantes modelados com esse número de carbonos no anel fazem uma interação com a Met196.

Estas interações, além da ligação covalente, são importantes, pois prendem o ligante no sítio ativo impedindo-o de ter movimento dentro do canal e desta forma estaria facilitando a inibição; assim, a cloro- telurooxetana seria a mais reativa de todas por possuir mais interações estando mais “presa” dentro do sítio de ligação, o que é esperado quando se observa os resultados obtidos para os ligantes analisados anteriormente.

Para a escolha do ligante, o grupo de orientações com maior repetição gerado pelo programa é selecionado, dentre o grupo selecionado, a orientação escolhida é a de menor energia total do complexo formado (valor escore gerado pelo programa GOLD).

Tabela 4.19 Escores gerados para as orientações escolhidas que se ligam à proteína. (kcal/mol)

	cloro-bromo- telurooxetana (Composto 4)	cloro-telurooxetana (Composto 5)	bromo- telurooxetana (Composto 6)
Escore	- 37,85	- 35,25	- 35,27

Os valores obtidos possuem a mesma ordem de grandeza o que é compatível com os resultados observados, já que todos os ligantes formam uma ligação covalente com o S.

4.2.5 Comparação das conformações das moléculas modeladas com as obtidas por docking antes e depois da retirada do haleto.

A análise conformacional dos compostos cristalográficos e o modelado e seus respectivos resultados de docking (primeiro e segundo passo) apresentaram os seguintes resultados:

- Cloro-Bromo-telurooxetana (4)

Na análise observa-se que o ligante torce o anel fenila, em relação à conformação modelada, tanto para entrar no sítio ligante quanto ao ligar-se na proteína.

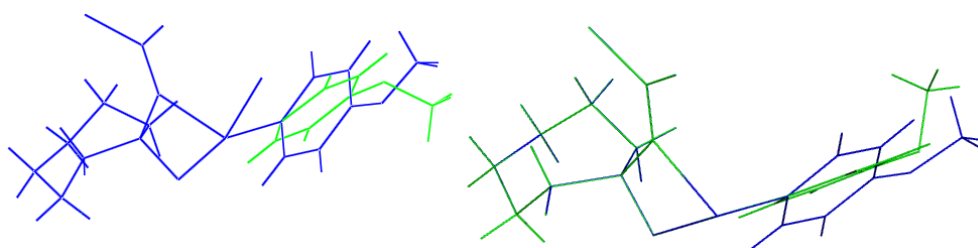


Figura 4.34 Superposição da cloro-bromo-telurooxetana (4): A molécula modelada em azul e a orientação escolhida do ligante no sítio em verde, à esquerda com o ligante neutro e à direita com a retirada do cloro.

- Cloro- telurooxetana (5)

O ligante ao entrar no sítio ativo tem seu anel fenila torcido, porém, ao ligar-se à Cys29 o anel volta à conformação da molécula modelada alterando-se apenas a direção da cadeia ligada ao anel.

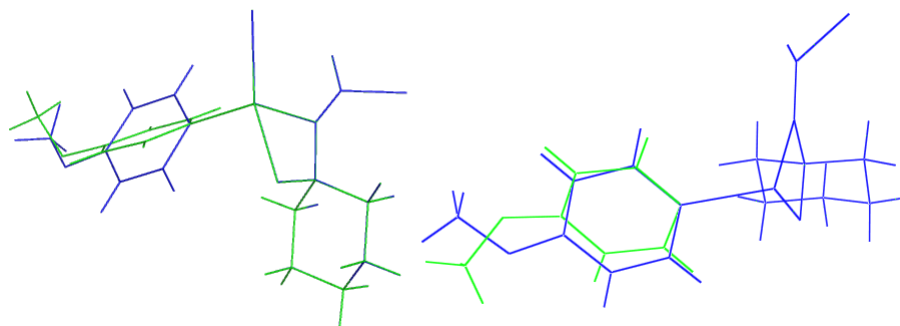


Figura 4.35 Superposição da cloro-telurooxetana (5): A molécula modelada em azul e a orientação escolhida do ligante no sítio em verde, à esquerda com o ligante neutro e à direita com a retirada do cloro.

- Bromo- telurooxetana (6)

O ligante torce o anel ao entrar no sítio ativo e o mantém torcido quando liga-se à Cat B.

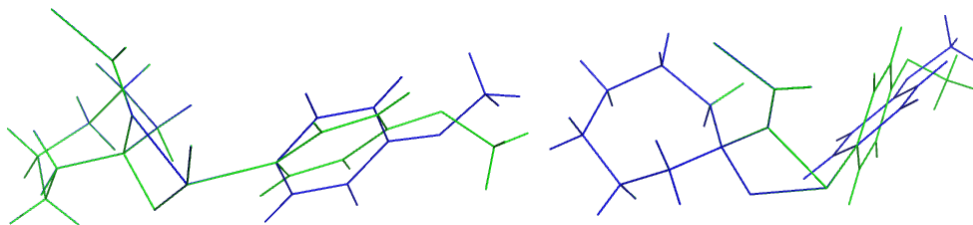


Figura 4.36 Superposição da bromo-telurooxetana (6): A molécula modelada em azul e a orientação escolhida do ligante no sítio em verde, à esquerda com o ligante neutro e à direita com a retirada do cloro.

4.2.6 Análise comparativa dos resultados para os ligantes

Finalmente, todos os resultados serão juntados de forma de poder compará-los entre si.

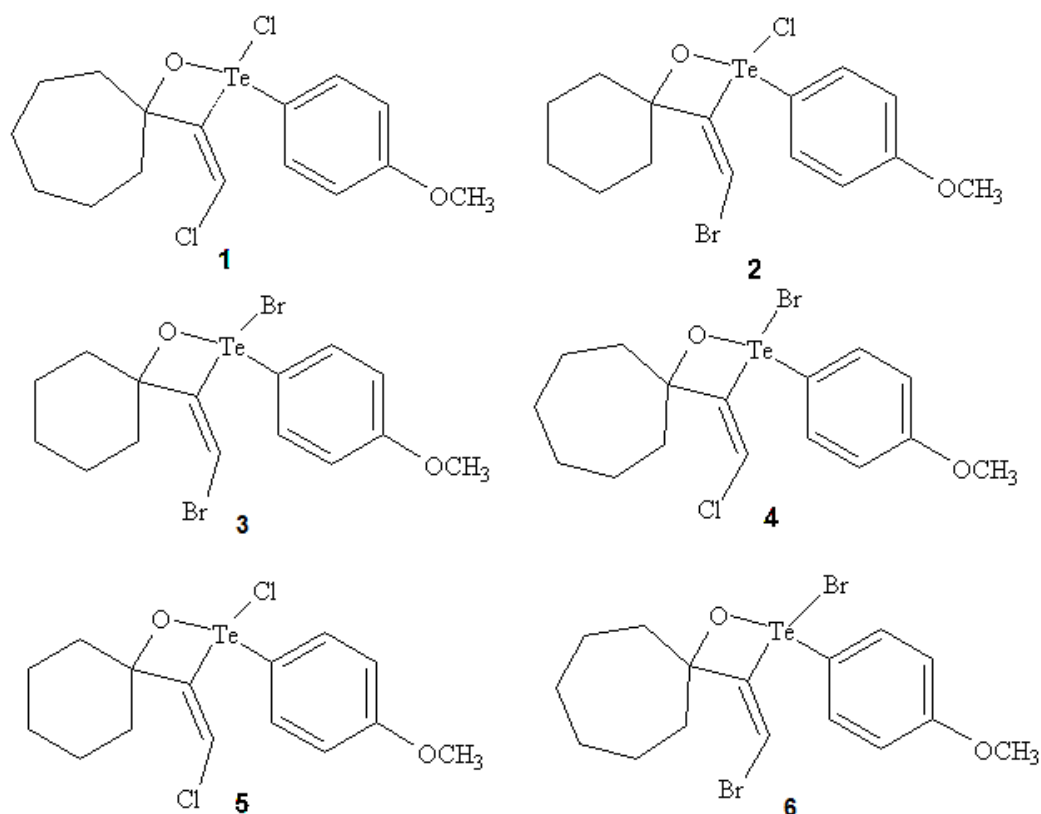


Figura 4.37 Ligantes estudados neste trabalho.

Para esta comparação, separou-se os ligantes de acordo com o tamanho de seu anel carbônico; assim dois grupos foram feitos: um grupo com o anel de 7 membros (compostos 1, 4 e 6) e um grupo contendo o anel de 6 membros (compostos 2, 3 e 5). Observou-se que, ao entrar no sítio ativo da enzima, todos os ligantes do grupo contendo anéis de 6 membros se posicionam praticamente no mesmo lugar como pode ser observado na Figura 4.38.

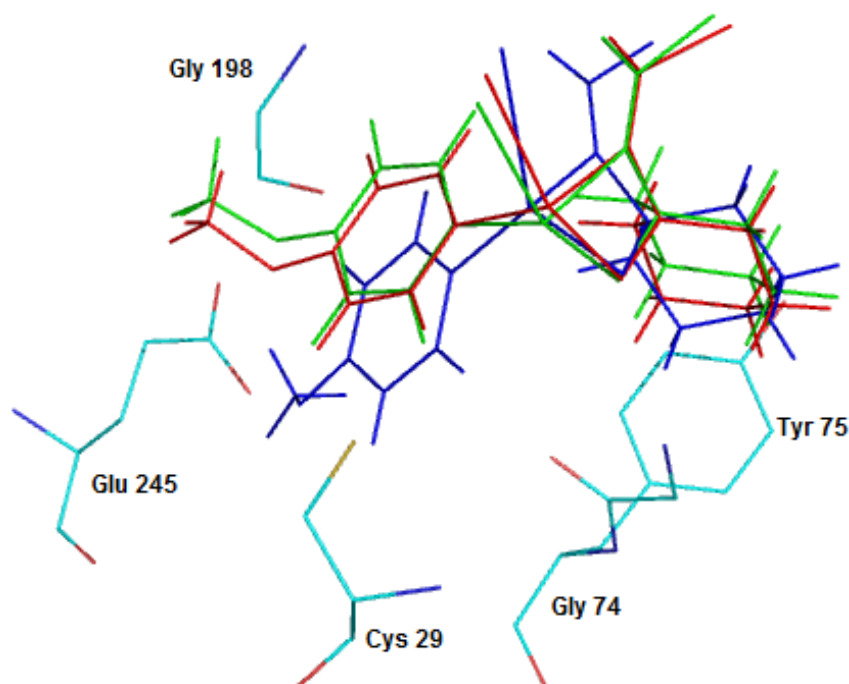


Figura 4.38 Superposição dos ligantes contendo anel de 6 membros na entrada do sítio ativo da Catepsina B: o ligante verde é o composto 2 (átomo de Cl ligado ao Te), o ligante azul é o composto 3 (átomo de Br ligado ao Te), o ligante vermelho é o composto 5 (átomo de Cl ligado ao Te).

A partir da Figura 4.38 é possível observar que os ligantes contendo o mesmo haleto ligado ao átomo de Te, neste caso o átomo de Cl, se sobrepõem mais que o ligante cujo átomo de Te está ligado ao Br (ligante de cor azul na Figura 4.38). Isso mostra que o haleto ligado ao átomo de Te tem influência na posição do ligante dentro do sítio ativo da enzima.

O mesmo efeito pode ser observado para o grupo contendo os ligantes com anel de 7 membros conforme pode ser observado na Figura 4.39.

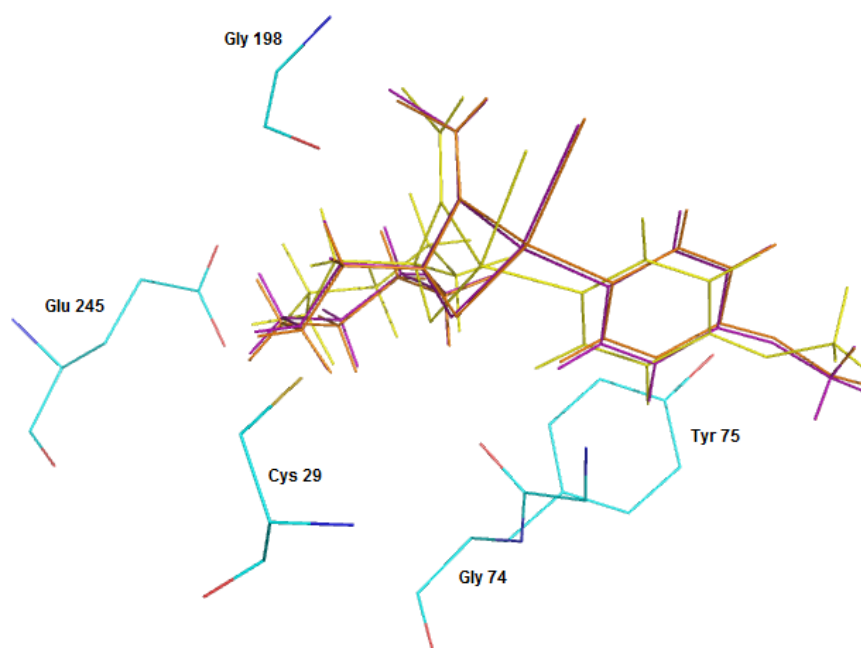


Figura 4.39 Superposição dos ligantes contendo anel de 7 membros na entrada do sítio ativo da Catepsina B: o ligante amarelo é o composto 1 (átomo de Cl ligado ao Te), o ligante laranja é o composto 4 (átomo de Br ligado ao Te), o ligante roxo é o composto 6 (átomo de Br ligado ao Te).

No caso do grupo dos ligantes contendo o anel de 7 membros, a sobreposição ocorre com os ligantes contendo o átomo de Br ligado ao Te, tendo uma diferença de posição em relação ao ligante contendo o átomo de Cl ligado ao Te.

Com a retirada do haleto e formação da ligação covalente Te-S, o grupo de ligantes contendo o anel de 6 membros se sobrepõem conforme pode ser observado na Figura 4.40.

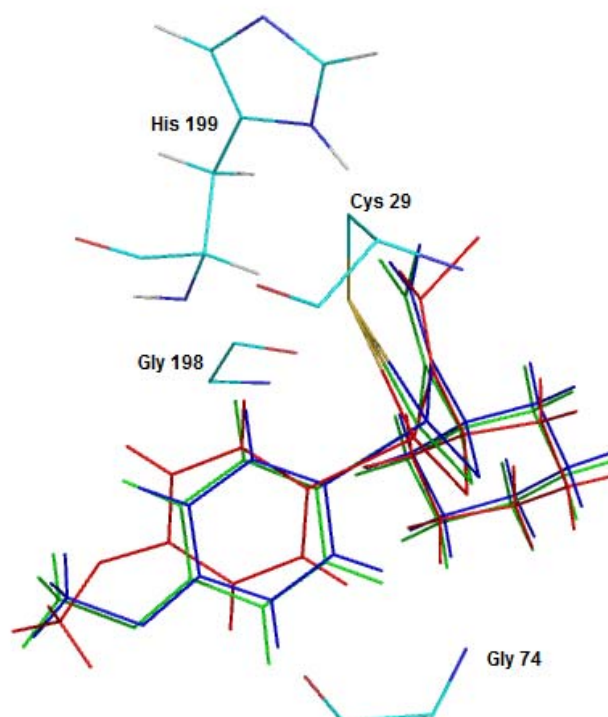


Figura 4.40 Superposição dos ligantes contendo anel de 6 membros com a retirada do haleto e formação da ligação Te-S: o ligante verde é o composto 2 (átomo de Br ligado ao átomo C2), o ligante azul é o composto 3 (átomo de Br ligado ao átomo C2), o ligante vermelho é o composto 5 (átomo de Cl ligado ao átomo C2).

Nesta situação observa-se apenas uma leve diferença na posição do ligante contendo o átomo de Cl ligado ao átomo C2 (ligante vermelho) em relação aos outros dois ligantes.

No caso da retirada do haleto no grupo de ligantes com anel de 7 membros não ocorre uma sobreposição dos ligantes (Figura 4.41).

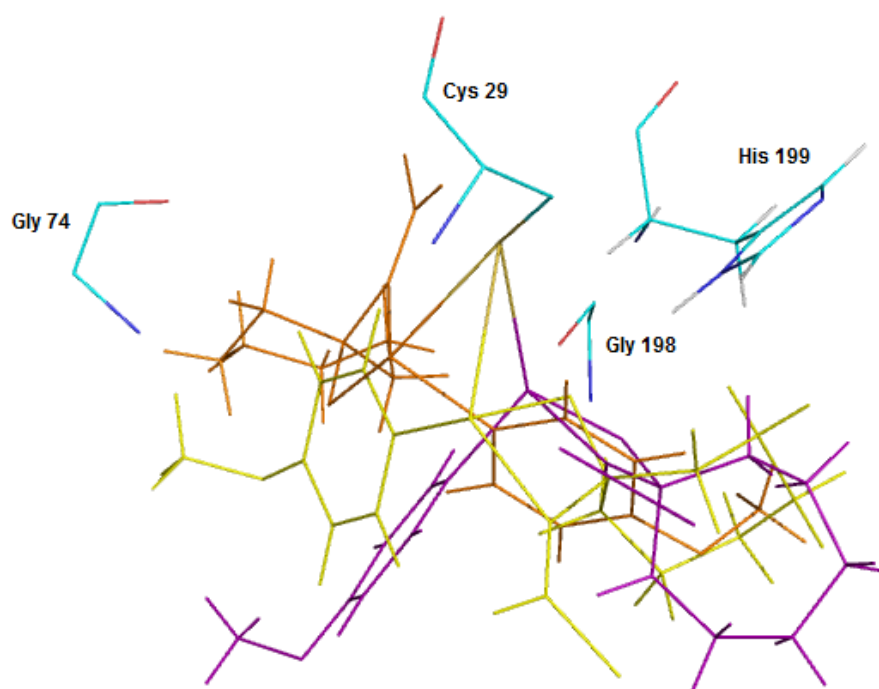


Figura 4.41 Superposição dos ligantes contendo anel de 7 membros com a retirada do haleto e formação da ligação Te-S: o ligante amarelo é o composto 1 (átomo de Cl ligado ao átomo C2), o ligante laranja é o composto 4 (átomo de Cl ligado ao átomo C2), o ligante roxo é o composto 6 (átomo de Br ligado ao átomo C2).

6. Conclusões

Foram realizados os estudos cristalográficos das duas telurooxetanas sintetizadas bem como sua análise supramolecular.

Nos dois casos as telurooxetanas apresentaram o mesmo poliedro de coordenação de pseudo-bipirâmide-pentagonal. Entretanto, o arranjo supramolecular é similar no sentido que nos dois cristais o Te forma um dímero centrossimétrico através de uma interação secundária com o haleto de uma molécula vizinha. A diferença se encontra nos *synthons*, que no caso de (1) é formado por quatro moléculas e no (2) somente por apenas três.

As coordenadas cristalográficas dos ligantes, obtidas por difração de raio X, foram importantes tanto para a utilização destas nos cálculos de *docking* como para a modelagem molecular de novos ligantes. A modelagem de compostos de Te foi feita por métodos desenvolvidos no nosso laboratório.

Para a realização dos cálculos de *docking* foi necessário um planejamento de uma estratégia para o desenvolvimento de um experimento *in silico*; para isso, foi de extrema importância o entendimento da bioquímica da proteína estudada, como por exemplo, os resíduos relacionados à atividade da enzima e a protonação dos resíduos do sítio ativo em pH ótimo além do conhecimento das coordenadas estruturais do ligante.

As visualizações em tela gráfica fazem parte tanto do planejamento quanto da análise dos resultados de *docking*. Para o planejamento é necessário observar as interações entre o ligante cristalográfico (no caso a dipeptidil nitrila) e a proteína, e na análise dos resultados para ver como o ligante se “acomoda” no sítio de ligação e as interações que ele realiza.

Os resultados obtidos com os cálculos de *docking* para os todos compostos de telúrio permitiram mostrar que estes ligantes formam complexos com a Catepsina B, bem como entender como ocorre a formação destes.

Baseando-se na comparação dos resultados para os ligantes é possível sugerir modificações neles que os tornem mais eficazes como inibidores: a Cat B possui um canal longo e estreito, de forma que o inibidor deveria ser o mais plano possível para deslizar com certa facilidade até o sítio ativo. Esta poderia ser a razão pela qual o

composto com o anel de sete membros tenha menor possibilidade de interação. Outra característica observada é que para a formação do complexo deve-se ter um grande número de ligações de hidrogênio formadas de modo que o ligante esteja “preso” dentro do sítio ativo.

A interação da telurooxetana com a enzima é influenciada por características estéricas e eletrostáticas. As diferenças nos valores obtidos para os escores de GOLD como o número de interações encontradas mostram que a síntese de derivados similares de telurooxetanas pode ser interessante no sentido de aumentar a atividade do organotelúrio tanto pela variação do substituinte ligado ao telúrio como pelo tamanho da cadeia carbônica da molécula (Cunha et al., 2005).

Uma possível continuação deste trabalho seria a síntese das telurooxetanas modeladas para posterior elucidação estrutural, estudos de testes biológicos para compará-lo com estudo de *docking* feito.

6 Referências Bibliográficas

AAKERÖY, C. B. "Crystal engineering: strategies and architectures". *Acta Crystallogr. B*, **53** : 569, 1997.

ALCOCK, N. W. "Bonding and structure: Structural principles in inorganic and organic chemistry". *Adv. Inorg. Chem. Radiochem.*, **15** : 1, 1972.

ALBECK, A.; WEITMAN, H.; SREDNI, B., ALBECK, M. "Tellurium Compounds: selective inhibition of cysteine proteases and model reaction with tilos". *Inorg. Chem.*, **37**:1704, 1998

ALTOMARE, A.; CASCARANO, G.; GIACOVAZZO, C.; GUAGLIARDI, A. "Completion and refinement of crystal structures with SIR92". *J. Appl. Cryst.*, **26** : 343, 1993.

ANNAMALA, M. K.; INAMPUDI, K. K.; GURUPRASA, L. "Docking of phosphonate and trehalose analog inhibitors into *M. tuberculosis* mycolyltransferase Ag85C: Comparison of the two scoring fitness functions GoldScore and ChemScore, in the GOLD software". *Bioinformatics*, **1** : 339, 2007.

ARMAND-UGÓN, M.; CLOTET-CODINA, I.; TINTORI, C.; MANETTI, F.; CLOTET, B.; BOTTA, M.; ESTE, J. A. "The anti-HIV activity of ADS-J1 targets the HIV-1 gp120". *Virology*, **343** : 141, 2005.

ATWOOD, J. L.; DAVIES, J. E. D.; MCNICOL, D. D.; VÖGTLE, F. *Comprehensive Supramolecular Chemistry*. Pergamon Press, Oxford, 1996, p.111.

AZÁROFF, L. V. *Elements of X-Ray Crystallography*, McGraw-Hill Book Company, New York, 1968, cap. 4.

BRAGA, D.; GREPIONI, F. "Organometallic crystal engineering: prospects for a systematic design". *J. Coord. Chem. Rev.*, **183** : 19, 1999.

BRAGA, D.; GREPIONI, F.; DESIRAJU, G. R. "Crystal Engineering and Organometallic Architecture". *Chem. Rev.*, **98** : 1375, 1998.

BRANDL, M.; WEISS, M. S.; JABS, A.; SÜHNEL, J.; HILGENFELD, R. "C-H... π in proteins". *J. Mol. Biol.*, **307** : 357, 2001.

CLARK, M.; CRAMER, R. D.; VAN OPDENBOSCH, N. "Validation of the General Purpose Tripos 5.2 Force Field". *J. Comp. Chem.*, **10** : 982, 1989.

CUNHA, R. L. O. R.; URANO, M. E.; CHAGAS, J. R.; ALMEIDA, P. C.; BINCOLETTO, C.; TERSARIOL, I. L. S.; COMASSETTO, J. V. "Tellurium-based cysteine protease inhibitors: evaluation of novel organotellurium (IV) compounds as inhibitors of human cathepsin B". *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15** : 755, 2005.

CUNHA, R. L. O. R.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; CARACELLI, I.; COMASSETTO, J. V. "Revisiting the addition reaction of TeCl₄ to alkynes: The crystal structure and docking studies of 1-chloro-2-trichlorotelluro-3-phenyl-propen-2-ol". *Journal of Organometallic Chemistry*, *J. Org. Chem.*, **691** : 4807, 2006.

CUNHA R.L.O.R., Comunicação pessoal, 2008.

DELANO, W.L. "PyMol Reference Guide", 2004.

Referências Bibliográficas

- DEREWENDA, Z. S.; LEE, L.; DEREWENDA, U. "The occurrence of C-H...O hydrogen bonds in proteins". *J. Mol. Biol.*, **252** : 248, 1995.
- DESAI, P. V.; PATNY, A.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; TEKWANI, B.; SRIVASTAVA, A.; AVERY, M. "Identification of novel parasitic cysteine protease inhibitors by use of virtual screening. 2. The available chemical directory". *J. Med. Chem.*, **49** : 1576, 2006.
- DESIRAJU, G. R. "The C-H...O hydrogen bond in crystals: what is it?". *Acc. Chem. Res.*, **24** : 290, 1991.
- ERICKSON, J. A.; JALAIE, M.; ROBERTSON, D. H.; LEWIS, R. A.; VIETH, M. "Lessons in Molecular Recognition: The Effects of Ligand and Protein Flexibility on Molecular Docking Accuracy". *J. Med. Chem.*, **47** : 45, 2004.
- ERSMARK, K.; NERVALL, M.; GUTIÉRREZ-DE-TERÁN, H.; HAMELINK E., JANKA, L. K.; CLEMENTE J. C.; DUNN, B. M.; GOGOLL, A.; SAMUELSSON, B.; AQVIST, J.; HALLBERG, A. "Macrocyclic inhibitors of the malaria aspartic proteases plasmepsin I, II and IV". *Bioorg. Med. Chem.*, **14** : 2197, 2006.
- FAORO, E. *Síntese e análise estrutural de novos dihaloorganoteluratos (II) monoaniônicos*, Programa de Pós-Graduação em Química - Santa Maria, 2006. Dissertação de Mestrado, 1 p.
- FARRUGIA, L. J. "WinGX suite for small-molecule single-crystal crystallography". *J. Appl. Cryst.* **32** : 837, 1999.
- FARRUGIA, L. J. "ORTEP3 for Windows – a version for Ortep III with a graphical user interface (GUI)". *J. Appl. Cryst.* **30** : 565, 1997.
- FYFE, M. C. T.; STODDART, J. F. "Synthetic supramolecular chemistry". *Acc. Chem. Res.*, **67** : 221, 1997.
- FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; ZAKRZEWSKI, V. G.; MONTGOMERY, J. A.; STRATMANN, R. E.; BURANT, J. C.; DAPPRICH, S.; MILLAM, M.; DANIELS, A. D.; KUDIN, K. N.; STRAIN, M. C.; FARKAS, O.; TOMASI, J.; BARONE, V.; COSSI, M.; CAMMI, R.; MENNUCCI, B.; POMELLI, C.; ADAMO, C.; CLIFFORD, S.; OCHTERSKI, J.; PETERSSON, G. A.; AYALA, P. Y.; CUI, Q.; MOROKUMA, K.; MALICK, D. K.; RABUCK, A. D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J. B.; CIOŚŁOWSKI, J.; ORTIZ, J. V.; STEFANOV, B. B.; LIU, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; GOMPERS, R.; MARTIN, R. L.; FOX, D. J.; KEITH, T.; AL-LAHAM, M. A.; PENG, C. Y.; NANAYAKKARA, A.; GONZALEZ, C.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P. M. W.; JOHNSON, B. G.; CHEN, W.; WONG, M. W.; ANDRES, J. L.; HEAD-GORDON, M.; REPLOGLE E. S.; POPLE J. A. *Gaussian 98 (Revision A.1)*, Inc., Pittsburgh PA, 1998.
- GEYER, J. A.; PRIGGE, S. T.; WATERS, N. C. "Targeting malaria with specific CDK inhibitors". *Bioch. et Bioph. Acta*, **1754** : 160, 2005.
- GIACOVAZZO, C., MONACO H. L., ARTIOLI G., VITERBO D., FERRARIS G., GILLI G., ZANOTTI G., CATTI M. *Fundamentals of Crystallography*, 2nd Ed. Giacobozzo C., IUCr e Oxford Science Publication, New York, 2002, cap. 1, cap. 2.
- GILLESPIE R. J.; HARGITTAI I. *The VSEPR Model of Molecular Geometry*, Allyn and Bacon, New York, 1991.
- GREENSPAN, P. D.; CLARK, K. L.; TOMMASI, R. A.; COWEN, S. D.; MCQUIRE, L. W.; FARLEY, D. L.; DUZER, J. H.; GOLDBERG, R. L.; ZHOU, H.; DU, Z.; FITT, J. J.; COPPA, D. E.; FANG, Z.; MACCHIA, W.; ZHU, L.; CAPPARELLI, M. P.; GOLDSTEIN, R.; WIGG, A. M.; DOUGHTY, J. R.; BOHACEK, R. S.; KNAP, A. K. "Identification of dipeptidyl nitriles as potent and selective inhibitors of cathepsin B through structure based drug design". *J. Med. Chem.*, **44** : 4524, 2001.

Referências Bibliográficas

- HADUC, I.; EDELMANN, F.T. *Supramolecular Organometallic Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, New York, 1999, cap. 1.
- HADUC, I.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. "Supramolecular self-assembly through secondary bonds in organotellurium chemistry". *J. Phosphorus, Sulfur and Silicon.*, **171** : 171, 2001.
- HARTSHORN, M. J.; VERDONK, M. L.; CHESSARI, G.; BREWERTON, S. C.; MOOIJ, W. T. M.; MORTENSON, P. N.; MURRAY, C. W. "Diverse, high-quality test set for the validation of protein-ligand docking performance". *J. Med. Chem.*, **50** : 726, 2007.
- HOU, T.; WANG, J.; CHEN, L.; XU, X. "Automated docking of peptides and proteins by using a genetic algorithm combined with tabu search". *Protein Eng.*, **12** : 639, 1999.
- IULEK, J.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; STADLER, C. C.; TOZETTO, A.; VEGA, M. "Crystal structure of 4-aza-2-(hydroxyimino)-3-methyl-5-(2-pyridyl)pent-3-ene, C₁₀H₁₃N₃O". *Z.Kristallogr.*, **216** : 585, 2001.
- JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C. "Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with description of desolvation". *J.Mol. Biol.*, **245** : 43, 1995.
- JONES, G.; WILLETT, P. "Docking small-molecule ligands into active sites". *Current.Opinion on Biotechnology.*, **6** : 652, 1995.
- JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C.; LEACH, A. R.; TAYLOR, R. "Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking". *J. Mol. Biol.*, **267** : 727, 1997.
- JONES, T. A. "A graphics model building and refinement system for macromolecules". *J. Appl. Crystallogr.*, **11** : 268, 1978.
- JONES, T. A.; ZOU, J. Y.; COWAN, S. W.; KJELDGAARD, M. "Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models". *Acta Crystallogr.,Sect. A*, **47** : 110, 1991.
- JOHNSON, D.; TRAVIS, J. "Inactivation of human alpha 1 proteinase-inhibitor by thiol proteinases". *Biochem. J.*, **163** : 639, 1977.
- KALECHMAN, Y.; STRASSMAN, G.; ALBECK, M.; SREDNI, B. "Up regulation by ammonium trichloro(Dioxoethylene-0,0')tellurate (AS-101) of FGAs/Apo-1 expression on B16 melanoma cells: implications for the antitumor effects of AS-101". *The Journal of Immunology*, **161** : 3536, 1998.
- KRUMRINE, J.; RAUBACHER, F.; BROOIJIMANS, N.; KUNTZ, I. *Principles and methods of docking and ligand design*. In: *Structural Bioinformatics*, Edited by Phippe E. Bourne & Helge Weissig, Wiley-Liss Inc., New Jersey, USA, 2003.
- KUNTZ, I. D. "Structure-based strategies for drug design and discovery". *Science*, **257**: 1078, 1992.
- KUNTZ, I. D.; BLANEY, J. M.; OATLEY, S. J.; LANGRIDGE, R.; FERRIN, T. E. "A geometric approach to macromolecule-ligand interactions". *J. Mol. Biol.*, **161** : 269, 1982.
- KATUNUMA, N.; KOMINAMI, E. "Abnormal expression of lysosomal cysteine proteinases in muscle wasting diseases". *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **108** : 1, 1987.
- LEHN, J. M. "Perspectives in Supramolecular Chemistry - From Molecular Recognition towards Molecular Information Processing and Self-Organization". *Angew. Chem.*, **29** : 1304, 1990.
- LEHN, J. M. *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*, VCH, Weinheim, 1995, p. 3 - 5.

- LYBRAND, T. P. "Ligand protein docking and rational drug design". *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **5** : 224, 1995.
- MIRANDA, M. N. *Algoritmos Genéticos: Fundamentos e Aplicações. Grupo de Teleinformática e Automação – UFRJ – <http://www.gta.ufrj.br/marciel/genetic.html>*, 2000.
- MUSIL, D.; ZUCIC, D.; TURK, D.; ENGH, R. A.; MAYR, I.; HUBER, R.; POPOVIC, T.; TURK, V.; TOWATARI, T.; KATUNUMA, N.; BODE, W. "The refined 2.15 Å x-ray crystal structure of human liver Cathepsin B: the structural basis for its specificity". *The Embo J.*, **10** : 2321, 1991.
- PAN, X.; TAN, N.; ZENG, G.; ZHANG, Y.; JIA, R. "Amentoflavone and its derivatives as novel natural inhibitors of human cathepsin B". *Bioorg. Med Chem.*, **13** : 5819, 2005.
- PANIGRAHI, S. K.; DESIRAJU, G. R. "Strong and weak hydrogen bonds in the protein ligand interface". *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, **67** : 128, 2007.
- PEDRETTI, A.; VILLA, L.; VISTOLI, G. "VEGA: A Versatile Program to Convert, Handle And Visualize Molecular Structure On Windows-Based PCs". *J. Mol. Graph.*, **21** : 47, 2002.
- PEDRETTI, A.; VILLA, L.; VISTOLI, G. "Atom-Type Description Language: A Universal Language To Recognize Atom Types Implemented In The Vega Program". *Theor. Chem. Acc.*, **109** : 229, 2003.
- PEDRETTI, A.; Villa, L.; Vistoli, G. "Vega - An Open Platform To Develop Chemo-Bio-Informatics Applications, Using Plug-In Architecture And Script Programming". *J. Computer-Aided Mol. Design*, **18** : 167, 2004.
- ROMEIRO, N. C.; AGUIRRE, G.; HERNÁNDEZ, P.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H.; ALDANA, I.; PÉREZ-SILANES, S.; MONGE, A.; BARREIRO, E. J.; LIMA, L. M. "Synthesis, trypanocidal activity and docking studies of novel quinoxaline-N-acylhydrazones, designed as cruzain inhibitors candidates". *Bioorg. Med. Chem.*, **17** : 641, 2009.
- ROSAMOND L., ALLSOP A., Harnessing the power of the genome in the search for new antibiotics, *Science*, **287** : 1973, 2000.
- SCHEINER, S.; KAR, T.; GU, Y. "Strength of the (CH)-H-alpha center dot center dot O hydrogen bond of amino acid residues". *J. of Biol. Chem.*, **276** : 9832, 2001.
- SHELDRIK, G. M. *Computational Crystallography*, edited by Sayre, Oxford: Clarendon Press, 1982.
- SHELDRIK, G. M. "Phase annealing in SHELX-90: direct methods for larger structures". *Acta Cryst. A*, **46** : 467, 1990.
- SHELDRIK, G. M. *SHELXL-97, Program for Crystal Structure Refinement*, University of Göttingen, Germany, 1997.
- SILVERMAN, R. B. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, Academic Press: São Diego, 1992, p. 147-218.
- SIMARD, S.; SU, D.; WUEST, J. D. "Use of hydrogen-bonds to control molecular aggregation – self-assembly of 3-dimensional networks with large chambers". *J. Am. Chem. Soc.*, **113** : 4696, 1991.

- SLOANE, B. F.; ROZHIN, J.; JOHNSON, K.; TAYLOR, H.; CRISSMAN, J. D.; HONN, K. V. "Cathepsin B: Association with plasma membrane in metastatic tumors". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2483, 1986.
- STEED, J. W.; ATWOOD, J. L. *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*. Wiley, New York, 2000, p. 23.
- TAYLOR, R. D.; JEWsbury, P. J.; ESSEX, J. W. "A review of protein-small molecule docking methods". *J. Comp. Aid. Molec. Design*, **16** : 151, 2002.
- TURK, B.; TURK, D.; TURK, V. "Lysosomal cysteine proteases: more than scavenger". *Biochimica et Biophysica Acta*, **1477** : 98, 2000.
- VEGA-TEIJIDO, M.; CARACELLI, I.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. "Conformational analyses and docking studies of a series of 5-nitrofuranyl- and 5-nitrothiophenyl-semicarbazone derivatives in three possible binding sites of trypanothione and glutathione reductases". *J. Mol. Graph. Model.* **24** : 349, 2006.
- VEGA-TEIJIDO, M.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; VENTURA, O. N.; CAMILLO, R. L.; CARACELLI, I.; GUADAGNIN, R. C.; BRAGA, A. L.; SILVEIRA, C. C. "Dichloro(cyclohexylidene-1-methylene)(phenyl)Te(IV). Looking for the theoretical treatment". *Z. Kristallogr.*, **219** : 652, 2004.
- VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHORN, M. J.; MURRAY, C. W.; TAYLOR, R. D.; "Improved protein-ligand docking using GOLD". *Proteins: Structure, Functions and Bioinformatics*, **52** : 609, 2003.
- VOET, D.; VOET, J. G. *Biochemistry* 2nd Ed., Wiley: Nova Iorque, 1995, p. 85 - 88, 356 -360.
- WATANABE, D.; YAMAMOTO, A.; TOMOO, K.; MATSUMOTO, K.; MURATA, M.; KITAMURA, K.; ISHIDA, T. "Quantitative evaluation of each catalytic subsite of cathepsin B for inhibitory activity-binding mode relationship of epoxysuccinyl inhibitors by x-ray crystal structure analyses". *J. Mol. Biol.*, **362** : 979, 2006.
- YAMAMOTO, D.; MATSUMOTO, K.; OHISHI, H.; ISHIDA, T.; INOUE M.; KITAMURA K.; MIZUNO H. "Refined x-ray structure of papain E-64-C complex at 2,1 Å resolution". *J. Biol. Chem.*, **266** : 14771, 1991.
- YAN, C.; XIU, Z.; LI, X.; HAO, C. "Molecular modeling study of β -cyclodextrin complexes with (+)-catechin and (-)-epicatechin". *J. Mol. Graph. and Mod.*, **26** : 420, 2007.
- ZENG, G. Z.; PAN, X. L.; XIONG, X.; ZHANG, Y. M. "Natural biflavones as novel inhibitors of cathepsin B and K". *European J. Med. Chem.*, **41** : 1247, 2006.
- ZIOLO, R. F.; TROUP, J. M. "Experimental observation of the Tellurium (IV) binding and lone-pair electron density in dimethyltellurium dichloride by x-ray diffraction techniques". *J. Am. Chem. Soc.*, **105** : 229, 1983.
- ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; HAIDUC, I.; SILVESTRU, C.; CEA-OLIVARES, R. "Crystal structures of antimony and indium phosphodithionates, M(S(2)PR(2))(3) (M=SB, R=ET, M= IN, R= ME, PH) – Is the lone pair responsible for the structures differences?". *Polyhedron*, **16** : 3087, 1995.
- ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; HAIDUC, I. "Diorganotellurium (IV) dihalides and secondary bonding: Revisiting de coordination polyhedral". *Phosphorus, Sulfur, Silicon*, **171** : 73, 2001.
- ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; HAIDUC, I. "Tellurium... π -aryl interactions: a new bonding motif for supramolecular self assembly and crystal engineering". *CrystEngComm*, **4** : 178, 2002.

Referências Bibliográficas

ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; HAIDUC, I.; CAMILLO, R. L. C.; COMASSETO, J. V.; CUNHA, R. L. O. R.; ALVIM, J. "Supramolecular self-assembly through tellurium center dot center dot centr dot halogen secondary bonds: A hexagonal grid of Te₂Cl₂ and Te₆Cl₆ rings in the solid state structure of 1,1,3-trichloro-2,4,6-tetrahydro-1H-1-lambda(4)-benzo[b]tellurophene". *Can. J. Chem.*, **80** : 1530, 2002

<http://openbabel.org> – Último acesso em 01/2009

<http://www.rcsb.org/pdb/home/> – Último acesso em 01/2009

<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/> – Último acesso em 01/2009

<http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/mercury/> – Último acesso em 01/2009