

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**SAULO LUÍS DA SILVA**

**MODELAGEM MOLECULAR DE DERIVADOS  
FENILPIRAZÓLICOS E FLAVONÓIDES INIBIDORES DA  
XANTINA OXIDASE**

**Tese de Doutorado apresentada  
ao Instituto de Biologia da  
Universidade Estadual de  
Campinas, para obtenção do  
título de Doutor em Biologia  
Funcional e Molecular na Área de  
Bioquímica.**

ORIENTADOR  
Prof. Dr. SÉRGIO MARANGONI  
Depto de Bioquímica - IB  
Universidade Estadual de  
Campinas  
UNICAMP

2003

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

**Si38m**

**Silva, Saulo Luís da**

Modelagem molecular de derivados fenilpirazólicos e flavonóides inibidores da xantina oxidase / Saulo Luís da Silva. – Campinas, SP:[s.n], 2003.

Orientador: Sérgio Marangoni

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.

Instituto de Biologia.

1. Modelagem molecular. 2. Flavonóides. 3. Xantina. I. Marangoni, Sérgio. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 21 de Agosto de 2003.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Sérgio Marangoni (orientador)  
Depto de Bioquímica – IB – UNICAMP

---

Assinatura

Prof. Dr. Tomomasa Yano  
Depto de Microbiologia e Imunologia – IB – UNICAMP

---

Assinatura

Prof. Dr. Eduardo Galembeck  
Depto de Bioquímica – IB – UNICAMP

---

Assinatura

Prof. Dr. Albérico Borges Ferreira da Silva  
Depto de Química de Física Molecular – IQSC – USP

---

Assinatura

Prof. Dr. Milan Trsic  
Depto de Química de Física Molecular – IQSC – USP

---

Assinatura

Prof. Dr. José Camillo Novello  
Depto de Bioquímica – IB – UNICAMP

---

Assinatura

Profa. Dra. Neusa Fernandes de Moura  
Centro de Ciências Agro-Ambientais – UNOCHAPECÓ

---

Assinatura

**Para:**

**Meus Pais, Maria Aparecida e  
José Antonio,**

**Meus Filhos, Luís Felipe e Ana  
Luísa,**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas

Ao Prof. Dr. Sérgio Marangoni e ao Dr. Marcos H. Toyama, pela orientação e oportunidade de realização desta tese, pela amizade, pelas sugestões, pela compreensão de todas as situações que se apresentaram e por sempre atenderem meus pedidos e necessidades. **Muito Obrigado!**

Ao Prof. Dr. Albérico Borges Ferreira da Silva, ao Prof. Dr. Milan Trsic e ao Prof. Dr. Tomomasa Yano, que antes de professores e amigos, foram pessoas que me abriram as portas para uma pesquisa séria e de qualidade, desde os tempos da iniciação científica até o presente momento, e espero por muitos outros anos. **Muito Obrigado!**

Aos meus pais, Maria Aparecida e José Antônio, meus irmãos, Soraia, Sabrina e Sérgio, meus filhos Ana Luísa e Luís Felipe e meus cunhados Adriano e Henrique, que estiveram em todos os momentos ao meu lado, e até neste instante auxiliaram e continuam auxiliando com todos os recursos possíveis, materiais, financeiros e afetivos, para que esta tese tenha chegado ao seu término. Nunca mediram esforços, agüentando as distâncias, variações de humor, as dificuldades e todas as pedras que se puseram neste caminho. **Muito Obrigado!**

À Tádía Lapinski, Karen Weber e Agnaldo Arroio, pela amizade e apoio nesta fase final da tese. **Muito Obrigado!**

À Patrícia Figueiredo, por todo carinho que sempre demonstrou, pela ajuda nos periódicos, pela disposição em ajudar em todos os momentos sem nunca dizer não. Uma pessoa muito especial. **Muito Obrigado!**

À Profa. Dra. Neusa Fernandes de Moura, Profa. Dra. Rosiani Berenice Denardin e Káthia Maria Honório muito obrigado pela amizade, atenção e carinho em todos os momentos importantes ou cotidianos. Muito obrigado

Um amigo extraordinário que sempre esteve a disposição para que qualquer dificuldade fosse ultrapassada: Prof. Ademir Schmidel. **Muito Obrigado!**

Aos Colegas do Laboratório de Química de Proteínas (LAQUIP) do Departamento de Bioquímica e do Laboratório de Microbiologia sob a responsabilidade do Prof. Yano no Departamento de Microbiologia do Instituto de Biologia da UNICAMP. **Muito Obrigado!**

Aos Colegas do Curso Aprovação e do Centro de Ciência Agro-ambientais e de Alimentos da Universidade Comunitária Regional de Chapecó. **Muito Obrigado!**

Muito obrigado a todos os professores do Depto de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP, em especial aos Prof. Dr. Hiroshi Aoyama, Prof. Dr. Eduardo Galembeck, Prof. Dr. José Camillo Novello, Prof. Dra. Carmem Veríssima, Prof. Dra. Fernanda Gradelha e Prof. Dra. Eneida de Paula, por todo conhecimento, atenção e sugestões que sempre me dispensaram.

Um muito obrigado especial às secretárias Andréia e Marina (Depto de Bioquímica IB-UNICAMP), à Ângela (IQSC-USP) e aos técnicos Paulinho, Marino e Stella pelos préstimos extremamente valiosos e sempre de boa vontade.

*“ parei para ouvir o silêncio... o dia estava morrendo e a  
noite nascia – mas em grande paz.  
Ali estavam os processos imponderáveis do cosmo,  
harmoniosos e silenciosos.*

*Harmonia, era isso!*

*Aquilo brotava do silêncio – ritmo suave, fluxo de um  
acordo perfeito,  
a música das esferas, talvez. Era suficiente captar aquele  
ritmo para ser parte dele por um momento.”*

*(Richard E. Byrd)*

## ÍNDICE GERAL

<b>Índice de Figuras</b>	<b>ix</b>
<b>Índice de Tabelas</b>	<b>xiii</b>
<b>Índice de equações</b>	<b>xviii</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>xix</b>
<b>Resumo</b>	<b>xx</b>
<b>Abstract</b>	<b>xxi</b>
<b>I – Introdução</b>	<b>1</b>
1.1- A enzima Xantina Oxidase (XO)	2
1.2- O allopurinol e os derivados fenilpirazólicos com capacidade de inibição da xantina oxidase	6
1.2.1 - O allopurinol	6
1.2.2 - Os derivados fenilpirazólicos	7
1.3- Flavonóides: Características, atividade biológica e farmacológicas e capacidade de inibição da Xantina Oxidase	10
1.3.1 - Características gerais	10
1.3.2 - Biossíntese e estrutura geral de um flavonóide	13
1.3.3 - As diversas classes de flavonóides	15
1.3.4 - Os flavonóides e suas funções biológicas	17
1.3.4.1 - Flavonóides usados na pigmentação vegetal:	17
1.3.4.2 – Flavonóides usados como protetores contra radiação UV-B	20
1.3.4.3 - Flavonóides usados como proteção antimicrobiana	21
1.3.4.4 - Ação dos flavonóides na interação planta animal	22
1.3.4.5 - Ações benéficas dos flavonóides ao organismo	

humano_____	24
1.3.4.6 – Flavonóides que inibem a Xantina Oxidase_____	26
1.4 – Métodos de Mecânica Molecular_____	28
1.5 – Métodos de Química Quântica_____	34
1.6 – O programa HyperChem 7.0_____	36
<b>II – Objetivos_____</b>	<b>38</b>
2.1 – Objetivos Gerais_____	39
2.2 – Objetivos Específicos_____	39
<b>III - Metodologia_____</b>	<b>40</b>
<b>IV – Resultados_____</b>	<b>49</b>
4.1 – Valores obtidos para as propriedades dos Fenipirazólicos_____	50
4.2 – Valores obtidos para as propriedades dos Flavonóides_____	70
<b>V – Discussões_____</b>	<b>91</b>
5.1 – Análises da geometria dos compostos fenilpirazólicos e flavonóides obtidos pelos métodos 1e 2_____	93
5.2 – Análises das diferenças entre os valores de energias e das propriedades moleculares_____	99
5.3 – Análises iniciais das relações estrutura – atividade quantitativa (QSAR) para os flavonóides estudados por Lin et al. (2002)_____	106
5.4 – Correlação da atividade e os aspectos energéticos e moleculares dos fenilpirazólicos e flavonóides que inibem a XO, obtidos pelo método 2_____	107

5.4.1 - Análises das estabilidades estruturais dos compostos das séries dos flavonóides e fenilpirazólicos_____	107
5.4.2 – Análise dos orbitais de fronteira e propriedades correlacionadas aos compostos das séries dos flavonóides e fenilpirazólicos_____	109
5.4.3 – Análise das propriedades de superfície e área moleculares dos compostos das séries dos flavonóides e fenilpirazólicos_____	111
5.4.4 – Análise das propriedades hidrofóbicas, de refratividade e polarizabilidade moleculares dos compostos das séries dos flavonóides e fenilpirazólicos_____	112
<b>VI – Conclusões_____</b>	<b>119</b>
<b>VII – Referências Bibliográficas_____</b>	<b>122</b>
<b>VIII. – Apêndice: Artigo submetido ao Chemical Physics_____</b>	<b>129</b>

## Índice de Figuras

	Pg
<b>Figura 1:</b> a) Rotas de degradação de ATP e GTP b) Ciclo redox da Xantina oxidase – Xantine dehidrogenase_____	3
<b>Figura 2:</b> Mecanismos de proteção celular _____	5
<b>Figura 3:</b> Analogia estrutural entre o allopurinol e a hipoxantina_____	7
<b>Figura 4:</b> Rota usada por Ishibuchi et al. (2001) para síntese de derivados fenilpirazólicos_____	8
<b>Figura 5:</b> Estratégia de mudança global do allopurinol utilizada por Ishibuchi et al. (2001) para um fenilpirazol._____	9
<b>Figura 6:</b> Flavonóides aglicosilados: a) Quercitina, b) Kaempferol e Flavonóides glicosilados: c) Quercitina-3-O-glicosídeo; d) Kaempferol-3-O-glicosídeo_____	12
<b>Figura 7:</b> Estrutura e numeração básica de um flavonóide_____	13
<b>Figura 8:</b> Principal rota biossintética dos flavonóides em uma planta_____	14
<b>Figura 9:</b> Alguns exemplos de flavonóides em uma planta_____	18
<b>Figura 10:</b> estrutura básica: a) de uma flavona; b) de um flavonol e de seus possíveis grupos substituintes_____	27
<b>Figura 11:</b> Principais funções no HyperChem_____	36
<b>Figura 12:</b> A molécula do salicilato no sítio ativo da XO. região hidrofílica do sítio ativo; b) região hidrofóbica do sítio ativo_____	42

<b>Figura 13:</b> Estrutura geral de: a) um derivado pirazólico, b) o salicilato e c) uma flavona_____	43
<b>Figura 14:</b> Definições dos ângulos diedros e cargas sobre os átomos ou grupos de átomos para: a) Fenilpirazóis e b) Flavonóides_____	47
<b>Figura 15:</b> Compostos sintetizados por Ishibuchi et al. (2001)_____	50
<b>Figura 16:</b> Flavonóides sintetizadas por van Hoorn et al. (2002)_____	70
<b>Figura 17:</b> Pontes de hidrogênios verificadas no interior do sítio catalítico Da xantina oxidase. a) com os fenilpirazólicos (composto 1); b) com os flavonóides (composto 1) _____	95
<b>Figura 18:</b> Disposição espacial dos inibidores fenilpirazólicos no sítio ativo da xantina oxidase. a) com o fenilpirazólico mais ativo (composto 1); b) com o fenilpirazólico mais ativo (composto 1) – visão estéreo_____	97
<b>Figura 19:</b> Disposição espacial dos inibidores flavonóides no sítio ativo da Xantina oxidase. a) com o flavonóide mais ativo (composto 1); b) com o Flavonóide mais ativo (composto 1) – visão estéreo_____	98
<b>Figura 20:</b> Disposição espacial dos fenilpirazólicos no sítio ativo da xantina oxidase: a) composto 1; b) composto 4_____	113
<b>Figura 21:</b> Disposição da miricetina no interior do sítio ativo. As hidroxilas do anel B se posicionam numa fenda de fácil acesso às moléculas de água_____	116
<b>Figura 22:</b> Disposição da morina no interior do sítio ativo. a) dentro do sítio ativo. b) detalhe dos resíduo hidrofóbicos_____	117

## Índice de Tabelas

	Pg
<b>Tabela 1:</b> Consumo de flavonóides em dietas diárias, baseados em padrões alimentares americanos_____	11
<b>Tabela 2:</b> Exemplos de Flavonas_____	15
<b>Tabela 3:</b> Exemplos de Flavanonas_____	16
<b>Tabela 4:</b> Exemplos de Flavonóis_____	16
<b>Tabela 5:</b> Exemplos de Flavanoas_____	17
<b>Tabela 6:</b> Complexos Flavonóides – copigmento de plantas com flores de coloração azulada_____	19
<b>Tabela 7:</b> Flavonóides identificados em plantas com capacidade de proteção contra radiação UV-B_____	20
<b>Tabela 8:</b> Alguns flavonóides com ação antimicrobiana_____	22
<b>Tabela 9:</b> Tipos de átomos definidos no método AMBER para o elemento oxigênio_____	30
<b>Tabela 10:</b> Grupo A <sup>a</sup> , compostos com atividade maior que o allopurinol_____	52
<b>Tabela 11:</b> Grupo B <sup>a</sup> , ,compostos com atividade menor que o allopurinol_____	53
<b>Tabela 12:</b> Valores de Energia Total para os Fenilpirazólicos, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles_____	54

<b>Tabela 13:</b> Valores de Energia de Ligação para os Fenilpirazólicos, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles_____	55
<b>Tabela 14:</b> Valores de Energia Eletrônica para os Fenilpirazólicos, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles_____	56
<b>Tabela 15:</b> Valores de Energia de Hidratação para os Fenilpirazólicos, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre el_____	57
<b>Tabela 16:</b> Valores de Energia do Mais Alto Orbital Molecular Ocupado (HOMO) os Fenilpirazólicos, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles_____	58
<b>Tabela 17:</b> Valores de Energia do Mais Baixo Orbital Molecular Ocupado (LUMO) os Fenilpirazólicos, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles_____	59
<b>Tabela 18:</b> Valores de Dureza para os fenilpirazólicos, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles_____	60
<b>Tabela 19:</b> Valores de Eletronegatividade de Müllikan para os Fenilpirazólicos, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles_____	61
<b>Tabela 20:</b> Valores de Calor de Formação para os Fenilpirazólicos, pelos Métodos 1 e 2, e as variações entre eles_____	62
<b>Tabela 21:</b> Valores dos Momentos de Dipolos para os Fenilpirazólicos, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles_____	63
<b>Tabela 22:</b> Valores de Área Superficial dos Fenilpirazólicos, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles_____	64

<b>Tabela 23:</b> Valores de Volume Molecular dos Fenilpirazólicos, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles_____	65
<b>Tabela 24:</b> Valores de Log P, Refratividade Molecular e Polarizabilidade para os Fenilpirazóis_____	66
<b>Tabela 25:</b> Valores dos ângulos diedros para os fenilpirazóis, definidos na figura 14, obtidos pelo método 1_____	67
<b>Tabela 26:</b> Valores dos ângulos diedros para os fenilpirazóis, definidos na figura 14, obtidos pelo método 2_____	67
<b>Tabela 27:</b> Valores das propriedades área, volume, Log P, Refratividade e Polarizabilidade moleculares associadas aos grupos R2 dos fenilpirazólicos, obtidos pelo método 2:_____	68
<b>Tabela 28:</b> Valores das cargas líquidas sobre os átomos dos fenilpirazóis, definidas na figura 14, obtidas pelo método 1_____	68
<b>Tabela 29:</b> Valores das cargas líquidas sobre os átomos dos fenilpirazóis, definidas na figura 14, obtidas pelo método 2_____	69
<b>Tabela 30:</b> Grupo A, compostos com atividade de inibição da XO_____	73
<b>Tabela 31:</b> Grupo B, compostos sem atividade de inibição da XO_____	74
<b>Tabela 32:</b> Valores de Energia Total para os flavonóides, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles_____	75
<b>Tabela 33:</b> Valores de Energia de Ligação para os flavonóides, pelos Métodos 1 e 2, e as variações entre eles_____	76

<b>Tabela 34:</b> Valores de Energia Eletrônica para os flavonóides, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles	77
<b>Tabela 35:</b> Valores de Energia de Hidratação para os flavonóides, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles	78
<b>Tabela 36:</b> Valores de Energia do Mais Alto Orbital Molecular Ocupado (HOMO) dos flavonóides, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles	79
<b>Tabela 37:</b> Valores de Energia do Mais Baixo Orbital Molecular Ocupado (LUMO) dos flavonóides, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles	80
<b>Tabela 38:</b> Valores de Dureza para os flavonóides, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles	81
<b>Tabela 39:</b> Valores de Eletronegatividade de Müllikan para os flavonóides, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles	82
<b>Tabela 40:</b> Valores de Calor de Formação para os flavonóides, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles	83
<b>Tabela 41:</b> Valores dos Momentos de Dipolos para os flavonóides, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles	84
<b>Tabela 42:</b> Valores de Área Superficial dos flavonóides, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles	85
<b>Tabela 43:</b> Valores de Volume Molecular dos flavonóides, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles	86

**Tabela 44:** Valores de Log P, Refratividade Molecular e Polarizabilidade para os flavonóides \_\_\_\_\_ 87

**Tabela 45:** Valores de dos ângulos diedros medidos entre os anéis C e B dos flavonóides \_\_\_\_\_ 88

**Tabela 46:** Valores das cargas sobre os átomos de oxigênio nas hidroxilas dos flavonóides, definidas na figura 14, obtidas pelo método 1 \_\_\_\_\_ 89

**Tabela 47:** Valores das cargas sobre os átomos de oxigênio nas hidroxilas dos flavonóides, definidas na figura 14, obtidas pelo método 2 \_\_\_\_\_ 90

**Tabela 48:** Comparação entre as médias de variações entre os métodos 1 e 2. Os valores apresentados refletem a relação percentual entre o método2 e o método1 \_\_\_\_\_ 100

## Índice de Equações

	Pg
<b>Equação 1:</b> Forma funcional da energia de ligação_____	29
<b>Equação 2:</b> Energia das ligações_____	31
<b>Equação 3:</b> Energia de deformação dos ângulos de ligações_____	31
<b>Equação 4:</b> Energia dos ângulos diedros_____	32
<b>Equação 5:</b> Energia de van der Waals_____	32
<b>Equação 6:</b> Parâmetros para o método AMBER_____	33
<b>Equação 7:</b> Parâmetros para o método AMBER_____	33
<b>Equação 8:</b> Parâmetros para o método OPLS_____	33
<b>Equação 9:</b> Parâmetros para o método OPLS_____	33
<b>Equação 10:</b> Potencial Eletrostático_____	33
<b>Equação 11:</b> Ligações de Hidrogênio_____	34
<b>Equação 12:</b> Equação de Schrödinger_____	34
<b>Equação 13:</b> Variação percentual entre os métodos 1 e 2_____	52
<b>Equação 14:</b> Dureza (Hardness)_____	103
<b>Equação 15:</b> Eletronegatividade de Müllikan_____	103

## **ABREVIATURAS:**

**AM1:** Austin Model 1

**AMBER:** Assisted Model Building and Energy Refinement

**ATP:** Adenosina Trifosfato

**Bio+ (CHARMM):** Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics

**CNDO:** Complet Neglect of Diatomic Overlap

**DNA:** Ácido Deoxiribo Nucléico

**DTF:** Teoria de Densidade Funcional

**GTP:** Guanosina Trifosfato

**HOMO:** Highest Occupied Molecular Orbital

**INDO:** Intermediate Neglect of Diatomic Overlap

**LDL:** Lipoproteína de Baixa Densidade

**LUMO:** Lowest Unoccupied Molecular Orbital

**MINDO3:** Modified Intermediate Neglect of Diatomic Overlap; version 3

**MM:** Mecânica Molecular

**MM+:** Mecânica Molecular de Al.ingher

**MM2:** Mecânica Molecular 2 de Al.ingher

**MNDO:** Modified Neglect of Diatomic Overlap

**MNDO/d:** Modified Neglect of Diatomic Overlap with orbitals d

**NDDO:** Neglect Diatomic Differencial Overlap

**OPLS:** Optimized Potentials for Liquid Simulations

**QM:** Mecânica Quântica

**PM3:** Parameterized Model 3

**ROS:** Espécies Reativas de Oxigênio

**SOD:** Superóxido Dismutase

**TNDO:** atom Type Neglect of Diatomic Overlap

**UV:** Ultra Violeta

**XO:** xantina oxidase

**ZINDO/1:** Zerner Intermediate Neglect of Diatomic Overlap; version 1

**ZINDP/S:** Zerner Intermediate Neglect of Diatomic Overlap;  
version spectroscopic

## RESUMO:

A xantina oxidase é uma enzima que produz ácido úrico utilizando hipoxantina como substrato, proveniente da degradação de bases purinas. O acúmulo de uratos, a forma fisiológica do ácido úrico, será responsável pela formação de diversas doenças, como por exemplo, a gota.

A droga mais amplamente usada na inibição da XO é o allopurinol, que pode causar severas reações alérgicas ao organismo em um conjunto de aspectos fisiológicos conhecidos como Síndrome da Intolerância ao Allopurinol (SAI).

Fenilpirazóis e flavonóides são capazes de inibir a XO, em alguns compostos de forma mais efetiva que o allopurinol e aparentemente sem causar danos severos, se tornando alvos interessantes para produção de fármacos.

Para entender as ações destes em relação à XO, as classes estudadas foram modeladas e analisadas suas propriedades eletrônicas, moleculares e geométricas, buscando encontrar as possíveis correlações estruturas atividades quantitativas (QSAR).

Para análise foram usados dois métodos: o primeiro, e mais tradicional, quando as moléculas foram desenhadas e otimizadas no vácuo (Método 1). O segundo, uma nova forma de abordagem estrutural de inibidores enzimáticos não protéicos, quando as moléculas foram otimizadas estruturalmente dentro do campo de força criado pelo cristal da enzima (Método 2).

As análises mostraram que as diferenças, principalmente energéticas, entre os métodos não são significativas. Entretanto o Método 2 apresentou a vantagem de mostrar uma análise estrutural mais interessante, pois aproxima o inibidor de sua melhor conformação de interação com a enzima. As propriedades moleculares acompanham as diferenças estruturais mostrando coerência na metodologia 2.

## ABSTRACT

The xanthine oxidase is an enzyme that produces uric acid utilizing the substrate hypoxanthine from purine bases degradation. The accumulation of urates, the physiologic form of the uric acid, will be responsible to the formation of diseases, for example, the gout.

The drug allopurinol, the most utilized XO inhibitor, can provoke severe allergic reactions to the organism in a group of physiologic aspects known as allopurinol intolerance syndrome (AIS).

Phenylpirazols and flavonoids, compounds able to inhibit the XO, in some cases, more effective than allopurinol and causing no severe damages, are interesting targets to the drugs production.

To understand their actions in the XO reactions, the compounds were modeled and studied in relation to geometric, molecular and electronic properties searching the possible quantitative structural activity relationship (QSAR):

Two methods were used: in the first, and most traditional, the molecules were drawn and optimized in vacuous (method 1). In the second method, a new form of the structural approach of non-proteic inhibitors, the molecular structures were having optimized in the force field of the enzyme crystal (method 2).

The analyses showed that the differences, principally energetic, between the methods are not meaningful. However, the second method presented the advantage to furnish more interesting structural analyses, approaching the inhibitor to the best conformation for the interaction with the enzyme. The molecular properties accompany the structural differences showing that the method 2 is coherent.

## I - INTRODUÇÃO

### 1.1) A Enzima Xantina Oxidase (XO)

A xantina oxidase (XO) é a enzima responsável pela transformação tanto da hipoxantina em xantina, quanto desta em ácido úrico que, em ambiente fisiológico, está na forma de urato. A hipoxantina e a xantina são muito mais solúveis que o ácido úrico, e este último pode se depositar como urato de sódio, um dos principais responsáveis pelo desenvolvimento da doença conhecida como gota (Tsutomu et al., 1991).

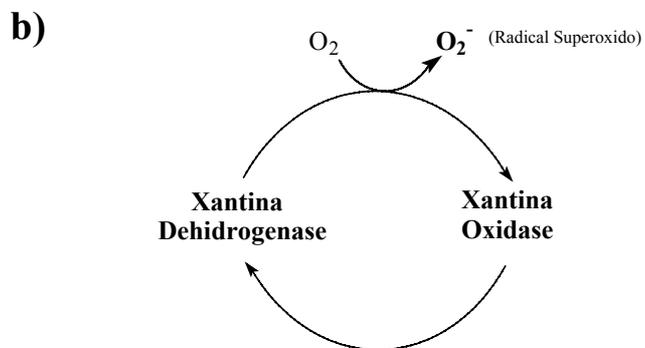
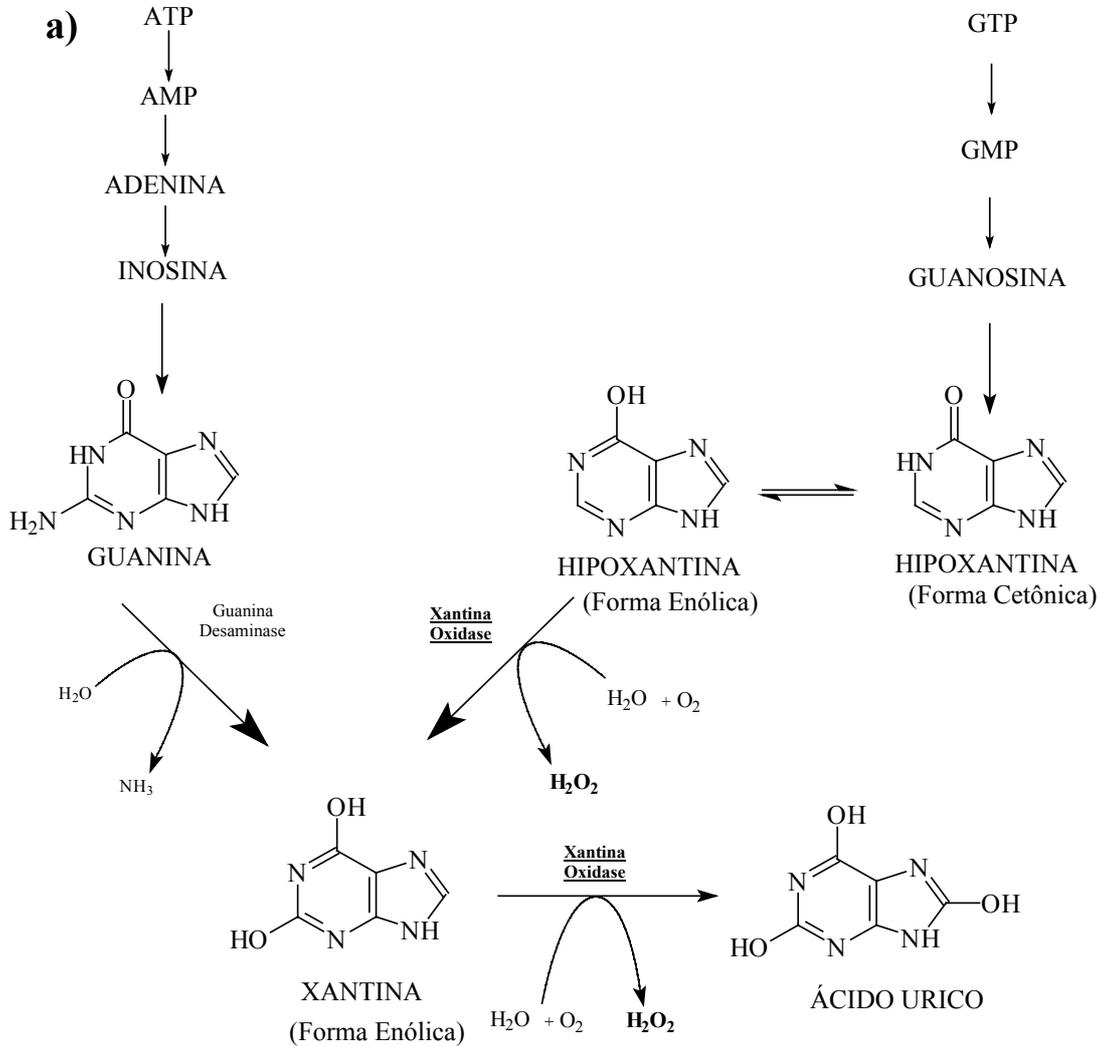
Outro ponto patológico importante ocorre durante o ciclo da isquemia – reperfusão de onde são oriundos dois processos que produzem espécies nocivas ao organismo agravando os estados debilitados dos pacientes.

O primeiro destes processos ocorre durante a isquemia, caracterizada por condições de hipóxia, ou seja, diminuição do fluxo de oxigênio, afetando principalmente o cérebro. Nesta situação a respiração celular diminui sua ação, reduzindo os níveis de ATP levando a formação de hipoxantina e depois à xantina. A degradação do GTP até a formação de guanina, outra base purina, pode também produzir xantina, e depois ácido úrico (Strayer, 1995) (Figura 1a).

Durante este processo ocorrerá a formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) que, apesar de não ser uma espécie radical, está parcialmente reduzida podendo liberar elétrons em processos oxidativos como, por exemplo, peroxidação lipídica, que entre outros pode levar as células à apoptose e também estar associados a doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (Smith et al., 1997; Eu et al., 2000; Giasson et al., 2002; Lee et al., 2002; Westphal and Kalthoff, 2003).

As concentrações aumentadas de urato levam a processos graves, como Síndrome de Lesch-Nyhan, gota e doenças renais graves, caracterizando um quadro clínico de hiperuricemia, cujos sintomas são: idiopatia, insuficiência renal, produção de cálculos renais no trato urinário, reabsorção tubular aumentada, aumento dos níveis de ácido láctico e também deposição de urato de sódio sob os tecidos, produzindo depósitos tofáceos (Gaw et al., 1999).

**Figura 1: a) Rotas de degradação de ATP e GTP b) Ciclo redox da Xantina oxidase – Xantine dehidrogenase.**



Além disto, durante a reperfusão ocorre a reoxidação da xantina dehidrogenase à xantina oxidase (Figura 1b). Neste processo o oxigênio molecular servirá de aceptor de elétrons, aumentando a concentração do radical superóxido ( $O_2^-$ ), que pode ter ações maléficas semelhantes ao peróxido de hidrogênio (Granger et al., 1981, Saksela et al., 1991; Rasmussen et al., 2000).

Estas espécies químicas também podem gerar outras substâncias danosas, como os radicais peroxinitrito ( $OONO^-$ ) e hidroxil ( $HO\cdot$ ), alterando os níveis das chamadas espécies reativas de oxigênio (ROS) (Haenen et al., 1997; Hensley et al. 2000; Heijnen et al., 2001).

Quando as produções destes radicais estão muito aumentadas, eles conseguem extrapolar os mecanismos de proteção celular (figura 2), que utiliza enzimas protetoras e moléculas antioxidantes (Forster and Estabreck, 1993), se tornando responsáveis por diversos processos patológicos associados ao stress oxidativo e apoptose (Saija et al., 1995; Peña et al., 1997). Para esta situação estão associados vários quadros patológicos como a inflamação, arteriosclerose, câncer, envelhecimento, e outros (Stadtman and Berlett, 1991; Pallardy, et al., 1997; Halliwell, 1999).

Em situações normais a SOD, superóxido dismutase, irá transformar o radical superóxido em peróxido de hidrogênio, e este por ação tanto da catalase, quanto da glutathiona peroxidase, irá ser transformado em água e oxigênio molecular (Yu, 1994).

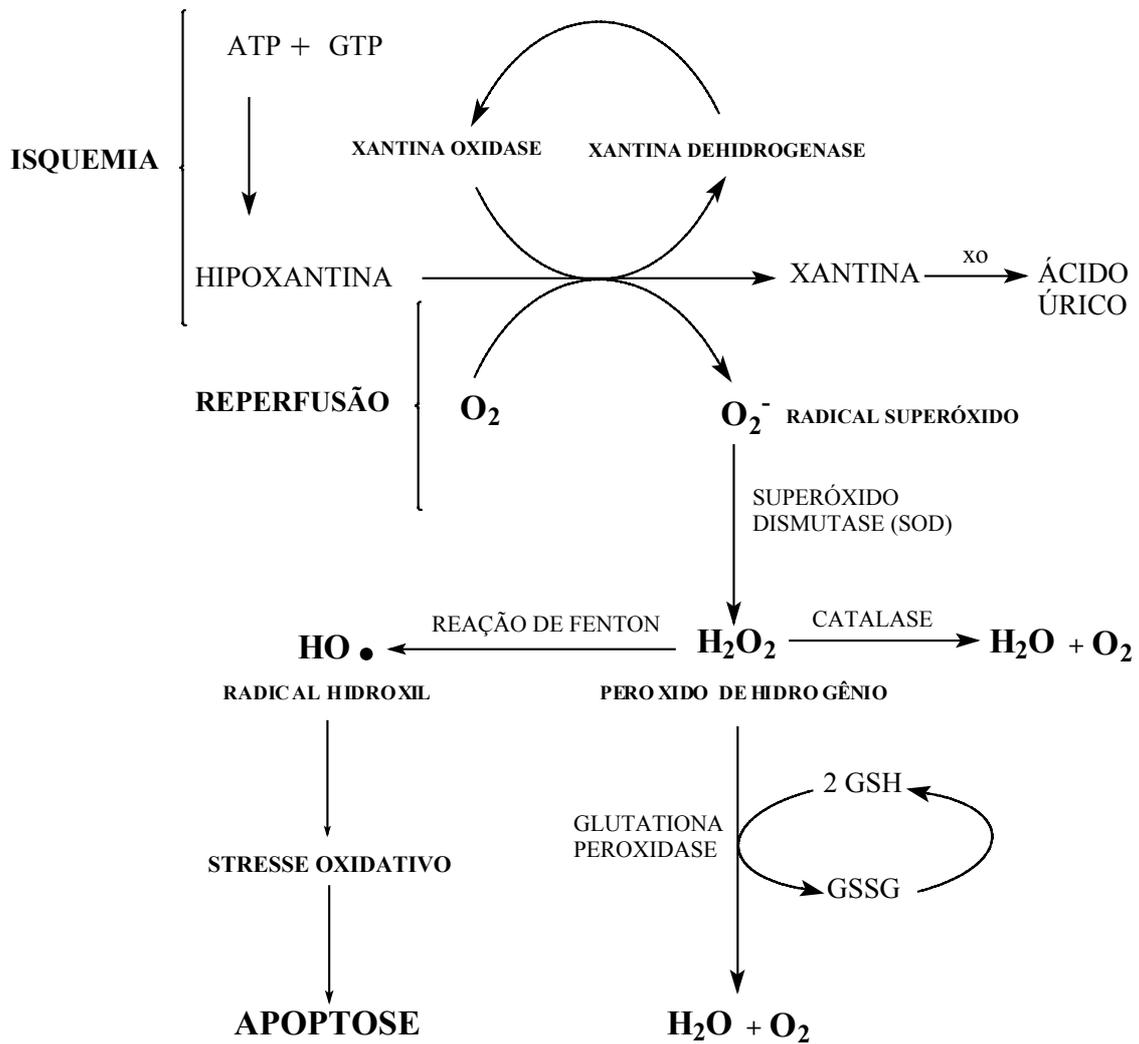
Quando em condições fisiológicas adversas, ou seja, na superprodução das espécies  $O_2^-$  e  $H_2O_2$ , as enzimas responsáveis pelas suas decomposições não conseguem transformar todas as moléculas produzidas, deixando escapar algumas.

A partir das espécies que escaparam da proteção enzimática poderá promover uma reação catalisada, principalmente por  $Fe^{+2}$  e conhecida como reação de Fenton, produzindo o radical hidroxil ( $HO\cdot$ ), para o qual não existe proteção específica, causando danos celulares por stresse oxidativo (Sussman and Bulkley, 1990).

Dentro das proteções celulares, além das enzimas protetoras, também existem as ações benéficas das vitaminas E e A, que evitam a presença de radicais livres nas regiões apolares da célula evitando danos às moléculas estruturais importantes, como por exemplo a destruição dos lipídeos de membranas por peroxidação.

A vitamina C (hidrossolúvel) desempenha este papel também porém em ambientes hidrofílicos, como o citossol.

**Figura 2: Mecanismos de proteção celular**



Diante do exposto fica muito evidente a importância do controle da atividade da xantina oxidase, quer seja para evitar a hiperuricemia e deposição de uratos de sódio, quer seja para controlar os radicais livres, ambos processos produtores de situações patológicas graves.

Duas classes de compostos testados *in vitro* mostraram altas capacidades de inibição da XO, e são alvos potenciais para produção de fármacos.

## **1.2) O allopurinol e os derivados fenilpirazólicos com capacidade de inibição da xantina oxidase**

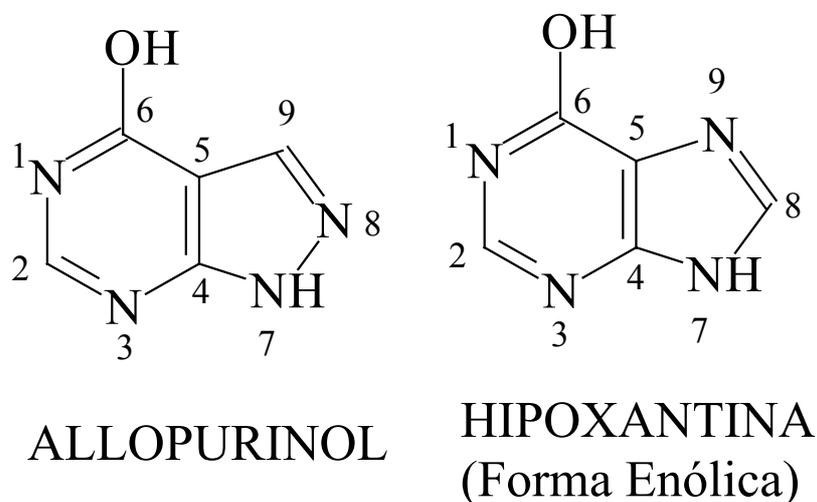
### **1.2.1) O allopurinol**

O allopurinol é um composto que atua como inibidor da xantina oxidase competindo pelo sítio catalítico que é ocupado pela hipoxantina, sendo transformado pela enzima na forma oxipurinol, interrompendo os processos que levam a produzir uratos ou radicais livres. Tem uma analogia estrutural muito alta com o substrato enzimático (Figura 3), e é atualmente considerado o mais eficiente das substâncias que efetivamente podem inibir a enzima (Ishibuchi et al., 2001).

Muitos casos de intolerância à droga têm sido descritos na literatura produzindo a Síndrome de Intolerância ao Allopurinol (SAI), caracterizado por febres, comprometimento renal e hepático, desenvolvimento de lesões eritematosas, entre outros efeitos. Talvez as reações alérgicas produzidas, possam estar associadas ao metabólito secundário do allopurinol, o oxipurinol, que apresenta um tempo de meia vida muito maior que o composto original no organismo (Singer and Wallace, 1986; Braden et al., 1994; Hamanaka et al., 1998).

Além da síndrome citada acima, ainda foi verificado que o allopurinol tem a capacidade de, sob radiação UV, se ligar a proteínas das lentes oculares produzindo sintomas que caracterizam a formação do processo de catarata (Shukla and Mishra, 1996).

**Figura 3: Analogia estrutural entre o allopurinol e a hipoxantina**



Descobrir novas drogas ou derivados menos agressivos se torna importante para atender a necessidade de ajudar na inibição da XO, impedindo o desenvolvimento de efeitos adversos e maléficos que causem menos transtornos fisiológicos aos pacientes que dependam desta medicação.

Ainda é preciso citar que tanto a xantina oxidase, quanto a xantina dehydrogenase podem ser inibidas por ação do óxido nítrico (NO) que é usado como broncodilator, regulador da função vasomotora, e outros. Este óxido pode ser inalado, absorvido por meio de medicação ou ainda produzido endogenamente (Ichimori et al., 1999). Porém quando o óxido nítrico está em concentrações altas poderá reagir com espécies radicalares disponíveis por outros caminhos que não aquele fornecido pela XO, e produzirão radicais livres do tipo peroxinitrito (Choi et al., 2002)

### 1.2.2) Os derivados fenilpirazólicos

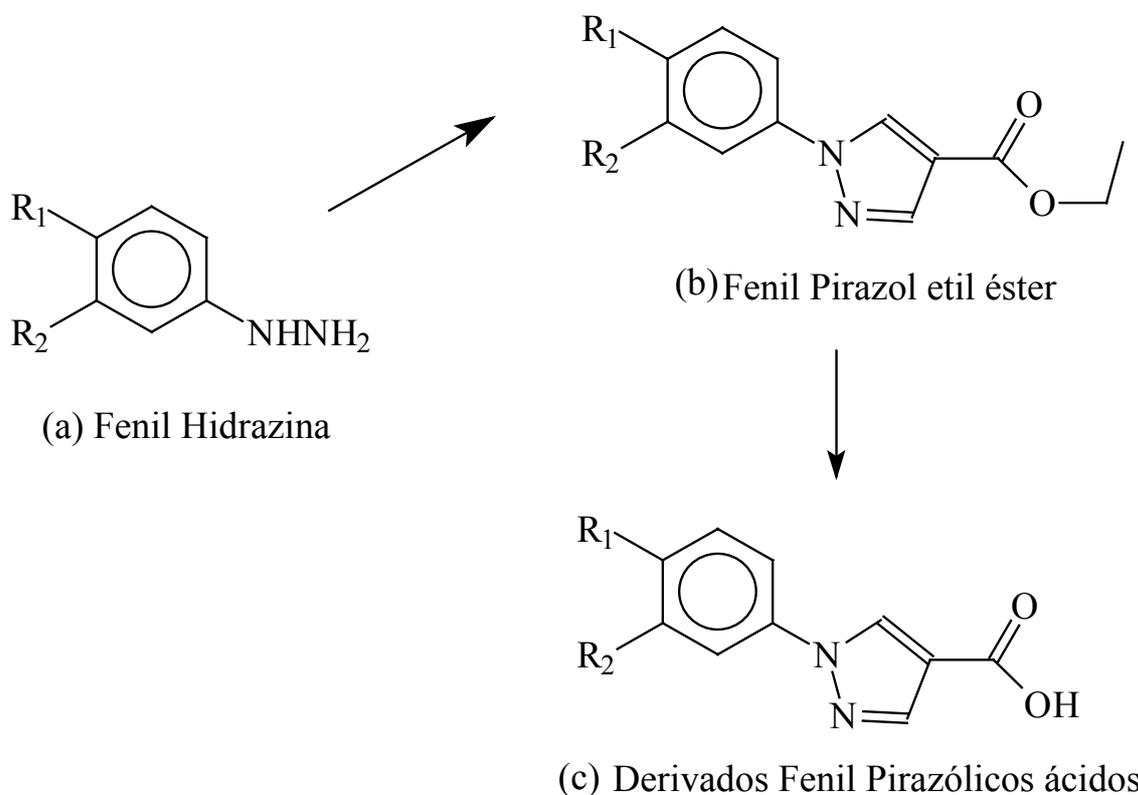
Ishibuchi et al. (2001) demonstraram ser possível sintetizar compostos com atividade de inibição sobre a xantina oxidase, com a vantagem de não apresentarem núcleos purina, evitando a formação do oxipurinol que pode servir de substrato para as enzimas transferase fosforibosil e uridina fosforilase, onde ambas produzirão derivados

ribosilados nas posições N-1 e N-7 (figura 3), respectivamente, possivelmente os metabólitos responsáveis pelas reações adversas no tratamento com allopurinol.

A rota sintética utilizada consiste na condensação de diferentes fenilhidrazinas **(a)** com etil etoximetileno cianoacetato em refluxo com etanol, seguido de deaminação com nitrito de isoamil que resulta em estruturas fenilpirazólicos etilesterificados **(b)**. Estas estruturas foram testadas e verificou-se que a presença do grupo etil éster inibe a ação de todos os compostos contra a XO.

Quando da função éster foi hidrolisada, ou seja, foi transformada em grupos carboxílicos por métodos diversos, verificou-se serem os produtos, os derivados fenilpirazólicos ácidos **(C)**, não só ativos contra a XO, como também terem seletividade em sua capacidade inibidora.

**Figura 4: Rota usada por Ishibuchi et al. (2001) para síntese de derivados fenilpirazólicos:**

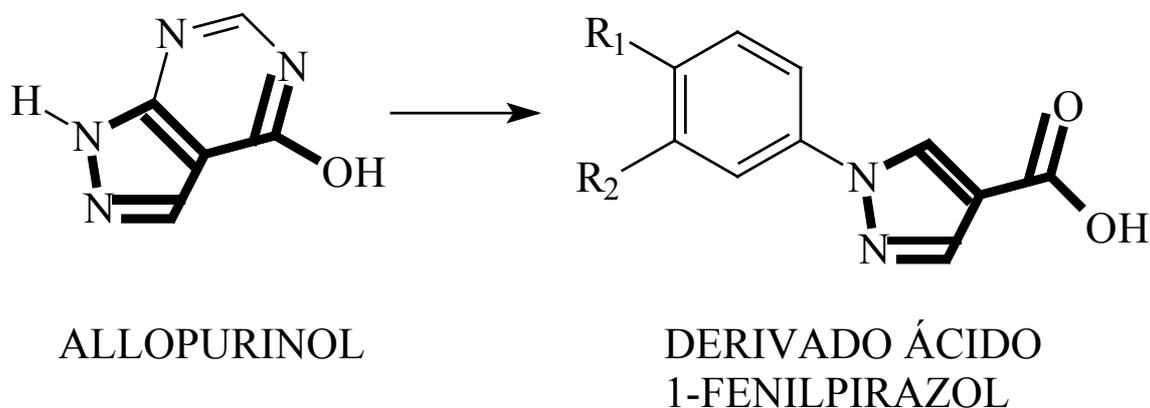


Na figura 4 é mostrado um resumo das rotas sintéticas que foram utilizada na produção do derivados fenilpirazólicos:

A estratégia de síntese utilizada manteve os átomos que se acredita atuarem na ligação do allopurinol com a XO, provocando a inibição da ação enzimática (Shukla and Mishra, 1996). Desta forma foi trocado o N-1 do allopurinol, por um átomo de oxigênio e adicionado um anel aromático no N-7, formando uma estrutura básica da classe de compostos chamados de fenilpirazóis.

A mudança global do allopurinol está mostrada na figura 5, e as partes em negrito representam as partes da molécula que foram mantidos durante a modificação estrutural.

**Figura 5: Estratégia de mudança global do allopurinol utilizada por Ishibuchi et al. (2001) para um fenilpirazol.**



Devido a sua capacidade de inibição da ação da XO, ainda que *in vitro*, os fenilpirazólicos podem se tornar uma classe de compostos de interesse para a indústria farmacêutica, evidentemente depois de pesquisar com muitos detalhes os seus efeitos colaterais, bem como os possíveis efeitos causados por seus metabólitos.

A estratégia usada para retirar o anel purínico do allopurinol poderá ser utilizada em outros fármacos quimioterápicos que são derivados das bases purinas e utilizados atualmente como medicamentos, como o aciclovir por exemplo, para tentar evitar os possíveis efeitos colaterais oriundos de metabólitos destas bases.

### **1.3) Flavonóides: Características, atividades biológicas e farmacológicas e capacidade de inibição da Xantina Oxidase.**

#### **1.3.1) Características Gerais**

O grupo dos flavonóides é constituído por uma série de estruturas polifenólicas encontradas em plantas, alimentícias ou não, e também em seus sub-produtos e divididas em classes onde, apesar de apresentarem um núcleo comum, são distingüidas por grupos funcionais ligados em posições distintas.

Dentre os muitos exemplos temos os derivados dos ácidos cinnâmico e benzóico, bem como seus derivados flavonas, flavanonas, antocianinas, isoflavonas e várias outras (Formica and Regelson, 1995).

Devido à presença de quantidades apreciáveis de flavonóides em alimentos o seu consumo diário por um humano é muito significativo e a busca de entender melhor os flavonóides é primordial para o domínio de suas ações biológicas.

Suas funções dentro dos vegetais e a descoberta de novas estruturas destes compostos já caracterizados como importante para o desenvolvimento das plantas domina um grande ramo da fitoquímica e fisiologia vegetal, e as pesquisas destas substâncias têm sido aprofundadas significativamente e são descritas cada vez mais ações farmacológicas interessantes e importantes ao tratamento de diversas doenças, testadas tanto *in vivo*, quanto *in vitro* (Di Carlo et al., 1999). Estas serão discutidas logo mais.

A tabela 1 mostra valores de flavonóides, totais ou não, estimados por estudos realizados para diversas plantas utilizadas na alimentação humana, em dietas diárias, baseados em padrões americanos, onde se estima que de todos os flavonóides consumidos diariamente, cerca de 5% esta na forma de quercitina (Pierpoint, 1986; Hertog et al., 1992; Hertog et al., 1993).

**Tabela 1: Consumo de flavonóides em dietas diárias, baseados em padrões alimentares americanos:**

Alimentos	Flavonóides	Quantidade
Cereais	Totais	44 mg/dia
Batatas, bulbos e raízes	Totais	79 mg/dia
Nozes e amendoins	Totais	45 mg/dia
Cebola	Quercitina	284 – 486 mg/kg
Feijão fresco	Quercitina	32 – 45 mg/kg
Brócoli	Quercitina	30 mg/kg
Tomate	Quercitina	8 mg/kg
Frutas em geral	Quercitina	15 – 72 mg/kg
Café e vinho branco	Quercitina	1 mg/l
Vinho tinto	Quercitina	4 a 16 mg/l
Suco de uva	Quercitina	7 –9 mg/l
Sucos em geral	Quercitina	5 mg/l
Chás em geral	Quercitina	10 a 25 mg/l

De maneira geral os flavonóides são compostos amplamente distribuídos no reino vegetal, e suas rotas biossintéticas podem gerar substâncias usadas tanto para utilização em pigmentação, como atrativos para diversos polinizadores em flores, e também elemento constitutivo em frutas, folhas e sementes.

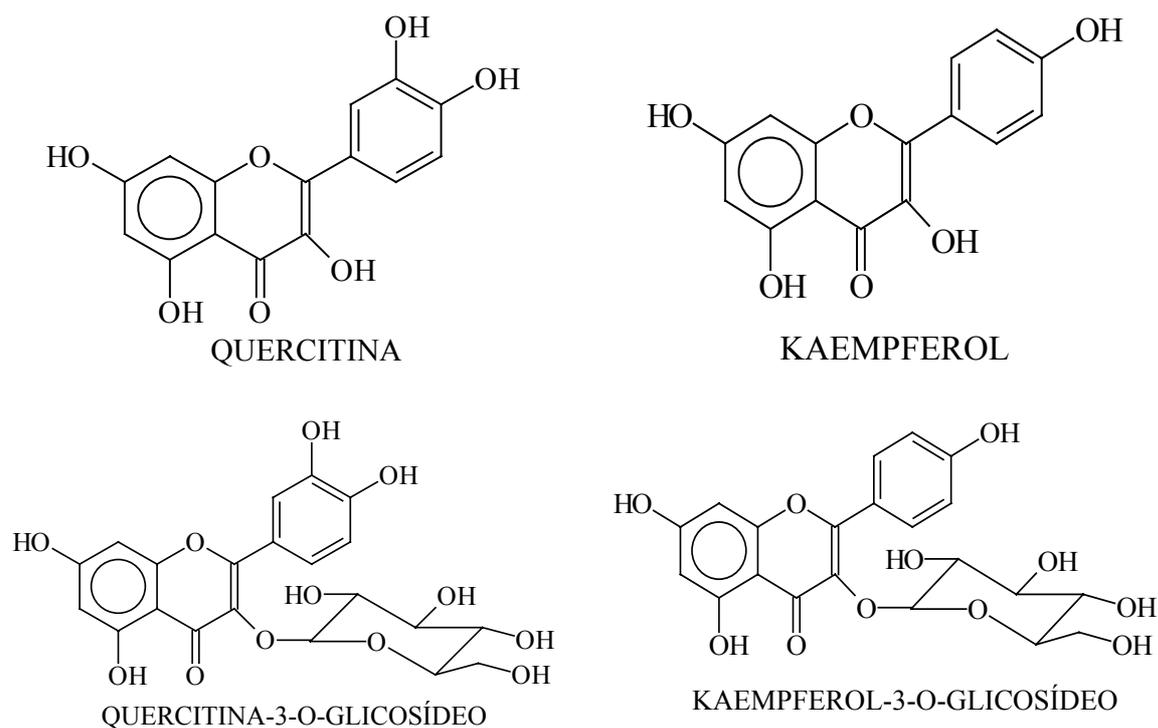
Além destas funções, podem ainda, serem usados como moléculas protetoras na formação de radicais livres por ação da luz UV-B, e foi verificado que a epiderme de folhas verdes submetidas a estresse por radiação tem suas concentrações de diversos tipos diferentes de flavonóides aumentadas.

Também protegem contra microorganismos, inibindo o crescimento principalmente de fungos, além de pragas e animais, já que estas moléculas são bem pouco palatáveis, e causam repugnância em lagartas e outros animais, inclusive mamíferos como macacos (Harbone and Williams 2000).

As estruturas destas classes podem ser encontradas na forma aglicosilada, como, por exemplo, a quercitina, naringenina ou ainda myricetina. Porém é mais freqüente encontrá-las no reino vegetal na forma glicosilada, unidas a moléculas de açúcares como a rhamnose, rutinose e ainda é possível uma mistura de glicosídeos, como a rhamno-glucosídeos, formando respectivamente os derivados flavonóides glicosilados conhecidos como quercetrin, rutina e naringina (Spanos and Wrolstad, 1992).

Alguns exemplos destes flavonóides são mostrados na figura 6.

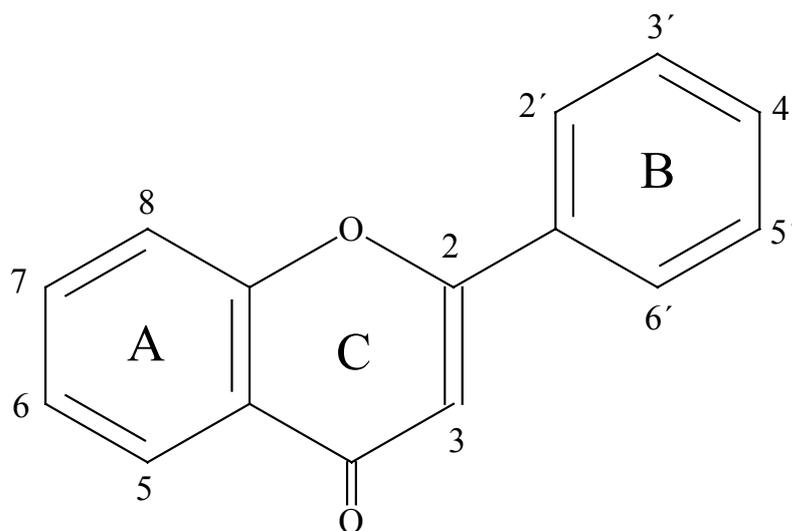
**Figura 6: Flavonóides aglicosilados: a) Quercitina e b) Kaempferol e flavonóides glicosilados: c) Quercitina-3-O-glicosídeo e d) Kaempferol-3-O-glicosídeo**



### 1.3.2) Biossíntese e estrutura geral de um flavonóide:

A molécula básica de um flavonóide possui três anéis, sendo dois aromáticos, formando um esqueleto carbônico de 15 átomos, numa estrutura classificada como benzo- $\gamma$ -pirona (Di Carlo et al., 1999). Os dois anéis aromáticos são denominados A e B e entre ambos é formado por uma estrutura de três carbonos, que gera o ciclo do anel C, mostrado na figura 7.

**Figura 7: Estrutura e numeração básica de um flavonóide:**

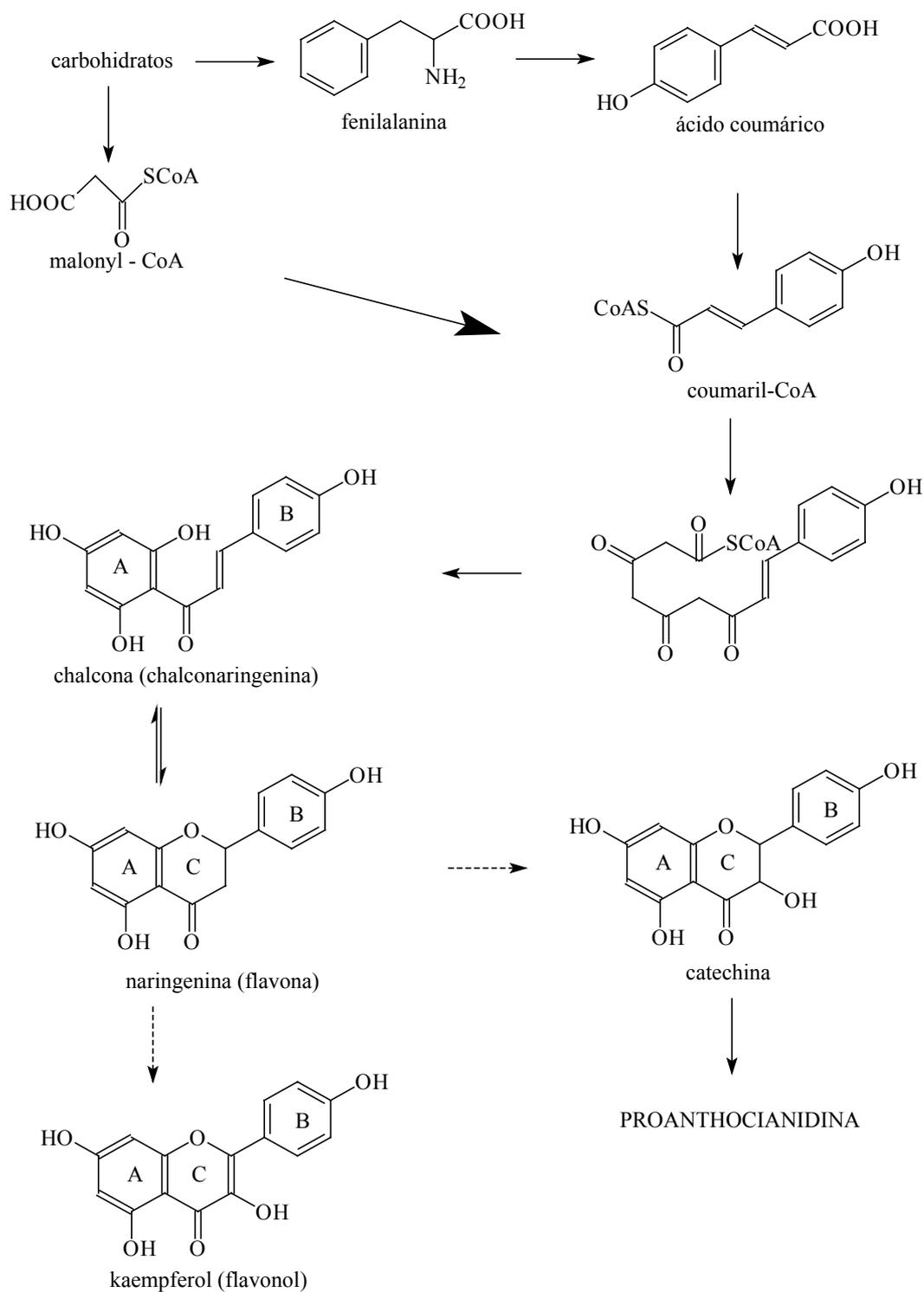


A principal rota biossintética dos flavonóides em vegetais, tem como ponto comum a formação da flavona naringenina, que através de uma série de reações irão produzir os mais diferentes tipos de flavonóides, nas mais diversas classes, reunindo hoje cerca de 4000 compostos diferentes (Harbone, 1994; Stevens et al., 1998).

A figura 8, mostra a rota principal de formação da naringenina (Zuurbier et al., 1995; Barron and Ibrahim, 1996). Os compostos que são os precursores das flavonóides são os aminoácidos, fenilalanina e tirosina, além do malonato, e todos podem ser gerados a partir das rotas catabólicas dos carboidratos.

A fenilalanina primeiramente é transformada em ácido coumárico que em conjunto a três moléculas de malonato são ativados com acetil coenzima A, formando respectivamente coumaril-CoA e malonil-CoA, que se condensam numa estrutura ativada que servirá de substrato para ação da enzima calcone sintase que vai produzir uma calcona conhecida como calconaringenina.

**Figura 8: Principal rota biossintética dos flavonóides em uma planta:**



Nesta seqüência outra enzima a calcone isomerase, irá transformar a calconaringenina na flavanona naringenina, que poderá sofrer agora uma série de reações de oxidação, redução, hidroxilação, metilação, prenilação e glicosilações, que darão origem a flavononas, flavonóis, dihidroflavonóis, e várias outras classes de flavonóides glicosilados ou não.

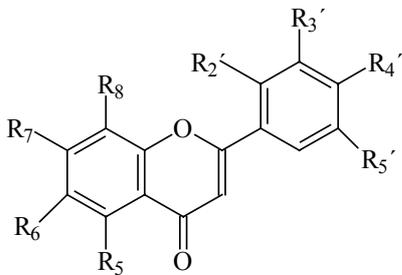
### 1.3.3) As diversas classes de flavonóides

Ainda que os flavonóides tenham a estrutura básica mostrada na figura 7, as diferentes classes apresentam particularidades no que tange aos tipos de ligações, quantidades de grupos hidroxilas, presença ou não de grupos cetonas e são estes fatos que determinam a classe do composto.

Dentre as diversas possíveis, podemos citar como exemplos principais as classes de compostos mostrados abaixo (Fórmica and Regelson, 1995; Pietta, 2000), onde quando não citado a ligação no anel corresponde ao hidrogênio:

- a) **Flavona:** caracterizadas pela presença de ligação olefínica entre os carbonos 2 e 3, e ausência de hidroxila na posição 3 (tabela 2):

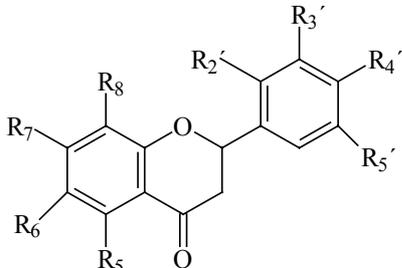
**Tabela 2: Exemplos de Flavonas:**

Estrutura geral	Nome	R <sub>5</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>3'</sub>	R <sub>4'</sub>
	Luteonina	OH	OH	OH	OH
	Apigenina	OH	OH		OH
	Chrysin	OH	OH		

Quando não indicado os outros grupos R são átomos de hidrogênio

- b) **Flavanonas:** caracterizadas pela ausência da ligação olefínica entre os carbonos 2 e 3, possibilitando o posicionamento do anel B em posição R ou S. Também é caracterizado pela ausência de hidroxila na posição 3 (tabela 3).

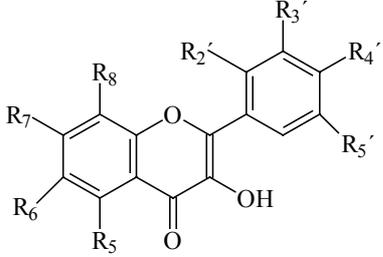
**Tabela 3: Exemplos de Flavanonas:**

Estrutura geral	Nome	R <sub>5</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>3'</sub>	R <sub>4'</sub>
	Hesperetina	OH	OH	OH	OCH <sub>3</sub>
	Naringenina	OH	OH		OH

Quando não indicado os outros grupos R são átomos de hidrogênio

- c) **Flavonóis:** caracterizadas pela presença de ligação olefínica entre os carbonos 2 e 3, e também da hidroxila na posição 3 (tabela 4):

**Tabela 4: Exemplos de Flavonóis:**

Estrutura geral	Nome	R <sub>5</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>3'</sub>	R <sub>4'</sub>	R <sub>5'</sub>
	Quercitina	OH	OH	OH	OH	
	Myricetina	OH	OH	OH	OH	OH
	Kaempferol	OH	OH	OH		
	Fisetina		OH	OH		OH

Quando não indicado os outros grupos R são átomos de hidrogênio

- d) **Flavanas:** caracterizadas pela ausência de ligação olefínica entre os carbonos 2 e 3, e também da hidroxila na posição 3 (tabela 5):

**Tabela 5: Exemplos de Flavanas:**

Estrutura geral	Nome	R <sub>3</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>3'</sub>	R <sub>4'</sub>
	Catechina	OH	OH	OH	OH	OH
	Meciadonol	OCH <sub>3</sub>	OH	OH	OH	OH

Quando não indicado os outros grupos R são átomos de hidrogênio

### 1.3.4) Os flavonóides e suas funções biológicas:

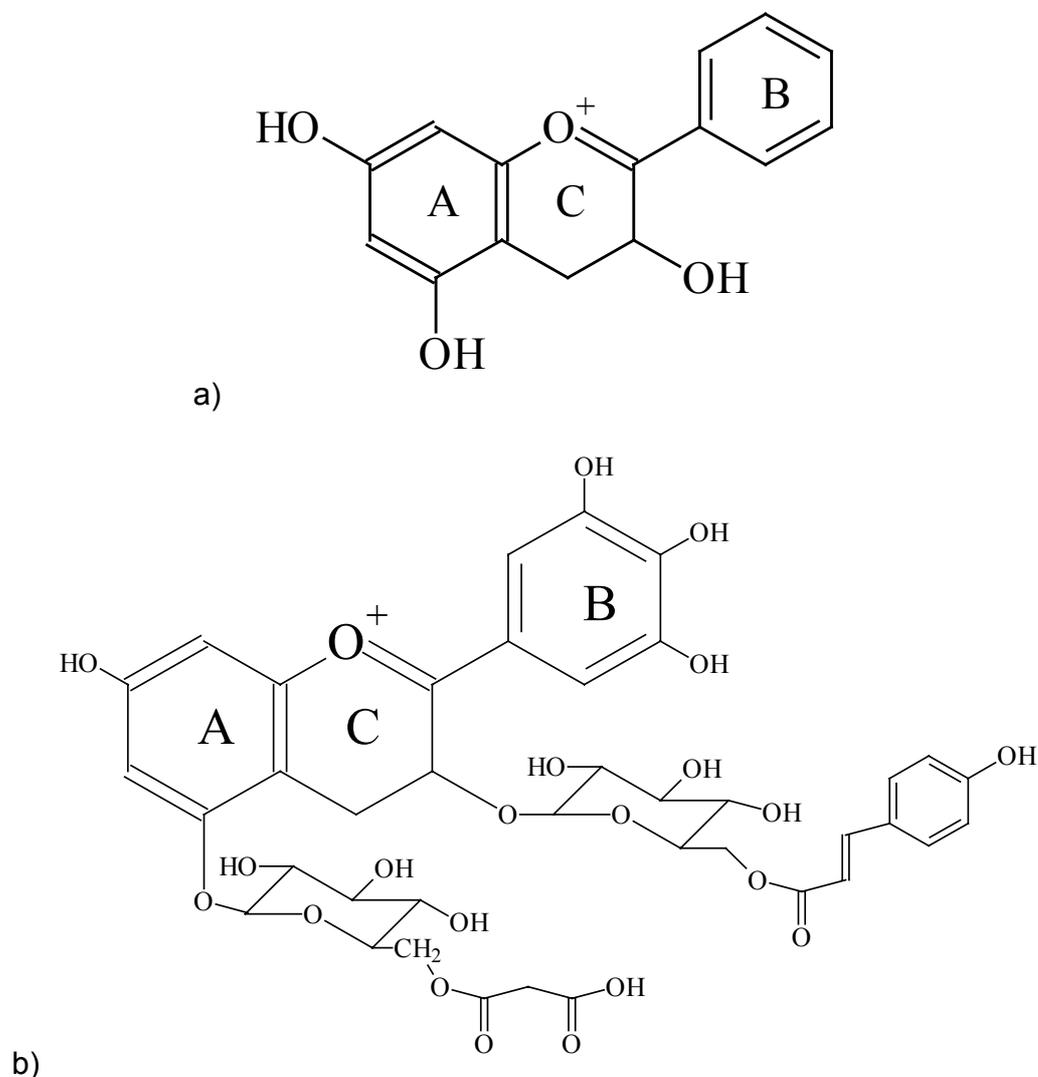
#### 1.3.4.1) Flavonóides usados na pigmentação vegetal:

As antocianinas (figura 9 a) estão entre os principais contribuintes utilizados pelas plantas na formação das cores, e o principal composto desta função é o derivado delphinina glicosídeo conhecido como malonylawobanina (figura 9 b), responsável pela coloração das flores azuis das angiospermas.

Esta coloração é alcançada quando a delphinina, ou seus derivados, é complexada com um copigmento do tipo flavona, e também um ou mais metais na forma catiônica que, no conjunto, promovem a emissão de luz característica.

Plantas menos evoluídas têm suas colorações baseadas em outro flavonóide conhecido como cianidina que possibilita a formação de colorações que vão do vermelho até o magenta, como ocorre em plantas como as Rosáceas (Gottlieb, 1982; Kondo et al., 1992).

**Figura 9: Alguns exemplos de flavonóides em uma planta:**



Outro complexo de coloração estudado é aquele característico da cor vermelho púrpuro das orquídeas, onde o flavonóide associado ao copigmento, e aos metais, são derivados da cianidina e da peonidina glicosídeos (Figueiredo et al., 1999; Bloor (1998).

A tabela 6 fornece alguns exemplos de flavonóides complexos que foram encontrados em famílias vegetais diferentes e atribuídos à função pigmentosa azul nas angiospermas:

**Tabela 6: Complexos Flavonóides – copigmento de plantas com flores de coloração azulada<sup>a</sup>.**

Família	Planta	Complexo de pigmentação <sup>b</sup>	Referência.
Compositae	<i>Felicia amelloides</i>	Dp 3-neohesperidosídeo-7-malonilglicosídeo, swertisina 2''''-ramnosídeo-4'-glicosídeo	(Bloor, 1999))
Labiatae	<i>Salvia uliginosa</i>	Dp 3- (p-coumarilglicosídeo)-5-(4-acetil-6-malonilglicosídeo), Apigenina 7-celobiosídeo, apigenina 7-celobiosídeo-4'-glicosídeo.	(Ishikawa et al., 1999))
Nymphaeaceae	<i>Nymphaea caerulea</i>	Dp 3'-(gal.oilgalactosídeo), Dp 3'-(gal.oilgalactosídeo), copigmento flavona desconhecido	(Fossen et al., 1999)
Pontederiaceae	<i>Eichhornia crassipes</i>	Dp 3-gentiobiosídeo, apigenina 7-malonilglicosídeo.	(Toki et al., 1994)
Rhamnaceae	<i>Ceanothus papillosus</i>	Dp 3-rutinosídeo-7- (p-coumarilglicosídeo)-3'-glicosídeo, Dp 3-rutinosídeo, 7,3'-(di-p-coumarilglicosídeo), Kaempferol 3-xylosil (1→2) rhamnosídeo	(Bloor, 1997)

<sup>a</sup> = A partir de Harbone et al. (2000).

<sup>b</sup> = Formados pelo flavonóide pigmento, copigmento e metal, respectivamente. Abreviações: Sc = Succinilcianina, Dp = Delfinidina, Pn = Peneodina, Cy = Cianidina.

### 1.3.4.2) Flavonóides usados como protetores contra radiação UV-B

A radiação ultravioleta, particularmente a faixa conhecida por B (280-315 nm) é a banda do espectro de radiação solar de menor comprimento de onda e maior energia, que tem a capacidade de passar pela camada de ozônio, e ao incidir nas moléculas das folhas são absorvidas, entre outras formas, pelos pigmentos complexos formados pelos flavonóides.

Em geral, estes pigmentos complexos absorvem na mesma região fornecida pelo UV-B funcionando assim como um filtro evitando que a radiação atue sobre outras moléculas celulares importantes, como por exemplo, o DNA, modificando e levando a formação de células defeituosas.

**Tabela 7: Flavonóides identificados em plantas com capacidade de proteção contra radiação UV-B<sup>a</sup>:**

Planta	Localização	Flavonóide com ação protetiva <sup>b</sup>	Referência
<i>Brassica napus</i>	Células epidérmicas	Qc 3-sophorosideo-7-glicosideo, Qc 3-sinapyl sophorosideo-7-glicosideo.	(Olsson et al., 1998)
<i>Gnaphalium lúteo-album</i>	Folhas cerosas	Calycopterina e 3'-metoxi calycopterina	(Cuadra et al., 1997)
<i>Marchantia polymorpha</i>	Talos	Lt 7-glucoronideo e Lt 3,4'-diglucoronideo	(Markham et al., 1998 a)
<i>Oryza sativa</i>	Células epidérmicas	Iso-orientina acilada glicosideo	(Markham et al., 1998 b)
<i>Pinna silvestris</i>	Células epidérmicas	3'',6''-di-p-coumaril kaempferol 3-glicosídeo, 3'',6''-di-p-coumaril-Qc-3-glicosídeo	(Schnitzer et al., 1996)
<i>Quercus ilex</i>	Folhas pilosas	Kaempferol acilados glicosídeos.	(Skaltsa et al., 1994)

<sup>a</sup> = A partir de Harbone et al. (2000)

<sup>b</sup> = Abreviações: Qc = Quercitina, Lt = luteonina, Cy = Cianidina.

Experimentos fisiológicos forneceram evidências que plantas submetidas à radiação UV-B artificial promovem mudanças nas rotas sintéticas dos flavonóides, alterando a sua concentração nas células epidérmicas, de folhas cerosas, folhas pilosas e talos. A tabela 7 mostra alguns exemplos de flavonóides que podem exercer a função de proteção contra radiação UV-B:

As observações gerais nestas plantas e outros estudos indicam os genótipos mais resistentes aos danos da radiação UV-B irão promover um aumento da síntese, tanto de flavonóides, quanto de outros polifenóis, sendo mais freqüente a produção de flavonas e flavonóis glicosídeos. Isto é bem coerente com o fato que flavonóides glicosubstituídos absorvem fortemente na região de 280-320 nm e, portanto servem como filtros UV.

#### **1.3.4.3) Flavonóides usados como proteção antimicrobiana**

Um dos atributos dos flavonóides que menos desperta divergências é sua função antimicrobiana (antifungos, antibactérias e antivírus), pois são os agentes constitutivos que produzirão as fitoalexinas em resposta a ataques microbianos (Grayer and Harbone, 1994; Harbone 1994b). A maioria dos flavonóides com esta ação é das classes dos isoflavonóides, flavanas e flavanonas. A tabela 8 mostra alguns exemplos de flavonóides com ação antimicrobiana:

À presença de hidroxilas fenólicas é atribuída a capacidade de inibir o crescimento das micelas, que se verifica na grande maioria dos casos testados. Com isso se cria a expectativa que o aumento do número de substituintes hidroxilas, metoxilas ou glicosilas também pudessem produzir um aumento desta ação anti – fúngica. No entanto foi verificado por Picman et al. (1995) que ocorria exatamente o contrário, ou seja, existe uma tendência na diminuição da atividade do composto com o aumento das hidroxilas. Mais ainda que existam evidências contrárias, as calconas

hidroxiladas são tão mais efetivas, quanto maior o número de hidroxilas, como foi demonstrado por Gafner et al. (1996).

**Tabela 8: Alguns flavonóides com ação antimicrobiana <sup>a</sup>:**

Flavonóide	Ação Biológica	Referência
3-hidroxi-8,9-metilenodioxiptero-carpan (maackian)	Anti – fúngico	(Stevenson and Haware, 1999)
Luteolina 7-(2''-sulfa-glucosídeo)	Anti – fúngico	(Jensen et al., 1998)
(2S)-4'-hidroxi-5,7,3'-trimetoxi flavana	Anti – fúngico	(Garo et al., 1996)
4,4'-dihidroxi-2'-metoxi-3'-prenil	Antibacteriana	(Haraguchi et al., 1998)
5,7,2',6'-tetrahidroxi-6-prenil-8-lavanduli- 4'-metoxi flavanona	Antibacteriana	(Linuma et al., 1994)
5,6,7-trihidroxi flavona-7-glucoronideo	Anti – viral	(Li et al., 1997)
Quercitina-3-(2''- galoilarabinopiranosídeo)	Anti – viral	(Kim et al., 1998)

<sup>a</sup> = A partir de Harbone et al. (2000).

#### 1.3.4.4) Ação dos flavonóides na interação planta animal

Já é amplamente aceito que os polifenóis têm papel importante na proteção vegetal contra insetos e mamíferos de hábitos herbívoros. Os principais estudos foram focados em flavanas poliméricas, proanthocianidinas, flavonas, flavonois e isoflavonas de baixo peso molecular (Harbone, 1995 e 1999 a). Três glicoflavonas: a schaftosideo, isoschaftosideo e a neoschaftosideo, foram isoladas de plantas de arroz e testadas como inibidores da ação de insetos sugadores como o *Niloparvatta lugens*, tendo como resultado a inibição da atividade de ingestão da seiva (Grayer et al., 1994).

No arroz foi identificado também que a flavanona sakuranetina e o ácido clorogênico fenilpropanóide têm suas concentrações foliares aumentadas em respostas à infecção do nematóide *Ditylenchus angustus*, um grande problema nas culturas de arroz do sudeste da Ásia (Plowright et al., 1996). A mesma sakuranetina é observada como resposta à radiação UV e ataque fúngico, mostrando ser uma molécula essencial para a proteção das plantas de arroz (Dillon et al., 1997).

Insetos que se alimentam de folhas verdes tem sua dieta adaptada para ingestão de flavonóides. Entretanto foi demonstrado que alguns gêneros como *Helicoverpa*, *Heliothis*, *lymantria* e *Trichoplusia*, são sensíveis a certos flavonóides glicosilados em sua dieta, principalmente quando se encontram no segundo estágio larval. Foram verificados que extratos purificados de *Pinnus banksiana* que continham flavonóides glicosilados, bem como rutina e quercitina 3-glicosídeo, quando administrado na dieta destas larvas promoviam um aumento da mortalidade e diminuição do crescimento (Beninger and Abou-Zaid, 1997).

Ainda dentro das interações plantas – animais, algumas espécies de borboletas como a *Danaus plexippus* é dependente da presença de flavonóides glicosilados para haver a ovoposição. Na sua alimentação uma das plantas mais utilizadas é a *Asplepias curassavica*, pois consegue produzir um estímulo ovopositor pela presença de quatro flavonóides glicosídeos: dois 3-dirhamnosil galactosídeo, a 3-rutinosídeo e a 3-rhamnosil galactosídeo da estrutura básica da quercitina.

Ao que parece a estrutura fundamental necessária para ovoposição é a presença de quercitina 3-galactosídeo, com adição de açúcares nas posições 2`` e/ou 6`` da galactose (Haribal and Renwick, 1996 e 1998).

Os flavonóides ainda são usados pelas plantas como defesas contra herbívoros, através de compostos das classes das procianidinas, que quando condensados em diferentes graus formam tanino (Stevens et al., 1998). Foi verificado por Reynolds et al. (1998) que macacos africanos tem alta rejeição por plantas com alto teor de tanino, porém isto não é verdade se são analisados chipanzés, os quais possuem uma certa tolerância ao tanino, quando a alimentação possui maior nível de açúcar livre. Por exemplo, se alimentação é feita a partir de figos, eles tendem a regurgitar as sementes que possuem altos teores de taninos.

Outras plantas como os *Eucalyptus ovata* e o *Eucalyptus viminalis*, que servem de alimentos para ursos Koalas, apresentaram em estudos ecológicos realizados por Lawler et al. (1998) que as quantidades de folhas consumidas por estes animais em árvores individuais variavam de maneira bem significativa.

Bioensaios realizados naquelas espécies, mostraram a presença de polifenóis floroglucinol, macrocarpol G e jensenona, que são estruturalmente relacionados às procianidinas geradoras de taninos. Ainda, dentro destes, foram feitas dietas artificiais que mostraram que concentrações de cerca de 2% de macropol G pode reduzir o consumo alimentar em cerca de 90%, o que pode indicar ser este agente uma forte fonte vegetal de proteção contra os herbívoros.

Alguns estudos (Hagerman and Robbins, 1993; Juntheikki et al., 1996) têm demonstrado uma adaptação evolutiva importante, onde proteínas salivares ricas em resíduos de prolina têm uma alta afinidade pelas moléculas de tanino que se complexam fazendo uniões por interações de hidrogênio e passam pelo trato estomacal sem causar danos. Até aonde foi possível verificar, esta adaptação é restrita aos herbívoros ainda que em níveis diferentes, dependendo da região geográfica e das espécies envolvidas, porém ausentes em carnívoros. Também foi verificado que estas proteínas têm esta capacidade de ligação quando os taninos estão na forma complexa e não como moléculas hidrolisáveis.

#### **1.3.4.5) Ações benéficas dos flavonóides ao organismo humano**

Dentre os mais de 4000 compostos das diversas classes dos flavonóides seria bem improvável não encontrar moléculas que desempenhassem papéis biológicos no organismo humano. Uma das possíveis vantagens destes compostos é que estão presentes na dieta cotidiana humana, como demonstrados na tabela 1 e, por tanto, devem ter papel tóxico pouco provável.

Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que estes compostos podem ser potencialmente usados contra diversas patologias humanas, e este campo de estudo está cada vez mais amplo e abrangente.

Aos flavonóides, além da capacidade de inibir a xantina oxidase, também foram relatados diversos efeitos biológicos importantes, como a capacidade anti-oxidativa, antitumoral, antiulcerogênica, e muitas outras.

Um dos aspectos mais estudados dos flavonóides é sua capacidade de remoção de radicais livres de diversos tipos. Estas espécies estão associadas ao estresse oxidativo, causando morte celular que podem estar associados à processos de neurodegenerescência importantes como os Mals de Parkinson e Alzheimer (Smith et al., 1997; Eu et al., 2000; Giasson et al., 2002; Lin et al., 2002). Também ao estresse oxidativo estão associados algumas formas de câncer devido aos danos provocados pelos radicais às moléculas de DNA (Halliwell, 1999).

A capacidade de danos causados por radicais livres também remete às doenças coronarianas. Dentre os vários fatores que agravam este quadro clínico, estão situações que devem levar em conta: idade, sexo, obesidade, fumo, dietas e outros.

Além disso, o risco deve ser analisado em também em função da capacidade dos radicais livres atuarem como pró-oxidantes sobre as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), possibilitando a sua deposição e formação de placas arterioscleróticas no endotélio, facilitada pela aderência dos macrófagos (De Vries et al., 1998). Foi demonstrado que certos flavonóides tem a capacidade de impedir que o LDL sofra modificação oxidativa, fornecendo assim proteção contra riscos arteriosclerótico (Whalley et al., 1990; Mangiapane et al., 1992; Rankin et al., 1993).

Um alto quociente LDL/colesterol é um forte indicativo de possibilidade de ocorrência de doença coronariana, uma vez que o excesso de colesterol irá ajudar a diminuir a atividade de receptores de LDL (Leite, 1994; Ylä – Herttuala et al., 2000).

Em função desta relação, os povos mediterrâneos têm sido estudados, uma vez que sua dieta apresenta um alto índice de gorduras e álcool, reconhecidamente fatores de riscos para doenças coronarianas, no entanto o quociente LDL/colesterol é pequeno e o índice de doenças cardíacas e degenerativas são bem pequenos nestes povos, gerando o chamado “Paradoxo da França”.

Uma possível explicação para este fato está no alto consumo de vinhos e azeites pelos habitantes da região mediterrânea, e estes produtos alimentícios têm uma alta concentração de flavonóides, possivelmente os responsáveis pela proteção contra os

efeitos oxidativos sobre o LDL e liberação de radicais danosos como o hidroxil (Spignoli, 2000; Sun et al., 2002).

Diversos estudos mostraram que os flavonóides tem diferentes capacidades de fazer a limpeza dos radicais livres que escapam dos mecanismos de proteção celular (enzimas como a SOD, catalase e vitaminas como A,C e E), funcionando também como fatores protetivos aos danos oxidativos (Cotelle et al., 1992 e 1996; Salah et al., 1995; Haenen et al., 1997; Pietta, 2000; Heijnen et al., 2001; Burda and Oleszek, 2001; Heim et al., 2002; Choi et al., 2002; Cornish et al., 2002).

Ainda contra ação oxidativa dos radicais livres verificou – se que os flavonóides fornecem proteção contra espécies que atacam as membranas celulares causando peroxidação lipídica, o que acarreta aumento da permeabilidade celular com a entrada de cálcio, saída de citocromo c das mitocôndrias e ativação da esfingomielienase, todos processos que ativam as cascatas de caspases, proteínas sinalizadoras de morte celular (Das and Ray, 1988; Hodnick et al., 1994; Saija et al., 1995; Peña et al., 1997; Hensley et al., 2000; Patel et al., 2001).

Diversas revisões mostram muitas outras ações benéficas dos flavonóides no organismo humano, como atividade estrogênica, atividade antiinflamatória e muitas outras (Middleton and Kandaswami, 1992; Formica and Regelson, 1995; Gil et al., 1997; Mantle et al., 1999; Di Carlo et al., 1999; Harbone and Williams, 2000; Rajnarayana et al., 2001; Crouvezier et al., 2001).

#### **1.3.4.6) Flavonóides que inibem a Xantina Oxidase**

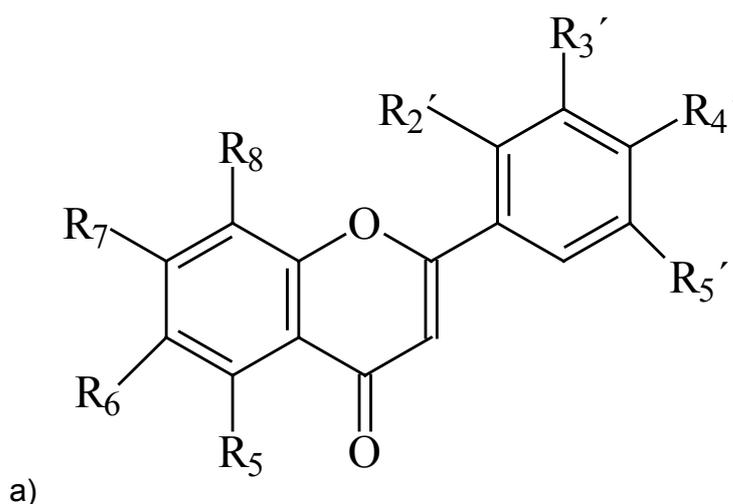
Costantino et al. (1996) e Rastelli et al. (1995) relataram uma série de compostos derivados de flavonas, onde o esqueleto básico da classe foi mantido e feitos uma série de modificações estruturais nas posições específicas R4', introduzindo diversos grupos como: metoxi, amino, nitrila, nitro, e outros. A estrutura básica das flavonas é mostrada na figura 10a.

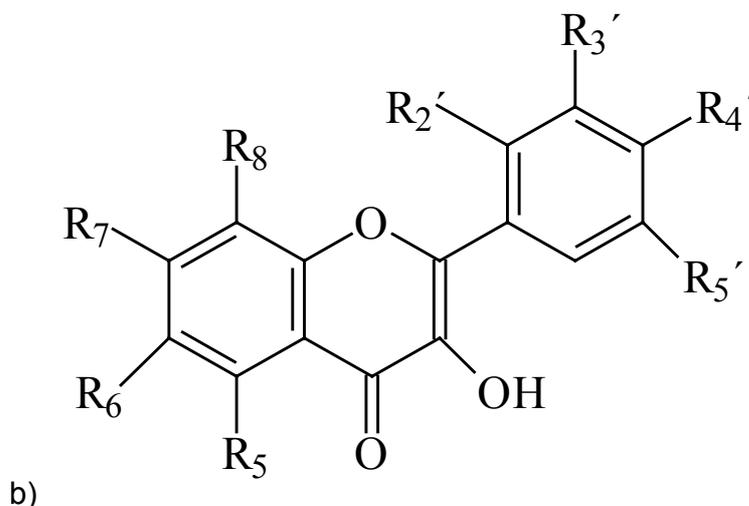
Como resultado destas modificações os autores conseguiram verificar que os derivados das flavonas possuíam capacidade distinta em inibir a XO, com valores de  $IC_{50}$  na faixa de 1 a 10  $\mu\text{m/l}$ , em função do tipo de substituinte usado.

Destes trabalhos algumas conclusões importantes foram tiradas, porém um das principais é que as flavonas se encontram em um equilíbrio entre a forma neutra e a aniônica, sendo esta última a forma ativa. Esta situação ocorre na hidroxila C-7 da flavona que servirá de doador protônico e irá interagir com a enzima na forma dissociada.

Cotelle et al. (1992) demonstraram através de 10 compostos do tipo flavonas, metoxiladas em posições diversas, ser possível inibir a produção do radical superóxido ( $O_2^-$ ) formado pelo sistema xantina / xantina oxidase contendo no meio reacional Lucigenina (nitrato de bis-N-metil-acridinium). Foi verificado que as flavonas que mantinham a hidroxila na posição C-7 mostravam maior poder inibidor, enquanto que se nesta posição ocorresse a entrada de um grupo metoxi, fazia com que a atividade de inibição fosse praticamente anulada.

**Figura 10: estrutura básica: a) de uma flavona; b) de um flavonol e de seus possíveis grupos substituintes.**





Van Hoorn et al. (2002) testaram uma série de flavonóides de diferentes classes (flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas e catequinas), verificando que os melhores resultados com relação ao poder de inibição sobre a xantina oxidase foram obtidos com os compostos da classe das flavonas e flavonóis (figura 10a e 10b).

Diante dos resultados e estudos efetuados pelos pesquisadores citados verifica-se que a classe dos flavonóides e, mais particularmente, as flavonas e flavonóis podem ser consideradas alvos potenciais e interessantes para inativação da xantina oxidase.

#### 1.4) Métodos de Mecânica Molecular

Entre os vários métodos de química teórica, os de mecânica molecular são muito utilizados para determinar as correlações energéticas e estruturais de uma dada molécula.

Este tipo de abordagem usa uma função de energia potencial,  $v(r)$ , de maneira simples e analítica, descrevendo as interações entre um grupo de átomos específicos relacionados entre si pelo eixo de coordenadas cartesianas  $R$ . Os usos destes potenciais na mecânica molecular fornecem com extrema simplicidade e exatidão a energia potencial para um sistema molecular.

Vários trabalhos têm sido desenvolvidos para produzirem métodos distintos usando diversos campos de força, além de padronizações de procedimentos aplicados

aos sistemas atômicos visando a obtenção de seus valores de energia total e estruturas de mínima energia.

O método pioneiro nesta área foi o campo de força MM2 desenvolvido por Al.inger (1977), sendo aplicado a moléculas pequenas, e alterado em 1989 (chamado a partir daí por MM+) também por Al.inger, que expandiu o método para peptídeos. O MM2 foi desenvolvido para trabalhos voltados a resultados mais apurados a certas classes de compostos e não desenvolvido para cálculos genéricos, porém menos precisos, que poderiam ser aplicados a quaisquer situações da química orgânica.

Atualmente podem ser citados vários tipos de métodos que usam campos de forças, como o AMBER, OPLS e BIO+ e cada um deles descreve a energia como uma função potencial dependente do campo existente entre dois átomos em função da distância e elevados a uma certa potência que varia para cada método. Por exemplo, para o MM+ a energia potencial é dada pela equação:

$$E_{\text{ligação}} = K_r (r - r_0)^2 \quad (1)$$

Onde **E** é a energia associada ao potencial quadrático com constante de força **K<sub>r</sub>** e distância de equilíbrio **r<sub>0</sub>** entre dois átomos.

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

A forma funcional é a função que descreve, entre outras; a energia potencial como a descrita na equação 1 para o método MM+. Esta descrição energética parte do principal fundamento envolvido nos métodos de mecânica molecular onde são considerados tipos de átomos e não de elementos químicos.

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

Um exemplo deste fato pode ser mostrado para o elemento oxigênio que é definido por 5 tipos diferentes de átomos, como mostrado na tabela 9.

**Tabela 9: Tipos de átomos definidos no método AMBER para o elemento oxigênio.**

Tipo de átomo	Grupamento
O	Oxigênio de carbonila
OH	Oxigênio de hidroxila
O <sub>2</sub>	Oxigênio de ácido carboxílico
Os	Oxigênio éster ou éter
Ow	Oxigênio água

Desta forma são os tipos de átomos, ou seja, os ambientes atômicos que são levados em conta para se fazer os diversos cálculos associados aos sistemas atômicos.

Dos métodos utilizados em mecânica molecular os dois mais usados para trabalhos com proteínas e ácidos nucleicos são: o AMBER (Assisted Model Building and Energy Refinement) e o OPLS (Optimized Potentials for Liquid Simulations).

O primeiro método, AMBER; foi desenvolvido inicialmente por Weiner (1984), e a sua última versão estabelecida por Cornell (1995), e possui como característica principal a capacidade de trabalhar com campos de forças gerados por duas regiões distintas na mesma molécula, possibilitando cálculos em sítios diferentes da mesma proteína.

O segundo método, OPLS, da mesma forma que o AMBER é recomendado para proteínas e ácidos nucleicos, com a vantagem de introduzir os parâmetros de interações não ligantes, como pontes de hidrogênios, interações hidrofóbicas e interações de dipolos, que foram desenvolvidos a partir de extensivas simulações usando simulações pelo método Monte Carlo para pequenas moléculas.

Isto possibilita uma ferramenta mais poderosa que o AMBER, pois no estudo de proteínas, as interações não ligantes são importantes pontos de estabilização molecular

e diminuição de energia interna. Além disso, utilizando estas interações não ligantes pode-se tratar melhor os complexos formados por proteínas - receptores, proteínas - inibidores, e muitas outras situações possíveis. Estes parâmetros que foram associados ao OPLS foram devidamente descritos por Jorgensen and Tirado-Rives (1988) e Pranada et al. (1991).

Tanto para o AMBER, quanto para o OPLS, existe um série de formas funcionais que descrevem os fatores energéticos associados aos cálculos moleculares. Praticamente as diferenças entre os dois métodos estão nas formas funcionais das forças de van der Waals e eletrostática, ou seja, as energia associadas à interações não ligantes.

As formas funcionais comuns aos métodos AMBER e OPLS são:

a) **Energia das ligações:** É uma função quadrática, associada ao tamanho das mesmas, onde a constante de ligação está medida em kcal/mol por Å<sup>2</sup> e pode ser representada pela equação (2).

$$E_{\text{ligação}} = \sum_{\text{ligação}} K_r (r - r_0)^2 \quad (2)$$

Uma vez definida o valor da constante  $K_r$ , este fornece uma boa idéia da tendência de dois átomos permanecerem em sua distância de equilíbrio  $r_0$ . Esta tendência será tão maior quanto maior o valor de  $K_r$ .

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

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

Valores maiores de  $K_\theta$  determinam uma grande tendência de permanência dos átomos permanecerem num ângulo de equilíbrio  $\theta$ .

c) **Energia dos ângulos diedros:** É a energia associada aos ângulos formados por quatro átomos consecutivos, com  $n$  dobras possíveis e sua tendência de permanecer em conformações que conferem mínimos de energias.

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

O período de interação é  $360/n$  e o mínimo de energia será aquele onde  $n = 1$  e  $\phi_0 = 0^\circ$  para a conformação trans e  $\phi_0 = 180^\circ$  para a conformação cis.

d) **Energia de van der Waals:** É a energia associada às interações não ligantes, atrativas e repulsivas, entre 2 átomos a uma distância de  $R$ . A equação 5 mostra a relação de energia para esta forma funcional.

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

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

Existem duas abordagens de  $A_{ij}$  e  $B_{ij}$ , que são os parâmetros que determinam as formas com que os pares átomos irão interagir de maneira não – ligante. A primeira forma de abordagem é dada pelas equações 6 e 7, sendo usando na resolução da forma funcional do método AMBER, já para o método OPLS são usadas as equações 8 e 9.

$$\mathbf{A}_{ij} = \left( \frac{r_i^*}{2} + \frac{r_j^*}{2} \right)^{12} \sqrt{\varepsilon_i \varepsilon_j} \quad (6)$$

$$\mathbf{B}_{ij} = 2 \left( \frac{r_i^*}{2} + \frac{r_j^*}{2} \right)^6 \sqrt{\varepsilon_i \varepsilon_j} \quad (7)$$

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

$$\mathbf{A}_{ij} = 4 \left( \sigma_i \sigma_j \right)^6 \sqrt{\varepsilon_i \varepsilon_j} \quad (8)$$

$$\mathbf{B}_{ij} = 4 \left( \sigma_i \sigma_j \right)^3 \sqrt{\varepsilon_i \varepsilon_j} \quad (9)$$

Onde  $\sigma_i$  é a energia de valor zero quando dois átomos, i e j, estão separados por por uma distância ( $r = \sqrt[6]{2\sigma_i}$ ) e  $\varepsilon_i$  está associado posicionamento de menor energia para o átomo i em relação ao átomo j.

e) **Potencial Eletrostático:** Este termo mostrado pela equação 10, descreve as interações eletrostáticas clássicas para dois átomos não ligados, com cargas  $q_i$  e  $q_j$  e separados por uma distância  $R_{ij}$ .

$$\mathbf{E}_{\text{eletrostático}} = \sum_{ij \in \text{eletrostático}} \left[ \frac{q_i q_j}{\varepsilon R_{ij}} \right] \quad (10)$$

O potencial acima descreve o comportamento eletrostático para tanto para o AMBER, quanto para o OPLS, A diferença entre eles está no fator de escalonamento (D) usado no algoritmo do método para descrever as possíveis diferenças entre solventes e para o AMBER D irá variar de 1 – 4, para o OPLS é constante vale 1.

f) **Ligações de Hidrogênio:** É o termo que determina as contribuições importantes das ligações de hidrogênio, e é descrito pela equação 11.

$$E_{\text{ligações de hidrogênio}} = \sum_{ij \in \text{lig. de H}} \left[ \frac{C_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{R_{ij}^{10}} \right] \quad (11)$$

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

### 1.5 – Métodos de Química Quântica.

Os principais métodos associados à química quântica são referidos como métodos *ab initio*, DTF (Teoria de Densidade Funcional) ou semi-empíricos. Ainda que nossas as descrições fiquem restritas ao último método, os três ao contrário da mecânica molecular, não usam o conceito de tipos de átomos, e sim um único tipo de elemento, além disso o tratamento matemático está baseado em constantes fundamentais, como por exemplo, a velocidade da luz e outras. Boas discussões podem ser revistas em Levine (1986) e Szabo and Ostlund (1989).

Particularmente os métodos semi-empíricos mais comuns utilizam os números atômicos (menor ou igual a 54.) para determinar os tipos de elementos, e um grupo de parâmetros empíricos obtidos a partir de experimentos físico-químicos.

Para a resolução dos métodos químico-quânticos a equação fundamental usada é aquela desenvolvida por Schrödinger, representada pela equação 12.

$$H\Psi = E\Psi \quad (12)$$

Nesta equação o hamiltoniano (H) descreve um dado sistema de partículas, e o valor E, representa a energia total deste mesmo sistema.  $\Psi$  representa a função de onda que descreve o sistema podendo ser bem conhecido para um dado conjunto de

partículas representado por  $H$ . A resolução da equação 12 é muito precisa para pequenas moléculas.

Os métodos semi-empíricos têm maior deficiência na precisão da resolução da equação de Schrödinger, porém estas imprecisões são suprimidas pelos valores arbitrários definidos nos algoritmos dos métodos disponíveis, obtidos usando dados experimentos.

O tratamento matemático destas formas de resoluções é muito complexo, porém para os métodos semi-empíricos existe uma aproximação que negligência certos termos envolvendo o recobrimento diferencial para certos orbitais moleculares, um dos diversos tratamentos que estão disponíveis é o NDDO (Neglect of Diatomic Differential Overlap) que serviu de base para três modificações o MNDO (Modified Neglect of Diatomic Overlap) e as suas modificações AM1 (Austin Model 1) e PM3.

Esta aproximação também será compensada pela parametrização de certas constantes, variam de método à método e a razão desta estratégia é a necessidade de grandes recursos computacionais para resolver a equação de Schrödinger para sistemas de 4 ou mais integrais de 2 elétrons.

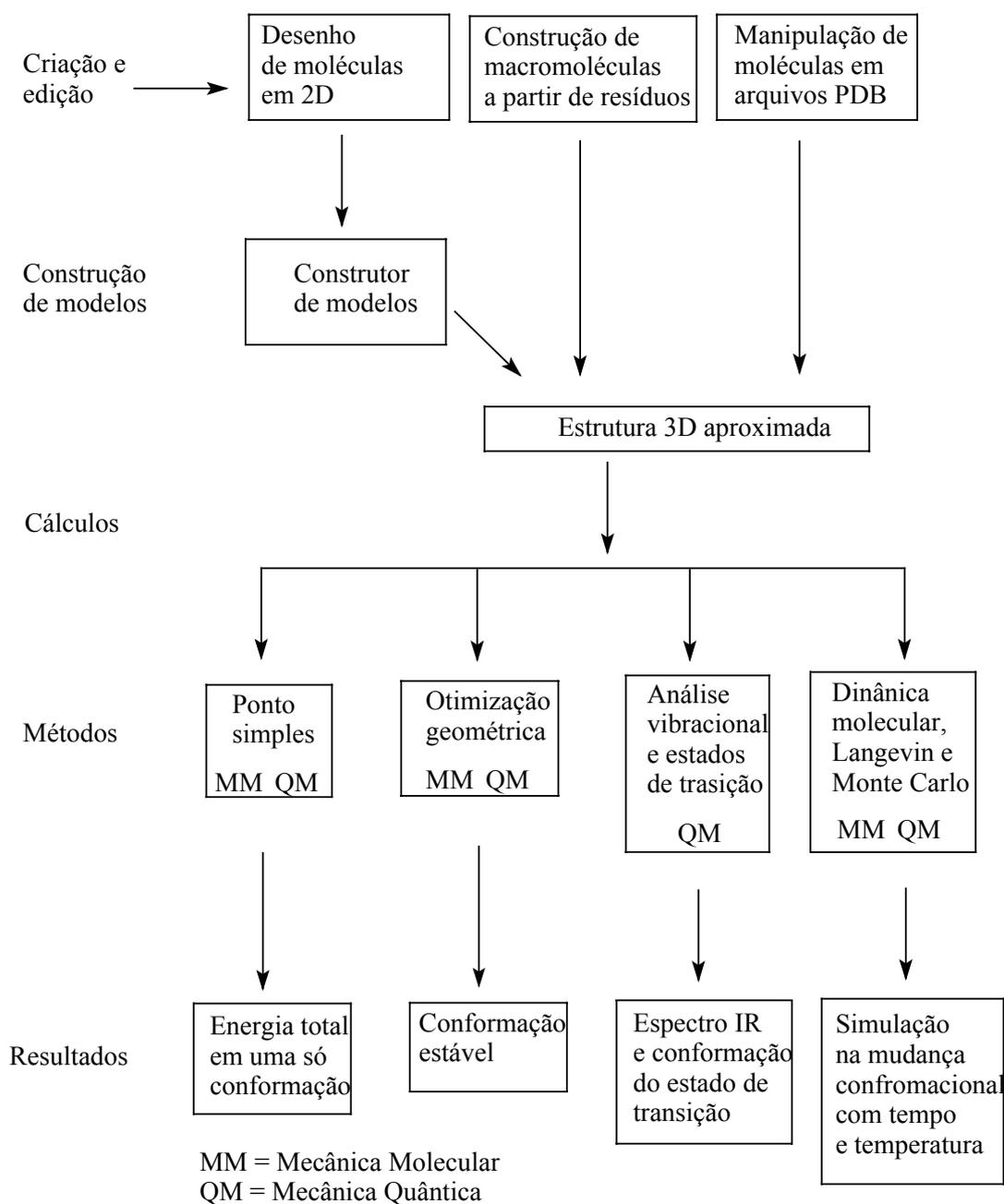
Os métodos AM1 e PM3 são duas modificações do MNDO desenvolvido e modificado em diversos trabalhos por Dewar et al. (1977) e por Davis et al. (1981), O PM3 é uma reparametrização do AM1 e foi desenvolvido por Stewart (1990).

A diferença fundamental entre o MNDO e o AM1 proposto por Dewar et al. (1985) está na forma funcional que caracteriza a repulsão núcleo – núcleo. O último método possui um termo extra que define uma função Gaussiana esférica para a forma funcional que não existe no MNDO. As principais vantagens do AM1 são sua capacidade reprodutível das ligações de hidrogênio e melhor determinação das energias de ativação para reações. Em termos de tempos computacionais não existem vantagens de nenhum dos três métodos comentados sobre os outros.

## 1.6 – O programa HyperChem 7.0

O pacote HyperChem é uma ferramenta de modelagem molecular que pode proceder a execução de cálculos complexos associados a sistemas moleculares. A figura 11 mostra um resumo das principais funções do HyperChem.

**Figura 11: Principais funções no HyperChem.**



Os métodos de campos de força existentes neste pacote para a mecânica molecular são: **MM+**, **AMBER**, **BIO+ (CHARMM)** e **OPLS**. Para os cálculos usando a química quântica os métodos disponíveis, tanto para o semi-empírico, *ab initio* e DTF são: **Hückel extendido**, **CNDO**, **INDO**, **MINDO3**, **MNDO**, **MNDO/d**, **AM1**, **PM3**, **ZINDO/1**, **ZINDO/S** E **TNDO**.

## **II - OBJETIVOS**

## 2.1 – Objetivos Gerais

- 1) Verificar as propriedades moleculares e estéricas dos compostos fenilpirazólicos e flavonóides que podem inibir da ação enzimática da xantina oxidase;
- 2) Verificar as mudanças energéticas e estruturais nas classes dos fenilpirazólicos e flavonóides quando modelados no vácuo e quando submetido à uma campo de força formado por uma estrutura atômica.

## 2.2 – Objetivos Específicos

As propostas deste trabalho estão relacionadas a dois pontos principais:

- 1) descrever quais os fatores estruturais, moleculares e energéticos que são primordiais na interação dos compostos fenilpirazólicos e flavonóides com a xantina oxidase e relaciona-los com sua capacidade de inibição enzimática;
- 2) Verificar a existência de mudanças significativas nos valores energéticos, estruturais e moleculares das duas classes de compostos estudados, quando modelados no vácuo (método 1), ou quando modelados no interior da estrutura cristalina da xantina oxidase que funcionará como campo de força fixo e atuante sobre a conformação do inibidor (método 2).

### **III - METODOLOGIA**

## Metodologia:

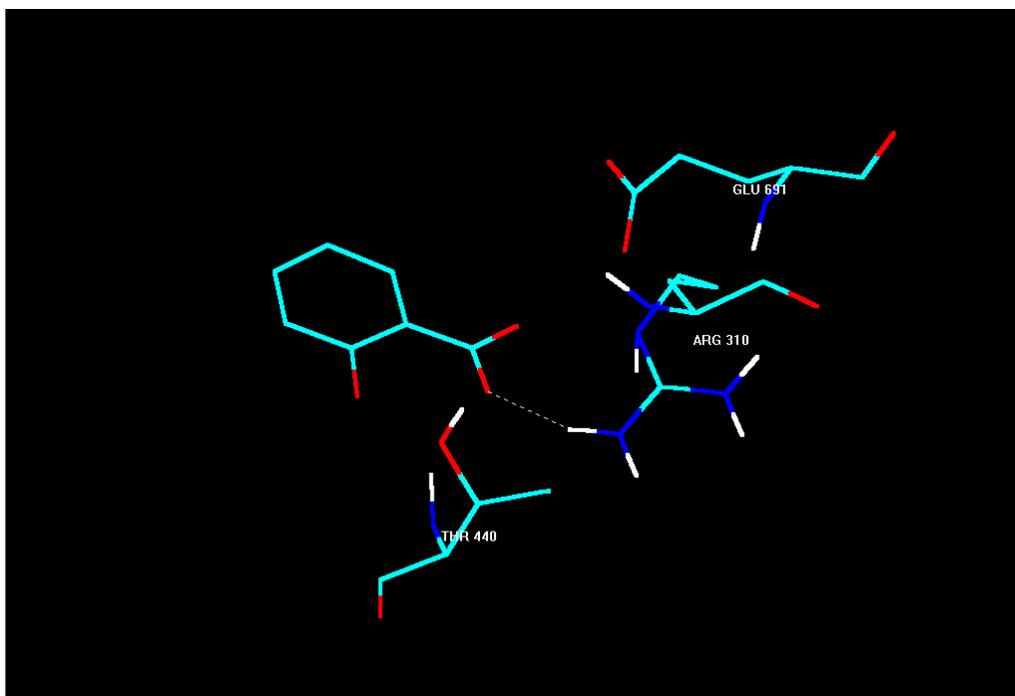
Para o desenvolvimento deste trabalho utilizou o pacote HyperChem 7.0 e, mais particularmente, o método de mecânica molecular OPLS, e na química quântica o método semi-empírico AM1, aplicados às classes dos fenilpirazóis de Ishibuchi et al. (2001) e das flavonas de van Hoorn et al. (2002).

Aproveitando a possibilidade do pacote fornecer cálculos em regiões distintas da mesma molécula ou sistema molecular, resolveu-se utilizar como modelo cristalino aquele desenvolvido por Enroth et al. (2000) no qual foi feito um complexo entre a xantina oxidase e o ácido salicílico na forma ionizada (depositado no **Protein Data Bank PDB** sob o código 1fiq). A figura 12 mostra o sítio ativo da XO e o salicilato.

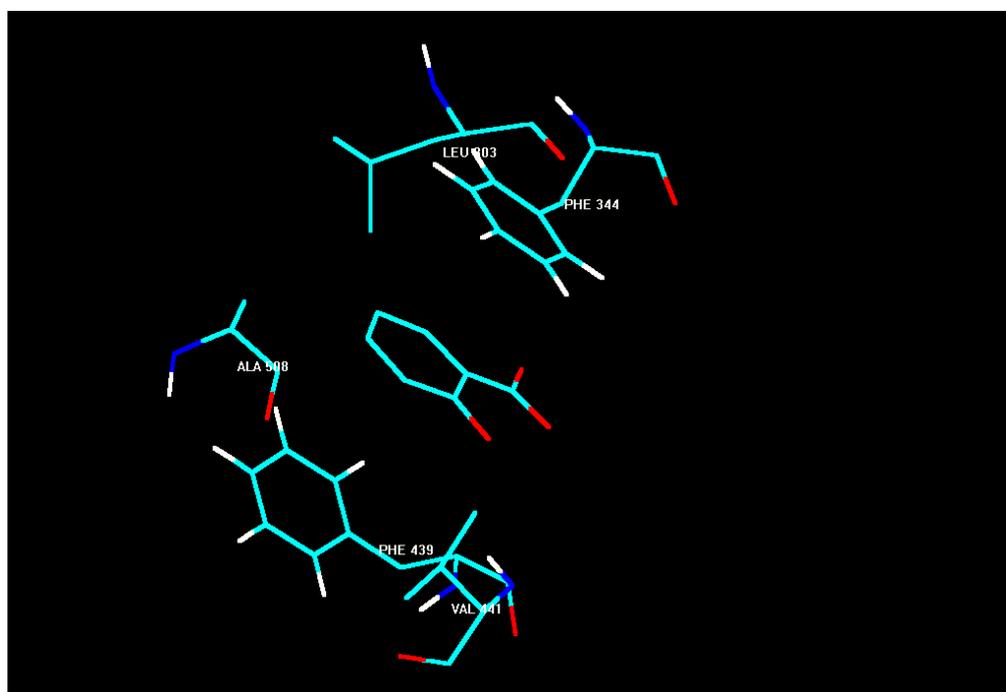
A escolha deste complexo cristalino como modelo para este estudo deveu-se a dois fatos principais: o primeiro é a inexistência de um complexo entre XO e compostos flavonóides ou fenilpirazólicos e, o segundo, é que o salicilato tem uma estrutura planar com um anel aromático e dois grupos funcionais hidrofílicos importantes para aumentar suas interações no sítio ativo (figuras 12a e 12b). As duas classes que serão estudadas têm também, estruturas planares e grupos funcionais em posições equivalentes às dos grupos do salicilato.

O complexo cristalino da XO formado por Enroth et al. (2000) consistiu de um heterotrímero com duas cadeias protéicas menores, A e B, e uma terceira cadeia maior que possui o sítio catalítico e o salicilato unido por ponte de hidrogênio ao aminoácido Arg 310 na estrutura denominada cadeia C (figura 12 a). O anel aromático do salicilato se posiciona entre os resíduos hidrofóbicos: Leu 303, Phe 344, Phe 439, Val 441 e Ala 598 (figura 12b). Para simplificar o modelo de estudo dos fenilpirazólicos e flavonóides, foram retiradas as cadeias A e B, além outras moléculas menores e todas as águas.

Figura 12: A molécula do salicilato no sítio ativo da XO. a) região hidrofílica do sítio ativo e b) região hidrofóbica do sítio ativo:



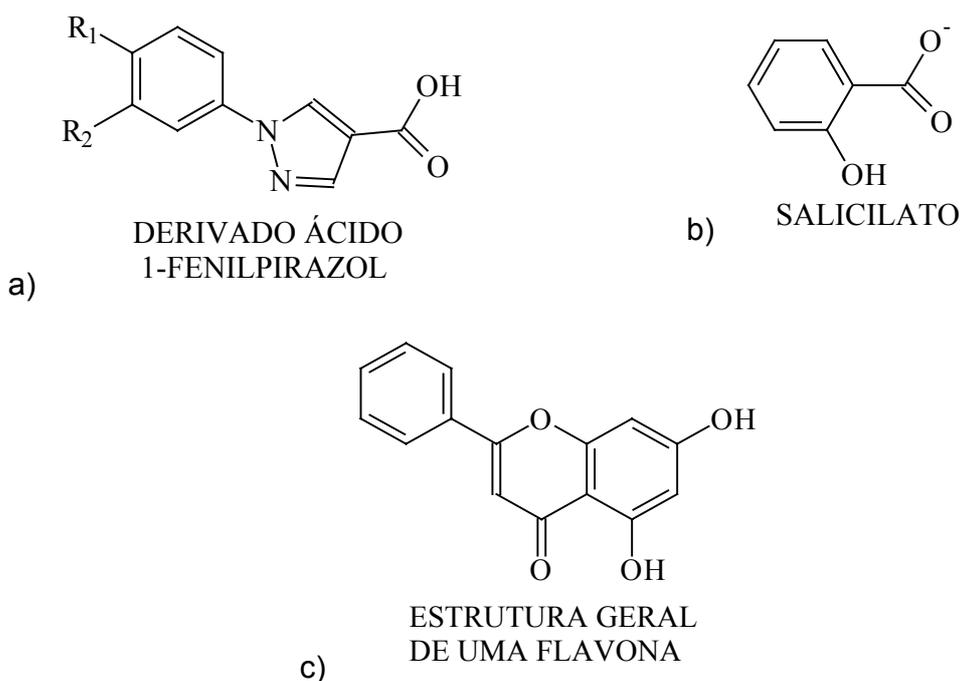
a)



b)

Os oxigênios das hidroxilas C5 e C7, ligadas ao anel A, das classes das flavonas e flavonóis, e também o oxigênio da carboxila e o nitrogênio não ramificado do anel pirazólico, nos derivados fenilpirazólicos, guardam entre si uma relação estrutural na distância bem próxima daquela que tem os oxigênios da carboxila e da hidroxila do salicilato. Isto sugere a possibilidade que os grupos funcionais nos fenilpirazóis e flavonóides possam interagir com a enzima XO de forma semelhante ao salicilato. A figura 13 mostra um esquema geral das três classes estudadas.

**Figura 13: Estrutura geral de: a) um derivado pirazólico, b) o salicilato e c) uma flavona.**



A distância entre os oxigênios das hidroxilas C5 e C7 dos flavonóides tem, em média, 4,74 Å e para os fenilpirazólicos a distância entre o oxigênio e o nitrogênio não ramificado tem, como valor médio, 4,71 Å. Ambos valores são próximos daquele encontrado para os oxigênios da carboxila e hidroxila do salicilato cuja distância é de 4,76 Å.

O anel pirazólico, o anel aromático do salicilato e como o anel A das flavonas, podem ser sobrepostos uns sobre os outros, se posicionando de maneira bem semelhante e este foi o ponto de partida para a modelagem das classes de compostos estudados.

Numa das estratégias que foi levada a efeito, e é uma das proposta deste trabalho, o anel pirazólico e aromático A nas flavonas, foi desenhado por meio da ferramenta de desenho do HyperChem, sobre o anel aromático do salicilato, na região mais interna do sítio ativo, tentando manter o mais próximo possível os grupos onde foram encontradas as semelhanças estruturais.

O restante da molécula foi desenhado em direção a região mais externa do sítio ativo, próximo ao ambiente hidrofílico. Neste processo tentou-se manter o maior distanciamento possível entre o novo desenho e os aminoácidos definidos na estrutura cristalina do complexo.

Esta última preocupação ocorreu mais na tentativa de diminuir o tempo computacional do que para evitar a perturbação sobre do sítio ativo, já vez que o HyperChem consegue fazer cálculos em regiões distintas da molécula, podendo manter uma delas estática, que seria o sítio catalítico, produzindo um campo de força fixo e uma outra região que pode variar sua energia em função deste campo, no caso os compostos estudados.

Para este estudo, a estrutura de cada classe que apresentou melhor ação inibidora da XO foi desenhada no sitio ativo, conforme descrito acima. Estas moléculas tiveram suas estruturas geométricas previamente otimizadas dentro da XO utilizando o método de mecânica molecular OPLS e o ambiente do sítio ativo como campo de força fixo.

Esta abordagem foi desenvolvida com o objetivo de tentar buscar uma conformação de menor energia, próxima daquela que poderia ser aquela encontrada na região do sítio ativo, se o complexo fosse formado entre a XO e os flavonóides ou fenilpirazóis, evitando assim o estudo de estruturas com mínimos locais de energia distintas e diferentes daquelas que poderiam ser a forma ativa do inibidor.

Com o objetivo de evitar o uso de uma conformação que esteja longe daquela que pode interagir com o sítio ativo, foi realizada a pré - otimização do composto dentro da região catalítica, e logo após, a otimização conjunta da região do sítio ativo e o inibidor. Com isso pretende-se que possíveis ajustes possam ser induzidos às cadeias laterais dos aminoácidos na região catalítica e assim tentar simular uma situação mais real da interação enzima - inibidor.

Nos trabalhos de relação estrutura atividade quantitativa a abordagem usual é fazer uma aproximação do modelo para uma forma de menor energia usando métodos de mecânica molecular no vácuo e depois, também no vácuo, fazer um refinamento desta estrutura usando métodos semi - empíricos, *ab initio* ou DFT.

Considera-se, para efeito de cálculos, que as estruturas obtidas desta forma são aquelas mais estáveis, porém, não é possível saber se a conformação estabelecida seria aquela encontrada num complexo entre uma enzima e o inibidor.

Na abordagem adotada e avaliada por este trabalho considerou-se como estrutura inibidora da XO aquela obtida a partir do modelo estrutural formado quando, o fenilpirazol ou o flavonóide, foi otimizado usando a intensidade do campo de força fornecido pelo sítio ativo da enzima, e nesta região do complexo aplicado o método OPLS.

A otimização do complexo foi realizada num espaço esférico de cerca de  $14 \text{ \AA}^3$ , abrangendo o inibidor, o sítio ativo e os aminoácidos adjacentes. O espaço onde foi aplicada a otimização foi escolhido em função do tamanho da região catalítica. Considerou-se satisfatória a estrutura que apresentou um gradiente de energia menor

de 0,1 kcal/mol, e o tempo computacional médio para a XO e os fenilpirazóis foi de 40 horas e a XO e os flavonóides de 26 horas por molécula.

Para verificar se a metodologia empregada traz variações significativas, tanto ao nível estrutural, quanto eletrônico ou molecular, em relação aos métodos usuais analisou-se as estruturas obtidas em duas situações:

- 1) utilizando a metodologia tradicional empregada em estudos de QSAR, onde a ferramenta de desenho para moléculas produziu uma estrutura 2D do inibidor que foi pré - otimizada por mecânica molecular (OPLS) no vácuo seguindo de refinamento da estrutura final por mecânica quântica, através do semi - empírico AM1, também no vácuo. **Denominado MÉTODO 1.**
  
- 2) utilizando o inibidor otimizado no sítio ativo da XO por mecânica molecular (OPLS). A estrutura resultante foi refinada utilizando o semi - empírico AM1 no vácuo. **Denominado MÉTODO 2.**

Para os dois métodos foram verificados os valores de várias formas de energia e propriedades moleculares ou geométricas.

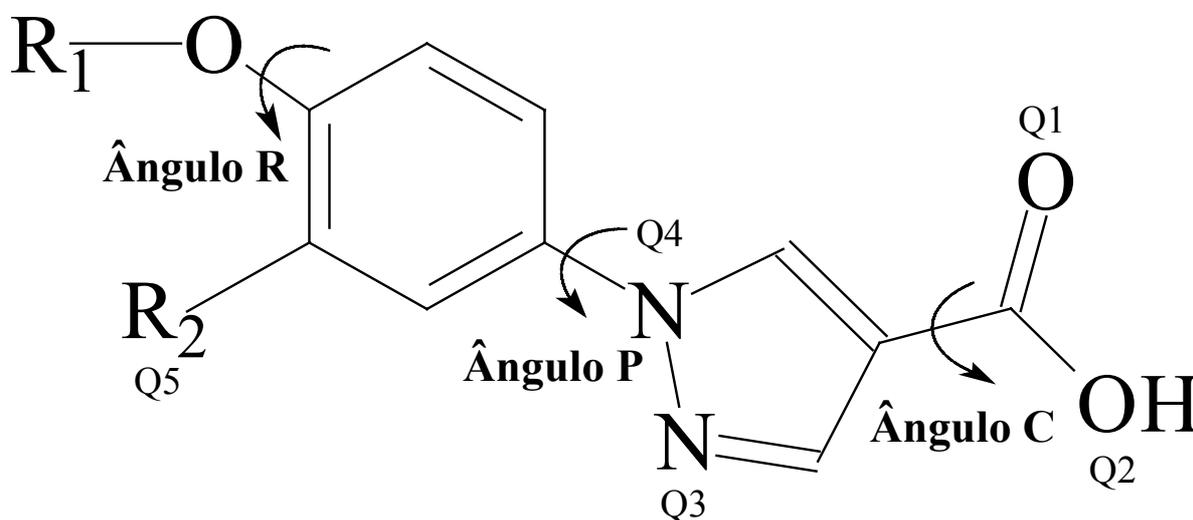
As propriedades que tiveram seus valores medidos e avaliados para ambos os métodos, tanto para os fenilpirazóis, quanto para os flavonóides, foram as seguintes:

- 1) Energia Total (eV);
- 2) Energia de Ligação (eV),
- 3) Energia Eletrônica (eV);
- 4) Energia de Hidratação ( $\text{kcal mol}^{-1}$ );
- 5) Calor de Formação ( $\text{kcal mol}^{-1}$ );
- 6) Volume ( $\text{Å}^3$ );

- 7) Área ( $\text{\AA}^2$ );
- 8) Refratividade;
- 9) Polarizabilidade Molecular (a.u.);
- 10) Momento de Dipolo (D);
- 11) Coeficiente de partição (Log P)
- 12) Orbital de fronteira mais alto ocupado (HOMO) (eV);
- 13) Orbital de fronteira mais baixo desocupado (LUMO) (eV);
- 14) Dureza (Hardness) (eV);
- 15) Eletronegatividade de Mullikan (eV);
- 16) Ângulos diedros e cargas líquidas sobre átomos (definidos na figura 14).

**Figura 14: Definições dos ângulos diedros e cargas sobre os átomos ou grupos de átomos para: a) Fenilpirazóis e b) Flavonóides:**

a)



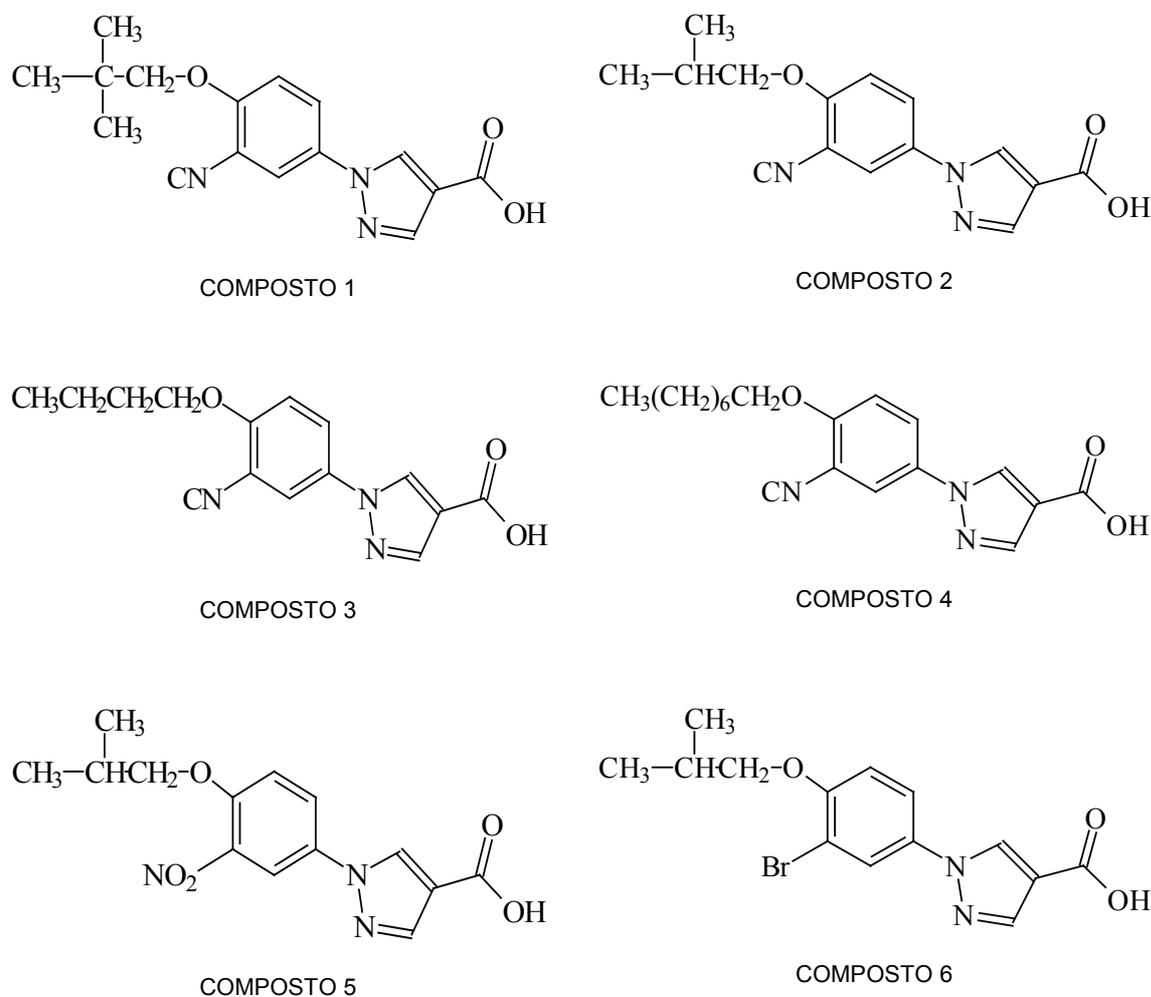


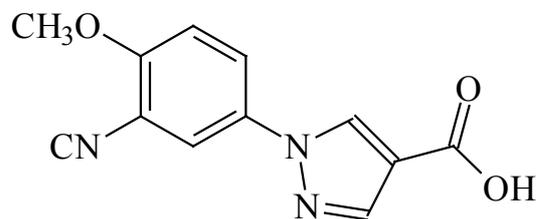
## **IV - RESULTADOS**

#### 4.1 Valores obtidos para as propriedades do fenilpirazólicos:

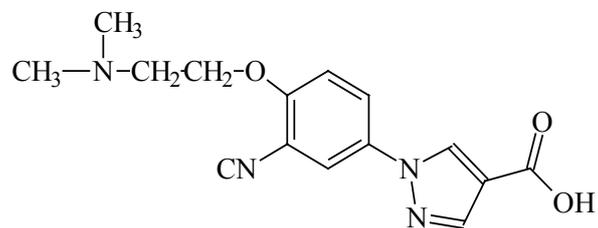
Os diversos compostos obtidos por Ishibuchi et al. (2001) estão representados na figura 15 e na tabelas 10 e 11. Quando medidos os valores de concentração de 50% de inibição ( $IC_{50}$ ) verificou-se que entre eles existiriam compostos com ótimo potencial farmacológico, com inibições superiores ao allopurinol em até 45 vezes (composto 1 e 2), e compostos com baixa atividade, com potência de inibição cerca de 20 vezes menores (composto 12) ou completamente inativos (compostos 13 e 14), valores mostrados nas tabelas 10 e 11.

**Figura 15: Compostos sintetizados por Ishibuchi et al. (2001).**

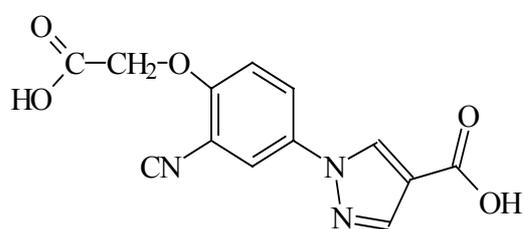




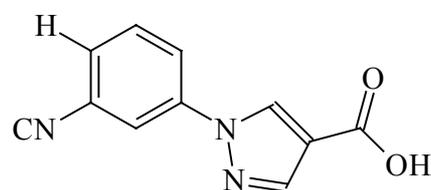
COMPOSTO 7



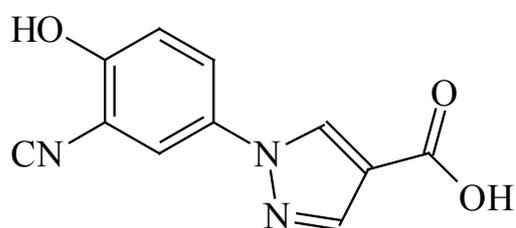
COMPOSTO 8



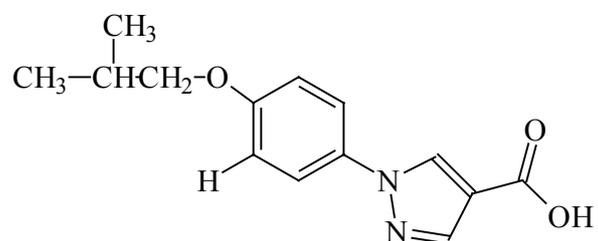
COMPOSTO 9



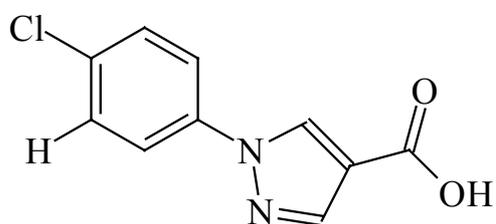
COMPOSTO 10



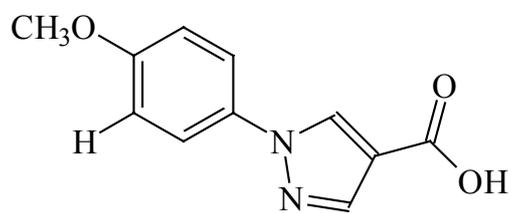
COMPOSTO 11



COMPOSTO 12



COMPOSTO 13



COMPOSTO 14

As moléculas foram divididas em 2 grupos para facilitar a análise dos compostos, conforme as tabela 1 e 2: grupo A (mais ativos que o allopurinol) e o grupo B (menos ativos que o allopurinol). Um critério que pode ser utilizado nesta divisão é o valor de referência de IC<sub>50</sub> encontrado por Ishibuchi et al. (2001) para o allopurinol (260 nmol/l ou log IC<sub>50</sub> = 2,42).

A justificativa para a escolha desta divisão foi tentar evidenciar quais mudanças estruturais, energéticas e moleculares tornam um composto mais ou menos eficiente na inibição da XO, possibilitando ferramentas para desenhar fármacos com potência igual ou superior ao allopurinol, porém sem o anel tipo purínico, para diminuir os efeitos de sensibilidade provocado em alguns tratamentos com a droga.

Utilizando os dois processos descritos (métodos 1 e 2) obteve-se, para os fenilpirazóis de Ishibuchi et al., os valores mostrados nas tabelas 12 a 28. Além dos cálculos realizados para cada metodologia, também se estimou foi a diferença percentual entre os resultados obtidos para cada propriedade nos dois métodos. A estimativa foi calculada usando a relação mostrada pela equação 13:

$$\text{Variação \%} = \left( \frac{\text{MÉTODO2}}{\text{MÉTODO1}} - 1 \right) \times 100 \quad (13)$$

**Tabela 10: Grupo A<sup>a</sup>, compostos com atividade maior que o allopurinol:**

<b>Grupo A</b>				
Número do composto	Valores de IC <sub>50</sub> ( nmols/L)	log IC <sub>50</sub>	R1	R2
1	5,8	0.76	OCH <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	CN
2	7,1	0.85	OCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CN
3	15	1.18	OC <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	CN
4	21	1.32	OC <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	CN
5	33	1.52	OCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub>
6	43	1.63	OCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Br

<sup>a</sup> = segundo Ishibuchi et al. (2001)

**Tabela 11: Grupo B<sup>a</sup>, compostos com atividade menor que o allopurinol**

<b>Grupo B</b>				
Número do composto	Valores de IC <sub>50</sub> ( nmols/L)	Log IC <sub>50</sub>	R1	R2
7	460	2.66	OCH <sub>3</sub>	CN
8	700	2.85	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CN
9	1500	3.17	OCH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	CN
10	3300	3.52	H	CN
11	3600	3.56	OH	CN
12	4700	3.67	OCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H
13	NA	NA	Cl	H
14	NA	NA	OCH <sub>3</sub>	H

<sup>a</sup> = segundo Ishibuchi et al. (2001); NA = Sem atividade (menor que 50% de atividade)

**Tabela 12: Valores de Energia Total para os Fenilpirazólicos, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles:**

Composto	Método 1 (eV)	Método 2 (eV)	%
1	-89.0592	-89.0638	0.0052
2	-85.4691	-85.4736	0.0053
3	-85.4723	-85.4757	0.0040
4	-99.8472	-99.8481	0.0009
5	-97.2362	-97.2408	0.0047
6	-85.9087	-85.9134	0.0055
7	-74.6939	-74.6918	-0.0028
8	-90.5430	-90.5438	0.0009
9	-92.4348	-92.4287	-0.0066
10	-63.7215	-72.0235	13.0286
11	-71.1130	-71.1143	0.0018
12	-78.0826	-78.0864	0.0049
13	-64.6357	-64.6404	0.0073
14	-67.3059	-67.3058	-0.0002
Soma das %			0.0309
Média (M)			0.0024
Desvio da Média ( $d_m$ )			0.0031
Desvio Padrão ( $\sigma$ )			0.0039

Para o levantamento estatístico foi desconsiderado o ponto 10, uma vez que foi a única medida que desviou muito em relação aos outros valores da propriedade.

**Diferença entre os dois métodos:  $0.0024 \pm 0.0039$  eV**

As diferenças % positivas indicam uma diminuição do valor medido da propriedade pelo método 2 em relação ao método 1, e vice versa.

**Tabela 13: Valores de Energia de Ligação para os Fenilpirazólicos, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles:**

<b>Composto</b>	<b>Método 1 (eV)</b>	<b>Método 2 (eV)</b>	<b>%</b>
1	-4.1414	-4.1460	0.1111
2	-3.8630	-3.8675	0.1165
3	-3.8663	-3.8696	0.0854
4	-4.9942	-4.9951	0.0180
5	-3.8371	-3.8417	0.1199
6	-3.6318	-3.6365	0.1294
<hr/>			
7	-3.0231	-3.0210	-0.0695
8	-4.0064	-4.0072	0.0200
9	-3.3987	-3.3926	-0.1795
10	-2.6520	-2.6335	-0.6976
11	-2.7539	-2.7552	0.0472
12	-3.6676	-3.6714	0.1036
13	-2.4368	-2.4415	0.1929
14	-2.8261	2.8260	-0.0035
Soma das %			-0.0070
Média (M)			-0.0005
Desvio da Média ( $d_m$ )			0.1354
Desvio Padrão ( $\sigma$ )			0.2217

A linha tracejada separa os compostos ativos( 1 a 6) e inativos (7 a 14)

Para o levantamento estatístico foram considerados todos os pontos dos valores medidos da propriedade.

**Diferença entre os dois métodos:  $-0.0005 \pm 0.2217$  eV**

As diferenças % positivas indicam uma diminuição do valor medido da propriedade pelo método 2 em relação ao método 1, e vice versa.

**Tabela 14: Valores de Energia Eletrônica para os Fenilpirazólicos, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles:**

<b>Composto</b>	<b>Método 1 (eV)</b>	<b>Método 2 (eV)</b>	<b>%</b>
1	-57.7973	-58.0250	0.3940
2	-53.2578	-53.4432	0.3481
3	-52.4025	-52.8163	0.7897
4	-67.1400	-69.4425	3.4294
5	-61.4278	-61.7190	0.4741
6	-52.0601	-51.8468	-0.4097
7	-41.0794	-41.1050	0.0623
8	-57.0801	-58.1954	1.9539
9	-53.0119	-53.0394	0.0519
10	-32.9862	-36.8683	11.7689
11	-37.2178	-37.1656	-0.1403
12	-46.8005	-46.8864	0.1835
13	-31.7996	-31.7773	-0.0701
14	-35.6214	-35.6250	0.1001
Soma das %			7.1669
Média (M)			0.5513
Desvio da Média ( $d_m$ )			0.6952
Desvio Padrão ( $\sigma$ )			1.0406

A linha tracejada separa os compostos ativos( 1 a 6) e inativos (7 a 14)

Para o levantamento estatístico foi desconsiderado o ponto 10, uma vez que foi a única medida que desviou muito em relação aos outros valores da propriedade.

**Diferença entre os dois métodos:  $0.5513 \pm 1.0406$  eV**

As diferenças % positivas indicam uma diminuição do valor medido da propriedade pelo método 2 em relação ao método 1, e vice versa.

**Tabela 15: Valores de Energia de Hidratação para os Fenilpirazólicos, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles:**

Composto	Método 1 (kcal mol <sup>-1</sup> )	Método 2 (kcal mol <sup>-1</sup> )	%
1	-12.65	-11.60	-8.30
2	-13.29	-12.17	-8.42
3	-13.63	-12.15	-10.86
4	-12.15	-10.33	-14.98
5	-13.15	-12.32	-6.31
6	- 9.85	- 8.50	-13.71
7	-15.35	-15.78	2.80
8	-13.96	-14.00	0.01
9	-23.20	-23.34	0.01
10	-14.94	-14.33	-4.08
11	-19.69	-20.93	6.30
12	-9.97	-8.73	-12.44
13	-10.43	-9.15	-12.27
14	-12.46	-12.46	0.00
		Soma das %	-82.25
		Média (M)	-5.88
		Desvio da Média (d <sub>m</sub> )	5.76
		Desvio Padrão (σ)	6.77

Para o levantamento estatístico foram considerados todos os pontos de valores medidos para esta propriedade.

**Diferença entre os dois métodos:  $-5.88 \pm 6.77$  kcal mol<sup>-1</sup>.**

As diferenças % positivas indicam uma diminuição do valor medido da propriedade pelo método 2 em relação ao método 1, e vice versa.

**Tabela 16: Valores de Energia do Mais Alto Orbital Molecular Ocupado (HOMO) os Fenilpirazólicos, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles:**

Composto	Método 1(eV)	Método 2 (eV)	%
1	-9.4514	-9.5369	0.9046
2	-9.4582	-9.5366	0.8221
3	-9.4659	-9.4340	-0.3370
4	-9.4636	-9.6407	1.8714
5	-10.0370	-9.8493	-1.8701
6	-9.5536	-9.4126	-1.4759
<hr/>			
7	-9.5210	-9.7695	2.600
8	-9.4845	-9.4600	-0.2583
9	-9.9228	-9.9612	0.3870
10	-9.9507	-9.8996	-0.5135
11	-9.6283	-9.5994	-0.3002
12	-9.1649	-9.0879	-0.8402
13	-9.6179	-9.4788	-1.4463
14	-9.2049	-9.2017	-0.0348
Soma das %			-0.4912
Média (M)			-0.0351
Desvio da Média ( $d_m$ )			0.9658
Desvio Padrão ( $\sigma$ )			1.2679

A linha tracejada separa os compostos ativos( 1 a 6) e inativos (7 a 14)

Para o levantamento estatístico foram considerados todos os pontos de valores medidos para esta propriedade.

**Diferença entre os dois métodos:  $-0.0351 \pm 1.2679$  eV.**

As diferenças % positivas indicam uma diminuição do valor medido da propriedade pelo método 2 em relação ao método 1, e vice versa.

**Tabela 17: Valores de Energia do Mais Baixo Orbital Molecular Ocupado (LUMO) os Fenilpirazólicos, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles:**

<b>Composto</b>	<b>Método 1 (eV)</b>	<b>Método 2 (eV)</b>	<b>%</b>
1	-0.9460	-0.9904	4.6934
2	-0.9542	-0.9846	3.1859
3	-0.9536	-0.9590	0.5663
4	-0.9529	-1.0559	10.8091
5	-1.5146	-1.4711	-2.8720
6	-0.9228	-0.8367	-9.3303
<hr/>			
7	-0.9858	-1.2263	24.3964
8	-1.0174	-1.1996	17.9084
9	-1.2985	-1.3699	5.4987
10	-1.0880	-1.3723	26.6682
11	-1.0626	-1.1620	9.3544
12	-0.5795	-0.5270	-9.0595
13	-0.9235	-0.8286	-10.2761
14	-0.6096	-0.6125	0.4757
Soma das %			72.0186
Média (M)			5.1442
Desvio da Média ( $d_m$ )			9.1100
Desvio Padrão ( $\sigma$ )			11.7895

A linha tracejada separa os compostos ativos (1 a 6) e inativos (7 a 14)

Para o levantamento estatístico foram considerados todos os pontos de valores medidos para esta propriedade.

**Diferença entre os dois métodos:  $5.1442 \pm 11.7895$  eV.**

As diferenças % positivas indicam uma diminuição do valor medido da propriedade pelo método 2 em relação ao método 1, e vice versa.

**Tabela 18: Valores de Dureza para os fenilpirazólicos, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles:**

<b>Composto</b>	<b>Método 1 (eV)</b>	<b>Método 2 (eV)</b>	<b>%</b>
1	4.2527	4.2733	0.4844
2	4.2520	4.2760	0.5644
3	4.2562	4.2375	-0.4394
4	4.2554	4.2924	0.8695
5	4.2612	4.1891	-1.6020
6	4.3154	4.2880	-0.6349
7	4.2676	4.2716	0.0937
8	4.2336	4.1302	-0.0244
9	4.3122	4.2957	-0.0383
10	4.4314	4.2637	-3.7844
11	4.2829	4.2187	-1.4989
12	4.2926	4.2805	-0.2819
13	4.3472	5.1537	18.5522
14	4.2977	4.2946	-0.0721
		Soma das %	-6.4543
		Média (M)	-0.4965
		Desvio da Média ( $d_m$ )	0.8653
		Desvio Padrão ( $\sigma$ )	1.2325

A linha tracejada separa os compostos ativos( 1 a 6) e inativos (7 a 14)

Para o levantamento estatístico foi desconsiderado o ponto 13, uma vez que foi a única medida que desviou muito em relação aos outros valores da propriedade.

**Diferença entre os dois métodos:  $-0.4965 \pm 1.2325$  eV**

As diferenças % positivas indicam um aumento do valor medido da propriedade pelo método 2 em relação ao método 1, e vice versa.

**Tabela 19: Valores de Eletronegatividade de Müllikan para os Fenilpirazólicos, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles:**

Composto	Método 1(eV)	Método 2 (eV)	%
1	5.1987	5.2637	1.2503
2	5.2062	5.2606	1.044
3	5.2098	5.1965	-0.2553
4	5.2083	5.3483	2.6880
5	5.7758	5.6602	-2.0015
6	5.2382	5.1247	-2.1668
<hr/>			
7	5.2534	5.4979	4.6541
8	5.2510	4.1302	-21.3445
9	5.6107	5.6656	0.9785
10	5.5194	5.6360	2.1125
11	5.3455	5.3807	0.6585
12	4.8722	4.8075	-1.3279
13	5.2707	5.1537	-2.2198
14	4.9073	4.9071	-0.0041
Soma das %			5.4114
Média (M)			0.4163
Desvio da Média ( $d_m$ )			1.6112
Desvio Padrão ( $\sigma$ )			2.0534

A linha tracejada separa os compostos ativos( 1 a 6) e inativos (7 a 14)

Para o levantamento estatístico foi desconsiderado o ponto 8, uma vez que foi a única medida que desviou muito em relação aos outros valores da propriedade.

**Diferença entre os dois métodos:  $0.4163 \pm 2.0534$  eV**

As diferenças % positivas indicam um aumento do valor medido da propriedade pelo método 2 em relação ao método 1, e vice versa.

**Tabela 20: Valores de Calor de Formação para os Fenilpirazólicos, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles:**

Composto	Método 1 (kcal mol <sup>-1</sup> )	Método 2 (kcal mol <sup>-1</sup> )	%
1	-3.7958	-8.3401	119.7192
2	-0.4573	-4.9536	983.2276
3	-3.7010	-7.0566	90.6674
4	-31.2321	-32.1873	3.0584
5	-26.3431	-30.9104	17.3377
6	-26.3696	-31.0511	17.7533
7	14.1928	16.2813	-14.7152
8	21.2402	20.4598	3.6742
9	-71.4146	-65.2962	-8.5674
10	50.5927	46.0093	9.0666
11	8.2490	7.0087	15.0358
12	-36.8045	-40.6161	10.3563
13	10.8950	6.1884	43.1996
14	-20.6523	-20.5957	-0.2741
		Soma das %	306.3118
		Média (M)	23.5624
		Desvio da Média (d <sub>m</sub> )	28.1383
		Desvio Padrão (σ)	39.3130

A linha tracejada separa os compostos ativos( 1 a 6) e inativos (7 a 14)

Para o levantamento estatístico foi desconsiderado o ponto 2, uma vez que foi a única medida que desviou muito em relação aos outros valores da propriedade.

**Diferença entre os dois métodos: 23.5624 ± 39.3130 kcal mol<sup>-1</sup>**

As diferenças % positivas indicam uma diminuição do valor medido da propriedade pelo método 2 em relação ao método 1, e vice versa.

**Tabela 21: Valores dos Momentos de Dipolos para os Fenilpirazólicos, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles:**

Composto	Método 1 (D)	Método 2 (D)	%
1	5.92	3.37	-43.31
2	5.82	3.33	-42.78
3	5.85	3.26	-44.27
4	5.87	3.44	-41.40
5	7.29	4.81	-34.02
6	5.42	2.97	-45.20
<hr/>			
7	7.27	2.60	-64.24
8	6.46	3.79	-41.33
9	4.42	4.88	10.41
10	5.70	1.99	-65.09
11	6.77	2.79	-58.79
12	5.48	3.62	-33.94
13	4.03	1.68	-58.31
14	6.22	6.23	0.01
Soma das %			-572.68
Média (M)			-47.72
Desvio da Média ( $d_m$ )			9.26
Desvio Padrão ( $\sigma$ )			10.99

A linha tracejada separa os compostos ativos( 1 a 6) e inativos (7 a 14)

Para o levantamento estatístico foram desconsiderados os pontos 9 e 14, uma vez que foram as medidas que desviaram muito em relação aos outros valores da propriedade.

**Diferença entre os dois métodos:  $-47.72 \pm 10.99$  D**

As diferenças % negativas indicam uma diminuição do valor medido da propriedade pelo método 2 em relação ao método 1, e vice versa.

**Tabela 22: Valores de Área Superficial dos Fenilpirazólicos, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles:**

Composto	Método 1 (Å <sup>2</sup> )	Método 2 (Å <sup>2</sup> )	%
1	538.78	537.50	-0.23
2	522.81	516.53	-1.20
3	532.72	530.82	-0.36
4	660.41	632.54	-4.22
5	512.37	515.32	0.58
6	509.64	518.13	1.67
<hr/>			
7	442.38	440.23	-0.49
8	549.48	532.22	-3.14
9	483.03	477.29	-1.19
10	402.40	421.11	4.65
11	415.17	411.18	-0.96
12	498.31	496.69	-0.33
13	398.17	397.03	-0.29
14	411.83	413.54	0.42
Soma das %			-5.09
Média (M)			-0.36
Desvio da Média (d <sub>m</sub> )			1.29
Desvio Padrão (σ)			2.06

A linha tracejada separa os compostos ativos( 1 a 6) e inativos (7 a 14)

Para o levantamento estatístico foram considerados todos os pontos de valores medidos para esta propriedade.

**Diferença entre os dois métodos:  $-0.36 \pm 2.06 \text{ Å}^2$ .**

As diferenças % positivas indicam um aumento do valor medido da propriedade pelo método 2 em relação ao método 1, e vice versa.

**Tabela 23: Valores de Volume Molecular dos Fenilpirazólicos, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles:**

Composto	Método 1 (Å <sup>3</sup> )	Método 2 (Å <sup>3</sup> )	%
1	894.35	890.11	-0.47
2	849.75	848.09	-0.20
3	861.83	856.73	-0.59
4	1077.25	1052.63	-2.28
5	850.54	844.08	-0.76
6	845.66	851.35	0.67
7	701.04	698.24	-0.40
8	892.82	878.18	-1.64
9	774.99	772.26	-0.35
10	626.33	663.77	5.98
11	647.97	642.20	-0.89
12	801.92	804.43	0.31
13	612.96	615.53	0.41
14	646.80	646.44	-0.06
Soma das %			-6.25
Média (M)			-0.48
Desvio da Média (d <sub>m</sub> )			0.58
Desvio Padrão (σ)			0.81

A linha tracejada separa os compostos ativos (1 a 6) e inativos (7 a 14)

Para o levantamento estatístico foi desconsiderado o ponto 10, uma vez que foi a única medida que desviou muito em relação aos outros valores da propriedade.

**Diferença entre os dois métodos:  $-0.48 \pm 0.81 \text{ \AA}^3$ .**

As diferenças % positivas indicam um aumento do valor medido da propriedade pelo método 2 em relação ao método 1, e vice versa.

**Tabela 24: Valores de Log P, Refratividade Molecular e Polarizabilidade para os Fenilpirazóis:**

<b>Composto</b>	<b>Log P (Coeficiente de Partição)</b>	<b>Refratividade Molecular</b>	<b>Polarizabilidade Molecular (a.u.)</b>
1	2.15	81.46	31.48
2	1.65	77.06	29.64
3	1.64	77.19	29.64
4	3.23	95.59	36.99
5	1.56	78.65	29.63
6	2.40	78.95	30.42
7	0.43	63.32	24.14
8	0.41	81.34	31.00
9	-0.02	69.40	26.70
10	1.20	61.66	23.60
11	0.40	58.55	22.31
12	1.61	71.32	27.79
13	1.17	55.92	21.74
14	0.40	57.58	22.29

A linha tracejada separa os compostos ativos( 1 a 6) e inativos (7 a 14)

Tanto o método 1, quanto o método 2, produziram valores de coeficientes de partição (log P), refratividade e polarizabilidade molecular exatamente iguais.

**Tabela 25: Valores dos ângulos diedros para os fenilpirazóis, definidos na figura 14, obtidos pelo método 1:**

Composto	Ângulo C (°)	Ângulo P (°)	Ângulo R (°)
1	179.55	31.00	-176.67
2	-179.77	30.55	173.77
3	179.51	31.21	-176.69
4	179.47	31.01	-177.37
5	-179.89	29.96	-84.53
6	-178.41	-30.55	117.64
7	179.71	31.07	-0.76
8	178.93	30.32	-150.24
9	-179.47	28.23	96.03
10	179.12	28.83	----
11	179.43	30.96	----
12	178.56	31.33	-179.78
13	-179.85	29.83	----
14	-178.71	-30.67	1.26

A linha tracejada separa os compostos ativos (1 a 6) e inativos (7 a 14)

**Tabela 26: Valores dos ângulos diedros para os fenilpirazóis, definidos na figura 14, obtidos pelo método 2:**

Composto	Ângulo C (°)	Ângulo P (°)	Ângulo R (°)
1	-179.81	-35.02	133.26
2	179.93	-36.01	135.29
3	-179.77	-29.29	144.06
4	-179.47	-30.31	107.23
5	179.37	-29.32	111.03
6	-179.35	-28.06	118.66
7	-177.40	155.98	111.94
8	175.61	35.47	114.53
9	177.66	-148.51	105.10
10	174.54	152.12	----
11	-177.13	153.84	----
12	-179.48	-31.02	156.17
13	177.88	-29.27	----
14	-171.42	-29.47	-2.53

A linha tracejada separa os compostos ativos (1 a 6) e inativos (7 a 14)

**Tabela 27: Valores das propriedades Área, Volume, Log P, Refratividade molecular e Polarizabilidade molecular associadas aos grupos R1 dos fenilpirazólicos., obtidas pelo método 2:**

Comp.	Área	Volume	Log P	Refratividade	Polarizabilidade
1	195.24	418.60	1.81	28.95	11.55
2	174.88	378.27	1.30	24.55	9.72
3	181.67	387.75	1.30	24.68	9.72
4	288.16	589.39	2.88	43.08	17.06
5	176.58	381.86	1.30	24.55	9.72
6	176.68	372.35	1.30	24.55	9.72
7	91.03	246.79	0.09	10.81	4.21
8	199.09	611.39	0.07	28.33	11.07
9	138.92	351.66	-0.37	16.89	6.77
10	67.98	516.03	0.86	9.15	3.67
11	51.59	276.04	0.06	6.04	2.38
12	188.02	377.55	1.30	24.55	9.72
13	74.55	465.44	0.86	9.15	3.67
14	99.89	237.94	0.09	10.81	4.21

**Tabela 28: Valores das cargas líquidas sobre os átomos dos Fenilpirazóis, definidas na figura 14, obtidas pelo método 1:**

Composto	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5
1	-0.311	-0.283	-0.061	-0.073	-0.128
2	-0.310	-0.283	-0.061	-0.074	-0.128
3	-0.311	-0.283	-0.061	-0.074	-0.128
4	-0.311	-0.283	-0.061	-0.073	-0.128
5	-0.305	-0.281	-0.061	-0.087	-0.113
6	-0.311	-0.283	-0.060	-0.077	+0.080
7	-0.310	-0.282	-0.062	-0.074	-0.108
8	-0.310	-0.282	-0.061	-0.076	-0.123
9	-0.310	-0.281	-0.057	-0.084	-0.113
10	-0.309	-0.282	-0.059	-0.083	-0.121
11	-0.309	-0.282	-0.062	-0.076	-0.106
12	-0.315	-0.285	-0.061	-0.066	+0.147
13	-0.312	-0.283	-0.059	-0.078	+0.157
14	-0.314	-0.285	-0.063	-0.067	+0.160

A linha tracejada separa os compostos ativos( 1 a 6) e inativos (7 a 14)

**Tabela 29: Valores das cargas líquidas sobre os átomos dos Fenilpirazóis, definidas na figura 14, obtidas pelo método 2:**

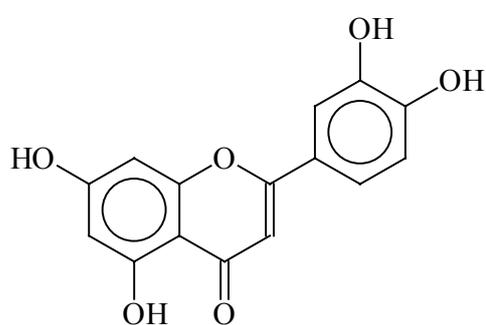
Composto	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5
1	-0.372	-0.314	-0.072	-0.083	-0.123
2	-0.372	-0.314	-0.072	-0.083	-0.123
3	-0.372	-0.314	-0.074	-0.080	-0.125
4	-0.372	-0.313	-0.073	-0.084	-0.117
5	-0.368	-0.313	-0.074	-0.089	-0.126
6	-0.374	-0.314	-0.073	-0.080	+0.077
7	-0.310	-0.281	-0.059	-0.079	-0.114
8	-0.310	-0.282	-0.058	-0.081	-0.115
9	-0.308	-0.281	-0.059	-0.085	-0.117
10	-0.309	-0.280	-0.057	-0.084	-0.106
11	-0.311	-0.282	-0.062	-0.074	-0.124
12	-0.378	-0.314	-0.075	-0.071	+0.146
13	-0.374	-0.313	-0.072	-0.081	+0.156
14	-0.313	-0.285	-0.063	-0.067	+0.160

A linha tracejada separa os compostos ativos( 1 a 6) e inativos (7 a 14)

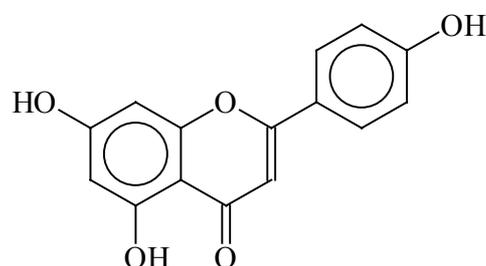
#### 4.2 Valores obtidos para as propriedades do flavonóides:

Van Hoorn et al. (2002) testaram uma série de flavonóides de diferentes classes (flavonas, flavanonas, isoflavonas e catequinas), verificando que os melhores resultados com relação ao poder de inibição sobre a xantina oxidase foram obtidos com os compostos das classes das flavonas e flavonóis (Figura 16):

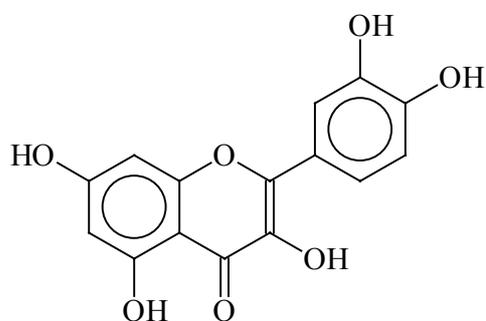
**Figura 16: Flavonóides sintetizadas por van Hoorn et al. (2002):**



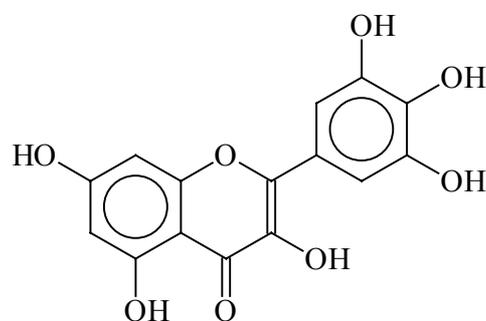
Flavona 1 (Luteonina)



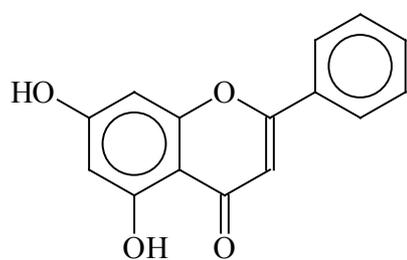
Flavona 2 (Apigenina)



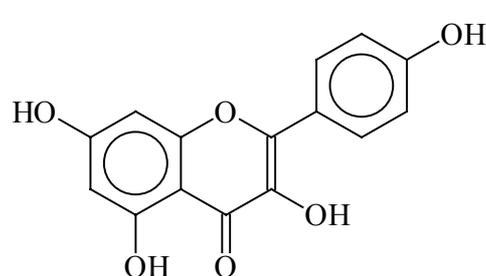
Flavonol 3 (Quercitina)



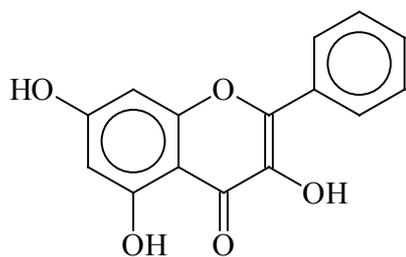
Flavonol 4 (Myricetina)



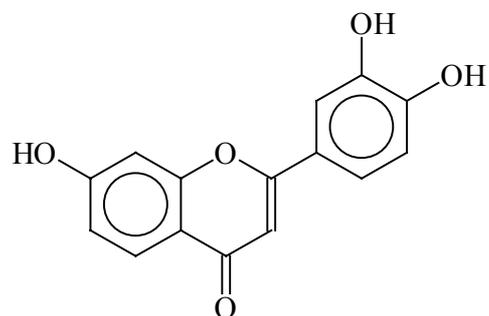
Flavona 5 (Chrysin)



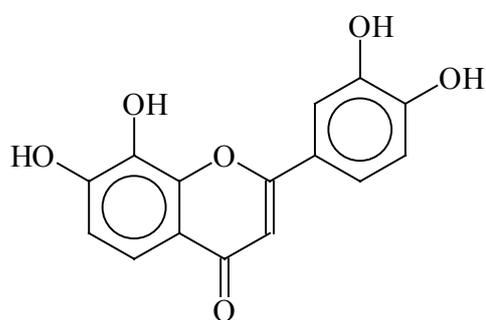
Flavonol 6 (Kaempferol)



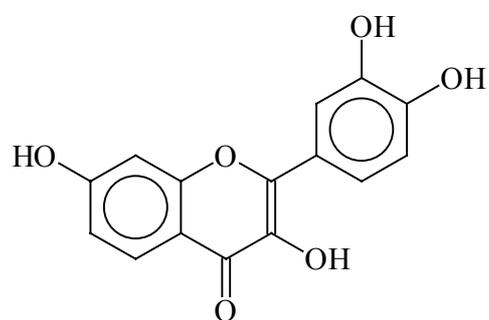
Flavonol 7 (Galagina)



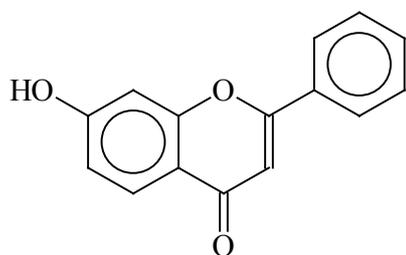
Flavona 8



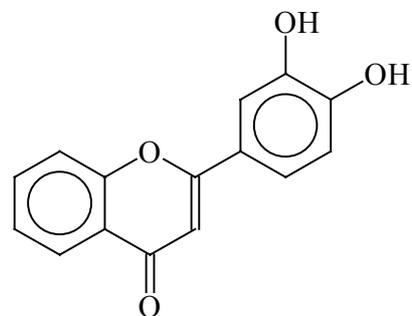
Flavona 9



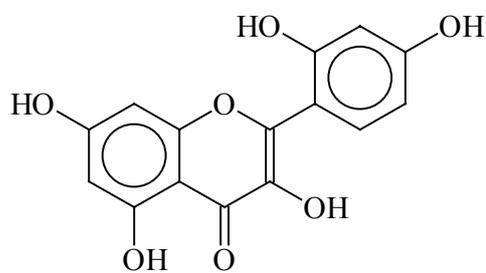
Flavonol 10 (Fisetina)



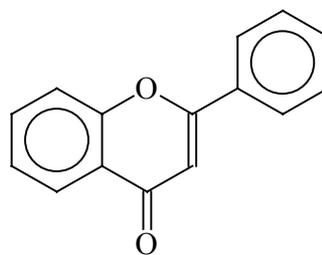
Flavona 11



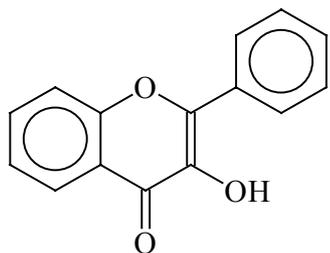
Flavona 12



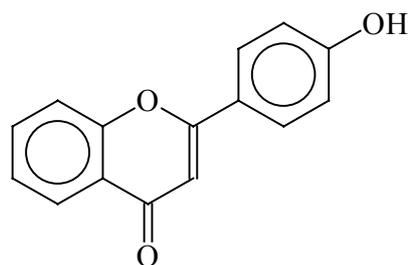
Flavonol 13 (morina)



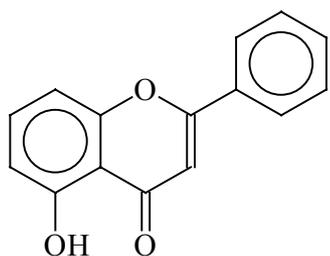
Flavona 14 (estructura básica)



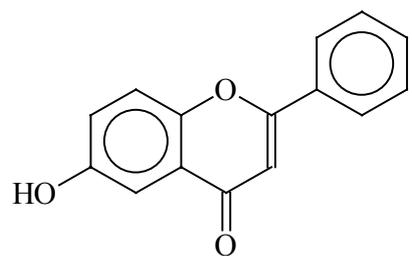
Flavonol 15



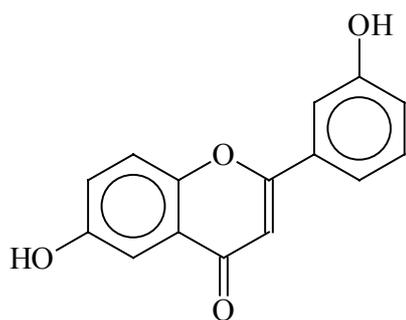
Flavona 16



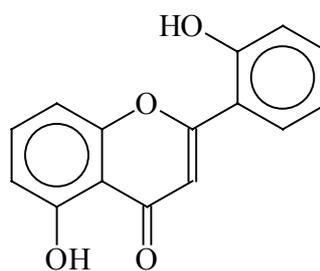
Flavona 17



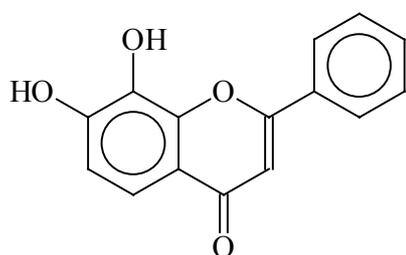
Flavona 18



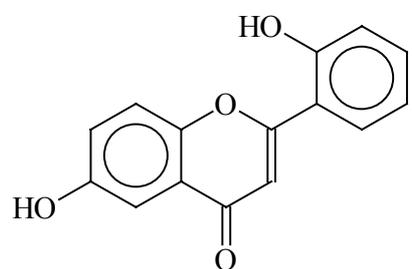
Flavona 19



Flavona 20



Flavona 21



Flavona 22

As tabelas 30 e 31 mostram as flavonas e flavonóis estudadas por Van Hoorn et al. (2002), com suas mudanças estruturais e sua respectiva dose de IC<sub>50</sub>.

Para facilitar nossa análise foram divididas em dois grupos:

- 1) Grupo A: compostos com atividade de inibição da XO (tabela 30);
- 2) grupo B: compostos com baixa ou ausência de capacidade de inibição da XO (tabela 31):

**Tabela 30: Grupo A<sup>a</sup>, compostos com atividade de inibição da XO:**

Número do composto	Nome Sistemático <sup>a</sup>	Posição dos OH	IC <sub>50</sub> (µm/l) <sup>b</sup>
1	Luteonina	5,7,3',4'	0,75
2	Apigenina	5,7,4'	1,0
3	Quercitina	3,5,7,3',4'	1,5
4	Myricetina	3,5,7,3',4',5'	1,5
5	Chrysin	5,7	2,5
6	Kaempferol	3,5,7,4'	2,5
7	Galagina	3,5,7	4,0
8		7,3',4'	4,0
9		7,8,3',4'	10,0
10	Fisetina	3,7,3',4'	11,3

<sup>a</sup> = Os espaços em branco significam compostos que não possuem nomes sistematizados

Tabela 31: Grupo B<sup>a</sup>, compostos sem atividade de inibição da XO:

Número do composto	Nome Sistemático <sup>a</sup>	Posição dos OH	IC <sub>50</sub> (µm/l) <sup>b</sup>
11		7	40
12		3',4'	40
13	Morina	3,5,7,2',4'	40
14		-----	NA
15		3	NA
16		4'	NA
17		5	NA
18		6	NA
19		6,3'	NA
20		5,2'	NA
21		7,8	NA
22		6,2'	NA

<sup>a</sup> = Os espaços em branco significam compostos que não possuem nomes sistematizados

<sup>b</sup> = NA = Não Ativo (concentração maior que 40 µmol/l na obter atividade.)

Para os dois métodos propostos (1 e 2) foram obtidos os seguintes resultados para os compostos estudados por van Hoorn et al. (2002) mostrados nas tabelas 32 a 47:

Tabela 32: Valores de Energia Total para os flavonóides, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles:

Composto	Método 1 (eV)	Método 2 (eV)	%
1	-91.7720	-91.7626	-0.0102
2	-84.3796	-84.3733	-0.0075
3	-99.1626	-99.1539	-0.0088
4	-106.5559	-106.5470	-0.0084
5	-76.9858	-79.9796	3.8888
6	-91.7702	-91.7647	-0.0060
7	-84.3763	-84.3709	-0.0064
8	-84.3760	-84.3730	-0.0036
9	-91.7613	-91.7627	-0.0015
10	-91.7686	-91.7646	-0.0044
<hr/>			
11	-69.5898	-69.5899	-0.0001
12	-76.9821	-76.9793	-0.0036
13	-99.1605	-99.1578	-0.0027
14	-62.1960	-62.1963	0.0005
15	-69.5865	-69.5871	0.0009
16	-69.5898	-69.5900	0.0003
17	-69.5921	-69.5859	-0.0089
18	-69.5886	-69.5889	0.0004
19	-76.9811	-76.9816	0.0006
20	-76.9831	-79.9791	3.8918
21	-76.9861	-76.9783	-0.0101
22	-76.9796	-76.9794	-0.0003
Soma das %			-0.0621
Média (M)			-0.0041
Desvio da Média ( $d_m$ )			0.0036
Desvio Padrão ( $\sigma$ )			0.0042

A linha tracejada separa os compostos ativos(1 a10) e inativos (11 a 22)

Para o levantamento estatístico foram desconsiderados os pontos 5 e 20, uma vez que foram as medidas que desviaram muito em relação aos outros valores da propriedade.

**Diferença entre os dois métodos:  $-0.0041 \pm 0.0042$  eV**

As diferenças % positivas indicam uma diminuição do valor medido da propriedade pelo método 2 em relação ao método 1, e vice versa.

**Tabela 33: Valores de Energia de Ligação para os flavonóides, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles:**

<b>Composto</b>	<b>Método 1 (eV)</b>	<b>Método 2 (eV)</b>	<b>%</b>
1	-3.6140	-3.6050	-0.2490
2	-3.5116	-3.5052	-0.1822
3	-3.7150	-3.7068	-0.2207
4	-3.8190	-3.8102	-0.2304
5	-3.4074	-3.4012	-0.1820
6	-3.6120	-3.6071	-0.1357
7	-3.5083	-3.5029	-0.1539
8	-3.5080	-3.5050	-0.0855
9	-3.6030	-3.6051	0.0583
10	-3.6110	-3.6064	-0.1274
11	-3.3010	-3.3011	0.0030
12	-3.4037	-3.4009	-0.0823
13	-3.7130	-3.7106	-0.0646
14	-3.1967	-3.1970	0.0094
15	-3.2977	-3.2983	0.0182
16	-3.3009	-3.3012	0.0091
17	-3.3032	-3.2970	-0.1877
18	-3.3000	-3.3000	0.0000
19	-3.4023	-3.4031	0.0235
20	-3.4047	-3.4007	-0.1175
21	-3.4032	-3.3999	-0.0970
22	-3.4012	-3.4010	-0.0059
		Soma das %	-1.5691
		Média (M)	-0.0909
		Desvio da Média ( $d_m$ )	0.0803
		Desvio Padrão ( $\sigma$ )	0.0946

A linha tracejada separa os compostos ativos(1 a10) e inativos (11 a 22)

Para o levantamento estatístico foram considerados todos os pontos dos valores medidos da propriedade.

**Diferença entre os dois métodos:  $-0.0909 \pm 0.0946$  eV**

As diferenças % positivas indicam uma diminuição do valor medido da propriedade pelo método 2 em relação ao método 1, e vice versa.

Tabela 34: Valores de Energia Eletrônica para os flavonóides, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles:

Composto	Método 1 (eV)	Método 2 (eV)	%
1	-54.3460	-54.3283	-0.0326
2	-49.4601	-49.4387	-0.0432
3	-60.1448	-60.1266	-0.0303
4	-65.4202	-65.4017	-0.0283
5	-45.1892	-45.1717	-0.0387
6	-55.0619	-55.0451	-0.0305
7	-50.6218	-50.6033	-0.0365
8	-49.2426	-49.2257	-0.0343
9	-54.7361	-54.7067	-0.0537
10	-55.2627	-54.8014	-0.8347
11	-40.3140	-40.3018	-0.0303
12	-44.7589	-44.7516	-0.0163
13	-60.9537	-60.0987	-1.4027
14	-36.0793	-36.0790	-0.0008
15	-34.6479	-41.1425	18.7446
16	-40.1282	-40.1249	-0.0082
17	-40.7222	-40.7085	-0.0336
18	-40.2713	-40.2652	-0.0151
19	-44.6253	-44.6085	-0.0376
20	-45.8232	-45.8407	0.0382
21	-45.4890	-45.4727	-0.0358
22	-45.3498	-45.3918	0.0926
		Soma das %	-2.5366
		Média (M)	-0.1244
		Desvio da Média ( $d_m$ )	0.1894
		Desvio Padrão ( $\sigma$ )	0.3440

A linha tracejada separa os compostos ativos(1 a10) e inativos (11 a 22)

Para o levantamento estatístico foi desconsiderado o ponto 15, uma vez que foi a única medida que desviou muito em relação aos outros valores da propriedade.

**Diferença entre os dois métodos: - 0.1244 ± 0.3440 eV**

As diferenças % positivas indicam uma diminuição do valor medido da propriedade pelo método 2 em relação ao método 1, e vice versa.

**Tabela 35: Valores de Energia de Hidratação para os flavonóides, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles:**

Composto	Método 1 (kcal mol <sup>-1</sup> )	Método 2 (kcal mol <sup>-1</sup> )	%
1	-29.37	-27.16	-7.52
2	-23.95	-22.29	-6.93
3	-32.86	-30.59	-6.90
4	-38.09	-35.80	-6.01
5	-17.08	-15.43	-9.66
6	-27.45	-25.73	-6.27
7	-20.58	-18.84	-8.45
8	-23.69	-23.12	-2.41
9	-27.31	-26.35	-3.52
10	-26.37	-26.64	1.02
11	-11.41	-11.40	-0.09
12	-16.91	-16.40	-3.02
13	-28.95	-31.10	7.43
14	-4.63	-4.66	0.65
15	-8.16	-8.13	-0.37
16	-11.49	-11.53	0.35
17	-10.58	-8.84	-16.45
18	-11.44	-11.49	0.44
19	-17.95	-18.04	0.50
20	-15.54	-13.89	-10.62
21	-16.12	-15.40	-4.47
22	-16.41	-13.99	-14.75
		Soma das %	-82.60
		Média (M)	-4.14
		Desvio da Média (d <sub>m</sub> )	4.50
		Desvio Padrão (σ)	5.64

A linha tracejada separa os compostos ativos(1 a10) e inativos (11 a 22)

Para o levantamento estatístico foram considerados todos os pontos dos valores medidos da propriedade.

**Diferença entre os dois métodos: - 4.14 ± 5.64 kcal mol<sup>-1</sup>**

As diferenças % positivas indicam uma diminuição do valor medido da propriedade pelo método 2 em relação ao método 1, e vice versa.

**Tabela 36: Valores de Energia do Mais Alto Orbital Molecular Ocupado (HOMO) dos flavonóides, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles:**

<b>Composto</b>	<b>Método 1 (eV)</b>	<b>Método 2 (eV)</b>	<b>%</b>
1	-9.1314	-8.9219	-2.2943
2	-9.1584	-9.0362	-1.3343
3	-8.7841	-8.5449	-2.7231
4	-8.7841	-8.5756	-2.3736
5	-9.2712	-9.2161	-0.5943
6	-8.7229	-8.5928	-1.4915
7	-8.8907	-8.7646	-1.4183
8	-9.0870	-8.9815	-1.1610
9	-9.0136	-8.8991	-1.2703
10	-8.7023	-9.3456	7.3923
11	-9.3360	-8.9928	-3.6761
12	-9.0508	-8.5783	-5.2205
13	-8.6092	-9.2901	7.9090
14	-9.2722	-8.8405	-4.6559
15	-8.7865	-9.1204	3.8001
16	-9.0861	-9.1204	0.3775
17	-9.1198	-9.1389	0.2094
18	-9.0527	-9.0547	0.0221
19	-9.0555	-9.0591	0.0398
20	-9.1818	-9.1886	0.0741
21	-9.2027	-9.0632	-0.0152
22	-9.1422	-8.9065	-0.0258
		Soma das %	-4.8013
		Média (M)	-0.3832
		Desvio da Média ( $d_m$ )	2.1468
		Desvio Padrão ( $\sigma$ )	3.2271

A linha tracejada separa os compostos ativos(1 a10) e inativos (11 a 22)

Para o levantamento estatístico foram considerados todos os pontos dos valores medidos da propriedade.

**Diferença entre os dois métodos: - 4.8013 ± 3.2271 eV**

As diferenças % positivas indicam uma diminuição do valor medido da propriedade pelo método 2 em relação ao método 1, e vice versa.

**Tabela 37: Valores de Energia do Mais Baixo Orbital Molecular Ocupado (LUMO) dos flavonóides, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles:**

Composto	Método 1 (eV)	Método 2 (eV)	%
1	-1.0487	-0.8028	-23.4481
2	-0.9813	-0.7198	-26.6483
3	-1.0920	-0.8434	-22.7656
4	-1.1670	-0.9106	-21.9709
5	-0.9867	-0.7026	-28.7929
6	-1.0473	-0.7670	-26.7641
7	-1.0559	-0.7622	-27.8151
8	-0.9374	-0.8960	-4.4165
9	-0.9189	-0.8851	-3.6783
10	-1.0892	-0.9560	-12.2229
11	-0.8712	-0.8154	-6.4050
12	-0.9130	-0.8807	-3.5378
13	-0.9469	-0.8368	-11.6274
14	-0.8465	-0.8028	-5.1624
15	-0.9273	-0.8829	-4.7881
16	-0.8434	-0.7989	-5.2763
17	-0.9626	-0.7098	-26.2830
18	-0.9047	-0.8387	-7.2952
19	-0.9620	-0.8881	-7.6819
20	-1.0398	-0.7403	-28.8036
21	-0.9796	-0.9134	-6.7579
22	-0.9863	-0.7434	-24.6274
		Soma das %	-286.6723
		Média (M)	-15.3077
		Desvio da Média ( $d_m$ )	9.5311
		Desvio Padrão ( $\sigma$ )	10.1378

A linha tracejada separa os compostos ativos(1 a10) e inativos (11 a 22)

Para o levantamento estatístico foram considerados todos os pontos dos valores medidos da propriedade.

**Diferença entre os dois métodos: - 15.3077 ± 10.1378 eV**

As diferenças % positivas indicam uma diminuição do valor medido da propriedade pelo método 2 em relação ao método 1, e vice versa.

**Tabela 38: Valores de Dureza para os flavonóides, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles:**

<b>Composto</b>	<b>Método 1 (eV)</b>	<b>Método 2 (eV)</b>	<b>%</b>
1	4.0414	4.0596	0.4503
2	4.0886	4.1587	1.7145
3	3.8461	3.8508	0.1220
4	3.8086	3.8325	0.6276
5	4.1423	4.2565	2.7642
6	3.8378	3.9129	1.9569
7	3.9174	4.0012	2.1392
8	4.0748	4.0423	-0.7976
9	4.0474	4.0070	-0.9982
10	3.8066	4.1948	10.1981
11	4.2324	4.0887	-3.3952
12	4.0689	3.8488	-5.4093
13	3.8312	4.2267	10.3231
14	4.2129	4.0189	-4.6049
15	3.9296	4.1188	4.8147
16	4.1214	4.1608	0.9560
17	4.0786	4.2146	3.3345
18	4.0740	4.1080	0.8346
19	4.0468	4.0855	0.9563
20	4.0710	4.2242	3.7632
21	4.1133	4.0749	-0.9336
22	4.0780	4.0816	0.0883
		Soma das %	26.7399
		Média (M)	1.3139
		Desvio da Média ( $d_m$ )	2.6531
		Desvio Padrão ( $\sigma$ )	3.8277

A linha tracejada separa os compostos ativos(1 a10) e inativos (11 a 22)

Para o levantamento estatístico foram considerados todos os pontos dos valores medidos da propriedade.

**Diferença entre os dois métodos: - 1.3139 ± 3.8277 eV**

As diferenças % negativas indicam uma diminuição do valor medido da propriedade pelo método 2 em relação ao método 1, e vice versa.

**Tabela 39: Valores de Eletronegatividade de Müllikan para os flavonóides, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles:**

Composto	Método 1 (eV)	Método 2 (eV)	%
1	5.0901	4.8624	-4.4733
2	5.0699	4.8780	-3.7851
3	4.9381	4.6942	-4.9391
4	4.9756	4.7431	-4.6728
5	5.1290	4.9594	-3.3067
6	4.8851	4.6799	-4.2005
7	4.9733	4.7634	-4.2205
8	5.0122	4.9388	-1.4644
9	4.9663	4.8921	-1.4941
10	4.8958	5.1508	5.2085
11	5.1036	4.9041	-3.9090
12	4.9819	4.7295	-5.0663
13	4.7781	5.0635	5.9731
14	5.0594	4.8217	-4.6982
15	4.8569	5.0017	2.9813
16	4.9648	4.9597	-0.1027
17	5.0412	4.9244	-2.3169
18	4.9787	4.9467	-0.6427
19	5.0088	4.9736	-0.7028
20	5.1108	4.9645	-2.8626
21	5.0912	4.9883	-2.0211
22	5.0643	4.8250	-4.7252
		Soma das %	-37.1827
		Média (M)	-2.0655
		Desvio da Média ( $d_m$ )	2.3931
		Desvio Padrão ( $\sigma$ )	3.1854

A linha tracejada separa os compostos ativos(1 a10) e inativos (11 a 22)

Para o levantamento estatístico foram considerados todos os pontos dos valores medidos da propriedade.

**Diferença entre os dois métodos: - 2.0655 ± 3.1854 eV**

As diferenças % negativas indicam uma diminuição do valor medido da propriedade pelo método 2 em relação ao método 1, e vice versa.

**Tabela 40: Valores de Calor de Formação para os flavonóides, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles:**

Composto	Método 1 (kcal mol <sup>-1</sup> )	Método 2 (kcal mol <sup>-1</sup> )	%
1	-172.6383	-163.2442	-5.4415
2	-129.4186	-123.0958	-4.8855
3	-214.1811	-205.5088	-4.0491
4	-258.2725	-249.3688	-3.4474
5	-84.7477	-78.5584	-7.3032
6	-170.8766	-165.4212	-3.1923
7	-126.1198	-120.7437	-4.2627
8	-125.8417	-122.8078	-2.4109
9	-162.0232	-163.4074	0.8543
10	-169.3131	-164.6552	-2.7511
11	-37.9266	-38.0382	0.2943
12	-81.1009	-78.2601	-3.5028
13	-212.0311	-209.2983	-1.2889
14	6.7619	6.4661	4.3745
15	-34.6479	-35.2213	1.6549
16	-40.1282	-38.1710	-4.8774
17	-40.7222	-33.9616	-16.6017
18	-40.2713	-37.0201	-8.0732
19	-80.1612	-80.5433	0.4767
20	-82.1255	-78.1196	-4.8778
21	-80.6187	-77.2736	-4.1493
22	-78.5632	-78.3483	-0.2735
		Soma das %	-63.4066
		Média (M)	-3.3515
		Desvio da Média (d <sub>m</sub> )	2.8412
		Desvio Padrão (σ)	4.2102

A linha tracejada separa os compostos ativos(1 a10) e inativos (11 a 22)

Para o levantamento estatístico foram considerados todos os pontos dos valores medidos da propriedade.

**Diferença entre os dois métodos: - 3.3515 ± 4.2102 kcal mol<sup>-1</sup>**

As diferenças % positivas indicam uma diminuição do valor medido da propriedade pelo método 2 em relação ao método 1, e vice versa.

**Tabela 41: Valores dos Momentos de Dipolos para os flavonóides, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles:**

Composto	Método 1 (D)	Método 2 (D)	%
1	5.141	2.231	-43.396
2	4.670	1.688	-36.103
3	3.110	3.751	20.611
4	1.734	4.970	186.621
5	5.194	2.765	-46.765
6	2.686	2.623	-2.346
7	3.381	3.201	-5.324
8	4.019	1.251	-68.873
9	3.185	2.090	-34.388
10	1.951	2.568	31.625
11	4.497	2.428	-46.008
12	2.852	2.085	-26.893
13	4.295	3.619	-15.739
14	3.606	3.572	-0.943
15	2.669	2.660	-0.337
16	2.701	2.705	1.481
17	4.108	3.681	-10.394
18	3.057	3.013	-1.439
19	3.294	3.298	1.214
20	2.792	2.745	-1.683
21	4.463	2.167	-51.445
22	1.721	4.467	158.558
		Soma das %	-257.6460
		Média (M)	-16.8573
		Desvio da Média ( $d_m$ )	21.9013
		Desvio Padrão ( $\sigma$ )	26.0838

A linha tracejada separa os compostos ativos(1 a10) e inativos (11 a 22)

Para o levantamento estatístico foram desconsiderados os pontos 4 e 22, uma vez que foram as medidas que desviaram muito em relação aos outros valores da propriedade.

**Diferença entre os dois métodos: - 16.8573 ± 26.9013 D**

As diferenças % negativas indicam uma diminuição do valor medido da propriedade pelo método 2 em relação ao método 1, e vice versa.

**Tabela 42: Valores de Área Superficial dos flavonóides, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles:**

Composto	Método 1 (Å <sup>2</sup> )	Método 2 (Å <sup>2</sup> )	%
1	448.76	463.96	3.39
2	441.47	451.05	2.17
3	449.79	464.56	3.28
4	459.41	477.95	4.04
5	429.26	438.03	2.04
6	442.32	455.81	3.05
7	433.25	447.29	3.24
8	443.92	454.54	2.39
9	448.09	461.17	2.92
10	443.00	459.65	3.76
11	424.19	430.23	1.42
12	432.59	435.59	0.69
13	460.59	470.36	2.12
14	412.66	415.46	0.68
15	415.95	425.58	2.32
16	423.33	427.21	0.92
17	417.30	424.30	1.68
18	423.87	429.26	1.27
19	432.79	442.40	2.22
20	420.28	435.15	3.54
21	428.23	435.34	1.66
22	427.98	435.68	1.80
		Soma das %	45.41
		Média (M)	2.32
		Desvio da Média (d <sub>m</sub> )	0.83
		Desvio Padrão (σ)	1.01

A linha tracejada separa os compostos ativos(1 a10) e inativos (11 a 22)

Para o levantamento estatístico foram considerados todos os pontos dos valores medidos da propriedade.

**Diferença entre os dois métodos:  $2.32 \pm 1.01 \text{ \AA}^2$**

As diferenças % negativas indicam uma diminuição do valor medido da propriedade pelo método 2 em relação ao método 1, e vice versa.

**Tabela 43: Valores de Volume Molecular dos flavonóides, pelos métodos 1 e 2, e as variações entre eles:**

Composto	Método 1 (Å <sup>3</sup> )	Método 2 (Å <sup>3</sup> )	%
1	744.97	750.05	0.68
2	725.50	729.01	0.48
3	759.92	766.48	0.86
4	779.79	785.21	0.70
5	703.43	708.32	0.70
6	740.08	744.69	0.62
7	718.96	724.87	0.82
8	730.12	731.25	0.15
9	744.95	747.85	0.39
10	739.40	748.08	1.17
11	688.44	688.71	0.04
12	708.86	709.95	0.15
13	754.14	766.13	1.59
14	667.13	668.22	0.16
15	682.77	684.61	0.27
16	689.19	689.34	0.02
17	682.52	685.67	0.46
18	688.44	690.26	0.26
19	710.29	712.20	0.27
20	692.62	701.83	1.33
21	702.23	703.89	0.24
22	700.29	708.75	1.21
		Soma das %	10.68
		Média (M)	0.54
		Desvio da Média (d <sub>m</sub> )	0.34
		Desvio Padrão (σ)	0.43

A linha tracejada separa os compostos ativos(1 a10) e inativos (11 a 22)

Para o levantamento estatístico foram considerados todos os pontos dos valores medidos da propriedade.

**Diferença entre os dois métodos:  $0.54 \pm 0.43 \text{ \AA}^3$**

As diferenças % negativas indicam uma diminuição do valor medido da propriedade pelo método 2 em relação ao método 1, e vice versa.

**Tabela 44: Valores de Log P, Refratividade Molecular e Polarizabilidade para os flavonóides. Para os dois métodos os resultados foram iguais.**

<b>Composto</b>	<b>Log P (Coeficiente de Partição)</b>	<b>Refratividade Molecular</b>	<b>Polarizabilidade (a.u.)</b>
1	1.18	73.73	27.90
2	1.46	73.75	27.27
3	0.28	75.43	28.54
4	0.00	77.12	29.18
5	1.75	70.36	26.63
6	0.56	73.73	27.90
7	0.85	72.04	27.27
8	1.46	72.05	27.27
9	1.18	73.75	27.90
10	0.56	73.73	27.90
11	2.03	68.67	25.98
12	1.75	70.36	26.63
13	0.28	75.43	28.54
14	2.32	66.97	25.36
15	1.42	68.65	25.99
16	2.03	68.67	25.99
17	2.03	68.67	25.99
18	2.03	68.67	25.99
19	1.75	70.36	26.63
20	1.75	70.36	26.63
21	1.75	70.36	26.63
22	1.75	70.36	26.63

A linha tracejada separa os compostos ativos(1 a10) e inativos (11 a 22)

**Tabela 45: Valores de dos ângulos diedros medidos entre os anéis C e B dos flavonóides. São mostrados os valores obtidos para ambos os métodos:**

<b>Composto</b>	<b>Método1 (°)</b>	<b>Método 2 (°)</b>
1	0.00	-22.86
2	0.00	-28.31
3	-0.07	-23.26
4	-0.06	-22.26
5	-0.06	-28.30
6	-0.07	-19.97
7	-0.07	-23.54
8	-0.07	-29.54
9	-0.23	-38.63
10	0.84	-20.79
<hr/>		
11	0.15	-23.68
12	0.42	-36.45
13	-0.11	-25.75
14	0.13	-19.66
15	-0.21	-19.16
16	-0.22	-19.43
17	-0.51	-24.35
18	-0.22	-15.61
19	-0.12	-22.75
20	-0.14	-23.70
21	-0.16	-24.02
22	-1.54	-25.30

A linha tracejada separa os compostos ativos(1 a10) e inativos (11 a 22)

**Tabela 46: Valores das cargas sobre os átomos de oxigênio nas hidroxilas dos flavonóides, definidas na figura 14, obtidas pelo método 1:**

Comp.	3	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'
1	--	-0.247	--	-0.238	--	--	-0.244	-0.264	--
2	--	-0.248	--	-0.238	--	--	--	-0.243	--
3	-0.250	-0.244	--	-0.235	--	--	-0.248	-0.266	--
4	-0.251	-0.243	--	-0.235	--	--	-0.245	-0.263	-0.270
5	--	-0.247	--	-0.238	--	--	--	--	--
6	-0.250	-0.244	--	-0.236	--	--	--	-0.246	--
7	-0.247	-0.244	--	-0.236	--	--	--	--	--
8	--	--	--	-0.242	--	--	-0.245	-0.265	--
9	--	--	--	-0.236	-0.223	--	-0.243	-0.265	--
10	-0.249	--	--	-0.240	--	--	-0.247	-0.266	--
11	--	--	--	-0.242	--	--	--	--	--
12	--	--	--	--	--	--	-0.244	-0.265	--
13	-0.255	-0.246	--	-0.237	--	-0.227	--	-0.244	--
14	--	--	--	--	--	--	--	--	--
15	-0.249	--	--	--	--	--	--	--	--
16	--	--	--	--	--	--	--	-0.244	--
17	--	-0.251	--	--	--	--	--	--	--
18	--	--	-0.249	--	--	--	--	--	--
19	--	--	-0.249	--	--	--	-0.248	--	--
20	--	-0.249	--	--	--	-0.253	--	--	--
21	--	--	--	-0.238	-0.246	--	--	--	--
22	--	--	-0.247	--	--	-0.254	--	--	--

A linha tracejada separa os compostos ativos(1 a10) e inativos (11 a 22)

**Tabela 47: Valores das cargas sobre os átomos de oxigênio nas hidroxilas dos flavonóides, definidas na figura 14, obtidas pelo método 2:**

Comp.	3	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'
1	--	-0.202	--	-0.239	--	--	-0.226	-0.222	--
2	--	-0.202	--	-0.237	--	--	--	-0.245	--
3	-0.246	-0.205	--	-0.237	--	--	-0.229	-0.225	--
4	-0.248	-0.205	--	-0.236	--	--	-0.225	-0.222	-0.257
5	--	-0.202	--	-0.240	--	--	--	--	--
6	-0.248	-0.205	--	-0.237	--	--	--	-0.248	--
7	-0.245	-0.205	--	-0.237	--	--	--	--	--
8	--	--	--	-0.243	--	--	-0.226	-0.220	--
9	--	--	--	-0.265	-0.232	--	-0.227	-0.222	--
10	-0.246	--	--	-0.240	--	--	-0.228	-0.224	--
11	--	--	--	-0.243	--	--	--	--	--
12	--	--	--	--	--	--	-0.226	-0.222	--
13	-0.250	-0.205	--	-0.236	--	-0.244	--	-0.224	--
14	--	--	--	--	--	--	--	--	--
15	-0.245	--	--	--	--	--	--	--	--
16	--	--	--	--	--	--	--	-0.245	--
17	--	-0.207	--	--	--	--	--	--	--
18	--	--	-0.249	--	--	--	--	--	--
19	--	--	-0.249	--	--	--	-0.247	--	--
20	--	-0.206	--	--	--	-0.248	--	--	--
21	--	--	--	-0.220	-0.222	--	--	--	--
22	--	--	-0.250	--	--	-0.230	--	--	--

A linha tracejada separa os compostos ativos(1 a10) e inativos (11 a 22)

## **V - DISCUSSÕES**

## 5) Discussões:

Na elaboração deste trabalho algumas dúvidas surgiram, e entre elas o questionamento sobre as possíveis mudanças que poderiam ocorrer nas propriedades geométricas, eletrônicas e moleculares quando aplicados os dois métodos propostos.

Em um deles, denominado método 1, as moléculas das duas séries tiveram suas estruturas otimizadas pelas formas tradicionais usadas em estudos de modelagem molecular. Nesta situação, as moléculas foram previamente otimizadas por mecânica molecular OPLS e depois refinadas com o método semi-empírico AM1, com ambas situações no vácuo. Nas estruturas obtidas foram estabelecidas as propriedades de interesse para estudo.

No segundo caso, denominado método 2, as moléculas foram otimizadas por mecânica molecular OPLS, dentro da estrutura cristalina do complexo estabelecido por Enroth et al. (2000) que possui um salicilato complexado no sítio ativo da xantina oxidase.

As moléculas em estudo substituíram o salicilato no sítio catalítico da enzima sendo então previamente otimizadas usando o cristal como campo de força externo e fixo. Em seguida para tentar simular o comportamento do complexo formado pela enzima com as moléculas estudadas, aplicou-se no modelo uma rotina de otimização sobre o conjunto formado pelos compostos fenilpirazólicos ou flavonóide, os aminoácidos do sítio catalítico e mais alguns adjacentes a eles, formando uma região esférica de aproximadamente 14 ângstrons.

As moléculas obtidas assim foram então refinadas pelo método semi-empírico AM1 no vácuo e utilizadas para estabelecer as propriedades eletrônicas, geométricas e moleculares.

### **5.1) Análises da geometria dos compostos fenilpirazólicos e flavonóides obtidos pelos métodos 1 e 2:**

Inicialmente quando são analisados os resultados das geometrias moleculares obtidas usando os métodos 1 e 2 para as séries estudadas, verifica-se várias mudanças significativas nas estruturas das duas classes de compostos de interesse neste estudo.

Particularmente, os fenilpirazóis foram os que mostraram maiores diferenças estruturais quando analisados os resultados dos dois métodos propostos, como pode ser verificado nas tabelas 25 e 26 para estes e na tabela 46 para os flavonóides.

As tabelas 25, 26 e 46 nos dão uma noção bem clara que os aspectos espaciais mudam em função dos ângulos diedros definidos na figura 14 (ângulos C, R, P para o fenilpirazólicos e ângulo F para os flavonóides). Quando são observados os valores para estes ângulos verifica-se que as duas séries analisadas apresentam pelo método 1 (modelagem das moléculas no vácuo) um aspecto mais próximo de uma estrutura planar.

Nos compostos fenilpirazólicos isto é refletido nos ângulos C e R que tem valores próximos à  $180^\circ$ , enquanto uma situação semelhante é observada para os flavonóides, cujo ângulo F retrata o aspecto planar destes compostos com valores girando em torno de  $0^\circ$ .

Usando apenas estas informações não foi possível estabelecer uma correlação interessante entre as atividades dos compostos em estudo e a posição geométrica dos átomos ou grupos de átomos analisados quando se usa o método 1.

Além disso, uma molécula planar muito grande não caberia no sítio ativo sem causar repulsão entre o inibidor e as cadeias laterais dos aminoácidos na região catalítica, que são muito volumosos e necessitam de uma conformação que minimize as possíveis interações não ligantes (repulsivas) entre o inibidor e os aminoácidos do sítio ativo..

Entretanto, quando usado o método 2 (modelagem usando o cristal da enzima como campo de força), os valores obtidos mostraram que esta rotina parece ser mais interessante para ambas às séries onde pelos valores mostrados nas tabelas 26 e 46, verifica-se que as moléculas estão fora de um aspecto planar.

Para os fenilpirazóis, o ângulo C, entre a carboxila e o anel pirazólico, se mantém constante e em torno de  $180^\circ$  para todos os compostos, de forma bem semelhante ao anel aromático e da carboxila do salicilato no complexo original de Enroth et al. (2001). Isto possibilita que a carboxila produza uma ponte de hidrogênio com a Thr 440, mostrado na figura 17 a, ou com o Glu por intermédio das duas águas mantidas no modelo, conforme Enroth et al. (2000) e Silva et al. (2003).

Quando são verificados os ângulos R e P, as medidas que foram obtidos para os compostos ativos (1 a 6), o primeiro fica entre  $110^\circ$  e  $130^\circ$ , e o segundo ângulo em torno de  $-30^\circ$ , fazendo com que os compostos fiquem fora de uma estrutura plana.

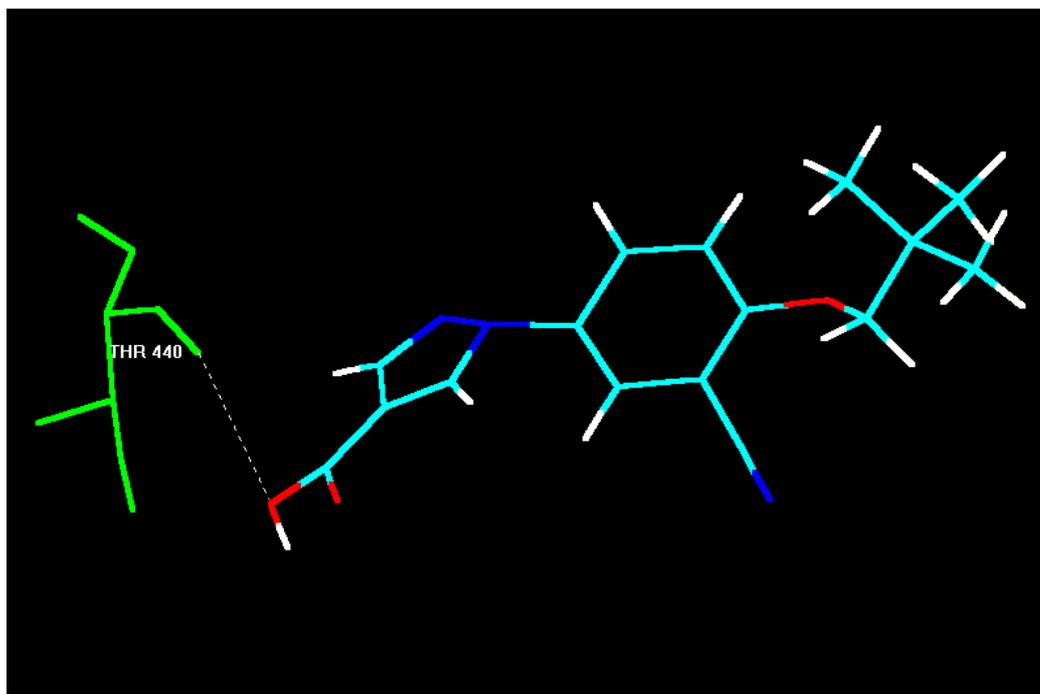
Verifica-se também que se o par de ângulos foge desta combinação, o composto tende a inatividade. Com isto pode-se observar que, ao contrário do primeiro, o segundo método forneceu uma boa relação entre atividade dos compostos e sua conformação.

No caso dos flavonóides se é utilizado o método 2, também são fornecidas estruturas fora do plano, com uma relação angular entre os anéis B e C entre  $-20^\circ$  e  $-30^\circ$ . No entanto não foi possível encontrar uma correlação estrutural para esta série, a não ser observar que o anel aromático A se posiciona dentro da mesma região ocupada pelo salicilato. Quando são observadas as figuras 18 e 18, vê-se que os melhores compostos de cada série se colocam muito bem no interior do sítio ativo e obedecem as geometrias encontradas pelo método 2.

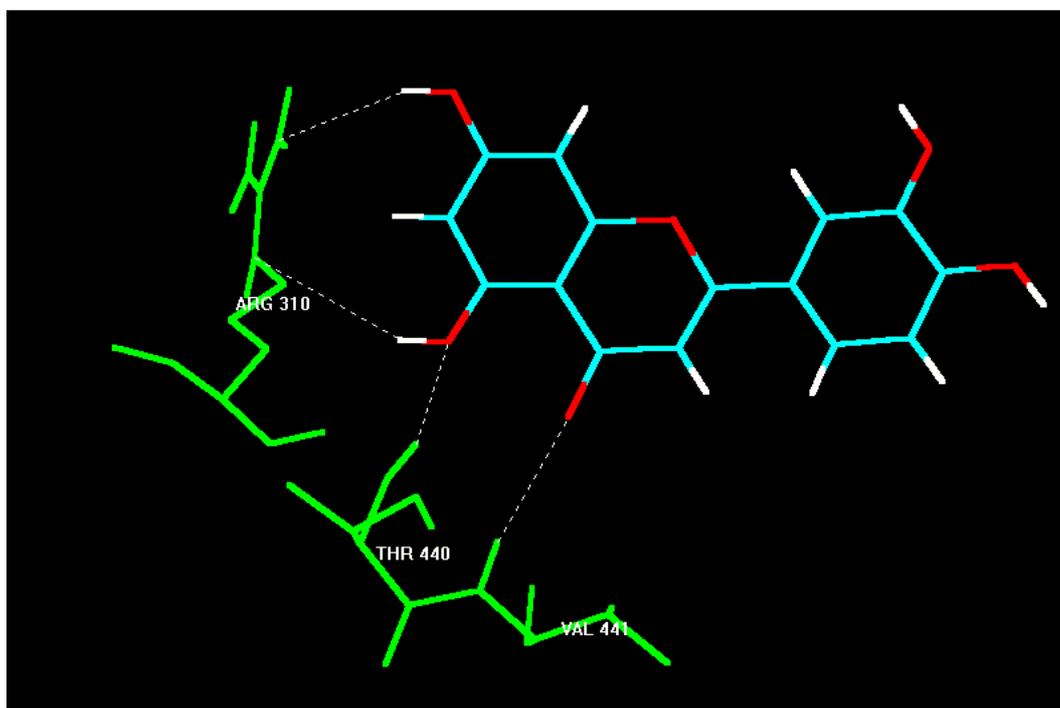
Além disso, verifica-se que também são realizadas 3 pontes de hidrogênios com os aminoácidos Thr 440, Val 441 e Arg 310, mostrado na figura 17b, o que não iria ocorrer se fosse usada uma molécula planar no sítio ativo, pois as hidroxilas do anel B iriam se posicionar cadeias laterais hidrofóbicas.

Estas diferenças devem estar associadas às possíveis interações obtidas pelos grupos substituintes destes compostos com as cadeias laterais dos aminoácidos que compõem o sítio ativo. Esta observação é feita em função do fato que a maior parte destes aminoácidos tem características hidrofóbicas, portanto mais parecidas aos substituintes R1 e R2 dos fenilpirazólicos e menos às hidroxilas fenólicas dos flavonóides.

Figura 17: Pontes de hidrogênio verificadas no interior do sítio catalítico da xantina oxidase. a) com os fenilpirazólicos (composto 1); b) com os flavonóides (composto 1).



a)



b)

Quando se observam as estruturas dos fenilpirazólicos mostradas na figura 17 e suas atividades inibidoras nas tabelas 10 e 11, percebe-se que as estruturas dos substituintes R1 devem estar associadas às suas ações de inibição.

Parece que os diferentes graus de hidrofobicidades podem ser os responsáveis pela inibição de onde podemos inferir que quanto mais hidrofóbicos forem os grupos R1 ligados aos anéis, maior a interação com o sítio ativo.

Como os flavonóides não possuem grupos muito hidrofóbicos em lugar de suas hidroxilas, possivelmente foi por esta característica que não se conseguiu fazer qualquer correlação geométrica nesta série de compostos.

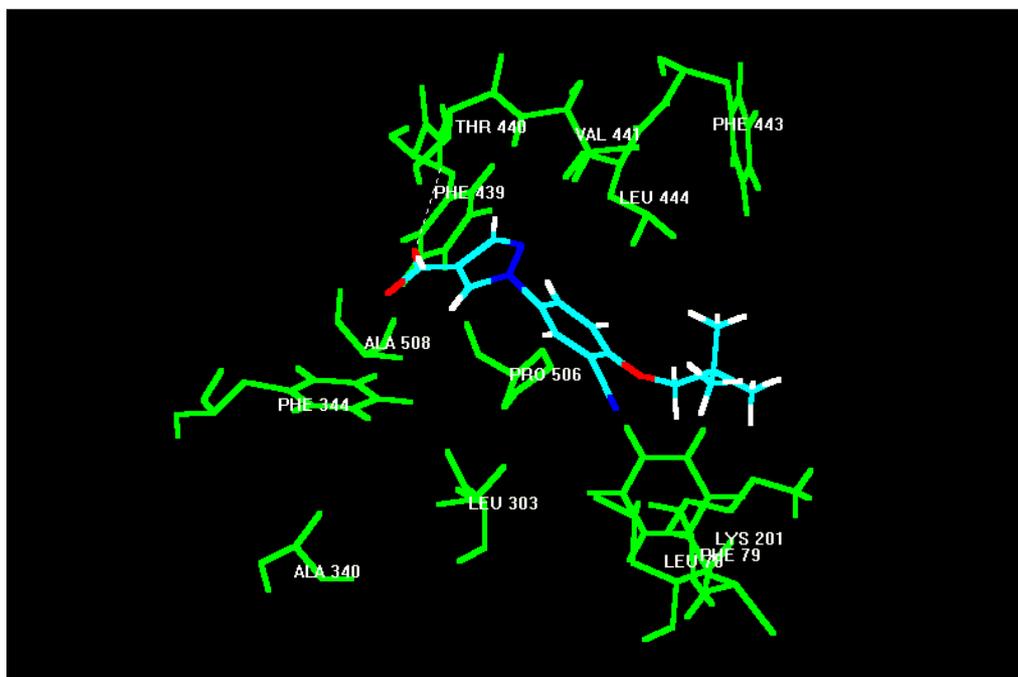
Nas figuras 18 e 19 vê-se claramente que os dois anéis dos derivados fenilpirazólicos (18a e 18b) e também os anéis condensados A e C do flavonóides (19a e 19b) se posicionam entre os aminoácidos Leu 303, Ala 340, Phe 344, Phe 439, Val 441, Leu 444, Pro 506 e Ala 508, reforçando as interações hidrofóbicas possíveis.

No entanto, verifica-se que nos flavonóides foram produzidas mais pontes de hidrogênio (grupos hidroxilas C7, C5 e o átomo de oxigênio do grupo cetona com os aminoácidos Arg 310, Thr 440 e Val 441, respectivamente) no interior do complexo do que aquelas produzidas pelos fenilpirazóis (somente da carboxila com a Thr 440) e, talvez seja o fato que compense a falta de grupos mais hidrofóbicos (figura 17<sup>a</sup> e 17b).

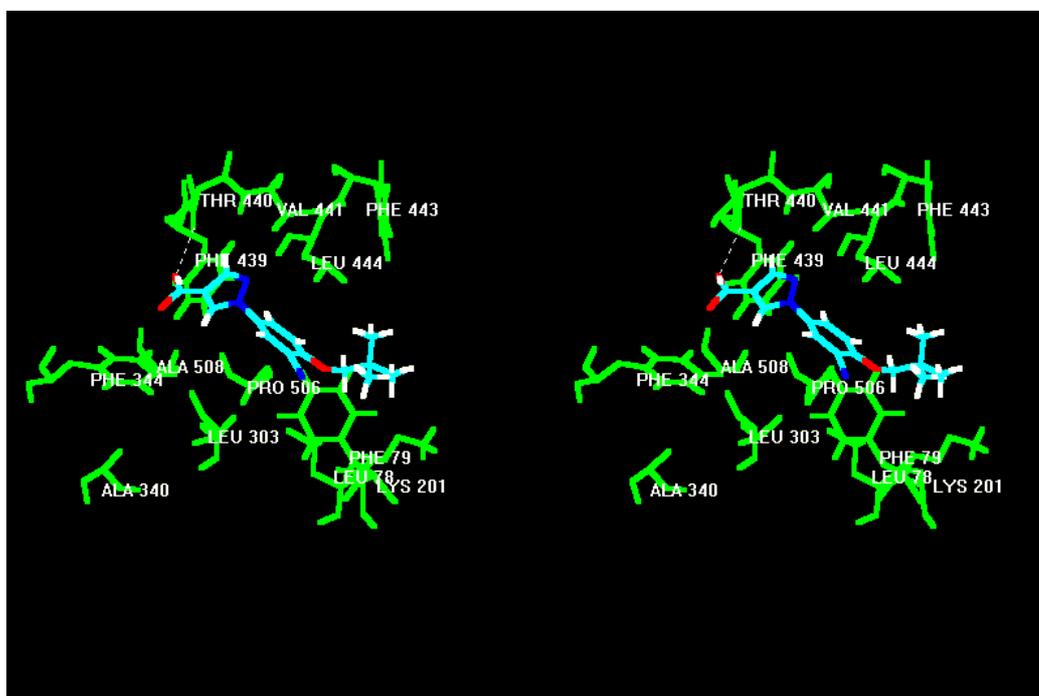
Podemos inferir em resumo que, para aumentar a ação do inibidor, é importante estruturalmente que as duas formas de interações entre o fármaco potencial e a enzima sejam satisfeitas simultaneamente.

Portanto se na molécula houver um grupo hidrofóbico como substituinte este deverá se posicionar em direção aos aminoácidos Leu 78, Phe79, Phe 443 e Leu 444, ao mesmo tempo, os anéis aromáticos devem estar posicionados entre os aminoácidos Leu 303, Ala 340, Phe 344, Phe 439, Val 441, Leu 444, Pro 506 e Ala 508, de forma a aumentar as possibilidades de interações hidrofóbicas.

Figura 18: Disposição espacial dos inibidores fenilpirazólicos no sítio ativo da xantina oxidase. a) com o fenilpirazólico mais ativo (composto 1); b) com o fenilpirazólico mais ativo (composto 1) – visão estéreo.

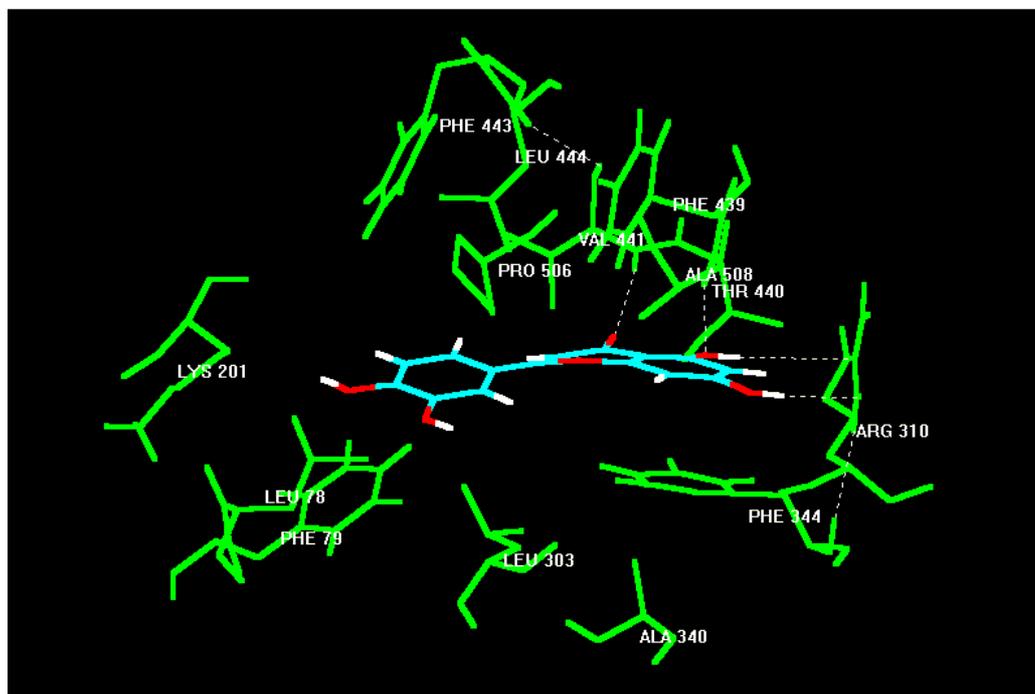


a)

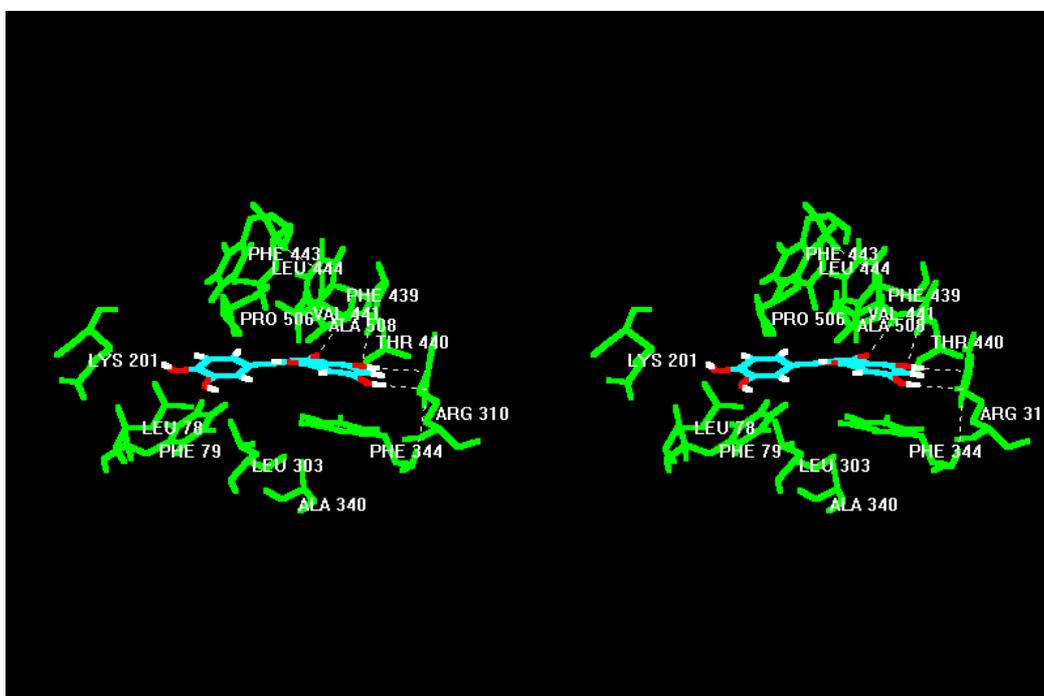


b)

Figura 19: Disposição espacial dos inibidores flavonóides no sítio ativo da xantina oxidase. a) com o flavonóide mais ativo (composto 1); b) com o flavonóide mais ativo (composto 1) – visão estéreo.



a)



d)

Ainda é importante observar que as hidroxilas fenólicas dos flavonóides e da carboxila do grupo ácido dos fenilpirazóis devem se posicionar de maneira a facilitar as pontes de hidrogênio com os aminoácidos Arg 310, Thr 440 e Val 441 e Thr 440 respectivamente. A ausência de hidroxila na posição C7 retirou a ação inibidora dos flavonóides.

Vale ressaltar que as moléculas na forma planar não conseguiriam obedecer estas condições e, se analisarmos unicamente os dados fornecidos pelo estudo usando o método 1, teríamos uma visão estrutural errada da interação da enzima XO com os inibidores.

## **5.2 Análises das diferenças entre os valores de energias e das propriedades moleculares:**

Uma vez verificado que os dois métodos produziram diferenças geométricas significativas e importantes, para que se possa fazer uma análise confiável das correlações estruturas-atividade, surge uma outra pergunta: as moléculas produzidas pelos dois métodos apresentam correlações energéticas significativamente diferentes entre si?

Para ajudar a responder esta dúvida foram medidas as diferenças percentuais das propriedades energéticas e moleculares que as rotinas do HyperChem 7.0 podem calcular.

As propriedades medidas são as seguintes:

- 1) Energia Total (eV);
- 2) Energia de Ligação (eV),
- 3) Energia Eletrônica (eV);
- 4) Energia de Hidratação ( $\text{kcal mol}^{-1}$ );
- 5) Calor de Formação ( $\text{kcal mol}^{-1}$ );
- 6) Volume ( $\text{\AA}^3$ );
- 7) Área ( $\text{\AA}^2$ );
- 8) Refratividade molecular;
- 9) Polarizabilidade Molecular (a.u.);

- 10) Momento de Dipolo (D);
- 11) Coeficiente de partição (Log P)
- 12) Orbital de fronteira mais alto ocupado (HOMO) (eV);
- 13) Orbital de fronteira mais baixo desocupado (LUMO) (eV);
- 14) Dureza (Hardness) (eV);
- 15) Eletronegatividade de Mullikan (eV);

Na tabela 48 estão mostrados as diferenças percentuais, obtidas para as propriedades escolhidas, utilizando ambos os métodos, e calculados através do HyperChem 7.0. Quando não citadas as propriedades não apresentaram diferenças percentuais entre seus valores.

Pela análise dos valores de Energias Total (tabelas 12 e 32), de Ligação (tabelas 13 e 33) e Eletrônica (tabelas 14 e 34), que demonstram as correlações energéticas entre elétrons - elétrons, elétrons - núcleos e núcleos - núcleos para uma molécula, verificamos que nas duas séries de moléculas não foi determinada praticamente nenhuma variação nos valores obtidos nos métodos testados, o que mostra que em termos destas energias as análises podem ser feitas sem nenhum problema pelas duas abordagens.

**Tabela 48: Comparação entre as médias de variações entre os métodos 1 e 2. Os valores apresentados refletem a relação percentual entre o método2 e o método1.**

<b>Propriedades</b>	<b>Fenilpirazóis (%)</b>	<b>Flavonóides (%)</b>
Energia Total	0.0024 ± 0.0039	-0.0041 ± 0.0042
Energia de Ligação	-0.0005 ± 0.2217	-0.0909 ± 0.0946
Energia Eletrônica	0.5513 ± 1.0406	-0.1244 ± 0.3440
Energia de Hidratação	-5.88 ± 6.77	-4.14 ± 5.64
Calores de Formação	23.5624 ± 39.3130	-3.3515 ± 4.2102
Orbitais HOMO	-0.0351 ± 1.2679	-0.3832 ± 3.2271
Orbitais LUMO	5.1442 ± 11.7895	-15.3077 ± 10.1378
Dureza (Hardness)	-0.4965 ± 1.2325	1.3139 ± 3.8277
Eletroneg. de Müllikan	0.4163 ± 2.0534	-2.0655 ± 3.1854

Momento de Dipolo	-47.72 ± 10.99	-16.85 ± 26.08
Área Superficial	-0.36 ± 2.06	2.32 ± 1.01
Volume molecular	-0.48 ± 0.81	0.54 ± 0.43

Quando são observados os valores de energia de hidratação (tabelas 15 e 35) o método 2 em relação ao método 1, apresentou uma variação de  $-5.88 \% \pm 6.77 \%$  e  $-4.14 \% \pm 5.64 \%$  para os fenilpirazóis e flavonóides respectivamente. Dentro dos limites determinados pelo desvio padrão, pode-se dizer que ambas as séries tiveram um pequeno aumento da energia de hidratação e praticamente igual quando usado o método 2, em relação ao método 1.

As moléculas otimizadas no vácuo tendem a alcançar uma das conformações de menor energia e, segundo os parâmetros semi-empíricos inseridos nos métodos computacionais, é aquela que apresenta melhor correlação entre os átomos ou grupos substituintes de uma molécula, independente de interações possíveis com a água.

Com isso, os resultados mostram que a forma planar das moléculas obtidas pelo método 1 facilitam o acesso e a interação das moléculas de água, o que irá fornecer uma energia de hidratação mais favorável. Quando a planariedade foi diminuída pelo método dois, o acesso das moléculas de água foi diminuído e conseqüentemente a energia de hidratação média para as duas séries foi menos favorecida.

Quando analisados os calores de formação (tabelas 20 e 40) que são indicadores relacionados à estabilidade da estrutura obtida, vê-se que ocorreu um aumento de energia para os flavonóides em torno de  $3.3515 \% \pm 4.2102 \%$  pelo método 2 em relação ao método 1.

Isto pode ser reflexo das polaridades das hidroxilas que como grupos hidrofílicos precisam ser reorganizadas dentro do ambiente hidrofóbico do sítio ativo, e as interações que estas estruturas provocam com os aminoácidos apolares região serão pouco favorecidas e poderão aumentar o calor de formação.

O fato de ser notado um aumento desta propriedade pode ser uma evidência que a conformação de menor energia obtidas pelos métodos usuais pode não ser sempre aquela responsável por um determinado efeito biológico. No entanto esta variação de

energia, na série dos flavonóides, pode ser considerada pequena e provavelmente não afetem as análises estruturais e energéticas.

Para os fenilpirazóis a variação do calor de formação mostrou uma diminuição de cerca de  $23.5624 \pm 39.3130$ . Estes valores são bem mais significativos para a correlação energética e podem estar associados ao ambiente hidrofóbico do sítio catalítico, mais favorável à modelagem destas moléculas.

Como foi observado que os compostos mais ativos dos fenilpirazólicos e, ao mesmo tempo, hidrofóbicos foram aqueles que tiveram maiores diminuições do calor de formação conforme a tabela 20, parece ser razoável inferir que as características de polaridades similares estão relacionadas aos melhores valores calculados para esta propriedade pelo método 2.

Assim parece que, de modo geral, se modelarmos os inibidores nos sítios ativos de polaridade semelhante, a tendência será encontrar moléculas mais estáveis que aquelas obtidas por modelagem no vácuo.

Os valores calculados para as energias dos orbitais, HOMO e LUMO, são mostrados nas tabelas 16 e 17 para os derivados fenilpirazólicos e nas tabelas 36 e 37 para os flavonóides.

A energia associada aos orbitais moleculares de fronteira é indicador do carácter eletrodoador ou eletroceptor de um composto. Valores altos de HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) indicam a alta capacidade de doação eletrônica, e quando os valores de LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) são altos, isto indica compostos de alta capacidade de aceção de elétrons (Honório and da Silva (2003)).

Para as duas séries estudadas, variações percentuais nos valores de HOMO ficaram em torno de 0 %, e dentro dos desvios padrões pode-se inferir que os dois métodos devem produzir valores muito próximos.

Já quando analisadas as variações percentuais entre os dois métodos para os valores dos orbitais moleculares de fronteira do tipo LUMO, os fenilpirazóis apresentaram uma variação percentual de  $5.1442 \% \pm 11.7895 \%$ , mostrando que as energias relativas a esta propriedade sofrem uma diminuição no método 2. Já os flavonóides mostraram um aumento de  $15.3077 \% \pm 10.1378 \%$  nos valores da propriedade para o mesmo método.

Isto é interessante, pois se sabe que a disposição espacial dos átomos (sua geometria molecular) e conseqüentemente, dos orbitais, afetam as energias associadas aos orbitais de fronteira.

Se estas diferenças energéticas nos orbitais de fronteira são consideradas paralelamente aos calores de formação, observa-se que os compostos que apresentaram melhorias nestes últimos valores (fenilpirazóis) foram aqueles que tiveram, na média, também diminuição nas energias de LUMO. Ao contrário, para os compostos onde ocorreu aumento do calor de formação (flavonóides), na média, tiveram aumento também na energia de LUMO. Desta forma, os derivados fenilpirazólicos devem apresentar um comportamento acceptor de elétrons maior que o flavonóides se considerado apenas o método 2.

Os valores de HOMO e LUMO refletirão as propriedades moleculares da dureza (Hardness) ( $\eta$ ) e a Eletronegatividade de Müllikan ( $\chi$ ), que estão associados às reatividades e estabilidades dos compostos e a direção de transferência de elétrons entre duas substâncias químicas, respectivamente (Pearson 1963 e 1985).

Os valores destas propriedades são calculados a partir dos valores dos orbitais de fronteiras, conforme as equações 14 e 15.

$$\eta = \left( \frac{E_{HOMO} - E_{LUMO}}{2} \right) \quad (14)$$

$$\chi = -\frac{(E_{HOMO} - E_{LUMO})}{2} \quad (15)$$

Pelas tabelas 18 e 38, verifica-se que as variações na dureza entre os dois métodos, na média, foram pequenas para ambas as séries e ainda que para os flavonóides tenha havido um pequeno aumento e para os fenilpirazólicos, uma pequena diminuição em seus valores, pode-se dizer dentro do desvio padrão são variações muito parecidas.

O mesmo comportamento é verificado para a propriedade da eletronegatividade de Müllikan (tabelas 19 e 39), onde também dentro do desvio padrão pode-se dizer que

o método 2 em relação ao método 1 apresenta valores muito próximos em ambas classes de compostos.

A propriedade que sofreu maior mudança nos valores obtidos pelos dois métodos foi o momento de dipolo ( $\mu$ ), propriedade associada à capacidade de acúmulo de cargas parciais em certos pontos da molécula, e quanto maior o valor calculado de  $\mu$ , maior a capacidade de produção de pólos de cargas opostas.

O método 1 produziu moléculas mais próximas de uma estrutura planar para as duas séries de compostos, e isto também é refletido nos momentos de dipolo, já que este aspecto geométrico favorece a ressonância entre os anéis aromáticos e os átomos de oxigênio e nitrogênio, já que os orbitais p destas estruturas estão paralelos. Esta relação planar irá favorecer o acúmulo de cargas.

Na série dos compostos fenilpirazóis ocorre quebra da planariedade em dois pontos determinados pelos ângulos R e P, ou seja, entre o anel aromático e o substituinte R1 e entre os anéis aromáticos e pirazol, respectivamente. Isto pode ser o responsável pelas maiores mudanças observadas entre os dois métodos para estes compostos, uma vez que isto diminui bastante a interação entre os elétrons pi, e dificulta a formação de pólos.

Já no caso dos flavonóides, onde a quebra de planariedade ocorreu apenas entre os anéis B e C e com valores baixos, isto causará diminuição das interações entre os elétrons pi, porém não tão drasticamente quanto nos fenilpirazólicos, implicando numa diminuição da medida menos intensa.

Em ambas situações foram verificados que houve diminuição nos valores calculados. Os fenilpirazólicos tiveram na média  $47,72\% \pm 10,99\%$  e os flavonóides  $16,85\% \pm 26,08\%$  dentro da previsão na análise estrutural acima.

As propriedades, área superficial e volume molecular, foram as duas últimas que apresentaram mudanças entre os dois métodos. No entanto também as variações percentuais foram pequenas para o método 2 em relação ao método 1.

A área superficial e volume molecular são propriedades que estão associadas aos aspectos geométricos assumidos pelas moléculas dos inibidores e sua capacidade de interações espaciais com os receptores, tomando como referência os raios de van der Waals de cada átomo.

Para o grupo dos compostos fenilpirazólicos ocorreu uma pequena diminuição das duas propriedades,  $0.36\% \pm 2.06\%$  e  $0.48\% \pm 0.81\%$  respectivamente, quando são comparadas as duas estratégias de análises. Esta é uma situação que apresenta coerência, pois o método 2 trouxe a cadeia do substituinte R1 em direção aos anéis diminuindo tridimensionalmente o volume e área dos compostos.

Quando se estuda a série dos flavonóides verifica-se um pequeno acréscimo nas duas propriedades, sendo de  $2.32\% \pm 1.01\%$  para a área superficial e  $0.54\% \pm 0.43\%$  para o volume molecular e podem ser situações esperadas uma vez que no método 2, as relações tridimensionais dos anéis ficariam maiores.

As outras propriedades que foram medidas para os fenilpirazóis e flavonóides e foram obtidos valores rigorosamente iguais nos dois métodos são: o Log P, Polarizabilidade e Refratividade Molecular.

A primeira propriedade está relacionada ao coeficiente de partição que simula as características hidrofóbicas do composto se comparada com a polaridade de um sistema água - octano. As duas últimas propriedades estão associadas ao volume molecular, e conseqüentemente ao tamanho global da molécula e à magnitude da formação de dipolos, além medir a capacidade de distorção do inibidor pela conformação do sítio ativo (Montanari et al. (2002)). As tabelas 24 e 44 mostram os valores de cada compostos para ambos os métodos.

Foram medidos os valores de cargas líquidas sobre os átomos de oxigênios, nitrogênios e os grupos R2 dos compostos fenilpirazólicos e também sobre os oxigênios das hidroxilas fenólicas dos flavonóides (átomos ou grupos definidos na figuras 14a e 14b). As tabelas 28 e 29 mostram os valores das cargas medidas para os fenilpirazólicos, pelo método 1 e 2 respectivamente, enquanto nas tabelas 46 e 47 são mostradas as cargas sobre os oxigênios das hidroxilas para os flavonóides também, pelos métodos 1 e 2 respectivamente.

Apesar de existirem algumas diferenças entre os valores encontrados, o comportamento geral encontrado pelo método 2 em relação ao método 1 foi uma pequena diminuição para as cargas sobre Q1, Q2, Q3 e Q4, enquanto que, para Q5 este comportamento não foi muito homogêneo para todas as cargas (ver tabelas),

porém os 14 compostos mantiveram suas magnitudes quando comparados os valores encontrados para as duas metodologias.

No comportamento das cargas dos oxigênios nas hidroxilas fenólicas dos flavonóides, quando observados os valores obtidos nos dois métodos pelas tabelas 46 e 47, não foram observadas mudanças significativas, nem correlação direta com a atividade.

Diante destas observações pode-se inferir que os dois métodos podem calcular as propriedades associadas às diversas formas de energia, as propriedades eletrônicas e moleculares, praticamente iguais ou com baixa diferença entre eles. Também é possível dizer que quando as propriedades calculadas mostraram diferenças mais significativas isto foi relacionado, de forma bem coerente, com as mudanças geométricas induzidas nas moléculas estudadas pelo método 2.

### **5.3) Análises iniciais das relações estrutura - atividade quantitativa (QSAR) para os flavonóides estudados por Lin et al. (2002):**

O início de nossos estudos dos possíveis inibidores da xantina oxidase ocorreu a partir dos compostos estudados por Lin et al. (2002 a). Usando uma série de sete compostos (allopurinol e seis flavonóides de diversas classes) foi realizado um estudo dos aspectos estruturais que estavam associados à capacidade de inibição seletiva pelos compostos sobre a xantina oxidase.

Os resultados produzidos por este estudo mostraram que dois pontos são relevantes para que um composto inibidor da XO possa atuar. Um deles é a orientação de entrada do composto inibidor no sítio ativo que deve ser feita de modo a produzir pontes de hidrogênio entre as hidroxilas C5 e C7 com um resíduo de ácido glutâmico no sítio catalítico usando duas moléculas de águas disponíveis na estrutura cristalina.

Além disso, também os compostos ativos produzem interações hidrofóbicas importantes entre os aminoácidos Phe 649 e 1076 e Leu 648, 873 e 1014 com o anel aromático da estrutura geral dos flavonóides estabilizando o complexo de forma muito efetiva.

O segundo ponto de relevância para inibição da XO pelos flavonóides estudados por Lin et al. (2002) foram as propriedades moleculares associadas aos compostos. Além da necessidade de orientação dos inibidores, o tamanho físico dos flavonóides foi fator de seletividade entre eles.

Os compostos mais ativos foram os aqueles fisicamente maiores, refletidos na refratividade, área superficial e volume molecular e ao mesmo tempo se orientavam de forma adequada no sítio ativo. E mesmo que as moléculas tenham os tamanhos adequados, mas sem a orientação correta, a atividade inibidora diminuí drasticamente (Silva et al. (2003)).

Com estes fatos observados, acredita-se que as análises devam ser feitas em função da capacidade de produção de interações entre o sítio catalítico da enzima e os possíveis inibidores, e também, com base nos tamanhos associados às estruturas destes.

Com vistas nestes fatos já observados serão feitas as principais análises de relações estrutura-atividade quantitativa (QSAR) para os derivados fenilpirazólicos de Ishibuchi et al. (2001) e dos flavonóides de van Hoorn et al. (2002).

#### **5.4) Correlação da atividade e os aspectos energéticos e moleculares dos fenilpirazólicos e flavonóides que inibem a XO, obtidos pelo método 2.**

##### **5.4.1) Análise das estabilidades estruturais dos compostos das séries dos flavonóides e fenilpirazólicos:**

Como já foi visto, o método 2 oferece vantagens sobre o método 1, nos aspectos geométricos e moleculares, e fornece estruturas energeticamente semelhantes ao método tradicional de abordagem em QSAR, se compararmos as duas séries em estudo.

Uma análise sobre as energias fornecidas nas tabelas 12, 13, 14 e 20 para os fenilpirazólicos e nas tabelas 32, 33, 34 e 40 para os flavonóides, mostra bem

claramente que, para ambas as classes de compostos, aqueles que são mais ativos foram também aqueles que mostraram serem mais estáveis.

Nas propriedades energéticas estudadas as correlações entre elétron-elétron, elétron-núcleo, núcleo-núcleo tem reflexo direto nas energias Total, de Ligação, Eletrônica e no Calor de Formação, e portanto na estabilidade do composto.

Ao olharmos as tabelas de valores que apresentam a Energia Total dos fenilpirazólicos (tabela 12) e dos flavonóides (tabela 32) verificamos que os compostos ativos apresentam valores menores de  $-85$  eV para os primeiros e menores de  $-80$  eV para os segundos. Os compostos inativos apresentaram valores, em geral, maiores que estes.

Nas tabelas de Energia de Ligação (tabela 13 e 33, respectivamente, dos fenilpirazólicos e flavonóides) é mostrado que o comportamento de ambas as séries é semelhante a aquele verificado na energia total, ou seja, os compostos mais ativos têm menores valores de energia de ligação. Os fenilpirazólicos mais ativos têm valores menores que  $-3,6$  eV e,  $-3,4$  eV para os flavonóides ativos. Já os compostos inativos das duas classes têm valores maiores que estes encontrados.

A Energia Eletrônica, também varia conforme aquilo observado para a energia total, já que pelas tabelas 14 e 34, para os fenilpirazólicos e flavonóides, respectivamente, observa-se que compostos ativos apresentam valores menores que  $-51$  eV para os primeiros e de  $-45$  eV para os últimos, ainda sendo os inativos mais energéticos que isto.

Outro critério de análise que foi levado em conta para verificar a estabilidade das estruturas foi o Calor de Formação que, pelas tabelas 20 e 40, respectivamente fenilpirazólicos e flavonóides, mostraram que compostos estáveis em ambas as séries foram aqueles menos energéticos.

Os fenilpirazólicos ativos apresentaram valores negativos em seus calores de formação reforçando que a capacidade de inibição da XO está relacionada à estabilidade estrutural do inibidor. Da mesma forma os flavonóides ativos tiveram seus valores desta propriedade menores que  $-120$  kcal mol<sup>-1</sup> e os inativos maiores que este.

De posse destas informações e, já que foram observados comportamentos semelhantes para as duas classes em estudo, podemos inferir que a estabilidade do composto seja ponto importante ao se sintetizar um possível inibidor da XO.

Ainda que não existam formas de avaliar, pelos dados que estão disponíveis neste trabalho, talvez as maiores estabilidades dos compostos ativos impeçam a enzima de promover o ajuste induzido e quebrar o inibidor para liberar seu sítio catalítico.

Uma vez que a enzima não consegue liberar os compostos de seu interior e estes, como foi visto, formam várias pontes de hidrogênio e outras interações, deve estar sendo formado uma estrutura complexa cuja constante de afinidade deve ser maior que aquela entre a xantina oxidase e a hipoxantina. Ressalta-se que esta é apenas uma especulação e para definir isto são necessários mais dados experimentais.

Como existem algumas exceções nas duas classes, em relação às observações acima, é possível supor que os fatores de estabilidade dos compostos não devam ser os únicos a atuarem na capacidade inibidora das moléculas das duas séries.

Os compostos inativos dos fenilpirazólicos 8, 9, 12 e 14, somente em uma ou duas propriedades de estabilidade energética, das quatro estudadas, tem valores semelhantes aos ativos. Já nos flavonóides os compostos inativos 12 e 13 são as exceções mais significativas e, apesar de terem alguns valores semelhantes aos ativos, isto não ocorre nas quatro propriedades energéticas ao mesmo tempo.

Desta observação sai a idéia que um bom inibidor deve satisfazer as quatro propriedades energéticas simultaneamente. Ainda que só este critério seja insuficiente para verificar as correlações estrutura-atividade, deve ser considerado como um ponto de auxílio, e em conjunto com outras propriedades a serem analisadas ainda, na busca de um fármaco efetivo inibidor da XO.

#### **5.4.2) Análise dos orbitais de fronteira e propriedades correlacionadas nos compostos das séries dos flavonóides e fenilpirazólicos:**

Na busca de correlações dos orbitais moleculares de fronteira com a capacidade de inibição da XO, foram estudadas as tabelas 16, 17, 18 e 19 para os fenilpirazólicos e

36, 37, 38 e 39 para os flavonóides e verificou-se que os orbitais HOMO e LUMO aparentemente não estão associados às atividades biológicas dos inibidores das duas classes em estudo.

A mesma observação pode ser feita para Dureza Absoluta ( $\eta$ ) e Eletronegatividade de Müllikan ( $\chi$ ) cujos valores estão associados e são calculados a partir dos orbitais HOMO e LUMO. Estas propriedades nos fornecem a idéia de como será a forma de interação entre o receptor e o inibidor.

A dureza absoluta ( $\eta$ ) indica a afinidade entre duas estruturas químicas usando os conceitos de ácidos e bases de Lewis, duros e moles e, para uma dada série de inibidores se os valores diminuem, diminui também a afinidade entre o receptor e inibidor.

Ácidos duros (aceptores eletrônicos) tendem a interagir preferencialmente com bases duras (doadores eletrônicos) e vice-versa. Como não foi possível estabelecer uma correlação desta propriedade com as atividades de inibição observadas para as duas séries, pode-se inferir que a dureza absoluta não deve ser preponderante para a ação inibidora.

A possibilidade de interações com transferências de elétrons podem ser aferidas pelos valores fornecidos para os orbitais moleculares de fronteira, HOMO (caráter eletrodoador), LUMO (caráter eletroceptor) e pela eletronegatividade de Müllikan (medida da direção da transferência de elétrons). Entretanto esta possibilidade pode ser desconsiderada, se levarmos em conta apenas estas duas séries, pois tanto os compostos ativos, quanto os inativos, tem os valores das três propriedades muito próximos entre si e, desta forma, não foi possível também estabelecer correlações que possam afirmar que ocorre transferência eletrônica.

### **5.4.3) Análise das propriedades de superfície e área moleculares dos compostos das séries dos flavonóides e fenilpirazólicos:**

As medidas das superfícies moleculares, área e volume, para ambas as séries foram interessantes. Observando as tabelas 22 e 23 para os fenilpirazólicos e tabelas 41 e 42 para os flavonóides, percebe-se claramente que a região espacial do inibidor é ponto importante na ação biológica.

Os compostos fenilpirazólicos ativos foram aqueles que apresentaram área superficial acima de  $500 \text{ \AA}^2$  e os flavonóides ativos apresentaram área acima de  $450 \text{ \AA}^2$ . Verifica-se que os compostos 8 nos fenilpirazólicos e 13 dos flavonóides, apesar de serem inativos, mostram valores próximos daqueles encontrados para os ativos.

Os volumes moleculares dos compostos ativos tiveram valores acima de  $840 \text{ \AA}^3$  e  $720 \text{ \AA}^3$ , para os fenilpirazólicos e flavonóides respectivamente, e também houveram exceções, os compostos 8 e 12 para os primeiros e o composto 13 para os últimos.

Analisando os valores destas propriedades para as duas séries, verificamos que a capacidade de inativação destes compostos deve estar associada ao volume e área da molécula. Esta situação irá favorecer possíveis aumentos nas interações dos compostos ativos quando estes são colocados no interior do sítio catalítico.

Possivelmente os compostos com baixa capacidade de inibição, por não possuírem uma boa correlação de área e volume, tem menos interações favoráveis que irá diminuir a eficiência da inibição enzimática.

Com as informações até agora analisadas pode-se inferir que um composto será um eficiente inibidor da XO, se apresentar uma estrutura muito estável e com grande relação de volume e área superficiais.

O conjunto de todas estas observações proporciona um modelo onde, devido à estabilidade molecular e geométrica do inibidor, associados às superfícies adequadas, possam ser os fatores de formação de interações muito fortes que estabilizariam o complexo enzima - inibidor e impediriam que a XO atuasse sobre o seu substrato fisiológico.

#### **5.4.4) Análise das propriedades hidrofóbicas, de refratividade e polarizabilidades moleculares dos flavonóides e fenilpirazólicos:**

De forma também muito boa, as propriedades Log P (Coeficiente de partição, hidrofobicidade), refratividade (REF) e Polarizabilidade (POL) mostraram uma correlação com a atividade muito interessante que, no conjunto, darão uma idéia de uma estrutura com bom potencial de inibição da XO.

Analisando inicialmente os fenilpirazólicos observa-se que para esta série é importante existir um valor de hidrofobicidade alto para que um composto seja um bom inibidor. Como podem ser verificados na tabela 24, os compostos ativos apresentam valores acima de 1.50 e os inativos valores abaixo deste.

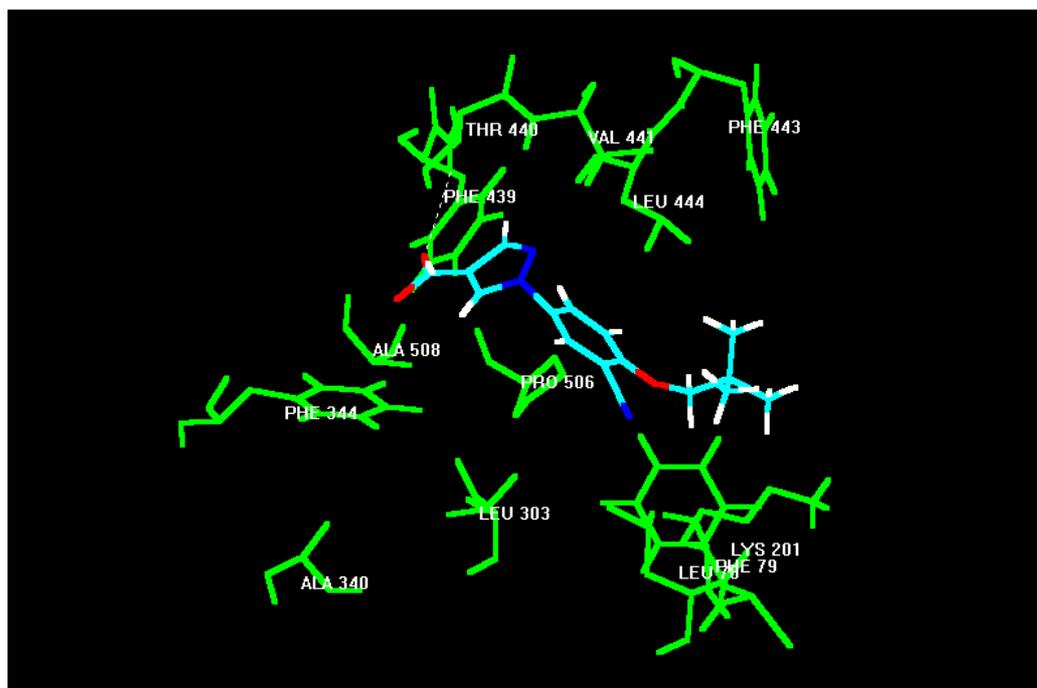
Se olharmos os substituintes usados na posição R1, vemos que os compostos ativos foram aqueles onde estes grupos possuem um volume grande e, pela ausência de grupos hidrofílicos, um maior caráter hidrofóbico (tabela 27).

A figura 20a mostra exatamente esta situação onde o grupo substituinte se organiza dentro de uma região formada pelos aminoácidos Leu 78, Phe79, Phe 443 e Leu 444, todos de características hidrofóbicas. Esta orientação é favorável ao posicionamento de R1.

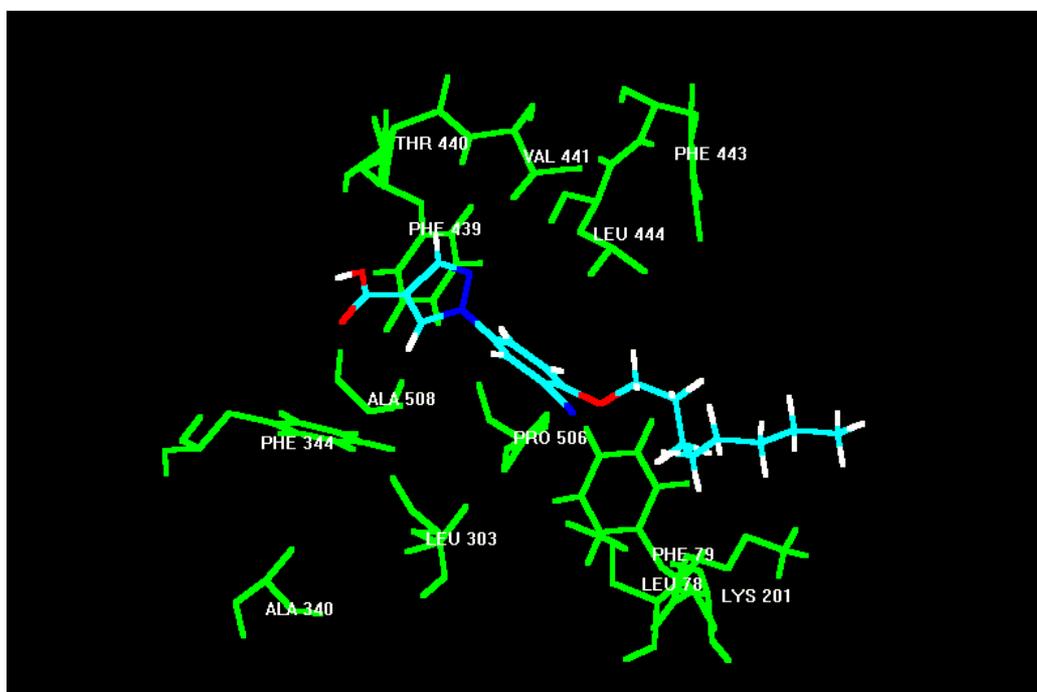
Entretanto, quando se relacionam os valores de volume, área, Log P, refratividade e polarizabilidade do composto 4, que são significativamente maiores que os 3 primeiros, com a atividade biológica, nota-se existe algum fator que está alterando a ação de inibição da XO.

A figura 20b mostra o composto dentro do sítio ativo e, podemos verificar que apesar de R1 do segundo composto se posicionar como o previsto, ou seja, dentro dos aminoácidos Leu 78, Phe79, Phe 443 e Leu 444, a sua linearidade (8 carbonos em cadeia normal e linear) faz com parte do substituinte se posicione fora do sítio catalítico, na região externa da enzima, e por tanto em contato com o ambiente hidrofílico causando certa perturbação ao sistema enzima-inibidor.

Figura 20: Disposição espacial dos fenilpirazólicos no sítio ativo da xantina oxidase. a) composto 1; b) composto 4.



a)



b)

Ainda pode-se perceber, na análise estrutural, que além das contribuições de R1, também o grupo R2 poderia estar afetando a ação do inibidor ao se orientar para a parte externa do sítio catalítico, com fácil acesso de moléculas de água.

Ainda na frente deste grupo está um resíduo de Lys 201, cuja carga líquida na cadeia lateral é positiva e vale +0.152. Desta forma R2 poderia estar também contribuindo para estes compostos por interações entre cargas, e por isso foram medidas os valores líquidos das cargas sobre este grupo.

Os resultados das medidas destas cargas estão mostrados na tabela 29, e interessante verifica-se que se este grupo R2 tem sua carga aumenta irá diminuir a ação do inibidor. Nos compostos ativos e inativos, a capacidade de interação diminui quando se torna a carga mais positiva. Provavelmente deve estar havendo repulsão entre a Lys 201 de carga positiva com R2 positivo.

Como se nota os fenilpirazólicos demonstram ter capacidade de interagir suas três regiões moleculares principais de forma diferente no interior do sítio ativo, por pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e interações de cargas.

As propriedades de refratividade (REF) e polarizabilidade (POL) estão associadas ao volume molecular e dão uma idéia de como os inibidores se modificam em função da sua interação com um determinado receptor ou sítio catalítico. Valores grandes indicam melhores capacidades de interação com o alvo biológico.

Nos fenilpirazólicos foram observados que os compostos ativos apresentam valores acima de 29 e 77, para a polarizabilidade e refratividade respectivamente, e isto indica que a capacidade de produzir dipolos, ou dispor cargas em algumas regiões moleculares é um fato importante. Já os compostos inativos têm baixa capacidade estabilização cargas em regiões moleculares distintas e isto pode estar ajudando a diminuir sua eficiência inibidora.

Dentro desta análise as exceções ficam por conta dos compostos 8 e 12. Ambos tem valores de POL e REF próximos aos compostos com atividade alta, porém dois fatos importantes são notados que podem ser os motivos que promovem seu baixo poder de inibição.

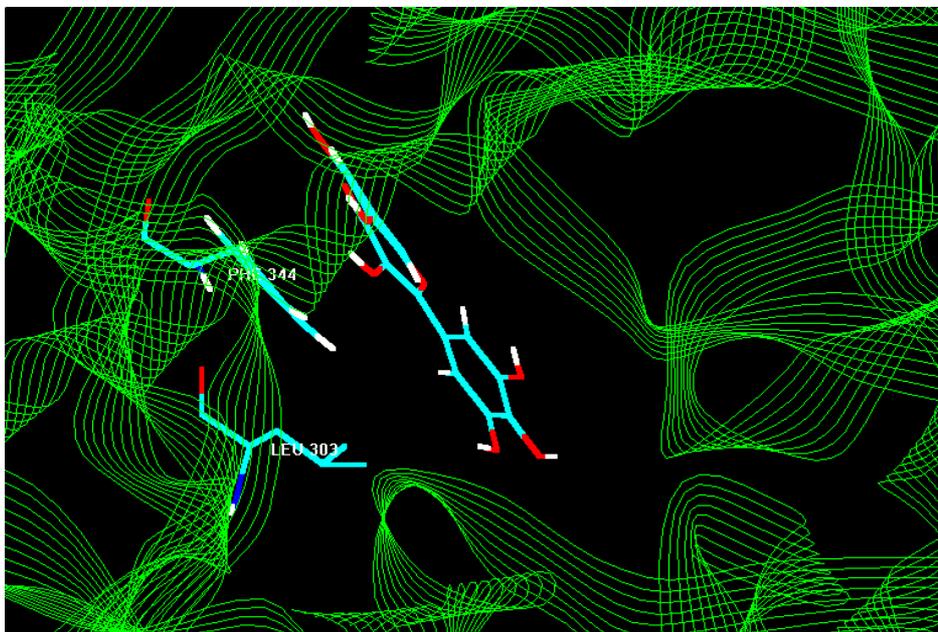
O composto 8 tem altos valores de REF e POL, o que nos induz pensar que este deveria ter boa atividade de inibição da XO. No entanto quando verificamos seu grupo R1, vemos que existe uma amina que provoca um abaixamento da hidrofobicidade da molécula e, portanto R2 não irá ser bem acondicionado na região apolar do sítio catalítico, que receberá este grupo e irá diminuir a inibição da XO.

O composto 12 apesar, da alta hidrofobicidade (log P) e também alta capacidade de distribuição de carga (REF e POL), semelhantes aos compostos ativos, verifica-se que o grupo R2 deste composto (um átomo de hidrogênio) tem carga positiva e vai sofrer repulsão pela Lys 201 e desestabilizar o complexo.

Ao contrário dos fenilpirazólicos, os flavonóides não têm sua atividade de inibição relacionada diretamente à alta hidrofobicidade, e na tabela 44 podemos verificar que a maior parte dos compostos ativos tem menores graus de hidrofobicidade, fato coerente com o maior número de hidroxilas destes em relação aos compostos inativos (figura 16).

Para se poder verificar qual o motivo desta diferença, observou-se como os flavonóides posicionam as hidroxilas dentro do sítio ativo. Interessantemente, quando o composto tem hidroxilas na posição 3 (classe dos flavonóis), ou ligadas no anel B (posições 3',4'e 5'), estas se posicionam numa fenda próxima da Lys 201 no sítio catalítico onde a água pode se movimentar livremente, posição bem observada na miricetina (figura 21).

**Figura 21: Disposição da miricetina no interior do sítio ativo. As hidroxilas do anel B se posicionam numa fenda de fácil acesso às moléculas de água.**



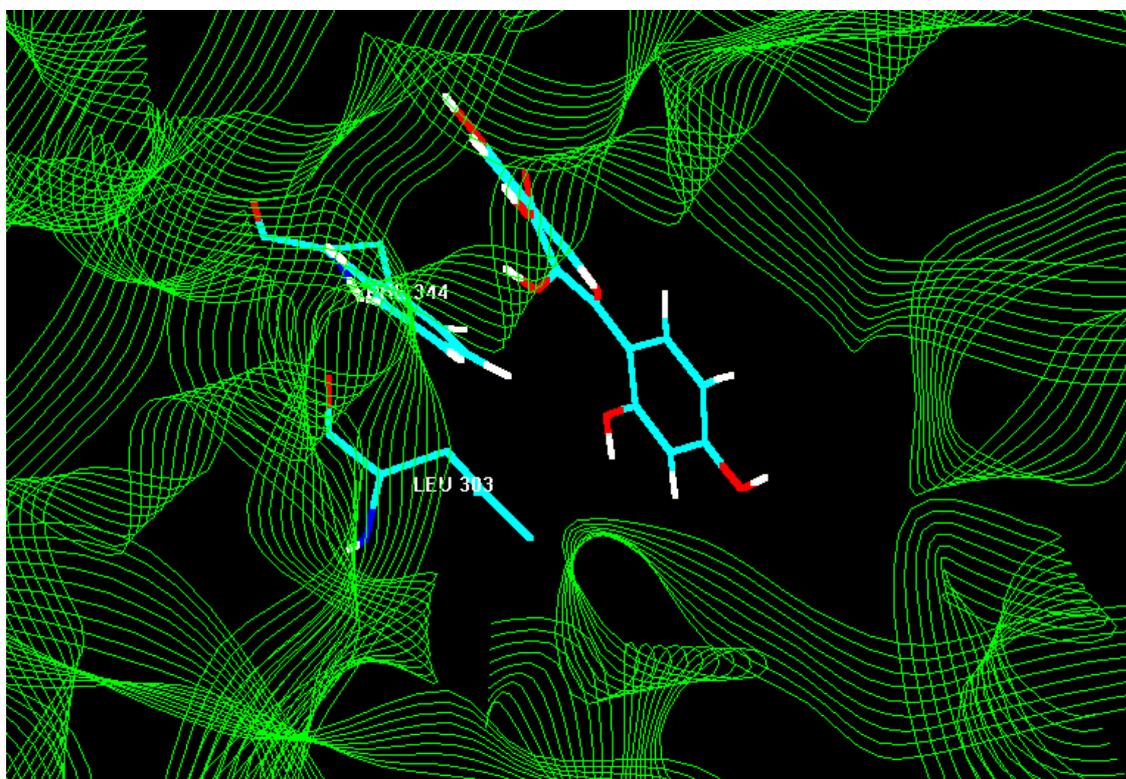
A observação acima pode ser refletida quando são observadas as energias de hidratações (tabela 35), onde se verifica que os compostos mais ativos são exatamente aqueles que mostram os melhores valores, ou seja, os mais negativos.

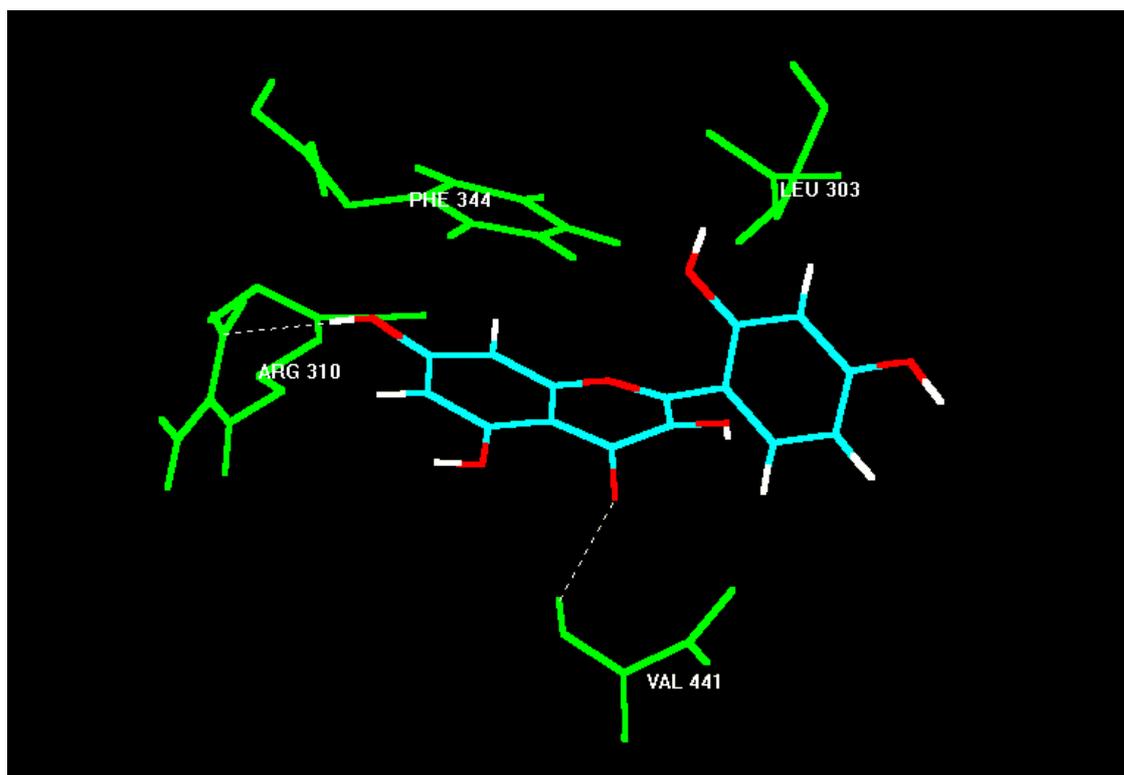
A exceção significativa nas energias de hidratação da tabela 35 é o composto 13 (morina), pois apesar de apresentar um valor tão grande quanto os compostos ativos 3 e 4, tem uma baixa capacidade de inibição. Isto é motivado pela hidroxila na posição 2', que se posiciona muito próximo à cadeia lateral do resíduo de Leu 303 e Phe 344 (figura 22a e 22b).

Desta forma, se a hidrofobicidade for utilizada racionalmente pode ser um fator de maior efetivação da ação da droga, porém como visto na série dos flavonóides, não preponderante.

De forma semelhante aos fenilpirazólicos, os flavonóides ativos também tem relações de refratividade e polarizabilidades moleculares maiores mostrando grande capacidade de organização de cargas em função do volume molecular. Isto mostra que aparentemente a capacidade acomodação de cargas é muito importante para que uma molécula se organize no interior do sítio catalítico da XO.

**Figura 22: Disposição da morina no interior do sítio ativo. a) dentro do sítio ativo. b) detalhe dos resíduo hidrofóbicos.**





## **VI - CONCLUSÕES**

**Conclusões:**

Em função das observações obtidas a partir dos cálculos realizados pode-se concluir os fatos que se seguem abaixo.

Em termos da metodologia testada (método 2), quando existir um complexo inibidor - enzima disponível em suas coordenadas cristalográficas, depositadas em bancos de dados, é possível fazer uma boa previsão dos aspectos geométricos que outras classes de moléculas inibidoras irão possuir se estiverem no sítio catalítico.

Como pré-requisito para usar este método é necessário existir na nova classe de moléculas grupos funcionais ou átomos que possam apresentar interações para estabilização semelhantes às aquelas apresentadas pelo inibidor já cristalizado.

Sendo obedecido este critério, pode fazer a otimização do novo inibidor dentro do sítio ativo por mecânica molecular (OPLS), seguido por semi-empírico (AM1), e admitir que esta conformação será aquela que estará complexada com a enzima e poderia inibi-la.

Como foram demonstrados os fatores energéticos não sofrem maiores variações, quando comparados aos métodos tradicionais (método 1 - modelagem no vácuo), porém esta metodologia (método 2) melhora a disposição espacial, e possibilita melhores correlações estruturais, moleculares e energéticos.

Para ambas as séries testadas, flavonóides e fenilpirazólicos, serão mais ativas as moléculas com melhores fatores de energia (Energias Total, de Ligação, Eletrônica, Calor de Formação e Energia de Hidratação).

Pelos resultados obtidos tanto nas energias dos orbitais de fronteira (HOMO e LUMO), como nas suas propriedades correlacionadas (Hardness e eletronegatividade de Müllikan), aparentemente estas não estão relacionadas à atividade inibidora dos compostos.

Entretanto, as propriedades associadas aos volumes e superfícies moleculares (Área, Volume, Refratividade e Polarizabilidade Moleculares) estão bem relacionadas à ação inibidora dos flavonóides e fenilpirazólicos. Quanto maiores os valores destas propriedades, ou seja, maiores volumes físicos, tão maiores serão suas ações de

inibição, e vice versa. Isto possibilita que sejam efetivadas melhores interações atrativas aumentando a estabilidade do inibidor dentro da enzima.

A hidrofobicidade pode ser utilizada para ajudar na ação inibidora, ou não. Caso existam hidroxilas como nos flavonóides, ou outros grupos polares pequenos, estes devem ser posicionados de forma a ocupar a região da fenda de entrada no sítio catalítico da XO para que o acesso de água ajude a estabilizar a estrutura.

Nos fenilpirazólicos, o grupo substituinte hidrofóbico R1 tem uma região ótima de posicionamento, mas mesmo assim, este grupo R1 precisa ter uma boa relação de tamanho e ramificações, pois se for muito linear ultrapassará a região hidrofóbica e parte de sua estrutura se posicionará na região hidrofílica em contato com a água o que vai causar diminuição de interações e conseqüente diminuição de atividade.

Tanto o anel aromático A dos flavonóides, quanto o anel pirazol dos derivados fenilpirazólicos ácidos, ocupam lugares semelhantes no interior da estrutura, sendo que o mesmo ocorre como o anel B dos primeiros e a ramificação fenila do segundo.

Ainda é necessária a manutenção da hidroxila C7 nos flavonóides, já que os compostos sem este grupo são inativos, ou com atividade muito baixa. Isto irá favorecer a formação de duas outras pontes de hidrogênio, na hidroxila em C5 e com o oxigênio cetônico.

Nos fenilpirazólicos é preciso haver um grupo em R2 com carga negativa que posicionem em direção à abertura da fenda da XO e frontalmente a Lys 210 (com carga positiva), como esperado para um grupo polar pequeno.

## **VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**Referências Bibliográficas:**

- Al.inger, N.L. (1989). **J. Am. Chem. Soc.** 111:8551-8560.
- Al.inger, N.L. (1977). **J. Am. Chem. Soc.** 99:8127-8140.
- Barron, D. and Ibrahim, R.K. (1996). **Phytochemistry.** 43:921–982.
- Beninger, C.W and Abou-Zaid, M.M. (1997). **Biochem. System. Ecol.** 25:505–512.
- Bloor, S.J. (1997). **Phytochemistry.** 45: 1399–1405.
- Bloor, S.J. (1998). **Phytochemistry.** 49: 225–228.
- Bloor, S.J. (1999). **Phytochemistry.** 50:1395 - 1399.
- Braden, G.L., Warzynski, M.J., Golighthy, M. and Bal.ow, M. (1994). **Immunol. Immunopathol.** 70: 145 – 151.
- Burda, S and Oleszek, W. (2001). **J. Agric. Food Chem.** 49: 2774 – 2779.
- Choi, J.S., Chung, H.Y., Kang, S.S., Jung, M.J., Kim, J.W, No, J.K. and Jung, H.A. (2002). **Phytotherapy Res.** 16: 232 – 235.
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Poel, B.V., Pieters, L., Vlietinck, A.J. and Berghe, D.V. (1998). **J. Nat. Prod.** 61:71-76.
- Cornell, A. (1995). **J. Am. Chem. Soc.** 117: 5179 – 5197.
- Cornish, K.M., Williamson, G. and Sanderson, J. (2002). **Free Rad. Biol. Med.** 33: 63 – 70.
- Costantino, L., Rastelli, G. and Albasini, A. (1996). **Eur. J. Med. Chem.** 31: 693 – 699.
- Cotelle, N., Bernier, J.L., Catteau, J.P., Wal.et, J.C., and Gaydou, E. (1992). **Free Rad. Biol. Med.** 13: 211 – 219.
- Cotelle, N., Bernier, J.L., Hénichart, J.P., Catteau, J.P., Pommery, J., Gaydou, E. and Wal.et, J.C. (1996). **Free Rad. Biol. Med.** 20: 35 -43.
- Crouvezier, S. Powell, B., Keir, D. and Yaqoob, P. (2001). **Cytokine.** 13: 280 – 286.
- Cuadra, P., Harbone, J.B. and Waterman, P.G. (1997). **Phytochemistry.** 45: 1377 - 1383.
- Das, M. and Ray, P.K (1988). **Biochem. Int.** 17: 203 – 209.
- Davis, L.P., Guidry, R.M., Williams, J.R., Dewar, M.J.S. and Rzepa, H.S. (1981). **J. Comp. Chem.** 2: 433.
- De Vries, H.E, Ronken, E. and Reinders, J-H. (1998). **FASEB J.** 12: 111 – 118.

- Dewar, M.J.S., Zoebisch, E.G., Healy, E.F. and Stewart. (1985). **J. Am. Chem. Soc.** 107:3902 - 3912.
- Dewar, M., J., S. and McKee, M., L. (1977). **J. Am. Chem. Soc.** 99: 5231.
- Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A.A. and Capasso, F. (1999). **Life Sci.** 65: 337 – 353.
- Dillon, V.M., Overton, J., Grayer, R.J., Harbone, J.B. (1997). **Phytochemistry**. 44: 599 – 603.
- Dixon, R.A. and Steele, C.L. (1999). **Trends Plant. Sci.** 10:394-400.
- Enroth, C., Eger, B. T., Okamoto, K., Nishino, T., Nishino, T., Pai, E. F. (2000). **Proc.Nat. Acad. Sci. USA**. 97:10723-10730.
- Eu, J.P., Liu, L., Zeng, M. and Stamler, J. S. (2000). **Biochemistry**. 39: 1040 – 1047.
- Figueiredo, P., George, F., Tatsuzawa, F., Taki, K., Saito, N. and Brouillard, R. (1999). **Phytochemistry**. 51: 125 – 132.
- Formica, J.V. and Regelson, W. (1995). **Food chem. Toxic.** 33: 1061 – 1080.
- Forster, R.E. and Estabreck, R. W. (1993). **Annu. Rev. Nutr.** 13: 383-403.
- Fossen, T. and Andersen, O. M. (1999). **Phytochemistry**. 50: 1185 – 1188.
- Gaw, A., Cowan, R.A., O'Reilly, D.S.J., Stewart, M.J. and Shepherd, J. (1999). **Clinical biochemistry**. Second edition. Harcourt Publishers LTD.
- Giasson, B.I., Ischiropoulos, H., Lee, V.M. and Trojanowski. (2002). **Free Rad. Biol. Med.** 12: 1264 – 1275.
- Gil, B., Sanz, M.J., Terencio, M.C., Gunasegaran, R., Payá, M. and Alcaraz, M.J. (1997). **Biochem. Pharmacol.** 53: 733 – 740.
- Granger, D.N., Rutili, G., McCord, J.M. (1981). **Gastroenterology**. 81:22-27.
- Grayer, R.J., Harbone, J.B., Kimmins, E.M., Stevenson, F.C. and wijayagunasekera, H.N.P. (1994). **Acta Horticult.** 381: 691 – 694
- Grayer, R.J., Harbone, J.B. (1994). **Phytochemistry** 31: 19 – 42.
- Gottlieb, O. (1982). **Micromolecular evolution, systematics and ecology**. Springer, Berlin, pp 142-148.
- Halliwell, B. (1999). **Mutat. Res.** 443: 37 – 52.
- Haenen, G.R.M.M., Paquay, J.B.G., Korthuwer, R.E.M. and Bast, A. (1997). **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 236: 591 – 593.
- Hagerman, A.E. and Robbins, C.T. (1993). **Canadian J Zool.** 71: 628 – 633.

- Harbone, J.B. (1994). **The flavonoids : advances in Research Since 1986..** Chapman and Hal., London, pp 1 – 676.
- Harbone, J.B. (1995). **Anon (ED.), Polyfenois 94..** INRA, Paris, pp. 19 – 26.
- Harbone, J.B. (1999 a). **Nat. Prod. Reports..** 16: 509 – 523.
- Harbone, J.B. (1999 a). **Biochem. Systematic and Ecol..** 27: 335 – 368.
- Harbone, J.B. and Williams, C.A. (2000). **Phytochemistry.** 55: 481 – 504
- Haribal, M. and Renwick, J.A.A. (1996). **Phytochemistry.** 41: 139 – 144.
- Haribal, M. and Renwick, J.A.A. (1998). **J. Chem. Ecol..** 24: 891 - 904.
- Heijnen, C.G.M., Haenen, G.R.M.M., van Acker, F.A.A., van der Vijgh, W.J.F. and Bast, A. (2001). **Toxicol. In vitro.** 15: 3 – 6.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R and Bobilya, D.J. (2002). **J. Nut. Biochem..** 13: 572 – 584.
- Hensley, K., Robinson, K. A., Gabbita, S.P., Salsman, S. and Floyd, R.A. (2002). **Free Rad. Biol. Med..** 28: 1456 – 1462.
- Honório, K.M and da Silva, A.B.F, (2003). **Int. J. Quantum Chem..** (in press).
- Hordnick, W.F., Duval, D.L and Pardini, R.S. (1994). **Biochem. Pharmacol..** 47: 573 – 580.
- HyperChem Release 7.0 for Windows (2002). **Reference manual.** Canadá.
- Ichimori, K., Fukahori, M., Nakazawa, H., Okamoto, K. and Nishino, T. (1999). **J. Biol. Chem..** 12: 7763 – 7768.
- Ishibuchi, S., Morimoto, H., Oe, T., Ikebe, T., Inoue, H., Fukunari, A., Kamezawa, M., Yamada, I. And Naka, Y. (2001). **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 11: 879-882.
- Iinuma, M., Tsuchiya, H., Ishikawa, T., Kondo, T., Kinoshira, T., Haruyama, H., Inaba, S., Takeda, K., Grayer, R.J. and Veitch, N.C. (1999). **Phytochemistry.** 52: 517 – 522.
- Jensen, P.R., Jenkins, K.M., Porter, D. and Fenical, W. (1998). **Applied Environ. Microbiol..** 64: 1490 – 1496.
- Jorgensen, W.L. and Tirado-Rives, J. (1988). **J. Am. Chem. Soc..** 110: 1657.
- Juntheikki, M.R., Julkenen-Tiitto, R. and Hagerman, A.E. (1996). **Biochem. System. Ecol..** 24: 25 – 35.
- Kim, H.J., Wood, E.R., Shin, C.G. and Park, H. (1998). **J. Nat. Prod..** 61: 145 – 148.

- Kondo, T., Yoshida, K., Nakagawa, A., Kawai, T., Tamura, H. and Goto, T. (1992). **Nature**. 358: 515 – 517.
- Lee, V.Y., McClintock, D.S., Santore, M.T., and Budinger, G.R.S. (2002). **J Biol. Chem.** 18: 16067 – 16074.
- Leite, P.F. (1994). **Risco cardiovascular: fatores metabólicos e nutricionai, diagnóstico e tratamento..** Ed. Acta Médica LTDA. pp:175.
- Levine, I.N. (1986). **Quantum Chemistry..** 3<sup>rd</sup> Ed., Allyn and Bacon.
- Li, B.Q., Fu, T., Yan, Y.D., Baylor, N.W., Ruscetti, F.W. and Kung, H.F. (1997). **Cell. Mol. Biol. Res.** 39: 119 – 124.
- Lin, C., Chen, C., Chen, C., Liang, Y. and Lin, J. (2002 a). **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 294:167-172.
- Lin, C., Chen, C., Lee, H. and Lin, J. (2002 b). **Planta Med.** 68:365-367.
- Mangiapane, H., Thomson, J., Salter, A., Brown, S., Bell, G.D. and White, D.A. (1992). **Biochem. Pharmacol.** 43: 445 – 450.
- Mantle, D., Falkous, G. and Perry, E.K. (1999). **Clin. Chim. Acta.** 285: 13 – 20.
- Markham, K.R., Ryan, K.G., Bloor, S.J. and Mitchel, K.A. (1998 a). **Phytochemistry**. 48: 791 - 794.
- Markham, K.R., Tanner, G.J., Caasi-lit, M., Whitecross, M.F., Nayudu, M. and Mitchell, K.A. (1998 b). **Phytochemistry**. 49: 1913 - 1919.
- Middleton Jr., E. and Kandaswani, C. (1992). **Biochem. Pharmacol.** 43: 1167 – 1179.
- Montanari, M.L.C., Montanari, C.A. and Gáudio, A.C. (2002). **Química Nova**. 25: 231 – 237.
- Narayana, K.R., Reddy, M.S., Chaluvadi, M.R. and Krishna, D.R. (2001). **Ind. J. Pharmacol.** 33:2-16.
- Olsson, L.C., Veit, M., Weissenböck, G. and Bornman, J.F. (1998). **Phytochemistry**. 49: 1021 - 1028.
- Pallardy, M., Perrin-Wolff, M. and Biola, A. (1997). **Toxicol. Vit.** 11: 573 – 578.
- Patel, R.P., Boersma, B.J., Crawford, J.H, Hogg, N., Kirk, M., Kalyanaraman, B., Parks, D.A., Barnes, S. and Darley-Usmar, V. (2001). **Free Radic. Biol. Med.** 31: 1570 – 1581.
- Peña, L.A., Fuks, Z. and Kolesnick, R. (1997). **Biochem. Pharmacol.** 53: 615 – 621.

- Pearson, R.G. (1963). **J. Am. Chem. Soc.** 107: 6801.
- Pearson, R.G. (1963). **J. Am. Chem. Soc.** 85: 3533.
- Pietta, P.G. (2000). **J. Nat. Prod.** 63: 1035 – 1042.
- Plowright, R.A., Grayer, R.J., Gill, J.R., Rahman, M.L. and Harbone, J.B. (1996). **Nematol.** 42: 564 – 578.
- Ponce, A.M., Blanco, S.E., Molina, A.S., García-Domenech, R. and Gálvez, J. (2000). **J. Chem. Inf. Comput. Sci.** 40:1039-1045.
- Pranada, J, Wierschke, S. and Jorgensen, W.L. (1991). **J. Am. Chem. Soc.** 113: 2810.
- Rajnarayana, K., Reddy, M.S. and Chaluvadi, M.R. (2001). **Ind. J. Pharmacol.** 33: 2 – 16.
- Rankin, S.M., Whaley, C.V, Hoult, J.R.S., Jessup, W., Wilkins, G.M., Collard, J and Leake, D.S. (1993). **Biochem. Pharmacol.** 45: 67 – 75.
- Rasmussen, J.T., Rasmussen, M.S. and Petersen, T.E. (2000). **J. Dairy Sci.** 83:499.
- Rastelli, G., Costantino, L. and Albasini, A. (1996). **Eur. J. Med. Chem.** 30: 141 - 146.
- Saija, A., Scalese, M., Lanza, M., Marzullo, D., Bonina, F. and Castelli, F. (1995). **Free Rad. Biol. Med.** 19: 481 – 486.
- Saksela, M., Lapatto, R. and Raivio, K.O. (1999). **FEBS Lett.** 443:117-122.
- Salah, N., Miller, N.J., Pagança, G., Tijburg, L., Bolwell, G.P. Rice-Evans, C. (1995). **Arch. Biochem. And Biophys.** 322: 339 – 346.
- Schnitzler, J.P., Jungblut, T.P., Feicht, C., Kofferlein, M., Langobartek, C., Heller, W. and Sandermann, H. (1996). **New Phytologist.** 132: 247 – 258.
- Shukla, M.K. and Mishra, D.C. (1996). **Spectrochimica Acta.** Part A 52: 1549 – 1557.
- Silva, S.L., da Silva, A., Honório, K.M., Marangoni, S., Toyama, M.H. and da Silva, A.B.F. (2003). **J. Mol. Struct.** (Artigo Submetido).
- Singer, J.Z. and Wallace, S.L. (1986). **Arthritis Rheumatism.** 29: 82 – 87.
- Skaltsa, H., Verykokidou, E., Harvala, C., Karabourniotis, G. and Manetas, Y. (1994). **Phytochemistry.** 37: 987 - 990.
- Smith, M.A., Harris, P.L.R., Sayre, L.M., Beckman, J.S. and Perry, G. (1997). **J. Neurosc.** 17: 2653 – 2657.
- Spanos, G.A and Wrolstad, R.E (1995). **J. Agric. Food Chem.** 40: 1478 – 1487
- Spignoli, G. (2000). **Eur. Bull. Drug Res.** 8: 1 – 8.

- Stadtman, E.R. and Berlett, B. (1991). **J. Biol. Chem.** 266: 17201 – 17211.
- Stevens, J.F., Miranda, C.L., Buhler, D.R and Deinzer, M.L. (1998). **J. Am. Soc. Brew. Chem.** 56: 136 – 145.
- Stevenson, P.C. and Haware, M.P. (1999). **Biochem. System. and Ecology.** 27: 761 – 767.
- Stryer, L. (1995). **Biochemistry**. Fourth edition. W.H. Freeman and Company. NY.
- Stewart, J.J.P. (1990). **J. Comp. Aided Mol. Design** 4: 1.
- Sun, A.Y., Simonyi, A and Sun, G.Y. (2002). **Free Radic. Biol. Med.** 32: 314 – 318.
- Sussman, M.S. and Bulkley, G.B. (1990). **Meth. Enzimol.** 186: 711 –722.
- Szabo, A. and Ostlund, N.S. (1989). **Modern Quantum Chemistry**, McGraw-Hill Publishing Co.
- Toki, K., Saito, N., Kawano, K., Lu, T.S., Shigihara, A., Honda, T. (1994). **Phytochemistry**. 36: 1181 - 1184
- Tsutomu, H., Taeko, Y., Rieko, Y., Yukihiko, I., Muneto, M., Kazufumi, Y., Isao, A., Sansei, N., Tadataka, N., Massao, Y. and Takuo, O. (1991). **Planta Med.** 57:83-84.
- Van Hoorn, D.E.C., Nijveldt, R.J., Van Leeuwen, P.A.M., Hofman, Z., M'Rabet, L., De Bont, D.B.A. and Van Norren, K. (2002). **Eur. J. Pharmacol.** 451:111-118.
- Zuurbier, K.W.M., Fung, S.Y., Scheffer, J.J.C. and Verpoorte, R. (1995). **Phytochemistry**. 38: 77-82.
- Ylä – Herttuala, S., Pakkanen, T., Leppänen, P. and Häkkinen, T. (2000). **J. Clin. Basic Cardiol.** 3: 87 – 88.
- Yu, B.P. (1994). **Physiol. Rev.** 74: 139-162.
- Weiner, S.J. (1984). **J. Comp. Chem.** 7: 230
- Westphal, S and Kalthoff (2003). **Mol. Cancer**. 2: 6 –20.
- Whaley, C.V, Rankin, S.M., Hault, J.R.S., Jessup, W. and Leake, D.S. (1990). **Biochem. Pharmacol.** 39: 1743 - 1750.

**VIII – APÊNDICE: ARTIGO SUBMETIDO AO CHEMICAL  
PHYSICS (Elsevier Science)**

## **The influence of structural, electronic and hydrophobic properties of flavonoid compounds in the inhibition of the Xanthine Oxidase**

**S.L. da Silva<sup>1,2</sup>, A. da Silva<sup>1</sup>, K. M. Honório<sup>3</sup>, S. Marangoni<sup>2</sup>, M.H. Toyama<sup>2</sup> and A.B.F. da Silva<sup>3\*</sup>**

***1. CCAA - Universidade Comunitária Regional de Chapecó (UNOCHAPECÓ)***

***2. Departamento de Bioquímica - IB - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)***

***3. Departamento de Química e Física Molecular - IQSC - Universidade de São Paulo (USP)***

\*Corresponding author (e-mail: [alberico@iqsc.usp.br](mailto:alberico@iqsc.usp.br))

## **Abstract**

Xanthine Oxidase (XO) is an enzyme with capacity of catalyzing the transformation of hypoxanthine in xanthine and, afterwards, the xanthine is transformed in urate which in high levels is responsible for several diseases, such as gout, renal diseases and stone formation in the urinary system.

Allopurinol is a powerful inhibitor of the XO enzyme as it links in the site occupied by the hypoxanthine. The allopurinol is used as a routinely medication in cases where it is necessary to inhibit the XO enzyme action, and in the literature several flavonoid compounds have been described as inhibitors of the XO enzyme in similar levels to the ones presented by allopurinol.

In this work, a study on the influence of structural, electronic and hydrophobic properties of some flavonoid compounds with capacity to inhibit the XO activity was carried out by using molecular mechanics (MM+) and semi-empirical (AM1) methods. From the results obtained we were able to correlate some properties of the flavonoid compounds studied with the inhibition of the XO.

*Keywords:* Flavonoids, allopurinol, xanthine oxidase, atomic and molecular properties

## 1. Introduction

Xanthine oxidase (XO) is the responsible enzyme for the transformation of hypoxanthine in xanthine through the degradation of AMP purine base in urate, and this metabolite (urate) predominantly acts in the known disease like gout [1]. Two other important pathologies occasioned by the species generated during the cycle ischemia-reperfusion are associated with the production of noxious species to the organism worsening the weakened state of the patients.

The first of these processes occurs during the ischemia, and the main characteristic presented is the decrease of ATP levels leading to the formation of hypoxanthine and, consequently, the formation of urate. The complete route of the ATP degradation to urate is shown in Figure 1 [2].

High concentrations of urate lead to serious processes such as Lesch-Nyhan's Syndrome, gout and serious renal diseases characterizing a clinical state of hyperuricemia whose main indications are: idiopathy, renal inadequacy, production of renal stones in the urinary system, high tubular reabsorption, increase in the levels of lactic acid and deposition of sodium urate under the tissues producing concentrations of tofaceo materials [3].

Beyond this situation, other pathology associated to ischemia and reperfusion, and more particularly to this last, occurs during the re-oxidation of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. In this process, the molecular oxygen, whose concentration was in high levels (reperfusion), will have electron acceptor character increasing the concentration of species known as reactive oxygen species (ROS), mostly the superoxide radical ( $O_2^-$ ) and the hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) [4-6]. These

chemical species can be eliminated from the organism by specific enzymes that help in its protection [7,8]. However, if the ROS production is very high, they become responsible for several pathological processes associated to the oxidative stress such as inflammation, arteriosclerosis, cancer, aging and others [9-11].

In this way, it looks like clear the importance of controlling the xanthine oxidase activity, either hindering the formation of free radicals or avoiding the urate production. Several authors have demonstrated that flavonoids compounds have a high capacity to inhibit the xanthine oxidase and they have verified its biological power by using studies of structure-activity relationships (SAR) [12-16].

In nature, flavonoid compounds and other similar classes are products extracted from plants and they are presented in their several parts: leaves, fruits, etc. These molecules are synthesized from phenylpropanoid and others precursory acetate derivatives and are used by the vegetables for their growth and defense against plagues [17].

The beneficial potential to the human health occasioned by the flavonoids compounds have been described by several authors [18-20]. The different classes of flavonoids present distinct pharmacological properties which can be associate to the cardiogenic, antiulcer, hepatoprotective, antioxidant, antiphlogistic, antineoplastic and antimicrobial activities. In all of these processes, the flavonoids act on specific enzymes and hormones besides interacting directly with molecular systems [21].

Recent studies [15,16] demonstrated the capacity of some flavonoid compounds to interact with the xanthine oxidase (XO) diminishing the XO activity levels in a competitive inhibitory action.

The main goal of this work is to study the structural, electronic and hydrophobic properties of some flavonoid compounds with the aim to correlate these properties with the XO inhibitory effects demonstrated by Lin et al. [15,16].

## 2. The flavonoid compounds studied

In a previous work Lin et al. [15] demonstrated the role of some flavonoids compounds in inhibiting the XO effects by using techniques of molecular modeling and enzymatic kinetic studies. The molecular modeling in Lin's works [15] made use of the crystalline structure determined by Enroth et al. [22] and showed that the XO forms a asymmetric trimeric complex with a salicylate molecule inserted in the molybdopterin catalytic center [15,22].

Six flavonoid compounds in Lin's work [15] were analyzed besides the allopurinol molecule, which is routinely used as competitive inhibitor of the hypoxanthine. The values of the XO inhibition constants ( $K_i$ ) of the flavonoids studied by Lin et al. [15] are presented in Table 1, and the chemical structure of each compound and the numbering system used in this work is shown in Figure 2.

The superimposition of salicylate with allopurinol showed that both molecules practically occupy the same space in the studied domain, except for small modifications which do not have great influence in the XO inactivation according to  $K_i$  value obtained by the authors for the allopurinol molecule [15].

When apigenin is superimposed with salicylate, it was observed that the bicycle benzopyranone ring fits very well in the region occupied by the salicylate, and the

phenolic ring is stabilized due to a hydrophobic region formed by Phe 1076 and 649 and Leu 648, 873 and 1014 residues [15]. Besides, two important characteristics were observed: the formation of hydrogen bonds between hydroxyls linked to C7 and C5, and the interaction between the carbonyl and the residues Glu 1261, Arg 880 and Thr 1010, respectively. These interactions demonstrated that the high affinity of some flavonoids by the XO is possibly due to this high number of stable connections [14,15,23].

Quercetin and myricetin present the same orientation as apigenin in the active center, however the weakest interactions are arising from the unstable effect of hydroxyls linked to C3 which is placed next to the nonpolar residues of Phe 1009, Val 1011 and Leu 1014. This effect was not observed in allopurinol and apigenin molecules [15].

Regarding the opposite orientation presented by genistein when compared with apigenin, the modeling study of Lin et al. [15] verified that this molecule can guide its benzopyranone ring (with a determined organization) to a region with good level of hydrophobicity. These low unstable effects prevent the XO enzymatic action, but the genistein presents an extremely weak inhibition when compared with the other flavonoid compounds [15].

The isovitexin presents very similar orientation to the genistein, however the presence of the sugar moiety in the molecule orientates this region towards the hydrophobic pocket which helps to stabilize the benzopyranone ring of apigenin [15]. And also, the presence of several hydroxyls in the glycosil group acts like unstable elements inside the highly nonpolar region [15].

The inactivity observed in the naringenin molecule can be explained by the absence of a planar structure, requirement in flavonoid compounds that present xanthine oxidase inhibition activity [15].

The conclusions in Lin's work [15] showed the importance of the hydroxyls linked to the C7 and C5 atoms and to the O9 atom in stabilizing the Flavonoid-XO (F-XO) complex. Substitutions at the C3 atom by hydroxyls or at the C6 atom by the sugar moiety do not favor the formation of the F-XO complex, as in both situations a polar group will be inserted in a very hydrophobic environment [15].

### 3. Methodology

The seven flavonoids compounds chosen for this study were divided into two groups as displayed in Table 2. The used criterion in this classification was based on the orientation of the benzopyranone ring which should be similar to the one verified in the salicylate complex of Enroth et al. [22]. So, the four compounds of Group A are the ones that present the benzopyranone ring superimposed according to the molecular modeling performed by Lin et al. [15]; and the three compounds of Group B are those that are connected to the XO by the non benzopyranone phenolic ring in inverse orientation than those of Group A [15].

For the calculations, the molecular structure of each compound was previously optimized by using the MM+ molecular mechanic method [24]. The MM+ is an extension of the MM2 force field method [25] and it includes routines considering the valence  $\pi$ -electrons in the self-consistent field ( $\pi$ -VESCF). Additionally, we performed a full re-

optimization using the AM1 semi-empirical method [26] with the aim to guarantee that the optimized geometry obtained for each compound corresponds to the equilibrium conformation assessed theoretically. Only these final structures, which represent the most stable ones for a given compound, have been used to obtain the molecular properties (descriptors). Both theoretical methods used in this work (MM+ and AM1) are inserted in the HyperChem 7.0 molecular modeling package [27].

The chosen molecular descriptors used in this work to be correlated with the XO inhibition activity of flavonoid compounds were:

<b>E<sub>HOMO</sub></b>	Energy of the highest occupied molecular orbital (eV);
<b>E<sub>LUMO</sub></b>	Energy of the lowest unoccupied molecular orbital (eV);
<b>χ</b>	electronegativity (eV);
<b>η</b>	hardness (eV);
<b>POL</b>	molecular polarizability (a.u.);
<b>ΔH<sub>f</sub></b>	heat of formation (kcal mol <sup>-1</sup> );
<b>HE</b>	hydration energy (kcal mol <sup>-1</sup> );
<b>MR</b>	molar refractivity (Å <sup>3</sup> );
<b>A</b>	superficial area (Å <sup>2</sup> );
<b>VOL</b>	molecular volume (Å <sup>3</sup> );
<b>E<sub>T</sub></b>	total energy (kcal mol <sup>-1</sup> );
<b>Log P</b>	partition coefficient;
<b>Q<sub>N</sub></b>	net atomic charge on the atom N;
<b>D<sub>3</sub></b>	torsion angle between C3-C2-C1'-C2' atoms;
<b>MEPM</b>	molecular electrostatic potencial maps.

The calculated descriptors were selected so that they could represent electronic ( $E_{\text{HOMO}}$ ,  $E_{\text{LUMO}}$ ,  $\chi_1$ ,  $\eta$ ,  $\alpha$ ,  $\Delta H_f$ , HE,  $E_T$ ,  $Q_N$  and MEPM), steric (POL, MR, A, VOL and  $D_3$ ) and hydrophobic (Log P) features of the compounds studied. These features are supposed to be important for the XO inhibition activity presented by the flavonoid compounds studied in this work; and the  $D_3$  and  $Q_N$  properties are defined in Figure 3.

The molecular electrostatic potential maps (MEPM) of the compounds studied were obtained by using the Spartan 5.0 program [28]. The MEPM were obtained through the calculation of a set of punctual atomic charges so that they represent the possible best quantum molecular electrostatic potential for a set of points defined around the molecule [29,30]. This method uses a density of 1 point per Å in four layers placed at distances of 1.4, 1.6, 1.8, and 2.0 times the van der Waals radii. Actually, the charges derived from electrostatic potential have the advantage of being physically more satisfactory than the Mulliken's charges, especially when one is working with compounds that present biological activity [31]. Figure 4 shows the MEPM obtained for each flavonoid molecule where the isoenergy contours were generated in the range of -50.0 (solid contour) to 50.0 (mesh contour) kcal mol<sup>-1</sup>.

## 4. Results and discussion

After the calculations, we could notice that only the descriptors POL, MR, A, VOL (properties related to the molecular size), Log P and MPEM could be related to the inhibition of the XO enzyme.

Despite the allopurinol does not be a flavonoid compound, we decided to include it in our calculation as it is routinely used as medication in cases where it is necessary to inhibit the XO enzyme [32,33]. In fact, allopurinol is a powerful inhibitor of the XO enzyme and the flavonoid compounds studied in this work have a XO inhibitor character similar to the allopurinol [15]. Table 3 shows all of the calculated values obtained for the molecular properties studied in this work.

From Table 3 we can see that the  $D_3$  torsion angle must present a value around 26 and 27 degrees so that the flavonoid compound presents XO inhibitory activity. If the compound presents a bigger value for  $D_3$  torsion angle than 27 degrees, it will present a loss of XO inhibitory activity (see for instance the compounds 6 and 7) due to the fact that the hydroxyls of the phenolic rings moves to a place occupied by the nonpolar residues causing the loss of the XO inhibitory activity of the compound. In fact, when the  $D_3$  torsion angles of the compounds are larger than 27 degrees, they are not able to inhibit the XO enzyme as the formation of the F-XO complex is destabilized.

Also, from the structural observations for the F-XO complex, made by Lin et al. [15], and the results displayed in Table 3 for the descriptors POL, MR, A and VOL, we can see that the size of the flavonoid compound has a very interesting influence in the inhibitory action of the molecule. In fact, the higher the values for POL, MR, A and VOL,

the lowest the inhibitory activity of the molecule. Probably, this behavior can be explained by the fact that when the size of the flavonoid compound increases, also increases the possibility to occur repulsive interactions in the active site inhibiting the formation of the F-XO complex.

Since the inactive compounds 6 and 7 have the POL, MR, A and VOL values very close to the active molecules, we can say that their low capacity in inhibit the XO is because their  $D_3$  torsion angles are larger than 27 degrees.

From these observations, we can see that the flavonoid size and its geometry are important factors in the positioning of the molecule in order to block the access of the physiologic substrate (the hypoxanthine) to the molybdopterin catalytic center of the XO.

Analyzing the Log P values in Table 3, we can see that apigenin and allopurinol present higher values for Log P and the decrease in the calculated Log P values does not look like to be a favorable aspect to the action of the flavonoid compounds studied. The diminishing of the hydrophobicity of the compound is accompanied by the diminishing of its inhibitory activity. Once more, the inactive compounds 6 and 7, despite having Log P values too close to the active compounds, do not have the capacity of forming a stable complex with the XO as their  $D_3$  torsion angles are larger than 27 degrees.

In order to verify the regions with high electronic density that could explain possible electrostatic interactions between the flavonoid compounds studied and the XO enzyme, we decided to obtain the molecular electrostatic potential (the MEPM) for each compound. The MEPM for the flavonoid compounds under study in this work are presented in Figure 4.

The mesh contour corresponds to the potential of 50 kcal/mol and the solid one corresponds to -50 kcal/mol. For the more active flavonoid compounds (apigenin, quercetin and myricetin), we can observe a negative charge density on the hydroxyl groups and on the O9 atom. These negative charge regions on apigenin, quercetin and myricetin could favor the formation of hydrogen bonds between these compounds and the XO.

The MEPM for the isovitexin, genistein and naringenin showed the same negative charge regions like that for apigenin, quercetin and myricetin. Nevertheless, it seems these negative charge regions for isovitexin, genistein and naringenin do not favor the interaction with the XO. In fact, the sugar linked to C6 atom in the isovitexin probably causes a steric hindrance avoiding the interaction with the XO; and for the genistein and naringenin, the non interaction with the XO is probably caused by the  $D_3$  torsion angle that is larger than 27 degrees. In fact, as we pointed out before, when the  $D_3$  torsion angle is larger than 27 degrees, the interaction between the flavonoid compound and the XO is not favored.

## 5. Conclusions

The results of this work showed that geometric properties of the flavonoids compounds studied are the most important ones for the inhibition of the XO enzyme. When the  $D_3$  torsion angles of the compounds are larger than 27 degrees, they become inactive, i.e. they are not able to inhibit the XO enzyme, as they destabilize the formation of the F-XO complex.

Another relevant aspect in the inhibitory activity of the flavonoid compounds studied is associated with their sizes. The calculated molecular properties POL, MR, A and VOL showed the higher the values for these four properties, the lowest the inhibitory activity of the molecule. This behavior can be explained, possibly, by the fact that when the size of the flavonoid compound increases, also increases the probability to occur repulsive interactions between the compounds and the aminoacid residues of the active site inhibiting, consequently, the F-XO complex formation.

The hydrophobic character (Log P) was another molecular property related to the inhibition of the XO enzyme. The flavonoid compounds with low Log P values are not good inhibitors of the XO enzyme, as small Log P values imply that the compound has a lesser probability to interact with the XO enzyme.

Finally, the molecular electrostatic potencial maps (the MEPM) showed the existence of several regions where hydrogen bonds could be formed stabilizing the formation of the F-XO complex.

Summarizing, a flavonoid compound will be a good XO inhibitor when it presents a combination of a  $D_3$  torsion angle around 26 and 27 degrees, a small size and a high hydrophobic character.

## **Acknowledgments**

The authors would like to thank CNPq and CAPES (Brazilian agencies) for the financial support.

## References

- [1] Tsutomu, H., Taeko, Y., Rieko, Y., Yukihiko, I., Muneto, M., Kazufumi, Y., Isao, A., Sansei, N., Tadataka, N., Massao, Y. and Takuo, O. (1991). **Planta Med.** 57:83-84.
- [2] Stryer, L. (1995). **Biochemistry**. Fourth edition. W.H. Freeman and Company. NY.
- [3] Gaw, A., Cowan, R.A., O'Reilly, D.S.J., Stewart, M.J. and Shepherd, J. (1999). **Clinical biochemistry**. Second edition. Harcourt Publishers LTD.
- [4] Granger, D.N., Rutili, G., McCord, J.M. (1981). **Gastroenterology** 81:22-27.
- [5] Saksela, M., Lapatto, R. and Raivio, K.O. (1999). **FEBS Lett.** 443:117-122.
- [6] Rasmussen, J.T., Rasmussen, M.S. and Petersen, T.E. (2000). **J. Dairy Sci.** 83:499.
- [7] Forster, R.E., Estabreck, R. W. (1993) **Annu. Rev. Nutr.** 13: 383-403.
- [8] Yu, B.P. (1994) **Physiol. Rev.** 74 : 139-162.
- [9] Halliwell, B. (1997). **Nutr. Rev.** 55, S44-S52.
- [10] Anup, R., Balasubramanian, K.A. (2000). **J. Surg. Res.** 92, 291-300.
- [11] Papathanassoglou, E.D.E., Moynihan, J.A., Ackerman, M.H. (2000). **Crit. Care Med.** 28, 537-549.
- [12] Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Poel, B.V., Pieters, L., Vlietinck, A.J. and Berghe, D.V. (1998). **J. Nat. Prod.** 61:71-76.
- [13] Ponce, A.M., Blanco, S.E., Molina, A.S., García-Domenech, R. and Gálvez, J. (2000). **J. Chem. Inf. Comput. Sci.** 40:1039-1045.
- [14] Van Hoorn, D.E.C., Nijveldt, R.J., Van Leeuwen, P.A.M., Hofman, Z., M'Rabet, L., De Bont, D.B.A. and Van Norren, K. (2002). **Eur. J. Pharmacol.** 451:111-118.

- [15] Lin, C., Chen, C., Chen, C., Liang, Y. and Lin, J. (2002). **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 294:167-172.
- [16] Lin, C., Chen, C., Lee, H. and Lin, J. (2002). **Planta Med.** 68:365-367.
- [17] Dixon, R.A. and Steele, C.L. (1999). **Trends Plant. Sci.** 10:394-400.
- [18] Choudhury, R., Chowrimootoo, G., Srail, K., Debnam, E., Rice-Evans, C.A. (1999). **Biochem. Bioph. Res. Comm.** 265, 410-415.
- [19] Katan, M.B., Hollman P.C.H. (1998). **Nutr. Metab. Cardiovas.** 8, 1-4.
- [20] Khalsa, P.S. (1999). **J. Neuromusc. Sys.** 7, 1-8.
- [21] Narayana, K.R., Reddy, M.S., Chaluvadi, M.R. and Krishna, D.R. (2001). **Ind. J. Pharmacol.** 33:2-16.
- [22] Enroth, C., Eger, B. T., Okamoto, K., Nishino, T., Nishino, T., Pai, E. F. (2000). **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 97:10723-10730.
- [23] Costantino, L., Rastelli, G. and Albasini, A. (1996). **Eur. J. Med. Chem.** 31: 693-699.
- [24] Allinger, N.L. (1989). **J. Am. Chem. Soc.** 111:8551-8560.
- [25] Allinger, N.L. (1977). **J. Am. Chem. Soc.** 99: 8127-8140.
- [26] Dewar, M.J.S., Zebisch, E.G., Healy, E.F. and Stewart, J. (1985). **J. Am. Che. Soc.** 13: 3902-3912.
- [27] HyperChem Release 7.0 for Windows (2002). **Reference manual.** Canadá.
- [28] Spartan 5.0, Wavefunction, Irvine, CA, 1997.
- [29] Willians, D.E. and Yan, J. (1998). **Adv. Atomic Mol. Phys.** 23: 87.
- [30] Chirlian, L.E. and Fracl, M.M. (1987). **J. Comp. Chem.** 8: 894.
- [31] Singh, U.C. and Kollman, P.A. (1984). **J. Comp. Chem.** 5: 129.

- [32] Ishibuchi, S., Morimoto, H., Oe, T., Ikebe, T., Inoue, H., Fukunari, A., Kamezawa, M., Yamada, I. And Naka, Y. (2001). **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 11: 879-882.
- [33] Hamanaka, H., Mizutani, H., Nouchi, N., Shimizu, Y. and Shimizu, M. (1998). **Clinic. Exp. Dermatol.** 23: 32-34.

## Tables

**Table 1.**  $K_i$  values and inhibition type defined by Lin et al. [15] for the flavonoid compounds studied

COMPOUNDS	INHIBITION TYPE	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )
Allopurinol (Allop)	Competitive	$0.34 \pm 0.22$
Apigenin (Apig)	Competitive	$0.61 \pm 0.31$
Quercitin (Querc)	Competitive	$1.40 \pm 0.78$
Myricetin (Myric)	Competitive	$2.17 \pm 1.13$
Genistein (Genis)	Competitive	$3.23 \pm 1.01$
Isovitexin (Isovit)	Competitive	$5.22 \pm 2.02$
Naringenin (Narin)	None	> 50

**Table 2.** Classification of the studied compounds into two groups: molecules with expressive inhibitory activity (Group A) and molecules with low inhibitory activity (Group B)

Grupo A	Grupo B
Allopurinol	Isovitexin
Apigenin	Genistein
Quercitin	Naringenin
Myricetin	

**Table 3.** Calculated values for the molecular properties of the flavonoid compounds studied

Properties	Compounds						
	GROUP A				GROUP B		
	(expressive inhibitory activity)				(low inhibitory activity)		
	Allop	Apig	Querc	Myric	Genis	Isovit	Narin
$E_{\text{HOMO}}$ (eV)	-9.742	-9.195	-8.752	-8.814	-9.248	-8.821	-9.312
$E_{\text{LUMO}}$ (eV)	-0.684	-0.910	-1.082	-1.116	-0.979	-0.718	-0.586
$\chi$ (eV)	4.529	4.138	3.835	3.489	4.052	4.135	4.363
$\eta$ (eV)	5.213	5.058	4.917	4.965	4.769	5.114	4.949
$\alpha$ (a.u.)	13.00	27.27	28.54	29.18	40.69	27.27	27.46
$\Delta H_f$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	-65.285	-129.686	-214.820	-258.186	-362.258	-130.470	-153.486
<b>HE</b> (kcal mol <sup>-1</sup> )	-17.14	-23.99	-33.03	-37.96	-30.51	-24.86	-23.29
<b>MR</b> (Å <sup>3</sup> )	34.02	72.05	75.43	77.12	105.17	70.85	70.43
<b>A</b> (Å <sup>2</sup> )	274.44	448.72	464.64	475.63	630.86	448.01	445.55
<b>VOL</b> (Å <sup>3</sup> )	397.45	726.55	761.14	780.19	1085.10	721.59	743.98
$E_T$ (10 <sup>3</sup> kcal mol <sup>-1</sup> )	-42.452	-84.380	-99.163	-106.556	-142.249	-84.381	-85.033
<b>Log P</b>	1.02	1.46	0.28	0.00	-0.39	1.50	1.99
<b>D<sub>3</sub></b> (degrees)	-	26.775	27.119	27.865	26.840	39.109	97.52
<b>Q<sub>9</sub></b>	-	-0.349	-0.360	-0.357	-0.351	-0.345	-0.333
<b>Q<sub>10</sub></b>	-	-0.248	-0.243	-0.243	-0.263	-0.247	-0.248
<b>Q<sub>11</sub></b>	-	-0.238	-0.235	-0.235	-0.216	-0.237	-0.239

## Figure Captions

**Figure 1.** Production route of the urate from ATP. The IMP and ATP abbreviations mean inositol monophosphate and adenosine triphosphate, respectively.

**Figure 2.** Chemical structure of the compounds studied (allopurinol and flavonoid molecules).

**Figure 3.** Definition of the torsion angle studied ( $D_3$ ) and the atomic charges on the more significative atoms.

**Figure 4.** Molecular electrostatic potential maps (MEPM) of the compounds studied. Mesh contour corresponds to 50 kcal/mol and the solid contour corresponds to -50 kcal/mol.

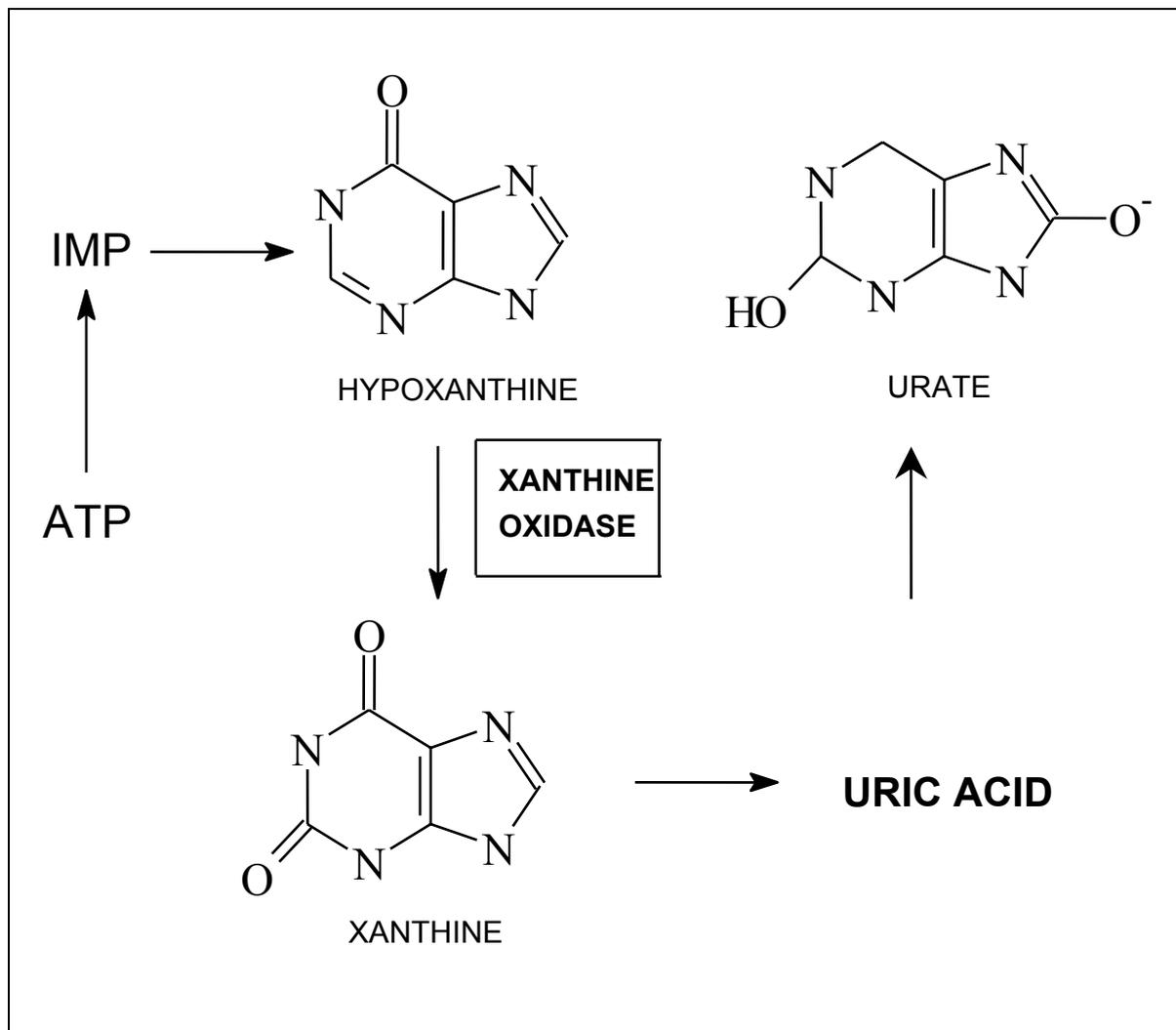
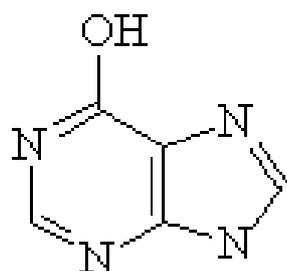
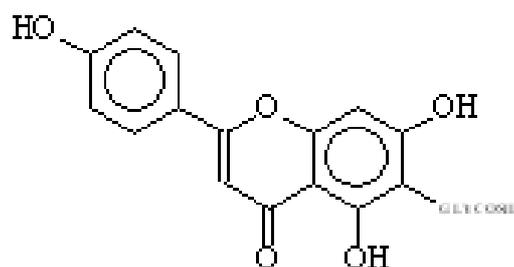


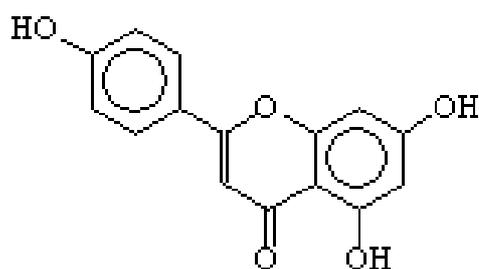
Figure 1



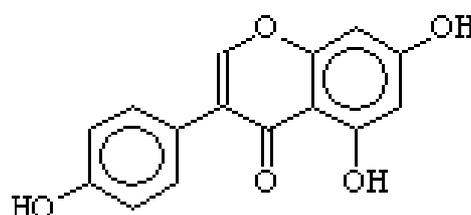
1 - Allopurinol



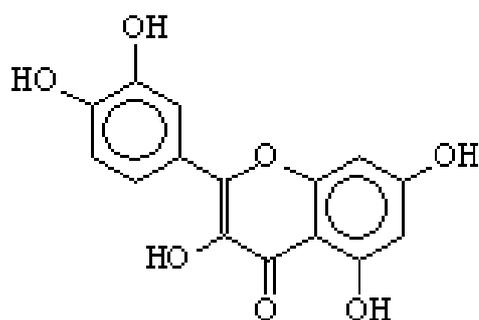
5 - Isovitexin (Flavone glycoside)



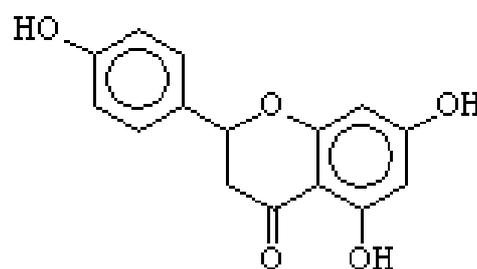
2 - Apigenin (Flavone)



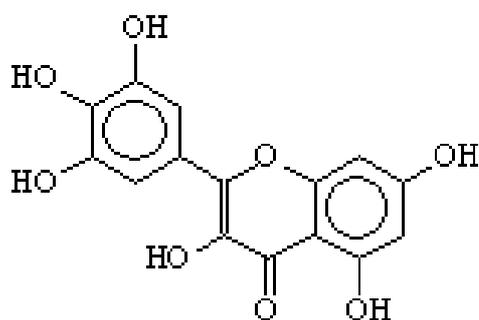
6 - Genistein (Isoflavone)



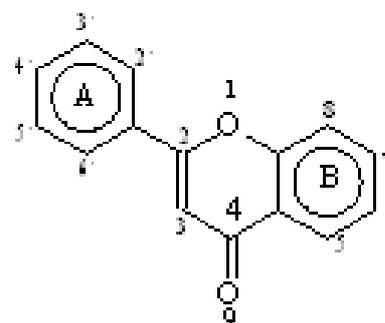
3 - Quercetin (Flavonol)



7 - Haringenin (Flavanone)



4 - Myricetin (Flavonol)



Numbering used in the flavonoids

Figure 2

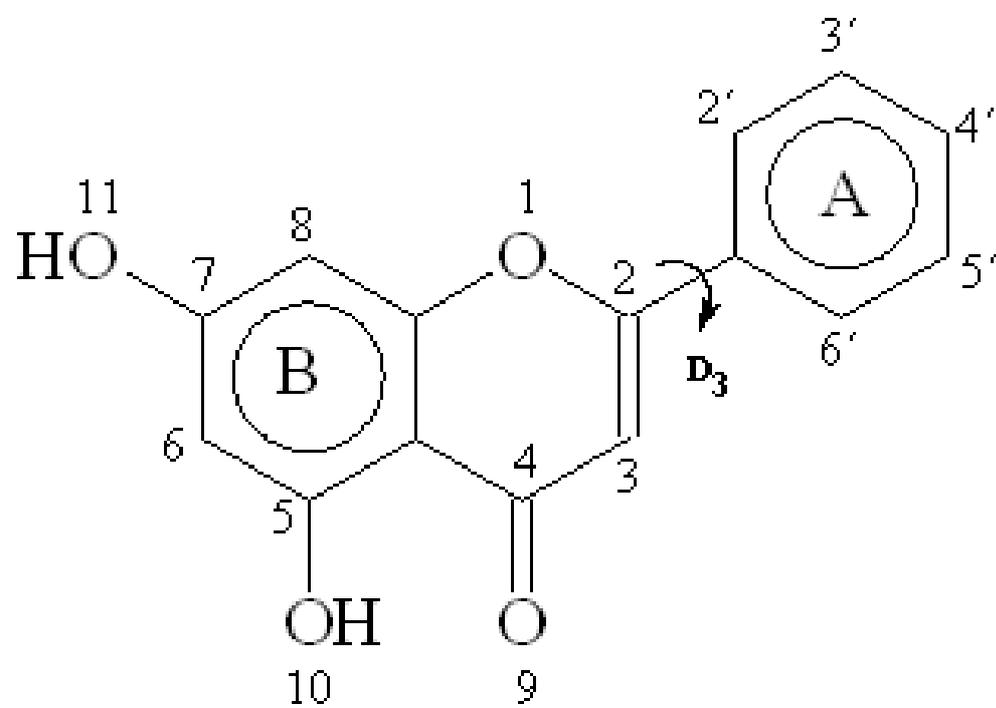
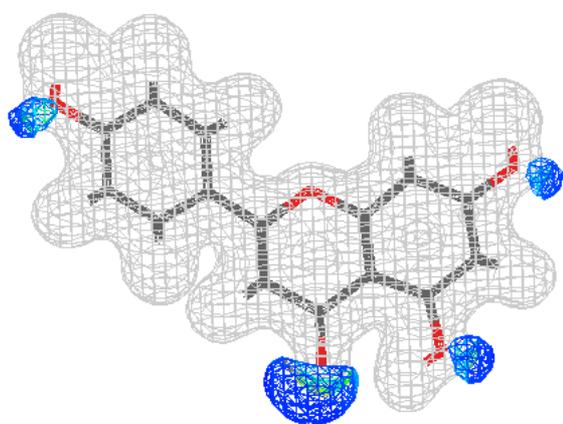
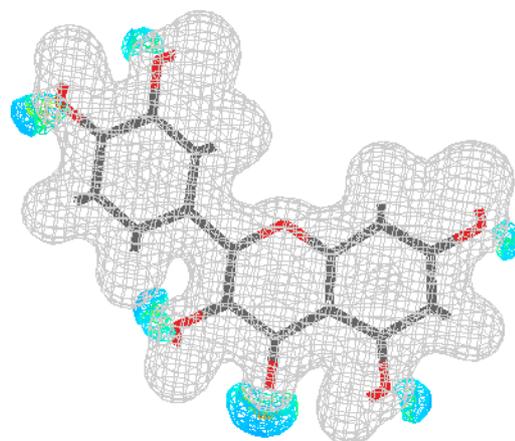


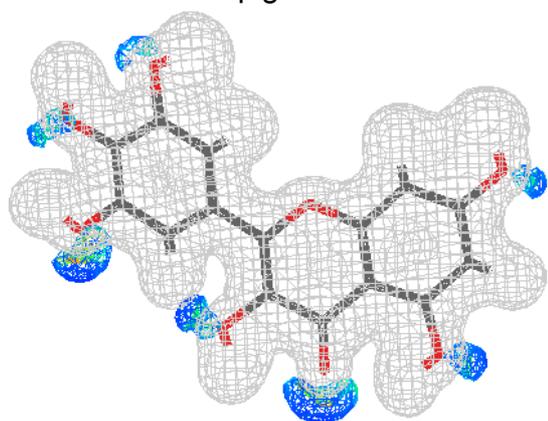
Figure 3



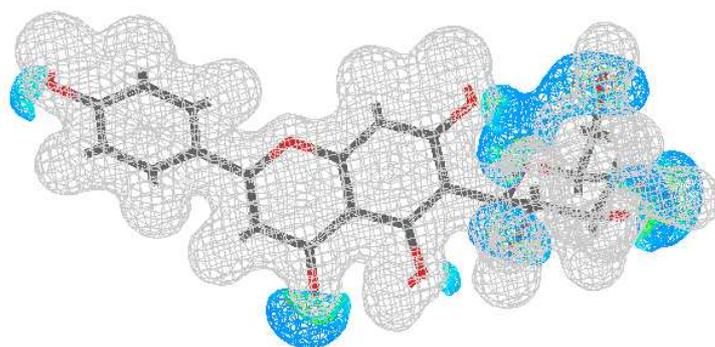
Apigenin



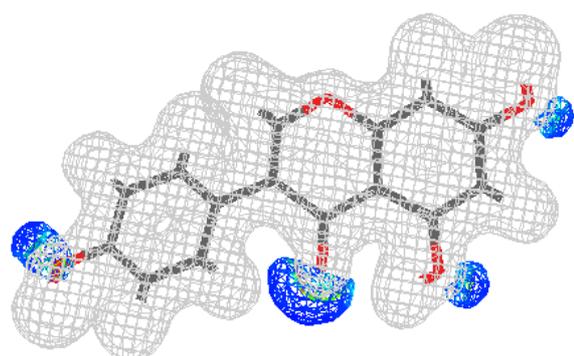
Quercetin



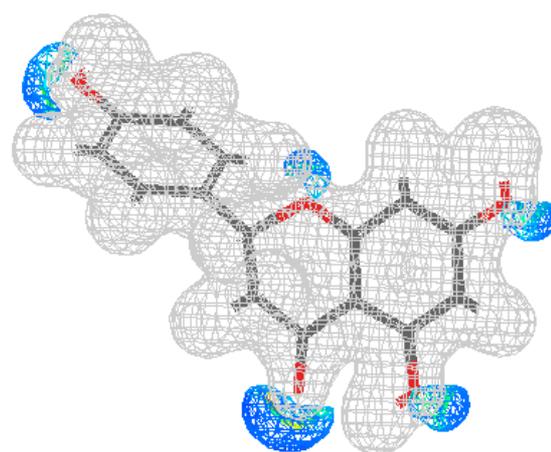
Myricetin



Isovitexin



Genistein



Naringenin

Figure 4