

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
CENTRO DE ESTUDOS GERAIS  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PG EM QUÍMICA

Julliane Yoneda Huguenin

*Modelagem molecular de compostos modelo  
e de substâncias com atividade antiviral*

Niterói  
Fevereiro/2009

H 89 Huguenin, Julliane Yoneda  
Modelagem molecular de compostos modelo e de substâncias  
com atividade antiviral./ Julliane Yoneda Huguenin. - Niterói:[s.n.],  
2009.

111f.

Tese - (Doutorado em Química Orgânica) - Universidade Federal  
Fluminense, 2009.

1. Modelagem molecular. 2. Herpes simples. 3.  
Ribonucleosídeos. I. Título.

CDD: 541.2

**JULLIANE YONEDA HUGUENIN**

**MODELAGEM MOLECULAR DE COMPOSTOS MODELO E DE SUBSTÂNCIAS  
COM ATIVIDADE ANTIVIRAL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Química Orgânica.

**Orientadores:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Kátia Zaccur Leal  
Prof. Dr. Peter Rudolf Seidl

Niterói  
Fevereiro/2009

**JULLIANE YONEDA HUGUENIN**

**Modelagem molecular de compostos modelo e de substâncias com atividade antiviral**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Química Orgânica.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profª Drª Kátia Zaccur Leal  
Instituto de Química – UFF

---

Prof. Dr. Peter Rudolf Seidl  
Escola de Química – UFRJ

---

Profª Drª Magaly Girão Albuquerque  
Instituto de Química – UFRJ

---

Prof. Dr. Pedro Geraldo Pascutti  
Instituto de Biofísica – UFRJ

---

Profª Drª Maria Cecília B. V. de Souza  
Instituto de Química – UFF

---

Profª Drª Alice Maria Rolim Bernardino  
Instituto de Química – UFF

Niterói

Fevereiro/2009

“Existem apenas duas maneiras de ver a vida. Uma é pensar que não existem milagres e a outra é acreditar que tudo é um milagre.”

(Albert Einstein)

“O único homem que está isento de erros, é aquele que não arrisca acertar.”

(Albert Einstein)

“Uma caminhada de mil milhas começa sempre com o primeiro passo.”

(provérbio Chinês)

“É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se e ver a vida passar.  
É melhor tentar, ainda que em vão,  
que sentar-se fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias tristes em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco,  
que em conformidade viver...”

(Martin Luther King)

*Para Davi.  
Amor maior não há,  
do que o meu amor por você.*

## AGRADECIMENTOS

---

À Profª Drª Kátia Zaccur Leal, que durante estes nove anos em que trabalhamos juntas, além de orientadora, sempre foi muito mais do que uma grande amiga e conselheira. Você é e sempre será muito importante em minha vida.

Ao Prof. Dr. Peter Rudolf Seidl não somente pela orientação, mas também pelos ensinamentos, apoio e amizade durante toda a minha vida acadêmica.

À Profª Drª Magaly Girão Albuquerque faço um agradecimento muito especial por toda a orientação que me deu neste trabalho. Sem a sua colaboração grande parte do que está escrito aqui não teria sido possível de se desenvolver ou concluir. Gostaria de agradecer também por ser tão compreensiva, atenciosa e por estar sempre pronta para ajudar e ensinar. Não tenho palavras para agradecer por sua amizade e por tudo o que você fez por mim.

Ao Prof. Dr. Ricardo Bicca de Alencastro pela utilização do LabMMol.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Profª Drª Maria Cecília B. V. de Souza, à Drª Fernanda da C. Santos, à Drª Márcia H. R. Velloso e ao Prof. Dr. Rodrigo Bagueira por me ajudarem sempre.

À Profª Drª Izabel C. P. P. Frugulhetti por fornecer dados não publicados e estar sempre pronta para ajudar.

À Drª Thérèse Malliavin pela ajuda com o programa AMBER.

Ao Prof. Dr. Ralph Wheeler pelo uso do programa AMBER 7.

Aos meus pais, Laurides e Luiz, por serem os melhores pais que alguém pode sonhar em ter, por estarem sempre presentes em minha vida, me apoiando em todos os

momentos, e por cuidarem de Davi com todo amor do mundo para que eu tivesse condições de desenvolver este trabalho.

Aos meus irmãos Ana Caroline e Valmir, por todo o amor e amizade, por alegrarem minha vida com sua presença e por me ajudarem a cuidar de Davi com todo o carinho para que eu pudesse estudar com tranqüilidade.

Ao meu marido José Augusto, por todo apoio, amor, incentivo, por ser tão compreensivo e por sempre me dar forças para seguir em frente. Muito obrigada por todo o sacrifício que você fez para que eu pudesse desenvolver este trabalho.

Ao meu pequeno Davi, agradeço por você existir tornando a minha vida muito mais feliz, e peço perdão por cada minuto que deixei de estar ao seu lado para realizar este trabalho.

À Deus por sempre guiar **todos** os meus passos.



# SUMÁRIO

---

LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E CONVENÇÕES .....	xi
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
<b>1 - INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 - Vírus Herpes Humanos.....	2
1.1.1 - Estrutura e Ciclo Replicativo dos Vírus Herpes Simples.....	3
1.1.2 - DNA Polimerase do HSV-1.....	4
1.1.3 - Infecções Causadas pelo HSV.....	6
1.1.4 - Fármacos Anti-Vírus Herpes.....	6
1.1.5 - Candidatos a Agentes Anti-HSV.....	11
1.1.5.1- Compostos 4-Dihidro-oxoquinolinos.....	11
1.1.5.2 - Compostos Derivados do Ácido 1,4-dihidro-4-oxoquinolino-3-carboxílico.....	12
1.2 - Modelagem Molecular.....	15
1.2.1 - Modelagem Molecular de Compostos Modelo e de Substâncias com Atividade Antiviral.....	16
1.2.1.1 - Modelagem Molecular de Compostos Modelo – Estudos de Relação Estrutura-Propriedade.....	17
1.2.2.1- Modelagem Molecular de Substâncias com Atividade Antiviral – Estudos de Relação Estrutura-Atividade.....	20

<b>2- JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> .....	24
<b>3 - METODOLOGIA</b> .....	26
3.1 - Métodos de Química Computacional.....	27
3.1.1 - Métodos de Mecânica Molecular.....	27
3.1.2 - Métodos Quânticos Teóricos .....	28
3.1.2.1 - Métodos Semi-empíricos.....	28
3.1.2.2 - Métodos <i>Ab initio</i> .....	29
3.1.2.3 - Métodos DFT.....	30
3.1.3 - Funções de Base.....	31
3.1.4 - Cálculos de Deslocamentos Químicos de RMN.....	32
3.2 - Modelagem por Homologia.....	33
3.3 - <i>Docking</i> .....	35
3.4 - Dinâmica Molecular.....	38
3.4.1 - Dinâmica Molecular dos Ribonucleosídeos.....	40
3.4.2 - Dinâmica Molecular dos Complexos Ligante / DNA Polimerase / DNA.....	42
<b>4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	44
4.1 - Modelagem Molecular de Compostos Modelo – Estudos de Relação Estrutura-Propriedade.....	45
4.1.1 - Halonorbornanos.....	46
4.1.2 - Norbornano, Norcânfora, Bornano e Cânfora.....	49
4.1.3 - Halonorcânforas.....	53
4.1.4 - Halocânforas.....	56
4.1.5 - Deslocamentos Químicos de RMN de <sup>1</sup> H e Distorções Moleculares como Provas para Efeitos Estéricos.....	59

4.2 - Modelagem Molecular de Substâncias com Atividade Antiviral – Estudos de Relação Estrutura-Atividade.....	61
4.2.1 - Análise Conformacional de Ribonucleosídeos por DM.....	64
4.2.2 - Mapas de Potencial Eletrostático.....	73
4.2.3 - Modelagem por Homologia.....	74
4.2.4 - Estudos de <i>Docking</i> .....	75
4.2.4.1 - Mutações.....	78
4.2.5 - Simulações por DM dos Complexos Ligante/DNA Polimerase/DNA.....	80
4.2.6 - Proposição de Novas Substâncias.....	86
<b>5 - CONCLUSÕES.....</b>	<b>96</b>
5.1 - Estudos de Relação Estrutura-Propriedade.....	97
5.2 - Estudos de Relação Estrutura-Atividade.....	98
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>100</b>
<b>ANEXO I – Material Suplementar.....</b>	<b>I</b>
<b>ANEXO II – Trabalhos desenvolvidos durante a tese.....</b>	<b>XXIII</b>

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1:</b>	Resultados de testes de atividade antiviral <i>in vitro</i> frente ao vírus HSV-1 dos ribonucleosídeos <b>1a-1j</b> na concentração de 50 $\mu$ M.....	12
<b>Tabela 2:</b>	Deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ experimentais e calculados pelo programa <i>CHARGE</i> para hidrogênios do adamantano.....	33
<b>Tabela 3:</b>	Efeitos de substituintes nos deslocamentos químicos (ppm) de $^1\text{H}$ para 3-halonorbornanos.....	47
<b>Tabela 4:</b>	Comprimentos de ligação ( $\text{\AA}$ ) para 3-halonorbornanos calculados pelo programa <i>Gaussian 98</i> .....	47
<b>Tabela 5:</b>	Ângulos diedros (graus) selecionados para 3-halonorbornanos calculados pelo método MM2.....	48
<b>Tabela 6:</b>	Distâncias internucleares e C-R ( $\text{\AA}$ ) para 3-halonorbornanos calculadas pelo método MM2.....	48
<b>Tabela 7:</b>	Deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ (ppm) para o norbornano, norcânfora, bornano e cânfora.....	50
<b>Tabela 8:</b>	Comprimentos de ligação ( $\text{\AA}$ ) do norbornano, norcânfora, bornano e cânfora calculados pelo programa <i>Gaussian 98</i> .....	50
<b>Tabela 9:</b>	Efeitos de substituintes nos deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ (ppm) para derivados 3-halonorcânfora.....	53
<b>Tabela 10:</b>	Comprimentos de ligação ( $\text{\AA}$ ) para 3-halonorcânforas calculados pelo programa <i>Gaussian 98</i> .....	54
<b>Tabela 11:</b>	Ângulos diedros selecionados (graus) para 3-halonorcânforas calculados pelo programa <i>Gaussian 98</i> (a) e pelo método MM2 (b).....	55
<b>Tabela 12:</b>	Efeitos de substituintes nos deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ (ppm) para derivados da cânfora substituídos.....	57

<b>Tabela 13:</b>	Ângulos diedros selecionados (graus) para halocânforas calculados pelo programa <i>Gaussian 98</i> .....	57
<b>Tabela 14:</b>	Comprimentos de ligação e distâncias selecionadas (Å) de halocânforas calculados pelo programa <i>Gaussian 98</i> .....	57
<b>Tabela 15:</b>	Valores médios das distâncias D1, D3 e D4 e D1', D3', D4' e D5' (Å) para as simulações por DM iniciadas com o confômero <i>syn</i> no vácuo a 300K.....	71
<b>Tabela 16:</b>	Densidades de carga calculadas para H8 dos ribonucleosídeos estudados pelo método <i>ChelpG</i> .....	71
<b>Tabela 17:</b>	Área superficial (Å <sup>2</sup> ) dos ribonucleosídeos estudados nas conformações <i>syn</i> e <i>anti</i> calculadas pelo programa <i>Hyperchem</i> ....	72
<b>Tabela 18:</b>	Interações do PNU e do ribonucleosídeo 6-Cl substituído com resíduos da DNA polimerase do HSV-1 até 2 ns de simulação .....	81
<b>Tabela 19:</b>	Interações do PNU e do ribonucleosídeo 6-Cl substituído com resíduos da DNA polimerase do HSV-1 de 2 a 8 ns de simulação.	83
<b>Tabela 20:</b>	Atividade antiviral frente ao HSV-1 para o ribonucleosídeo 6-Cl substituído e para o PNU comparados ao ACV.....	85
<b>Tabela 21:</b>	Resultados de testes de atividade antiviral <i>in vitro</i> frente ao vírus HIV dos derivados quinolônicos acilhidrazonas <b>30</b> , <b>31</b> e <b>32</b> .....	86
<b>Tabela 22:</b>	Interações do PNU e compostos <b>30</b> , <b>31</b> e <b>32</b> com resíduos da DNA polimerase do HSV-1.....	90
<b>Tabela 23:</b>	Interações do PNU e das estruturas propostas <b>1</b> , <b>2</b> , <b>3</b> e <b>4</b> com resíduos da DNA polimerase do HSV-1.....	94
<b>Tabela A1:</b>	Deslocamentos químicos experimentais de <sup>13</sup> C (ppm) para 3-halonorbornos.....	II
<b>Tabela A2:</b>	Deslocamentos químicos experimentais de <sup>13</sup> C (ppm) para 3-halonorcânforas.....	II

<b>Tabela A3:</b>	Densidades de carga para 3-halonorcânforas calculadas pelo programa <i>Gaussian 98</i> .....	II
<b>Tabela A4:</b>	Efeitos de substituintes nos deslocamentos químicos de <sup>1</sup> H (ppm) para 3-halonorcânforas calculados pelo programa <i>Gaussian 98</i> ....	III
<b>Tabela A5:</b>	Efeitos de substituintes nos deslocamentos químicos de <sup>1</sup> H (ppm) para 3-halonorcânforas calculados pelo programa <i>CHARGE 6A</i> ....	III
<b>Tabela A6:</b>	Distâncias internucleares (Å) para 3-halonorcânforas calculadas pelo método MM2.....	III
<b>Tabela A7:</b>	Efeitos de substituintes nos deslocamentos químicos de <sup>13</sup> C experimentais (ppm) de cânforas substituídas.....	IV
<b>Tabela A8:</b>	Densidades de carga para cânforas substituídas calculadas pelo programa <i>Gaussian 98</i> .....	IV
<b>Tabela A9:</b>	Efeitos de substituintes nos deslocamentos químicos de <sup>1</sup> H (ppm) para cânforas substituídas calculados pelo programa <i>Gaussian 98</i> .....	IV
<b>Tabela A10:</b>	Efeitos de substituintes nos deslocamentos químicos de <sup>1</sup> H (ppm) para cânforas substituídas calculados pelo programa <i>CHARGE 6A</i> .....	V
<b>Tabela A11:</b>	Distâncias internucleares e distâncias C-R (Å) para cânforas substituídas calculadas pelo método MM2.....	V

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1:</b>	Fotomicrografia eletrônica e representação esquemática do HSV-1 respectivamente.....	3
<b>Figura 2:</b>	DNA polimerase do HSV-1.....	5
<b>Figura 3:</b>	Arranjo espacial relativo de regiões conservadas de DNA polimerases.....	5
<b>Figura 4:</b>	Estruturas químicas dos nucleosídeos Guanosina e Citidina, de alguns análogos de nucleosídeos e de seus respectivos pró-fármacos.....	7
<b>Figura 5:</b>	Estrutura química do Foscarnet.....	10
<b>Figura 6:</b>	Exemplos de compostos 4-dihidro-oxoquinolinos sintetizados pela <i>Pharmacia</i> .....	11
<b>Figura 7:</b>	Estruturas de compostos contendo o sistema 1,4-dihidro-4-oxoquinolina: análogo de nucleosídeo 6-Cl, anel heterociclo e PNU-183792, respectivamente.....	14
<b>Figura 8:</b>	Modelo proposto por Liu e colaboradores (2006) para a inibição da DNA polimerase do HSV-1 pelo PNU-183792.....	15
<b>Figura 9:</b>	Diferenças entre os valores de deslocamento químico de RMN de <sup>1</sup> H do norbornano substituído na posição 2- <i>exo</i> por Cl, Br e I respectivamente e do norbornano não substituído.....	18
<b>Figura 10:</b>	Possíveis orientações espaciais para o substituinte etila no 1-etiladamantano.....	19
<b>Figura 11:</b>	Efeito estérico dos substituintes metila e bromo em adamantanos 2,2-di-substituídos.....	19
<b>Figura 12:</b>	Modelo proposto por Shen e colaboradores (1989) para a auto-associação da quinolona com o DNA.....	21

<b>Figura 13:</b>	6-Aminoquinolonas (R=H ou C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ).....	21
<b>Figura 14:</b>	4-Hidroxiquinolino carboxamidas: PNU-181128, PNU-145185 e PNU-181465 respectivamente.....	22
<b>Figura 15:</b>	Representação esquemática dos confômeros <i>syn</i> e <i>anti</i> do ácido 7-metóxi-1,4-dihidro-4-oxo-1-(β-D-ribofuranosil)quinolino-3-carboxílico ( <b>1j</b> ), mostrando a numeração dos átomos, os ângulos de torção em vermelho, θ <sub>1</sub> (O4'-C1'-N1-C8a) e θ <sub>2</sub> (H-O1a-C1-C3), e as distâncias interatômicas em azul monitoradas durante as simulações por DM.....	42
<b>Figura 16:</b>	<i>Norbornanos substituídos</i> .....	46
<b>Figura 17:</b>	Norbornano, norcânfora, bornano e cânfora respectivamente.....	49
<b>Figura 18:</b>	Ângulos selecionados no norbornano, 1-metil adamantano e bornano respectivamente.....	52
<b>Figura 19:</b>	Ângulos, distâncias interatômicas e comprimentos de ligação selecionados para o norbornano, bornano e cânfora respectivamente.....	52
<b>Figura 20:</b>	Norcânfora com substituintes na posição 3.....	53
<b>Figura 21:</b>	Ângulos de ligação selecionados para derivados 3-halonorcânfora calculados pelo programa <i>Gaussian 98</i> .....	55
<b>Figura 22:</b>	Cânfora com substituintes na posição 3.....	56
<b>Figura 23:</b>	Alguns ângulos de halocânforas calculados pelo programa <i>Gaussian 98</i> .....	58
<b>Figura 24:</b>	Alguns ângulos de derivados da cânfora bromo- e metil-substituídos calculados pelo programa <i>Gaussian 98</i> .....	60
<b>Figura 25:</b>	Representação esquemática do confômero <i>anti</i> do ácido 7-metóxi-1,4-dihidro-4-oxo-1-(β-D-ribofuranosil)quinolino-3-carboxílico ( <b>1j</b> ) estudado por Leal e colaboradores, o confômero	



	<i>anti</i> do derivado 4-oxoquinolino ( <b>2</b> ) estudado por Cruz e colaboradores e o confômero <i>syn</i> da 1-deazo-2'-deoxiadenosina ( <b>3</b> ) estudado por Seela e colaboradores.....	63
<b>Figura 26:</b>	Variação do ângulo de torção $\theta_1$ durante 10 ns de simulação por DM no vácuo (acima) e em água (abaixo) para a conformação inicial <i>syn</i> (esquerda) e <i>anti</i> (direita) do confômero <b>1</b> a 300K.....	65
<b>Figura 27:</b>	Variação do ângulo de torção $\theta_1$ durante 10 ns de simulação por DM no vácuo (acima) e em água (abaixo) para a conformação inicial <i>syn</i> (esquerda) e <i>anti</i> (direita) do confômero <b>1</b> a 600K.....	65
<b>Figura 28:</b>	Variações das distâncias entre C=O e OH5' e entre OMe e OH5' durante a simulação para a conformação inicial <i>syn</i> a 300K.....	67
<b>Figura 29:</b>	Variações das distâncias entre O4' e H8 e entre O4' e H2 durante a simulação iniciada com o confômero <i>syn</i> a 300K.....	67
<b>Figura 30:</b>	Mapas de potencial eletrostático para os ribonucleosídeos 6-Br e 7-Br substituídos (acima) e 6-Cl e 7-Cl substituídos (abaixo) respectivamente na conformação <i>syn</i> .....	73
<b>Figura 31:</b>	Sobreposição da estrutura obtida homologia (verde) à estrutura de raios-X da DNA polimerase do HSV-1 (magenta).....	74
<b>Figura 32:</b>	Ligante da estrutura do PDB 1TKT - 6-Cloro-4-(ciclo-hexil-oxi)-3-propilquinolin- 2(1H)-ona.....	75
<b>Figura 33:</b>	<i>Template</i> (magenta) ocupando espaço próximo a V823 (verde)....	76
<b>Figura 34:</b>	Resultado do <i>docking</i> para as conformações <i>syn</i> e <i>anti</i> respectivamente do composto 6-Cl substituído .....	77
<b>Figura 35:</b>	Resultado do <i>docking</i> para a conformação <i>anti</i> do composto 6-Br substituído.....	78
<b>Figura 36:</b>	Resultado do <i>docking</i> para o PNU e para as conformações <i>anti</i> e <i>syn</i> respectivamente do composto 6-Cl substituído, para a	

	mutação V823P.....	79
<b>Figura 37:</b>	Resultado do <i>docking</i> para o PNU e para as conformações <i>anti</i> e <i>syn</i> respectivamente do composto 6-Cl substituído, para a mutação V823A.....	80
<b>Figura 38:</b>	Diedros $\theta_1$ e $\theta_2$ monitorados durante a simulação para o ribonucleosídeo 6-Cl substituído.....	82
<b>Figura 39:</b>	Interações do grupo cloro-fenila do PNU com os resíduos da região hidrofóbica GLN617, GLN618, PHE820 e VAL823 de 2 a 8 ns de simulação.....	83
<b>Figura 40:</b>	Interações da carbonila do PNU com os resíduos ASN815, TYR818 e GLY819 de 2 a 8 ns de simulação.....	84
<b>Figura 41:</b>	Interações da carbonila do ribonucleosídeo 6-Cl substituído com os resíduos GLY822, VAL823 e GLN824 de 2 a 8 ns de simulação.....	84
<b>Figura 42:</b>	Interações do ribonucleosídeo 6-Cl substituído com os resíduos da região hidrofóbica GLN617, GLN618, PHE820 e VAL823 de 2 a 8 ns de simulação.....	85
<b>Figura 43:</b>	Derivados quinolônicos acilhidrazonas <b>A</b> , <b>B</b> , <b>C</b> e PNU-183792 respectivamente.....	86
<b>Figura 44:</b>	Gráfico de <i>Drug-likeness</i> para os compostos <b>A</b> , <b>B</b> , <b>C</b> , ribonucleosídeo 6-Cl substituído e PNU.....	87
<b>Figura 45:</b>	Resultado do <i>docking</i> dos compostos <b>A</b> , <b>B</b> e <b>C</b> com a DNA polimerase do HSV-1.....	88
<b>Figura 46:</b>	Sobreposição das estruturas de saída do <i>docking</i> para os compostos <b>A</b> , <b>B</b> e <b>C</b> ao PNU.....	88
<b>Figura 47:</b>	PNU (amarelo), composto <b>A</b> (verde), alguns dos resíduos importantes no modelo de Liu e colaboradores e resíduos	

	próximos a ASP888.....	91
<b>Figura 48:</b>	Estruturas propostas <b>1, 2, 3 e 4</b> respectivamente .....	91
<b>Figura 49:</b>	Gráficos de <i>Drug-likeness</i> para as substâncias propostas <b>1, 2, 3 e 4</b> e para o PNU.....	92
<b>Figura 50:</b>	Resultado do <i>docking</i> das estruturas propostas <b>1, 2, 3 e 4</b> com a DNA polimerase do HSV-1 sobrepostas ao PNU.....	93
<b>Figura 51:</b>	Modificações estruturais propostas para o ribonucleosídeo 6-Cl substituído.....	95
<b>Figura A1:</b>	Variação de $\theta_1$ no vácuo e na água para as conformações iniciais <i>syn</i> (esquerda) e <i>anti</i> (direita) de <b>1j</b> a 300 K.....	VI
<b>Figura A2:</b>	Variação de $\theta_2$ no vácuo e na água para as conformações iniciais <i>syn</i> (esquerda) e <i>anti</i> (direita) de <b>1j</b> a 300 K.....	VI
<b>Figura A3:</b>	Variação das distâncias entre $\text{COOH}$ e $\text{C=O}$ ( $D_2$ e $D_2'$ ) no vácuo e na água para as conformações iniciais <i>syn</i> (esquerda) e <i>anti</i> (direita) de <b>1j</b> a 300 K.....	VII
<b>Figura A4:</b>	Variação das distâncias entre $\text{OMe}$ e $\text{OH}_{5'}$ ( $D_1$ ) e entre $\text{C=O}$ e $\text{OH}_{5'}$ ( $D_1'$ ) no vácuo e na água para as conformações iniciais <i>syn</i> (esquerda) e <i>anti</i> (direita) de <b>1j</b> a 300 K.....	VII
<b>Figura A5:</b>	Variação da distância entre $\text{O}_{4'}$ e $\text{H}_2$ ( $D_3'$ ) no vácuo e na água para a conformação inicial <i>anti</i> de <b>1j</b> a 300 K.....	VIII
<b>Figura A6:</b>	Variação da distância entre $\text{OH}_{2'}$ e $\text{H}_8$ ( $D_4'$ ) no vácuo e na água para a conformação inicial <i>anti</i> de <b>1j</b> a 300 K.....	VIII
<b>Figura A7:</b>	Variação da distância entre $\text{OH}_{5'}$ e $\text{H}_2$ ( $D_5'$ ) no vácuo e na água para a conformação inicial <i>anti</i> de <b>1j</b> a 300 K.....	VIII
<b>Figura A8:</b>	Variação da distância entre $\text{O}_{4'}$ e $\text{H}_8$ ( $D_3$ ) no vácuo e na água para a conformação inicial <i>syn</i> de <b>1j</b> a 300 K.....	VIII
<b>Figura A9:</b>	Variação da distância entre $\text{OH}_{5'}$ e $\text{H}_8$ ( $D_4$ ) no vácuo e na água	

	para a conformação inicial <i>syn</i> de <b>1j</b> a 300 K.....	IX
<b>Figura A10:</b>	Variação das distâncias entre $\underline{QH5'}$ e H2 (D5'), OH2' e H8 (D4') e O4' e H2 (D3') quando a conformação inicial <i>syn</i> de <b>1j</b> é convertida na <i>anti</i> no vácuo a 300K.....	IX
<b>Figura A11:</b>	Espectro de nOe para o ribonucleosídeo <b>1j</b> . A irradiação de H1' ( $\delta$ 6,30) resultou em 20,4% de nOe em H8 ( $\delta$ 7,45) e 4,0% em H2 ( $\delta$ 9.51).....	X
<b>Figura A12:</b>	Variação de $\theta_1$ no vácuo e na água para as conformações iniciais <i>syn</i> (esquerda) e <i>anti</i> (direita) do ribonucleosídeo <b>1</b> (R=H) a 300K.....	XI
<b>Figura A13:</b>	Variação de $\theta_2$ no vácuo e na água para as conformações iniciais <i>syn</i> (esquerda) e <i>anti</i> (direita) do ribonucleosídeo <b>1</b> (R=H) a 300K.....	XI
<b>Figura A14:</b>	Variação de $\theta_1$ no vácuo e na água para as conformações iniciais <i>syn</i> (esquerda) e <i>anti</i> (direita) do ribonucleosídeo <b>1a</b> a 300 K.....	XII
<b>Figura A15:</b>	Variação de $\theta_2$ no vácuo e na água para as conformações iniciais <i>syn</i> (esquerda) e <i>anti</i> (direita) do ribonucleosídeo <b>1a</b> a 300 K.....	XII
<b>Figura A16:</b>	Variação de $\theta_1$ no vácuo e na água para as conformações iniciais <i>syn</i> (esquerda) e <i>anti</i> (direita) do ribonucleosídeo <b>1b</b> a 300 K.....	XIII
<b>Figura A17:</b>	Variação de $\theta_2$ no vácuo e na água para as conformações iniciais <i>syn</i> (esquerda) e <i>anti</i> (direita) do ribonucleosídeo <b>1b</b> a 300 K.....	XIII
<b>Figura A18:</b>	Variação de $\theta_1$ no vácuo e na água para as conformações iniciais <i>syn</i> (esquerda) e <i>anti</i> (direita) do ribonucleosídeo <b>1c</b> a 300 K.....	XIV
<b>Figura A19:</b>	Variação de $\theta_2$ no vácuo e na água para as conformações iniciais <i>syn</i> (esquerda) e <i>anti</i> (direita) do ribonucleosídeo <b>1c</b> a 300 K.....	XIV
<b>Figura A20:</b>	Variação de $\theta_1$ no vácuo e na água para as conformações iniciais <i>syn</i> (esquerda) e <i>anti</i> (direita) do ribonucleosídeo <b>1e</b> a 300 K.....	XV

<b>Figura A21:</b>	Varição de $\theta_2$ no vácuo e na água para as conformações iniciais <i>syn</i> (esquerda) e <i>anti</i> (direita) do ribonucleosídeo <b>1e</b> a 300 K.....	XV
<b>Figura A22:</b>	Varição de $\theta_1$ no vácuo e na água para as conformações iniciais <i>syn</i> (esquerda) e <i>anti</i> (direita) do ribonucleosídeo <b>1f</b> a 300 K.....	XVI
<b>Figura A23:</b>	Varição de $\theta_2$ no vácuo e na água para as conformações iniciais <i>syn</i> (esquerda) e <i>anti</i> (direita) do ribonucleosídeo <b>1f</b> a 300 K.....	XVI
<b>Figura A24:</b>	Varição de $\theta_1$ no vácuo e na água para as conformações iniciais <i>syn</i> (esquerda) e <i>anti</i> (direita) do ribonucleosídeo <b>1g</b> a 300 K.....	XVII
<b>Figura A25:</b>	Varição de $\theta_2$ no vácuo e na água para as conformações iniciais <i>syn</i> (esquerda) e <i>anti</i> (direita) do ribonucleosídeo <b>1g</b> a 300 K.....	XVII
<b>Figura A26:</b>	Varição de $\theta_1$ no vácuo e na água para as conformações iniciais <i>syn</i> (esquerda) e <i>anti</i> (direita) do ribonucleosídeo <b>1i</b> a 300K.....	XVIII
<b>Figura A27:</b>	Varição de $\theta_2$ no vácuo e na água para as conformações iniciais <i>syn</i> (esquerda) e <i>anti</i> (direita) do ribonucleosídeo <b>1i</b> a 300 K.....	XVIII
<b>Figura A28:</b>	Mapas de potencial eletrostático feitos com o programa <i>Spartan</i> para os ribonucleosídeos estudados na conformação <i>anti</i> .....	XIX
<b>Figura A29:</b>	Mapas de potencial eletrostático feitos com o programa <i>Spartan</i> para os ribonucleosídeos estudados na conformação <i>syn</i> .....	XX
<b>Figura A30:</b>	Sobreposição da Região III da DNA polimerase do HSV-1 (verde) e do domínio DNA polimerase da Transcriptase Reversa do HIV (rosa). Em amarelo o resíduo VAL823.....	XXII

## LISTA DE ABREVIATURAS E CONVENÇÕES

---

**a:** posição *anti*

**ACV:** Aciclovir

**AIDS:** Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

**AM1:** “*Austin Model 1*”

**AMBER:** “*Assisted Model Building with Energy Refinement*”

**B3LYP:** Método híbrido de três parâmetros, baseado na DFT, proposto por Becke que utiliza o funcional de Lee, Yang e Parr.

**CDV:** Cidofovir

**ChelpG:** “*CHarges from ELectrostatic Potentials using a Grid based method*”

**CMV:** Citomegalovírus

**CPC:** Condições Periódicas de Contorno

**DFT:** Teoria do Funcional de Densidade

**DM:** Dinâmica Molecular

**DMEM:** *Dubelcco’s modified Eagle medium*

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DNA:** Ácido desoxirribonucléico

**EBV:** Epstein-Barr Vírus

**EC<sub>50</sub>:** Concentração da substância capaz de inibir em 50% a replicação viral na célula

**eOn:** Efeito Overhauser nuclear

**GCV:** Ganciclovir

**GIAO:** “*Gauge Independent Atomic Orbitals*”

**HF:** “*Hartree-Fock*”

**HHV:** Vírus Herpes Humanos

**HIV:** Vírus da Imunodeficiência Humana

**HSV-1:** Herpes Simples Vírus do tipo 1

**HSV-2:** Herpes **S**imples **V**írus do tipo **2**

**IC<sub>50</sub>:** Concentração da substância capaz de inibir em 50% a replicação viral na enzima

**IUPAC:** União Internacional de Química Pura e Aplicada

**KSHV:** Sarcoma de Kaposi

**LCAO:** Combinação linear de orbitais atômicos

**μM:** Micromolar

**MM:** Mecânica Molecular

**MM2:** “*Molecular Mechanics 2*”

**MM3:** “*Molecular Mechanics 3*”

**MM4:** “*Molecular Mechanics 4*”

**MNDO:** “*Modified Neglect of Diatomic Overlap*”

**MP2:** Teoria de perturbação de 2ª ordem Möller Plesset

**n:** posição *endo*

**PBMC:** células mononucleares do sangue periférico

**PCV:** Penciclovir

**PDB:** “*Protein Data Bank*”

**ppm:** Parte por milhão

**PM3:** “*Parametrisation 3 of MNDO*”

**QSAR:** Relação Quantitativa Estrutura-Atividade

**QSAR-3D:** Relação Quantitativa Estrutura-Atividade Tridimensional

**RMN:** Ressonância Magnética Nuclear

**RMS:** “*Root Mean Square*”

**s:** posição *syn*

**SAR:** Relação Estrutura-Atividade

**STO:** Orbitais do tipo *Slater*

**TMS:** Tetrametilsilano

**TP:** trifosfato

**VERO:** Células de rim de macaco verde africano

**VZV: Varicella-Zóster Vírus**

**x:** posição **exo**



## RESUMO

---

Atualmente, o planejamento racional baseado em estrutura e no mecanismo de ação de um fármaco é a estratégia mais eficiente e menos dispendiosa para o desenvolvimento de novos fármacos. Há uma grande variedade de métodos de Modelagem Molecular que podem ser aplicados no estudo de sistemas biológicos a fim de se compreender o fenômeno biológico a nível molecular, possibilitando o desenho de fármacos com propriedades específicas, melhor atividade e menores efeitos colaterais.

Neste trabalho, dividido em duas partes, foram desenvolvidos estudos de Modelagem Molecular em aspectos variados. Na primeira parte foram realizados estudos de estrutura-propriedade com o intuito de se dar continuidade a um trabalho de investigação de efeitos estéricos em compostos modelo através de deslocamentos químicos de RMN. Verificou-se que a magnitude dos efeitos de substituintes nos sistemas estudados pode ser relacionada ao volume de substituintes halogênicos. Porém, ao invés da polarização de ligação observada nos sistemas adamantano, os efeitos de substituintes foram principalmente refletidos por distorções em ligações e ângulos diedros.

Na segunda parte do trabalho foram realizados estudos de estrutura-atividade a fim de se tentar compreender diferenças de atividade anti-HSV-1 observadas para uma série de ribonucleosídeos sintetizados como potenciais agentes antivirais. Os resultados mostraram que as diferenças de atividade observadas não se devem a efeitos conformacionais e que as conformações *syn* e *anti* dos ribonucleosídeos estudados são importantes, podendo co-existir em água a 300K. Com base em estudos de *docking* e DM foram propostas quatro substâncias candidatas a agentes anti-HSV-1, numa tentativa de se melhorar a atividade do ribonucleosídeo 6-Cl substituído. Selecionou-se uma das propostas como potencial candidata.

## **ABSTRACT**

---

Nowadays the rational drug design based on the structure and the mechanism of action of a drug is the most efficient and less expensive strategy for the development of new drugs. There are many Molecular Modeling tools which can be applied in the study of biological systems in order to understand the biological phenomena at molecular level. It leads to the design of drugs with specific properties, increased activity and low side effects.

In this work, which is divided in two parts, Molecular Modeling studies were developed in many ways. In the first part we made structure-property studies in order to continue with the work of steric effects investigation on model compounds by NMR chemical shifts. It was verified that the magnitude of substituent effects on the studied systems can be related to the 'bulk' of halogen substituents. However, instead of the bond polarization observed for adamantyl compounds, here substituent effects were mainly reflected by distortions in bonds and dihedral angles.

In the second part, we made structure-activity studies trying to understand differences in the activity against HSV-1 observed for a series of ribonucleosides synthesized as potential antiviral agents. The results showed that the differences observed for activity are not due to conformational effects and both *syn* and *anti* conformations of the ribonucleosides are important and co-exist in water at 300K. Based on *docking* and molecular dynamics studies we proposed four compounds as candidates to anti-HSV-1 agents in order to improve the activity of the ribonucleoside with chlorine substituent at position 6. One of the proposed structures was selected as a potential one.

# ***Introdução***

---

# 1 Introdução

## 1.1 - Vírus Herpes Humanos

A família *Herpesviridae* contém mais de 80 vírus identificados e dentre estes, oito são capazes de provocar doenças em seres humanos, sendo denominados vírus herpes Humanos (*Human Herpes Virus*, HHV). Todos os vírus desta família, após a infecção primária, podem permanecer indefinidamente em estado latente no hospedeiro e serem reativados de modo recorrente em resposta a estímulos do meio. Os HHV são responsáveis por diversas doenças, que vão desde manifestações subclínicas a infecções fatais em pacientes imunocomprometidos (Fatahzadeh e Schwartz, 2007).

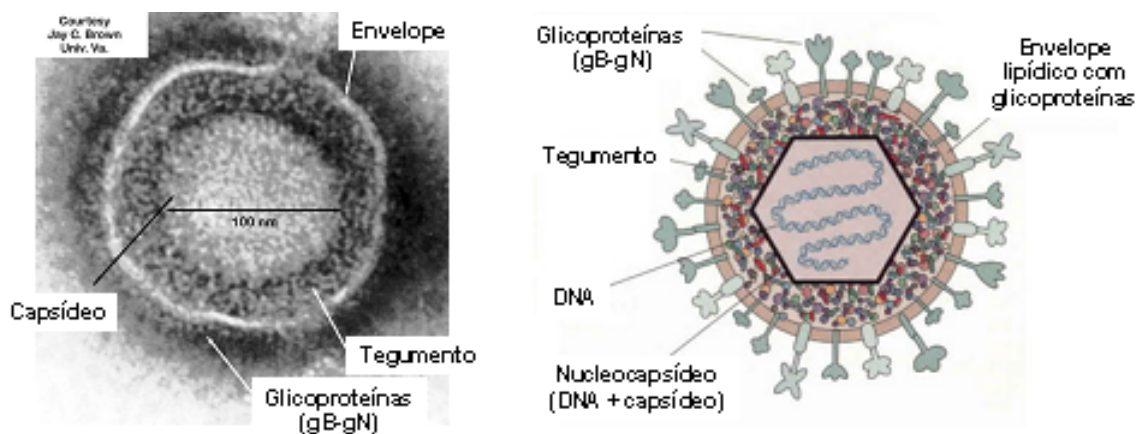
A família dos HHV é dividida em três subfamílias denominadas  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -*herpesvirinae*, onde os oito HHV estão distribuídos da seguinte forma (Martinho et al., 2003):

Subfamília	Código do vírus	Nome comum do vírus (sigla)
<b>Alfa</b>	HHV-1	Vírus Herpes Simples 1 (HSV-1)
	HHV-2	Vírus Herpes Simples 2 (HSV-2)
	HHV-3	Varicela-Zoster (VZV)
<b>Beta</b>	HHV-5	Citomegalovírus (CMV)
	HHV-6	Vírus Herpes Humano 6 (HHV-6)
	HHV-7	Vírus Herpes Humano 7 (HHV-7)
<b>Gama</b>	HHV-4	Vírus Epstein-Barr (EBV)
	HHV-8	Vírus associado ao Sarcoma de Kaposi (KSHV)

Alguns destes vírus, em particular, membros da subfamília  $\alpha$ -*herpesvirinae* são associados com infecções primárias e recorrentes em hospedeiros imunocomprometidos (Gilbert et al., 2002).

### ***1.1.1 – Estrutura e Ciclo Replicativo dos Vírus Herpes Simples***

A estrutura dos vírus herpes simples (HSV-1 e HSV-2), assim como dos demais vírus herpes, apresenta quatro componentes básicos: hélice dupla de DNA (*double stranded DNA*, dsDNA), capsídeo icosaédrico (estrutura proteica que engloba o material genético e este conjunto é denominado nucleocapsídeo), tegumento (material amorfo que circunda o nucleocapsídeo) e envelope (membrana lipídica, contendo glicoproteínas virais, que recobre a partícula viral) (Figura 1) (Lupi, 2000). Embora o HSV-1 e o HSV-2 compartilhem similaridades em suas sequências de DNA, eles se distinguem em seus envelopes proteicos (Fatahzadeh e Schwartz, 2007).



**Figura 1.** Fotomicrografia eletrônica (esquerda) e representação esquemática da organização estrutural (direita) do HSV-1 [Reproduzido de <http://bioinfo.bact.wisc.edu/themicrobialworld/AnimalViruses.html>, acessado em fevereiro de 2009].

A replicação viral inicia-se quando as partículas virais são adsorvidas na superfície da célula hospedeira via interações com receptores celulares. Após entrar na célula, o nucleocapsídeo é transportado pelo citoesqueleto até as proximidades do núcleo e o capsídeo é deixado no citoplasma. Em seguida, o DNA e a proteína do tegumento - TIF, após se complexarem com proteínas citoplasmáticas do hospedeiro, penetram no núcleo.

Uma vez dentro do núcleo, a replicação viral é dividida em três fases. Durante a primeira fase ocorre a síntese de proteínas que serão necessárias nas próximas fases.

Na segunda fase o gene da timidina quinase e a UL30/UL42 (DNA polimerase viral) são expressos e a DNA polimerase viral é replicada. Por fim, durante a última fase são feitos os componentes estruturais dos virions (partículas infectantes básicas dos vírus) (Souza et al., 2005).

O período de incubação é de cerca de sete dias. A infecção propaga-se para as terminações nervosas livres, com disseminação intra-axonal, por transporte retrógrado dos virions para os gânglios sensoriais paravertebrais. A replicação viral prossegue no gânglio sensorial e nos tecidos neurais contíguos, com o estabelecimento da latência viral. Os gânglios sacrais e trigeminais são os mais acometidos, mas outros gânglios paravertebrais também podem servir de epicentro nas recorrências clínicas (Lupi, 2000). Estresse, hipertermia, transplante de órgãos e imunossupressão podem levar a infecção produtiva. Durante a reativação, os vírus migram pelo axônio e causam lesões mucocutâneas, encefalites e inflamações córneas (Souza et al., 2007).

### ***1.1.2 – DNA Polimerase do HSV-1***

Os vírus herpes possuem um ciclo de replicação comum no qual a polimerase viral atua em múltiplos pontos, sendo um alvo atrativo para o desenvolvimento de fármacos anti herpéticos.

As polimerases dos vírus herpes exibem de 34 a 90% de identidade de sequência primária e são formadas por cerca de 1012 a 1242 aminoácidos. A DNA polimerase do HSV-1 (Figura 2), o protótipo da família de polimerases dos vírus herpes, possui 1235 resíduos de aminoácidos e exhibe todas as funções enzimáticas de uma polimerase.

As polimerases são classificadas de acordo com suas sequências e homologies funcionais. Todas as DNA polimerases dos vírus herpes pertencem à família B de DNA polimerases. Várias polimerases eucarióticas, incluindo as polimerases  $\alpha$  e  $\delta$  humanas também pertencem a esta família de DNA polimerases, onde a polimerase  $\delta$  humana

compartilha o mais alto grau de identidade sequencial com as polimerases dos vírus herpes. Esta família B de DNA polimerases apresenta de quatro a sete domínios altamente conservados, numerados de I a VI, em grau decrescente de ordem de conservação (Figura 3) (Oien et al., 2002).

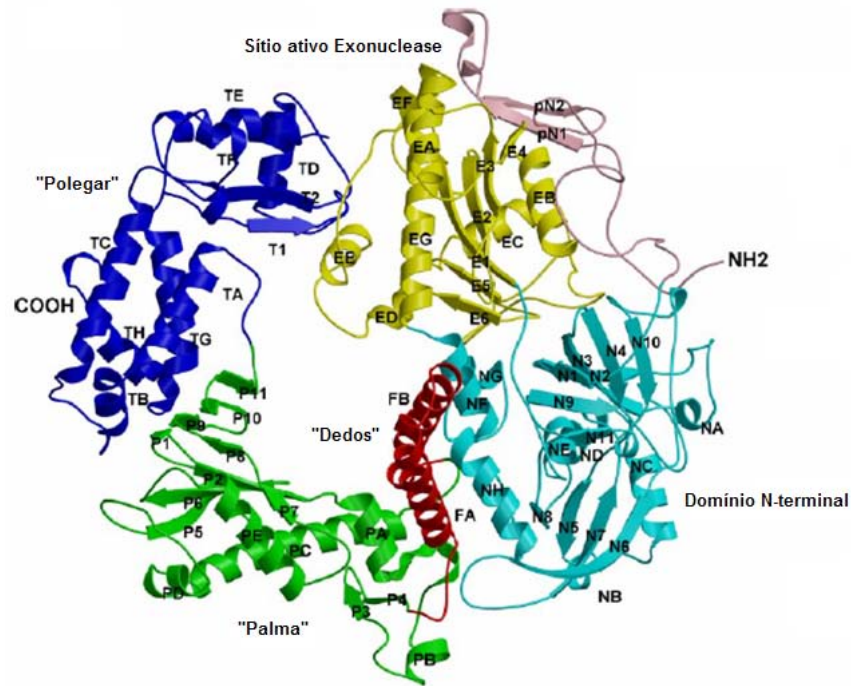


Figura 2. DNA polimerase do HSV-1 (Liu et al., 2006).

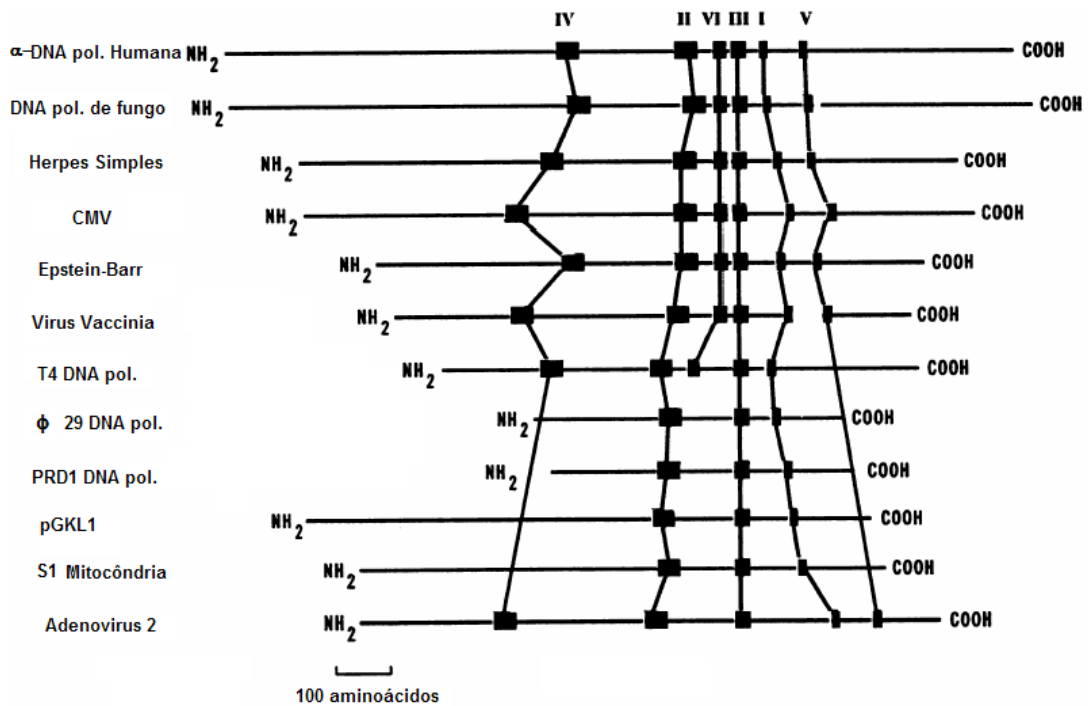


Figura 3. Arranjo espacial relativo de regiões conservadas de DNA polimerases. Regiões similares são alinhadas por linhas verticais (Wang et al., 1989).

### ***1.1.3 – Infecções Causadas pelo HSV***

As infecções causadas pelo HSV têm distribuição mundial e têm sido descritas na literatura médica por séculos. O HSV existe sob duas formas o HSV-1 e o HSV-2. O HSV-1 é associado à doença oral (herpes labial) e o HSV-2, à genital (herpes genital). Estas doenças estão entre as mais comuns em seres humanos e estima-se que cerca de 60 a 95% da população adulta esteja infectada por pelo menos um destes vírus (Brady e Bernstein, 2004).

Os HSVs causam no homem lesões mucocutâneas desde moderadas até graves com desconforto para o paciente e mesmo risco de vida nos indivíduos imunocomprometidos (Travassos et al., 1988).

O herpes é uma doença que não tem cura, existindo, contudo, alguns tratamentos que melhoram a situação do indivíduo, quer acelerando o processo de cicatrização das vesículas formadas (diminuindo o período de manifestação da doença) quer aumentando os períodos de tempo entre dois surtos consecutivos (Martinho et al., 2003).

### ***1.1.4 – Fármacos Anti-Vírus Herpes***

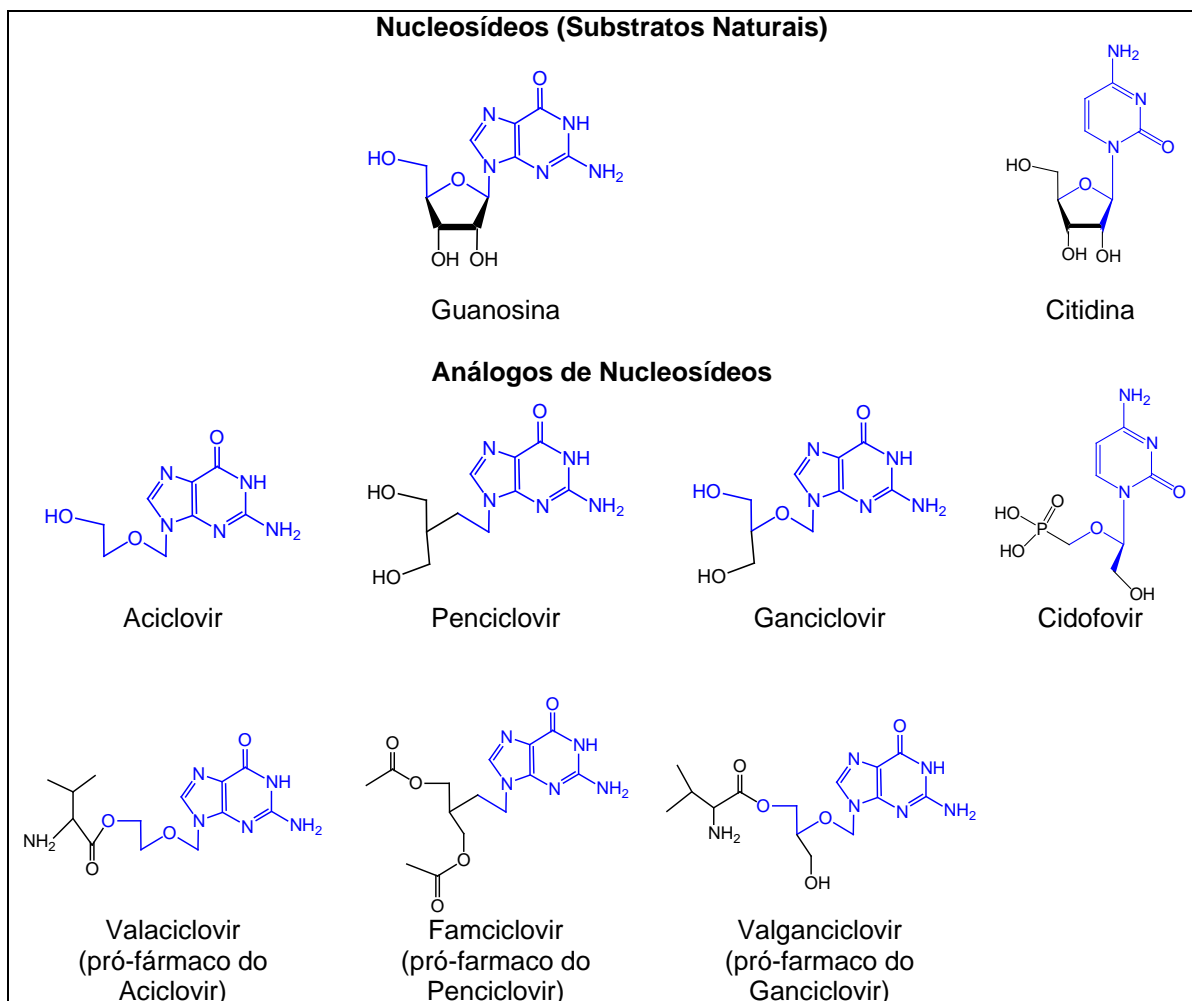
As infecções por HSV estão entre as primeiras doenças que vieram a ser tratadas com fármacos antivirais. Dentre estes, análogos de nucleosídeos naturais (como a guanossina), foram introduzidos em 1960 no arsenal da terapia antiviral como inibidores da DNA polimerase viral, uma vez que esta é uma enzima chave na replicação de todos os vírus herpes.

Vários fármacos estão disponíveis para se tratar infecções por vírus herpes. Fármacos como o Foscarnet agem diretamente na inibição da polimerase. Outros, como os análogos de nucleosídeos Aciclovir, Penciclovir e Ganciclovir atuam como inibidores competitivos da DNA polimerase viral com relação ao substrato natural, uma vez que são



análogos do substrato. De um modo geral, eles são pró-fármacos que devem ser primeiro fosforilados por quinases para a forma monofosfato e então fosforilados por enzimas celulares para a forma trifosfato antes de se tornarem inibidores ativos. A forma trifosfato destes análogos de nucleosídeos inibe as polimerases virais competindo com a interação dos desoxinucleosídeos trifosfatos naturais (Thomsen et al., 2003).

Os análogos de nucleosídeos Aciclovir, Penciclovir, Ganciclovir e Cidofovir (Figura 4) são alguns exemplos de fármacos anti-HSV disponíveis atualmente (Gilbert et al., 2002; Clercq, 2007). Os mecanismos de ação dos mesmos e do Foscarnet são descritos a seguir (Clercq, 2004; Clercq, 2001; Fatahzadeh e Schwartz, 2007; Brady e Bernstein, 2004):



**Figura 4.** Estruturas químicas dos nucleosídeos Guanosina e Citidina, de alguns análogos de nucleosídeos e de seus respectivos pró-fármacos.

- Aciclovir (ACV): 9-(2-hidroxietoximetil)guanina, acicloguanosina (ACG), Zovirax®

O ACV é um pró-fármaco análogo da desoxiguanosina, que é um dos quatro nucleosídeos do DNA (guanina). Ele é monofosforilado pela timidina quinase do HSV-1 (garantindo que ele atue apenas nas células infectadas) e o produto é di-fosforilado por quinases celulares, se tornando um substrato para a DNA polimerase do HSV. A incorporação do ACV trifosfatado resulta na terminação de cadeia e inativação da DNA polimerase, com a consequente inibição da replicação viral. Ele é utilizado via oral para o tratamento de infecções por HSV-1, HSV-2 e VZV.

A biodisponibilidade do ACV administrado por via oral é de apenas 10-20%, sendo necessário se utilizar múltiplas dosagens. O Valaciclovir, o éster de L-valina do Aciclovir, é bem absorvido (50%) e rapidamente convertido em Aciclovir.

- Penciclovir (PCV): 9-(4-hidróxi-3-hidroximetil-buta-1-il)guanina, Denavir<sup>®</sup>, Vectavir<sup>®</sup>

O PCV possui um mecanismo de ação similar ao do ACV, sendo utilizado, principalmente, para o tratamento de herpes labial, na forma de creme. Comparado ao ACV, apresenta maior tempo de meia-vida e maior concentração nas células infectadas por HSV, porém, é cerca de 100 a 160 vezes menos potente em inibir a DNA polimerase viral. O PCV interrompe a síntese do DNA viral por inibição competitiva e irreversível da DNA polimerase.

O Famciclovir é um éster de diacetila do PCV, bem absorvido (70%) pelo trato gastrointestinal. É indicado para o tratamento de HSV-1 em pacientes imunocomprometidos. Apresenta maior absorção oral, maior biodisponibilidade e maior intervalo de dosagens com relação ao PCV.

- Ganciclovir (GCV): 9-(1,3-dihidroxi-2-propoximetil)guanina (DHPG), Cymevene®, Cytovene®

Assim como o ACV, o GCV precisa ser ativado à forma trifosfato, competindo com a guanosina trifosfato pela incorporação ao DNA viral. O GCV se liga ao DNA da polimerase viral, onde atua como terminador de cadeia. O primeiro passo da fosforilação é catalisado pela timidina quinase do HSV ou pela proteína quinase do HCMV, o que explica a especificidade do GCV para o HSV e o HCMV respectivamente. É indicado, principalmente, para o tratamento de infecções causadas por HCMV, especialmente, retinite em pacientes imunocomprometidos, sendo administrado por via intravenosa.

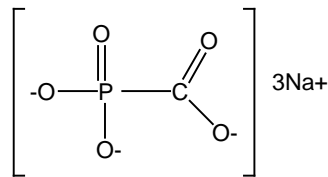
- Cidofovir (CDV): (S)-1-(3-hidróxi-2-fosfonilmetoxipropil)citosina (HPMPC), Vistide®, Forvade®

O CDV se liga à DNA polimerase viral, atuando como terminador de cadeia. Ele sofre uma fosforilação por uma quinase celular para se converter na forma difosfato (forma ativa). O CDV difosfato inibe a síntese do DNA viral, competindo com a incorporação da desoxicidina-TP à cadeia de DNA. É indicado para o tratamento de retinite causada por infecções do HCMV em pacientes com AIDS, sendo administrado por via intravenosa. Também se mostra eficaz no tratamento de HSV nos casos de resistência ao ACV e ao Foscarnet.

- Foscarnet: trisódio fosfonoformato, sódio Foscarnet, Foscavir®

O Foscarnet (Figura 5) é um análogo de pirofosfato que bloqueia, competitivamente, os sítios de reconhecimento de pirofosfato da DNA polimerase viral durante o processo de polimerização do DNA. Ele inibe diretamente a polimerase viral e não requer fosforilação pela timidina quinase viral. A resistência ao Foscarnet é rara e é proveniente de mutações na DNA polimerase. Sua toxicidade limita seu uso no tratamento de infecções resistentes ao ACV. É indicado, principalmente, para o

tratamento de infecções por HSV e VZV resistentes ao ACV, em pacientes imunocomprometidos, sendo administrado por via intravenosa.



**Figura 5.** Estrutura química do Foscarnet.

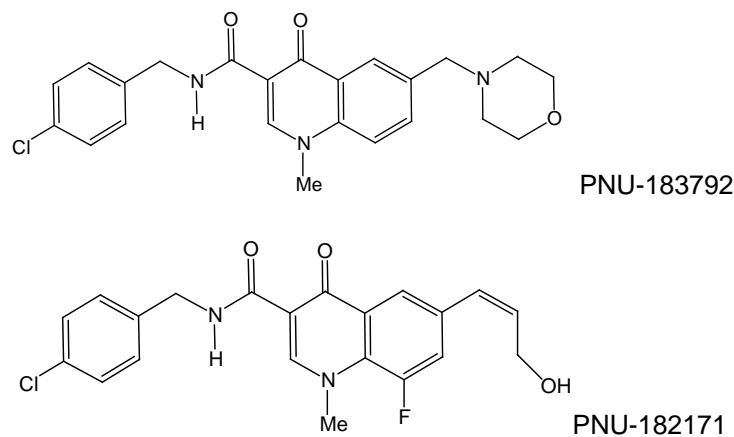
O uso do ACV é considerado seguro para o tratamento de pacientes com lesões herpéticas devido a sua baixa citotoxicidade. No entanto, vem sendo observado um aumento do número de cepas de HSV-1 resistentes ao ACV. Estas estirpes surgem, principalmente, em pacientes imunocomprometidos (Stranska et al., 2005). Além disso, a administração sistêmica de ACV vem sendo correlacionada com a formação de cristais e consequente falha no funcionamento renal (Lyon et al., 2002). Tanto o ACV quanto o GCV podem, ocasionalmente, apresentar neurotoxicidade (Ernst e Franey, 1998). Em alguns casos, este último está associado à carcinogênese (Wutzler e Thust, 2001). Fármacos como o Foscarnet têm sido empregados para tratamento de pacientes infectados com cepas resistentes ao ACV. No entanto, o Foscarnet pode levar a mutações em DNA polimerases celulares quando usado por longos períodos (Hwang et al., 1992). O Cidofovir é altamente nefrotóxico e é reservado para o tratamento de infecções por HSV resistentes ao ACV e ao Foscarnet (Fatahzadeh e Schwartz, 2007).

Desta forma, embora existam diversos fármacos antivirais em uso clínico para o tratamento das infecções por HSV, a síntese de novos derivados de nucleosídeos, além de outras classes de compostos com potencial atividade antiviral, continua a ser uma importante estratégia no desenvolvimento de fármacos candidatos a agentes anti-HSV (Clercq, 2001), principalmente devido à emergência de formas virais resistentes (Morfin e Thouvenot, 2003).

## 1.1.5 – Candidatos a Agentes Anti-HSV

### 1.1.5.1 - Compostos 4-Dihidro-oxoquinolinos

Devido à necessidade de novos agentes ativos contra cepas resistentes de HHV e com maior perfil de segurança, o centro de pesquisa da *Pharmacia Corp.* sintetizou, testou e estudou diversos compostos 4-dihidro-oxoquinolinos (Figura 6), que se mostraram excelentes candidatos a agentes anti-herpéticos (Wathen, 2002).



**Figura 6.** Exemplos de compostos 4-dihidro-oxoquinolinos sintetizados pela *Pharmacia* (Thomsen et al., 2003).

Estes inibidores não nucleosídeos, recentemente descritos na literatura (Wathen, 2002; Brideau et al., 2002; Oien et al., 2002; Hartline et al., 2005), previnem a replicação de um largo espectro de vírus herpes.

Uma das limitações dos fármacos disponíveis atualmente é que eles são ativos apenas contra alguns dos oito HHVs, enquanto alguns dos compostos 4-dihidro-oxoquinolinos inibiram seis dos oito HHVs (Wathen, 2002). A atividade antiviral desses compostos se correlaciona com a inibição da DNA polimerase viral. Além disso, eles são seletivos, pois inibem as DNA polimerases virais sem inibir as DNA polimerases humanas (Thomsen et al., 2003).

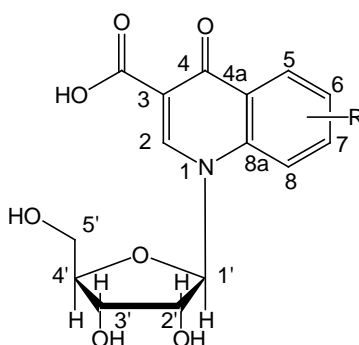
O largo espectro de atividade antiviral destes compostos pode ser explicado pelo fato de que eles parecem interagir com uma região dentro do domínio III da DNA polimerase viral, domínio este que é extremamente conservado em muitos dos vírus

herpes (Thomsen et al., 2003). Outro aspecto positivo destes compostos é que eles se mostraram ativos contra vírus resistentes ao ACV. Todos estes fatores fazem destes compostos potenciais candidatos a agentes para a profilaxia de vírus herpes em pacientes imunocomprometidos (Wathen, 2002).

### 1.1.5.2 – Compostos Derivados do Ácido 1,4-dihidro-4-oxoquinolino-3-carboxílico

Alguns grupos de pesquisa na Universidade Federal Fluminense objetivam sintetizar e estudar a atividade antiviral de novos compostos candidatos a agentes anti-HSV. Como exemplo, citamos uma série de ribonucleosídeos contendo, como unidade heterocíclica, derivados do sistema 1,4-dihidro-4-oxoquinolino (Tabela 1).

**Tabela 1.** Resultados dos ensaios de atividade antiviral *in vitro* dos ribonucleosídeos **1a-1j** frente ao vírus HSV-1 na concentração de 50  $\mu$ M.



Substância	1a	1b	1c	1d	1e	1f	1g	1h	1i	1j
R	6-Me	6-F	6-Cl	6-Br	6-OMe	7-F	7-Cl	7-Br	7-Me	7-OMe
% de inibição	99	53	99	0	11	0	91	93	67	90

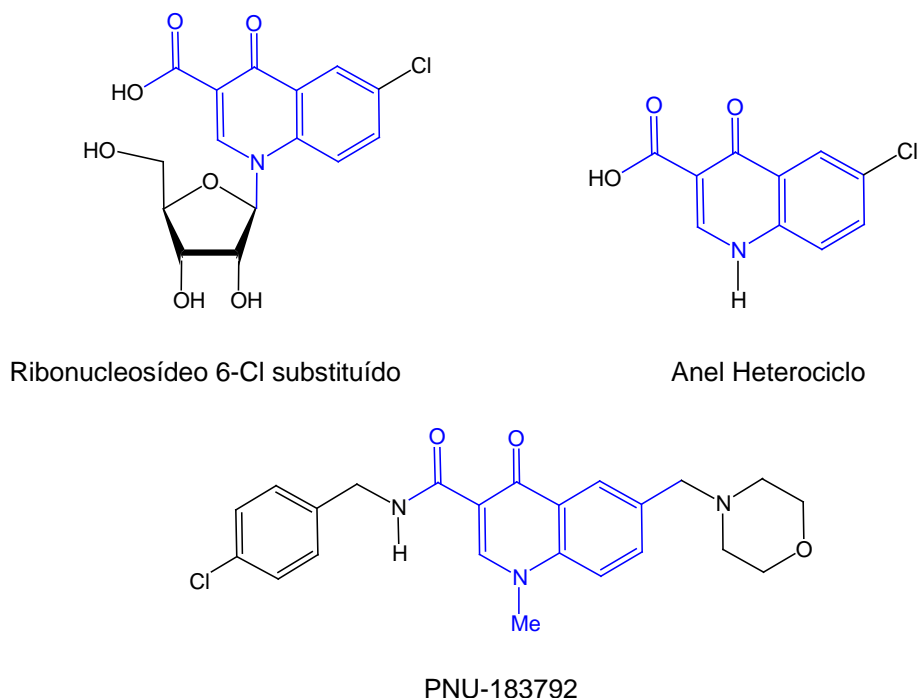
Em ensaios *in vitro*, os ribonucleosídeos contendo este heterociclo com os substituintes 6-Me, 6-Cl, 7-OMe, 7-Cl ou 7-Br (Tabela 1) apresentaram acima de 90% de inibição da replicação do HSV-1 na concentração de 50  $\mu$ M ( Santos, 2004). Estes ensaios foram feitos utilizando-se células VERO (rins de macaco verde africano) crescidas em meio DMEM (Dubelco's) suplementado com 2% de soro fetal bovino e 8%

de soro bovino, antibióticos (penicilina e estreptomicina) e fungizona. As células foram infectadas com HSV-1 e mantidas por 1 hora a 37 °C, em atmosfera de 5% de gás carbônico. Os ribonucleosídeos foram diluídos em DMSO até concentração 50µM e, após a adsorção do inóculo viral, foram deixados por 72 horas, quando o título viral foi determinado segundo o método de Reed & Muench (1938).

Em função destes resultados (Tabela 1) foram realizados estudos sobre o mecanismo de ação do ribonucleosídeo com o substituinte 6-cloro (**1c**, Tabela 1) no processo de replicação do vírus HSV-1, usando como padrão o ACV. Investigou-se também, a citotoxicidade destes ribonucleosídeos (Canuto et al., 2007; Souza et al., 2008).

Como resultado desses estudos, verificou-se que a concentração do composto 6-cloro substituído, necessária para inibir a DNA polimerase viral, é menor do que aquela necessária para inibir a DNA polimerase  $\alpha$  de células VERO. Ambos os ribonucleosídeos 6-cloro (**1c**) e 7-cloro (**1g**) inibem a atividade da DNA polimerase do HSV-1 na mesma extensão do que o ACV (Souza et al., 2005).

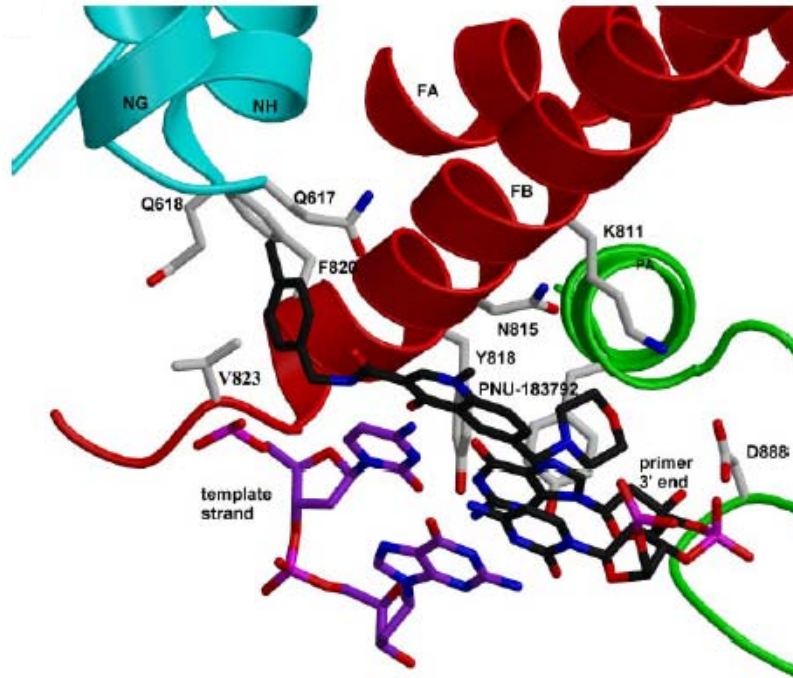
Verificou-se, também, que o derivado 6-Cl substituído apresenta baixa citotoxicidade e alto índice de seletividade. Ele inibiu a atividade da DNA polimerase do HSV-1, mas diferentemente do ACV, com um mecanismo acompetitivo (Souza et al., 2008). Tanto o ribonucleosídeo 6-cloro substituído quanto o anel heterociclo (Figura 7), que também foi testado (Souza et al., 2008), inibem a atividade da DNA polimerase do HSV-1, mostrando que o grupamento principal, responsável pela inibição, é o anel cloro-oxoquinolínico. Este resultado está de acordo com os estudos de Wathen (2002).



**Figura 7.** Estruturas de compostos contendo o sistema 1,4-dihidro-4-oxoquinolina: análogo de nucleosídeo 6-Cl, anel heterociclo e PNU-183792, respectivamente (em azul, o grupamento comum às três estruturas).

Ao publicar a estrutura de raios-X da DNA polimerase do HSV-1, Liu e colaboradores (2006) demonstraram que o composto PNU-183792 (Figura 7), também um derivado 1,4-dihidro-4-oxoquinolina, interage com o complexo HSV-DNA-polimerase/DNA-duplex, mecanismo este compatível com o perfil de inibição do ribonucleosídeo 6-Cl substituído. A partir deste resultado, Liu e colaboradores (2006) propõem um modelo para a inibição da DNA polimerase do HSV pelo PNU-183792, onde este composto substitui um nucleotídeo, deslocando uma base do *template* do sítio ativo. Neste modelo, o anel oxoquinolínico do PNU-183792 está “empilhado” com os anéis aromáticos das bases nitrogenadas do *primer/template* e também interage com resíduos de aminoácidos da polimerase. Adicionalmente, o grupo 6-cloro-benzila interage com uma região hidrofóbica, composta pelos resíduos GLN617, GLN618, PHE820 e VAL823 (Figura 8).





**Figura 8.** Modelo proposto por Liu e colaboradores (2006) para a inibição da DNA polimerase do HSV-1 pelo PNU-183792.

## ***1.2 - Modelagem Molecular***

Atualmente, o planejamento racional, baseado na estrutura e no mecanismo de ação de um fármaco, é a estratégia mais eficiente e menos dispendiosa para o desenvolvimento de novos fármacos, capaz de contribuir em todos os estágios do processo, desde a descoberta e a otimização de protótipos até a elaboração de compostos candidatos a testes clínicos (Silva e Silva, 2007).

Existe uma grande variedade de métodos de Modelagem Molecular que pode ser aplicada ao estudo de compostos que atuam em sistemas biológicos. Em sua essência, todos os métodos têm a mesma finalidade: compreender o mecanismo de ação biológico em nível molecular, possibilitando o desenho de fármacos com propriedades específicas, mais potentes, seletivos e com menos efeitos colaterais.

Com o avanço da Modelagem Molecular, hoje é possível, a partir do conhecimento da estrutura tridimensional de uma biomacromolécula alvo, sua função e sítio ativo receptor, construir e fazer o *docking* de um ligante na biomacromolécula alvo antes de investir tempo e recursos em síntese e testes de atividade. Outra abordagem é a simulação por Dinâmica Molecular (DM), que é uma ferramenta poderosa para a análise do comportamento de biomacromoléculas, permitindo obter seu perfil de energia em função do tempo de simulação (Meyer et al., 2000). Também se tornou possível propor e validar modelos matemáticos por estudos de relações entre a estrutura química e a atividade farmacológica, possibilitando a proposição de novas entidades químicas de interesse (Amaral e Montanari, 2002).

### ***1.2.1 - Modelagem Molecular de Compostos Modelo e de Substâncias com Atividade Antiviral***

As propriedades físico-químicas de determinados grupos funcionais são de extrema importância na fase farmacodinâmica de ação dos fármacos. Portanto, compreender a influência de substituintes nas propriedades estruturais de moléculas ligantes é fundamental.

Os efeitos dos substituintes podem ser divididos em dois tipos: estéricos e eletrônicos. Na dissertação de Mestrado, investigamos os efeitos estéricos em compostos modelo, utilizando dados de deslocamento químico de RMN calculados e experimentais (Yoneda, 2005). Como os resultados foram promissores, demos continuidade a estes estudos nesta tese Doutorado, estudando outros sistemas modelo (Yoneda, Seidl et al., 2006).

A abordagem empregada neste trabalho inclui a análise conformacional por DM dos ribonucleosídeos em estudo (Tabela 1) para testar a hipótese de que a conformação é o fator responsável pela diferença de resposta biológica observada para estes

compostos. Caso esta hipótese seja verdadeira, será investigado se as diferenças conformacionais estão associadas a efeitos estéricos, o que pode ser analisado pela metodologia empregada na dissertação de Mestrado (Seidl et al., 2002; Yoneda, 2005; Seidl et al., 2005). Caso esta hipótese seja falsa, serão utilizadas abordagens computacionais tais como *docking*, QSAR e DM para se tentar responder a esta questão.

Deste modo, este trabalho está dividido em duas partes: estudos de estrutura-propriedade e estudos de estrutura-atividade.

### ***1.2.1.1 - Modelagem Molecular de Compostos Modelo – Estudos de Relação Estrutura-Propriedade***

Como na primeira parte deste trabalho demos continuidade ao trabalho de dissertação de Mestrado, é importante descrever aqui, de forma breve, algumas das conclusões obtidas nos trabalhos anteriores.

Numa molécula, o efeito estérico é oriundo da repulsão entre orbitais de átomos (ou grupos de átomos) que se encontram espacialmente próximos. Para minimizar este efeito, ocorre então um rearranjo geométrico, que promove uma redistribuição de cargas, que pode alterar distâncias interatômicas, comprimentos de ligação, ângulos de ligação e ângulos diedros da molécula.

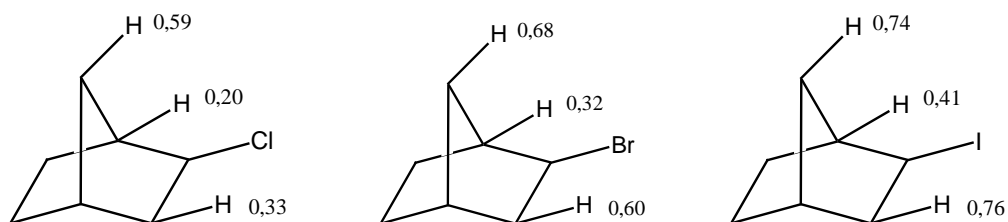
No caso da ligação C-H, como por exemplo, nos sistemas tetraciclododecanos (Seidl et al., 1998), a polarização da ligação é uma das consequências do efeito estérico, em que ocorre uma transferência de carga do átomo de hidrogênio para o átomo de carbono, aumentando o caráter s da ligação C-H, que é encurtada (“polarizada”), levando à blindagem do átomo de  $^{13}\text{C}$  e à desblindagem do átomo de  $^1\text{H}$ .

O efeito oposto corresponde à polarização inversa da ligação C-H, como por exemplo, nos sistemas 1-metil-adamantano (Seidl e Leal, 2001), onde a ligação C-H é estirada, ocorrendo a desblindagem do átomo de  $^{13}\text{C}$  e a blindagem do átomo de  $^1\text{H}$ .

A abordagem de investigar efeitos estéricos por deslocamento químico de RMN foi aplicada no trabalho de Mestrado a sistemas modelo substituídos, tais como norbornanos, adamantanos, di- e triamantanos (Yoneda, 2005), procurando correlacionar os valores obtidos experimentalmente na literatura com os valores calculados de deslocamento químico de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , comprimentos de ligação, ângulos de ligação, ângulos diedros e densidade de carga. No trabalho de Doutorado os estudos se estenderam a outros compostos modelo substituídos, tais como o bornano, cânforas e norcânforas (Yoneda, Seidl et al., 2006).

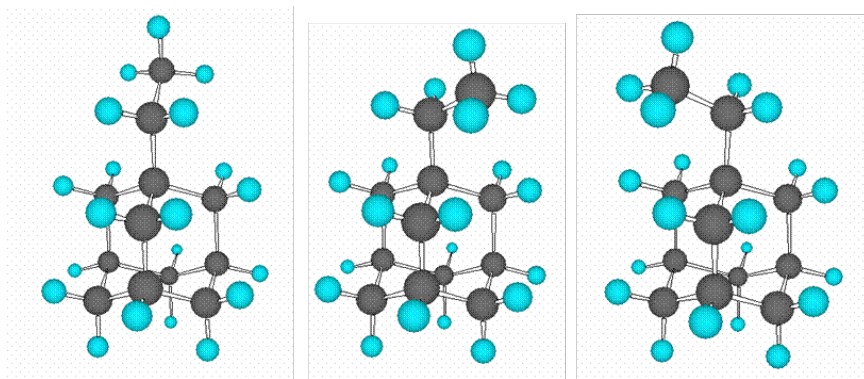
Esta metodologia nos permitiu verificar que efeitos estéricos, devido à presença de substituintes, podem ocasionar variações de deslocamento químico tanto em núcleos vizinhos quanto em núcleos relativamente distantes e que esses efeitos podem ser transmitidos através do espaço ou através de ligações.

O estudo de halogênios como substituintes na posição 2-exo do sistema norbornano (Figura 9) mostrou uma correlação entre a magnitude do efeito estérico e o raio de van der Waals do substituinte, uma vez que quanto maior o seu raio de van der Waals, maior o grau de polarização da ligação C-H e maior o grau de desblindagem dos átomos de hidrogênio espacialmente próximos ao substituinte (Seidl et al., 2005).



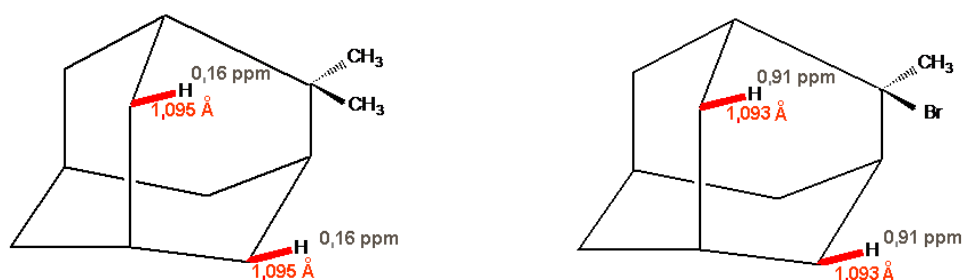
**Figura 9.** Diferenças entre os valores de deslocamento químico de RMN de  $^1\text{H}$  do norbornano substituído na posição 2-exo por Cl, Br e I respectivamente e do norbornano não substituído (Seidl et al., 2005).

O estudo do substituinte etila no sistema adamantano (Figura 10) permitiu definir a orientação espacial do substituinte, a partir dos valores calculados de comprimento de ligação, densidade de carga e deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  (Seidl et al., 2005).



**Figura 10.** Possíveis orientações espaciais para o substituinte etila no 1-etil-adamantano (Seidl et al., 2005).

Em estudo com adamantanos 2,2-dissubstituídos (Figura 11), a comparação entre os substituintes bromo e metila mostrou que a magnitude do efeito estérico do bromo é maior do que o da metila, levando à polarização mais acentuada da ligação e afetando o deslocamento químico de átomos de hidrogênio de uma forma que a metila não faz, embora dados da literatura (Carey, 2000) indiquem que o raio de van der Waals da metila é maior do que o do bromo.



**Figura 11.** Efeito estérico dos substituintes metila e bromo em adamantanos 2,2-di-substituídos (em cinza: diferença entre os valores de deslocamento químico de RMN de  $^1\text{H}$  do adamantano substituído e não substituído (ppm), em vermelho: valores de comprimento da ligação C-H, que no adamantano não substituído é de 1,098Å) (Yoneda, 2005).

A racionalização do efeito do substituinte metila em norbornanos e adamantanos permitiu compreender as variações de deslocamento químico com relação ao adamantano observadas para os di- e triamantanos (Yoneda, 2005; Yoneda et al., 2005).

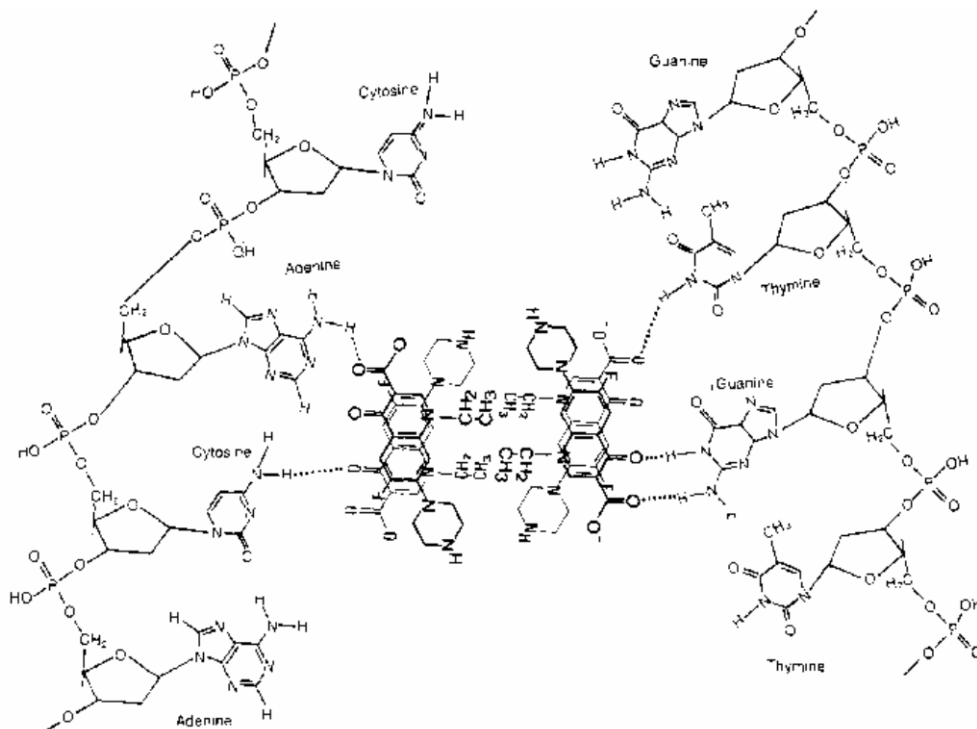
Nos sistemas estudados, de um modo geral, onde as variações observadas nos deslocamentos químicos de RMN decorrem, principalmente, de efeitos estéricos, os

deslocamentos químicos dos núcleos de  $^{13}\text{C}$  refletem principalmente mudanças na geometria, enquanto que os deslocamentos químicos dos núcleos de  $^1\text{H}$  refletem, principalmente, mudanças na distribuição de cargas, estando associadas à magnitude do efeito. Em conjunto, a variação do deslocamento químico, associada aos diferentes tipos de substituintes, reflete a extensão e a direção de interações estéricas.

### *1.2.1.2 - Modelagem Molecular de Substâncias com Atividade Antiviral – Estudos de Relação Estrutura-Atividade*

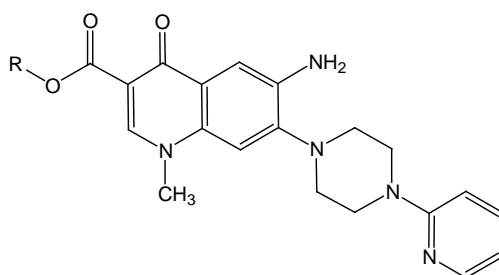
Na segunda parte do trabalho, estudamos a relação estrutura-atividade dos ribonucleosídeos com atividade anti-HSV-1 (Tabela 1), empregando metodologias computacionais que podem auxiliar na racionalização das diferenças de resposta biológica observadas. Dentre estas técnicas podemos destacar a análise conformacional, mapas de potencial eletrostático molecular, estudos qualitativos de relação estrutura-atividade (SAR), estudos quantitativos de relação estrutura-atividade (QSAR) clássicos (também denominados 1D-2D) ou em três dimensões (QSAR-3D), estudos de encaixe molecular (*docking*), etc.

A série de compostos em estudo não é adequada para estudos de QSAR clássicos ou QSAR-3D devido à ausência de dados de  $\text{IC}_{50}$  dos compostos bem como a pequena diversidade dos mesmos. Como alternativa, um banco de dados de compostos similares selecionado da literatura pode ser usado para se construir um modelo de QSAR clássico ou de QSAR-3D (Cramer et al., 1988) e em seguida aplicá-lo aos compostos alvo deste trabalho. No entanto, na literatura, existem apenas dados de quinolonas com atividade antibacteriana que atuam na DNA girase, associando-se ao DNA, de acordo com o modelo proposto por Shen e colaboradores (1989), onde a conformação do grupo  $\text{COOH}$  seria importante para interação com o DNA (Figura 12).

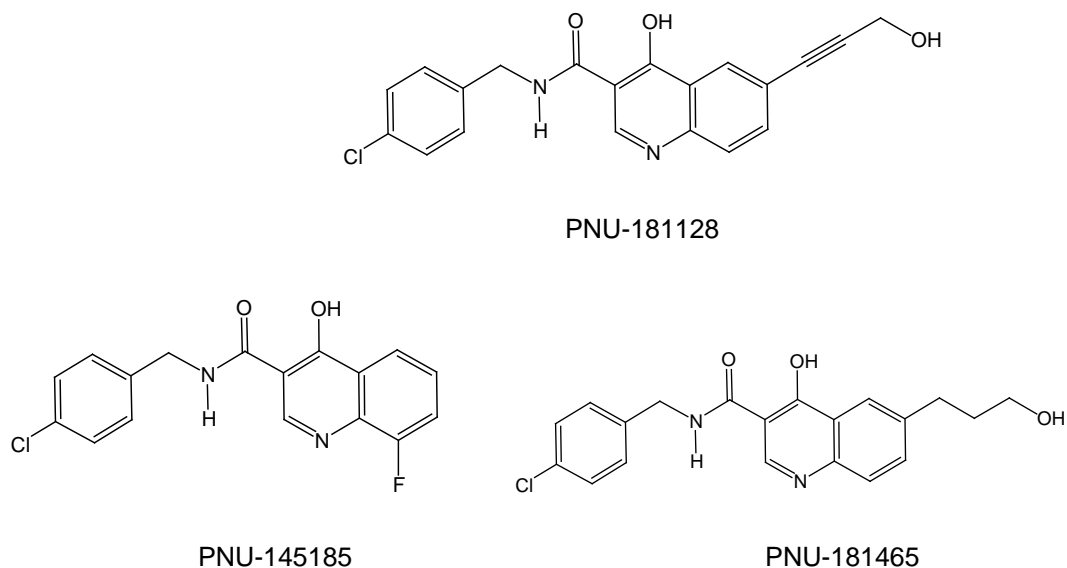


**Figura 12.** Modelo proposto por Shen e colaboradores (1989) para a auto-associação da quinolona com o DNA.

No caso de estudos de encaixe molecular (*docking*), é necessária a estrutura 3D da macromolécula alvo além da estrutura 3D dos ligantes. Verificou-se que compostos similares (Figura 13) não agem na Transcriptase Reversa, DNA integrase ou protease (Parolin et al., 2003). Como compostos contendo um anel similar à série de interesse (Figura 14) inibem a DNA polimerase do HSV-1, sem inibir polimerases humanas (Oien et al., 2002), esta enzima pode ser a macromolécula alvo da série de ribonucleosídeos.



**Figura 13.** 6-Aminoquinolonas (R=H ou C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) (Parolin et al., 2003).



**Figura 14.** 4-Hidroxiquinolino carboxamidas: PNU-181128, PNU-145185 e PNU-181465 respectivamente (Oien et al., 2002).

De fato, testes de atividade biológica do composto 6-Cl (**1c**, Tabela 1) substituído com a DNA polimerase do HSV-1 indicam cinética de inibição do tipo acompetitiva (Souza et al., 2008). Neste caso, o mecanismo de ação molecular pode ser devido à uma interação do ribonucleosídeo com o complexo DNA-enzima em concordância com o mecanismo proposto por Shen e colaboradores (1989). A questão seria em que região da enzima estaria ocorrendo tal interação. Foi feita então uma busca no *Protein Data Bank* – PDB – (Berman et al., 2000) por DNA polimerases de vírus complexadas com compostos similares aos ribonucleosídeos em estudo, mas nada foi encontrado.

Várias referências propõem regiões importantes (Gibbs et al., 1988; Haffey et al., 1990) na DNA polimerase, mas a partir de testes com um composto similar aos de interesse (PNU-183792, Figura 7) foi proposta na literatura uma interação importante com o resíduo VAL823. Esta interação justificaria a ausência de atividade do PNU-183792 com polimerases humanas, uma vez que embora este resíduo faça parte da região conservada III ele não está presente nas polimerases humanas. Testes com o vírus e a DNA polimerase viral mostraram uma correlação entre a inibição da DNA polimerase e a atividade antiviral (Thomsen et al., 2003). Logo, a inibição da DNA polimerase deve ser o



mecanismo de atividade procurado. Por isso, foi feita uma busca sem sucesso no PDB por uma estrutura que apresentasse uma região similar à região III da DNA polimerase do HSV-1 com o *primer/template* próximo, uma vez que a enzima deve colocar o DNA em posição adequada para gerar o sítio ativo e interagir com o antiviral.

Em 2006 foi publicada por Liu e colaboradores (2006) a estrutura de raios-X da DNA polimerase do HSV-1 (estrutura do PDB: 2GV9). O mecanismo proposto para a interação desta enzima com o PNU-183792 nesta referência veio de encontro ao que estávamos pressupondo. No entanto, a estrutura cristalográfica da enzima estava incompleta, e alguns dos resíduos faltosos se localizavam próximos à região de interesse (resíduo VAL823). Deste modo, foi necessário se construir por homologia as regiões com resíduos faltosos. Além disso, foi necessário se adicionar a dupla fita de DNA à enzima.

Em seguida, foram realizados estudos de *docking* de alguns dos ribonucleosídeos sob investigação e do PNU-183792 (para fins de simplificação, a partir deste ponto passaremos a chamar o PNU-183792 simplesmente de PNU) com a DNA polimerase do HSV-1 reconstruída por homologia e complexada com a dupla fita de DNA.

Os resultados do estudo de *docking* serviram como ponto de partida para simulações por DM visando-se avaliar a persistência das interações existentes entre os ligantes e o complexo DNA-polimerase do HSV-1/DNA-duplex. Combinando-se os resultados de estudos de *docking* e de simulações por DM foi possível propor novos candidatos a agentes anti-HSV-1.

# ***Justificativa e Objetivos***

---

## **2** *Justificativa e Objetivos*

---

Alguns grupos de pesquisa do Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense realizam trabalhos visando à síntese e o estudo da atividade antiviral de novos compostos candidatos a agentes anti-HSV, como, por exemplo, derivados ribonucleosídeos, contendo como unidade heterocíclica o sistema 1,4-dihidro-4-oxoquinolino (Santos, 2004; Marques, 2005; Santos, 2006; Canuto et al., 2007).

No entanto, o desenho e o desenvolvimento de novos fármacos é um processo multi-estágios e dispendioso, devendo ser planejado e controlado de maneira apropriada (Kubinyi, 1993). Desta forma, como mencionado na Introdução, a Modelagem Molecular é uma ferramenta capaz de analisar detalhes moleculares de compostos envolvidos em sistemas biológicos fornecendo subsídios para explicar a relação estrutura-atividade de moléculas candidatas à protótipos de fármacos.

O objetivo deste trabalho é não apenas o de dar continuidade ao trabalho de dissertação de Mestrado (Yoneda, 2005), estendendo-se o estudo de efeitos conformacionais, estéricos e eletrônicos por Modelagem Molecular e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) a outros compostos modelo, mas principalmente de tentar compreender por que a troca de substituintes ou da posição dos mesmos leva ou não à atividade anti-HSV-1 de ribonucleosídeos (Tabela 1), que são sintetizados por um grupo de pesquisas do Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense (Santos, 2004; Marques, 2005; Santos, 2006; Canuto et al., 2007). Isto foi feito com o uso da Química Computacional a fim de se obter racionalizações que permitissem fundamentar propostas de modificações estruturais que possam direcionar o trabalho do grupo de síntese para o planejamento de novos agentes antivirais.

# ***Metodologia***

---

## **3 Metodologia**

---

Conforme já mencionado na Introdução, utilizou-se neste trabalho as seguintes abordagens computacionais: otimização de geometrias e cálculos de deslocamentos químicos de RMN, modelagem por homologia, *docking* e DM. Estas abordagens serão detalhadas a seguir.

### **3.1 – Métodos de Química Computacional**

De maneira geral, pode-se agrupar os métodos de cálculo criados desde o advento da mecânica quântica e dos métodos computacionais em duas classificações: métodos de mecânica molecular (MM) e métodos quânticos teóricos. O método a ser utilizado deve ser escolhido considerando-se o custo computacional e a qualidade dos resultados a serem atingidos de acordo com o sistema molecular em questão.

#### **3.1.1 - Métodos de Mecânica Molecular**

Os métodos empíricos baseiam-se na mecânica clássica, onde a energia do sistema é descrita pelo somatório das contribuições das energias de ligação, angular, torsional e por interações não ligadas, onde estes valores são previamente obtidos a partir de dados experimentais ou através de cálculos para uma determinada classe de compostos.

Estes métodos consideram apenas o movimento nuclear dos átomos, uma vez que os elétrons acompanham o núcleo. Assim, os resultados deste cálculo não fornecem dados que sejam dependentes dos elétrons, tais como densidade eletrônica, potencial de ionização, momento dipolar, etc.

A vantagem dos métodos de mecânica molecular é que são rápidos computacionalmente, podendo ser empregados em cálculos de moléculas muito grandes, uma vez que um modelo estritamente mecânico é utilizado em sua formulação (Campos, 2001).

Como exemplo de métodos de MM pode-se citar o MM3 (Allinger et al., 1989), o MM4 (Allinger et al., 1996) e o AMBER (Cornell et al., 1995), cada qual com seu campo de força particular, ou seja, suas expressões analíticas que descrevem a superfície de energia potencial de uma molécula.

### ***3.1.2 - Métodos Quânticos Teóricos***

Os métodos quânticos teóricos podem ser subdivididos em mais duas classificações: métodos semi-empíricos e *ab initio*. Estes métodos levam em conta o movimento dos elétrons, considerando o núcleo fixo, e representam os orbitais moleculares como uma combinação linear de orbitais atômicos.

#### ***3.1.2.1 - Métodos Semi-empíricos***

Os métodos semi-empíricos utilizam métodos da mecânica quântica parametrizados com dados experimentais. Estes métodos consideram somente os elétrons da camada de valência, sendo os elétrons de camadas internas representados juntamente com o núcleo. Dentre os métodos semi-empíricos pode-se citar: o MNDO (Dewar et al., 1977), AM1 (Dewar et al., 1985), PM3 (Stewart et al., 1989), entre outros.

### 3.1.2.2 - Métodos *Ab initio*

Os métodos *ab initio* não utilizam parâmetros experimentais em seus cálculos. Baseiam-se exclusivamente nas leis da mecânica-quântica empregando aproximações para a resolução da equação de Schrödinger que tornam possíveis soluções aproximadas para uma grande faixa de moléculas, conforme descrito a seguir, uma vez que soluções exatas para esta equação não são possíveis mesmo para os sistemas moleculares mais simples (Leach, 2001):

- Princípio de Born-Oppenheimer: considera que o movimento dos elétrons é desacoplado do movimento do núcleo.
- *Hartree-Fock* (HF): assume que cada elétron se move num campo “fixo” compreendendo o núcleo e os outros elétrons.
- Combinação Linear de Orbitais Atômicos (LCAO): cada orbital molecular é expresso como uma combinação linear de orbitais atômicos.

Dentre os métodos *ab initio*, os mais simples se baseiam na teoria HF, que produz um modelo razoável para um grande número de sistemas moleculares. Porém, a teoria HF tem suas limitações. Elas surgem principalmente do fato de que esta teoria não inclui um tratamento completo dos efeitos da correlação eletrônica, ou seja, não leva em consideração as interações individuais entre os elétrons, já que os mesmos, em um sistema molecular, interagem entre si e tendem a permanecer afastados.

Para suprir esta limitação, alguns métodos têm sido desenvolvidos, os quais incluem alguns efeitos de correlação eletrônica. Dentre eles podemos destacar o método MP2, o qual contabiliza interações instantâneas dos pares de elétrons com spins opostos.

### 3.1.2.3 - Métodos DFT

Recentemente, uma terceira classe de métodos quânticos teóricos, o método da Teoria do Funcional de Densidade (DFT) tem sido amplamente empregado. Estes métodos são similares aos métodos *ab initio* em muitos aspectos. Os métodos DFT usam funcionais de densidade eletrônica de um sistema para a modelagem da correlação eletrônica, sendo mais rápidos, o que representa uma vantagem com relação aos métodos de correlação tradicionais, uma vez que se tem menos funções para calcular. Segundo esta teoria, todos os termos componentes de energia eletrônica, com exceção da energia de repulsão nuclear, são funções da densidade eletrônica.

O DFT enfoca a distribuição de densidade eletrônica correspondente a uma dada molécula. A energia da molécula é unicamente especificada pelo funcional de densidade eletrônica. O cálculo envolve a construção de uma expressão para a densidade eletrônica. A energia do sistema é então expressa como:

$$E = T + v_{en} + J_{ee} + v_{xc} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde T é a energia cinética,  $v_{en}$  e  $J_{ee}$  são interações Coulômbicas elétron-núcleo e elétron-elétron, respectivamente e  $v_{xc}$  são os efeitos de correlação e troca. Como na aproximação de orbitais moleculares HF, a minimização de energia deve proporcionar a descrição mais apurada do campo eletrônico. O problema matemático é definir cada um dos termos com  $v_{xc}$  sendo o mais variável. A formulação não pode ser feita exatamente, mas várias aproximações têm sido desenvolvidas e calibradas por comparação com dados experimentais. Os cálculos podem ser feitos com um tempo de computação consideravelmente menor do que o requerido para métodos de orbitais moleculares *ab initio* mais avançados (Carey e Sundberg, 2000).

Com isso, os métodos DFT, podem fornecer geometrias iguais ou melhores do que o método MP2, pois já que esta teoria necessita de menos recursos computacionais, funções de base mais sofisticadas podem ser empregadas.



### **3.1.3 - Funções de Base**

Funções de base são a representação matemática dos orbitais moleculares em uma molécula. As funções de base podem ser interpretadas como a restrição do elétron em uma região específica do espaço. Funções de base maiores impõem menores restrições ao espaço ocupado pelos elétrons, aumentando a precisão da forma dos orbitais moleculares, o que requer um tempo computacional maior.

A menor função de base é a STO, outro tipo de função é a 6-31G. O conjunto de funções de base mais comum utiliza funções de polarização ( $d,p$ ), neste caso, são adicionadas funções  $d$  para átomos pesados e  $p$  para os hidrogênios. Funções mais complexas incluem funções difusas (+ ou ++), que são versões maiores das funções  $s$  e  $p$ , ou seja, esta nova função (orbital) pode ocupar uma maior região do espaço. Quanto maior for a base, mais exata será a descrição dos orbitais, por impor um número menor de restrições na localização dos elétrons no espaço (Tormena, 2002).

O funcional B3LYP (Becke, 1993) utilizado neste trabalho é baseado nos funcionais de Becke (Becke, 1988), Lee, Yang e Parr (Lee et al., 1988). Interpreta-se a notação B3LYP/6-31G( $d,p$ ) ou 6-31G\*\* da seguinte maneira: o cálculo a ser executado terá suas bases construídas por seis bases gaussianas para os elétrons internos, e os elétrons de valência têm suas bases divididas em duas partes, uma com três bases e outra com uma base gaussiana. O termo ( $d,p$ ) diz respeito a funções de polarização, que expandem os níveis de energia dos átomos leves (hidrogênios) ao nível  $p$ , e dos átomos pesados (carbono, etc.) ao nível  $d$ .

### **3.1.4 - Cálculos de Deslocamentos Químicos de RMN**

A precisão dos cálculos de deslocamento químico por métodos DFT tem sido relatada (Kupka et al., 1999; Peralta et al., 1999; Adcock et al., 1999). A qualidade dos resultados depende da qualidade das geometrias. Portanto, as geometrias estudadas neste trabalho foram completamente otimizadas no nível B3LYP/ 6-31G(d,p).

A base 6-31G(d,p) foi escolhida para nossos trabalhos não só por se ter uma boa quantidade de trabalhos na literatura (Della et al., 2000) que a utilizam com bons resultados, mas principalmente por se tratar de uma continuidade do trabalho iniciado durante a dissertação de Mestrado (Yoneda, 2005). Foi mostrado que os cálculos funcionam bem quando se trabalha com diferenças de deslocamentos químicos ao invés de seus valores absolutos, eliminando-se assim erros sistemáticos (Topic e Pejov, 2001). Estas diferenças são objeto de interesse neste trabalho.

A base utilizada não possui parâmetros para o iodo. Logo, as geometrias das estruturas com substituintes halogênios também foram otimizadas pelo método MM2 (Burket e Allinger, 1982) do programa *Chem 3D*.

Os cálculos DFT foram realizados com o programa *Gaussian 98* (Frisch et al., 1998). Os tensores de blindagem magnética isotrópica foram calculados a partir das geometrias otimizadas utilizando-se o método *Gauge Independent Atomic Orbital* (GIAO) (Ditchfield, 1974; Wolinski et al., 1990) com a base B3LYP/6-31G(d,p). Os valores de deslocamento químico de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  foram obtidos com relação à blindagem isotrópica do Tetrametilsilano (TMS), calculada no mesmo nível. No entanto, embora o método GIAO venha sendo aplicado com sucesso no cálculo de deslocamentos químicos de núcleos mais pesados como o  $^{13}\text{C}$ , este não é o caso do  $^1\text{H}$  (Helgaker et al., 1999). O problema reside no fato de que as diferenças de deslocamentos químicos quando se trata do núcleo de  $^1\text{H}$  são muito pequenas. Como exemplo pode-se citar o fato de que os deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  são praticamente os mesmos quando ligados aos

carbonos secundários e terciários do adamantano não substituído (Tabela 2). Assim sendo, para fins de comparação com os resultados do método DFT, os deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  também foram calculados dos dados estruturais otimizados usando-se a versão 6A do programa *CHARGE* (Abraham e Ainger, 1999), que diferenciou bem os hidrogênios em questão (Tabela 2), mostrando um notável progresso com suas sucessivas versões.

**Tabela 2.** Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  experimentais (Topic e Pejov, 2001) e calculados pelo programa *CHARGE* para hidrogênios do adamantano.

Adamantano					
	Experimental	CHARGE 3A	CHARGE 4A	CHARGE 6A	DFT B3LYP/6-31G(d,p)
<b>CH</b>	1,87	2,07	1,98	1,95	1,80
<b>CH<sub>2</sub></b>	1,75	1,20	1,35	1,70	1,79

### 3.2 - Modelagem por Homologia

Embora a base de dados das estruturas resolvidas de proteínas no PDB esteja crescendo exponencialmente nos últimos anos, devido aos crescentes avanços alcançados pelas técnicas de determinação estrutural, ainda não existem dados estruturais para boa parte das proteínas eleitas como alvos terapêuticos atrativos (Nayeem et al., 2006).

Nos casos em que a elucidação estrutural do alvo terapêutico não é possível ou ainda não foi determinada, modelos virtuais de proteínas podem ser elaborados por comparação da similaridade de sua seqüência primária de aminoácidos com as seqüências de proteínas homólogas com estruturas resolvidas e depositadas no PDB. Este procedimento comparativo para a construção de modelos estruturais é conhecido como Modelagem Molecular por homologia estrutural ou modelagem comparativa (Silva e Silva, 2007).

No processo de Modelagem Molecular por homologia estrutural são utilizadas estruturas de proteínas determinadas experimentalmente para se predizer a conformação de outra proteína que apresenta uma seqüência de aminoácidos similar (Hillisch et al., 2004).

A estratégia de modelagem por homologia baseia-se no conhecimento de que a conformação estrutural de uma proteína é mais conservada que sua seqüência de aminoácidos durante o processo evolutivo, e que pequenas mudanças na seqüência, em geral, resultam em sutis modificações na estrutura tridimensional (Nayeem et al., 2006).

O processo de obtenção de um modelo proteico virtual através da execução da estratégia da Modelagem Molecular por homologia estrutural envolve quatro etapas principais: busca de proteínas homólogas, alinhamento das seqüências, construção e otimização dos modelos, e a validação dos mesmos (Hillisch et al., 2004).

Para se construir a estrutura tridimensional dos resíduos faltosos da estrutura 2GV9, utilizou-se o programa *Swiss Model* (Arnold et al., 2006). O *Swiss Model* integra programas e banco de dados requeridos para modelagem por homologia. Ele permite ao usuário contruir modelos comparativos de proteínas a partir de conexão com a internet sem necessidade de baixar ou instalar grandes pacotes de programas e bancos de dados.

Inicialmente foi feita uma busca por proteínas homólogas à DNA polimerase do HSV-1 no programa *Swiss Model*. Foram selecionadas as estruturas homólogas de DNA polimerases do PDB 2GV9, 1QHT, 1Q8I e 1D5A. Estas estruturas foram utilizadas como moldes para a modelagem por homologia no modo projeto do programa *Swiss Model*. O arquivo de entrada para o modo projeto contém estruturas molde superpostas e o alinhamento entre a proteína-problema e as proteínas-molde. Este arquivo é gerado no programa *Swiss-Pdb Viewer* (Guex e Peitsch, 1997), que permite gerar, visualizar, analisar e manipular projetos de modelagem para submeter ao programa *Swiss Model*.

Embora a sobreposição da estrutura obtida por homologia com a DNA polimerase do HSV-1 tenha levado a um RMS de 2,68 Å, os resíduos importantes para as interações propostas pelo modelo de Liu e colaboradores (2006) saíram completamente de sua posição original. Como alternativa, tentou-se utilizar o modo automático do programa *Swiss Model*. O modo automático foi desenvolvido para casos onde a similaridade proteína-problema/proteína-molde é suficientemente alta para permitir uma modelagem totalmente automatizada. A submissão no modo automático requer apenas a seqüência primária de aminoácidos da proteína-problema como dado de entrada e o programa seleciona automaticamente os moldes adequados (Arnold et al., 2006) – no caso a própria estrutura da DNA polimerase do HSV-1 foi selecionada (2GV9), e optou-se pela utilização da cadeia B uma vez que esta possui menos resíduos faltosos do que a cadeia A.

Com o modo automático obteve-se a estrutura que foi utilizada neste trabalho conforme descrito na seção de Resultados e Discussão.

### **3.3 - Docking**

O *Docking* ou ancoramento molecular é um processo computacional de busca por um ligante capaz de se “encaixar” geométrica e energeticamente ao sítio ativo de uma proteína.

A obtenção de uma descrição acurada e automatizada do processo de reconhecimento molecular receptor-ligante, utilizando metodologias computacionais, é motivada pela possibilidade de redução do tempo e dos altos custos envolvidos no desenvolvimento de novos medicamentos (Morgon e Coutinho, 2007). O *docking* pode ser feito por ajuste manual (*docking* manual), onde o composto é posicionado no sítio de interação de acordo com modelos comparativos de outros compostos análogos, ou de modo automático (*docking* automático), onde o composto é posicionado por *softwares*

que utilizam algoritmos de busca para achar as orientações mais estáveis (de menor energia).

Para se realizar os estudos de *docking* foi necessário construir o complexo proteína/DNA. Este foi construído no programa *Swiss-Pdb Viewer* (Guex e Peitsch, 1997) por sobreposição das estruturas do PDB 2GV9 (reconstruída por homologia) e 1b1f (modelo teórico de DNA polimerase).

Vale comentar que tentou-se utilizar os programas *FlexX* (Tripos Inc.) e *Molegro Virtual Docker* (Thomsen et al., 2006) para se realizar os estudos de *docking*. No entanto, o programa *FlexX* não reconheceu o DNA, sobrepondo o ligante a átomos do mesmo, e o *Molegro* não conseguiu gerar uma estrutura para o PNU que estivesse com a conformação parecida com a do modelo proposto por Liu e colaboradores (2006). Utilizou-se então o programa *Surflex-Dock* (Jain, 2003), que em um estudo comparativo de oito programas de *docking* foi um dos que apresentou melhor desempenho (Kellenberger et al., 2004).

O *Surflex-Dock* considera que a enzima é rígida e que o ligante possui flexibilidade conformacional. O programa lista 20 ligantes de acordo com uma função de pontuação que inclui os termos hidrofóbico, polar, repulsivo, de entropia e de solvatação para o complexo proteína-ligante.

O *Surflex-Dock* utiliza um sítio ativo idealizado para o ligante (chamado de *protomol*) como um alvo para gerar prováveis poses de moléculas ou fragmentos moleculares. Existem duas maneiras de se gerar o *protomol*: o modo baseado no ligante (onde o programa gera o sítio ativo com base na estrutura de um ligante em um complexo de partida proteína-ligante) e o modo baseado em resíduos (onde se informa ao programa quais são os resíduos do sítio ativo). Caso não se tenha idéia de onde o sítio ativo está localizado há ainda o modo automático, em que o programa busca uma cavidade na proteína para se gerar o *protomol*.

Uma vez fornecida ao programa a estrutura da proteína com os hidrogênios e escolhida a maneira de se gerar o sítio ativo, será gerado um arquivo *protomol* que servirá como alvo para o ligante ser alinhado com base em similaridade molecular. Três tipos de fragmentos moleculares (CH<sub>4</sub>, C=O e N-H) são colocados dentro do sítio ativo em posições múltiplas e são otimizados para interação com a proteína. Fragmentos combinados de alta pontuação formam o *protomol*.

Os ligantes são então encaixados dentro da proteína para otimizar o valor da função de pontuação gerando-se conformações otimizadas dos ligantes junto com suas pontuações correspondentes.

Nesta etapa o ligante de entrada é fragmentado resultando em 1-10 fragmentos moleculares. Para cada fragmento é feita uma busca conformacional e a conformação de cada fragmento é alinhada com o *protomol* para levar a poses que maximizem a similaridade molecular ao *protomol*. Os fragmentos alinhados são pontuados e selecionados com base na função de pontuação e no grau de interpenetração na proteína.

A função de pontuação fornece os resultados em unidades de  $-\log(K_d)^2$ . Os termos da função em ordem de significância são a complementariedade hidrofóbica, a complementariedade polar, termos entrópicos e termos de solvatação.

Neste trabalho o estudo de *docking* foi feito com o modo baseado em resíduos, pois este foi o que forneceu melhores resultados conforme detalhado na seção de Resultados e Discussão.

Antes de se realizar o *docking*, as estruturas do PNU e dos ribonucleosídeos 6-Cl substituídos (**1c**) nas formas *syn* e *anti* foram otimizadas no programa *Gaussian 98* e no mesmo programa foram calculadas as cargas com o método *ChelpG* (Breneman e Wiberg, 1990) para cada conformação otimizada. Das vinte estruturas geradas pelo *docking* selecionou-se para o PNU aquela de conformação mais parecida com a proposta no modelo de Liu e colaboradores (2006) e para o ribonucleosídeo a estrutura que

apresentou o átomo de cloro mais próximo a VAL823. Cada estrutura selecionada foi otimizada dentro do sítio ativo da proteína no próprio *Surflex-dock*, e os complexos proteína-ligante serviram como ponto de partida para estudos de simulação por DM.

### **3.4 - Dinâmica Molecular**

A mecânica clássica é um método adequado para descrever a maioria das propriedades de sistemas de interesse biológico, e o método de simulações por DM é a abordagem teórica mais adequada para estes estudos (Karplus, 2002).

Neste método, partículas interagentes, inicialmente dispostas em uma determinada configuração, movimentam-se sob a influência de potenciais intermoleculares. Conhecendo posições e velocidades de todas as partículas em um dado instante  $t_0$ , pode-se computar as forças resultantes em cada partícula devido às interações com as demais e então determinar posições e velocidades em um instante posterior  $t_0 + \delta t$ . As novas posições são utilizadas para o cômputo de novas forças e daí posições e velocidades em  $t_0 + 2\delta t$ . Este procedimento é realizado recursivamente gerando trajetórias moleculares para todo o sistema (Morgon e Coutinho, 2007).

A trajetória é obtida resolvendo-se as equações diferenciais incorporadas na segunda lei de Newton (Equação 2):

$$\vec{F}_i = m_i \frac{\partial^2 \vec{r}_i}{\partial t^2} = - \frac{\partial U(r^N)}{\partial r_i} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde  $F_i$  corresponde à força aplicada na partícula  $i$ , causada pelas  $N-1$  demais partículas do sistema,  $m_i$  corresponde à sua massa e a segunda derivada parcial de sua posição  $r_i$  em relação ao tempo corresponde à aceleração.  $U(r^N)$  é a função de energia potencial do sistema cuja derivada parcial em relação à posição  $r_i$  é a força aplicada resultante na partícula  $i$  (Oliveira, 2005).



$U(r^N)$  normalmente é descrita como um somatório de termos ligados e não-ligados (Equação 3):

$$U(r^N) = U_{\text{ligação}} + U_{\text{ângulo}} + U_{\text{diedro}} + U_{\text{vdw}} + U_{\text{elet}} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde  $U_{\text{ligação}}$ ,  $U_{\text{ângulo}}$  e  $U_{\text{diedro}}$ , correspondem às funções de energia potencial de deformação axial de ligação, deformação angular e de rotação torcional (interações ligadas), enquanto que  $U_{\text{vdw}}$  e  $U_{\text{elet}}$  correspondem às funções de energia potencial de van der Waals e eletrostática (interações não-ligadas).

Os termos não-ligados  $U_{\text{vdw}}$  e  $U_{\text{elet}}$  são representados tipicamente por interações de Lennard-Jones e de Coulomb, respectivamente, como nas Equações 4 e 5.

$$U_{\text{vdw}} = 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (\text{Equação 4})$$

$$U_{\text{elet}} = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r_{ij}} \quad (\text{Equação 5})$$

Na Equação 4,  $\epsilon_{ij}$  corresponde a profundidade do potencial entre a barreira atrativa e a repulsiva,  $\sigma_{ij}$  é a distância finita na qual o potencial interpartícula é zero e  $r_{ij}$  é a distância interatômica. Na Equação 5,  $q_i$  e  $q_j$  correspondem às cargas parciais atômicas dos átomos  $i$  e  $j$ ,  $\epsilon_0$  e  $\epsilon_r$  correspondem a permissividade elétrica no vácuo e a constante dielétrica do meio respectivamente, e  $r_{ij}$  é a distância entre os átomos  $i$  e  $j$  (Namba et al., 2008).

Nas simulações é necessário um período para se atingir o equilíbrio e relaxar o sistema, e um de coleta de dados.

As simulações por DM ajudam na compreensão dos processos bioquímicos e dão uma dimensão dinâmica aos dados estruturais. Por causa disto, tornaram-se a ferramenta chave para a investigação de biomoléculas. Com este método podemos partir de estruturas obtidas experimentalmente ou de modelos e simular o comportamento das

proteínas em solução através de cálculos computacionais. Desta forma é possível monitorar, em escala atômica, mudanças conformacionais da molécula que estejam associadas a sua atividade biológica na escala de nanossegundos, permitindo-se melhorar resultados de estudos de *docking*, monitorar a estabilidade de ligações hidrogênio e etc.

### ***3.4.1 – Dinâmica Molecular dos Ribonucleosídeos***

Inicialmente as simulações por DM foram feitas para o ribonucleosídeo 7-OMe substituído (**1j**), pois para este composto tinha-se dados de raios-X (Leal et al., 2005).

As estruturas dos confôrmeros *syn* e *anti* do ribonucleosídeo 7-OMe substituído foram obtidas pelo método DFT disponível no programa *Gaussian 98* (Frisch et al., 1998), após uma análise conformacional feita com o método AM1. As geometrias foram otimizadas utilizando-se o funcional de densidade B3LYP com base 6-31G(d,p). As cargas foram calculadas por ajuste ao potencial eletrostático para uma grade de pontos selecionados de acordo com o esquema *ChelpG* (Breneman e Wiberg, 1990). Os arquivos de topologia e de coordenadas para ambos os confôrmeros foram criados com o programa *LEaP* do programa *AMBER 7* (Case et al., 2002), e eles representam as estruturas iniciais usadas como arquivo de entrada nas simulações por DM.

Com o intuito de simular o comportamento do ribonucleosídeo 7-OMe substituído em solução aquosa, cada confôrmero foi colocado em uma caixa d'água. Como moléculas do solvente presentes nas extremidades da caixa passariam a interagir com um número menor de átomos do que aqueles do centro da caixa utilizou-se Condições Periódicas de Contorno (CPC), que consistem em se criar imagens transladadas do sistema ao redor do mesmo, produzindo um sistema pseudo-infinito. Assim, quando um átomo se move na caixa central, suas imagens periódicas em cada uma das caixas vizinhas se movem exatamente da mesma forma, e se uma molécula deixa a caixa

central, uma de suas imagens periódicas irá entrar pela face oposta. O modelo TIP3P foi utilizado para a água (Jorgensen, 1981) e o tamanho da caixa foi de 34,9Å x 30,5Å x 31,3Å para o confômero *syn* e 34,2Å x 32,2Å x 29,3Å para o *anti*.

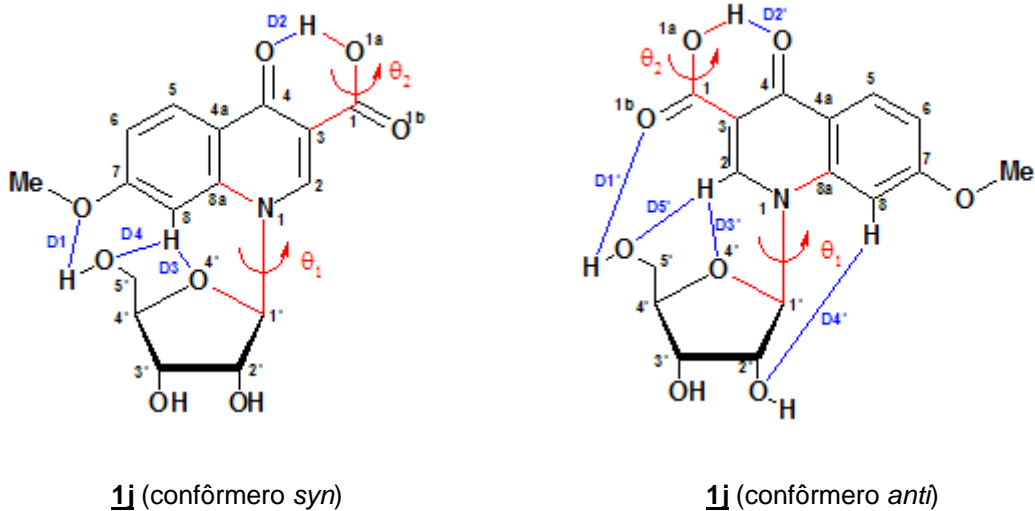
Um corte de 9Å de distância ao longo dos três eixos foi aplicado a fim de se descartar alguma molécula de água que estivesse mais longe do que este valor de algum átomo do soluto, e o número total de moléculas de água na caixa para os confômeros *syn* e *anti* foi de 694 e 643, respectivamente.

Os cálculos de DM e MM foram feitos com o programa *AMBER 7* (Case et al., 2002). Uma distância de corte de 9Å foi utilizada para interações de Lennard-Jones e interações eletrostáticas de longa distância na caixa d'água foram calculadas utilizando-se o protocolo Particle Mesh Ewald (Darden et al., 1993), que avalia as interações de uma partícula com todas as outras contidas na caixa central bem como com todas as caixas periódicas replicadas.

As simulações por DM foram iniciadas com uma minimização de todo o sistema seguida de 20 ps de equilibrção. O sistema solvatado foi equilibrado por 10 ps a volume constante e 30 ps a pressão constante a fim de se levar a densidade do sistema a um valor próximo de 0,99 g/cm<sup>3</sup>.

Inicialmente, as simulações por DM foram feitas no vácuo e na água a 300 K e 600 K durante 1 ns, porém este tempo de simulação não foi suficiente para produzir variações de interesse na conformação da estrutura. Deste modo, as simulações por DM foram estendidas a 10 ns em ambas as temperaturas. Todas as ligações covalentes envolvendo átomos de hidrogênio foram mantidas rígidas utilizando-se o algoritmo *SHAKE* (Rickaert et al., 1977). As coordenadas atômicas foram salvas a cada 0,2 ps durante a simulação. A análise das simulações por DM foi feita com o programa *PTRAJ* (Case et al., 2002), e o programa *Rasmol* foi utilizado para visualização das estruturas (Sayle e Milner-White, 1995).

A fim de se acessar a conformação preferencial e as interações intramoleculares (tais como ligações hidrogênio) durante a simulação, monitorou-se os ângulos de torção  $\theta_1$  (O4'-C1'-N1-C8a) e  $\theta_2$  (H-O1a-C1-C3), e as distâncias interatômicas D1-D4 (confômero *syn*) e D1'-D5' (confômero *anti*) (Figura 15).



**Figura 15.** Representação esquemática dos confômeros *syn* e *anti* do ácido 7-metóxi-1,4-dihidro-4-oxo-1-( $\beta$ -D-ribofuranosil)quinolino-3-carboxílico (**1j**) e a numeração IUPAC dos átomos, destacando os ângulos de torção (em vermelho)  $\theta_1$  (O4'-C1'-N1-C8a) e  $\theta_2$  (H-O1a-C1-C3) e as distâncias interatômicas (em azul) monitoradas durante as simuações por DM.

Em seguida, o procedimento realizado para o ribonucleosídeo 7-OMe substituído a 300K no vácuo e na água foi aplicado para os demais ribonucleosídeos em estudo durante 3 ns em água e para a conformação inicial *anti* no vácuo. No caso da conformação inicial *syn* no vácuo as simulações foram feitas por 10 ns, uma vez que neste caso alguns ribonucleosídeos foram para a forma *anti* e outros não.

### 3.4.2 – Dinâmica Molecular dos Complexos Ligante / DNA Polimerase / DNA

As estruturas de entrada para as simulações por DM dos complexos PNU/DNA polimerase/DNA e ribonucleosídeo 6-Cl substituído/DNA polimerase/DNA foram aquelas obtidas pelos estudos de *docking* conforme descrito na seção 3.3. Cada ligante selecionado foi re-submetido ao cálculo de cargas de acordo com o esquema *ChelpG* no programa *Gaussian 98*.

Os arquivos de topologia e de coordenadas para os complexos foram criados com o programa *LEaP* do programa *AMBER 9* (Case et al., 2006). O sistema obtido ficou muito grande, contendo 1159 resíduos e 37970 moléculas de água, o que exigiria um enorme tempo de simulação. Desta forma, foi necessário se fazer um corte na enzima. Selecionou-se átomos que se encontravam a até 15Å de distância do PNU, e os que não se encontravam dentro desta faixa foram excluídos. Dos átomos selecionados, tomou-se os resíduos que se encontravam a até 8Å do PNU para que pudessem se movimentar e os demais tiveram suas posições fixadas com uma constante de força de 100 kcal/mol.Å<sup>2</sup>. O sistema foi neutralizado com átomos de sódio e a simulação foi feita no vácuo à 300K durante 8 ns.

Os cálculos de DM e MM foram feitos com o programa *AMBER 9* (Case et al., 2006). Uma distância de corte de 9Å foi utilizada para interações de Lennard-Jones e as coordenadas atômicas foram salvas a cada 2 ps durante a simulação

As simulações por DM foram iniciadas com uma minimização de todo o sistema seguida de 10 ps de aquecimento a 300K e 20 ps de equilíbrio.

As ligações covalentes envolvendo átomos de hidrogênio foram mantidas rígidas utilizando-se o algoritmo *SHAKE* (Rickaert et al., 1977). O programa *WebLab ViewerLite* (Accelrys Software Inc.) foi utilizado para visualização das estruturas.

A fim de se acessar as interações intermoleculares durante a simulação, foram tomados pontos aleatórios da trajetória e estes foram submetidos ao programa *LPC* (Sobolev et al., 1999). Este programa permite analisar contatos entre ligantes e proteínas e é disponível gratuitamente na internet no endereço <http://ligin.weizmann.ac.il/cgi-bin/lpccsu/LpcCsu.cgi>. Para cada ligante o programa determina os resíduos em contato com ele, e o tipo de interação existente. Selecionadas as interações existentes, elas foram analisadas com o programa *PTRAJ* (Case et al., 2006).

# ***Resultados e Discussão***

---

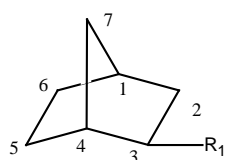
## 4 Resultados e Discussão

---

### 4.1 - Modelagem Molecular de Compostos Modelo – Estudos de Relação Estrutura-Propriedade

Nesta seção investigou-se os efeitos estéricos decorrentes da introdução de substituintes analisando-se deslocamentos químicos de RMN e dados estruturais obtidos de geometrias otimizadas em compostos modelo dando continuidade ao trabalho de dissertação de Mestrado (Seidl et al., 2002; Seidl et al., 2005; Yoneda, 2005).

Nossos trabalhos sobre adamantanos mono- e di-substituídos mostrou que efeitos de substituintes nos deslocamentos químicos de RMN podem ser traçados por mudanças na geometria molecular e distribuição de cargas (Seidl et al., 2002; Seidl et al., 2005; Yoneda, 2005). Seria desejável testar um critério similar para a análise de efeitos estéricos em outros sistemas a fim de se avaliar a generalidade do nosso trabalho em adamantanos substituídos, uma vez que a magnitude destes efeitos segue o raio de van der Waals do átomo halogênio (Seidl et al., 2005) e logo, pode ser diretamente relacionada a seu “volume”. Uma boa escolha seria o sistema norbornano, que consiste em um anel rígido de átomos de carbono, que é distorcido pela introdução de substituintes em diferentes posições. No entanto, como já foi mostrado (Abraham, 1999), embora muitos compostos modelo interessantes sejam conhecidos, a informação sobre seus deslocamentos químicos de hidrogênio é escassa, como no caso dos sistemas norbornanos 2-*exo* (Figura 16) e *endo* halo-substituídos. Neste contexto, a publicação de dados de deslocamentos químicos de hidrogênio dos derivados substituídos 3-*endo* e *exo* norcânfora (ou norbornanonas) (Gauze et al., 2006) proporciona uma boa oportunidade para se verificar a aplicabilidade de nossos resultados a outros sistemas.



	$R_1$
<b>2</b>	H
<b>3</b>	Cl
<b>4</b>	Br
<b>5</b>	I

**Figura 16.** Norbornanos substituídos.

A mesma abordagem que temos utilizado (Seidl et al., 2005) foi aplicada neste trabalho a estrutura de novos compostos de interesse: deslocamentos químicos experimentais foram usados para determinar efeitos de substituintes, e foram usados como provas para mudanças nas respectivas geometrias.

A magnitude dos efeitos de substituintes nos sistemas norbornano pode ser também relacionada ao volume dos substituintes halogênicos. Porém, ao invés da polarização de ligação observada para os compostos adamantano, os efeitos de substituintes são principalmente refletidos por distorções em ligações e ângulos diedros.

### 5.1.1 - Halonorbornanos

Efeitos de substituintes nos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  para os exo-halonorbornanos (Figura 16, compostos 2-5, o esquema de numeração é o mesmo que o correspondente a 2-cetonas para facilitar comparações) são dados na Tabela 3, indicando que o maior efeito de substituintes que pode ser associado a interações estéricas com halogênios são observadas para  $\text{H}_{2x}$ ,  $\text{H}_{2n}$ ,  $\text{H}_{3n}$ ,  $\text{H}_4$  e  $\text{H}_{7s}$ . Elas devem corresponder a átomos de hidrogênios espacialmente mais próximos ao substituinte (ou no caso de  $\text{H}_{2n}$ , ser afetado por interações do substituinte com  $\text{H}_{2x}$ ) e ser responsáveis pelas maiores variações nos comprimentos de ligação e ângulos (como a eletronegatividade dos respectivos halogênios segue a ordem inversa da desblindagem que seria esperada por efeitos eletrônicos, os efeitos observados seriam principalmente



de natureza estérica). As respectivas ligações C-H são encurtadas (Tabela 4) levando a desblindagem do núcleo de hidrogênio correspondente. O grau de desblindagem e de compressão de ligação pode ser relacionado ao raio de van der Waals do substituinte halogênio, assim como observado para o sistema adamantano (Seidl et al., 2005).

**Tabela 3.** Efeitos de substituintes nos deslocamentos químicos (ppm) de  $^1\text{H}$  para 3-halonorbornanos (Gauze et al., 2006).

	3	4	5
H <sub>1</sub>	0,12	0,12	0,06
H <sub>2n</sub>	0,75	0,87	0,97
H <sub>2x</sub>	0,33	0,60	0,76
H <sub>3n</sub>	2,71	2,83	2,82
H <sub>3x</sub>	---	---	---
H <sub>4</sub>	0,20	0,32	0,41
H <sub>5n</sub>	-0,02	0,02	0,07
H <sub>5x</sub>	0,14	0,17	0,10
H <sub>6n</sub>	-0,09	-0,08	-0,06
H <sub>6x</sub>	0,00	0,01	0,02
H <sub>7a</sub>	0,06	0,11	0,17
H <sub>7s</sub>	0,59	0,68	0,74

**Tabela 4.** Comprimentos de ligação (Å) para 3-halonorbornanos calculados pelo programa *Gaussian 98*.

	2	3	4
C <sub>1</sub> -C <sub>2</sub>	1,547	1,548	1,549
C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	1,547	1,546	1,546
C <sub>1</sub> -C <sub>7</sub>	1,545	1,545	1,545
C <sub>3</sub> -C <sub>2</sub>	1,564	1,556	1,554
C <sub>4</sub> -C <sub>3</sub>	1,547	1,540	1,537
C <sub>4</sub> -C <sub>5</sub>	1,548	1,552	1,553
C <sub>4</sub> -C <sub>7</sub>	1,545	1,544	1,544
C <sub>5</sub> -C <sub>6</sub>	1,565	1,564	1,563
C <sub>1</sub> -H <sub>1</sub>	1,094	1,093	1,093
C <sub>2</sub> -H <sub>2n</sub>	1,095	1,095	1,095
C <sub>2</sub> -H <sub>2x</sub>	1,095	1,093	1,092
C <sub>3</sub> -H <sub>3n</sub>	1,095	1,090	1,089
C <sub>3</sub> -H <sub>3x</sub>	1,095	---	---
C <sub>4</sub> -H <sub>4</sub>	1,094	1,091	1,091
C <sub>5</sub> -H <sub>5n</sub>	1,095	1,095	1,095
C <sub>5</sub> -H <sub>5x</sub>	1,095	1,094	1,095
C <sub>6</sub> -H <sub>6n</sub>	1,095	1,095	1,095
C <sub>6</sub> -H <sub>6x</sub>	1,095	1,095	1,095
C <sub>7</sub> -H <sub>7s</sub>	1,096	1,094	1,094
C <sub>7</sub> -H <sub>7a</sub>	1,096	1,095	1,095

Há uma diferença notável entre as estruturas dos sistemas norbornano e adamantano. Efeitos secundários, bem como torções ao redor das ligações  $C_{\alpha}$ - $C_{\beta}$  e mudanças em ângulos de ligação que também foram observadas para sistemas adamantano (Seidl et al., 2005) e levaram a distorções em sua geometria, são muito mais significativos nos sistemas norbornano. Ângulos diedros selecionados para 2-5 são dados na Tabela 5. O maior volume do iodo com relação aos outros substituintes é refletido muito mais pelo ângulo diedro do que pelo grau de polarização de ligação de  $C_3$ - $H_{3n}$ . Distâncias internucleares são dadas na Tabela 6.

**Tabela 5.** Ângulos diedros (graus) selecionados para 3-halonorbornanos calculados pelo método MM2.

	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>R-C3-C2-H2x</b>	-1,0	-2,0	-3,0	-6,0

**Tabela 6.** Distâncias internucleares e C-R (Å) para 3-halonorbornanos calculadas pelo método MM2.

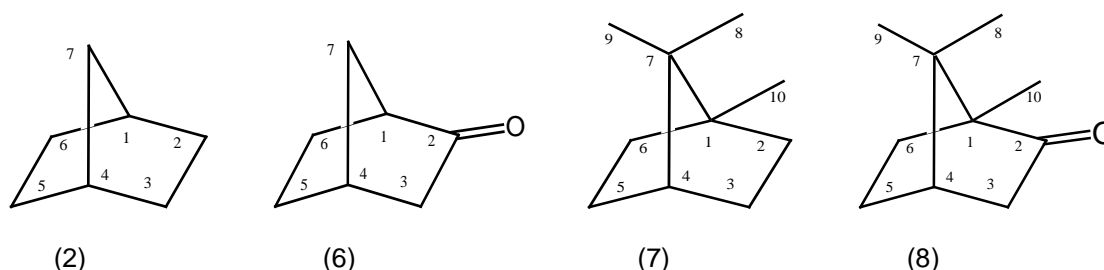
	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>R...H<sub>1</sub></b>	4,54	4,67	4,90
<b>R...H<sub>2x</sub></b>	2,71	2,82	2,96
<b>R...H<sub>2n</sub></b>	3,53	3,67	3,82
<b>R...H<sub>3n</sub></b>	2,36	2,50	2,67
<b>R...H<sub>4</sub></b>	2,88	2,99	3,11
<b>R...H<sub>5x</sub></b>	4,91	5,06	5,24
<b>R...H<sub>5n</sub></b>	4,32	4,48	4,65
<b>R...H<sub>6x</sub></b>	5,56	5,72	5,93
<b>R...H<sub>6n</sub></b>	5,08	5,24	5,43
<b>R...H<sub>7a</sub></b>	4,31	4,43	4,65
<b>R...H<sub>7s</sub></b>	2,95	3,05	3,26
<b>C-R</b>	1,81	1,97	2,16

Hidrogênios que estão envolvidos em interações estéricas com os substituintes halogênicos se encontram a cerca de 3,0 Å de distância do cloro, 3,1 Å do bromo e 3,3 Å do iodo, tomando-se seus respectivos núcleos como referência como no caso dos haloadamantanos (Seidl et al., 2005). Enquanto todas as distâncias internucleares

seguem a ordem dos respectivos raios de van der Waals do substituinte, os dados nas Tabelas 3, 4 e 5 indicam que distorções na estrutura molecular não são uniformes.

#### 4.1.2 - Norbornano, Norcânfora, Bornano e Cânfora

Os aspectos estruturais do norbornano (2), norcânfora (6), bornano (7) e cânfora (8) (Figura 17) são comparados com o intuito de se avaliar os efeitos dos grupos carbonila e metila em seus respectivos deslocamentos químicos de hidrogênio (Tabela 7). Das comparações de deslocamentos químicos da norcânfora e do norbornano bem como da cânfora e do bornano (Tabela 7) fica claro que os hidrogênios são desblindados na mesma extensão pela carbonila. Uma vez que contribuições estéricas e anisotrópicas para os deslocamentos químicos de hidrogênio nos derivados do norbornano, bornano e cânfora têm sido investigadas (Abraham, 1999) e uma abordagem similar foi recentemente aplicada a norcânfora (Gauze et al., 2006), a presente análise se limita a seus componentes estéricos. Estes podem ser localizados por comparações de deslocamentos químicos entre o bornano e o norbornano bem como entre a cânfora e a norcânfora (Tabela 7) e subseqüentes mudanças nos comprimentos de ligação dados na Tabela 8.



**Figura 17.** Norbornano, norcânfora, bornano e cânfora respectivamente.

**Tabela 7.** Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  (ppm) para o norbornano, norcânfora, bornano e cânfora (Abraham, 1999).

	Norbornano (2)	Norcânfora (6)		Bornano (7)	Cânfora (8)
$\text{H}_1$	2,19	2,60	$\text{H}_1$	---	---
$\text{H}_{2x}$	1,47	---	$\text{H}_{2x}$	1,49	---
$\text{H}_{2n}$	1,16	---	$\text{H}_{2n}$	1,23	---
$\text{H}_{3x}$	1,47	2,06	$\text{H}_{3x}$	1,71	2,35
$\text{H}_{3n}$	1,16	1,84	$\text{H}_{3n}$	1,13	1,84
$\text{H}_4$	2,19	2,67	$\text{H}_4$	1,60	2,09
$\text{H}_{5x}$	1,47	1,79	$\text{H}_{5x}$	1,71	1,95
$\text{H}_{5n}$	1,16	1,45	$\text{H}_{5n}$	1,13	1,34
$\text{H}_{6x}$	1,47	1,81	$\text{H}_{6x}$	1,49	1,68
$\text{H}_{6n}$	1,16	1,53	$\text{H}_{6n}$	1,23	1,40
$\text{H}_{7s}$	1,18	1,73	$\text{H}_8$	0,83	0,84
$\text{H}_{7a}$	1,18	1,56	$\text{H}_9$	0,83	0,96
			$\text{H}_{10}$	0,83	0,92

**Tabela 8.** Comprimentos de ligação (Å) do norbornano, norcânfora, bornano e cânfora calculados pelo programa *Gaussian 98*.

	Norbornano (2)	Norcânfora (6)	Bornano (7)	Cânfora (8)
<b>C1-C2</b>	1,547	1,529	1,555	1,536
<b>C1-C6</b>	1,548	1,560	1,555	1,566
<b>C1-C7</b>	1,545	1,546	1,577	1,572
<b>C1-C10</b>	---	---	1,523	1,518
<b>C2-C3</b>	1,564	1,541	1,560	1,538
<b>C3-C4</b>	1,547	1,544	1,547	1,543
<b>C4-C5</b>	1,547	1,548	1,548	1,548
<b>C4-C7</b>	1,545	1,549	1,561	1,567
<b>C5-C6</b>	1,565	1,564	1,561	1,559
<b>C7-C8</b>	---	---	1,540	1,541
<b>C7-C9</b>	---	---	1,540	1,537
<b>C1-H1</b>	1,094	1,090	---	---
<b>C2-O</b>	---	1,211	---	1,212
<b>C2-H2x</b>	1,095	---	1,095	---
<b>C2-H2n</b>	1,095	---	1,095	---
<b>C3-3x</b>	1,095	1,097	1,094	1,095
<b>C3-3n</b>	1,095	1,095	1,095	1,095
<b>C4-H4</b>	1,094	1,093	1,095	1,094
<b>C5-H5x</b>	1,095	1,094	1,094	1,093
<b>C5-H5n</b>	1,095	1,094	1,095	1,094
<b>C6-H6x</b>	1,095	1,094	1,095	1,094
<b>C6-H6n</b>	1,095	1,094	1,095	1,094
<b>C7-H7s</b>	1,096	1,095	---	---
<b>C7-H7a</b>	1,096	1,095	---	---

O efeito estérico do grupo carbonila (Gauze et al., 2006) é perceptível na Tabela 8. A distorção na geometria molecular é refletida pelas ligações  $\text{C}_1\text{-C}_7$  e  $\text{C}_4\text{-C}_7$  maiores na

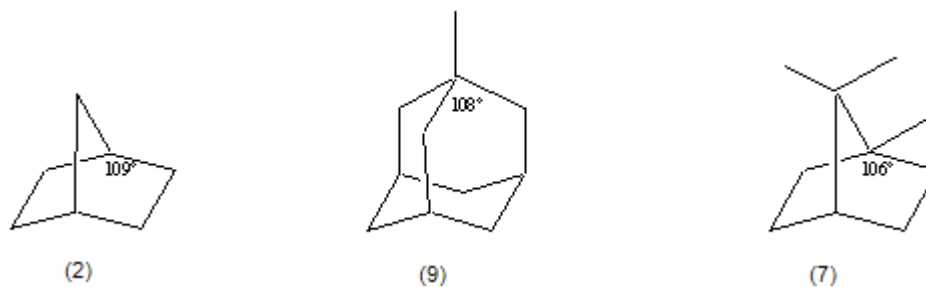
norcânfora com relação ao norbornano e a diferença entre seus respectivos comprimentos na norcânfora.

Efeitos de substituintes em norbornanos e bornanos já foram interpretados (Abraham et al., 1989). Distorções no anel com o objetivo de se minimizar as repulsões entre grupos metila e suas respectivas interações com os hidrogênios nas posições *exo* e  $H_4$  podem ser localizadas na Tabela 8.

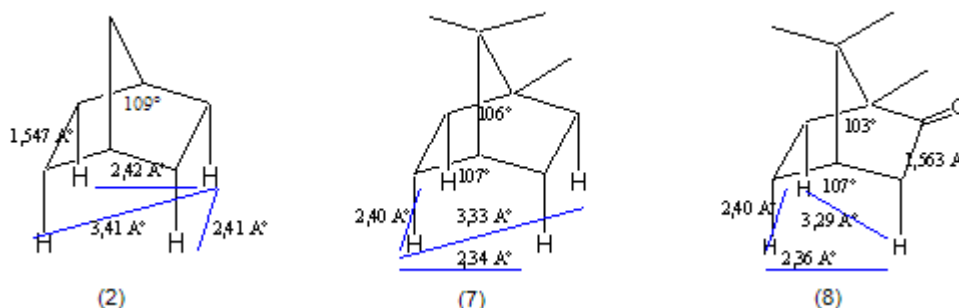
No norbornano, a introdução de grupos metila na posição 7 (bornano) leva ao estiramento não apenas das ligações  $C_\alpha-C_\beta$  mas também da ligação  $C_\beta-H_\beta$  ( $C_4-H_4$ ). Como consequência  $H_4$  é mais blindado no bornano do que no norbornano, de acordo com nosso trabalho em adamantanos substituídos, que mostrou que a introdução de substituintes metila em posições terciárias leva ao estiramento das ligações  $C_\alpha-C_\beta$  e  $C_\beta-H_\beta$ , e como consequência os hidrogênios  $\beta$  são blindados (Seidl et al., 2005).

No caso da posição  $C_{10}$ , a introdução do grupo metila deve levar a um efeito  $\beta$  nos hidrogênios dos carbonos 2 e 6. Para  $H_{2x}$  e  $H_{6x}$  este efeito ocorre simultaneamente com o efeito  $\gamma_{syn}$  dos grupos metila ligados a  $C_7$  e os dois efeitos parecem cancelar um ao outro, pois nem os comprimentos de ligação  $C_\beta-H_\beta$  (relativos a  $Me_{10}$ ) ou  $C_{\gamma_{syn}}-H_{\gamma_{syn}}$  (relativos a  $Me_8$  e  $Me_9$ ) (Tabela 8) e nem os deslocamentos químicos de  $H_{2x}$  e  $H_{6x}$  mudam no norbornano com relação ao bornano.

A interpretação de efeitos estéricos em hidrogênios *endo* requer um entendimento de como eles afetam a geometria molecular. A repulsão entre os grupos metila comprime os ângulos de ligação  $C_6-C_1-C_2$  e  $C_5-C_4-C_3$  com relação ao norbornano e ao adamantano (Figura 18). A consequência desta compressão é que os hidrogênios *endo* são forçados a se aproximar (Figura 19). A presença de um grupo carbonila em  $C_2$ , introduz interações estéricas adicionais com os grupos metila em  $C_1$  e  $C_7$ , diminuindo as distâncias internucleares e ângulos de ligação.



**Figura 18.** Ângulos selecionados no norbornano, 1-metil adamantano e bornano respectivamente.



**Figura 19.** Ângulos, distâncias interatômicas e comprimentos de ligação selecionados para o norbornano, bornano e cânfora respectivamente.

O efeito  $\gamma_{syn}$  dos grupos metila em  $C_7$  pode ser observado para  $H_{3x}$  e  $H_{5x}$ , onde não há efeito  $\beta$  da metila  $Me_{10}$ . Seus respectivos comprimentos de ligação C-H são encurtados e como conseqüência eles são mais desblindados no bornano do que no norbornano (Tabelas 7 e 8).

Comparando-se a cânfora e o norbornano, uma combinação de efeitos do grupo carbonila (norcânfora) e dos grupos metila (bornano) é observada. Por exemplo, a ligação  $C_3-H_{3x}$  deve ser estirada devido à presença do grupo carbonila e esta ligação também seria comprimida devido ao efeito  $\gamma_{syn}$  da  $Me_8$ . Como conseqüência, seu comprimento não se altera com relação ao norbornano. O mesmo tipo de racionalização pode ser aplicado aos outros hidrogênios da cânfora. Para  $H_4$ , o comprimento da ligação C-H deveria diminuir devido ao grupo carbonila, mas ao mesmo tempo deveria aumentar por causa do grupo metila. Assim, também não há alteração relativa ao norbornano. Para  $H_{5x}$ , por outro lado, ambos os substituintes, carbonila e metila, contribuem para o encurtamento da ligação C-H. Como conseqüência a ligação  $C_{5x}-H_{5x}$  é a menor ligação C-H da cânfora.

Para H<sub>5n</sub> e H<sub>6n</sub>, o substituinte metila não leva a efeito significativo devido à distância existente entre eles e o encurtamento da ligação C-H associado ao grupo carbonila prevalece. Finalmente, para H<sub>6x</sub>, os efeitos das metilas Me<sub>9</sub> e Me<sub>10</sub> cancelam um ao outro, como observado no bornano, e o efeito relacionado ao grupo carbonila prevalece. Por isso a ligação C<sub>6</sub>-H<sub>6x</sub> é encurtada como no caso da norcânfora.

### 4.1.3 - Halonorcânforas

Inicialmente deve-se destacar que o efeito do grupo carbonila nos deslocamentos químicos de hidrogênio destas estruturas parece ser constante, como observado pelo grau de desblindagem muito próximo de H<sub>3x</sub> e H<sub>3n</sub> nos derivados da norcânfora *endo* e *exo* substituídos, respectivamente (Tabela 9). Esta observação também é válida para os derivados da cânfora substituídos – ver próxima seção.

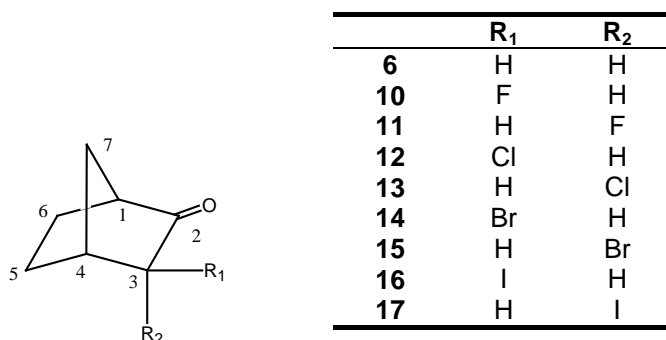


Figura 20. Norcânfora com substituintes na posição 3.

Tabela 9. Efeitos de substituintes nos deslocamentos químicos de <sup>1</sup>H (ppm) para derivados 3-halonorcânfora (Gauze et al., 2006).

	12	13	14	15	16	17
<b>H1</b>	0,13	0,17	0,14	0,16	0,10	0,14
<b>H3x</b>	-	2,07	-	2,26	-	2,58
<b>H3n</b>	1,83	-	1,99	-	2,30	-
<b>H4</b>	0,06	0,14	0,12	0,16	0,14	0,10
<b>H5x</b>	0,15	-0,11	0,17	-0,06	0,10	0,01
<b>H5n</b>	0,05	0,59	0,08	0,62	0,15	0,56
<b>H6x</b>	0,04	0,10	0,03	0,08	0	-0,07
<b>H6n</b>	0,03	0,06	0,05	0,04	0,05	-0,04
<b>H7s</b>	0,54	0,10	0,57	0,18	0,55	0,29
<b>H7a</b>	0,04	0,22	0,07	0,29	0,12	0,38

A comparação dos derivados halonorbornano e halonorcânfora (Figuras 16 e 20) mostra que a presença de um grupamento carbonila não parece afetar a interpretação do efeito do substituinte halogênio que foi proposta para os norbornanos substituídos. Assim como nos norbornanos substituídos na posição 3-*exo*, os hidrogênios que estão sob forte compressão estérica nos derivados *exo*-norcânforas são H<sub>3n</sub>, H<sub>4</sub> e H<sub>7s</sub> (Tabela 19). Suas desblindagens estão associadas com o encurtamento de suas respectivas ligações C-H (Tabela 10) como observado para os adamantanos (Seidl et al., 2005).

Em geral, o grau de desblindagem segue o raio de van der Waals do substituinte, como foi observado para os haloadamantanos (Seidl et al., 2005). No entanto, para o H<sub>7s</sub> do composto **16** e H<sub>5n</sub> do composto **17**, a desblindagem não aumenta do bromo para o iodo. Existem várias racionalizações possíveis para isto com base na distorção molecular, mas listá-las é muito difícil. Por exemplo, conforme o substituinte se torna maior, a molécula é consideravelmente distorcida a fim de se minimizar as interações estéricas, como refletido por certos ângulos diedros (Tabela 11), mas estas distorções não parecem seguir nenhum padrão definido, e estão fora do escopo do presente trabalho.

**Tabela 10.** Comprimentos de ligação (Å) para 3-halonorcânforas calculados pelo programa *Gaussian 98*.

	<b>6</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>
<b>C1-C2</b>	1,529	1,526	1,523	1,527	1,524	1,528	1,525
<b>C1-C6</b>	1,560	1,557	1,560	1,558	1,561	1,559	1,560
<b>C1-C7</b>	1,546	1,548	1,547	1,546	1,546	1,545	1,546
<b>C2-C3</b>	1,541	1,559	1,553	1,558	1,553	1,550	1,549
<b>C2-O</b>	1,211	1,208	1,209	1,206	1,206	1,207	1,207
<b>C3-C4</b>	1,544	1,530	1,536	1,537	1,542	1,534	1,540
<b>C4-C5</b>	1,548	1,549	1,547	1,552	1,546	1,553	1,546
<b>C4-C7</b>	1,549	1,549	1,548	1,548	1,551	1,548	1,552
<b>C5-C6</b>	1,564	1,564	1,563	1,563	1,562	1,563	1,562
<b>C1-H1</b>	1,090	1,090	1,090	1,090	1,090	1,090	1,091
<b>C3-H3x</b>	1,097	---	1,099	---	1,094	---	1,093
<b>C3-H3n</b>	1,095	1,095	---	1,091	---	1,090	---
<b>C4-H4</b>	1,093	1,092	1,092	1,091	1,091	1,091	1,091
<b>C5-H5x</b>	1,094	1,093	1,093	1,094	1,094	1,094	1,094
<b>C5-H5n</b>	1,094	1,095	1,092	1,095	1,092	1,095	1,092
<b>C6-H6x</b>	1,094	1,094	1,095	1,094	1,094	1,094	1,094
<b>C6-H6n</b>	1,094	1,094	1,093	1,094	1,093	1,093	1,093
<b>C7-H7s</b>	1,095	1,093	1,096	1,093	1,095	1,093	1,095
<b>C7-H7a</b>	1,095	1,094	1,094	1,094	1,094	1,094	1,094



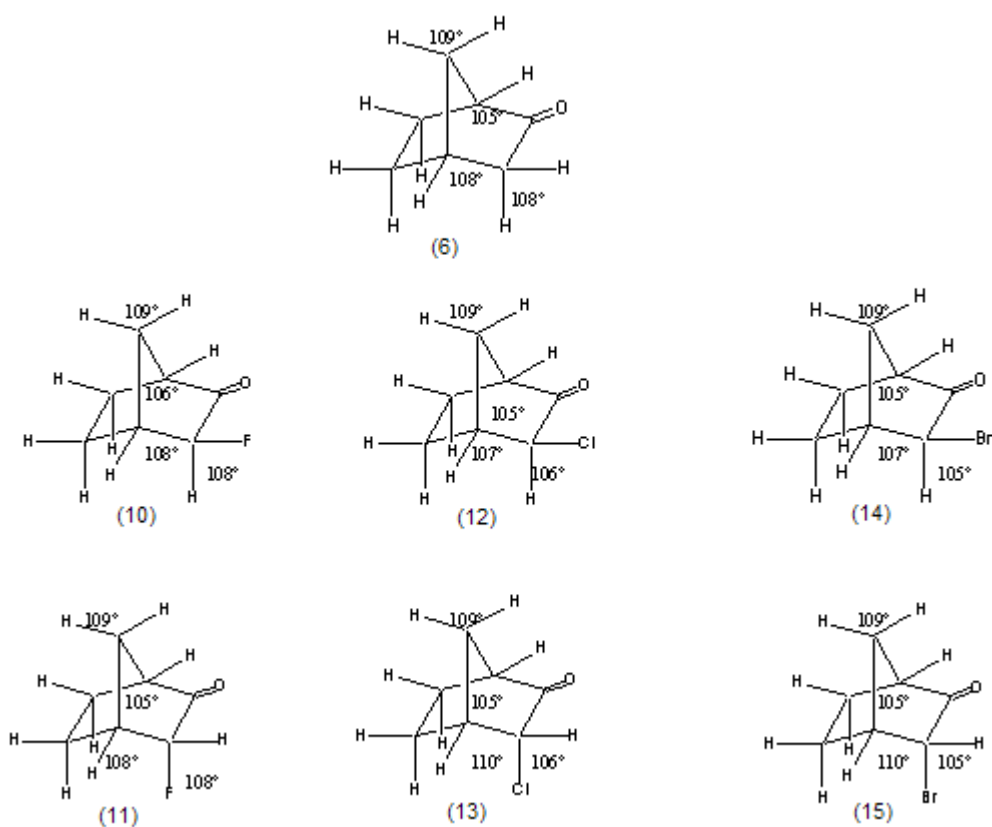
**Tabela 11.** Ângulos diedros selecionados (graus) para 3-halonorcânforas calculados pelo programa *Gaussian 98* (a) e pelo método MM2 (b).

	6		10		12		14		16	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
R1-C3-C2-O	66	65	67	61	64	60	68	64	---	63
C3-C4-C7-H7s	-62	-60	-61	-61	-63	-61	-63	-61	---	-62

	6		11		13		15		17	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
R2-C3-C2-O	-52	-57	-49	-47	-45	-46	-47	-50	---	-51
H4-C4-C5-H5n	-79	-78	-80	-79	-77	-77	-78	-77	---	-75

Para os compostos 3-*endo* substituídos, os hidrogênios mais fortemente afetados por interações estéricas são H<sub>3x</sub> e H<sub>5n</sub>, mas as diferenças nos comprimentos de ligação C-H são menores se comparados a efeitos de substituintes. Aqui outros fatores como ângulos de ligação e ângulos diedros devem estar tendo uma importante contribuição para os efeitos de substituintes. Os átomos halogênicos nas posições 3-*exo* ou 3-*endo* devem estar envolvidos nas distorções moleculares ilustradas na Figura 21.

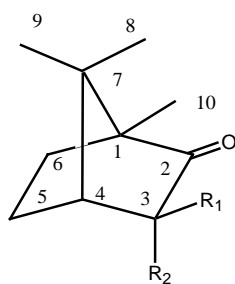


**Figura 21.** Ângulos de ligação selecionados para derivados 3-halonorcânfora calculados pelo programa *Gaussian 98*.

Um substituinte na posição 3-*exo* aumentará as interações estéricas com H<sub>7s</sub> comprimindo os ângulos de ligação C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub> e R-C<sub>3</sub>-H<sub>3n</sub>. Substituintes na posição 3-*endo* aumentarão as interações estéricas com H<sub>5n</sub>, comprimindo o ângulo R-C<sub>3</sub>-H<sub>3x</sub>, mas neste caso, o ângulo C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub> aumenta com o objetivo de minimizar interações estéricas no lado do anel em que o substituinte é introduzido. Quanto maior o raio de van der Waals do substituinte, maior a distorção com relação à norcânfora (Figura 21).

#### 4.1.4 - Halocânforas

Uma racionalização similar pode ser aplicada aos derivados halocânforas (Figura 22). Para substituintes na posição 3-*exo*, H<sub>3n</sub>, H<sub>4</sub> e H<sub>8</sub> são os mais fortemente desblindados devido a efeitos estéricos (Tabela 12) enquanto para substituintes na posição 3-*endo* estes hidrogênios são H<sub>3x</sub> e H<sub>5n</sub>, como observado para os derivados halonorcânforas.



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>8</b>	H	H
<b>18</b>	F	H
<b>19</b>	H	F
<b>20</b>	Cl	H
<b>21</b>	H	Cl
<b>22</b>	Br	H
<b>23</b>	H	Br
<b>24</b>	I	H
<b>25</b>	H	I
<b>26</b>	Me	H
<b>27</b>	H	Me

Figura 22. Cânfora com substituintes na posição 3.

Para se analisar os efeitos de substituintes de grupamentos alquila, efeitos conformacionais devem ser levados em consideração (Seidl et al., 2005). Este também é o caso dos derivados da cânfora substituídos uma vez que a conformação do grupo metila (Me<sub>8</sub>) do mesmo lado do substituinte muda ligeiramente com relação a cânfora, como mostrado na Tabela 13. Comprimentos de ligação e distâncias internucleares selecionadas são dados na Tabela 14.

**Tabela 12.** Efeitos de substituintes nos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  (ppm) para derivados da cânfora substituídos (Kaiser et al., 1994).

	18	19	20	21	22	23	24	25
H3n	2,53	-	2,03	-	2,20	-	2,55	-
H3x	-	2,50	-	2,04	-	2,24	-	2,60
H4	0,16	0,30	0,20	0,22	0,30	0,22	0,36	0,15
H5n	-0,01	0,55	0,15	0,73	0,18	0,77	0,18	0,69
H5x	0,08	-0,22	0,17	-0,16	0,19	-0,08	0,11	-0,03
H6n	0	0,09	0,10	-0,15	0,13	0,04	0,14	-0,03
H6x	-0,03	0,09	0,03	0,06	0,01	0,02	0,01	-0,09
H8	0,13	0,04	0,22	0,10	0,29	0,12	0,39	0,13
H9	0,01	0,07	0,01	0,11	0,01	0,13	0	0,15
H10	0,06	0,06	0,07	0,07	0,08	0,07	0,08	0,08

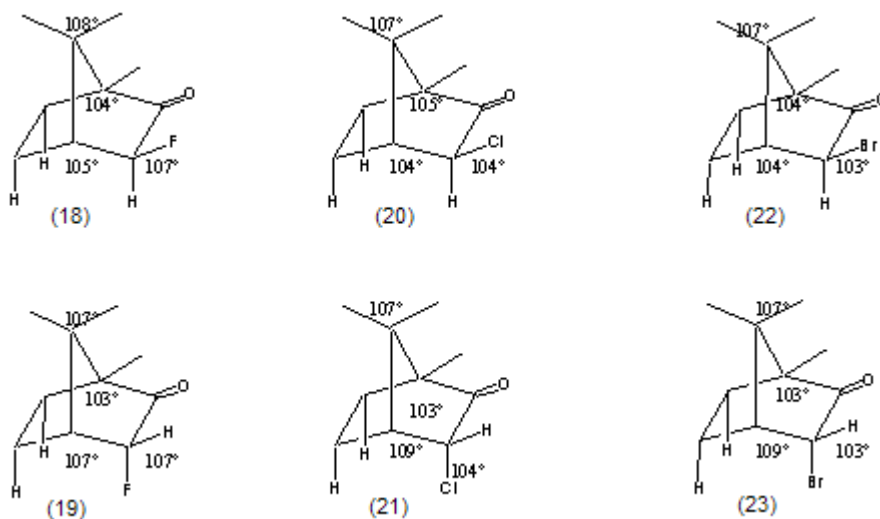
**Tabela 13.** Ângulos diedros selecionados (graus) para halocânforas calculados pelo programa *Gaussian 98*.

	8	18	19	20	21	22	23	26	27
C4-C7-C8-H8	58	55	61	59	62	58	61	62	62
C4-C7-C9-H9	-54	-55	-53	-55	-54	-55	-54	-55	-54
C7-C1-C10-H10	174	176	174	176	175	176	175	176	174
R1(H <sub>exo</sub> )-C3-C2-O	61	56	65	50	67	51	65	44	73
R1(H <sub>endo</sub> )-C3-C2-O	-57	-62	-53	-66	-48	-63	-50	-73	-45

**Tabela 14.** Comprimentos de ligação e distâncias selecionadas (Å) de halocânforas calculados pelo programa *Gaussian 98*.

	8	18	19	20	21	22	23	26	27
C1-C2	1,536	1,532	1,530	1,536	1,533	1,537	1,533	1,537	1,536
C1-C6	1,566	1,564	1,567	1,565	1,567	1,565	1,567	1,566	1,568
C1-C7	1,572	1,577	1,573	1,574	1,572	1,574	1,573	1,573	1,571
C1-C10	1,518	1,518	1,518	1,519	1,518	1,519	1,518	1,518	1,518
C2-C3	1,538	1,556	1,552	1,554	1,551	1,547	1,546	1,543	1,541
C2-O	1,212	1,209	1,210	1,207	1,208	1,207	1,208	1,213	1,214
C3-C4	1,543	1,533	1,536	1,541	1,540	1,538	1,538	1,554	1,552
C4-C5	1,548	1,549	1,547	1,552	1,545	1,553	1,545	1,548	1,547
C4-C7	1,567	1,568	1,567	1,569	1,572	1,570	1,573	1,571	1,569
C4-H4	1,094	1,093	1,094	1,092	1,093	1,092	1,093	1,095	1,095
C5-C6	1,559	1,560	1,559	1,560	1,558	1,560	1,558	1,561	1,559
C5-H5n	1,094	1,095	1,091	1,094	1,091	1,094	1,091	1,094	1,092
C5-H5x	1,093	1,092	1,093	1,092	1,093	1,093	1,092	1,093	1,093
C6-H6n	1,095	1,095	1,094	1,095	1,094	1,095	1,094	1,095	1,095
C6-H6x	1,094	1,094	1,095	1,094	1,094	1,094	1,094	1,094	1,095
C7-C8	1,541	1,540	1,543	1,540	1,542	1,540	1,542	1,540	1,542
C7-C9	1,537	1,537	1,537	1,538	1,538	1,538	1,538	1,539	1,539
C8-H8a	1,095	1,095	1,096	1,095	1,096	1,095	1,096	1,096	1,096
C8-H8b	1,094	1,095	1,095	1,095	1,095	1,095	1,095	1,095	1,095
C8-H8c	1,094	1,091	1,094	1,091	1,093	1,091	1,093	1,092	1,093
C9-H9a	1,096	1,096	1,096	1,096	1,096	1,096	1,096	1,096	1,096
C9-H9b	1,095	1,095	1,095	1,095	1,095	1,095	1,095	1,095	1,095
C9-H9c	1,093	1,092	1,091	1,092	1,091	1,091	1,091	1,091	1,091
C10-H10a	1,096	1,095	1,095	1,095	1,095	1,095	1,095	1,095	1,095
C10-H10b	1,092	1,094	1,094	1,094	1,094	1,094	1,094	1,094	1,094
C10-H10c	1,095	1,094	1,095	1,094	1,094	1,094	1,094	1,094	1,097
C3...CH <sub>3</sub> (8)	2,949	2,978	2,920	3,030	2,914	3,037	2,910	3,033	2,952
C3...CH <sub>3</sub> (9)	3,850	3,840	3,820	3,860	3,820	3,860	3,820	3,880	3,850
C3...CH <sub>3</sub> (10)	3,830	3,840	3,830	3,840	3,830	3,840	3,820	3,850	3,840

Os comprimentos de ligação C<sub>7</sub>-C<sub>8</sub> não variam nos compostos *exo*-substituídos, mas esta ligação é mais curta do que nos compostos *endo*-substituídos, mostrando que algum tipo de interação espacial do substituinte na posição *exo* com Me<sub>8</sub> deve estar presente. O tamanho maior do substituinte parece ser refletido pelo grau de distorção molecular (Figura 23).



**Figura 23.** Alguns ângulos de halocânforas calculados pelo programa *Gaussian 98*.

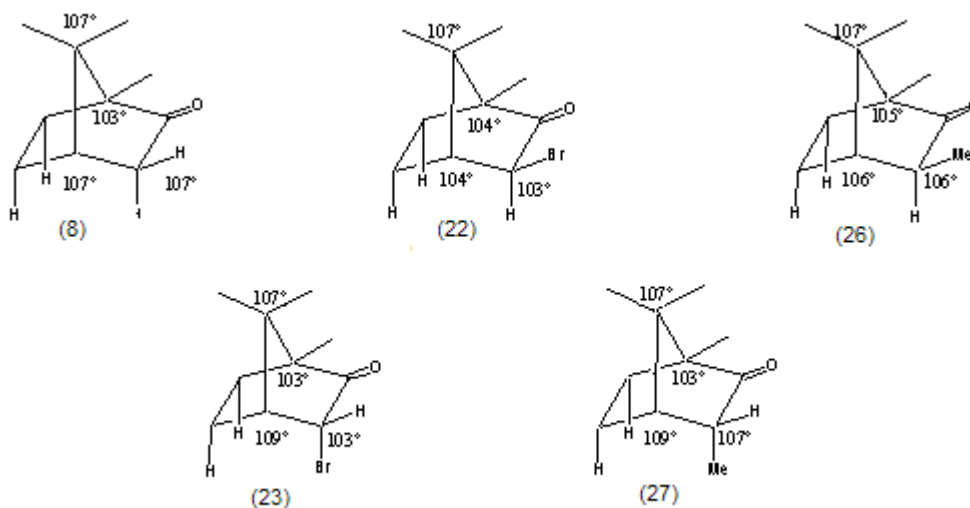
Como consequência da compressão do ângulo de ligação C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>, as distâncias internucleares C<sub>3</sub>...C<sub>8</sub> nos compostos *exo* substituídos são não apenas maiores do que nos compostos não substituídos, mas também maiores do que nos derivados *endo* correspondentes, com o objetivo de se minimizar interações estéricas entre o substituinte e a metila na posição 8. Uma racionalização similar pode ser aplicada para os compostos *endo* substituídos para os quais estas distâncias são menores do que nos compostos não substituídos e menores do que nos derivados *exo*. As distâncias C<sub>3</sub>...C<sub>8</sub> para os derivados halonorcânforas tendem a ser maiores (nos derivados *exo*) ou menores (nos derivados *endo*) conforme o raio de van der Waals do substituinte aumenta. Estes efeitos são muito maiores nos derivados da cânfora dos que nos análogos norcânfora substituídos. Comparações entre a 3-*exo*-bromonorcânfora e a 3-*exo*-bromocânfora

(Figuras 21 e 23), por exemplo, mostram claramente que a extensão da compressão dos ângulos de ligação R-C<sub>3</sub>-H<sub>3n</sub> e C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub> segue a presença de substituintes volumosos.

#### ***4.1.5 - Deslocamentos Químicos de RMN de <sup>1</sup>H e Distorções Moleculares como Provas para Efeitos Estéricos***

Efeitos estéricos e distorções na estrutura molecular podem ser associados a interações estéricas entre grupos espacialmente próximos e podem ser convenientemente localizadas por deslocamentos químicos de <sup>1</sup>H. Dados os sistemas modelo apropriados, eles proporcionam importantes informações das propriedades associadas ao tamanho ou volume de certos grupos. A seguir são dados exemplos que complementam nossas investigações prévias (Seidl et al., 2002; Seidl et al., 2005).

Em nosso trabalho sobre adamantanos substituídos (Seidl et al., 2005), um substituinte bromo leva a maiores mudanças nos deslocamentos químicos de <sup>1</sup>H do que um grupamento metila. Este resultado está em aparente contradição com a magnitude de seus respectivos raios de van der Waals (Carey e Sundberg, 2000). A análise da distorção molecular nos compostos correspondentes (Figura 24) mostra claramente que para o bromo isto ocorre em extensão consideravelmente maior do que para o grupo metila. Logo, em todas as conformações do grupo metila que foram investigadas, o bromo é um substituinte mais volumoso do que o grupo metila.



**Figura 24.** Alguns ângulos de derivados da cânfora bromo- e metil-substituídos calculados pelo programa *Gaussian 98*.

Também é interessante notar que embora nos derivados fluoronorcânfora e 3-*endo*-fluorocânfora, o flúor não pareça causar nenhum tipo de distorção angular devido a efeitos estéricos (Figuras 21 e 23), na 3-*exo*-fluorocânfora alguns ângulos de ligação mudam se comparados à cânfora (Figura 24). Isto significa que embora o flúor normalmente não esteja associado a efeitos estéricos, em situações mais congestionadas, como no caso da interação entre o flúor com o grupo metila na posição 8 da 3-*exo*-fluorocânfora (18), eles podem ser detectados.

Nossos resultados mostram que a interpretação de efeitos estéricos no sistema adamantano (Seidl et al., 2002; Seidl et al., 2005) também pode ser aplicada a variação nos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  causados pela introdução de grupos metila no bornano com relação ao norbornano e na cânfora com relação à norcânfora. Eles também mostram que a redução nos comprimentos de ligação C-H estão associadas a interações estéricas levando a desblindagem nos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$ . Porém, a introdução de substituintes nas posições R1 e R2 levam a distorções angulares, que se tornam mais fortes na cânfora com relação à norcânfora devido a interações estéricas que surgem da introdução de grupos metila. Dados os modelos apropriados (isto é, aqueles para os quais as contribuições estéricas podem ser separadas daqueles de

natureza eletrônica ou anisotrópica), os deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  são eficientes na localização de efeitos estéricos.

Dados de deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  experimentais, densidade de cargas calculadas, distâncias interatômicas e efeitos de substituintes nos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  calculados pelo programa *Gaussian 98* e *CHARGE 6A* encontram-se no Anexo I.

## ***4.2 - Modelagem Molecular de Substâncias com Atividade Antiviral – Estudos de Relação Estrutura-Atividade***

### ***4.2.1 - Análise Conformacional de Ribonucleosídeos por DM***

De acordo com as regras de notação da IUPAC-IUB (IUPAC) para nucleosídeos, os termos *syn* e *anti* descrevem diferentes regiões conformacionais do ângulo de torção  $\chi$ , isto é, o ângulo de torção da ligação N-glicosídica (N-C1'), que liga a base (purina ou pirimidina) ao açúcar. A sequência de átomos que define este ângulo é O4'-C1'-N9-C4 quando a base é purínica e O4'-C1'-N1-C2 quando a base é pirimidínica. O grupo 4-oxoquinolino não é uma base nitrogenada, no entanto, sua estrutura é mais similar a um sistema purínico do que a um sistema pirimidínico. Desta forma, o ângulo de torção  $\chi$  foi nomeado como  $\theta_1$  para o composto **1j** (7-OMe), correspondendo à sequência de átomos O4'-C1'-N1-C8a (Figura 15).

A conformação dos nucleosídeos purínicos é definida pela IUPAC-IUB (IUPAC) como *syn* quando  $\chi=0\pm 90^\circ$  e *anti* quando  $\chi=180\pm 90^\circ$ . No entanto, dependendo da referência consultada na literatura, a faixa de ângulo que é usada para definir se a conformação é *syn* ou *anti* pode variar. Por exemplo, Foloppe e Nilsson (2005) em um estudo com nucleosídeos, definem a conformação *syn* na faixa de 30 a 90° e a *anti* na faixa de 170 a 180° e -60 a -180°, enquanto Gelbin e colaboradores (1996), em um

estudo com nucleosídeos e nucleotídeos consideram a conformação *syn* na faixa de 0 a 100° e a *anti* na faixa de 170 a 180° e -80 a -180°, de acordo com a definição de Saenger (Saenger, 1983). Neste trabalho, adotamos esta última definição.

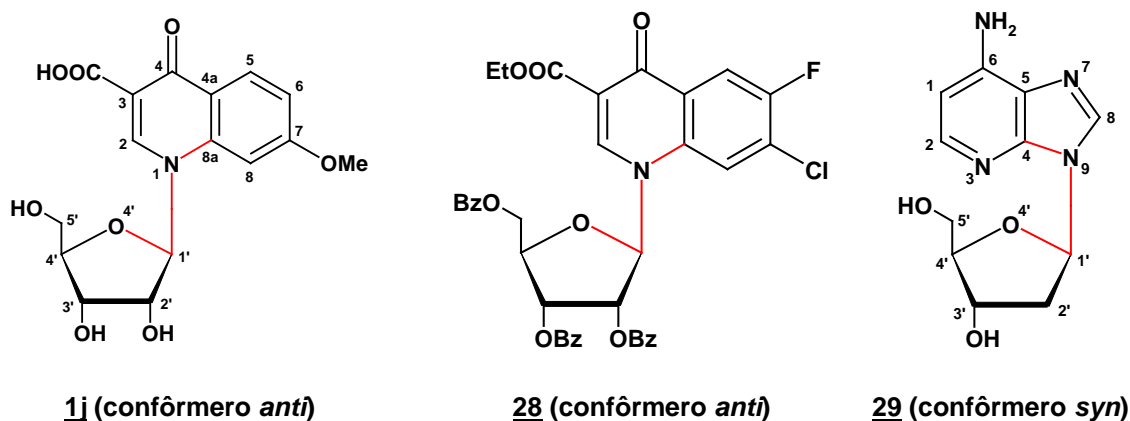
A conformação *syn* é a mais frequentemente encontrada em nucleosídeos naturais (Donohue & Trueblood, 1960), exceto quando os anéis purínicos possuem um substituinte na posição 3 (Minakawa et al., 1996; Cruz et al., 1993). Porém, no caso de análogos de nucleosídeos não há uma preferência estabelecida. Por exemplo, o derivado 4-oxoquinolino **28** (Figura 25), similar aos ribonucleosídeos de nosso interesse, apresenta a conformação *anti* como predominante em solução (Cruz et al., 1993) (nesta referência, o confôrmero *anti* foi assinalado como *syn*, uma vez que a definição utilizada foi oposta a deste trabalho).

Por outro lado, estudos com o composto 1-deazo-2'-desoxiadenosina (**29**, Figura 25) (Seela et al., 1999) mostram que ambas as conformações *syn* e *anti* são observadas no estado sólido, uma vez que este composto apresenta as duas formas de cristalização enquanto que a conformação *syn* é a predominante em solução de D<sub>2</sub>O.

A preferência pela conformação *syn*, não apenas neste caso, mas também em nucleosídeos naturais, que também possuem um nitrogênio na posição 3 da base purínica (ou posição similar em análogos de nucleosídeos), é provavelmente devido a interações por ligação hidrogênio intramoleculares entre o átomo de nitrogênio da posição 3 e o grupo OH da posição 5'.

Este não é o caso do composto **1j** em estudo (Figura 25), que se apresenta na conformação *anti* no estado sólido, de acordo com dados de difração de raios-X, e também em fase gás, visto que a conformação *anti* é mais estável do que a *syn* (4,643 kcal/mol), de acordo com cálculos DFT (Leal et al., 2005). Alterações na natureza da base podem mudar a conformação preferencial de análogos de nucleosídeos ou nucleotídeos, como discutido anteriormente.





**Figura 25.** Representação esquemática dos confômeros *anti* do ácido 7-metóxi-1,4-dihidro-4-oxo-1-( $\beta$ -D-ribofuranosil)quinolino-3-carboxílico (**1j**) estudado por Leal e colaboradores (2005), e do derivado 4-oxoquinolino (**28**), estudado por Cruz e colaboradores (1993) e do confômero *syn* da 1-deazo-2'-desoxiadenosina (**29**), estudado por Seela e colaboradores (1999).

Estudos de análise conformacional de compostos biologicamente ativos (como por exemplo, substratos naturais e inibidores sintéticos de enzimas) são muito importantes, visto que a atividade biológica de uma molécula está relacionada a um espaço conformacional limitado, podendo ter aplicação direta na compreensão da relação estrutura-atividade e no desenho de novos fármacos (Minakawa et al., 1996). O espaço conformacional pode ser investigado por várias técnicas experimentais, tais como difração de raios-X e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (Cruz et al., 1993; Seela et al., 1999) e por métodos teóricos de cálculo, como a simulação por DM.

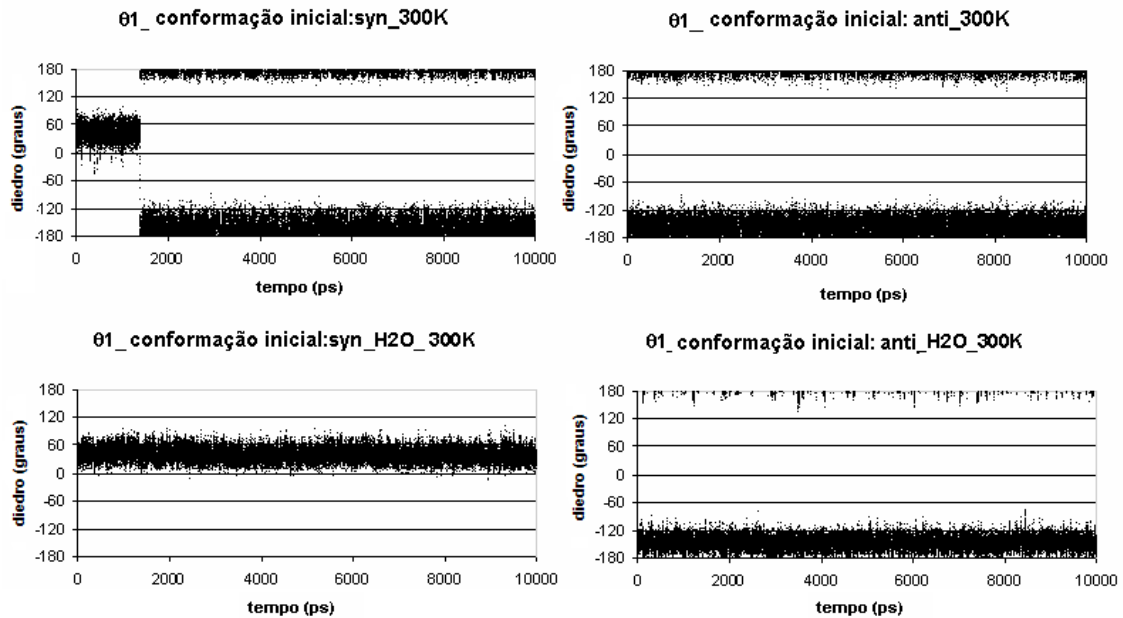
Uma caracterização completa e quantitativa das conformações de nucleosídeos em solução é relativamente difícil de se obter, visto que estas moléculas apresentam vários graus de liberdade conformacional. No entanto, um estudo recente de oito nucleosídeos naturais, constituintes dos ácidos nucleicos (Foloppe e Nilsson, 2005), mostra que a simulação por DM é muito útil para explorar a estrutura e o comportamento dinâmico de moléculas de interesse biológico, indicando que esta técnica está se tornando madura o suficiente para caracterizar completamente propriedades de nucleosídeos em solução.

Embora já tenhamos estabelecido que o confômero *anti* de **1j** é o encontrado na fase sólida, de acordo com dados de difração de raios-X, e que esta é a conformação mais estável na fase gasosa, de acordo com cálculos DFT (Leal et al., 2005), a conformação predominante em água ainda não tinha sido determinada. Assim, para se obter informações sobre o comportamento conformacional de **1j** em solução, este composto foi submetido a simulação por DM durante 10 ns, utilizando o campo de força AMBER. As simulações por DM foram realizadas no vácuo e numa caixa d'água em duas temperaturas diferentes, 300 e 600K, iniciando-se com os confômeros *syn* e *anti* de **1j**.

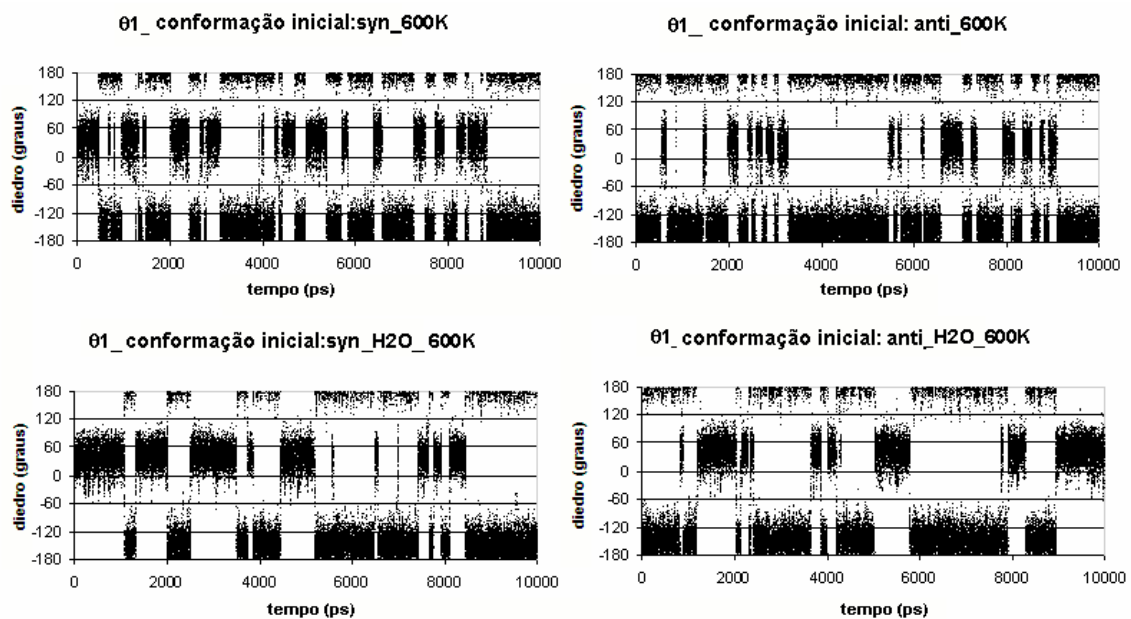
Para distinguir as conformações de **1j** em cada meio, o ângulo de torção  $\theta_1$  foi monitorado durante a simulação, uma vez que este permite diferenciar a conformação *syn* ( $0^\circ < \theta_1 < 100^\circ$ ) da *anti* ( $170^\circ < \theta_1 < 280^\circ$ ). Outros parâmetros geométricos também foram monitorados: o ângulo de torção  $\theta_2$ , que corresponde a uma possível ligação hidrogênio intramolecular entre COOH e C4=O, e as distâncias interatômicas D1-D4 (confômero *syn*) e D1'-D5' (confômero *anti*), que correspondem a possíveis interações intramoleculares (Figura 15).

Analisando-se os valores do ângulo de torção  $\theta_1$  adotados durante as simulações iniciadas com as conformações *syn* e *anti* de **1j**, à temperatura de 300K, no vácuo e na água, pode-se verificar que a conformação inicial (*syn* ou *anti*) é mantida durante os 10 ns de simulação (Figura 26), exceto no vácuo, quando a conformação *syn* é a inicial. Neste caso, a conformação muda após cerca de 1500 ps de simulação (Figura 26), mostrando que a conformação *anti* é a preferencial no vácuo. Um comportamento anômalo, porém, é observado na simulação em água quando a conformação inicial é a *syn*, que neste caso não muda para a *anti*, a mais estável. Há duas hipóteses para explicar este comportamento: as moléculas de água explícitas ao redor do soluto estabilizam esta conformação ou esta mudança em água ocorre em um tempo maior do que 10 ns de simulação devido ao efeito do volume do solvente.

À temperatura de 600K, a variação do ângulo de torção  $\theta_1$  observada durante as simulações iniciadas com as conformações *syn* e *anti* de **1j**, no vácuo e na água, mostra que ambos os confôrmeros podem co-existir, uma vez que ocorre uma mudança periódica de uma conformação para a outra ao longo do tempo de simulação (Figura 27).



**Figura 26.** Variação do ângulo de torção  $\theta_1$  durante 10 ns de simulação por DM, à 300K, no vácuo (acima) e em água (abaixo) para a conformação inicial *syn* (esquerda) e *anti* (direita) do ribonucleosídeo **1j**.

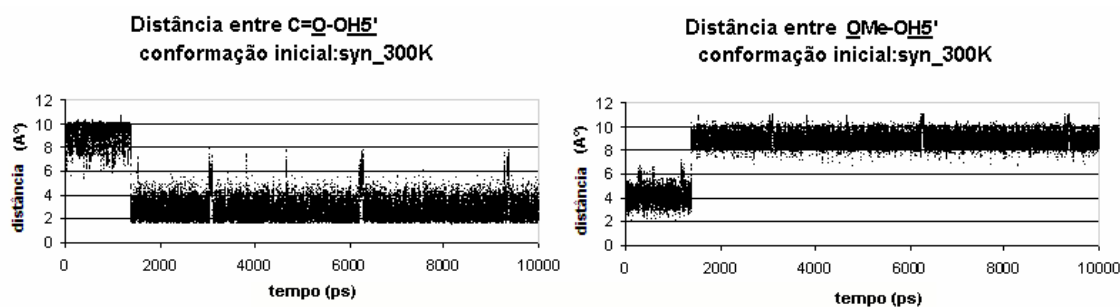


**Figura 27.** Variação do ângulo de torção  $\theta_1$  durante 10 ns de simulação por DM, à 600K, no vácuo (acima) e em água (abaixo) para a conformação inicial *syn* (esquerda) e *anti* (direita) do ribonucleosídeo **1j**.

Comparando-se as simulações no vácuo iniciadas com a conformação *syn*, à 300K e à 600K, o tempo de mudança conformacional é reduzido para 1/3 (cerca de 500 ps) na temperatura de 600K. Em água, à 600K, a primeira mudança conformacional ocorre em cerca de 1000 ps, indicando que o efeito do volume do solvente pode desacelerar o processo de mudança conformacional.

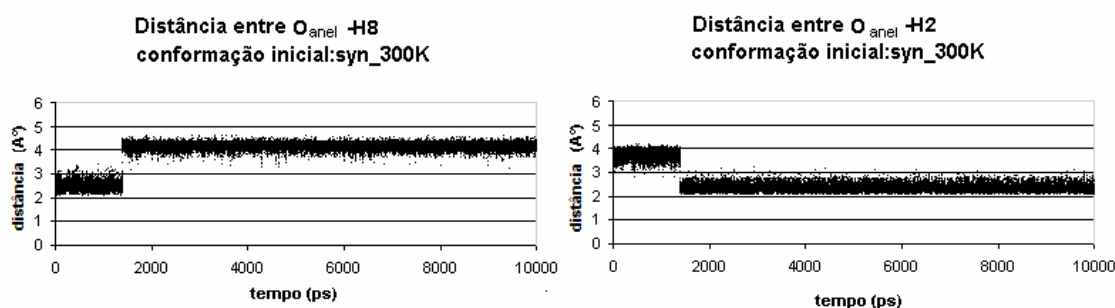
Analisando-se o ângulo de torção  $\theta_2$  (Figura A2, Anexo I), cujo valor médio fica em torno de  $0^\circ$  durante todo o período de simulação (10 ns) em todas as condições de simulação, verifica-se a manutenção de uma ligação hidrogênio intramolecular entre  $\text{COOH}$  e  $\text{C4}=\text{O}$ , formando um pseudo anel de seis. A distância medida entre estes átomos varia de 1,75 a 1,80 Å, em ambas as temperaturas (300 e 600K) e em ambos os meios (vácuo e água). Esta distância corresponde a uma interação por ligação hidrogênio de intensidade moderada, segundo Jeffrey (1997), que classifica interações por ligação hidrogênio com distância H...O na faixa de 1,2 a 1,5 Å como fortes, de 1,5 a 2,2 Å como moderadas e de 2,2 a 3,2 Å como fracas.

A distância entre  $\text{OH5}'$  e  $\text{COOH}$  ( $D1'$ ) para o confômero *anti* se manteve em um valor médio de 3,17 Å entre  $\text{OH5}'$  e  $\text{COOH}$  a 300K, o que indica a existência de uma interação fraca entre estes átomos (Jeffrey, 1997). Em água, estas interações intramoleculares não parecem ocorrer porque a distância média é de 4,0 Å a 300K, provavelmente por causa das interações com as moléculas de solvente. No caso da conformação *syn*, a distância entre  $\text{OH5}'$  e  $\text{OMe}$  ( $D1$ ) fica em torno de 4,20 Å, indicando que não existem interações intramoleculares entre estes átomos em vácuo ou em água. Porém quando o confômero *syn* é convertido no *anti*, este passa a apresentar interações estabilizantes entre o grupo  $\text{OH5}'$  e  $\text{COOH}$  de acordo com a distância média de 2,80 Å entre estes átomos (Figura 28). As distâncias entre  $\text{COOH}$  e  $\text{C4}=\text{O}$  ( $D2$  e  $D2'$ ) já foram comentadas anteriormente na análise de  $\theta_2$ .



**Figura 28.** Variações das distâncias entre C=O e OH5' e entre OMe e OH5' durante a simulação para a conformação inicial *syn* de **1j** a 300K.

As distâncias entre O4' e H2 (D3') quando se inicia a simulação com a conformação *anti* a 300K permanece com uma distância média de 2,30-2,50 Å no vácuo e na água (Anexo I) indicando a existência de uma fraca interação intramolecular entre estes átomos. A 600K estas interações podem ser rompidas em alguns pontos da simulação no vácuo. No entanto, na água as interações são mantidas com a distância de 2,36 Å entre O4' e H2. O mesmo pode ser dito para a distância entre O4' e H8 (D3) quando a simulação é iniciada com a conformação *syn*, mas neste caso, a 600K a interação é rompida em alguns pontos da simulação e a 300K, como o confômero *syn* muda para o *anti*, esta interação é quebrada e uma entre O4' e H2 é formada (Figura 29).



**Figura 29.** Variações das distâncias entre O4' e H8 e entre O4' e H2 durante a simulação iniciada com o confômero *syn* de **1j** a 300K.

As distâncias entre OH5' e H8 ou H2 (D4 e D5') para os confômeros *syn* e *anti* respectivamente, são mantidas num valor médio de 2,70-3,10 Å durante as simulações no vácuo ou na água (Anexo I), mas elas flutuam para valores maiores em alguns pontos

a 600K. Quando a simulação é iniciada com a conformação *syn* no vácuo a 300K, a interação entre  $\underline{QH5'}$  e H8 é quebrada e uma entre  $\underline{QH5'}$  e H2 é formada.

Finalmente, para o confômero *anti* a distância entre  $\underline{QH2'}$  e H8 também foi monitorada e um valor médio de 2,90-3,00 Å foi observado no vácuo e na água a 300K indicando que existe alguma interação entre estes átomos. A 600K, esta interação não é observada. Quando o confômero *syn* é convertido no *anti* no vácuo a 300K esta interação é também observada na mesma faixa de distância observada quando se inicia a simulação com a conformação *anti*.

A análise da Figura 28 mostrou que a mudança de conformação de *syn* para *anti* no vácuo a 300K levou a mais interações intramoleculares, que podem promover uma melhor estabilização da estrutura. Embora a maioria das interações observadas seja de intensidade fraca (as distâncias entre os átomos H...O são maiores do que 2,2 Å) (Jeffrey, 1997), elas podem estar ajudando a manter o ribonucleosídeo na conformação inicial de simulação.

A água tem uma grande influência nas propriedades conformacionais dos nucleosídeos (Foloppe e Nilsson, 2005). Em água, a conformação inicial parece ser mantida durante as simulações a 300K, não apenas devido às interações intramoleculares observadas neste estudo, mas também devido à perda de liberdade conformacional devido as moléculas do solvente. A 600K, os dois confômeros coexistem, mas no vácuo a conformação inicial é majoritária (Anexo I). Assim, ambas as conformações são importantes e devem ser consideradas nos próximos estudos, como por exemplo, numa simulação por DM do complexo enzima-inibidor.

Estes resultados são similares em alguns pontos, mas não completamente comparáveis com aqueles obtidos por Foloppe e Nilsson (2005). A conformação inicial dos nucleosídeos pirimidínicos estudados por Foloppe e Nilsson é mantida em água. Porém nosso sistema é diferente, porque em nucleosídeos purínicos, enquanto a conformação *anti* parece ser a menos impedida estericamente, a *syn* é estabilizada por

ligações hidrogênio entre o grupo OH5' e as bases *syn* apesar da competição pela água. No sistema aqui estudado estas interações estabilizantes para a forma *syn* não existem, mas outros tipos de interações intramoleculares e interações com as moléculas do solvente parecem ser suficientes para estabilizar as duas conformações.

A simulação a 300K em água (Anexo I) mostrou que as moléculas explícitas de água ao redor do soluto estão impedindo a mudança de uma conformação para outra, uma vez que a conformação inicial *syn* ou *anti* é mantida.

O assinalamento completo do espectro de RMN do composto **1j** já foi feito por Leal e colaboradores (2005), onde o experimento de eOn foi usado para determinar a configuração  $\beta$  do ribonucleosídeo e a posição de ribosilação em N1. Vale comentar aqui a parte do experimento que permitiu analisar a conformação do composto **1j** em solução de DMSO-d6, publicada em 2006 (Yoneda et al., 2006).

A irradiação de H<sub>1'</sub> ( $\delta$  6,30) do ribonucleosídeo **1j** resultou em 20,4% de eOn no sinal de H<sub>8</sub> ( $\delta$  7,45) e em 4,0% no de H<sub>2</sub> ( $\delta$  9,51), indicando que H<sub>8</sub> está mais próximo de H<sub>1'</sub> e logo, a conformação *anti* deve ser a preferencial (espectro no Anexo I). Isto está de acordo com o trabalho de Cruz e colaboradores para um análogo de nucleosídeo similar ao estudado (Cruz et al., 1993) (embora eles não utilizem a mesma definição de *syn/anti* utilizada aqui). Porém o eOn em H<sub>2</sub> significa que o confômero *syn* também deve co-existir em solução.

Os resultados de simulações por DM no vácuo estão de acordo com a estrutura cristalográfica de **1j** (confômero *anti*) e também com cálculos DFT, onde o confômero *anti* é o mais estável (Leal et al., 2005). Em água, porém, ambos os confômeros podem existir a 300K, a temperatura dos testes *in vivo* e *in vitro*, o que mostra que ambos os confômeros devem ser levados em consideração em um estudo de simulação por DM do complexo enzima-inibidor. Os resultados computacionais estão de acordo com os resultados de eOn.

As simulações por DM feitas para o ribonucleosídeo 7-OMe substituído foram estendidas aos demais ribonucleosídeos da série em estudo a 300K (com exceção dos compostos com substituinte bromo (**1d** e **1h**), uma vez que para este átomo não há parâmetros para o cálculo de cargas pelo método *ChelpG* implementado no programa *Gaussian 98*).

Os resultados para as simulações em água e para a conformação *anti* no vácuo coincidem com os resultados obtidos para o ribonucleosídeo 7-OMe (**1j**) substituído, onde a conformação inicial é sempre mantida (os resultados encontram-se no Anexo I). No entanto, as simulações iniciadas com a conformação *syn* no vácuo apresentaram resultados distintos. Neste caso, os ribonucleosídeos com substituintes 6-F (**1b**), 6-Cl (**1c**) e o não substituído (**1**, R=H) foram para a conformação *anti* no decorrer das simulações ao passo que os com substituintes 6-Me (**1a**), 6-OMe (**1e**), 7-F (**1f**), 7-Cl (**1g**) e 7-Me (**1i**) ficaram na conformação *syn*.

Embora estas condições não representem as condições do meio biológico (vácuo), seria interessante analisar o que poderia estar ocorrendo.

Verificou-se que a demora em ir para a conformação *anti* deve estar associada a distância D3 (Figura 15). Quanto menor o valor da distância D3 (Tabela 15), mais tempo se leva para mudança de conformação de *syn* para *anti*. Embora o ribonucleosídeo não substituído apresente o mesmo valor de D3 que o 7-OMe substituído (**1j**), este último muda de conformação bem antes (1500 ps) provavelmente devido ao efeito estérico do substituinte volumoso na posição 7.



**Tabela 15.** Valores médios das distâncias D1, D3 e D4 e D1', D3', D4' e D5' (Å) para as simulações por DM iniciadas com o confôrmero *syn* no vácuo a 300K.

	D1	D3	D4	D1'	D3'	D4'	D5'
<b>1 (H)</b>	4,15	2,50	2,84	2,77	2,38	3,19	2,98
<b>1a (6-Me)</b>	4,14	2,48	2,88	---	---	---	---
<b>1b (6-F)</b>	4,21	2,48	2,90	2,77	2,37	3,12	2,95
<b>1c (6-Cl)</b>	4,09	2,48	2,77	2,73	2,37	3,14	2,95
<b>1e (6-OMe)</b>	4,16	2,47	2,91	---	---	---	---
<b>1f (7-F)</b>	4,06	2,47	2,76	---	---	---	---
<b>1g (7-Cl)</b>	4,0	2,48	2,83	---	---	---	---
<b>1i (7-Me)</b>	4,07*	2,46	2,70	---	---	---	---
<b>1j (7-OMe)</b>	4,19	2,50	2,89	2,83	2,38	3,14	2,96

\* este valor oscila bastante

Como o ribonucleosídeo não substituído (**1**, R=H) vai para a conformação *anti*, seria de se esperar que os demais tivessem um comportamento similar, até porque a conformação *anti* é estericamente menos impedida e como visto para **1j**, apresenta mais interações intramoleculares estabilizantes do que a conformação *syn*. Desta forma, tentou-se justificar a permanência dos ribonucleosídeos 6-Me (**1a**), 6-OMe (**1e**), 7-F (**1f**), 7-Cl (**1g**) e 7-Me (**1i**) na conformação *syn*.

Os ribonucleosídeos 7-F (**1f**) e 7-Me (**1i**) substituídos deixam H8 altamente positivo de acordo com as cargas calculadas pelo método *ChelpG*, o que leva a menores valores de distâncias D3 e D4 (Tabela 16). Isto deve contribuir para que estes ribonucleosídeos fiquem na conformação *syn*.

**Tabela 16.** Densidades de carga calculadas para H8 dos ribonucleosídeos estudados pelo método *ChelpG*.

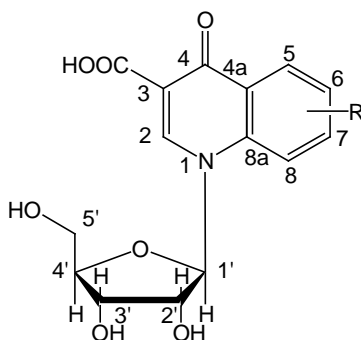
	H8
<b>1 (H)</b>	0,122
<b>1a (6-Me)</b>	0,130
<b>1b (6-F)</b>	0,140
<b>1c (6-Cl)</b>	0,149
<b>1e (6-OMe)</b>	0,137
<b>1f (7-F)</b>	0,180
<b>1g (7-Cl)</b>	0,113
<b>1i (7-Me)</b>	0,187
<b>1j (7-OMe)</b>	0,163

Vale comentar que o ribonucleosídeo 7-Me (**1i**) substituído possui uma densidade de carga muito positiva em H8. Com isso, ele consegue uma conformação diferenciada dos demais (observada pelo diedro  $\theta_1$  de  $126,0^\circ$ - Anexo I) na qual consegue continuar com a interação entre OH5' e H8, de acordo com o baixo valor de D4 observado (Tabela 15) e ao mesmo tempo minimizar interações estéricas com o grupo metila na posição 7.

Os ribonucleosídeos 7-F (**1f**) e 7-Cl (**1g**) substituídos devem apresentar algum tipo de interação entre o substituinte e o hidrogênio de OH5', devido aos menores valores de D1 (Tabela 15) observados. Isto também deve favorecer a conformação *syn*.

No entanto, não se conseguiu uma explicação para o fato de os ribonucleosídeos 6-Me (**1a**) e 6-OMe (**1e**) substituídos permanecerem na conformação *syn*. Foram feitos cálculos de área superficial (Tabela 17) com o programa *Hyperchem 7.0* (Hypercube Inc.), para se tentar encontrar alguma justificativa. No vácuo, espera-se que o composto mais estável seja aquele de área superficial menor. Porém, todos os confôrmeros *anti* apresentaram uma área menor do que os *syn*.

**Tabela 17.** Área superficial dos ribonucleosídeos estudados nas conformações *syn* e *anti* calculada pelo programa *Hyperchem*.



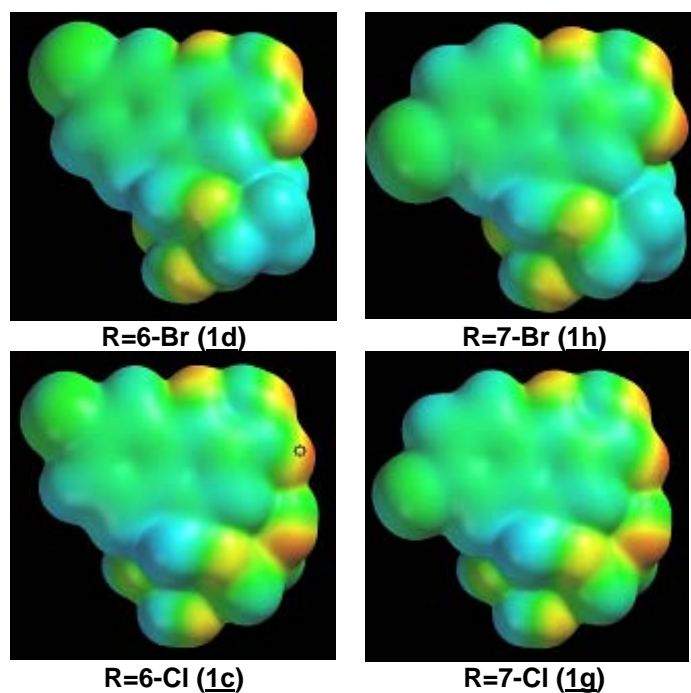
Ribonucleosídeo ( <i>anti</i> )	Área superficial (Å <sup>2</sup> )	Ribonucleosídeo ( <i>syn</i> )	Área superficial (Å <sup>2</sup> )
R=H	292,19	R=H	296,0
R=6-F	295,70	R=6-F	299,96
R=7-F	296,24	R=7-F	299,68
R=6-Cl	304,13	R=6-Cl	313,26
R=7-Cl	303,97	R=7-Cl	313,21
R=6-Me	312,60	R=6-Me	316,74
R=7-Me	313,01	R=7-Me	317,13
R=6-OMe	321,25	R=6-OMe	326,09
R=7-OMe	321,03	R=7-OMe	324,39

Tentou-se obter a estrutura de raios-X para os demais nucleosídeos a fim de compará-las com os resultados de simulação no vácuo, mas não foi possível se obter monocristais para a realização dos experimentos.

#### 4.2.2 – Mapas de Potencial Eletrostático

Numa tentativa de se compreender as diferenças de atividade dos ribonucleosídeos derivados do ácido 1,4-dihidro-4-oxoquinolino-3-carboxílico frente ao vírus HSV-1, foram feitos mapas de potencial eletrostático (Anexo I) para as conformações *syn* e *anti* dos mesmos no programa *Spartan* (Wavefunction, Inc.).

Não foram observadas diferenças de coloração nos mapas obtidos que permitissem algum tipo de racionalização, como exemplificado pelos compostos 6-Cl, 6-Br, 7-Cl e 7-Br substituídos na Figura 30. O composto 6-Cl (**1c**) substituído é um dos mais ativos da série (99% de inibição) e o 6-Br (**1d**) um dos menos ativos (0% de inibição).



**Figura 30.** Mapas de potencial eletrostático para os ribonucleosídeos 6-Br e 7-Br substituídos (acima) e 6-Cl e 7-Cl substituídos (abaixo) respectivamente na conformação *syn*.

### 4.2.3 - Modelagem por Homologia

O modelo obtido por homologia com o modo automático não apresentou visualmente desvios da posição original para os resíduos importantes da região III da DNA polimerase do HSV-1, e o RMS obtido no programa *Swiss-Pdb Viewer* foi de 0,08 Å (Figura 31). Porém, a análise de *Anolea* (Melo e Feytmans, 1998), mostrou regiões desfavoráveis na vizinhança de vários aminoácidos. Este problema foi solucionado após minimização de energia da enzima com o método AMBER (Cornell et al., 1995) no programa *Hyperchem 7.0* (Hypercube, Inc.).

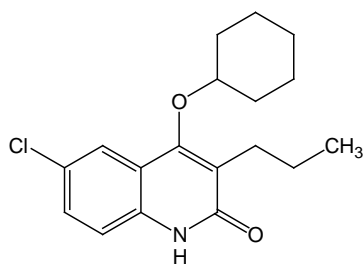


**Figura 31.** Sobreposição da estrutura obtida por homologia (verde) à estrutura de raios-X da DNA polimerase do HSV-1 (magenta).

A estrutura final também foi submetida ao programa *Procheck* (Laskowski et al., 1996) através do endereço <http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES/> a fim de se validar o modelo obtido. Os gráficos de *Ramachandran* obtidos mostraram uma distribuição normal de pontos, com ângulos *Phi* em sua maioria restritos a valores negativos e valores de *Psi* agrupados em regiões distintas com 98,7% dos resíduos ocupando as regiões permitidas.

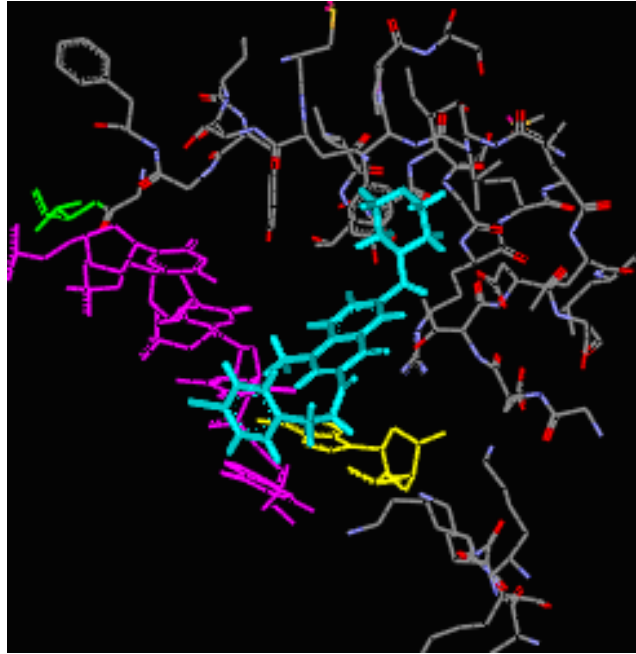
#### 4.2.4 – Estudos de Docking

Antes de se realizar o *docking* com os compostos em estudo, testou-se o programa *Surflex-dock* (Jain, 2003) com a estrutura do PDB 1TKT. Embora nesta estrutura a enzima seja diferente da DNA polimerase (é a Transcriptase Reversa), o ligante possui similaridade estrutural com os análogos de ribonucleosídeos em estudo (Figura 32). Utilizando-se o modo automático o programa não encontrou a posição original do ligante, mas com o modo ligante e com o modo resíduos o programa chegou à estrutura original. O programa também permitiu a rotação da ligação do oxigênio com o anel cicloexano do ligante em teste, ou seja, o programa é capaz de rodar o diedro  $\theta_1$  dos ribonucleosídeos em estudo, que diferencia a conformação *syn* da *anti*.



**Figura 32.** Ligante da estrutura 1TKT (6-Cloro-4-(ciclo-hexil-oxi)-3-propilquinolin- 2(1H)-ona).

Após o teste, fez-se o *docking* com o PNU. Mas com nenhum dos modos de se gerar o sítio ativo o ligante se aproximou da VAL823. Isto ocorreu porque o *template* estava ocupando o espaço próximo a VAL823 (Figura 33).



**Figura 33.** *Template* (magenta) ocupando espaço próximo a V823 (verde).

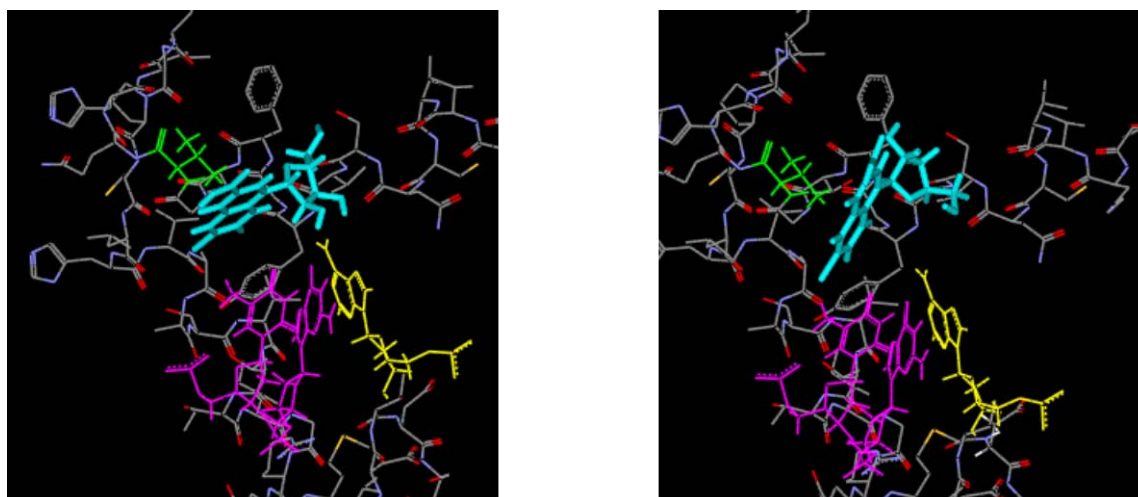
Assim, foi necessário retirar resíduos do *template*, confirmando-se a proposta do modelo de Liu e colaboradores (2006) de que o ligante precisa deslocar resíduos do *template* do sítio ativo para interagir com a enzima.

Em seguida, o teste foi feito com o PNU considerando-se três possibilidades para se gerar o *protomol*:

- 1- Foram selecionados os resíduos da região III (805-845) com um raio de 3Å com relação a cada resíduo selecionado, os resíduos de *template* T6-T10 e os do *primer* P19-21.
- 2- Foram selecionados os resíduos da região III considerados importantes (GLN617, GLN618, LYS811, ASN815, TYR818, PHE820, VAL823 e ASP888) pelo modelo proposto por Liu e colaboradores (2006) com um raio de 10 Å com relação a eles, os resíduos de *template* T6-T10 e os do *primer* P19-21.
- 3- Foi feita a mesma seleção do item 2 mas com um raio de 3 Å com relação aos resíduos selecionados da proteína.

O melhor resultado (conformação mais próxima a do modelo) foi obtido para a terceira tentativa. Utilizou-se então estas condições para se gerar o sítio ativo para o *docking* do composto 6-Cl substituído. Este foi escolhido porque foi um dos compostos mais ativos da série em estudo e, além disso, foi bastante estudado por Souza e colaboradores (2008).

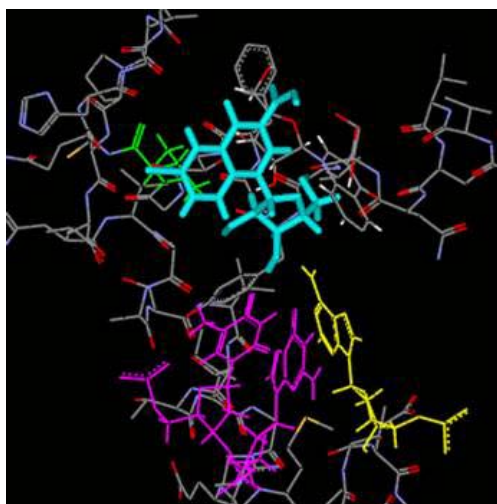
Foi feito o *docking* para o composto 6-Cl substituído nas conformações *syn* e *anti*. Dos arquivos de saída foram escolhidas as conformações em que o cloro se encontrava mais próximo à VAL823. No resultado do *docking* feito com a conformação *syn* obteve-se conformações *syn* e *anti* com o cloro próximo a VAL823. Para o confôrmero *syn* a distância entre o cloro e o átomo mais próximo da VAL823 foi de 4,2 Å e para o *anti* foi de 7,5 Å. Já no resultado do *docking* feito com a conformação *anti*, a estrutura obtida que ficou mais próxima da VAL823 estava na forma *syn*, com uma distância de 5,2 Å entre o cloro e o átomo mais próximo da VAL823. Deste modo, selecionou-se a estruturas obtidas com o *docking* feito com a conformação *syn* (Figura 34) como ponto de partida para se realizar as simulações por DM com as conformações *syn* e *anti*.



**Figura 34.** Resultado do *docking* para as conformações *syn* e *anti* respectivamente do composto 6-Cl substituído (**1c**) (VAL823-verde, ribonucleosídeo-ciano, primer-amarelo, template-magenta).

O *docking* também foi feito para o ribonucleosídeo com substituinte bromo na posição 6 a fim de se verificar se ele se aproximaria da VAL823, uma vez que para este

composto observou-se 0% de atividade anti-HSV-1 (Tabela 1). Porém, em várias das conformações geradas na saída do *docking* o bromo se aproximou da VAL823 (Figura 35). Como não temos dados de IC<sub>50</sub> não é possível dizer se este resultado é incoerente. Além disso, pode ser que o composto se aproxime da VAL823 uma vez dentro do sítio ativo, mas pode ser que na prática ele não apresente atividade por não conseguir chegar até lá, seja por motivo de tamanho ou de solubilidade. Além disso, seria conveniente que houvesse uma convergência entre os resultados obtidos pelas simulações de *docking* feitas com as formas *syn* e *anti*, o que não ocorreu.



**Figura 35.** Resultado do *docking* para a conformação *anti* do composto 6-Br substituído (**1d**) (VAL823-verde, ribonucleosídeo-ciano, *primer*-amarelo, *template*-magenta).

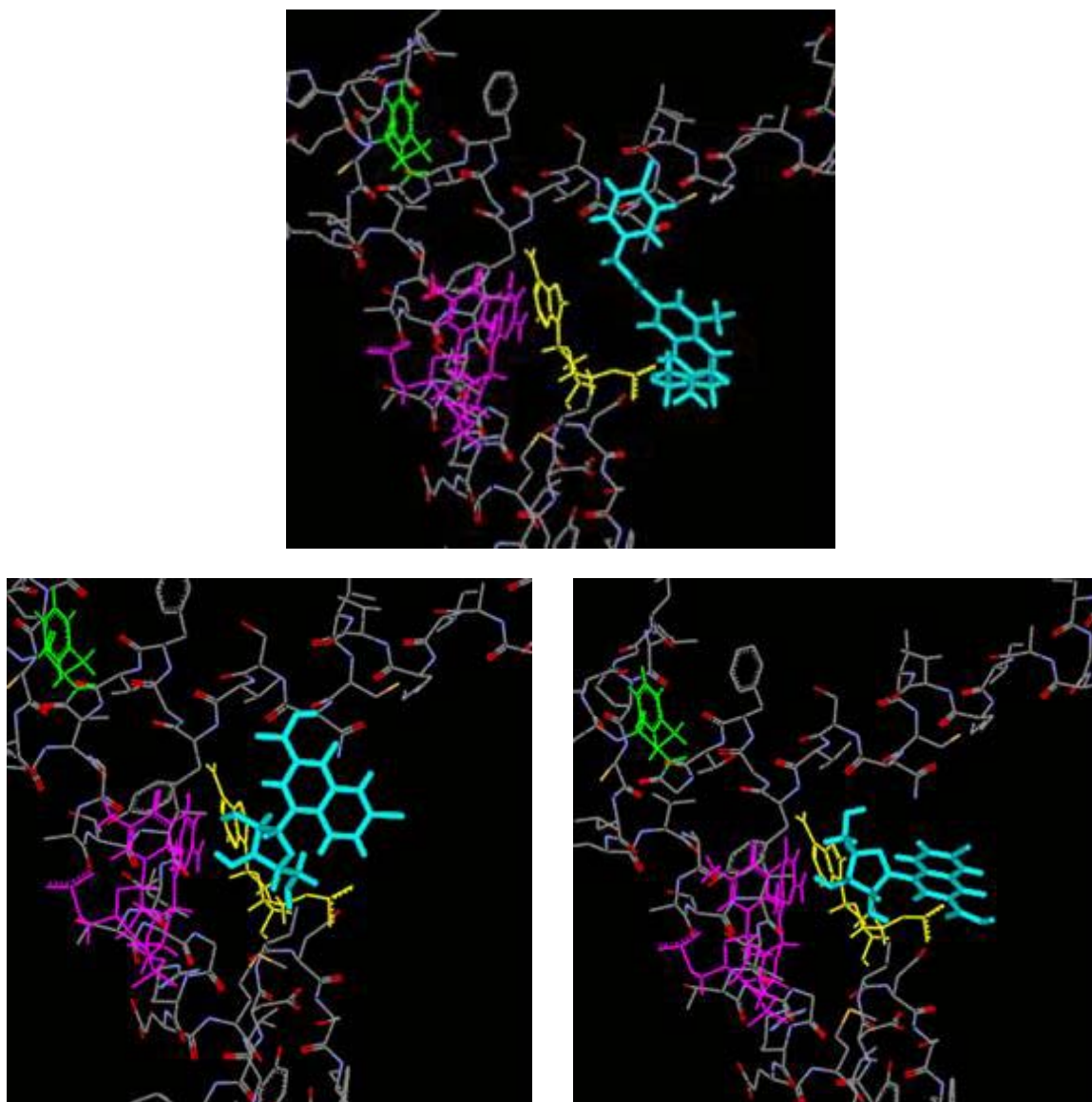
#### 4.2.4.1 – Mutações

De acordo com Thomsen e colaboradores (2003), a mutação na VAL823 para ALA823, que é o resíduo correspondente na DNA polimerase  $\delta$  humana, leva a perda de inibição da polimerase pelo PNU.

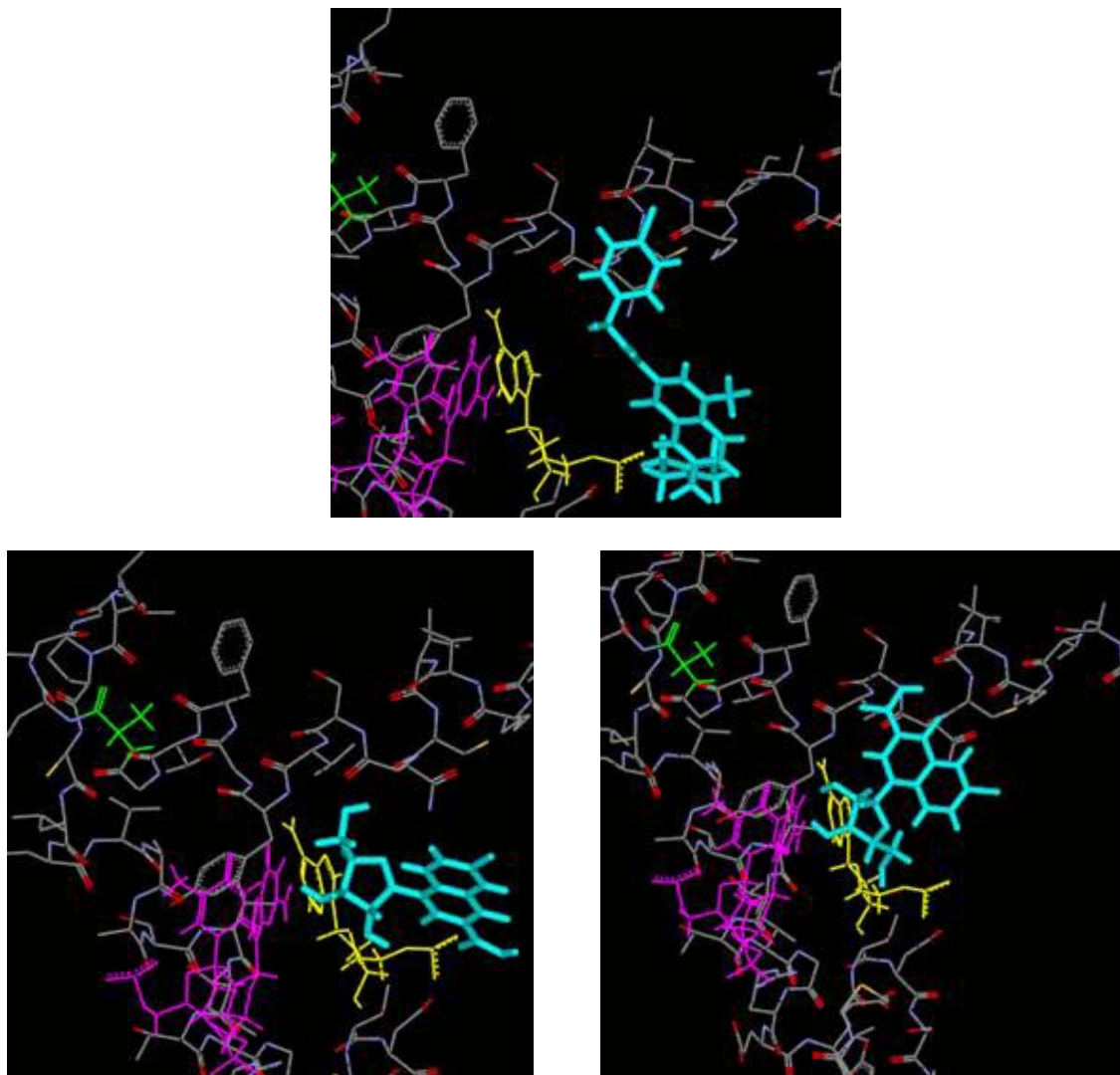
Com base nesta informação, foi feita a mutação da VAL823 para ALA823 e também para PHE823, que seria o resíduo correspondente na DNA polimerase  $\alpha$  humana.



Os resultados do *docking* mostraram que realmente a interação com a VAL823 é determinante, estando de acordo com Thomsen e colaboradores (2003), uma vez que tanto o composto 6-Cl substituído (nas formas *syn* e *anti*) quanto o PNU deixaram de se aproximar do resíduo 823 após a mutação (Figuras 36 e 37).



**Figura 36.** Resultado do *docking* para o PNU e para as conformações *anti* e *syn* respectivamente do composto 6-Cl (**1c**) substituído, para a mutação V823P (PHE823-verde, ribonucleosídeo-ciano, *primer*-amarelo, *template*-magenta).



**Figura 37.** Resultado do *docking* para o PNU e para as conformações *anti* e *syn* respectivamente do composto 6-Cl (**1c**) substituído, para a mutação V823A (ALA823-verde, ribonucleosídeo-ciano, *primer*-amarelo, *template*-magenta).

#### 4.2.5 - Simulações por DM dos Complexos Ligante / DNA Polimerase / DNA

As simulações por DM foram feitas com o programa *AMBER 9.0* conforme descrito na seção 3.4.2. As simulações foram também realizadas com o ribonucleosídeo na forma *anti* embora a distância entre o cloro e a VAL823 tenha sido grande (7,5Å), a fim de se verificar se no decorrer da simulação o átomo de cloro se aproximaria deste e dos demais resíduos da região hidrofóbica. Verificou-se que esta aproximação não ocorreu e,

portanto, relataremos aqui os resultados referentes às simulações feitas com o PNU e com o ribonucleosídeo 6-CI substituído na forma *syn*. Neste ponto vale ressaltar as limitações da simulação realizada: ela foi feita no vácuo e com alguns dos átomos da enzima com posições fixas, com isso, oscilações mais amplas não estariam sendo permitidas.

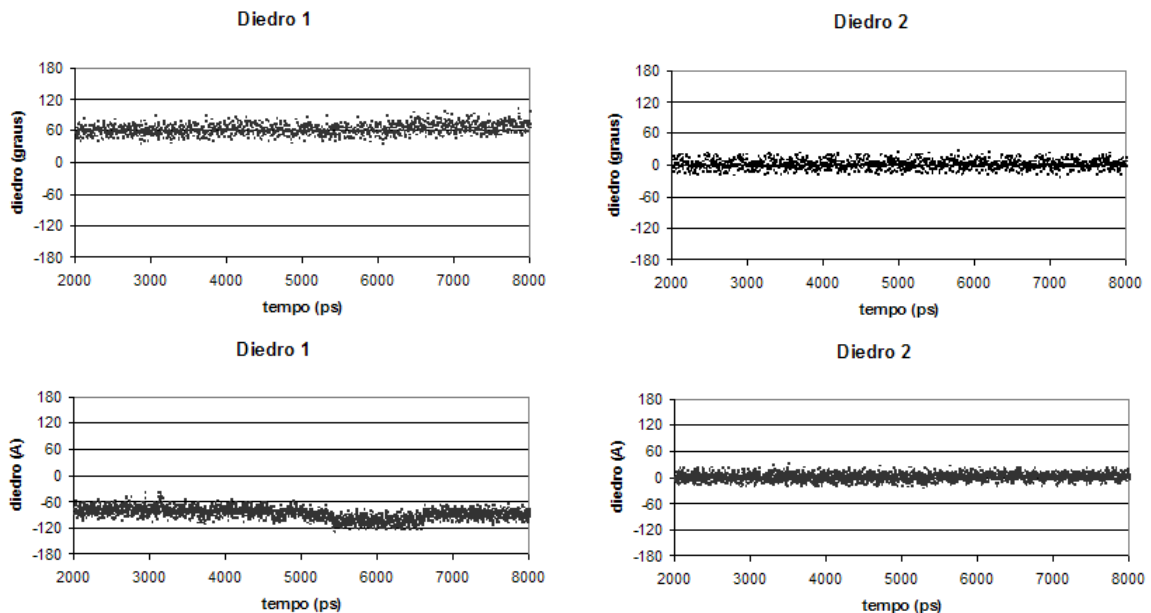
Os resultados mostraram que nos dois primeiros nanossegundos de simulação, tanto o composto 6-CI substituído quanto o PNU apresentaram interações com os resíduos considerados importantes no modelo proposto por Liu e colaboradores (2006) (Tabela 18).

**Tabela 18.** Interações do PNU e do ribonucleosídeo 6-CI substituído (**1c**) com resíduos da DNA polimerase do HSV-1 até 2 ns de simulação (em azul os resíduos considerados importantes pelo modelo de Liu e colaboradores (2006) e em verde as interações comuns aos dois compostos).

Resíduos	6-CI	PNU
ILE504		X
GLY505		X
GLY616	X	X
GLN617	X	X
GLN618	X	X
SER720		X
PRO723		X
VAL812		X
CYS814		X
ASN815	X	X
SER816	X	X
VAL817		X
TYR818	X	X
GLY819	X	X
PHE820	X	X
GLY822	X	
VAL823	X	X
GLN824	X	
HIS825		X
GLY826		X
LEU831	X	
ALA834	X	
ALA835	X	
THR887		X

Após 2 ns as interações são mantidas para o composto 6-CI substituído e ele também passa a interagir com o resíduo THR838 (Tabela 19). A conformação *syn* (monitorada pelo diedro  $\theta_1$ , conforme descrito na seção 4.2.1) foi mantida durante toda a

simulação e a ligação hidrogênio entre COOH<sub>H</sub> e C4=O (monitorada pelo diedro  $\theta_2$ ) também (Figura 38). Embora não se esteja relatando os resultados da simulação para o conformero *anti*, vale comentar que sua conformação foi mantida durante toda a simulação, bem como a ligação hidrogênio entre COOH<sub>H</sub> e C4=O (Figura 38).

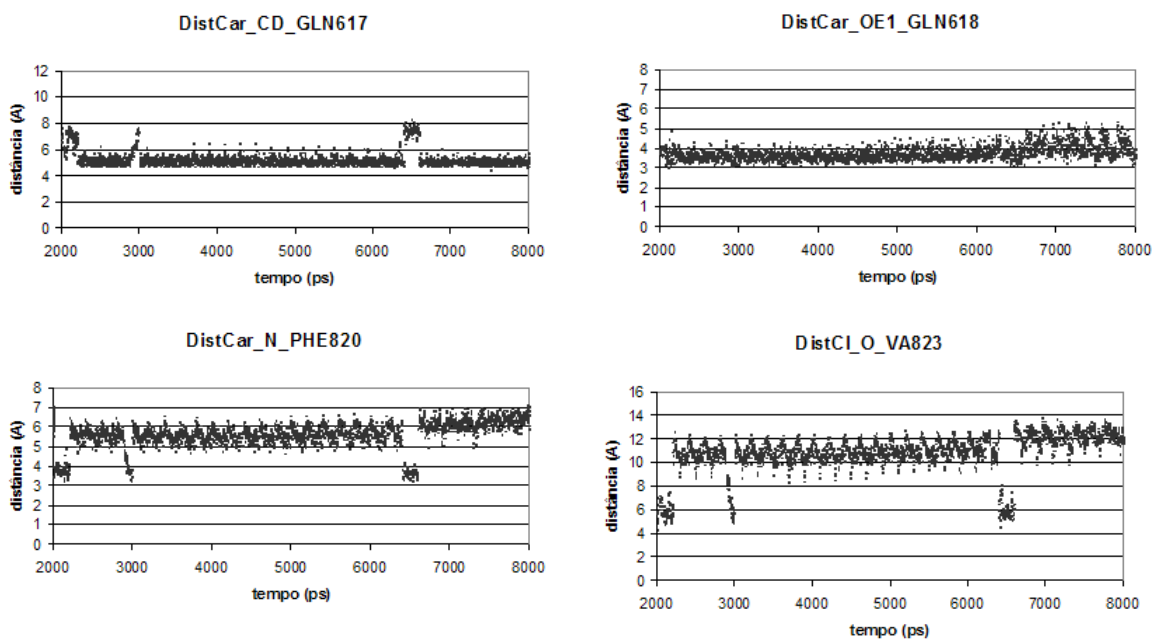


**Figura 38.** Diedros  $\theta_1$  e  $\theta_2$  respectivamente, monitorados durante a simulação para o ribonucleosídeo 6-Cl substituído nas conformações *syn* (acima) e *anti* (abaixo) respectivamente.

Embora o átomo de cloro do PNU pareça ter interações pouco constantes com a VAL823, o grupo 6-cloro-benzila continua a interagir com resíduos da região hidrofóbica (GLN617, GLN618, PHE820 e VAL823) considerados importantes no modelo proposto por Liu e colaboradores (2006) (Figura 39).

**Tabela 19.** Interações do PNU e do ribonucleosídeo 6-Cl substituído (**1c**) com resíduos da DNA polimerase do HSV-1 de 2 a 8 ns de simulação (em azul os resíduos considerados importantes pelo modelo de Liu e colaboradores (2006), em verde as interações comuns aos dois compostos, em laranja as interações ganhas após 2 ns e em cinza as perdas).

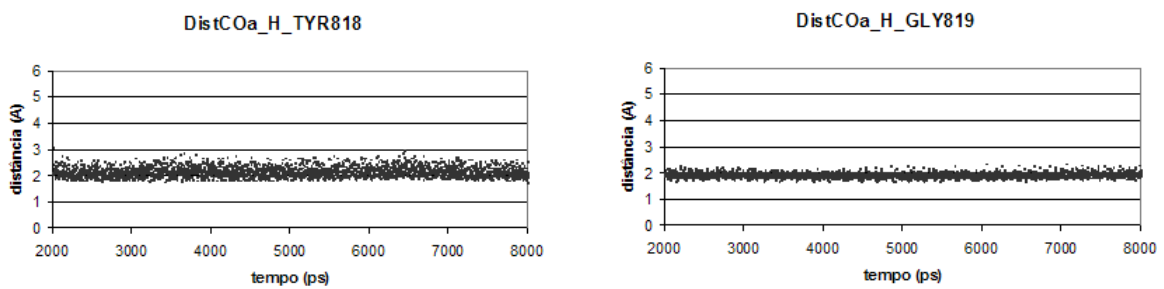
Resíduos	6-Cl	PNU
ILE504		X
GLY505		X
GLY616	X	X
GLN617	X	X
GLN618	X	X
SER720		
TYR722		X
PRO723		X
ILE726		X
LEU734		X
VAL812		X
CYS814		X
ASN815	X	X
SER816	X	X
VAL817		X
TYR818	X	X
GLY819	X	X
PHE820	X	X
GLY822	X	
VAL823	X	
GLN824	X	
HIS825		
GLY826		
LEU831	X	
ALA834	X	
ALA835	X	
VAL837		X
THR838	X	
THR887		



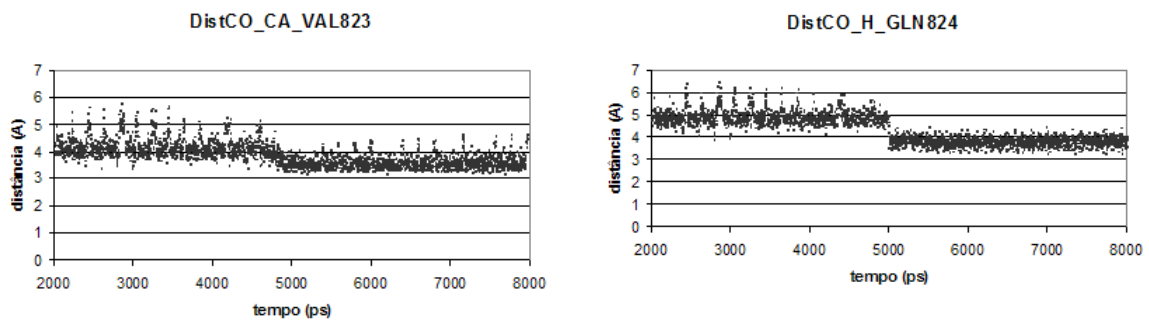
**Figura 39.** Interações do grupo 6-cloro-benzila do PNU com os resíduos da região hidrofóbica GLN617, GLN618, PHE820 e VAL823 de 2 a 8 ns de simulação.

Ligações hidrogênio moderadas com os resíduos TYR818 e GLY819 (distância média entre C=O e H de 1,87-2,11 Å) são mantidas pela carbonila do anel aromático do PNU (Figura 40).

A carbonila do ribonucleosídeo 6-Cl substituído passa a apresentar interações com os resíduos VAL823 e GLN824 em cerca de 5 ns de simulação (Figura 41), mas estas interações são menos intensas do que aquelas feitas pela carbonila correspondente do PNU. Isto provavelmente ocorre porque a metila ligada ao nitrogênio do PNU deve estar contribuindo para um efeito do tipo “push-pull” com a carbonila.



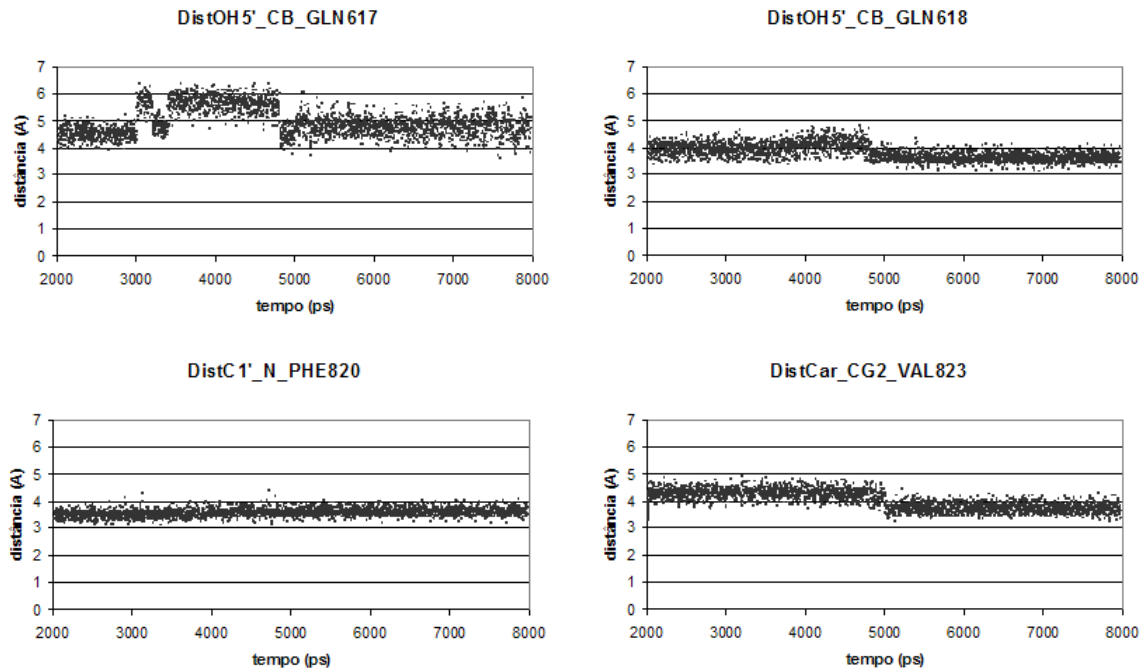
**Figura 40.** Interações da carbonila do PNU com os resíduos TYR818 e GLY819 de 2 a 8 ns de simulação.



**Figura 41.** Interações da carbonila do ribonucleosídeo 6-Cl substituído com os resíduos VAL823 e GLN824 de 2 a 8 ns de simulação.

As interações do ribonucleosídeo com os resíduos GLN617, GLN618, PHE820 e VAL823 da região hidrofóbica do sítio ativo da DNA polimerase do HSV-1 são constantes e estáveis (Figura 42). No entanto, a ribose e o grupo COOH são bastante hidrofílicos e devem preferir a solubilidade em água a interagir com esta região hidrofóbica. Além disso, a carbonila do ribonucleosídeo está comprometida com a ligação hidrogênio monitorada pelo diedro  $\theta_2$ , ficando menos disponível para interações com a enzima.

Outro ponto é que o PNU apresenta interações com mais resíduos da DNA polimerase e é mais ativo que o ribonucleosídeo 6-Cl substituído de acordo com ensaios realizados com células infectadas pelo HSV-1 (Tabela 20). Desta forma buscamos propor modificações estruturais que pudessem vir a aumentar a atividade do ribonucleosídeo em estudo.



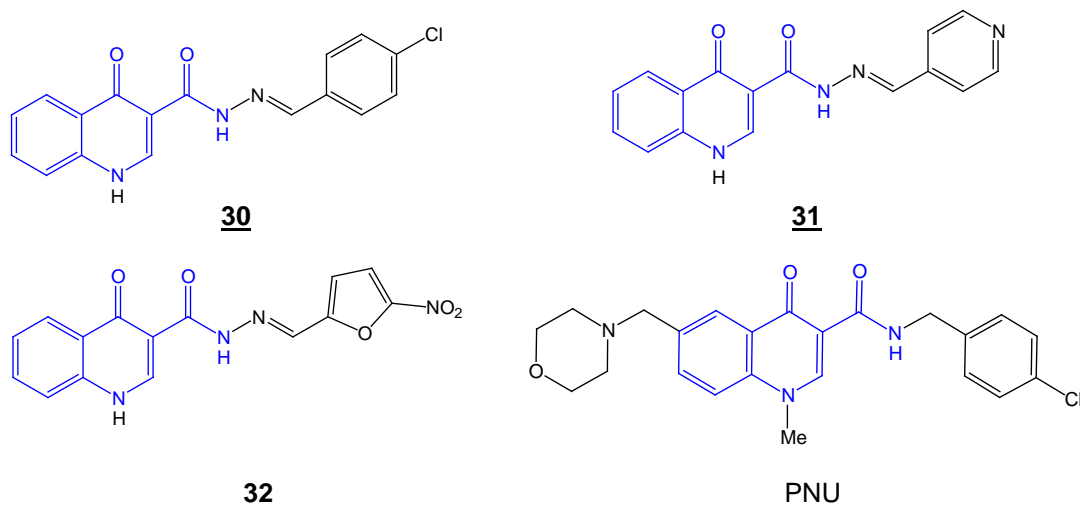
**Figura 42.** Interações do ribonucleosídeo 6-Cl substituído com os resíduos da região hidrofóbica GLN617, GLN618, PHE820 e VAL823 de 2 a 8 ns de simulação.

**Tabela 20.** Atividade antiviral frente ao HSV-1 para o ribonucleosídeo 6-Cl substituído (Canuto et al., 2007) e para o PNU (Brideau et al., 2002) comparados ao ACV.

Substância	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	Substância	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
6-Cl	1,5	PNU	3,3
ACV	1,25	ACV	3,9

#### 4.2.6 - Proposição de Novas Substâncias

Santos, F.C. em sua tese de Doutorado sintetizou os compostos **30**, **31** e **32** da Figura 43 (Santos, 2009).



**Figura 43.** Derivados quinolônicos acilidrazonas **30**, **31**, **32** e PNU-183792 respectivamente.

Estes compostos foram testados contra o HIV em células PBMC (dados não publicados fornecidos pela Prof<sup>a</sup>. Izabel C. P. P. Frugulhetti) e os resultados encontram-se na Tabela 21. Os ensaios foram realizados como descrito por Souza e colaboradores (2008).

**Tabela 21.** Resultados de testes de atividade antiviral *in vitro* frente ao vírus HIV-1 dos derivados quinolônicos acilidrazonas **30**, **31** e **32** (Figura 43).

Substância	% de inibição (50 $\mu$ M)	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
<b>30</b>	99	3,4
<b>31</b>	10	100
<b>32</b>	40	56

Estes compostos são interessantes para este trabalho devido à sua semelhança estrutural com o PNU (porção em azul na Figura 43) e com os ribonucleosídeos em estudo. Por isso, eles foram submetidos ao programa *Osiris* (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo>) para avaliação de suas propriedades semelhantes a um fármaco (*Drug-likeness*).



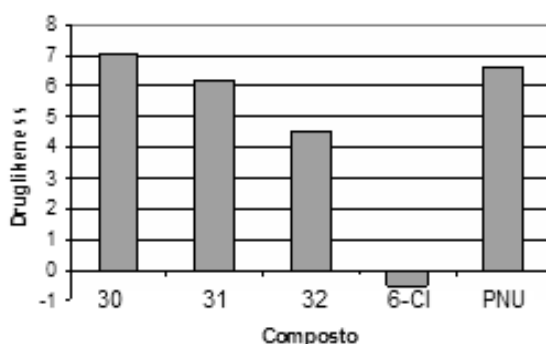
No programa *Osiris* a frequência de ocorrência de cada fragmento de uma molécula candidata a fármaco é determinada dentro de uma coleção de fármacos comerciais e dentro de um banco de compostos supostamente sem as características de *Drug-likeness*. O processo de predição é baseado numa lista de cerca de 5300 fragmentos distintos associados a uma classificação *Drug-likeness*.

O *Drug-likeness* ( $d$ ) é calculado de acordo com a Equação 6:

$$d = \frac{\sum v_i}{\sqrt{n}} \quad (\text{Equação 6})$$

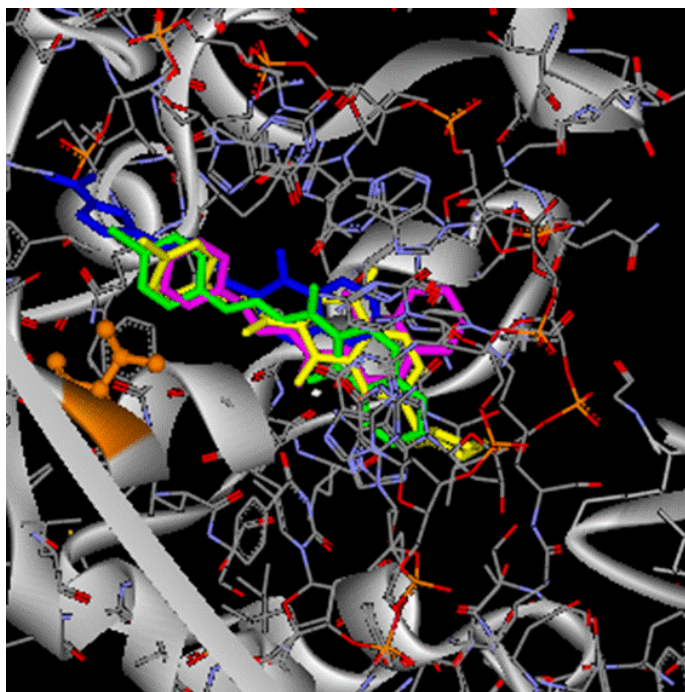
Onde se calcula a razão do somatório dos valores de *Drug-likeness* ( $v_i$ ) dos fragmentos que estão presentes na estrutura em avaliação pela raiz do número de fragmentos ( $n$ ).

De acordo com os resultados obtidos (Figura 44), destaca-se que o composto **30** apresentou um *Drug-likeness* maior do que o PNU, e este foi o composto mais ativo frente ao vírus HIV (Tabela 21). O ribonucleosídeo 6-Cl substituído apresentou um *Drug-likeness* negativo, indicando que modificações estruturais conforme estamos propondo seriam interessantes a fim de torná-lo um melhor candidato à fármaco.



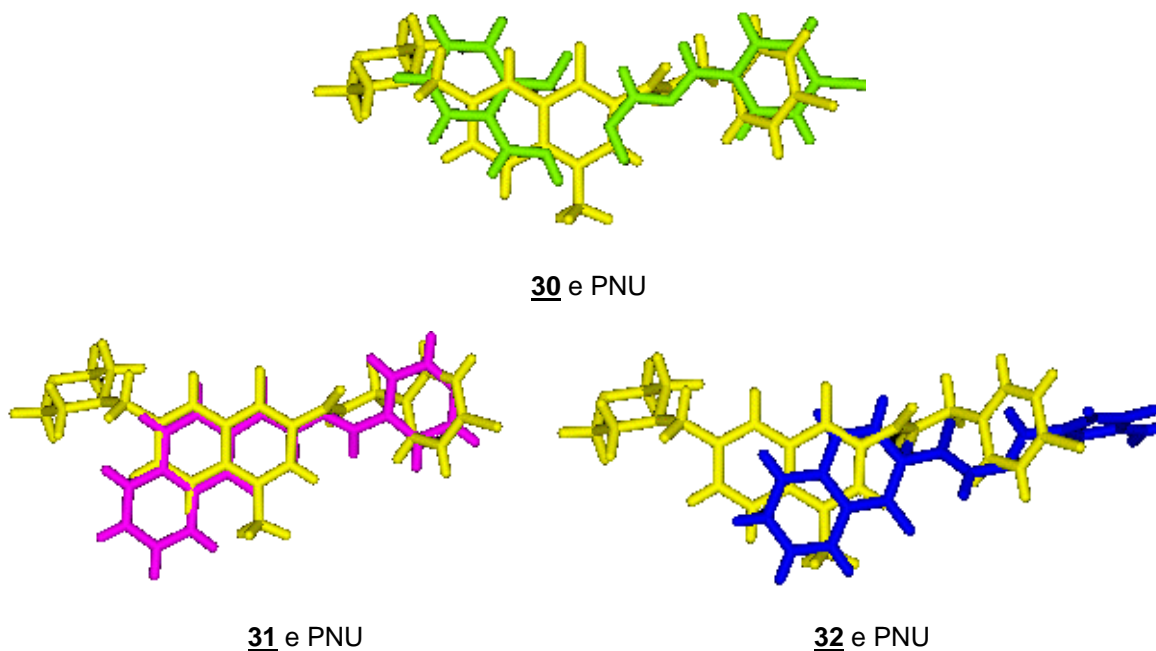
**Figura 44.** Gráfico de *Drug-likeness* para os compostos **30**, **31**, **32**, ribonucleosídeo 6-Cl substituído (**1c**) e PNU.

Em seguida foi feito o *docking* no programa *Surflex-dock* dos compostos **30**, **31** e **32** com a DNA polimerase do HSV-1. O resultado encontra-se na Figura 45.



**Figura 45.** Resultado do *docking* dos compostos 30, 31 e 32 com a DNA polimerase do HSV-1. (PNU – amarelo, 30 - verde, 31 - magenta, 32 - azul, VAL823 - laranja).

De acordo com a Figura 46, o composto 30 apresentou um arranjo espacial bem similar ao do PNU, indicando que sua atividade anti-HSV-1 deve ser testada.



**Figura 46.** Sobreposição das estruturas de saída do *docking* para os compostos 30, 31 e 32 ao PNU (PNU - amarelo, 30 - verde, 31 - magenta, 32 - azul).

Esta similaridade de comportamento com o PNU e a maior atividade frente ao HIV observada para o composto **30** pareceu bem interessante e nos levou a investigar se alguma enzima do HIV teria uma região em comum com a região III da DNA polimerase do HSV-1. Verificou-se que a Transcriptase Reversa do HIV possui um domínio DNA polimerase. Verificou-se também que a DNA polimerase I e domínio DNA polimerase da Transcriptase Reversa embora não apresentem homologia significativa de seqüência primária, compartilham características estruturais em seus domínios polimerase. Por isso verificamos a estrutura tridimensional de ambas as enzimas. No entanto, embora uma das alfas-hélices da DNA polimerase do HSV-1 tenha tido boa sobreposição com uma alfa-hélice do domínio DNA polimerase da Transcriptase Reversa, a outra alfa-hélice bem como a região em que se encontra a VAL823 não se sobrepuseram bem, o que não permitiu justificar a observação (Anexo I).

Mesmo assim aproveitou-se a análise das estruturas **30**, **31** e **32** para se propor modificações estruturais para o ribonucleosídeo 6-Cl substituído.

O resultado do estudo de *docking* foi submetido ao programa *LPC* (Sobolev et al., 1999) para análise de interações. Verificou-se que embora os três compostos apresentem treze interações em comum com o PNU, o composto **30** é o que apresenta interações na região próxima ao resíduo ASP888 (Tabela 22) que seria importante para interações com o PNU de acordo com o modelo proposto por Liu e colaboradores (2006).

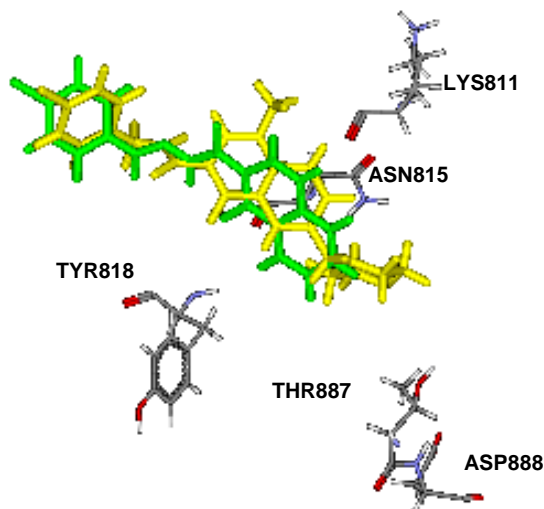
**Tabela 22.** Interações do PNU e compostos **30**, **31** e **32** com resíduos da DNA polimerase do HSV-1 (em azul os resíduos considerados importantes pelo modelo de Liu e colaboradores (2006), em verde as interações em comum com o PNU e em rosa resíduo próximo a ASP888).

Resíduos	30	31	32	PNU
ILE504	X	X	X	X
GLY616		X	X	X
GLN617	X	X	X	X
GLN618	X	X	X	X
ILE619			X	
GLN640	X		X	
SER720				X
PRO723				X
LYS811		X		X
VAL812			X	X
CYS814				X
ASN815	X	X	X	X
SER816	X	X	X	X
TYR818	X	X		X
GLY819	X	X	X	X
PHE820	X	X	X	X
VAL823	X	X	X	X
HIS825	X		X	X
GLY826	X		X	
THR887	X			X
P20	X	X	X	X
P21	X	X	X	X

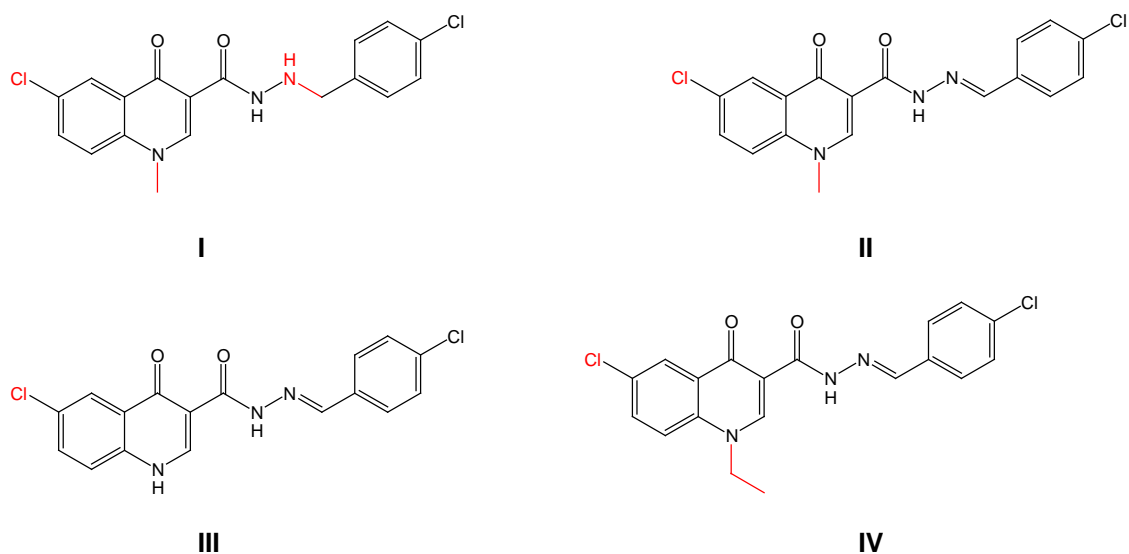
Com base na Figura 47, para se aumentar as interações na região próxima ao resíduo ASP888, pensou-se em fazer as seguintes modificações estruturais no composto **30** (Figura 48), que teria um cloro na posição 6 uma vez que seria obtido a partir de propostas de modificações estruturais no ribonucleosídeo 6-Cl substituído:

- 1- Adicionar uma metila na posição 1 e tirar a dupla ligação entre o carbono e o nitrogênio. Talvez a livre rotação permita uma conformação ainda mais similar a do PNU.
- 2- Simplesmente adicionar uma metila na posição 1. Talvez isto mantenha a conformação obtida mas permita uma maior aproximação do composto a outros resíduos.
- 3- Caso a metila não faça diferença, talvez simplesmente a presença do cloro na posição 6 aumente o alcance que seria correspondente ao anel morfolina do PNU.

4- O composto com uma etila na posição 1 já foi sintetizado por F.C. Santos (Santos, 2009). Por isso, este composto também foi testado nos estudos de *docking*.

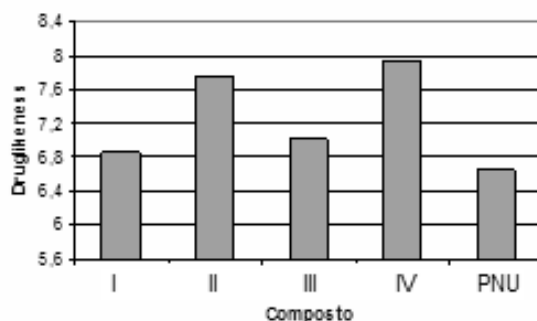


**Figura 47.** PNU (amarelo), composto **30** (verde), alguns dos resíduos importantes no modelo de Liu e colaboradores (2006) e resíduos próximos a ASP888.



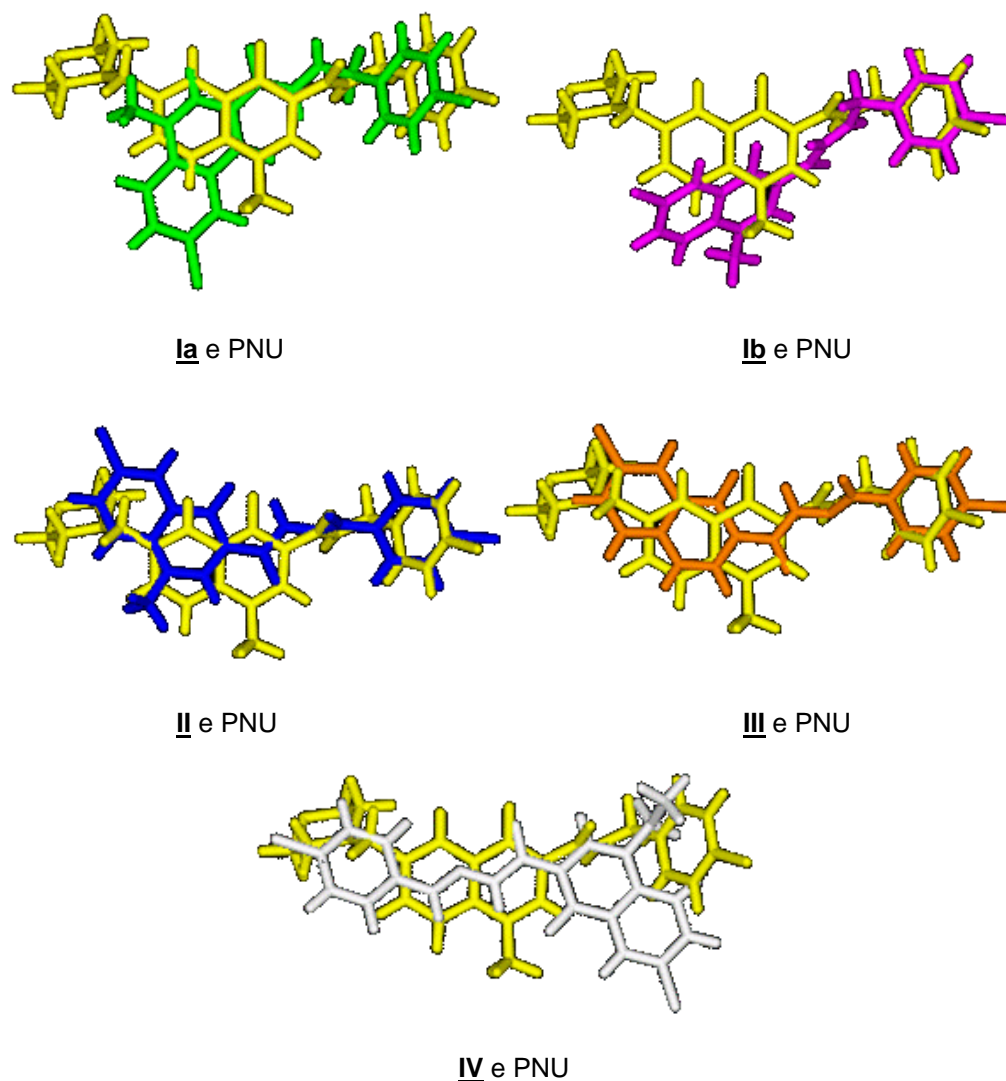
**Figura 48.** Estruturas propostas I, II e III e substância IV já sintetizada (Santos, 2009) respectivamente (em vermelho as modificações propostas).

Foi feito o *docking* das estruturas propostas com a DNA polimerase do HSV-1 e também o gráfico de *Drug-likeness* das mesmas. De acordo com o gráfico, as substâncias propostas **II** e **IV** apresentam os mais altos valores de *Drug-likeness*, maior até do que o do PNU devendo ser, portanto, boas candidatas a fármacos (Figura 49).



**Figura 49.** Gráficos de *Drug-likeness* para as substâncias propostas **I**, **II**, **III** e **IV** e para o PNU.

Na Figura 50 encontram-se os resultados do *docking* das estruturas propostas **I**, **II**, **III** e **IV**. A estrutura proposta **I** apresentou duas conformações plausíveis, uma com a metila apontando na direção do anel morfolina do PNU (estrutura proposta **Ia**) e outra com a metila na mesma direção da metila do PNU (estrutura proposta **Ib**). As estruturas propostas **II** e **III** foram as que apresentaram uma disposição espacial mais similar a do PNU.



**Figura 50.** Resultado do *docking* das estruturas propostas **I**, **II**, **III** e **IV** com a DNA polimerase do HSV-1 sobrepostas ao PNU (PNU – amarelo, estrutura proposta **Ia** - verde, estrutura proposta **Ib** - magenta, estrutura proposta **II** - azul, estrutura proposta **III** - laranja, estrutura proposta **IV** - branco).

A análise das interações (Tabela 23) mostrou que os compostos **II** e **III** foram os que mais ganharam interações com os resíduos que o PNU interage sem perder nenhuma interação que o composto **30** fazia. Embora o composto **III** seja o que ganhou mais interações com relação ao composto **30** (cinco interações, sendo duas em comum com o PNU), o composto **II** foi o que ganhou mais interações com resíduos que o PNU interage (ganhou quatro, sendo três em comum com o PNU).

**Tabela 23.** Interações do PNU e das estruturas propostas I, II, III e IV com resíduos da DNA polimerase do HSV-1 (verde- interações em comum com o PNU, laranja - interações ganhas com relação ao composto **30**, cinza - interações perdidas com relação ao composto **30**).

Resíduos	Ia	Ib	II	III	IV	PNU
ILE504	X	X	X	X	X	X
LYS534		X				
GLY616			X	X	X	X
GLN617	X	X	X	X	X	X
GLN618	X	X	X	X	X	X
ILE619						
GLN640	X		X	X		
SER720						X
TYR722			X	X		
PRO723			X			X
LYS811	X	X				X
VAL812	X	X		X		X
CYS814			X			X
ASN815	X	X	X	X	X	X
SER816	X	X	X	X	X	X
TYR818		X	X	X	X	X
GLY819	X	X	X	X	X	X
PHE820	X	X	X	X	X	X
VAL823	X	X	X	X	X	X
HIS825	X	X	X	X		X
GLY826	X		X	X		
LEU827				X		
THR887	X		X	X	X	X
T6				X		
P18					X	
P20	X	X	X	X	X	X
P21	X	X	X	X	X	X

Por conta do que foi descrito no parágrafo anterior, estamos propondo a síntese da estrutura II (Figura 51) que além de apresentar um alto valor de *Drug-likeness* (Figura 49), apresentou incrementos de interação com relação à estrutura **30** com os resíduos GLY616, TYR722, PRO723 e CYS814, e essas interações são importantes por serem mantidas pelo PNU durante as simulações por DM. Além disso, a presença da metila na estrutura II a torna mais interessante do que a III, devido ao efeito “*push-pull*” que pareceu ser importante durante as simulações por DM com o PNU.



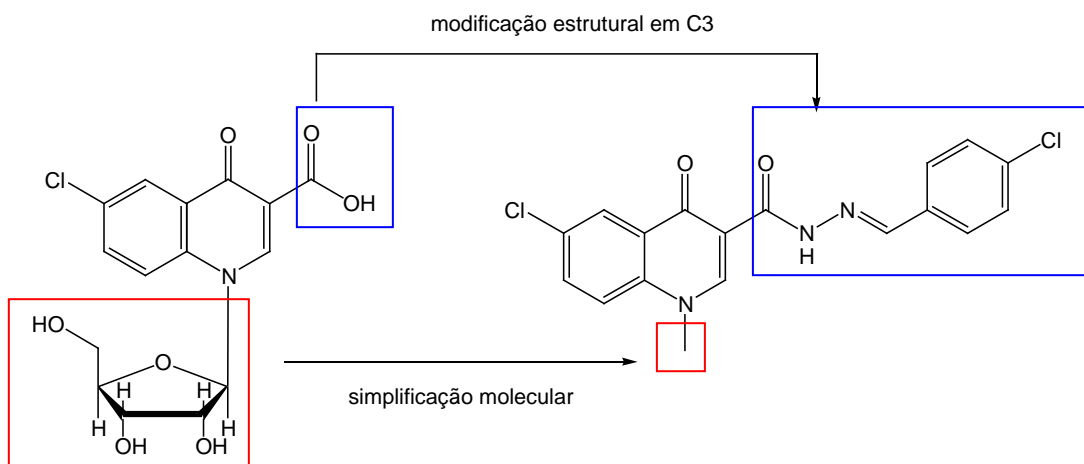


Figura 51. Modificações estruturais propostas para o ribonucleosídeo 6-Cl substituído.

# ***Conclusões***

---

## **5** *Conclusões*

---

### **5.1 – Estudos de Relação Estrutura-Propriedade**

Com relação aos estudos de Modelagem Molecular de compostos modelo verificou-se que a interpretação de efeitos estéricos no sistema adamantano também pode ser aplicada à variação nos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  causados pela introdução de grupos metila no bornano com relação ao norbornano e na cânfora com relação à norcânfora. Eles também mostraram que para os sistemas estudados a redução nos comprimentos de ligação C-H estão associadas a interações estéricas levando a desblindagem nos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$ . Porém, a introdução de substituintes nas posições R1 e R2 levaram a distorções angulares, que se tornaram mais fortes na cânfora com relação à norcânfora devido a interações estéricas que surgem da introdução de grupos metila. Dados os modelos apropriados, os deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  são provas eficientes para efeitos estéricos. Eles confirmam as significativas interações entre o grupo carbonila e outros substituintes e indicam que, em todas as situações investigadas, o bromo apresentou um efeito estérico maior do que o grupo metila embora seu raio de van der Waals seja considerado menor.

## **5.2 – Estudos de Relação Estrutura- Atividade**

Com relação aos estudos de Modelagem Molecular de substâncias com atividade antiviral, os resultados de simulações por DM no vácuo para o ribonucleosídeo 7-OMe substituído estão de acordo com a estrutura cristalina obtida por raios-X e com cálculos DFT, onde o confômero *anti* é o mais estável.

As simulações em água não só para o ribonucleosídeo 7-OMe substituído, mas para todos os demais ribonucleosídeos estudados mostrou que ambos os confômeros podem existir a 300K, a temperatura dos testes *in vivo* e *in vitro*, o que mostra que ambos os confômeros devem ser levados em consideração em um estudo de simulação por DM do complexo enzima-inibidor. Deste modo a conformação não deve ser o fator responsável pelas diferenças de atividade observadas.

Não foi possível se racionalizar as diferenças de atividade observadas para os ribonucleosídeos estudados por SAR e nem por estudos de *docking*.

A necessidade de se retirar resíduos do *template* para se realizar os estudos de *docking* confirmou a proposta do modelo de Liu e colaboradores (2006) de que o ligante precisa deslocar resíduos do *template* do sítio ativo para interagir com a enzima.

Os resultados dos estudos de *docking* mostraram que realmente a interação com o resíduo VAL823 é determinante para a atividade dos compostos tipo PNU frente ao HSV-1, uma vez que tanto o ribonucleosídeo 6-Cl substituído (nas formas *syn* e *anti*) quanto o PNU deixaram de se aproximar do resíduo 823 após a mutação do mesmo para resíduos correspondentes aos de DNA polimerases humanas.

Embora o átomo de cloro do PNU pareça ter interações pouco constantes com a VAL823 durante as simulações por DM, o grupo 6-cloro-benzila continua a interagir com os resíduos da região hidrofóbica da DNA polimerase do HSV-1, considerados importantes de acordo com o modelo proposto por Liu e colaboradores (2006).

A metila ligada ao nitrogênio do PNU deve estar contribuindo para um efeito “*push-pull*” com a carbonila, uma vez que esta apresentou interações mais intensas com

resíduos da DNA polimerase do HSV-1 do que a carbonila do ribonucleosídeo 6-Cl substituído durante as simulações por DM.

O composto **30** (Figura 43) sintetizado por F.C. Santos deve ser um forte candidato a agente anti-HSV-1 de acordo com os estudos de *docking* realizados.

Com base nos estudos de *docking* e DM realizados foram propostas quatro substâncias candidatas a agentes anti-HSV-1 numa tentativa de se melhorar a atividade do ribonucleosídeo 6-Cl substituído. Dentre elas a estrutura **II** (Figura 51) foi selecionada como melhor candidata.

## Referências Bibliográficas

---

- Abraham, R.J.; Barlow, A.P.; Rowan, A.E. Substituent Chemical Shifts in NMR. Part 4 -  $^1\text{H}$  SCS in Some 2-Substituted Norbornanes and Bornanes. *Magn.Reson.Chem.*, **1989**, 27 (11),1074-1084.
- Abraham, R.J.; Ainger, N.J. Proton Chemical Shifts in NMR. Part 13. Proton Chemical Shifts in Ketones and the Magnetic Anisotropy and Electric Field Effect of the Carbonyl Group. *J.Chem.Soc.Perkin Trans. 2*, **1999**, 441-448.
- Abraham, R.J. A Model for the Calculation of Proton Chemical Shifts in Non-conjugated Organic Compounds. *Progr. Nucl. Magn. Reson. Spectr.*, **1999**, 35 (2), 85-152.
- Adcock, W.; Lunsmann, L.; Peralta, J.E.; Contreras, R.H. DFT-GIAO and DFT-NBO Studies of the Origin of  $^{19}\text{F}$  NMR Shielding Effects in Alkyl Fluorides. *Magn.Res.Chem.*, **1999**, 37, 167-172.
- Allinger, N.L.; Chen, K.; Lii, J.H. An Improved Force Field (MM4) for Saturated Hydrocarbons. *J.Comp.Chem.*, **1996**, 17 (5-6), 642-668.
- Allinger, N.L.; Yuh, Y.H.; Lii, J.H. Molecular Mechanics. The MM3 Force Field for Hydrocarbons *J.Am.Chem.Soc.*, **1989**, 111 (23), 8551-8565.
- Amaral do, A.T.; Montanari, C.A. Química Medicinal: 25 Anos de Planejamento Racional de Fármacos. *Química Nova*, **2002**, 25 (supl. 1), 39-44.
- Arnold, K.; Bordoli, L.; Kopp, J.; Schwede, T. The Swiss-Model Workspace: a Web-Based Environment for Protein Structure Homology Modeling. *Bioinformatics*, **2006**, 22 (2), 195-201.
- Becke, A.D. Density-functional Exchange-energy Approximation with Correct Asymptotic Behaviour. *Phys. Rev.*, **1988**, A38 (6), 3098-3100.
- Becke, A.D. Density-functional Thermochemistry. III. The Role of Exact Exchange. *J.Chem.Phys.*, **1993**, 98 (7), 5648-5652.

- Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N.; Bourne, P.E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, **2000**, *28*, 235-242.
- Brady, R.C.; Bernstein, D.I. Treatment of Herpes Simples Vírus Infections. *Antivir. Res.*, **2004**, *61*, 73-81.
- Breneman, C.M.; Wiberg, K.B. Determining Atom-centered Monopoles from Molecular Electrostatic Potentials. The Need for High Sampling Density in Formamide Conformational Analysis. *J.Comp.Chem*, **1990**, *11*, 361-373.
- Brideau, R.J.; Knechtel, M.L.; Huang, A.; Vaillancourt, V.A.; Vera, E.E.; Oien, N.L.; Hopkins, T.A.; Wieber, J.L.; Wilkinson, K.F.; Rush, B.D.; Schwende, F.J.; Wathen, M.W. Broad-spectrum Antiviral Activity of PNU-183792, a 4-oxo-dihydroquinoline, Against Human and Animal Herpesviruses. *Antivir. Res.*, **2002**, *54*, 19-28.
- Burket, U.; Allinger, N.L. *Molecular Mechanics*, ACS Monograph 177, **1982**, American Chemical Society, Wasington, DC.
- Campos, M.G. Estudos de Ressonância Magnética Nuclear de 3-endo e 3-exo-Halobiciclo[2.2.1]heptan-2-onas. *Tese de Mestrado*, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, **2001**.
- Canuto, C.V.B.S.; Gomes, C.R.B.; Marques, I.P.; Faro, L.V.; Santos, F.C.; Frugulhetti, I.C.P.P.; Souza, T.M.L.; Romeiro, G.A.; Ferreira, V.F.; Souza, M.C.B.V. Synthesis and Anti-HSV-1 Activity of 1,4-dihydro-4-oxoquinoline Ribonucleosides. *Lett.Drug Des.Discov.*, **2007**, *4* (6), 404-409.
- Carey, F.A.; Sundberg, R.J. *Advanced Organic Chemistry, Part A: Structure and Mechanisms*. 4<sup>th</sup> ed, Kluwer/ Plenum, New York, **2000**, Chapter 3.
- Case, D.A.; Pearlman, D.A.; Caldwell, J.W.; Cheatham III, T.E.; Wang, J.; Ross, W.S.; Simmerling, C.L.; Darden, T.A.; Stanton, R.V.; Cheng, A.L.; Vincent, J.J.; Crowley, M.; Tsui, V.; Gohlke, H.; Radmer, R.J.; Duan, Y.; Pitera, J.; Massova, I.; Seibel, G.L.; Singh, U.C.; Weiner, P.K.; Kollman, P.A. *AMBER 7*. University of California, San Francisco, **2002**.
- Case, D.A.; Darden, T.A.; Cheatham III, T.E.; Simmerling, C.L.; Wang, J.; Duke, R.E.; Luo, R.; Merz, K.M.; Pearlman, D.A.; Crowley, M.; Walker, R.C.; Zhang, W.; Wang,

B.; Hayik, S.; Roitberg, A.; Seabra, G.; Wong, K.F.; Paesani, F.; Wu, X.; Brozell, S.; Tsui, V.; Gohlke, H.; Yang, L.; Tan, C.; Mongan, J.; Hornak, V.; Cui, G.; Beroza, P.; Mathews, D.H.; Schafmeister, C.; Ross, W.S.; Kollman, P.A. *AMBER* 9. University of California, San Francisco, **2006**.

Clercq de, E. Antiviral Drugs: Current State of the Art. *J. Clin. Virology*, **2001**, *22*, 73-89.

Clercq de, E. Antiviral Drugs in Current Clinical Use. *J Clin Virol*, **2004**, *30*, 115-133.

Clercq de, E. Acyclic Nucleoside Phosphonates: Past, Present and Future: Bridging Chemistry to HIV, HBV, HCV, HPV, Adeno-, Herpes-, and Poxvirus Infections: The Phosphonate Bridge. *Biochem. Pharmacol.*, **2007**, *73*, 911-922.

Clercq de, E. The Acyclic Nucleoside Phosphonates from Inception to Clinical Use: Historical Perspective. *Antivir. Res.*, **2007**, *75*, 1-13.

Cornell, W.D.; Cieplak, P.; Bayly, C.I.; Gould, I.R.; Merz Jr., K.M.; Ferguson, D.M.; Spellmeyer, D.C.; Fox, T.; Caldwell, J.W.; Kollman, P.A. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids and Organic Molecules. *J.Am.Chem.Soc.*, **1995**, *117*, 5179-5197.

Cramer, R.D.; Patterson, D.E.; Bunce, J.D. Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA). 1. Effect of Shape on Binding of Steroids to Carrier Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 5959-5967.

Cruz de la, A.; Elguero, J.; Goya, P.; Martinez, A.; de Clercq, E. Synthesis and Biological Evaluation of 4-quinolone Ribosides. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, **1993**, *7*, 845-849.

Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle Mesh Ewald (PME): a  $N \log(N)$  Method for Ewald Sums in Large Systems. *J. Chem. Phys.*, **1993**, *98*, 10089-10092.

Della, E.W.; Lochert, I.J.; Peralta, J.E.; Contreras, R.H. A DFT/GIAO/NBO and Experimental Study of  $^{13}\text{C}$  SCSs in 1-X-bicyclo[1.1.1] Pentanes. *Mag. Reson. Chem.*, **2000**, *38*, 395-402.

Dewar, M.J.S.; Theil, W. Ground States of Molecules. 38. The MNDO Method: Approximations and Parameters. *J.Am.Chem.Soc.*, **1977**, *99*, 4899-4907.



- Dewar, M.J.S.; Zoebisch, E.G.; Healy, E.F.; Stewart, J.J.P. The Development and Use of Quantum Mechanical Molecular Models. 76. AMI: a New General Purpose Quantum Mechanical Molecular Model. *J.Am.Chem.Soc.*, **1985**, *107*, 3902-3909.
- Ditchfield, R. Self-consistent Perturbation Theory of Diamagnetism I. A Gauge-invariant LCAO Method for NMR Chemical Shifts. *Mol. Phys.*, **1974**, *27*, 789-807.
- Donohue, J.; Trueblood, K.N. Base Pairing in DNA. *J. Mol. Biol.*, **1960**, *2*, 363-371.
- Ernst, M.E.; Franey, R.J. Acyclovir- and Gancyclovir- Induced Neurotoxicity. *Ann. Pharmacother*, **1998**, *32*, 111-113.
- Fatahzadeh, M.; Schwartz, R.A. Human Herpes Simplex Virus Infections: Epidemiology, Pathogenesis, Symptomatology, Diagnosis and Management. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **2007**, *57* (5), 737-763.
- Foloppe, N.; Nilsson, L. Toward a Full Characterization of Nucleic Acid Components in Aqueous Solution: Simulation of Nucleosides. *J. Phys. Chem. B*, **2005**, *109*, 9119-9131.
- Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Gill, P.M.W.; Johnson, B.G.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Keith, T.G.; Peterson, G.A.; Montgomery, J.A.; Raghavachari, K.; Al-Laham, M.A.; Zakrzewski, V.G.; Ortiz, J.V.; Foresman, J.B.; Cioslowski, J.; Stefanov, B.B.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Peng, C.Y.; Ayala, P.Y.; Chen, W.; Wong, N.W.; Andress, J.L.; Replogle, E.S.; Gomperts, R.; Martin, R.L.; Fox, D.J.; Binkley, J.S.; Defrees, D.J.; Baker, J.; Stewart, J.P.; Head-Gordon, M.; Gonzalez, C.; Pople, J.A. *Gaussian 98*. Gaussian Inc. Pittsburg, PA, **1998**.
- Gauze, G.F.; Campos, M.G.; Basso, E.A.; Rittner, R.; Abraham, R.J. <sup>1</sup>H Chemical Shifts in NMR. Part 24. Proton Chemical Shifts in Some *Gem*-difunctional Compounds: 3-*endo* and 3-*exo* Substituted Norbornanones. *J.Phys.Org.Chem.*, **2006**, *19*(6), 376-383.
- Gelbin, A.; Schneider, B.; Clowney, L.; Hsieh, S.H.; Olson, W.K.; Berman, H.M. Geometric Parameters in Nucleic Acids: Sugar and Phosphate Constituents. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 519-529.

- Gibbs, J.S.; Chou, H.C.; Bastow, K.F.; Cheng, Y.C.; Cohen, D.M. Identification of Aminoacids in Herpes Simplex Virus DNA Polymerase Involved in Substrate and Drug Recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1988**, *85*, 6672- 6676.
- Gilbert, C.; Bestman-Smith, J.; Boivin, G. Resistance of Herpesviruses to Antiviral Drugs: Clinical Impacts and Molecular Mechanisms. *Drug Resistance Updates*, **2002**, *5*, 88-114.
- Guex, N.; Peitsch, M.C. Swiss-Model and the Swiss-PdbViewer: An Environment for Comparative Protein Modeling. *Electrophoresis*, **1997**, *18*, 2714-2723.
- Haffey, M.L.; Novotny, J.; Bruccoleri, R.E.; Carroll, J.T.S.; Matthews, J.T. Structure-Function Studies of the Herpes Simplex Virus Type 1 DNA Polymerase. *J. Virol.*, **1990**, *64* (10), 5008-5018.
- Hartline, C.B.; Harden, E.A.; Williams-Aziz, S.L.; Kushner, N.L.; Brideau, R.J.; Kern, E.R. Inhibition of Herpesvirus Replication by a Series of 4-oxo-dihydroquinolines with Viral Polymerase Activity. *Antivir. Res.*, **2005**, *65*, 97-105.
- Helgaker, T.; Jaszunski, M.; Ruud, K. *Ab initio* Methods for the Calculation of NMR Shielding and Indirect Spin-spin Coupling Constants. *Chem. Rev.*, **1999**, *99*, 293-352.
- Hillisch, A.; Pineda, L.F.; Hilgenfeld, R. Utility of Homology Models in the Drug Discovery Process. *Drug Discov. Today*, **2004**, *15*, 659-669.
- Hwang, C.B.C.; Ruffner, K.L.; Coen, D.M. A Point Mutation within a Distinct Conserved Region of the Herpes Simplex Virus DNA Polymerase Gene Confers Drug Resistance. *J. Virol*, **1992**, *66* (3), 1774-1776.
- IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Abbreviations and Symbols for the Description of Conformations of Polynucleotide Chains. Recommendations **1982**. (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/misc/pnuc2.html>)
- Jain, A. Surfex: Fully Automatic Flexible Molecular Docking Using a Molecular Similarity-Based Search Engine. *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 499-511.
- Jeffrey, G.A. *An Introduction to Hydrogen Bonding*. Oxford University Press, NY, **1997**, Chapter 2.

- Jorgensen, W. Quantum and Statistical Mechanical Studies of Liquids. 10. Transferable Intermolecular Potential Functions for Water, Alcohols, and Ethers. Application to Liquid Water. *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 335-340.
- Kaiser, C.R.; Rittner, R.; Basso, E.A. Proton Resonance Spectra and Substituent-induced Chemical Shifts of 3-Halocamphors. *Magn.Reson.Chem.*, **1994**, *32(9)*, 503-508.
- Kaiser, C.R.; Basso, E.A.; Rittner, R. Substituent-induced <sup>13</sup>C Chemical Shifts of 3-Substituted Camphors. *Magn.Reson.Chem.*, **2001**, *39(10)*, 643-644.
- Karplus, M. Molecular Dynamics Simulations of Biomolecules. *Accounts of Chemical Research*, **2002**, *35 (6)*, 321-323.
- Kellenberger, E.; Rodrigo, J.; Muller, P.; Rognan, D. Comparative Evaluation of Eight Docking Tools for Docking and Virtual Screening Accuracy. *Proteins*, **2004**, *57*, 225-242.
- Kubinyi, H. *QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches*. vol. 1 - *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*, VCH, Weinheim, **1993**
- Kupka, T.; Pasterna, G.; Lodowski, P.; Szeja, W. GIAO-DFT Prediction of Accurate NMR Parameters in Selected Glucose Derivatives. *Magn.Res.Chem.*, **1999**, *37*, 421-426.
- Laskowski, R.A.; MacArthur, M.W.; Moss, D.S.; Thornton, J.M. PROCHECK: a Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. *J. Appl. Cryst.*, **1993**, *26*, 283-291.
- Leach, A.R. *Molecular Modelling – Principles and Applications*. 2<sup>nd</sup> ed., Prentice Hall, London, **2001**.
- Leal, K.Z.; Seidl, P.R.; Yoneda, J.D.; Santos, C.V.B.; Marques, I.P.; Souza, M.C.B.V.; Ferreira, V.F. Conformational Analysis of Nucleoside of 1,4-Dihidro-4-Oxoquinoline-3-Carboxylic Acid Analogue. *J. Mol. Struct.*, **2005**, *748*, 137-141.
- Lee, C.; Yang, W.; Parr, R.G. Development of the Colle-Salvetti Correlation-energy Formula into a Functional of the Electron Density. *Phys. Rev.*, **1988**, *B37*, 785-789.

- Liu, S.; Knafels, J.D.; Chang, J.S.; Waszak, G.A.; Baldwin, E.T.; Deibel, M.R.; Thomsen, D.R.; Homa, F.L.; Wells, P.A.; Tory, M.C.; Poorman, R.A.; Gao, H.; Qiu, X.; Seddon, A.P. Crystal Structure of Herpes Simplex 1 Virus DNA Polymerase. *J. Biol. Chem.*, **2006**, *281*, 18193-18200.
- Lupi, O. Herpes Simples. *An. Bras. Dermatol.*, **2000**, *75* (3), 261-275.
- Lyon, A.W.; Mansoor, A.; Trotter, M.J. Urinary Gems: Acyclovir Crystalluria. *Arch Pathol Lab Med.*, **2002**, *126*(6), 753-754.
- Marques, I.P. Síntese e Avaliação Farmacológica de Ribonucleosídeos e de Novos Derivados dos Sistemas Quinolônico e Pirimidoquinolínico. *Dissertação de Mestrado*, Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil, **2005**.
- Martinho, A.; Oliveira, A.; Silva, C. *Monografia sobre os Herpesvírus Humanos*. Universidade de Évora, Évora, Portugal, **2003**.
- Melo, F.; Feytmans, E. Assessing Protein Structures with a Non-local Atomic Interaction Energy. *J. Mol. Biol.*, **1998**, *277*(5), 1141-1152.
- Meyer, E.F.; Swanson, S.M.; Williams, J.A. Molecular Modelling and Drug Design. *Pharmacol. Therapeut.*, **2000**, *85*, 113-121.
- Minakawa, N.; Kojima, N.; Matsuda, A. Nucleosides and Nucleotides. 138. Synthesis of 3-halo-3- deazainosines: Conformational Lock with the Halogen at the 3-position of the 3-deazainosine in Anti-conformation. *Heterocycles*, **1996**, *42*, 149-154.
- Morfin, F.; Thouvenot, D. Herpes Simplex Virus Resistance to Antiviral Drugs. *J. Clin. Virol.*, **2003**, *26*, 29-37.
- Morgon, N.H.; Coutinho, K. *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular*. Livraria da Física, SP, **2007**.
- Namba, A.M.; da Silva, V.B.; da Silva, C.H.T.P. Dinâmica Molecular: Teoria e Aplicações em Planejamento de Fármacos. *Ecl. Quím.*, **2008**, *33*(4), 13-24.

- Nayeem, A.; Sitkoff, D.; Krystek, S. A Comparative Study of Available Software for High-accuracy Homology Modeling: From Sequence Alignments to Structural Models. *Protein Sci.*, **2006**, *15*, 808-824.
- Oien, N. L.; Brideau, R.J.; Hopkins, T.A.; Wieber, J.L.; Knechtel, M.L.; Shelly, J.A.; Anstadt, R.A.; Wells, P.A.; Poorman, R.A.; Huang, A.; Vaillancourt, V.A.; Clayton, T.L.; Tucker, T.A.; Wathen, M.W. Broad Spectrum Antiherpes Activities of 4-hydroxyquinoline Carboxamides, a Novel Class of Herpesvirus Polymerase Inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2002**, *46*(3), 724-730.
- Oliveira, C.A.F. Estudo Teórico da Atividade Catalítica da Serina Protease do Citomegalovírus Humano. *Tese de Doutorado*, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, **2005**.
- Parolin, C.; Gatto, B.; Del Vecchio, C.; Pecere, T.; Tramontano, E.; Cecchetti, V.; Fravolini, A.; Masiero, S.; Palumbo, M.; Palù, G. New Anti-human Immunodeficiency Virus Type 1 6-Aminoquinolones Mechanism of Action. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2003**, *47* (3), 889-896.
- Peralta, J.E.; Contreras, R.H.; Taurian, O.E.; Ortiz, F.S.; Kowalewski, D.G.; Kowalewski, V.J. Methyl  $\beta$ -substituent Effect on NMR  $^{17}\text{O}$  Chemical Shifts in Two-coordinated Oxygen Atoms: DFT GIAO and NBO and experimental studies. *Magn.Res.Chem.*, **1999**, *37*, 31-35.
- Reed, L.I.; Muench, H. A Simple Method of Estimating Fifty per Cent Endpoints. *Am. J. Hyg.*, **1938**, *27*, 439-497.
- Rickaert, J.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. Numerical Integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of *N*-alkanes. *J. Comput. Phys.*, **1977**, *23*, 327-341.
- Saenger, W. Principles of Nucleic Acid Structure. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo, **1983**.
- Santos dos, C.V.B. Síntese e Avaliação da Atividade Biológica de Novos Desoxinucleosídeos Quinolônicos, Ribonucleosídeos Pirimido[5,4-C]quinolínicos e Novos Derivados Quinolônicos Contendo Substituintes Triazólicos. *Tese de*

*Doutorado*, Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil, **2004**.

Santos, F.C. Síntese e Avaliação Farmacológica de Novos Aciclonucleosídeos Quinolônicos como Candidatos a Agentes Antivirais e Tuberculostáticos. *Dissertação de Mestrado*, Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil, **2006**.

Santos, F.C. Quinolonas: Provas de Versatilidades Sintética e Bilógica. *Tese de Doutorado*, Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil, **2009**.

Sayle, R.; Milner-White, E.J. RasMol: Biomolecular graphics for all. *Trends in Biochemical Sciences*, **1995**, *20*, 374-376.

Seela, F.; Debelak, H.; Reuter, H.; Kastner, G.; Mikhailopulo, I.A. Different Conformations of 1-Deazaadenosine and its 2'-Deoxyribonucleoside in the Solid State and in Solution. *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 1295-1308.

Seidl, P.R.; Leal, K.Z.; Costa, V.E.U.; Mollman, M.E.S. Steric Effects on Carbon-13 NMR Shifts: Carbon-hydrogen Bond Polarization Contributions. *Mag.Reson.Chem.*, **1998**, *36*, 261-266.

Seidl, P.R.; Leal, K.Z. Steric Contributions to Calculated Chemical Shifts of 1-methyl and 2-methyl Adamantane. *J. Mol.Struct. (Theochem)*, **2001**, *539*, 159-162.

Seidl, P.R.; Leal, K.Z.; Yoneda, J.D. NMR Chemical Shifts as Probes for Steric Effects on Mono and Disubstituted Adamantanes, *J.Phys.Org.Chem.*, **2002**, *15*, 801-807.

Seidl, P.R.; Yoneda, J.D.; Leal, K.Z. An NMR Investigation of Steric Effects in Alkyl and Haloadamantanes. *J.Phys.Org.Chem.*, **2005**, *18*, 162-166.

Shen, L.L.; Mitscher, L.A.; Sharma, P.N.; O'Donnel, T.J.; Chu, D.W.T.; Cooper, C.S.; Rosen, T.; Pernet, A.G. Mechanism of Inhibition of DNA Gyrase by Quinolone Antibacterials: a Cooperative Drug-DNA Binding Model. *Biochem.*, **1989**, *28* (9), 3886-3894.

Silva da, V.B.; Silva, C.H.T.P. Modelagem Molecular de Proteínas-alvo por Homologia Estrutural. *Revista Eletrônica de Farmácia*, **2007**, *IV*(1), 15.

- Sobolev, V.; Sorokine, A.; Prilusky, J.; Abola, E.E.; Edelman, M. Automated Analysis of Interatomic Contacts in Proteins. *Bioinformatics*, **1999**, *15* (4), 327-332.
- Souza, T.M.L.; Souza, M.C.B.V.; Ferreira, V.F.; Santos, C.V.B.; Marques, I.P.; Fontes, C.F.L.; Frugulhetti, I.C.P.P. Effect of 6-chloro-1,4-dihydro-4-oxo-1-( $\beta$ -ribofuranosyl)quinoline-3-carboxylic Acid Against the *In vitro* Replication of Herpes Simplex Virus type 1. *Antivir. Res.*, **2005**, submetido.
- Souza, T.M.L.; Souza, M.C.B.V.; Ferreira, V.F.; Canuto, C.V.B.S.; Marques, I.P.; Fontes, C.F.L.; Frugulhetti, I.C.P.P. The Chloroxoquinolinic Derivative 6-chloro-1,4-dihydro-4-oxo-1-( $\beta$ -D-ribofuranosyl)quinoline-3-carboxylic Acid Inhibits HSV-1 Adsorption by Impairing its Adsorption on HVEM. *Arch. Virol.*, **2007**, *152*, 1417-1424.
- Souza, T.M.L.; Souza, M.C.B.V.; Ferreira, V.F.; Canuto, C.V.B.S.; Marques, I.P.; Fontes, C.F.L.; Frugulhetti, I.C.P.P. Inhibition of HSV-1 Replication and HSV DNA Polymerase by the Chloroxoquinolinic Ribonucleoside 6-chloro-1,4-dihydro-4-oxo-1-( $\beta$ -D-ribofuranosyl)quinoline-3-carboxylic Acid and its Aglycone. *Antivir. Res.*, **2008**, *77*, 20-27.
- Souza, T.M.L.; Cirne-Santos, C.C.; Rodrigues, D.Q.; Abreu, C.M.; Tanuri, A.; Ferreira, V.F.; Marques, I.P.; Souza, M.C.B.V.; Fontes, C.F.L.; Frugulhetti, I.C.P.P., Bou-Habib, D.C. The Compound 6-chloro-1,4-oxo-1-( $\beta$ -D-ribofuranosyl)quinoline-3-carboxylic Acid Inhibits HIV-1 Replication by Targeting the Enzyme Reverse Transcriptase. *Current HIV Research*, **2008**, *6*, 209-217.
- Stewart, J.J.P. Optimization of Parameters for Semiempirical Methods. I. Method. *J.Comp.Chem.*, **1989**, *10*, 209-220.
- Stranska, R.; Schuurman, R.; Nienhuis, E.; Goedegebuure, I.W.; Polman, M.; Weel, J.F.; Wertheim-Van Dillen, P.M.; Berkhout, R.J.; van Loon, A.M. Survey of Acyclovir-Resistant Herpes Simplex Virus in the Netherlands: Prevalence and Characterization. *J Clin Virol.*, **2005**, *32*(1), 7-18.
- Thomsen, D.R.; Oien, N.L.; Hopkins, T.A.; Knechtel, M.L.; Brideau, R.J.; Wathen, M.W.; Homa, F.L. Amino-acid Changes within Conserved Region III of the Herpes Simplex Virus and Human Cytomegalovirus DNA Polymerases Confer Resistance

- to 4-oxo-dihydroquinolines, a Novel Class of Herpesvirus Antiviral Agents. *J Virol.*, **2003**, 77,1868-1876.
- Thomsen, R.; Christensen, M.H. MolDock: A New Technique for High-accuracy molecular Docking. *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 3315-3321.
- Topic, D.V.; Pejov, L. On the Choice of Optimal Methodology for Calculation of  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  NMR Isotropic Chemical Shifts in Cagelike Systems. Case Studies of Adamantane, 2-Adamantanone and 2,4-Methano-2,4-dehidroadamantane. *J.Chem.Inf.Comput.Sci.*, **2001**, 41, 1478-1487.
- Tormena, C.F. *Cálculo de Deslocamento Químico de Hidrogênio Através da Teoria CHARGE*. VII Jornada Brasileira de RMN, Maringá, **2002**.
- Travassos, S.N.; Nogueira, C.M.A.F.; Wanke, N.C.F. Herpesvírus – Tratamentos. *An. Bras. Dermatol.*, **1988**, 63, 1, 19-23.
- Wang, T.S.F.; Wong, S.W.; Korn, D. Human DNA Polymerase  $\alpha$ : Predicted Functional Domains and Relationships with Viral DNA Polymerases. *FASEB J.*, **1989**, 3, 14-21.
- Wathen. M.W. Non-nucleoside Inhibitors of Herpesviruses. *Rev. Med. Virol.*, **2002**, 12, 167-178.
- Whitesell, J.K.; Minton, M.A. *Stereochemical Analysis of Alicyclic Compounds by  $^{13}\text{C}$  NMR Spectroscopy*. Chapman and Hall, London, **1987**.
- Wolinski, K.; Hinton, J.F.; Pulay, P. Efficient Implementation of the Gauge-Independent Atomic Orbital Method for NMR Chemical Shift Calculations. *J.Am.Chem.Soc.*, **1990**, 112, 8251-8260.
- Wutzler, P.; Thust, R. Genetic Risks of Antiviral Nucleoside Analogues - a Survey *Antiviral Research*, **2001**, 49, 55-74.
- Yoneda, J.D. Deslocamentos químicos de RMN na investigação de efeitos estéricos. *Dissertação de Mestrado*, Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil, **2005**



Yoneda, J.D.; Leal, K.Z.; Seidl, P.R.  $^{13}\text{C}$  Chemical Shifts of Di- and Triamantanes: A Similar Effect of a Methyl Substituent on Adamantanes. *Ann. Magn. Reson.*, **2005**, *4 (1)*, 9-16.

Yoneda, J.D.; Seidl, P.R.; Leal, K.Z.; Campos, M.G.; Rittner, R. A Theoretical Investigation of Steric Effects on  $^1\text{H}$  Chemical Shifts of Camphor and Norcamphor Derivatives. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)*, **2006**, *767*, 29-36.

Yoneda, J.D.; Albuquerque, M.G.; Leal, K.Z.; Seidl, P.R.; Wheeler, R.A.; Boesch, S.; Alencastro, R.B.; Souza, M.C.B.V; Ferreira, V.F. Molecular Dynamics Simulations of a Nucleoside Derivative of the 1,4-Dihidro-4-Oxoquinoline-3-Carboxylic Acid Synthesized as a Potential Antiviral Agent: Conformational Studies in Vacuum and in Water. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)*, **2006**, *778*, 97-103.

# ***Anexo I***

---

**Tabela A1.** Deslocamentos químicos experimentais de  $^{13}\text{C}$  (ppm) para 3-halonorbornanos (Whitesell e Minton, 1987).

	2	3	4	5
<b>C1</b>	36,3	36,3	37,0	37,9
<b>C2</b>	29,6	43,4	43,8	45,1
<b>C3</b>	29,6	61,7	53,1	29,9
<b>C4</b>	36,3	45,9	46,4	47,9
<b>C5</b>	29,6	26,5	27,4	28,4
<b>C6</b>	29,6	28,0	28,0	28,7
<b>C7</b>	38,3	35,0	35,5	36,2

**Tabela A2.** Deslocamentos químicos experimentais de  $^{13}\text{C}$  (ppm) para 3-halonorcânforas (Gauze et al., 2006).

	6	12	13	14	15	16	17
<b>C1</b>	49,9	48,6	48,8	49,1	48,3	49,8	47,2
<b>C2</b>	218,3	210,5	210,2	210,8	210,2	212,2	211,9
<b>C3</b>	45,3	59,3	63,5	49,6	55,2	28,1	35,3
<b>C4</b>	35,4	44,2	42,2	44,5	44,2	45,7	42,8
<b>C5</b>	27,2	25,6	20,8	26,3	22,7	27,1	26,5
<b>C6</b>	24,2	23,7	25,6	23,5	25,1	23,0	24,6
<b>C7</b>	27,7	34,3	34,4	35,0	35,7	36,5	36,2

**Tabela A3.** Densidades de carga para 3-halonorcânforas calculadas pelo programa *Gaussian 98*

	6	10	11	12	13	14	15
<b>C1</b>	-0,135	-0,143	-0,138	-0,142	-0,138	-0,142	-0,139
<b>C2</b>	0,436	0,414	0,403	0,467	0,467	0,463	0,458
<b>C3</b>	-0,241	0,232	0,230	-0,245	-0,256	-0,152	-0,156
<b>C4</b>	-0,099	-0,130	-0,140	-0,082	-0,083	-0,089	-0,094
<b>C5</b>	-0,178	-0,196	-0,188	-0,192	-0,184	-0,193	-0,185
<b>C6</b>	-0,194	-0,194	-0,194	-0,195	-0,196	-0,195	-0,196
<b>C7</b>	-0,188	-0,199	-0,202	-0,192	-0,201	-0,194	-0,200
<b>H1</b>	0,095	0,103	0,102	0,106	0,105	0,106	0,105
<b>H3x</b>	0,128	---	0,109	---	0,172	---	0,164
<b>H3n</b>	0,123	0,100	---	0,166	---	0,155	---
<b>H4</b>	0,083	0,099	0,094	0,107	0,101	0,107	0,100
<b>H5x</b>	0,101	0,112	0,103	0,113	0,129	0,113	0,105
<b>H5n</b>	0,100	0,105	0,124	0,107	0,107	0,107	0,128
<b>H6x</b>	0,110	0,114	0,112	0,116	0,125	0,115	0,113
<b>H6n</b>	0,114	0,117	0,122	0,119	0,113	0,119	0,125
<b>H7s</b>	0,099	0,123	0,108	0,128	0,109	0,128	0,108
<b>H7a</b>	0,102	0,103	0,110	0,106	0,111	0,104	0,111

**Tabela A4.** Efeitos de substituintes nos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  (ppm) para 3-halonorcânforas calculados pelo programa *Gaussian 98*.

	10	11	12	13	14	15
H1	0,04	0,03	0,30	0,09	0,16	0,10
H3x	---	2,73	---	2,08	---	2,29
H3n	2,46	---	1,81	---	1,93	---
H4	0,03	0,15	-0,02	0,02	0,04	0,02
H5x	-0,02	-0,21	0,09	-0,23	0,11	-0,19
H5n	-0,17	0,65	-0,09	0,72	-0,07	0,90
H6x	-0,03	0,08	-0,04	0,04	-0,04	0,04
H6n	-0,09	0,16	-0,09	0,07	-0,09	0,08
H7s	0,62	-0,14	0,62	-0,04	0,78	0,02
H7a	0,04	0,04	-0,08	0,10	-0,09	0,17

**Tabela A5.** Efeitos de substituintes nos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  (ppm) para 3-halonorcânforas calculados pelo programa *CHARGE 6A*.

	10	11	12	13	14	15
H1	0,16	0,17	0,17	0,16	0,17	0,15
H3x	---	3,19	---	2,27	---	2,26
H3n	3,22	---	2,26	---	2,30	---
H4	0,12	0,12	0,19	0,19	0,24	0,24
H5x	0,09	-0,03	0,04	-0,25	0,02	-0,26
H5n	0,17	0,52	0,15	0,78	0,15	0,96
H6x	0,12	0,04	0,09	0,02	0,06	0,02
H6n	0,11	0,13	0,08	0,14	0,07	0,16
H7s	0,36	0,12	0,56	0,08	0,72	0,07
H7a	0,05	0,16	-0,13	0,09	-0,16	0,07

**Tabela A6.** Distâncias internucleares (Å) para 3-halonorcânforas calculadas pelo método MM2.

	10	11	12	13	14	15	16	17
R...H1	4,17	4,49	4,54	4,88	4,62	5,02	4,80	5,18
R...H3x	---	2,06	---	2,36	---	2,50	---	2,68
R...H3n	2,06	---	2,38	---	2,52	---	2,69	---
R...H4	2,63	2,85	2,92	3,17	3,03	3,29	3,19	3,49
R...H5x	4,56	3,87	4,95	4,21	5,09	4,32	5,28	4,49
R...H5n	3,99	2,54	4,36	2,82	4,52	2,91	4,71	3,03
R...H6x	5,17	4,67	5,60	5,02	5,73	5,13	5,94	5,26
R...H6n	4,65	3,67	5,06	3,90	5,23	3,98	5,41	4,03
R...H7s	2,70	4,01	2,97	4,42	3,04	4,56	3,20	4,78
R...H7a	4,00	4,56	4,35	4,97	4,44	5,11	4,62	5,32
C-R	1,39	1,39	1,80	1,80	1,96	1,96	2,16	2,15

**Tabela A7.** Efeitos de substituintes nos deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  experimentais (ppm) de cânforas substituídas (Kaiser et al., 2001)

	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
<b>C1</b>	-0,32	0,56	0,55	0,41	0,62	-0,03	0,17	-1,18	-0,20	0,76
<b>C2</b>	-4,50	-5,12	-4,79	-5,98	-4,85	-5,98	-3,80	-4,76	3,21	2,92
<b>C3</b>	49,62	48,31	16,25	17,96	4,78	10,12	-20,3	-9,49	5,59	0,81
<b>C4</b>	5,37	4,55	8,31	6,61	8,34	6,48	8,80	6,58	6,13	5,13
<b>C5</b>	-4,05	-9,27	0,19	-6,97	1,21	-4,72	2,47	-0,68	2,08	-7,29
<b>C6</b>	-1,18	1,76	-1,32	0,90	-1,40	0,44	-1,49	-0,24	-0,57	1,08
<b>C7</b>	-0,36	-4,14	0,02	-1,55	0,09	-0,84	0,17	-0,71	-0,09	-0,75
<b>C8</b>	1,05	0,08	1,72	-0,03	2,14	0,06	3,05	0,20	1,91	-0,22
<b>C9</b>	0,29	0,49	0,80	0,36	0,82	0,80	0,79	1,43	1,36	0,14
<b>C10</b>	-0,39	-0,01	-0,03	0,31	0,41	0,35	0,64	0,36	0,21	0,34

**Tabela A8.** Densidades de carga para cânforas substituídas calculadas pelo programa *Gaussian 98*.

	8	18	19	20	21	22	25	26	27
<b>C1</b>	-0,009	-0,015	-0,010	-0,018	-0,010	-0,019	-0,011	-0,012	-0,007
<b>C2</b>	0,428	0,398	0,394	0,454	0,460	0,448	0,452	0,430	0,433
<b>C3</b>	-0,246	0,230	0,231	-0,253	-0,264	-0,155	-0,160	-0,110	-0,117
<b>C4</b>	-0,084	-0,116	-0,128	-0,069	-0,067	-0,078	-0,079	-0,082	-0,087
<b>C5</b>	-0,185	-0,202	-0,194	-0,199	-0,191	-0,199	-0,191	-0,191	-0,187
<b>C6</b>	-0,200	-0,201	-0,201	-0,201	-0,202	-0,201	-0,202	-0,200	-0,201
<b>C7</b>	0,041	0,027	0,026	0,040	0,027	0,039	0,027	0,045	0,039
<b>C8</b>	-0,322	-0,324	-0,325	-0,321	-0,327	-0,321	-0,326	-0,324	-0,324
<b>C9</b>	-0,318	-0,317	-0,316	-0,318	-0,317	-0,317	-0,317	-0,317	-0,318
<b>C10</b>	-0,326	-0,325	-0,327	-0,324	-0,327	-0,324	-0,327	-0,324	-0,327
<b>H3n</b>	0,121	0,103	-	0,169	-	0,160	-	0,115	-
<b>H3x</b>	0,129	-	0,109	-	0,175	-	0,166	-	0,120
<b>H4</b>	0,073	0,090	0,083	0,099	0,090	0,099	0,089	0,071	0,070
<b>H5n</b>	0,095	0,101	0,121	0,102	0,126	0,102	0,125	0,094	0,097
<b>H5x</b>	0,100	0,110	0,101	0,111	0,105	0,111	0,103	0,098	0,099
<b>H6n</b>	0,110	0,111	0,118	0,112	0,121	0,112	0,120	0,107	0,109
<b>H6x</b>	0,106	0,111	0,107	0,112	0,109	0,112	0,109	0,106	0,105
<b>H8</b>	0,106	0,111	0,109	0,113	0,110	0,112	0,110	0,107	0,104
<b>H9</b>	0,103	0,105	0,106	0,106	0,107	0,105	0,107	0,103	0,102
<b>H10</b>	0,108	0,112	0,111	0,113	0,113	0,113	0,223	0,107	0,108

**Tabela A9.** Efeitos de substituintes nos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  (ppm) para cânforas substituídas calculados pelo programa *Gaussian 98*.

	18	19	20	21	22	23	26	27
<b>H3n</b>	3,07	-	2,35	-	2,47	-	0,49	-
<b>H3x</b>	-	2,64	-	2,10	-	2,31	-	0,20
<b>H4</b>	0,15	0,23	0,15	0,07	0,20	0,08	-0,10	-0,05
<b>H5n</b>	-0,11	0,75	-0,02	0,85	0	1,03	0	0,39
<b>H5x</b>	-0,02	-0,33	0,10	-0,29	0,13	-0,26	0,06	-0,22
<b>H6n</b>	-0,1	0,13	-0,05	0,07	-0,05	0,09	0,07	-0,10
<b>H6x</b>	-0,05	0,06	-0,07	0,01	-0,06	0,01	-0,05	-0,01
<b>H8</b>	0,22	-0,02	0,23	0,01	0,32	0,05	0,06	0,03
<b>H9</b>	0	0,02	-0,04	0,03	-0,04	0,05	-0,02	0,04
<b>H10</b>	0,03	0	0,03	0,01	0,04	0,01	0	-0,01

**Tabela A10.** Efeitos de substituintes nos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  (ppm) para cânforas substituídas calculados pelo programa CHARGE 6A.

	18	19	20	21	22	23	26	27
H3n	3,22	–	2,21	–	2,22	–	0,10	–
H3x	–	3,15	–	2,27	–	2,23	–	0,27
H4	0,13	0,13	0,20	0,20	0,25	0,25	-0,35	-0,21
H5n	0,17	0,63	0,12	0,94	0,12	1,14	0,02	0,34
H5x	0,11	-0,05	0,07	-0,31	0,05	-0,30	-0,07	-0,33
H6n	0,12	0,13	0,11	0,16	0,10	0,18	0,05	0,03
H6x	0,14	0,05	0,12	0,02	0,10	0,02	0,03	-0,05
H8	0,15	0,10	0,13	0,08	0,13	0,06	0,05	0,02
H9	0,04	0,07	0,02	0,05	0,02	0,04	-0,01	0,00
H10	0,04	0,05	0,04	0,04	0,03	0,03	0,00	0,01

**Tabela A11.** Distâncias internucleares e distâncias C-R (Å) para cânforas substituídas calculadas pelo método MM2.

	18	19	20	21	22	23	24	25
R...H3x	---	2,04	---	2,34	---	2,47	---	2,66
R...H3n	2,05	---	2,35	---	2,49	---	2,66	---
R...H4	2,63	2,88	2,91	3,20	3,03	3,32	3,18	3,52
R...H5x	4,56	3,79	4,93	4,14	5,08	4,25	5,26	4,42
R...H5n	3,90	2,42	4,23	2,72	4,38	2,81	4,48	2,94
R...H6x	5,21	4,57	5,65	4,93	5,80	5,04	6,01	5,19
R...H6n	4,56	3,49	4,95	3,76	5,10	3,83	5,29	3,93
R...C8	2,93	4,31	3,30	4,71	3,38	4,85	3,56	5,07
R...H8	2,38	4,01	2,73	4,37	2,84	4,52	2,99	4,71
R...C9	4,50	4,96	4,92	5,38	5,03	5,53	5,24	5,70
R...H9	4,68	5,15	5,04	5,57	5,14	5,71	5,32	5,91
R...C10	4,64	4,87	5,07	5,27	5,18	5,40	5,40	5,57
R...H10	4,59	5,12	4,99	5,48	5,07	5,59	5,27	5,73
C-R	1,39	1,39	1,80	1,80	1,96	1,96	2,16	2,16

\*Distâncias dos grupos metila são com relação ao hidrogênios mais próximo na conformação de mais baixa energia.

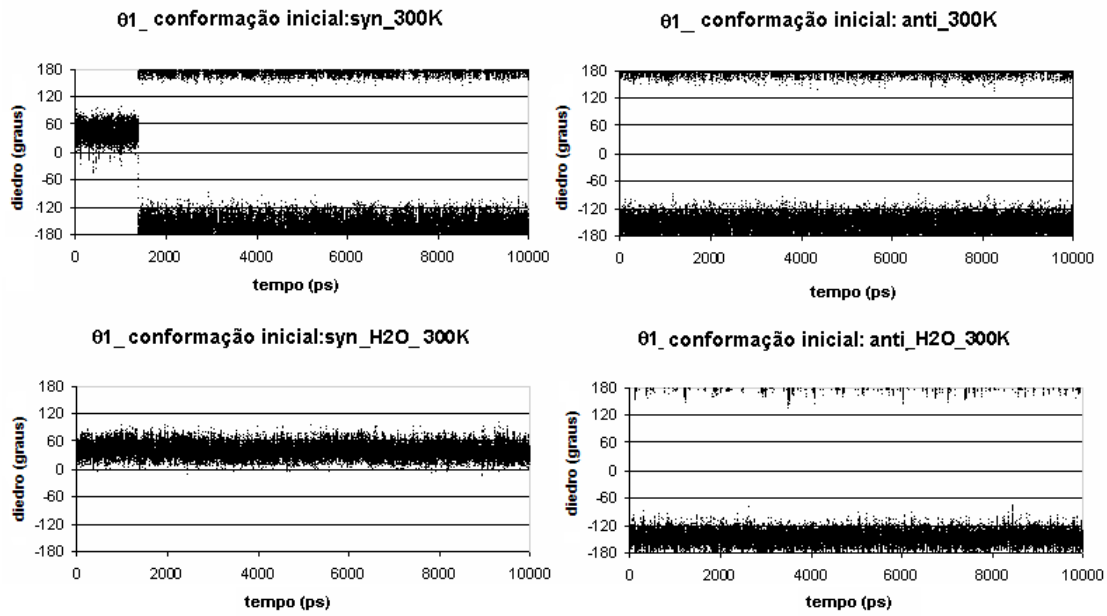


Figura A1. Variação de  $\theta_1$  no vácuo e na água para as conformações iniciais *syn* (esquerda) e *anti* (direita) de **1j** a 300 K.

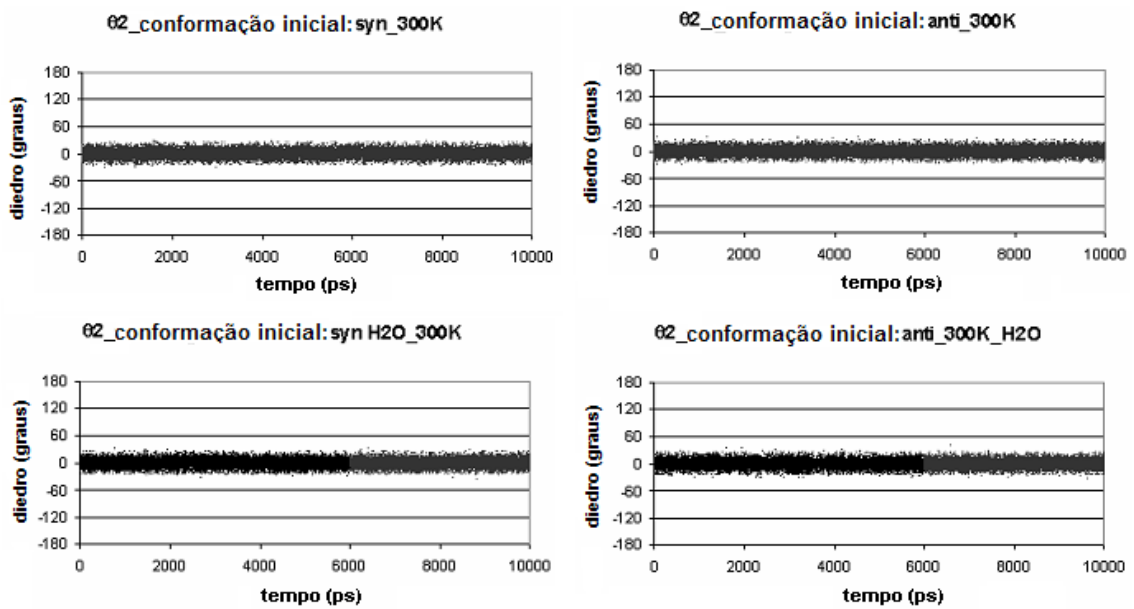
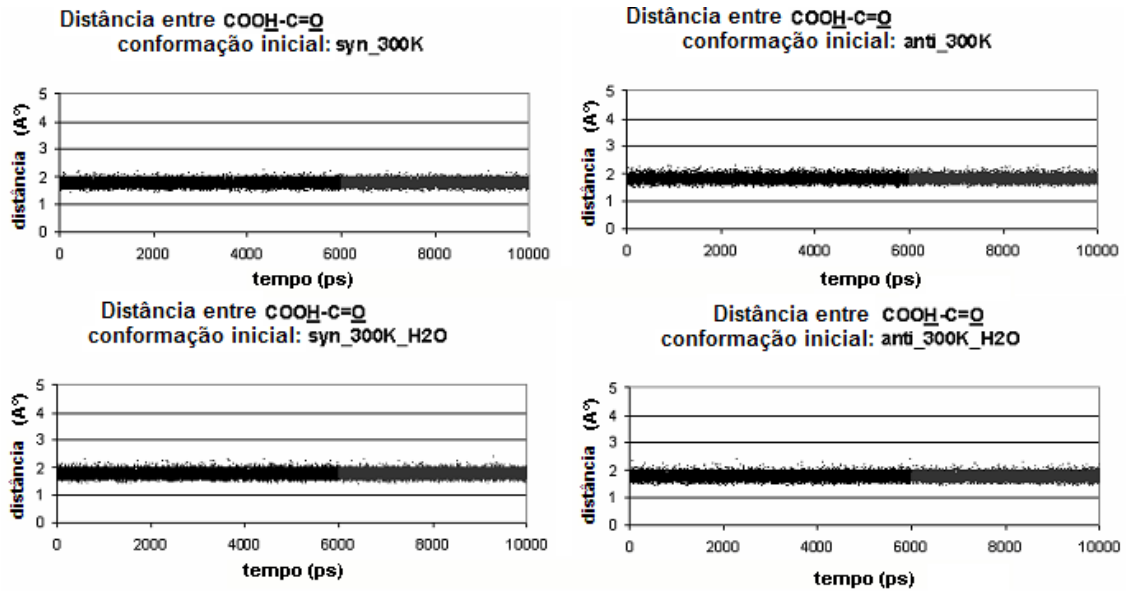
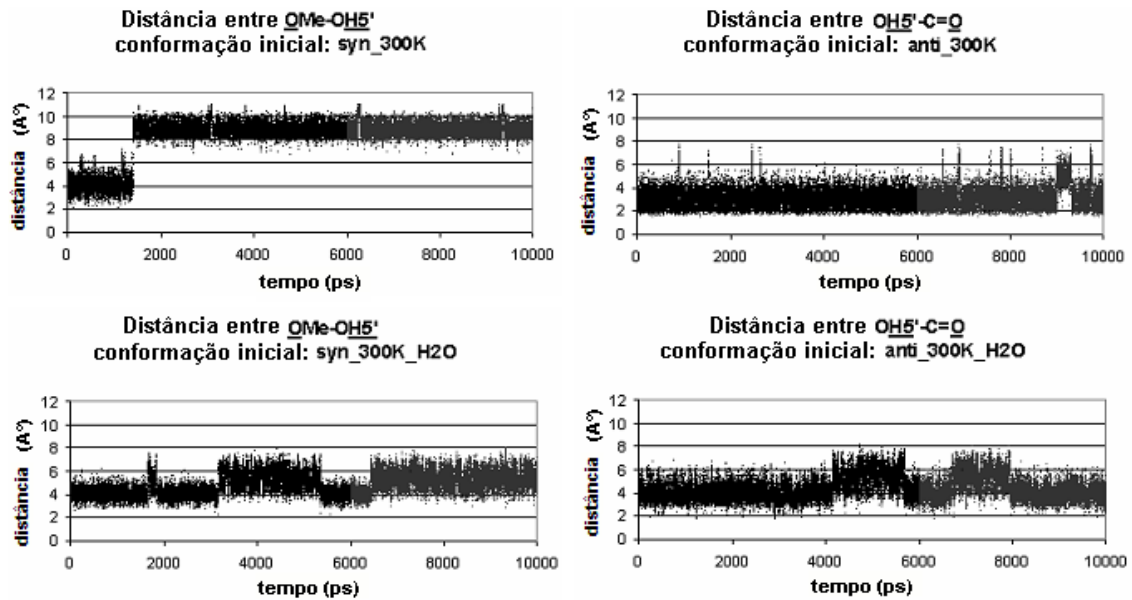


Figura A2. Variação de  $\theta_2$  no vácuo e na água para as conformações iniciais *syn* (esquerda) e *anti* (direita) de **1j** a 300 K.

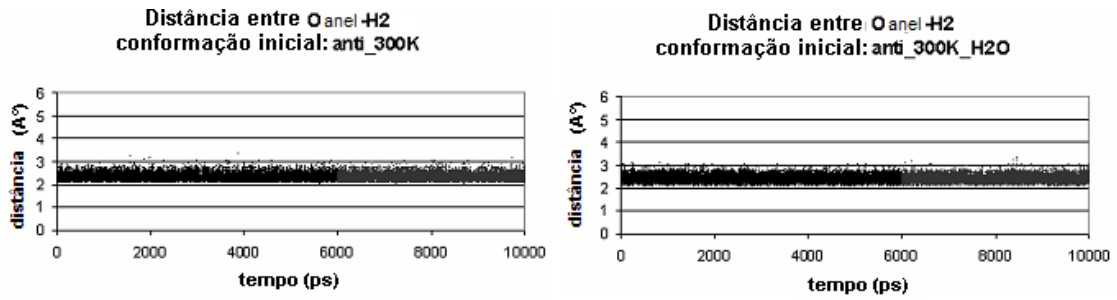


**Figura A3.** Variação das distâncias entre  $\text{COOH}$  e  $\text{C=O}$  ( $D_2$  e  $D_2'$ ) no vácuo e na água para as conformações iniciais *syn* (esquerda) e *anti* (direita) de **1j** a 300 K.

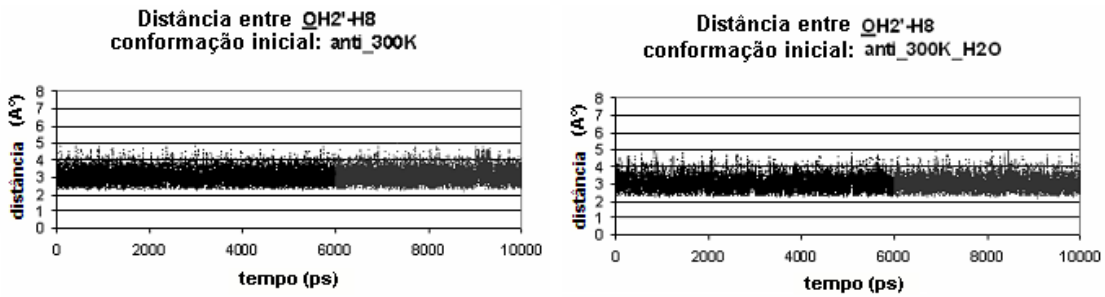


**Figura A4.** Variação das distâncias entre  $\text{OMe}$  e  $\text{OH5'}$  ( $D_1$ ) e entre  $\text{C=O}$  e  $\text{OH5'}$  ( $D_1'$ ) no vácuo e na água para as conformações iniciais *syn* (esquerda) e *anti* (direita) de **1j** a 300 K.

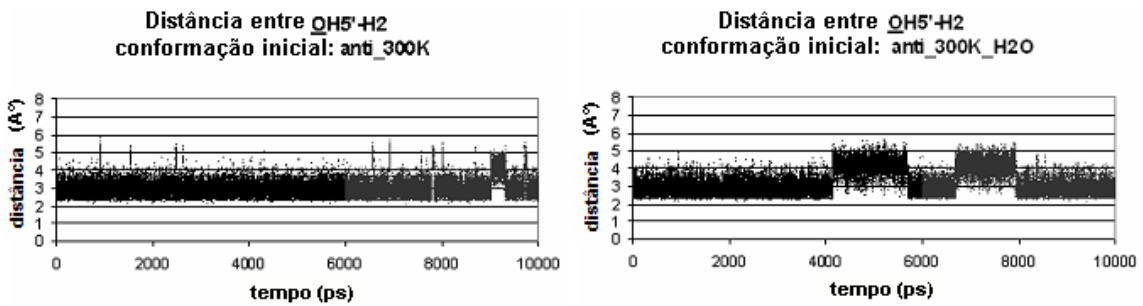




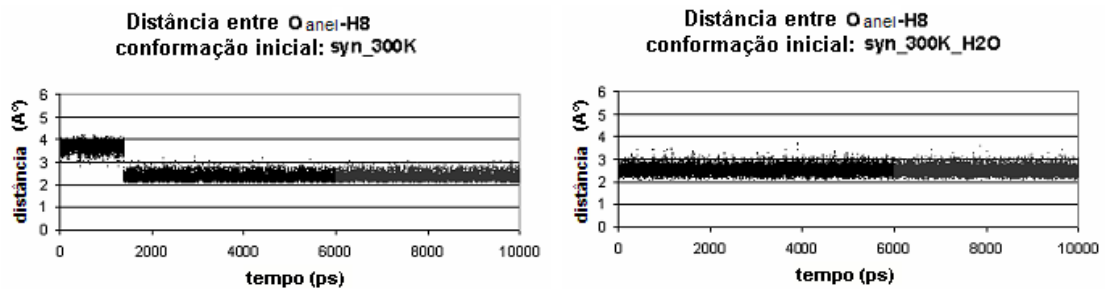
**Figura A5.** Variação da distância entre O4' e H2 (D3') no vácuo e na água para a conformação inicial *anti* de 1j a 300 K.



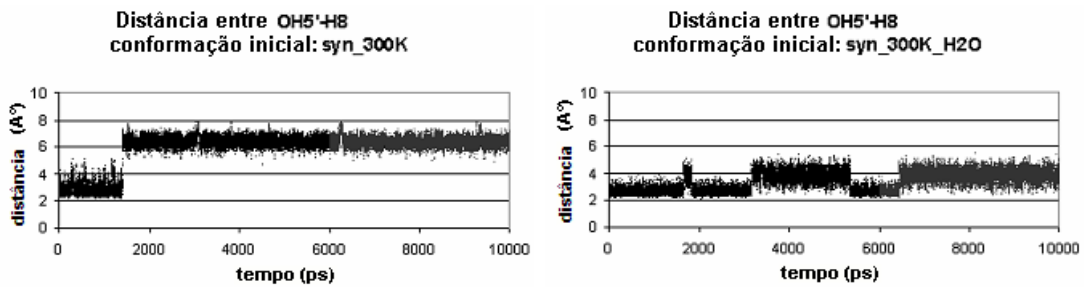
**Figura A6.** Variação da distância entre OH2' e H8 (D4') no vácuo e na água para a conformação inicial *anti* de 1j a 300 K.



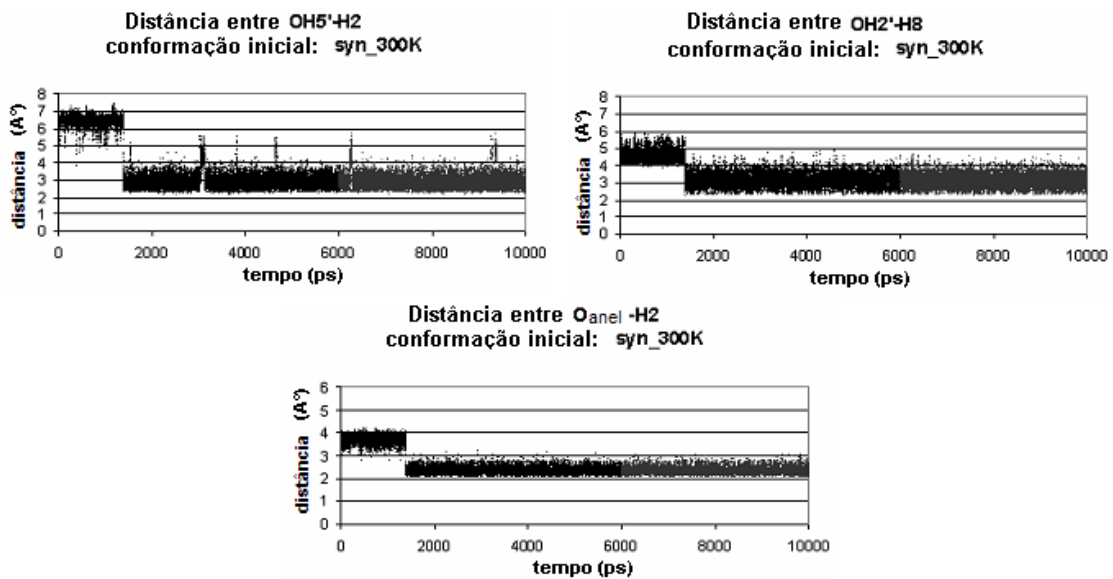
**Figura A7.** Variação da distância entre OH5' e H2 (D5') no vácuo e na água para a conformação inicial *anti* de 1j a 300 K.



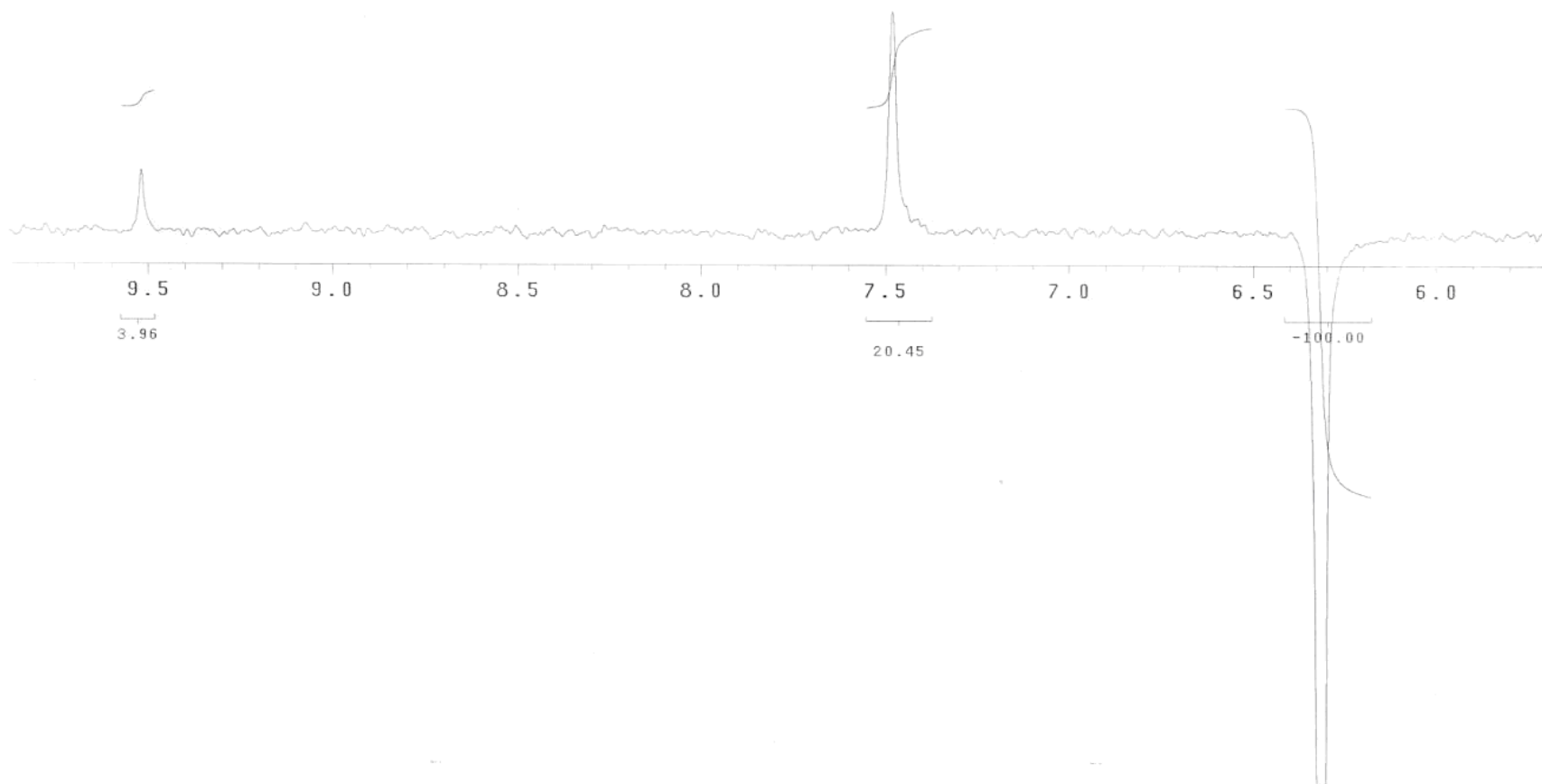
**Figura A8.** Variação da distância entre O4' e H8 (D3) no vácuo e na água para a conformação inicial *syn* de 1j a 300 K.



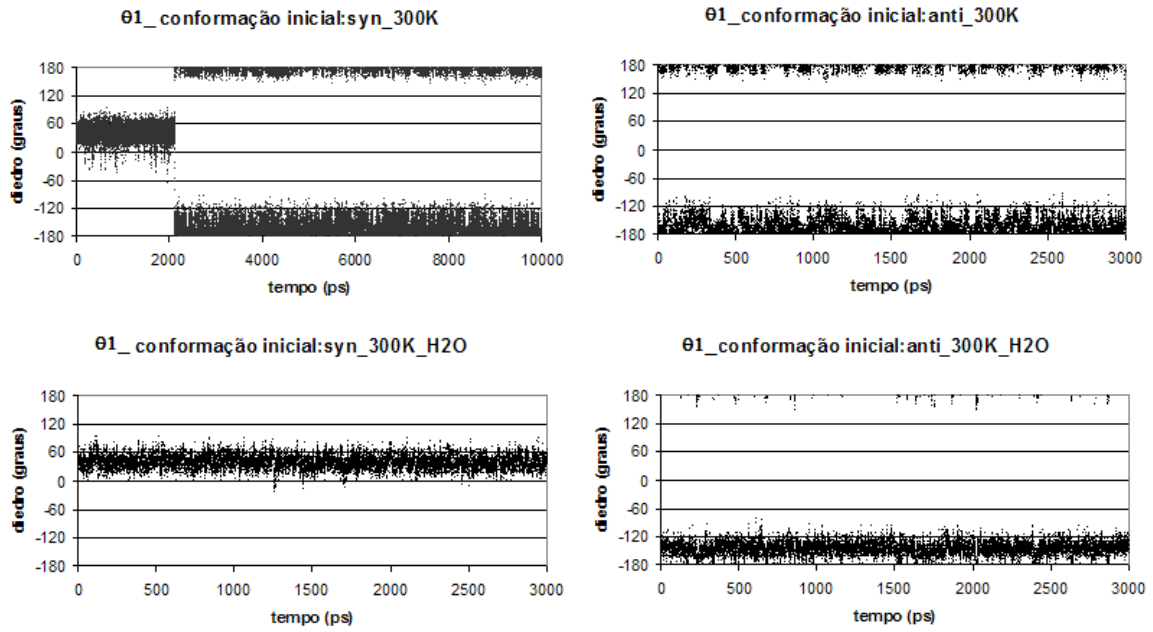
**Figura A9.** Variação da distância entre  $\underline{O}H5'$  e H8 (D4) no vácuo e na água para a conformação inicial *syn* de  $\underline{1j}$  a 300 K.



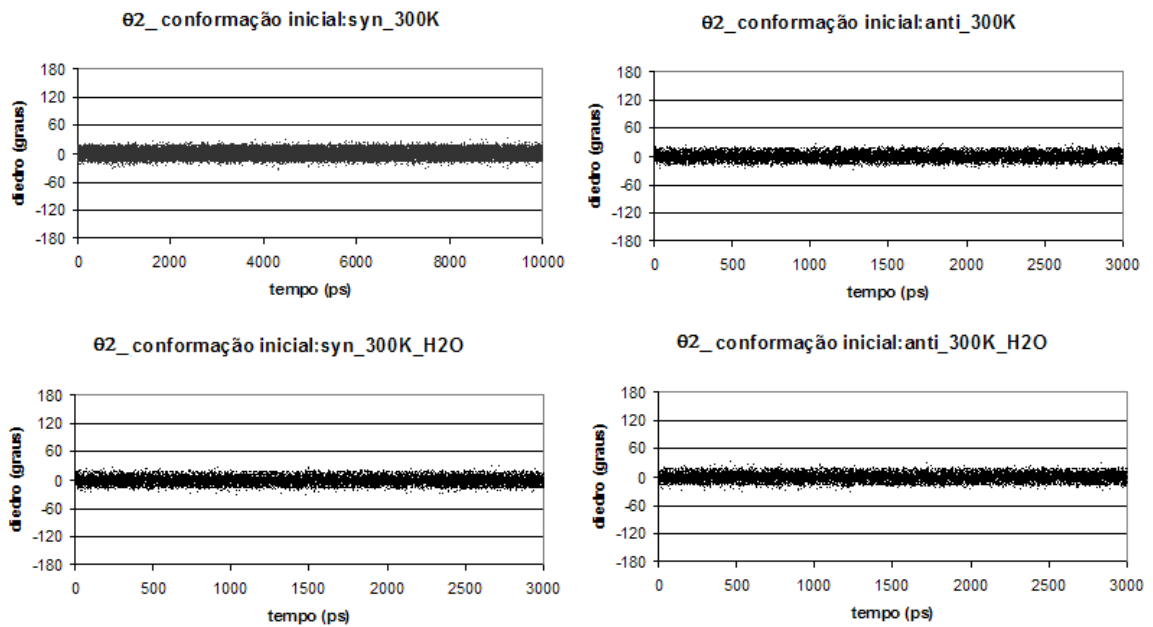
**Figura A10.** Variação das distâncias entre  $\underline{O}H5'$  e H2 (D5'), OH2' e H8 (D4') e O4' e H2 (D3') quando a conformação inicial *syn* de  $\underline{1j}$  é convertida na *anti* no vácuo a 300K.



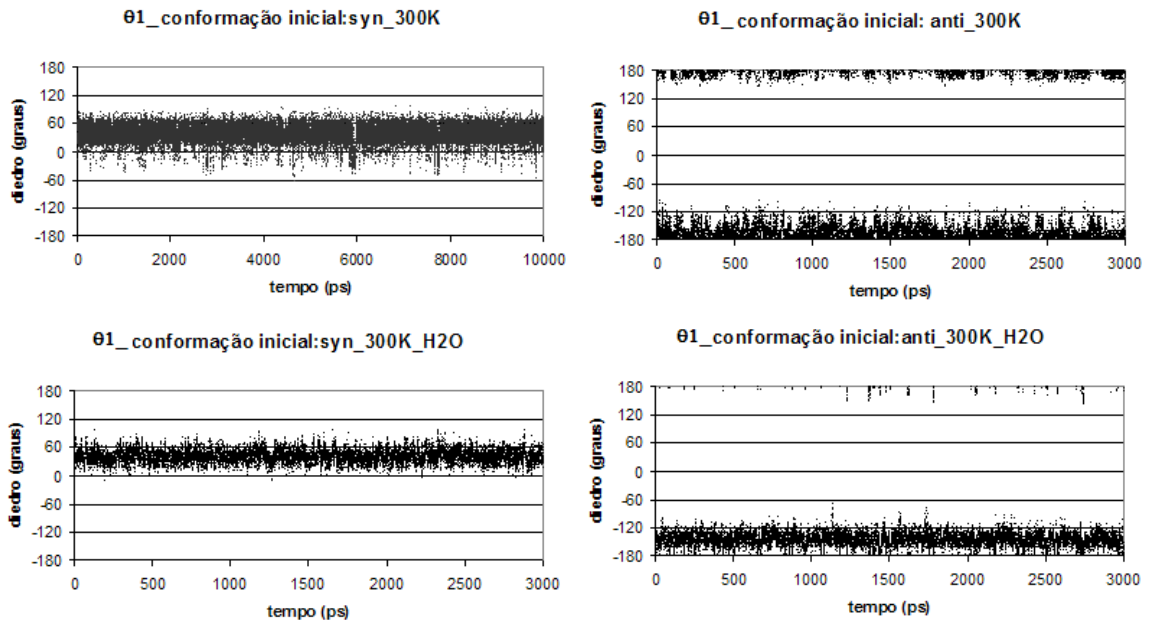
**Figura A11.** Espectro de nOe para o ribonucleosídeo **1j**. A irradiação de H1' ( $\delta$  6,30) resultou em 20,4% de nOe em H8 ( $\delta$  7,45) e 4,0% em H2 ( $\delta$  9,51).



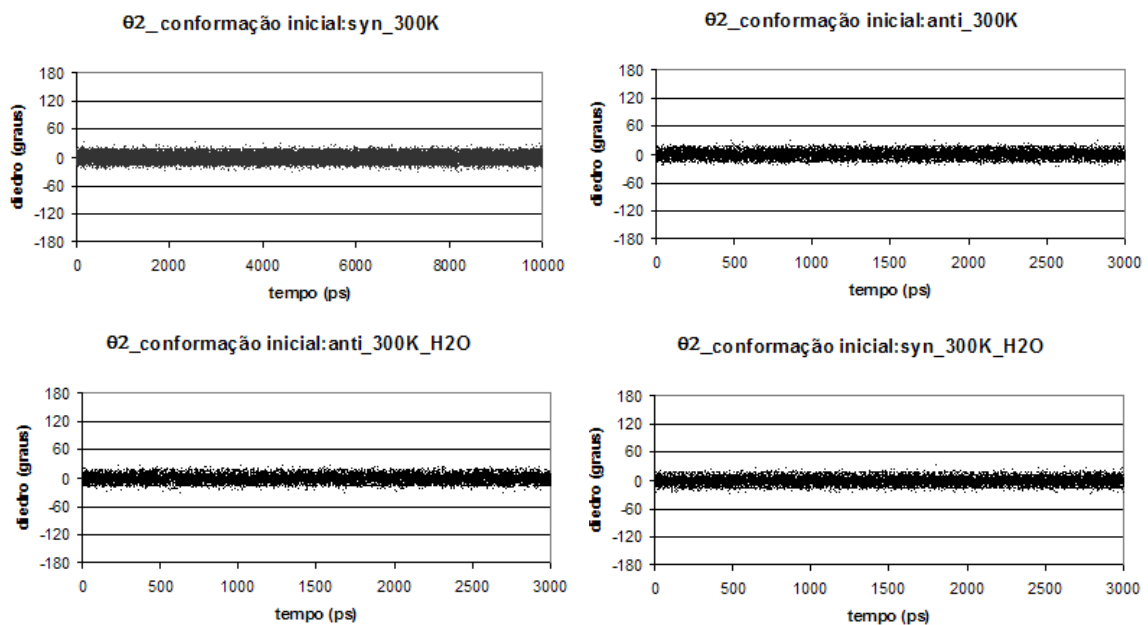
**Figura A12.** Variação de  $\theta_1$  no vácuo e na água para as conformações iniciais *syn* (esquerda) e *anti* (direita) do ribonucleosídeo 1 (R=H) a 300 K.



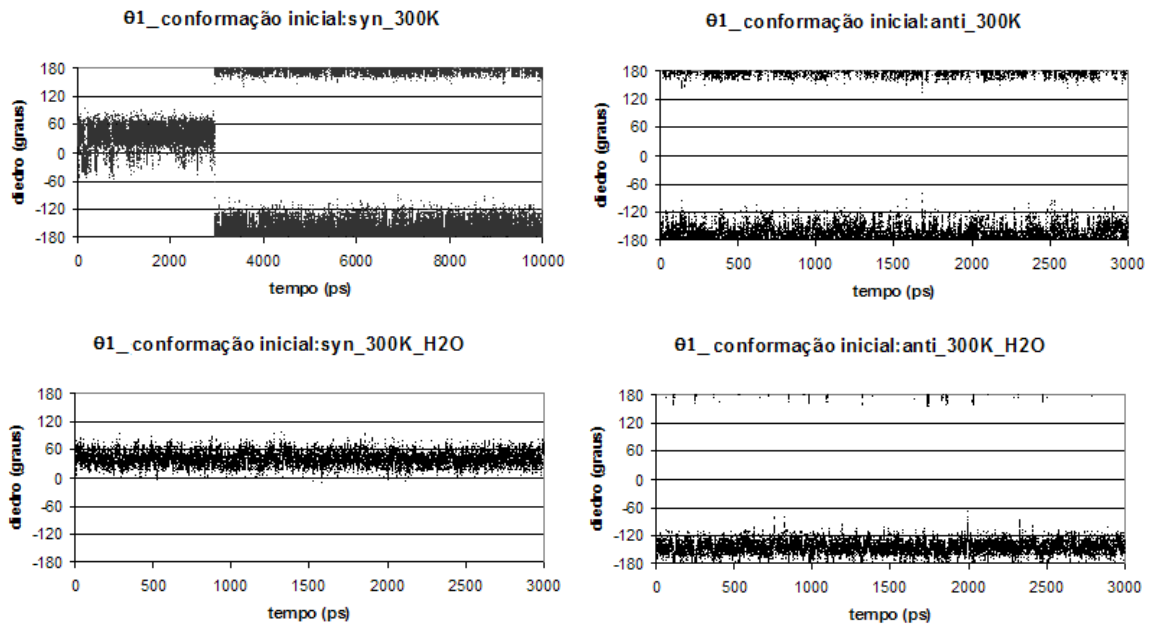
**Figura A13.** Variação de  $\theta_2$  no vácuo e na água para as conformações iniciais *syn* (esquerda) e *anti* (direita) do ribonucleosídeo 1 (R=H) a 300 K.



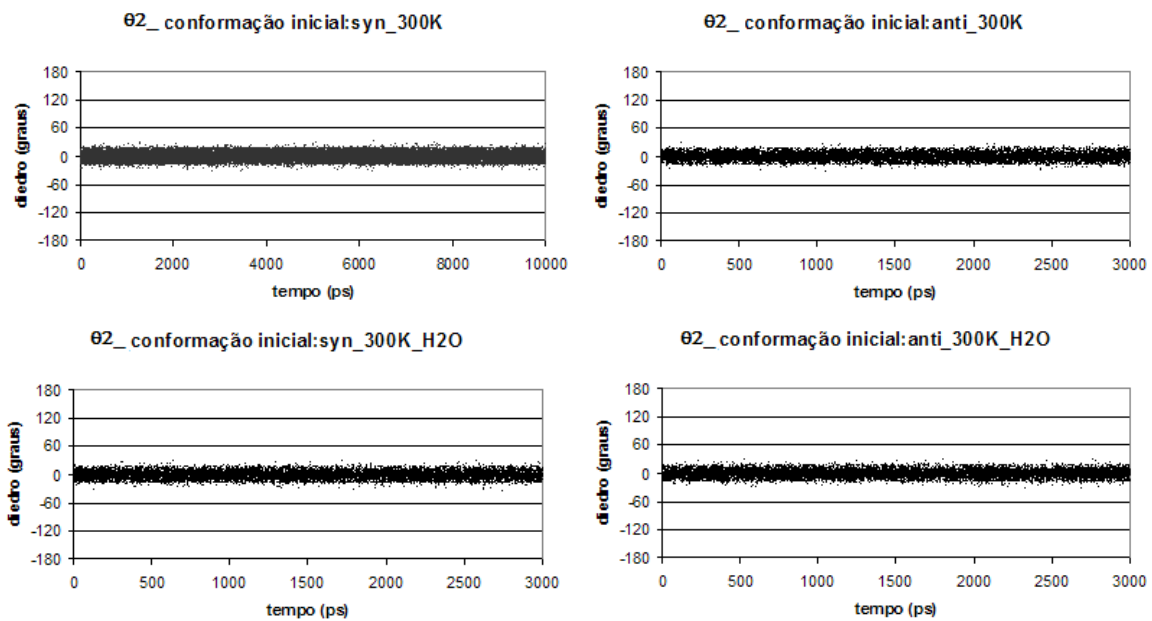
**Figura A14.** Variação de  $\theta_1$  no vácuo e na água para as conformações iniciais *syn* (esquerda) e *anti* (direita) do ribonucleosídeo **1a** (R=6-Me) a 300 K.



**Figura A15.** Variação de  $\theta_2$  no vácuo e na água para as conformações iniciais *syn* (esquerda) e *anti* (direita) do ribonucleosídeo **1a** (R=6-Me) a 300 K.



**Figura A16.** Variação de  $\theta_1$  no vácuo e na água para as conformações iniciais *syn* (esquerda) e *anti* (direita) do ribonucleosídeo **1b** (R=6-F) a 300 K.



**Figura A17.** Variação de  $\theta_2$  no vácuo e na água para as conformações iniciais *syn* (esquerda) e *anti* (direita) do ribonucleosídeo **1b** (R=6-F) a 300 K.

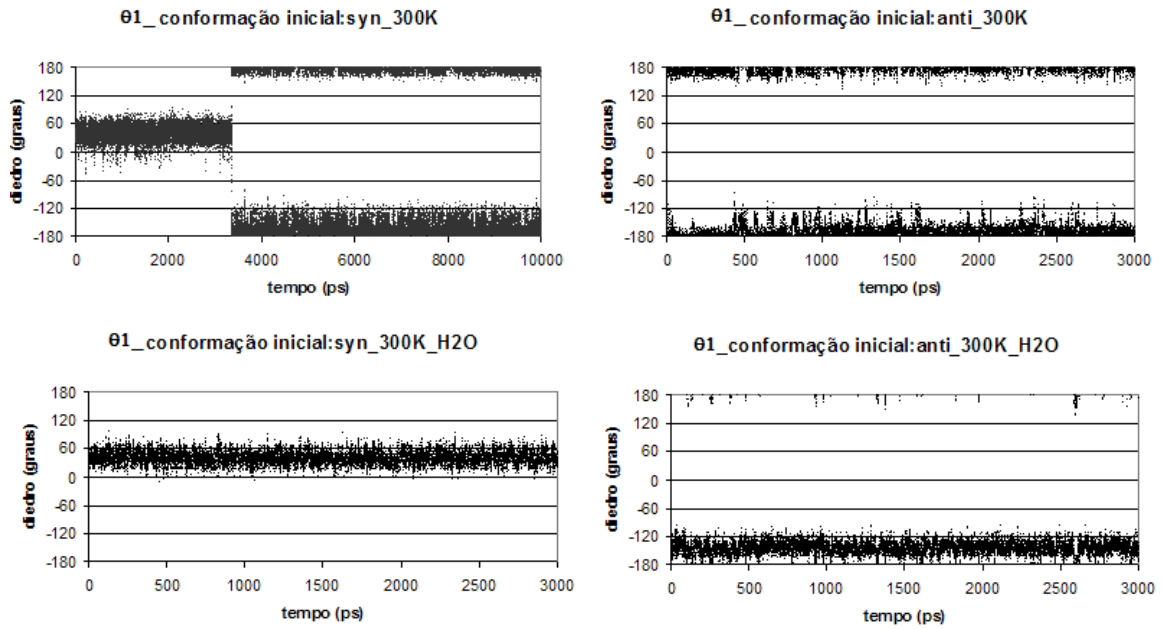


Figura A18. Variação de  $\theta_1$  no vácuo e na água para as conformações iniciais *syn* (esquerda) e *anti* (direita) do ribonucleosídeo 1c (R=6-Cl) a 300 K.

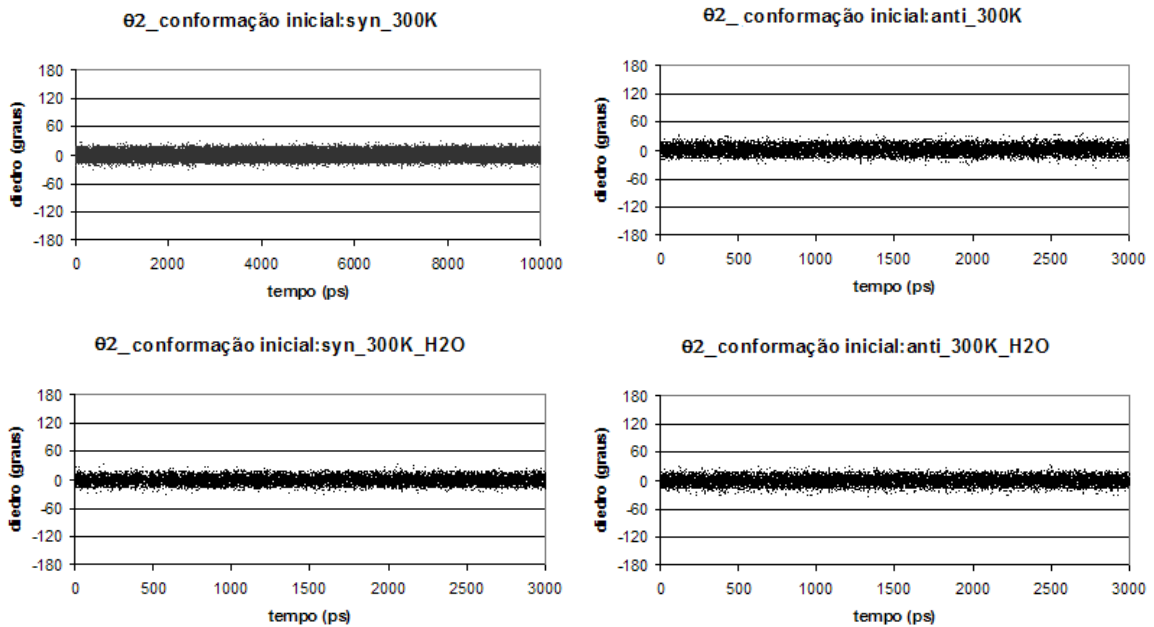
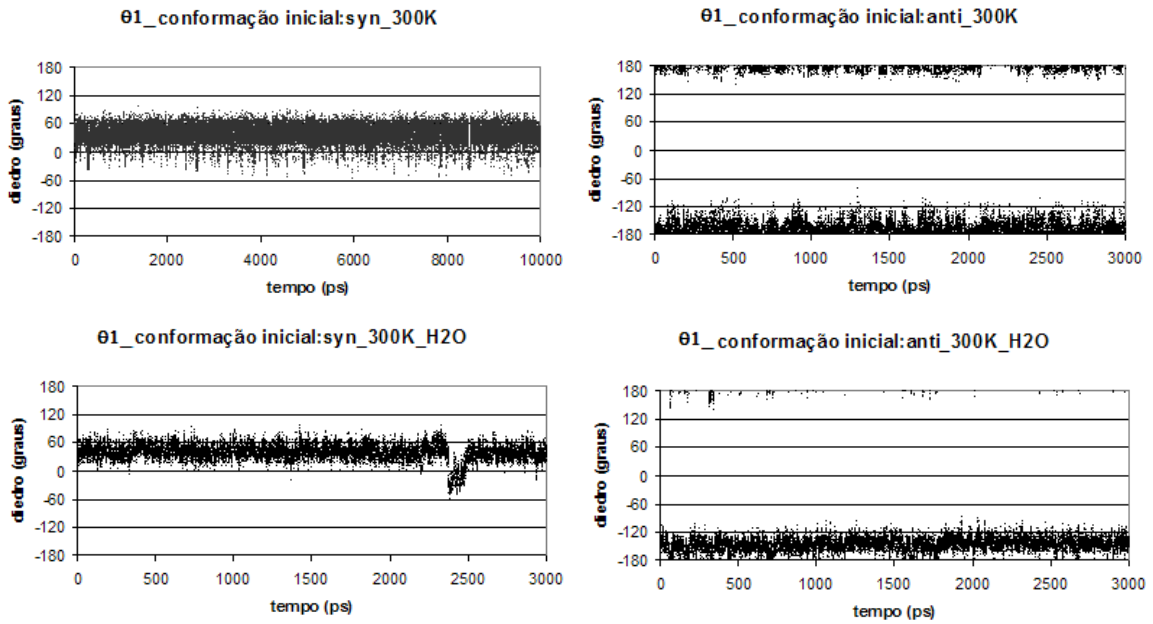
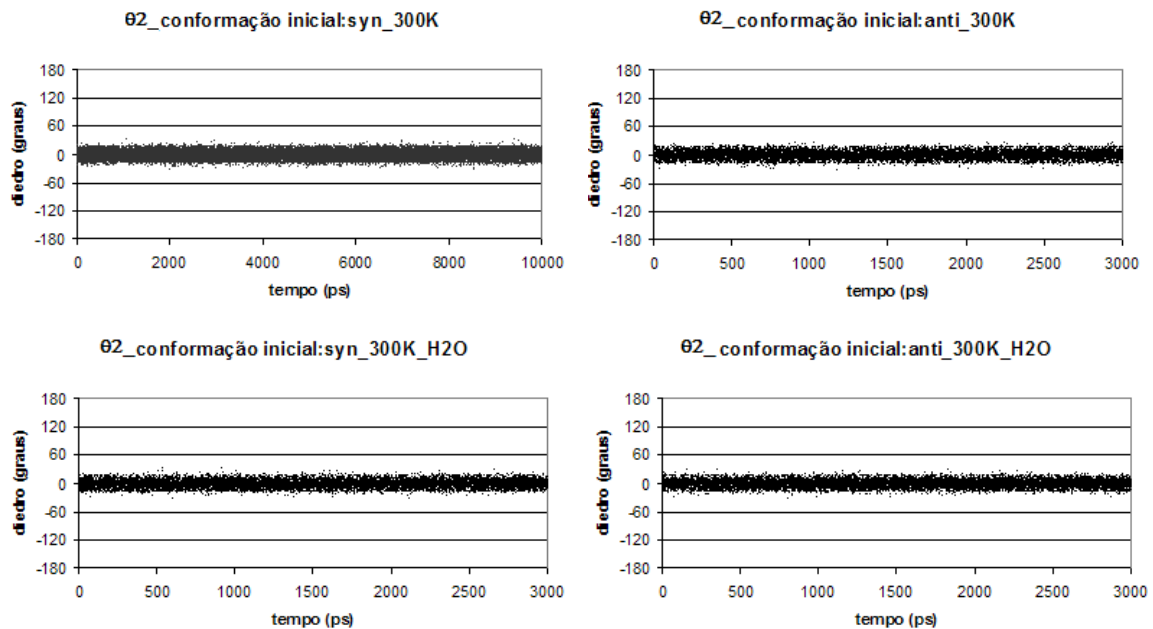


Figura A19. Variação de  $\theta_2$  no vácuo e na água para as conformações iniciais *syn* (esquerda) e *anti* (direita) do ribonucleosídeo 1c (R=6-Cl) a 300 K.

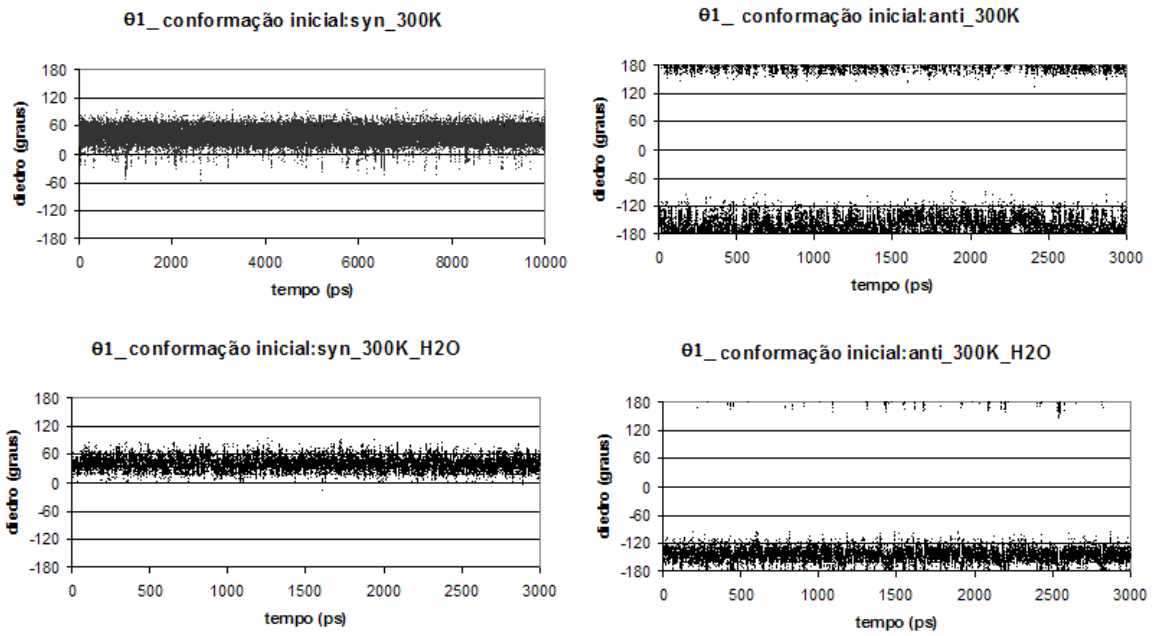


**Figura A20.** Variação de  $\theta_1$  no vácuo e na água para as conformações iniciais *syn* (esquerda) e *anti* (direita) do ribonucleosídeo 1e (R=6-OMe) a 300 K.

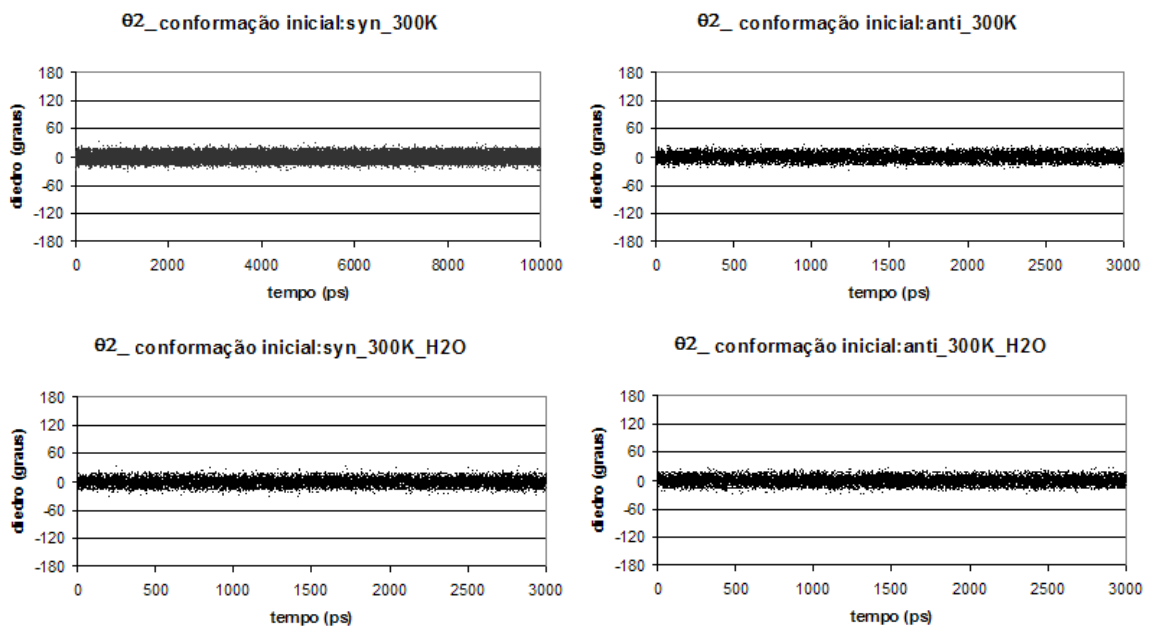


**Figura A21.** Variação de  $\theta_2$  no vácuo e na água para as conformações iniciais *syn* (esquerda) e *anti* (direita) do ribonucleosídeo 1e (R=6-OMe) a 300 K.

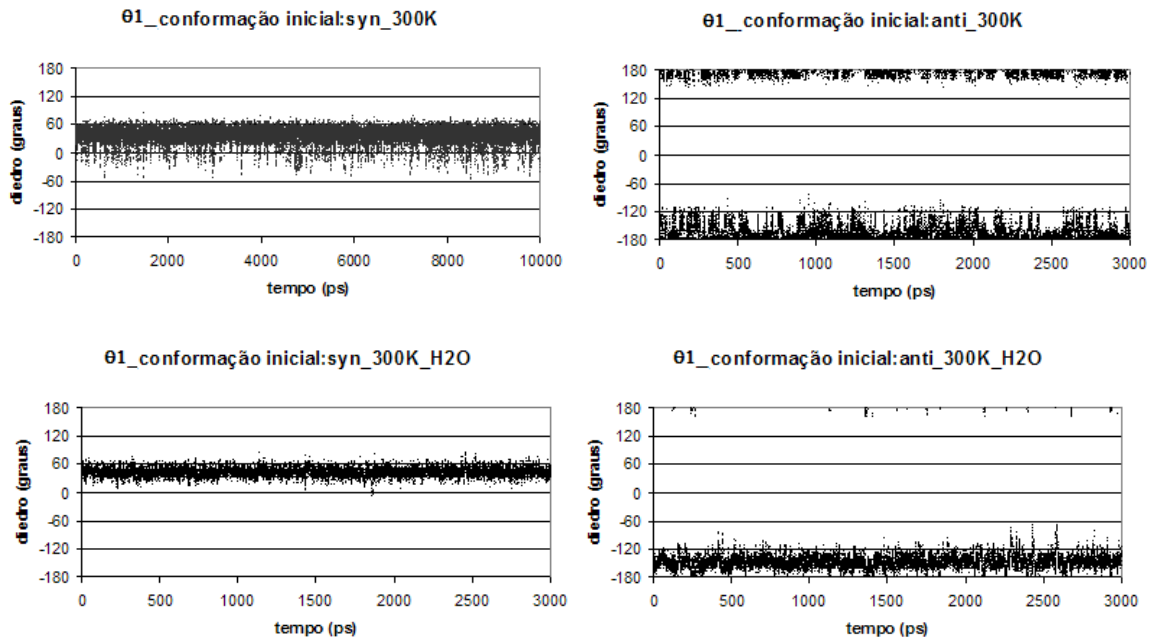




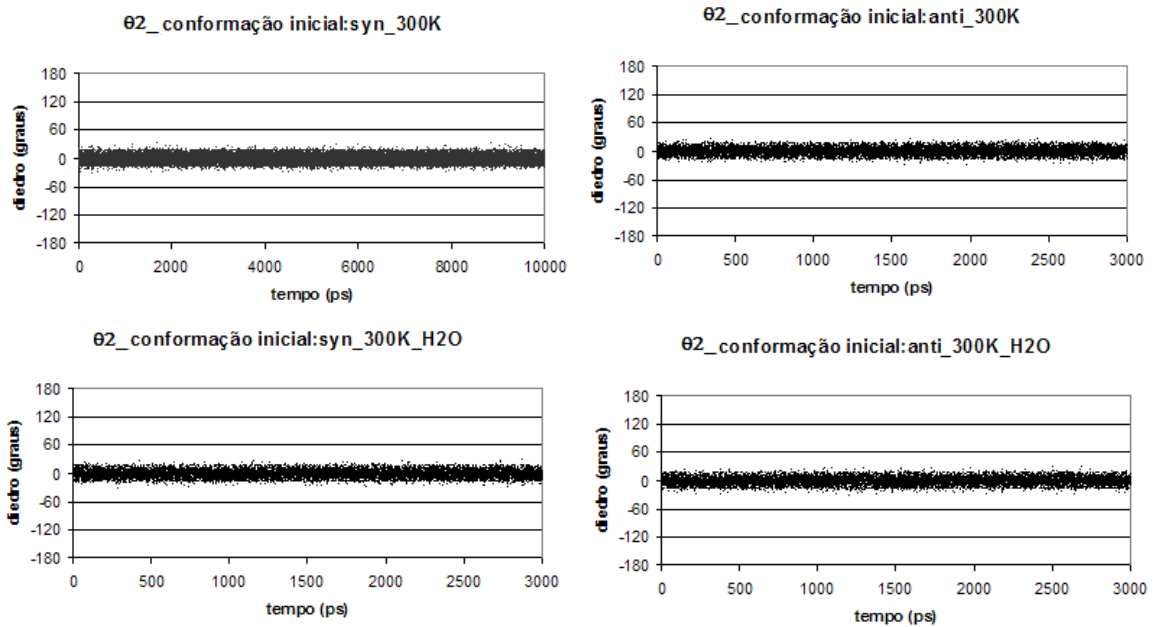
**Figura A22.** Variação de  $\theta_1$  no vácuo e na água para as conformações iniciais *syn* (esquerda) e *anti* (direita) do ribonucleosídeo 1f (R=7-F) a 300 K.



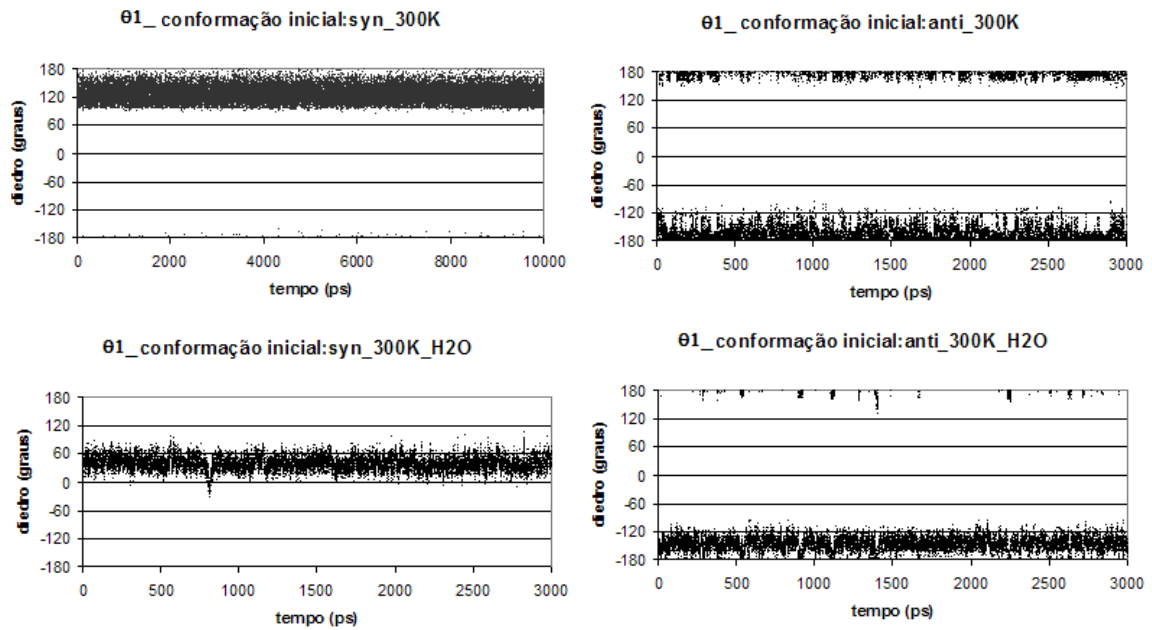
**Figura A23.** Variação de  $\theta_2$  no vácuo e na água para as conformações iniciais *syn* (esquerda) e *anti* (direita) do ribonucleosídeo 1f (R=7-F) a 300 K.



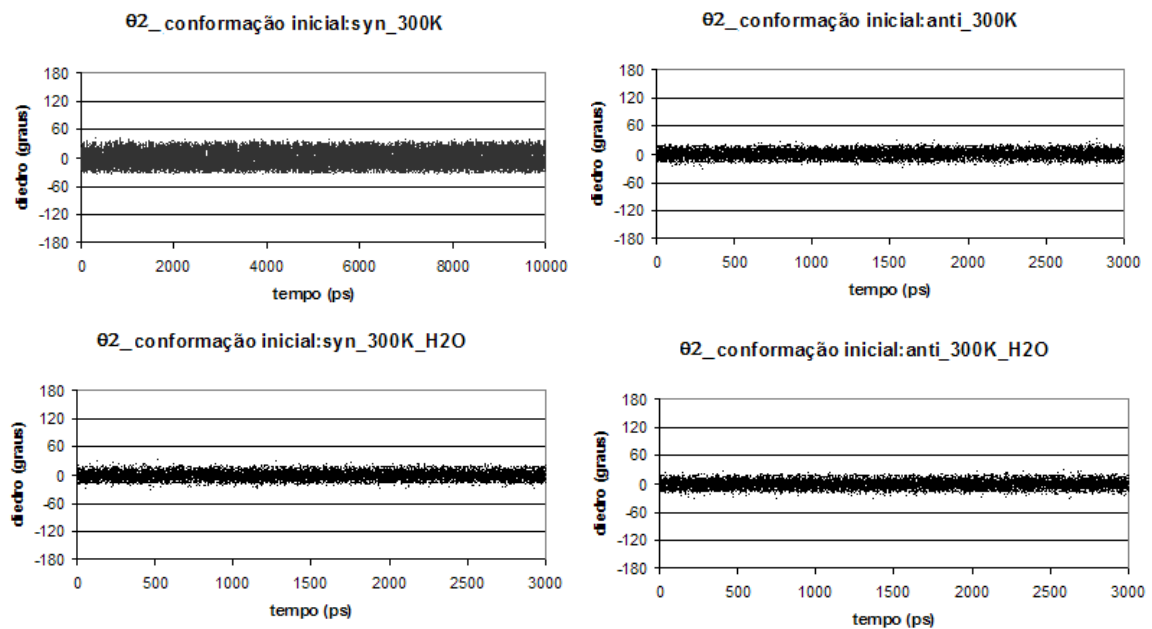
**Figura A24.** Variação de  $\theta_1$  no vácuo e na água para as conformações iniciais *syn* (esquerda) e *anti* (direita) do ribonucleosídeo **1g** (R=7-CI) a 300 K.



**Figura A25.** Variação de  $\theta_2$  no vácuo e na água para as conformações iniciais *syn* (esquerda) e *anti* (direita) do ribonucleosídeo **1g** (R=7-CI) a 300 K.

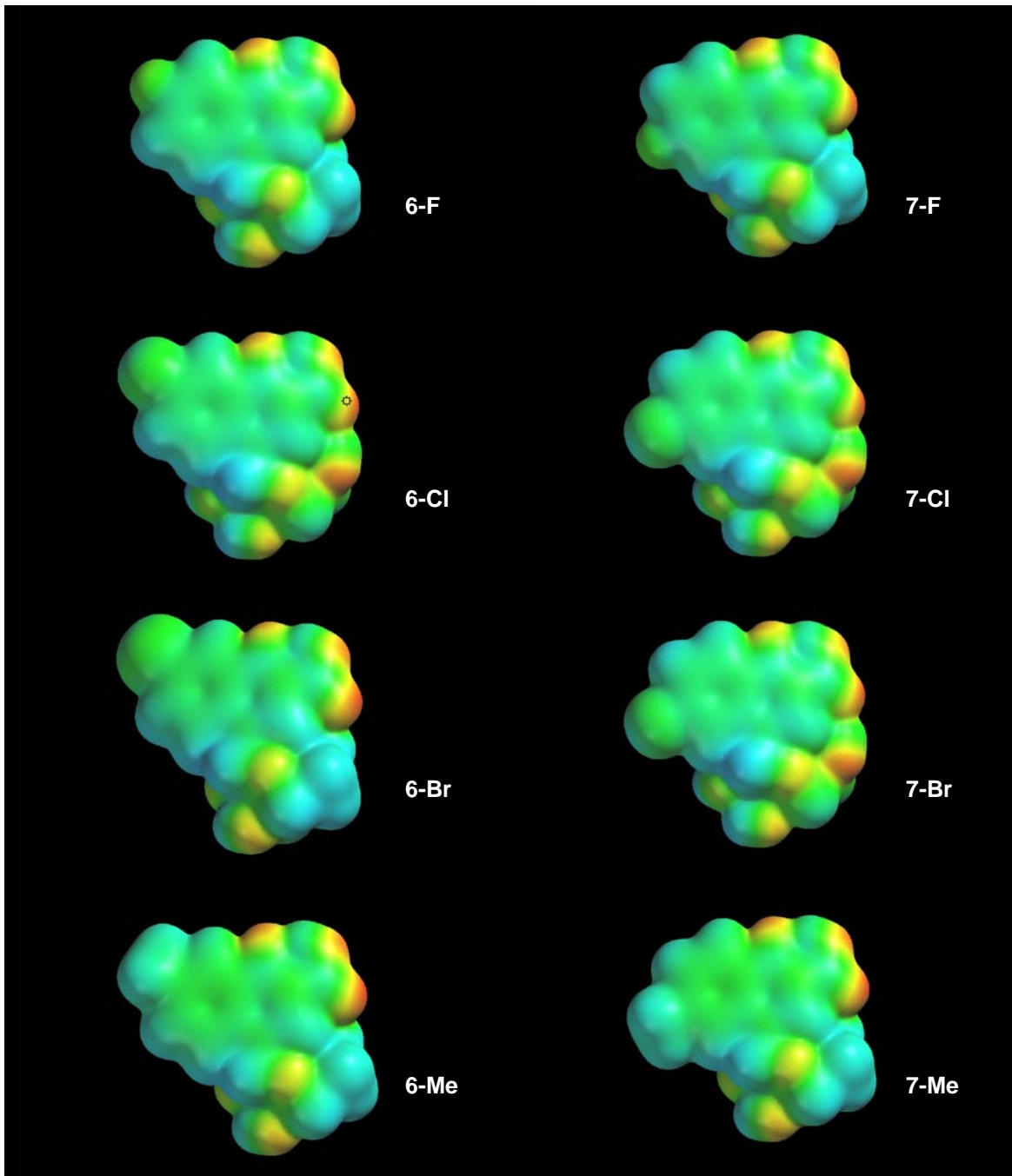
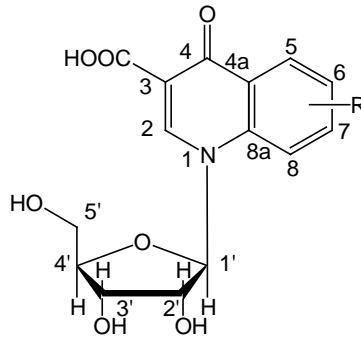


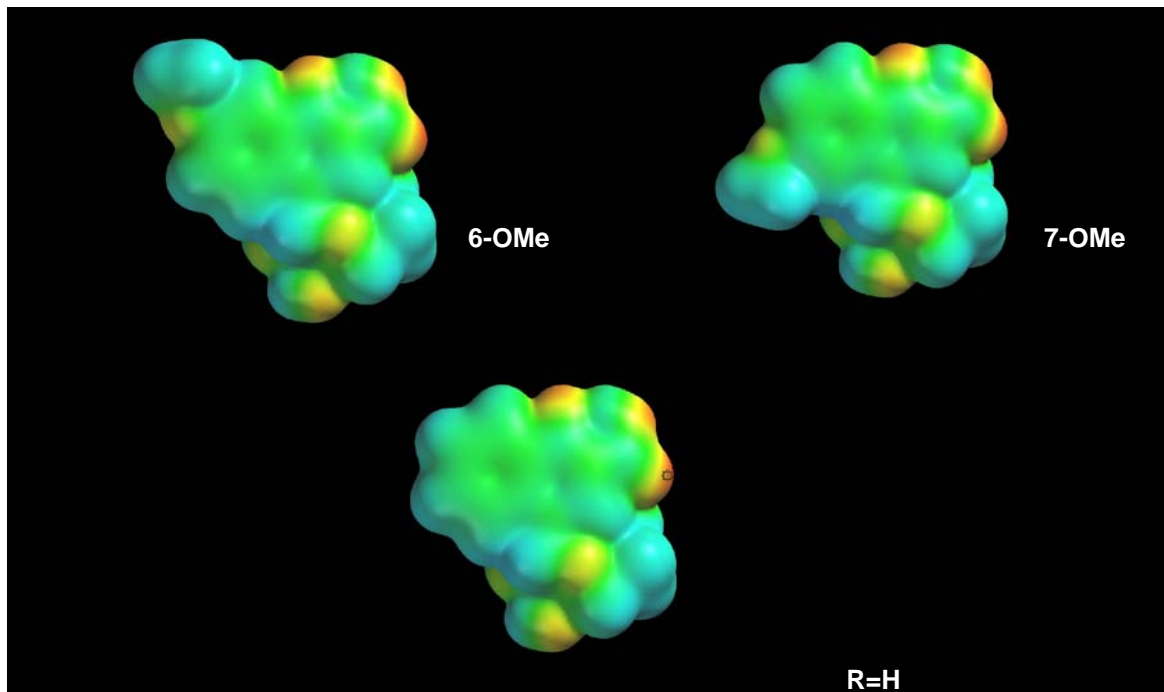
**Figura A26.** Variação de  $\theta_1$  no vácuo e na água para as conformações iniciais *syn* (esquerda) e *anti* (direita) do ribonucleosídeo 1i (R=7-Me) a 300 K.



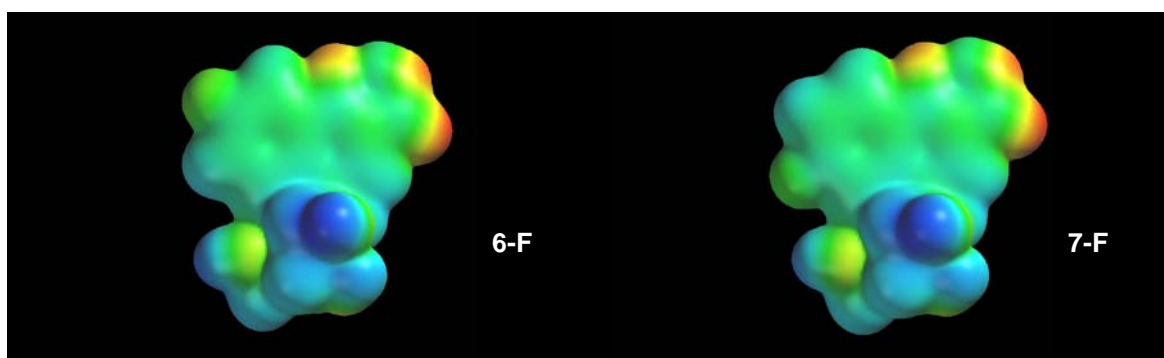
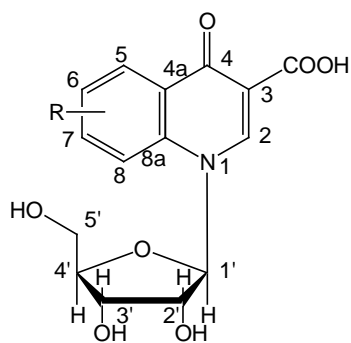
**Figura A27.** Variação de  $\theta_2$  no vácuo e na água para as conformações iniciais *syn* (esquerda) e *anti* (direita) do ribonucleosídeo 1i (R=7-Me) a 300 K.

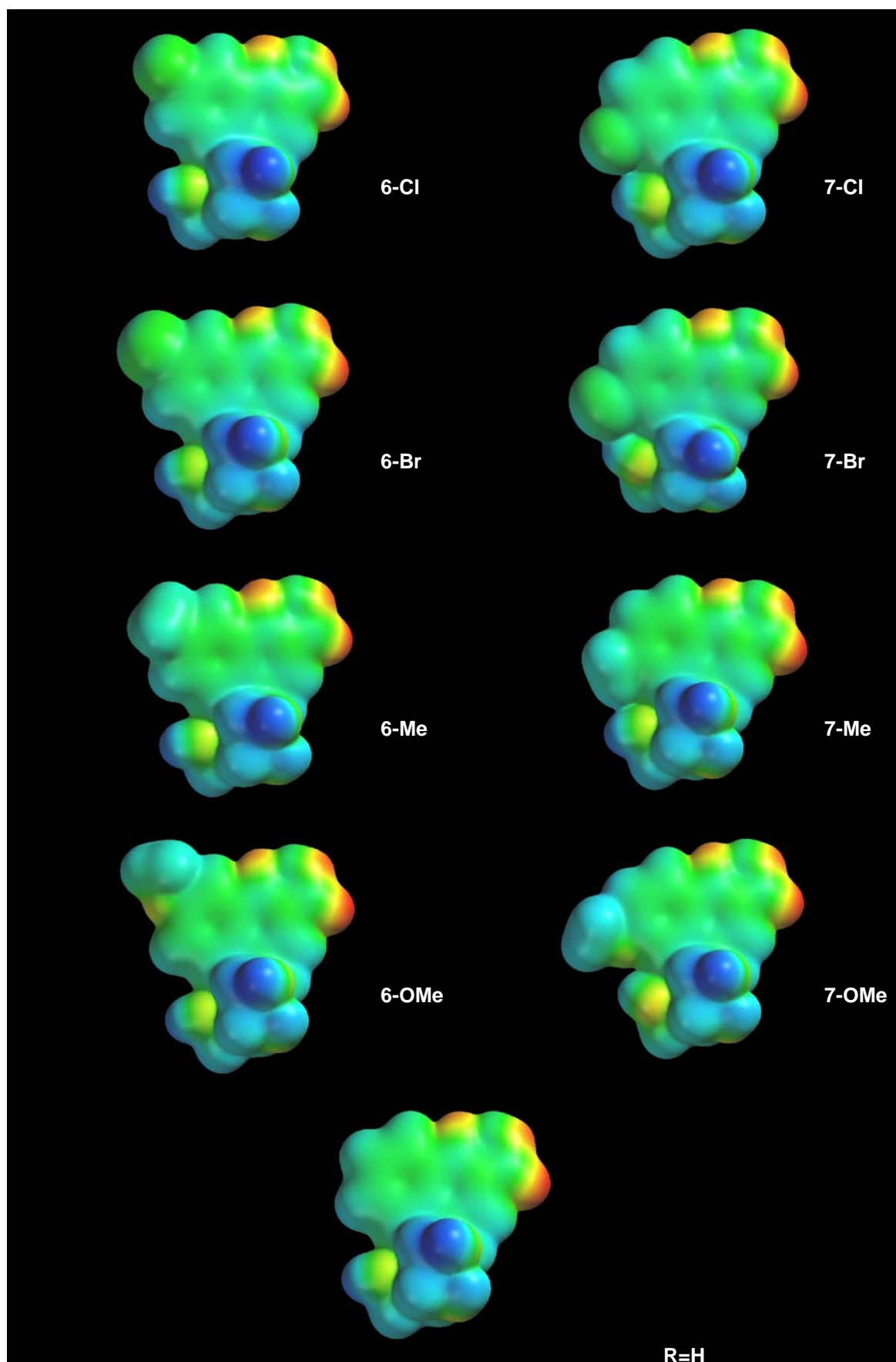
**Figura A28.** Mapas de potencial eletrostático feitos com o programa *Spartan* para os ribonucleosídeos estudados na conformação *anti*.

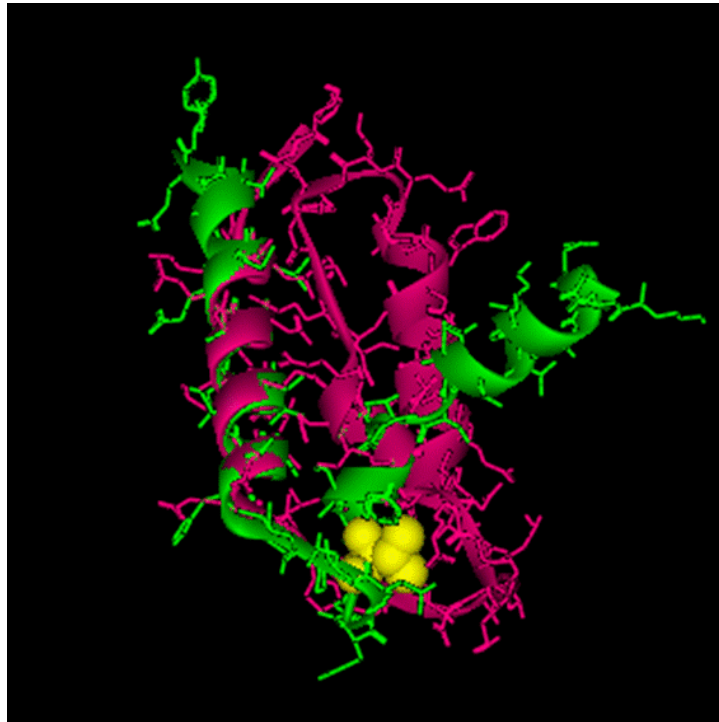




**Figura A29.** Mapas de potencial eletrostático feitos com o programa *Spartan* para os ribonucleosídeos estudados na conformação *syn*.







**Figura A30.** Sobreposição da Região III da DNA polimerase do HSV-1 (verde) e do domínio DNA polimerase da Transcriptase Reversa do HIV (rosa). Em amarelo o resíduo VAL823.

# ***Anexo II***

---



## ***Trabalhos desenvolvidos durante a tese***

---

### **- Trabalhos resumidos publicados em anais de eventos**

1. **YONEDA**, J.D., AZEREDO, R.B.V., VELLOSO, M.H.R., ALBUQUERQUE, M.G., LEAL, K.Z., SEIDL, P.R., ALENCASTRO, R.B., de SOUZA, M.C.B.V., FERREIRA, V.F.; *“Análise conformacional de ribonucleosídeos quinolônicos com atividade anti-HSV-1”*, X Jornada Brasileira de Ressonância Magnética, Livro de resumos, **2008**, P.75-76.
2. **YONEDA**, J.D., SEIDL, P.R., LEAL, K.Z.; *“Cálculos de deslocamentos químicos de RMN de <sup>13</sup>C de anéis naftênicos”*, X Jornada Brasileira de Ressonância Magnética, Livro de resumos, **2008**, P.109-110.
3. LINDGREN, E.B., VIANA, K.P., LEAL, K.Z., **YONEDA**, J.D., CORREA, A.L., FRANÇA, H.S., ROCHA, L.M.; *“Análise conformacional de floroglucínóis do Hypericum brasiliense”*, X Jornada Brasileira de Ressonância Magnética, Livro de resumos, **2008**, P.73-74.
4. SEIDL, P.R., **YONEDA**, J.D., LEAL, K.Z.; *“Molecular distortions as indicators of steric effects”*, 19th Conference on Physical Organic Chemistry, Livro de resumos, **2008**, P.88.
5. **YONEDA**, J.D., ALBUQUERQUE, M.G., LEAL, K.Z., SEIDL, P.R., ALENCASTRO, R.B., de SOUZA, M.C.B.V., FERREIRA, V.F.; *“Docking de Ribonucleosídeos com Atividade Anti-HSV-1”*, XI Encontro Regional da SBQ-Rio, Livro de resumos, **2007**, P002 020, cd rom.
6. SEIDL, P.R., LEAL, K.Z., Oszczapowicz, J., **YONEDA**, J.D., Simionato, R.A.; *“Substituent effects on NMR chemical shifts of rigid systems – The importance of steric contributions”*, 9th Latin American Conference on Physical Organic Chemistry, Livro de resumos, **2007**, P.200.

7. **YONEDA**, J.D., SEIDL, P.R., LEAL, K.Z.; *“Determining the magnitude of steric effects by NMR”*, 9th Latin American Conference on Physical Organic Chemistry, Livro de resumos, **2007**, P.149.
8. SEIDL, P.R., LEAL, K.Z., Oszczapowicz, J., Simionato, R.A., **YONEDA**, J.D.; *“Interpreting substituent effects in monosubstituted adamantanes by NMR chemical shift calculations”*, XI Nuclear Magnetic Resonance Users Meeting / Workshop: NMR in South America, Livro de resumos, **2007**, P.87-88.
9. Menezes, S.M.C., SEIDL, P.R., Tasic, L., LEAL, K.Z., **YONEDA**, J.D.; *“Absorptions of naphthenic rings in NMR spectra of petroleum asphaltenes”*, XI Nuclear Magnetic Resonance Users Meeting / Workshop: NMR in South America, Livro de resumos, **2007**, P.81-82.
10. SEIDL, P.R., **YONEDA**, J.D., LEAL, K.Z., *“Locating and Evaluating Steric Effects by NMR”*. 18th Conference on Physical Organic Chemistry, Livro de resumos, **2006**, P. 26-27.
11. **YONEDA**, J.D., ALBUQUERQUE, M.G., LEAL, K.Z., SEIDL, P.R., ALENCASTRO, R.B., de SOUZA, M.C.B.V., FERREIRA, V.F.; *“Simulação por dinâmica molecular de um nucleosídeo derivado do ácido 1,4-dihidro-4-oxoquinolino-3-carboxílico”*. X Encontro regional da SBQ-Rio, Livro de resumos, **2005**, QT07.
12. **YONEDA**, J.D., SEIDL, P R., LEAL, K.Z., CAMPOS, M.G., RITTNER, R.; *“Substituent effects on camphors and norcamphors”*. VIII Conferência Latino-Americana de Físico-Química Orgânica, Livro de resumos, **2005**, P. 83.
13. **YONEDA**, J.D., LEAL, K.Z., SEIDL, P.R.; *“<sup>13</sup>C chemical shifts of di- and triamantanes: a similar effect of a methyl group on adamantanes”*, X Nuclear Magnetic Resonance Users Meeting and III Portuguese-Brazilian NMR Meeting, Livro de resumos, **2005**, P.110.

**- Trabalho aceito para apresentação em evento**

- **YONEDA**, J.D., LEAL, K.Z., AZEREDO, R.B.V., VELLOSO, M.H.R., SUGIURA, M., ALBUQUERQUE, M.G., SEIDL, P.R., ALENCASTRO, R.B., CUNHA, A.C., SANTOS, F.C., de SOUZA, M.C.B.V., FERREIRA, V.F.; “*Conformational analyses of a ribonucleoside with anti-HSV-1 activity*”, a ser apresentado na 50th Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference, Califórnia, **2009**.

**- Artigos publicados em periódicos**

1. Laine, E., **YONEDA**, J.D., Blondel, A., Malliavin, T.E.; “*The conformational plasticity of calmodulin upon calcium complexation gives a model for its interaction with the Oedema factor of Bacillus anthracis*”, Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, **2008**, 71 (4), 1813-1829.
2. **YONEDA**, J.D., LEAL, K.Z., SEIDL, P.R., AZEREDO, R.B.V., KLEINPETER, E.; “*Cânfora: um modelo conveniente para ilustrar experimentos de RMN*”, Química Nova, **2007**, 30(8), 2053-2056.
3. **YONEDA**, J.D., ALBUQUERQUE, M.G., LEAL, K.Z., SEIDL, P.R., WHEELER, R.A., BOESCH, S., ALENCASTRO, R.B., SOUZA, M.C.B.V, FERREIRA, V.F.; “*Molecular Dynamics Simulations of a Nucleoside Derivative of the 1,4-Dihidro-4-Oxoquinoline-3-Carboxylic Acid Synthesized as a Potential Antiviral Agent: Conformational Studies in Vacuum and in Water*”, Journal of Molecular Structure (THEOCHEM), **2006**, 778, 97-103.
4. **YONEDA**, J.D., SEIDL, P.R., LEAL, K.Z., CAMPOS, M.G., RITTNER, R.; “*A theoretical investigation of steric effects on <sup>1</sup>H chemical shifts of camphor and norcamphor derivatives*”. Journal of Molecular Structure (THEOCHEM), **2006**, 767, 29-36.

5. **YONEDA**, J.D., LEAL, K.Z., SEIDL, P.R.; *"<sup>13</sup>C Chemical Shifts of Di- and Triamantanes: A Similar Effect of a Methyl Substituent on Adamantanes"*. Annals of Magnetic Resonance, **2005**, 4 (1), 9-16.
6. LEAL, K.Z., SEIDL, P.R., **YONEDA**, J.D., SANTOS, C.V.B, SOUZA, M.C.B.V., FERREIRA, V.F.; *"Conformational Analysis of Nucleoside of 1,4-Dihidro-4-Oxoquinoline-3-Carboxylic Acid Analogue"*, Journal of Molecular Structure, 748 (1-3), **2005**, 137-141.
7. SEIDL, P R., **YONEDA**, J.D., LEAL, K.Z.; *"An NMR investigation of steric effects in alkyl and haloadamantanes"*, Journal of Physical Organic Chemistry, 18 (2), **2005**, 162-166.

**- Atividade docente:**

- Professora substituta no departamento de Físico-Química da Universidade Federal Fluminense de outubro de 2005 a outubro de 2007 ministrando os cursos de Físico-Química I, Físico-Química I experimental e Físico-Química V experimental para os cursos de Farmácia, Química Industrial, licenciatura em Química e Engenharia Química.

- Orientação da monitora Diana Ferreira da Silva, na disciplina de Físico-Química I experimental, durante o ano de 2006.

- Monitora do curso de introdução à Ressonância Magnética (multi)Nuclear em fevereiro de 2006, no Instituto Militar de Engenharia.

- Participação na banca examinadora de Seminários da disciplina Tutoria II do curso de Química, em julho de 2007.

- Co-orientação dos alunos de Iniciação Científica do Laboratório da Prof<sup>a</sup> Kátia Zaccur Leal de 2003 a 2008.