

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Josenaide Pereira do Nascimento**

**ESTUDO DE FLAVONÓIDES INIBIDORES DA INTEGRASE  
DO HIV-1 ATRAVÉS DE MÉTODOS DFT E DINÂMICA  
MOLECULAR COM QM/MM**

**BELÉM  
2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Josenaide Pereira do Nascimento**

**ESTUDO DE FLAVONÓIDES INIBIDORES DA INTEGRASE  
DO HIV-1 ATRAVÉS DE MÉTODOS DFT E DINÂMICA  
MOLECULAR COM QM/MM**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Pará como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Química.

Área de Concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Nahum Alves  
Co-Orientador: Prof. Dr. Jerônimo Lameira Silva

**BELÉM  
2010**

**Josenaide Pereira do Nascimento**

**ESTUDO DE FLAVONÓIDES INIBIDORES DA INTEGRASE DO HIV-1  
ATRAVÉS DE MÉTODOS DFT E DINÂMICA MOLECULAR COM QM/MM**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Pará como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Química.

Data da Apresentação: **02 de junho de 2010**

Conceito: \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Cláudio Nahum Alves  
ICEN/UFPA - Orientador

Prof. Dr. Jerônimo Lameira Silva  
ICEN/UFPA - Co-Orientador

Prof. Dr. Fábio Alberto de Molfetta  
ICEN/UFPA - Membro

Prof. Dr. Davi do Socorro Barros Brasil  
ITEC/UFPA - Membro

Dedico este trabalho com todo carinho aos meus pais Antonio Geraldo e Francinaide Nascimento e ao meu marido Carlos Eduardo Sábio, que foram principais fontes de inspiração para realização deste.

E a duas pessoas muito especiais que infelizmente não estão mais entre nós, meu primo Jean Carlos e meu tio avó Antonio Emidio, onde quer que eles estejam tenho certeza que eles estão muito felizes por esta minha conquista.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a DEUS por todas as graças e livramentos concedidos e por ter iluminado meu caminho;

Agradeço também ao meu marido, uma pessoa muito especial na minha vida que em todos os momentos me deu apoio, me incentivou me encorajou e que de coração esteve ao meu lado nos momentos em que mais precisei;

Quero agradecer a minha mãe Francinaide, que me deu o dom da vida e o ensinamento necessário para assumir as responsabilidades da trajetória por mim escolhida, ao meu pai que é para mim um exemplo de vida nos momentos que não tive condições de continuar a caminha;

Em especial quero agradecer as minhas irmãs Geovania e Geralda e a minha sobrinha Giovanna pelo carinho, dedicação e o apoio incansável desde o início do curso até a conclusão de mais esse passo importante em minha vida;

Aos meus colegas e amigos Isaque Medeiros, Natália Silva, Maria Carolina, Nelson Alencar, Gleiciane Leal, Maíris Sousa, Paulo Robson, José Gomes, Rogério Silva, Diego Lima, Glaécia Pereira, Davi Brasil, Mauro Reis e Elinaldo Sampaio pela palavra amiga e pela força nos momentos difíceis desta jornada;

Agradeço a todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para a formulação deste trabalho e para o meu crescimento e desenvolvimento;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa de estudos durante todo o mestrado;

À UFPA e em especial ao Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos, por toda infraestrutura disponibilizada;

E por fim um agradecimento ao meu orientador Cláudio Nahum Alves por ter acreditado em meu trabalho, pelos conhecimentos e ensinamentos que me foram de grande importância, pela paciência e amizade adquirida no decorrer de nosso trabalho.

Muito Obrigada.

“Deus não trabalha na ansiedade do homem.  
As coisas acontecem na hora certa!  
As coisas acontecem exatamente quando  
devem acontecer!  
Se Deus trouxe isto a você, Ele lhe trará  
algo através de sua fé.  
Momentos felizes louvem a Deus.  
Momentos difíceis busquem a Deus.  
Momentos silenciosos adorem a Deus.  
Momentos dolorosos confiem em Deus.  
Cada momento da sua vida agradeça a  
Deus.”

## RESUMO

Os flavonóides são um grupo de compostos polifenólicos de ocorrência natural encontrados nos vegetais, frutas e cereais. Durante as últimas décadas, os flavonóides têm recebido crescente interesse, uma vez que muitos estudos bioquímicos e epidemiológicos têm demonstrado que possuem efeitos benéficos para a saúde humana. Uma das principais propriedades dos flavonóides é a inibição da replicação do vírus da imunodeficiência. Nesta dissertação apresentam-se resultados do uso dos métodos computacionais: Mecânica Quântica/Mecânica Molecular (QM/MM) e Dinâmica Molecular (DM) aplicados ao estudo das interações entre a enzima integrase (IN) do HIV-1 e o flavonóide quercetagina. Através destes métodos foi possível identificar os principais tipos de interações que ocorrem entre os resíduos da IN e o inibidor quercetagina. Além disso, apresenta-se também nesta dissertação a acidez em fase gasosa e em solução para quinze compostos flavonóides determinados através de cálculos teóricos B3LYP/6-311++G(d,p). O objetivo foi encontrar o sítio de desprotonação dos compostos e correlacionar as propriedades de acidez com a atividade anti-HIV-1. As informações reportadas nesta dissertação podem ser usadas para o planejamento de novos inibidores de IN. Uma vez que os resultados fornecem informação sobre o mecanismo de inibição usado por essas moléculas.

**PALAVRAS-CHAVE:** HIV, AIDS, flavonóides, anti-HIV-1, integrase, DFT/B3LYP, propriedades de acidez.

## ABSTRACT

Flavonoids are a group of naturally occurring polyphenolic compounds found in vegetables, fruits, and cereals. During the last decades, flavonoids have received growing interest since many epidemiological and biochemical studies have demonstrated that they possess beneficial effects on human health. A of the main properties of the flavonoids is inhibition of human immunodeficiency virus (HIV) transcriptase and HIV replication. In this dissertation is presented results of the Quantum Mechanics/Molecular Mechanics (QM/MM) and Molecular Dynamics (MD) applied to study of the interactions between the enzyme integrase (IN) of HIV-1 and the inhibitor quercetagenin. Through these methods we could identify the main types of interactions that occur between the residues of IN and the inhibitor quercetagenin. Moreover, present thus in this dissertation the gas phase and in solution acidities for the fifteen compound flavonoids determined through theoretical B3LYP/6-311++G(d,p) calculations. The aim was to find the desprotonation site of the compounds and correlate these thermodynamic quantities with the activity anti-HIV-1. The information reported in this dissertation can be used for the design of new inhibitors of IN. In conclusion this results can supply some information about the inhibition mechanism used for this molecules.

**KEY WORDS:** HIV, AIDS, flavonoids, anti-HIV-1, integrase, DFT/B3LYP, acidity properties.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Uma visão global da infecção pelo vírus HIV, as áreas em vermelho mostram os países com maior número de casos, os dados foram obtidos dividindo o número de adultos (15-49 anos) vivendo com AIDS, pela população adulta (15-49 anos) de cada país.....	20
Figura 2	Ciclo de replicação do HIV. <u>1</u> adsorção; <u>2</u> fusão; <u>3</u> desencapamento; <u>4</u> transcrição reversa; <u>5</u> integração ao genoma do hospedeiro; <u>6</u> transcrição em RNA viral genômico e mRNA; <u>7</u> tradução em poliproteínas env, gag e gag-pol; <u>8</u> montagem; <u>9</u> brotamento; <u>10</u> maturação.....	21
Figura 3	Estrutura do complexo cristalográfico 1QS4 complexada com o 5CITEP. Este complexo apresenta três cadeias idênticas, A, B e C. A região expandida apresenta o sítio onde o 5CITEP se complexou (cadeia A). Os resíduos de aminoácidos e o átomo de magnésio, os elementos essenciais para a atividade catalítica da enzima, são apresentados.....	23
Figura 4	Principais inibidores da integrase divulgados por FESEN et al.....	24
Figura 5	Representação do Raltegravir ou MK-0518 o primeiro inibidor de integrase.....	25
Figura 6	Representação dos principais inibidores do HIV, para cada estágio do ciclo reprodutivo do vírus.....	26
Figura 7	Principais classes de flavonóides.....	27
Figura 8	a) Domínio catalítico do HIV-1 integrase complexado com $Mg^{2+}$ e o inibidor 5CITEP, cadeia A em azul, cadeia B em vermelho e cadeia C em	

	cinza; b) inibidor 5CITEP 1-(5- cloroindol-3-il)-3-hidroxi-3-(2 <i>H</i> -tetrazol-5-il)-propanona e c) estrutura do flavonóide quercetagetina.....	32
Figura 9	A enzima integrase no interior de uma caixa cúbica de molécula de água com dimensão de 80 Å.....	33
Figura 10	Comparação entre os valores de acidez em fase gasosa e em solução.....	39
Esquema 1	Estruturas de ressonância do composto <b>15</b> para as posições 4' e 7.....	41
Figura 11	Representação da interação entre a enzima IN, o inibidor quercetagetina, em quatro conformações diferentes, e o cátion Mg <sup>2+</sup> . .....	50
Figura 12	Representação da interação entre a enzima IN, o inibidor quercetagetina, em quatro conformações diferentes, e o cátion Mg <sup>2+</sup> .....	52
Figura 13	Representação das interações mais importantes entre os resíduos da integrase e as quatro diferentes conformações do inibidor (quercetagetina) na enzima IN.....	54
Figura 14	Representação da energia de interação para (a) molécula neutra e seus íons (b) 4' e (c) 7 para cada sistema dos últimos 100 ps de DM.....	56
Figura 15	Gráfico da energia de interação por resíduo.....	57

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1	Estrutura básica, numeração e atividade biológica dos compostos flavonóides estudados.....	28
Tabela 2	Valores de acidez dos flavonóides calculados a nível B3LYP/6-311++G** em fase gasosa e em solução, com suas respectivas posições de desprotonação.....	39
Tabela 3	Mostra a representação gráfica dos modelos de regressão linear obtidos entre os valores de acidez em fase gasosa para a posição 4'-OH do anel B e as atividades de (a) integração e (b) clivagem, assim como os modelos obtidos entre os valores de acidez em solução aquosa para a posição 4'-OH, para ambas atividades de (c) integração e (d) clivagem;.....	44
Tabela 4	Energia de interação média entre a enzima integrase e os compostos neutros (segunda coluna) e desprotonados nas posições 4' (terceira coluna) e 7 (quarta coluna).....	55

**LISTA DE SIGLAS**

HIV	Human Immunodeficiency Virus
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
UNAIDS	United Nations Programme on AIDS
DM	Dinâmica Molecular
QM/MM	Quantum Mechanical/Molecular Mechanical
PDB	Protein Data Bank
5CITEP	1-(5-chloroindol-3-yl)-3-hydroxy-3-(2H-tetrazol-5-yl)-propenone
SAR	Structure Activity Relationship
QSAR	Quantitative Structure Activity Relationship
RT	Reverse Transcriptase
IN	Integrase
PR	Protease
DFT	Density Functional Theory
HF	Hartree-Fock
PCM	Polarization Continuum Method

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	18
2.1 OBJETIVO GERAL .....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b> .....	19
3.1 PROBLEMÁTICA - O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA..	19
3.2 INTEGRASE .....	22
3.3 INIBIDORES DA INTEGRASE .....	24
3.4 FLAVONÓIDES .....	26
<b>4 MÉTODOS</b> .....	29
4.1 CÁLCULO TEÓRICO DAS PROPRIEDADES DE ACIDEZ .....	29
4.1.1 Propriedades de acidez em fase gasosa e em solução de compostos flavonóides com atividade anti-HIV-1 integrase.....	29
4.2 O MODELO .....	31
4.3 SIMULAÇÃO POR DINÂMICA MOLECULAR UTILIZANDO O MÉTODO HÍBRIDO QM/MM PARA UM FLAVONÓIDES COM AÇÃO ANTI-HIV-1 INTEGRASE .....	34

4.4 CÁLCULO DA ENERGIA DE INTERAÇÃO .....	36
4.5 CÁLCULOS DA ENERGIA DE DECOMPOSIÇÃO POR RESÍDUO....	37
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
5.1 PROPRIEDADES DE ACIDEZ EM FASE GASOSA E EM SOLUÇÃO DE COMPOSTOS FLAVONÓIDES COM ATIVIDADE ANTI-VIH-1 INTEGRASE .....	38
5.2 CÁLCULO DE $pK_a$ PARA ENZIMA INTEGRASE .....	51
5.3 DINÂMICA MOLECULAR QM/MM .....	52
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>58</b>
REFERÊNCIAS .....	60

## 1 INTRODUÇÃO

O Vírus da imunodeficiência Humana (HIV) é o agente etiológico causador da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), o qual tem a capacidade seletiva de infeccionar o sistema imunológico responsável pela defesa do organismo contra invasores (FAUCI, 1988; FOLKS, KESSLER et al., 1988). Segundo dados do UNAIDS (“The United Nations Program on AIDS”), no mundo inteiro, estima-se que 33,4 milhões de pessoas estão infectadas com o vírus. No ciclo de vida do retrovírus (HIV), três enzimas são codificadas pelo gene *pol* do HIV: transcriptase reversa (RT), integrase (IN) e protease (PR), estas enzimas são essenciais para a replicação viral, por esse motivo tornam-se alvos importantes para o desenvolvimento de fármacos contra AIDS. A IN é o mais recente alvo estudado no combate ao HIV, uma vez que inibidores de transcriptase reversa e protease têm apresentado toxidez e resistência viral (HAMMER, 2005; MARINELLO, MARCHAND et al., 2008). Os primeiros inibidores de integrase foram divulgados na década de 90 (FESEN et al., 1993; 1994), entretanto, somente no ano de 2005 foi divulgado pelo laboratório Merk um novo inibidor de integrase, que se encontra em fase de teste clínico (POMMIER, Y., A. A. JOHNSON, et al., 2005). Todavia, ainda não é conhecido o mecanismo de ação dos inibidores de integrase, bem como o mecanismo de integração.

O HIV-1 (IN) é um alvo válido e atrativo para o desenvolvimento de fármacos contra a AIDS, pois é de grande importância para o ciclo de vida viral e também não existem análogos em células humanas (POMMIER, Y., A. A. JOHNSON, et al., 2005). A IN catalisa a integração do cDNA no genoma humano, facilitando a replicação viral de maneira estável e sustentando a infecção. Estudos *in vitro* usando recombinação de proteínas permitiu a distinção entre as duas principais reações catalisadas pela IN, chamada processamento 3' e transferência de fita de DNA. Ambas as reações consistem em um

ataque nucleofílico de uma ligação fosfodiéster por um grupo hidroxila e requer um íon metálico divalente ( $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ ) como um cofator (BROWN, 1997). Entretanto, o mecanismo de inibição ainda não está claro. Existem algumas propostas na literatura para justificar a atividade anti-HIV (IN), por exemplo, para moléculas aromáticas foi sugerido que a interação do anel aromático com o íon metálico, interação do tipo cátion- $\pi$  (NICKLAUS, NEAMATI et al., 1997; MARCHAND, ZHANG et al., 2002; Pais, Zhang et al., 2002), é responsável pela atividade apresentada. Há também a possibilidade de uma interação tipo carga-carga entre o íon metálico e o ligante iônico ou cargas parciais do ligante. Foi mostrado que ambos os tipos de interação podem coexistir no sítio ligante (DOUGHERTY, 1996). Outros trabalhos também têm sugerido um modo de atuação no qual o inibidor atua como um agente quelante (POMMIER, JOHNSON et al., 2005).

Flavonóides são compostos polifenólicos amplamente encontrados no reino vegetal e que possuem atividades biológicas bastante diversificadas. Alguns compostos flavonóides apresentam ação anti-HIV, entretanto a forma de atuação desses compostos na inibição do vírus pode ser de forma diferente, por exemplo, o quercetin que é uma flavona possui atividade anti-HIV-1, inibindo a integrase (FESEN, KOHN et al., 1993). Enquanto que Baicalin, que também é uma flavona e possui atividade anti-HIV-1, inibindo a RT (TAN, MILLER et al., 1992).

Recentemente significativas pesquisas têm indicado compostos flavonóides como inibidores da integrase (FESEN, POMMIER et al., 1994; RAGHAVAN, BUOLAMWINI et al., 1995). Desse modo, torna-se fundamental compreender o mecanismo de ação dos compostos flavonóides, a fim de não só, indicar quais propriedades físico-químicas faz-se importantes para cada tipo de mecanismo de atuação, mas também, contribuir para síntese

de futuros fármacos, mais potentes e menos tóxicos, baseando-se nas propriedades ditas como importantes para ação dos mesmos.

O método de mecânica quântica combinado com o método de mecânica molecular (QM/MM) (WARSHEL E LEVITT, 1976; FIELD, BASH et al., 1990) foi desenvolvido para cálculos com proteínas e vem sendo utilizado em estudos de reações enzimáticas (GARCIA-VILOCA, GAO et al., 2004; MARTI, ROCA et al., 2004), especialmente em catálise enzimática. No método QM/MM, o ligante é explicitamente tratado por um método quântico (QM). O ambiente protéico e/ou solvente são representados por campo de força da mecânica molecular (MM). Este método tem-se mostrado eficiente para o estudo de interações entre ligantes e proteínas no sistema HIV-1 protease (HENSEN, HERMANN et al., 2004) e em outros sistemas (GRATER, SCHWARZL et al., 2005). Recentemente, esta metodologia foi utilizada para obtenção da energia de interação entre a enzima IN e alguns inibidores (S-1360, *wild-type* e N155S), os quais foram relacionados com sua atividade anti-HIV-1 IN (ALVES, MARTI et al., 2007b; a; 2008). Portanto, nesta dissertação, também realizaremos simulações de Dinâmica Molecular (DM) com o método de Mecânica Quântica/Mecânica Molecular (QM/MM) para determinar a energia de interação e a energia de decomposição por resíduo a fim de determinar as contribuições individuais dos resíduos nas interações entre enzima e inibidor. Além de realizar cálculos utilizando a Teoria do Funcional de Densidade (DFT) para um conjunto de 15 flavonóides, com objetivo de verificar a posição mais favorável de desprotonação do hidrogênio ( $H^+$ ). Estes dados foram relacionados com os resultados de DM, os quais estão de acordo com dados da literatura.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudos teóricos de flavonóides com atividade anti-HIV-1 IN, através das metodologias QM/MM e Simulação por Dinâmica Molecular, visando contribuir para o entendimento do mecanismo de ação dessas moléculas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Realizar um estudo teórico de acidez em fase gasosa e em solução para quinze compostos flavonóides com atividade anti-HIV-1-IN, com objetivo de avaliar a provável posição de desprotonação destas moléculas.

2.2.2 Estudar através de metodologias QM/MM e Dinâmica Molecular interações intermoleculares específicas entre a enzima integrase e os flavonóides com atividade anti-HIV-1 IN, buscando identificar os principais tipos de interações que ocorrem no acoplamento entre estes possíveis fármacos e a enzima integrase.

2.2.3 Dar uma contribuição a nível molecular para o mecanismo de ação da Integrase frente a estes inibidores, desta forma criar um modelo para o estudo de novos inibidores de HIV-1 partindo de produtos naturais.

### 3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

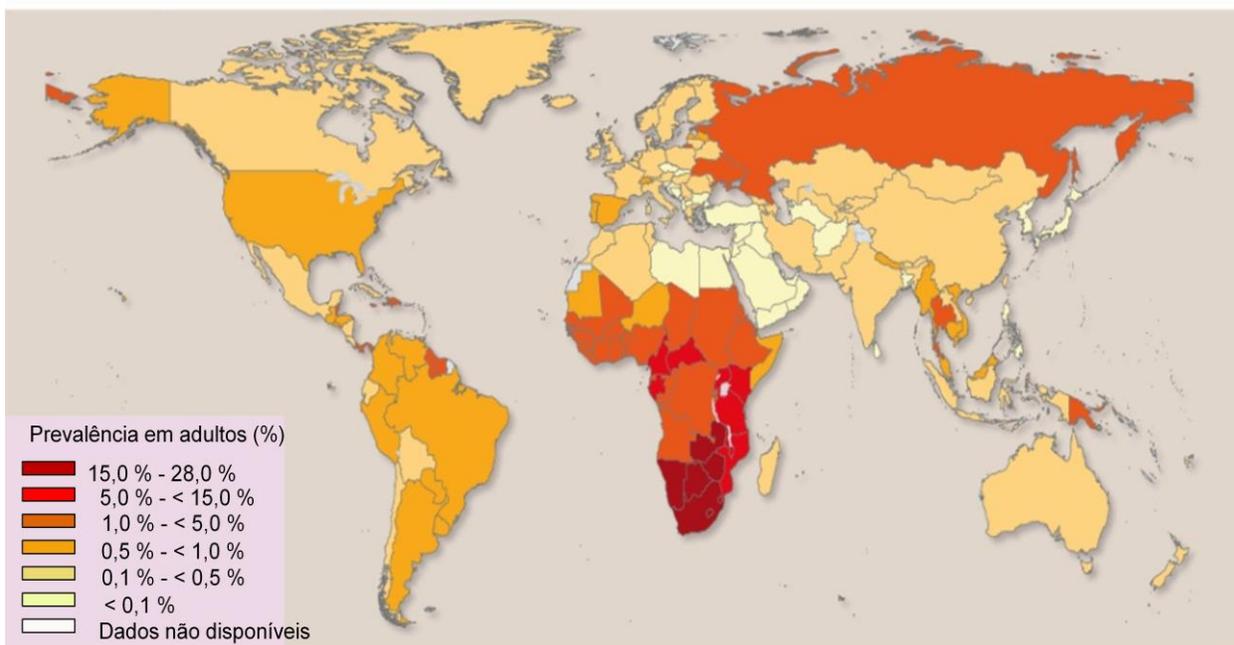
#### 3.1 PROBLEMÁTICA - O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA

O HIV, pertencente à família dos lentivírus e é considerado um retrovírus RNA, o qual foi originalmente designado vírus T linfotrófico humano (HTLV)-III. Este vírus codifica um DNA-polimerase em RNA-dependente (transcriptase reversa) e se replica através de um DNA intermediário, a cópia de DNA do genoma viral é integrada no cromossomo do hospedeiro e transcrita como um gene celular (FAUCI, 1988; FAUCI E FISCHINGER, 1988). Existem dois tipos de HIV: o Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 (HIV-1) que é o mais patogênico, cerca de 99% dos casos, e o Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 2 (HIV-2) que é menos patogênico, encontrado predominantemente no oeste da África (TRINITAPOLI, 2009).

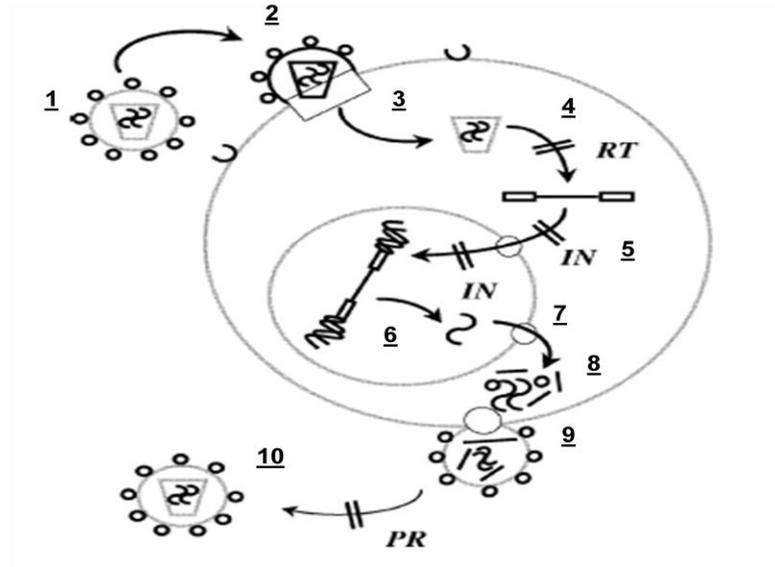
De acordo com recente boletim do Programa das Nações Unidas para HIV/AIDS (UNAIDS) sobre a situação do HIV, no mundo, aproximadamente 33,4 milhões de pessoas estão atualmente infectadas pelo vírus (Figura 1), deste total 31,3 milhões são pessoas adultas, 15,7 milhões são mulheres e 2,1 milhões são crianças com menos de 15 anos de idade, na América latina, os índices de HIV atingem cerca de 2,0 milhões de pessoas, o que torna esta doença um dos principais problemas de saúde pública mundial (UNAIDS, 2009). A Figura 1 mostra o mapa com as áreas destacadas em vermelho, as quais são as que possuem maior número de casos, os dados foram obtidos dividindo o número de adultos (15-49 anos) vivendo com AIDS, pela população adulta (15-49 anos) de cada país.

O ciclo de vida do retrovírus (Figura 2) requer três regiões principais: a região *gag*, que codifica as proteínas estruturais internas p17 (MA), p24 (CA), p7 (NC) e p6, a região *pol*, que codifica a protease (p11, PR), transcriptase reversa (p66/p51, RT) e integrase (p31,

IN) e, finalmente, a região *env*, responsável pela codificação das proteínas do envoltório, gp120 (SU) e gp41 (TM) (FRANKEL E YOUNG, 1998). O genoma do HIV-1 codifica ainda seis outras proteínas acessórias, sendo duas (*tat* e *rev*) relacionadas com a regulação da expressão gênica (FRANKEL E YOUNG, 1998).



**Figura 1.** Uma visão global da infecção pelo vírus HIV, as áreas em vermelho mostram os países com maior número de casos, os dados foram obtidos dividindo o número de adultos (15-49 anos) vivendo com AIDS, pela população adulta (15-49 anos) de cada país. *Source 2008 Report on the global AIDS epidemic, July 2008, UNAIDS*



**Figura 2.** Ciclo de replicação do HIV. 1 adsorção; 2 fusão; 3 desencapamento; 4 transcrição reversa; 5 integração ao genoma do hospedeiro; 6 transcrição em RNA viral genômico e mRNA; 7 tradução em poliproteínas env, gag e gag-pol; 8 montagem; 9 brotamento; 10 maturação (D'ANGELO, MOUSCADET et al., 2001)

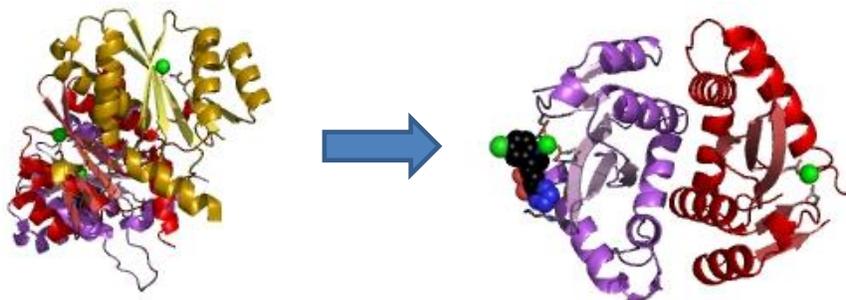
O vírus infecta particularmente as células contendo, em sua superfície, a molécula CD4, a qual é encontrada em células imunológicas, principalmente nas T-auxiliares, as quais auxiliam o sistema imunológico, e também nas macrófages, células que flutuam pelo organismo combatendo bactérias e outros germes. O HIV penetra nessas células grudando-se no receptor da CD4 por meio da glicoproteína de superfície gp120. Uma vez grudado na CD4, o HIV, para completar a fusão, ativará outras proteínas na superfície da célula humana conhecida como receptores CCR5 (ALKHATIB, LOCATI et al., 1997) e CXCR4 (BERGER, 1997). Uma vez ocorrida a fusão (LU, SEUFERT et al., 1997), o RNA do vírus, e algumas enzimas importantes, são absorvidas pela célula humana. Desta forma, a enzima viral transcriptase reversa traduz o material genético RNA em DNA.

O DNA viral recém-formado integra-se ao DNA da célula hospedeira humana através da enzima viral integrase (KATZ E SKALKA, 1994). Isso permite que o HIV codifique a célula humana para criar mais vírus. Nesse estágio, as duas variações do DNA dividem-se, formando uma nova variação do RNA viral, os quais são, algumas vezes, chamados de RNA mensageiro. Os blocos formadores de proteínas, constituídos dentro da célula humana, produzirão a nova partícula do HIV. Estes blocos são criados através da tradução das informações fornecidas pelo mensageiro do RNA. Os blocos formadores de proteínas são cortados em partes menores pela enzima viral denominada protease. Essas partes formam a estrutura da nova partícula do HIV que inclui cada uma das enzimas e proteínas necessárias para a repetição do processo reprodutivo. Uma vez ocorrida a formação, a nova partícula do vírus sai da célula humana e entra na corrente sanguínea, podendo assim infectar outras células. Aproximadamente 10,3 bilhões de novos *virions* são formados diariamente em pessoas que não usam a terapia anti-retroviral altamente potente (HAART) (POWERS, MARDEN et al., 2006).

### 3.2 INTEGRASE

A integrase (Figura 3) é um alvo interessante para o desenvolvimento de fármacos contra a AIDS, pois é de grande importância para o ciclo de vida viral e também não existem análogos em células humanas (POMMIER, JOHNSON et al., 2005). A IN catalisa a integração do cDNA no genoma humano, facilitando a replicação viral de maneira estável e sustentando a infecção (BROWN, BOWERMAN et al., 1987; Brown, 1997). Estudos *in vitro* realizando recombinação de proteínas permitiu a distinção entre as duas principais reações catalisadas pela IN, chamada processamento 3' e transferência de fita de DNA. Ambas as reações consistem em um ataque nucleofílico de uma ligação fosfodiéster por um

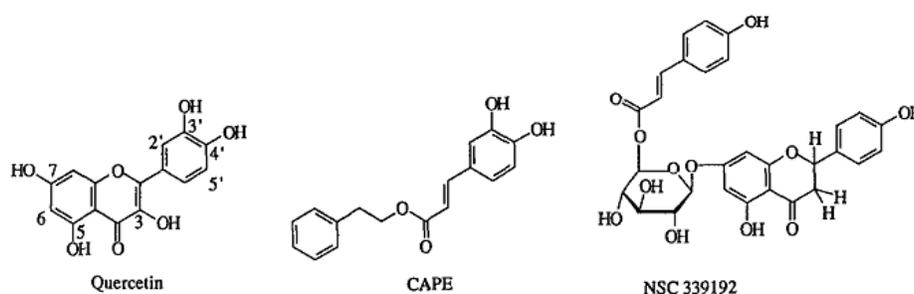
grupo hidroxila e requer um íon metálico divalente ( $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ ) como um cofator (BROWN, 1997). Entretanto, o mecanismo de inibição ainda não é muito claro. Existem algumas propostas na literatura para justificar a atividade anti-HIV (IN), por exemplo, para moléculas aromáticas foi sugerido que a interação do anel aromático com o íon metálico, interação do tipo cátion- $\pi$  (NICKLAUS, NEAMATI et al., 1997; MARCHAND, ZHANG et al., 2002; PAIS, ZHANG et al., 2002), é responsável pela atividade apresentada. Há também a possibilidade de uma interação tipo carga-carga entre o íon metálico e o ligante iônico ou cargas parciais do ligante. Foi mostrado que ambos os tipos de interação podem coexistir no sítio ligante (DOUGHERTY, 1996). Outros trabalhos também têm sugerido um modo de atuação no qual o inibidor atua como um agente quelante (POMMIER, JOHNSON et al., 2005).



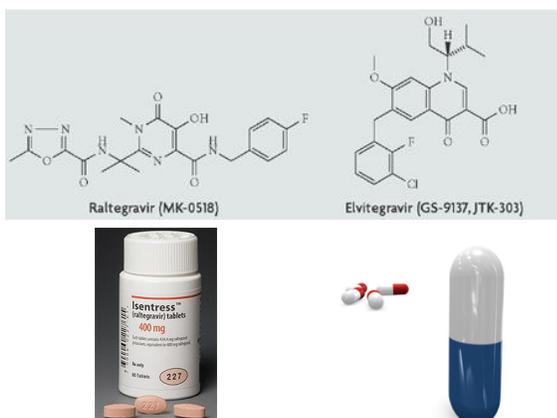
**Figura 3.** Estrutura do complexo cristalográfico 1QS4 complexada com o 5CITEP. Este complexo apresenta três cadeias idênticas, A, B e C. A região expandida apresenta o sítio onde o 5CITEP se complexou (cadeia A). Os resíduos de aminoácidos e o átomo de magnésio, os elementos essenciais para a atividade catalítica da enzima, são apresentados.

### 3.3 INIBIDORES DA INTEGRASE

Os inibidores da enzima integrase são moléculas que atuam como anti-HIV, mas por um mecanismo de ação diferenciado, o que pode torná-los menos tóxicos. O desenvolvimento de agentes antivirais alternativos, que inibam o ciclo replicativo do HIV, continua sendo um objetivo importante a fim de aliviar os efeitos colaterais dos agentes atualmente aprovados, ou para superar o problema da resistência aos medicamentos. Os primeiros inibidores de integrase foram divulgados por FESEN et al., 1993; 1994 (Figura 4). No entanto, mais uma década depois foi que o Laboratório Merk lançou o primeiro inibidor de integrase, conhecido como Raltegravir ou MK-0518 (Figura 5) (EVERING E MARKOWITZ, 2007), que esta em processo de testes clínico (COOPER, STEIGBIGEL et al., 2008; STEIGBIGEL, COOPER et al., 2008) e tem mostrado bons resultados (GOLDWIRT, BARRAIL-TRAN et al.), apesar deste medicamento possuir alto valor de mercado. Dessa forma, torna-se necessário encontrar novos candidatos a fármacos, que sejam menos onerosos para o governo e principalmente para a população.



**Figura 4.** Principais inibidores da integrase divulgados por FESEN et al.



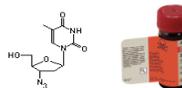
**Figura 5.** Representação do Raltegravir ou MK-0518 o primeiro inibidor de integrase.

Existem vários medicamentos anti-HIV, com a finalidade de atacar o vírus em alguns estágios do ciclo de vida (ver Figura 2). A Figura 6 mostra os principais inibidores do HIV, para cada estágio do ciclo reprodutivo do vírus. No estágio da fusão são chamados inibidores de fusão. Experimentos realizados com o T-20 (enfuvirtide, Fuzeon) em combinação com outros anti-retrovirais demonstraram resultados positivos (HE, CHENG et al., 2008). Para bloquear o vírus, o T-20 gruda no mesmo, enquanto que outros inibidores de fusão grudam na proteína CCR5 ou na CXCR4. No estágio da transcrição reversa três classes de medicamentos anti-HIV atacam o vírus: os análogos de nucleosídeo (MANOUILOV, FEDOROV et al., 1995) (AZT/zidovudina, ddI/didanosina, 3TC/lamivudina, d4T/lamivudina, ddC/zalcibatina, abacavir); os inibidores de transcriptase reversa não-nucleosídeos (CHOW, HIRSCH et al., 1993) (efavirenze, neviraparina, delavirdina); e os análogos de nucleotídeo (tenofovir) (TUSKE, SARAFIANOS et al., 2004). Finalmente, os inibidores de protease (TISDALE, MYERS et al., 1995) (indinavir, ritonavir, saquinavir, nelfinavir, amprenavir, lopinavir, atazanavir, tripanavir) que atacam esse estágio do ciclo de vida do HIV.

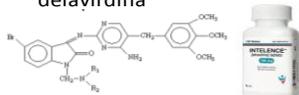
- Inibidores de fusão:  
Enfuvirtide, Fuzeon



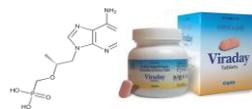
- Inibidores de transcrição reversa nucleosídica:  
AZT/zidovudina, ddI/didanosina, 3TC/lamivudina,  
d4T/lamivudina, ddC/zalcibatina, abacavir



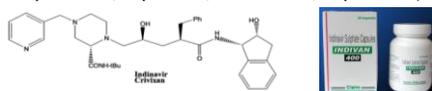
- Inibidores de transcrição reversa não-nucleosídica:  
efavirenze, nevirapina,  
delavirdina



- Inibidores de transcrição reversa análogos de nucleotídeo: tenofovir



- Inibidores de protease: indinavir, ritonavir, saquinavir, nelfinavir,  
amprenavir, lopinavir, atazanavir, tripanavir)



**Figura 6.** Representação dos principais inibidores do HIV, para cada estágio do ciclo reprodutivo do vírus

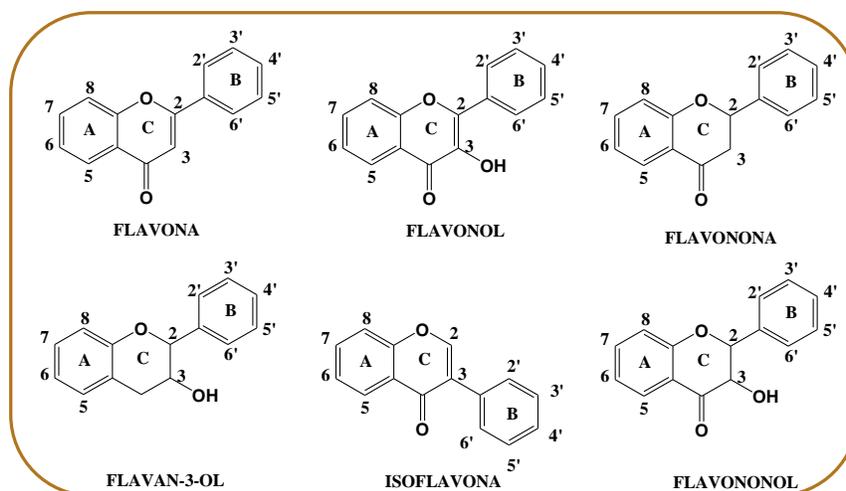
Apesar de existirem medicamentos capazes de inibir estes estágios do ciclo de vida do HIV, inibidores de transcriptase reversa e protease têm se mostrados tóxicos e têm apresentado resistência viral (HAMMER, 2005; MARINELLO, MARCHAND et al., 2008). Portanto, o mecanismo de ação dos inibidores de integrase é um alvo válido e atrativo para o desenvolvimento de fármacos contra a AIDS, pois o mecanismo de integração ainda não foi totalmente elucidado.

### 3.4 FLAVONÓIDES

Os flavonóides constituem um grupo de substâncias naturais que possuem atividades biológicas bastante diversificadas. Como os flavonóides estão presentes na dieta humana, sendo amplamente encontrados em chás verdes, vinhos tintos, frutas, vegetais, plantas medicinais e remédios derivados de ervas (HSIEH E KINSELLA, 1989), é importante o entendimento das suas propriedades biológicas. As variadas propriedades

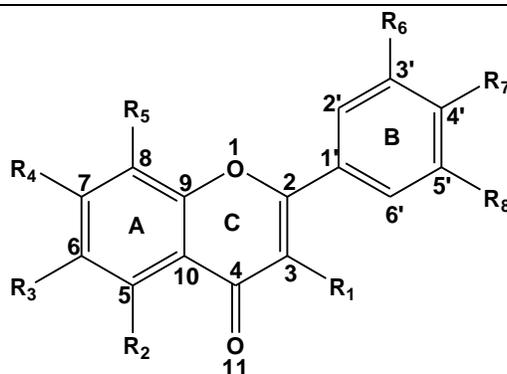
biológicas dos flavonóides (HAVSTEEN, 1980; HAVSTEEN, 2002) podem ser descritas como: atividade antiinflamatória (TATLI, AKDEMIR et al., 2008), anti-tumoral (CABRERA, SIMOENS et al., 2007), anti-bactéria (GABOR E EPERJESS.E, 1966), atividade hepatotóxica, antioxidante (JOVANOVIC, STEENKEN et al., 1994; RICEEVANS E MILLER, 1996), antiviral (BELADI, PUSZTAI et al., 1977), anti-HIV (HU, CHEN et al., 1994), anti-microbial (CUSHNIE E LAMB, 2005) etc.

Na literatura existem mais de 4.000 flavonóides diferentes, que têm sido descritos e categorizados como flavonol, flavona, flavanona, flavanonol, isoflavona, flavanol e antocianinas (Figura 7) que podem ou não possuir açúcares ligados as suas estruturas (HAVSTEEN, 1983; HARBORNE E WILLIAMS, 2000; HAVSTEEN, 2002). A estrutura geral dos compostos flavonóides, estudados nesta dissertação, está esboçada na Tabela 1.



**Figura 7.** Principais classes de flavonóides.

**Tabela 1.** Estrutura básica, numeração e atividade biológica dos compostos flavonóides estudados.



Flavonóides	<i>Log</i> <sub>IC<sub>50</sub></sub> (μM)		Substituição dos anéis								
	Cleavage	Integration	3	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'
1 Quercetagetin	6,10	7,00	OH	OH	OH	OH			OH	OH	
2 Baicalein	5,92	5,37		OH	OH	OH					
3 Robinetin	5,23	5,80	OH			OH			OH	OH	OH
4 Myricetin	5,12	5,60	OH	OH		OH			OH	OH	OH
5 Quercetin	4,63	4,87	OH	OH		OH			OH	OH	
6 Fisetin	4,55	5,07	OH			OH			OH	OH	
7 Luteolin	4,48	4,60		OH		OH			OH	OH	
8 Myricetrin	4,40	4,99	RH	OH		OH			OH	OH	OH
9 Quercetrin	4,22	4,42	RH	OH		OH			OH	OH	
10 Rhamnetin	4,21	4,54	OH	OH		MeO			OH	OH	
11 Avicularin	4,18	4,60	A	OH		OH			OH	OH	
12 Gossypin	4,16	4,65	OH	OH		OH	GL		OH	OH	
13 Morin	4,12	4,50	OH	OH		OH		OH		OH	
14 6-MeO-Luteolin	4,03	4,41		OH	MeO	OH			OH	OH	
15 Kaempferol	4,01	4,19	OH	OH		OH				OH	

Abreviações: RH = raminose; A = arabinose; e GL = glicose (FESEN et al.)

Conforme comentado acima, alguns flavonóides apresentam ação anti-HIV, entretanto a forma de atuação desses compostos na inibição do vírus pode ser de forma diferente, por exemplo, o quercetin que é uma flavona possui atividade anti-HIV-1, inibindo a integrase (FESEN, KOHN et al., 1993). Enquanto que Baicalin, que também é uma flavona e possui atividade anti-HIV-1, inibindo a RT (TAN, MILLER et al., 1992).

Recentemente significativas pesquisas têm indicado compostos flavonóides como inibidores da integrase (FESEN, POMMIER et al., 1994; RAGHAVAN, BUOLAMWINI et al., 1995). Além de estudos sobre a Relação Estrutura Atividade (Structure Activity Relationship, SAR) e Relação Quantitativa entre Estrutura Atividade (Quantitative Structure Activity Relationship, QSAR) (RAGHAVAN, BUOLAMWINI et al., 1995; ZHAO, NEAMATI et al., 1996; ALVES, PINHEIRO et al., 1999; ALVES, PINHEIRO et al., 2001; MOLFETTA, ALVES et al., 2002; MOLFETTA, HONORIO et al., 2004) de flavonóides e derivados encontrados nas literaturas indicarem boas correlações entre estes e as propriedades estéricas e eletrônicas, porém ainda existe uma ampla área de conhecimento a ser investigado para a compreensão do mecanismo de ação destas fármacos. Desse modo, torna-se fundamental compreender o mecanismo de ação dos compostos flavonóides, a fim de não só, indicar quais propriedades físico-químicas faz-se importantes para cada tipo de mecanismo de atuação, mas também, contribuir para síntese de futuros fármacos, mais potentes e menos tóxicos, baseando-se nas propriedades ditas como importantes para ação dos mesmos.

## **4 MÉTODOS**

### **4.1 CÁLCULO TEÓRICO DAS PROPRIEDADES DE ACIDEZ**

#### **4.1.1 Propriedades de acidez em fase gasosa e em solução de compostos flavonóides com atividade anti-HIV-1 integrase**

Os flavonóides constituem um grupo de substâncias naturais que possuem atividades biológicas bastantes diversificadas (HAVSTEEN, 2002). As principais propriedades dos compostos flavonóides são a capacidade de modificar a atividade de

várias enzimas, interagirem com receptores específicos e proteger contra doenças oxidativas. Esta capacidade antioxidante é relacionada com o número e posições relativas dos grupos hidroxilas, sua conjugação e efeitos de ressonância.

Na literatura, dois mecanismos (LEOPOLDINI, RUSSO E TOSCANO, 2006) - pelos quais antioxidantes fazem seu papel de proteção - foram propostos e largamente analisados. A transferência do átomo de hidrogênio, no qual um radical livre  $R^{\bullet}$  remove um átomo de hidrogênio do antioxidante (ArOH):  $R^{\bullet} + \text{ArOH} \rightarrow \text{RH} + \text{ArO}^{\bullet}$  e o mecanismo de transferência de um elétron, no qual o antioxidante doa um elétron para o radical livre:  $R^{\bullet} + \text{ArOH} \rightarrow R^{-} + \text{ArOH}^{+\bullet}$ . Nesta dissertação, realizamos um estudo teórico de acidez em fase gasosa e em solução de quinze compostos flavonóides com atividade anti-HIV-1 integrase (FESEN, POMMIER et al., 1994), com o objetivo de avaliar a provável posição de desprotonação destas moléculas e obter uma relação entre os valores de acidez e a atividade biológica dos compostos estudados.

O programa Gaussian03 (FRISCH, TRUCKS et al., 2004) foi utilizado para os cálculos das propriedades de acidez relatadas no presente estudo. Todos os cálculos foram realizados utilizando a Teoria do Funcional de Densidade (DFT) (LEE, YANG et al., 1988) com o funcional híbrido B3LYP. Os flavonóides neutros, em solução e seus respectivos ânions foram otimizados sem restrição empregando os conjuntos de bases 6-311++G(d,p) (DITCHFIELD, HEHRE et al., 1971; LEE, YANG et al., 1988; BECKE, 1993) com dupla- $\zeta$  polarização. A inclusão de funções difusas, dos conjuntos de bases, pode descrever adequadamente o comportamento, de longo alcance, de orbitais moleculares associados com sistemas aniônicos.

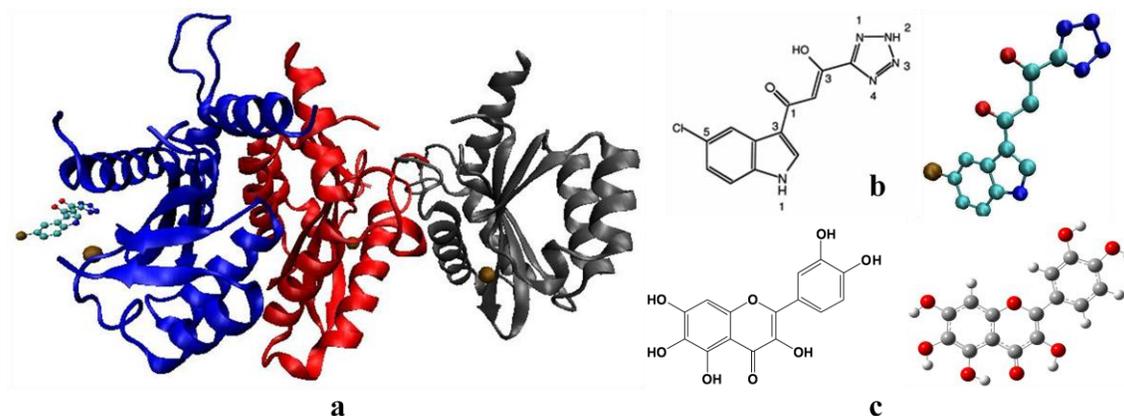
As frequências vibracionais foram calculadas para as moléculas neutras (ArOH) e seus respectivos ânions ( $\text{ArO}^{\bullet}$ ), com o objetivo de obter a conformação de mínima energia

no ponto zero. Efeito do solvente foi calculado utilizando o modelo contínuo polarizado (PCM), sendo a constante dielétrica em meio aquoso de 78,39.

Análise das cargas NBO (FOSTER E WEINHOLD, 1980; REED, WEINSTOCK et al., 1985) foi utilizada para melhor descrever as estruturas eletrônicas do sistemas aquoso. A acidez em fase gasosa foi calculada em 298 K, como sendo a diferença de entalpia entre o ânion ( $A^-$ ) e suas espécies neutras (HA):  $\Delta H_{\text{acidez}} = H_{A^-} - H_{HA}$  como descrito na literatura (LEOPOLDINI, RUSSO E TOSCANO, 2006).

## 4.2 O MODELO

As coordenadas iniciais para os cálculos de DM QM/MM foram retiradas da cadeia A da estrutura cristalina trímica do HIV-1 (Figura 8a), a qual é complexada com o inibidor 5CITEP (Figura 8b), e localizada sob o código 1QS4 (GOLDGUR, CRAIGIE et al., 1999) no banco de dados de proteínas PDB (*Protein Data Bank*). A cadeia A da estrutura 3D contendo o inibidor 5CITEP foi utilizada como ponto de partida para a simulação de DM, pois é a única que liga o inibidor ao domínio catalítico da integrase, substituindo o 5CITEP pelo flavonóide quercetagetina (Figura 8c).

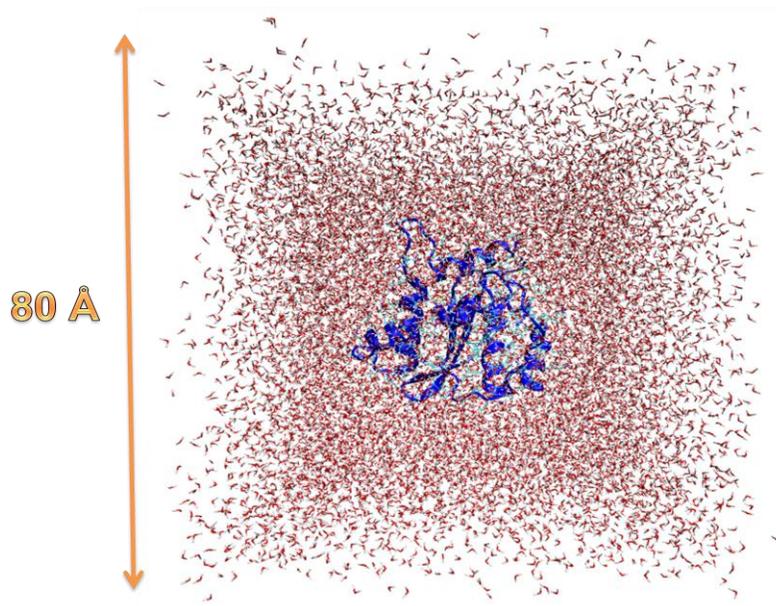


**Figura 8.** a) Domínio catalítico do HIV-1 integrase complexado com  $Mg^{2+}$  e o inibidor 5CITEP, cadeia A em azul, cadeia B em vermelho e cadeia C em cinza; b) inibidor 5CITEP 1-(5- cloroindol-3-il)-3-hidroxi-3-(2H-tetrazol-5-il)-propanona e c) estrutura do flavonóide quercetagina.

O primeiro passo foi adicionar todos os átomos de hidrogênio ao sistema 1QS4-IN, os quais foram adicionados na proteína de acordo com cálculos eletrostáticos de  $pK_a$  (GILSON, 1993; ANTOSIEWICZ, MCCAMMON et al., 1994), como implementado por Field, Bash et al., 1990; nenhum estado de ionização de aminoácidos foi predito. Os átomos de hidrogênio adicionados a proteína foram relaxados por meio de sucessivos passos de otimização através de diferentes algoritmos de busca: gradiente, gradiente conjugado e LBFGSB (BYRD, LU et al., 1995). Durante esse processo todos os átomos pesados da proteína e do inibidor foram mantidos através de uma constante *umbrella* de  $1000 \text{ kJmol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ .

O segundo passo foi relaxar a proteína, a qual foi otimizada usando o esquema de retenção, aplicado apenas a estrutura básica dos peptídicos, mas com uma constante menor ( $100 \text{ kJmol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ ). Em seguida, a proteína otimizada foi colocada em uma caixa cúbica de águas pré-otimizadas com dimensão de  $80 \text{ \AA}$  (Figura 9), utilizando o eixo principal do

complexo inibidor-proteína, como o centro geométrico. As moléculas de água situadas em um raio de 2,8 Å de distância de um átomo pesado da proteína foram excluídas. Então, as moléculas de água restante na estrutura final foram relaxadas usando alguns passos do algoritmo de gradiente conjugado seguido por uma otimização LBFGSB.



**Figura 9.** A enzima integrase no interior de uma caixa cúbica de molécula de água com dimensão de 80 Å

O sistema final foi equilibrado com DM usando o método híbrido QM/MM de Langevin-Verlet de 100 ps. Todos os cálculos de DM foram realizados no programa DYNAMO (DYNAMO, 2000). Em todos os cálculos o inibidor foi tratado com o método semi-empírico AM1 (DEWAR, ZOEBISCH et al., 1985), enquanto o resto do sistema (proteína e água) foi descrito usando uma combinação dos campos de força OPLS-AA (JORGENSEN, MAXWELL et al., 1996) e TIP3P (JORGENSEN E JENSON, 1998). A IN foi colocada em uma caixa de água com dimensão de 80 Å, todo o sistema contém 15741

resíduos com total de 50215 átomos (ver Figura 9). Posteriormente, todo o sistema foi submetido a simulações de DM QM/MM até 1,0 ns, a uma temperatura de 300 K.

#### 4.3 SIMULAÇÃO POR DINÂMICA MOLECULAR UTILIZANDO O MÉTODO HÍBRIDO QM/MM PARA UM FLAVONÓIDES COM AÇÃO ANTI-HIV-1 INTEGRASE

O método de mecânica quântica combinado com o método de mecânica molecular (QM/MM) (WARSHEL E LEVITT, 1976; FIELD, BASH et al., 1990) foi desenvolvido para cálculos com proteínas e vem sendo usado para o estudo de reações enzimáticas (GARCIA-VILOCA, GAO et al., 2004; MARTI, ROCA et al., 2004), especialmente em catálise enzimática. No método QM/MM, o ligante é explicitamente tratado por um método quântico (QM). O ambiente protéico e/ou solvente são representados por campo de força da mecânica molecular (MM). Este método tem-se mostrado eficiente para o estudo de interações entre ligantes e proteínas no sistema HIV-1 protease (HENSEN, HERMANN et al., 2004) e em outros sistemas (GRATER, SCHWARZL et al., 2005). Recentemente, esta metodologia foi utilizada para obtenção da energia de interação entre a enzima e inibidor, de alguns inibidores de IN, a qual foi relacionada com sua atividade anti-HIV-1 (IN) (ALVES, MARTI et al., 2007b; a; 2008). Portanto, nesta dissertação, a energia de interação para o flavonóide quercetagetina foi calculada usando simulações de Dinâmica Molecular combinado com o método de Mecânica Quântica/Mecânica Molecular (QM/MM). Em seguida foram realizados cálculos para a decomposição de energia para determinar as contribuições individuais dos resíduos nas interações entre enzima-inibidor.

Neste sentido, foram estudadas, através da metodologia QM/MM e Dinâmica Molecular, as interações intermoleculares específicas entre a enzima integrase e o composto flavonóide quercetagina, caracterizado como inibidor, a fim de criar um modelo para o estudo de novos inibidores de HIV-1.

Nesta etapa, a proteína foi relaxada utilizando um algoritmo de otimização para fixar a cadeia peptídica com uma constante de força menor ( $100 \text{ kJ.mol}^{-1}\text{Å}^{-2}$ ). Em seguida, foi inserida em uma caixa d'água com dimensão de  $80 \text{ Å}$ , de águas pré-otimizadas, usando o eixo principal do complexo proteína-inibidor como centro geométrico (ver Figura 4). As moléculas de água que estavam a um raio de  $2.8 \text{ Å}$  da proteína foram excluídas, e as demais moléculas de água foram otimizadas seguindo o LBFGSB algoritmo de otimização.

O sistema final foi equilibrado através de simulações de dinâmica molecular de até  $1,0 \text{ ns}$ , a uma temperatura de  $300 \text{ K}$ , com o método QM/MM. Em que somente os átomos do inibidor foram tratados com mecânica quântica, utilizando o método semi-empírico AM1, enquanto que, o resto do sistema (proteína e moléculas de água) foi descrito usando os campos de força OPLS-AA e TIP3P, respectivamente como implementado no programa DYNAMO. A etapa seguinte consistiu em congelar todos os resíduos de aminoácidos que se encontram a uma distância de  $25 \text{ Å}$  do centro do inibidor. Seguindo assim com os cálculos de DM QM/MM até atingir  $1,0 \text{ ns}$  de dinâmica, utilizando uma distância de corte (*cutoff*) para os não ligantes de  $11$  a  $13 \text{ Å}$ .

#### 4.4 CÁLCULO DA ENERGIA DE INTERAÇÃO

A energia de interação para um sistema QM/MM pode ser obtida por:

$$E = V_{MM}(R_{MM}) + \left\langle \Psi(r, R_{QM}, R_{MM}) \left| \hat{H}_o(r, R_{QM}) \right| \Psi(r, R_{QM}, R_{MM}) \right\rangle + \left\langle \Psi(r, R_{QM}, R_{MM}) \left| \hat{V}_{QM/MM}(r, R_{MM}) \right| \Psi(r, R_{QM}, R_{MM}) \right\rangle + V_{QM/MM}^{vw}(R_{QM}, R_{MM}), \quad (1)$$

onde  $\hat{H}_o$  é o hamiltoniano no vácuo para a parte QM selecionada,  $\Psi$  é a função de onda polarizada, que representa a energia do campo de força e  $\hat{V}_{QM/MM}$  é a união entre o operador do subsistema QM e MM e inclui um termo eletrostático e de van der Waals.

A equação (1) pode ser escrita numa forma diferente a fim de definir a energia de interação QM/MM. De forma eficaz, a energia total pode ser escrita como a soma da energia QM do subsistema no vácuo, a energia de interação QM/MM e a energia MM:

$$E_{QM/MM}^{Int} = E - E^0(R_{QM}) - E_{MM}(R_{MM}) = V_{QM/MM}^{vw}(R_{QM/MM}, R_{MM}) + \left\langle \Psi(r, R_{QM}, R_{MM}) \left| \hat{V}_{QM/MM}(r, R_{MM}) \right| \Psi(r, R_{QM}, R_{MM}) \right\rangle + \left\langle \Psi(r, R_{QM}, R_{MM}) \left| \hat{H}_o(r, R_{QM}) \right| \Psi(r, R_{QM}, R_{MM}) \right\rangle - \left\langle \Psi(r, R_{QM}) \left| \hat{H}_o(r, R_{QM}) \right| \Psi(r, R_{QM}) \right\rangle \quad (2)$$

onde  $\Psi^0$  é a função de onda padrão não polarizada (fase gasosa) do subsistema QM. A energia de interação (QM/MM) pode ser mais adiante decomposta considerando que o operador de junção entre os subsistemas QM e MM inclui um termo eletrostático e de van der Waals. Esta última contribuição é normalmente avaliada usando a expressão de Lennard-Jones:

$$E_{QM/MM}^{Int} = E_{vw}(R_{QM}, R_{MM}) + E_{elec}^{QM}(r, R_{QM}, R_{MM}) + E_{POL}^{QM}(r, R_{QM}, R_{MM}) \quad (3)$$

onde  $R$  é a distância entre os centros de interação QM e MM. Como esta expressão não envolve coordenada eletrostática este termo de energia não precisa ser incluído na avaliação SCF da função de onda do subsistema QM.

#### 4.5 CÁLCULOS DA ENERGIA DE DECOMPOSIÇÃO POR RESÍDUO

Para verificar a confiabilidade das estruturas e dos cálculos de energia de interação por resíduo, realizados pelo método AM1/MM, foram realizados cálculos DFT (Teoria de Densidade Funcional) para descrever a região híbrida QM/MM. A função B3LYP foi empregada com o conjunto de base 6-31G\* para descrever a região QM do sistema, o qual inclui todos os átomos dos ligantes, enquanto que o campo de força OPLS-AA foi utilizado para a região MM. Esta estratégia foi utilizada por Guo et al., 2002 para estudar a estabilidade das ligações com um metal.

A energia potencial para este estudo foi obtida da expressão QM/MM:

$$E = \langle \Psi | \hat{H}_0 | \Psi \rangle + \left( \left\langle \Psi \left| \frac{q_{MM}}{r_{e,MM}} \right| \Psi \right\rangle + \sum \frac{Z_{QM} q_{MM}}{r_{QM,MM}} \right) + E_{QM/MM}^{vdW} + E_{MM} \quad (4)$$

$$E = E_{QM} + E_{QM/MM}^{elect} + E_{QM/MM}^{vdW} + E_{MM} \quad , \quad (5)$$

onde  $E_{MM}$  é a energia da região MM, é a energia de van der Waals entre as regiões QM e MM, incluindo as interações colônicas do núcleo QM ( $Z_{QM}$ ) e a interação eletrostática da função de onda polarizada ( $\Psi$ ) com as cargas da proteína ( $q_{MM}$ ), e  $E_{QM}$  é a energia na fase gás da função de onda polarizada. Algoritmos de otimização substituíram o termo de interação eletrostática por uma interação columbina, na qual as cargas dos átomos da região QM foram obtidas através de potenciais eletrostáticos baseados na densidade eletrônica. A energia potencial final pode ser expressa por:

$$E = \langle \Psi | \hat{H}_0 | \Psi \rangle - \sum \sum \frac{q_{QM}^{ChelpG-fit} q_{MM}}{r_{QM/MM}} + E_{QM/MM}^{vdW} + E_{MM} \quad (6)$$

Finalmente, a energia de interação entre o inibidor e o meio é calculada como a diferença entre a energia QM/MM e as energias QM e MM separadas. Considerando que a

região MM será descrita usando um potencial não polarizado, a energia de interação é dada pela seguinte expressão:

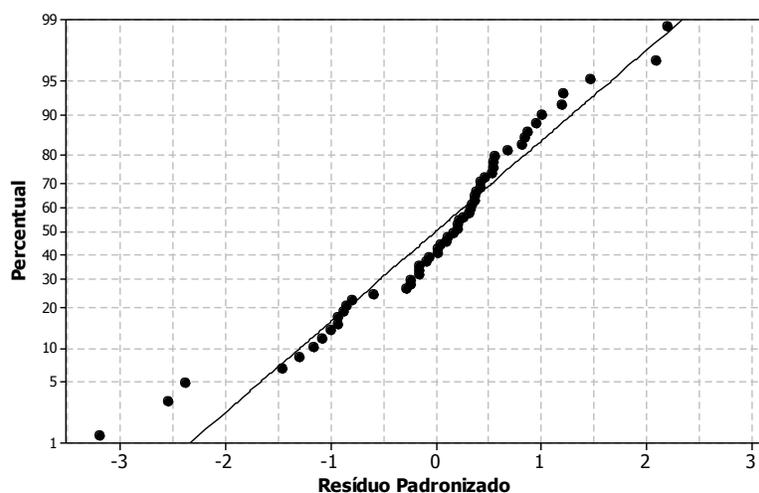
$$E_{QM/MM}^{Int} = \langle \Psi | \hat{H}_0 | \Psi \rangle - \langle \Psi^0 | \hat{H}_0 | \Psi^0 \rangle + \sum \sum \frac{q_{QM}^{ChelpG-fit} q_{MM}}{r_{QM/MM}} + E_{QM/MM}^{vdW} , \quad (7)$$

onde  $\Psi^0$  é a função de onda na fase gasosa do inibidor.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PROPRIEDADES DE ACIDEZ EM FASE GASOSA E EM SOLUÇÃO DE COMPOSTOS FLAVONÓIDES COM ATIVIDADE ANTI-HIV-1 INTEGRASE

A utilização do método DFT, para a determinação das propriedades de acidez em fase gasosa e em solução, demonstrou resultados satisfatórios. Em nossa análise, ambos os métodos são válidos e úteis para o desenvolvimento deste estudo. A Figura 10 mostra uma comparação entre os valores de acidez em fase gasosa e em solução (Tabela 2), este modelo apresentou coeficiente de correlação igual a 0,77 e distribuição linear da acidez. Os valores de acidez das moléculas **9**, **11** e **12** identificadas como *outliers* foram omitidas para obter o modelo, o qual possui valores de resíduo padronizado maior que dois. Essas moléculas têm açúcares como substituinte nos anéis C e A, respectivamente, o que provavelmente influencia o calor de formação (HF) destes compostos. Eles mostraram bons valores, com um baixo coeficiente de variação e um bom ajuste entre os dados de acidez. Portanto, DFT é um bom método para avaliar a acidez tanto em fase gasosa quanto em solução.



**Figura 10.** Comparação entre os valores de acidez em fase gasosa e em solução.

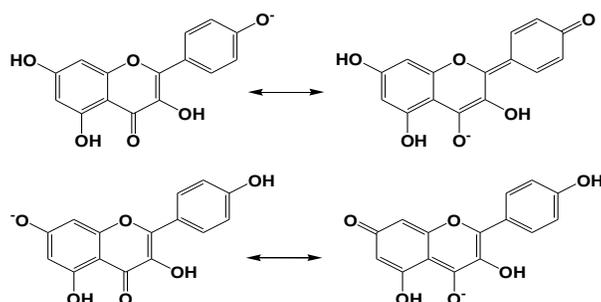
**Table 2.** Valores de acidez dos flavonóides calculados a nível B3LYP/6-311++G\*\* em fase gasosa e em solução, com suas respectivas posições de desprotonação.

Compostos	Acidez (kcal/mol)	
	Fase gasosa	Solução
<i>Phenol</i>		
OH	345,1	303,8
<i>Quercetagenin</i>		
3'-OH	337,6	302,6
4'-OH	316,2	295,3
3-OH	332,1	300,5
5-OH	331,3	299,4
6-OH	328,2	297,3
7-OH	327,2	296,1
<i>Baicalein</i>		
5-OH	337,6	300,7
6-OH	330,9	296,6
7-OH	323,7	299,3
<i>Robinetin</i>		
3'-OH	323,6	298,2
4'-OH	323,2	295,5
5'-OH	338,9	302,6
3-OH	337,7	302,0
7-OH	322,4	296,7
<i>Myricetin</i>		
3'-OH	335,7	302,3
4'-OH	320,3	295,1
5'-OH	322,9	298,5

3-OH	330,5	299,4
5-OH	338,6	303,0
7-OH	323,7	296,8
<i>Quercetin</i>		
3'-OH	336,7	301,4
4'-OH	315,9	298,9
3-OH	332,1	299,8
5-OH	338,9	303,0
7-OH	323,8	296,7
<i>Fisetin</i>		
3'-OH	325,5	301,5
4'-OH	319,4	299,3
3-OH	338,0	301,9
7-OH	323,9	296,8
<i>Luteolin</i>		
3'-OH	320,6	297,2
4'-OH	325,1	298,5
5-OH	345,0	304,9
7-OH	326,7	296,6
<i>Myricetrin</i>		
3'-OH	328,0	300,8
4'-OH	317,8	296,3
5'-OH	332,9	301,1
5-OH	351,0	308,4
7-OH	332,8	300,6
<i>Quercetrin</i>		
3'-OH	329,8	250,2
4'-OH	337,1	250,8
5-OH	349,7	256,1
7-OH	333,1	248,9
<i>Rhamnetin</i>		
3'-OH	338,4	302,1
4'-OH	317,2	294,6
3-OH	333,6	299,6
5-OH	339,1	301,9
<i>Avicularin</i>		
3'-OH	333,5	292,6
4'-OH	339,7	292,6
5-OH	354,5	298,5
7-OH	336,5	291,2
<i>Gossypin</i>		
3'-OH	333,6	297,5
4'-OH	313,7	295,7
3-OH	329,8	299,6
5-OH	350,5	302,5
7-OH	339,7	301,6
<i>Morin</i>		

2'-OH	329,0	298,6
4'-OH	324,0	298,7
3-OH	331,2	299,7
5-OH	334,7	301,6
7-OH	320,4	295,9
<i>6-MeO-Luteolin</i>		
3'-OH	320,6	297,2
4'-OH	325,0	297,1
5-OH	342,6	303,8
7-OH	329,8	296,0
<i>Kaempferol</i>		
4'-OH	324,1	298,5
3-OH	333,1	299,7
5-OH	338,3	302,3
7-OH	324,2	296,6

A Tabela 2 lista os compostos com seus respectivos valores calculados de acidez em fase gasosa e em solução. A ordem decrescente de acidez obtida foi 4'-OH > 7-OH > 3'-OH > 3-OH > 6-OH > 5'-OH > 5-OH. Os compostos apresentaram maior acidez nos sítios de desprotonação 4'-OH e 7-OH. Por exemplo, o kaempferol em fase gasosa doa primeiro o próton H<sup>+</sup> da posição 4'-OH, que apresenta maior acidez, enquanto que em fase aquosa a posição 7-OH irá perder o próton mais rapidamente, como pode se observado nas estruturas ressonantes do composto **15**, em que há a formação de um íon pela perda de um próton da posição 4' ou da posição 7 (Esquema 1).



**Esquema 1.** Estruturas de ressonância do composto **15** para as posições 4' e 7.

Os resultados de acidez em fase aquosa mostram que, com exceção do composto **2**, o grupo OH da posição 7 é o sítio mais ácido em relação aos outros estudados, a presença de outras hidroxilas nas posições 3, 5 e 6 não modificam consideravelmente a acidez do grupo 7-OH. Os cálculos de acidez dos grupos hidroxilas dos compostos flavonóides (ver Tabela 2) confirmam a observação experimental, em que as posições 7-OH e 4'-OH das moléculas são as que preferencialmente desprotonam.

Vários modelos de regressão linear foram obtidos a fim de correlacionar os valores de acidez com as atividades anti-HIV-1, integração e clivagem, dos flavonóides em estudo. Os modelos foram gerados com os valores de acidez, em fase gasosa e em solução, da posição 4' do anel B e as atividades de integração e clivagem, separadamente para os compostos **1, 3, 4, 6, 7 e 13-15**, apresentando valores elevados de  $R^2$  de 0,83 para acidez em fase gasosa versus a atividade de integração (Modelo 1) e  $R^2$  de 0,63 para acidez em fase gasosa versus a atividade de clivagem (Modelo 2), já em solução foram obtidos  $R^2$  de 0,57 para integração (Modelo 3) e 0,59 para clivagem (Modelo 4).

O Modelo 5 mostra a regressão linear obtida entre os valores de acidez em fase gasosa para as hidroxilas ligadas aos carbonos 7 para os compostos **2, 8, 9, 11 e 12** e a atividade de integração, este modelo apresentou  $R^2$  de 0,65. O mesmo conjunto de compostos foi utilizado para obter a regressão entre a acidez em fase gasosa das hidroxilas ligadas aos carbonos 7 e a clivagem, obtendo-se um  $R^2$  de 0,82 (Modelo 6), já em solução foram obtidos  $R^2$  de 0,36 para integração (Modelo 7) e 0,10 para clivagem (Modelo 8).

### **Modelo 1**

$IC_{50}$  integração =  $85,9 - 0,251$  acidez em fase gasosa da posição 4'

$N = 8$ ;  $R^2 = 0,76$ ;  $R^2_{aj.} = 0,66$ ;  $s = 0,54$  e  $Q^2 = 0,45$

**Modelo 2**

$IC_{50}$  clivagem =  $63,8 - 0,183$  acidez em fase gasosa da posição 4'

$N = 8$ ;  $R^2 = 0,63$ ;  $R^2_{aj.} = 0,57$ ;  $s = 0,48$  e  $Q^2 = 0,28$

**Modelo 3**

$IC_{50}$  integração =  $128,0 - 0,415$  acidez em solução da posição 4'

$N = 8$ ;  $R^2 = 0,57$ ;  $R^2_{aj.} = 0,50$ ;  $s = 0,60$  e  $Q^2 = 0,18$

**Modelo 4**

$IC_{50}$  clivagem =  $103,0 - 0,329$  acidez em solução da posição 4'

$N = 8$ ;  $R^2 = 0,59$ ;  $R^2_{aj.} = 0,53$ ;  $s = 0,50$  e  $Q^2 = 0,26$

**Modelo 5**

$IC_{50}$  integração =  $22,8 - 0,054$  acidez em fase gasosa da posição 7

$N = 5$ ;  $R^2 = 0,65$ ;  $R^2_{aj.} = 0,53$ ;  $s = 0,30$

**Modelo 6**

$IC_{50}$  clivagem =  $42,3 - 0,113$  acidez em fase gasosa da posição 7

$N = 5$ ;  $R^2 = 0,82$ ;  $R^2_{aj.} = 0,77$ ;  $s = 0,40$

**Modelo 7**

$IC_{50}$  integração =  $1,7 + 0,107$  acidez em solução da posição 7

$N = 5$ ;  $R^2 = 0,36$ ;  $R^2_{aj.} = 0,15$ ;  $s = 0,40$

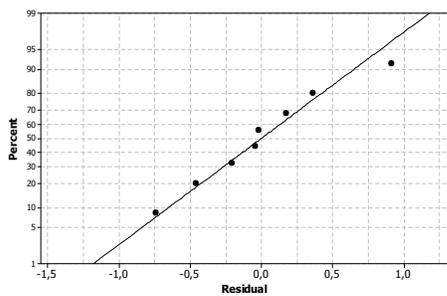
### Modelo 8

$IC_{50}$  clivagem =  $1,54 + 0,105$  acidez em solução da posição 7

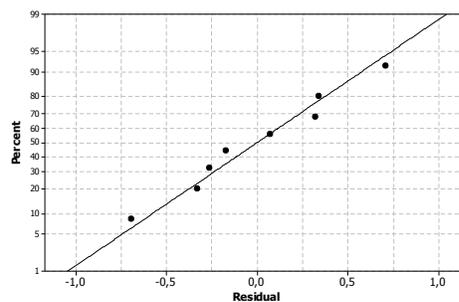
$N = 5$ ;  $R^2 = 0,10$

A Tabela 3 mostra a representação gráfica dos modelos de regressão linear obtidos entre os valores de acidez em fase gasosa e em solução para as hidroxilas ligadas aos carbonos 4' e 7 para os compostos **1, 3, 4, 6, 7, 13-15** e **2, 8, 9, 11, 12** e as atividades de integração e clivagem, respectivamente.

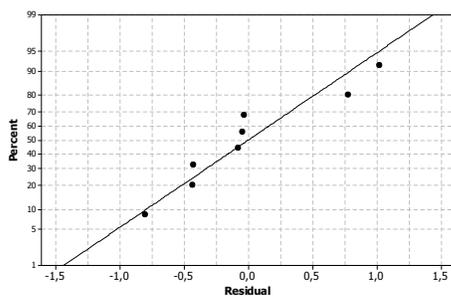
**Tabela 3.** Mostra a representação gráfica dos modelos de regressão linear obtidos entre os valores de acidez em fase gasosa para a posição 4'-OH do anel B e as atividade de (a) integração e (b) clivagem, assim como os modelos obtidos entre os valores de acidez em solução aquosa para a posição 4'-OH, para ambas atividades de (c) integração e (d) clivagem.



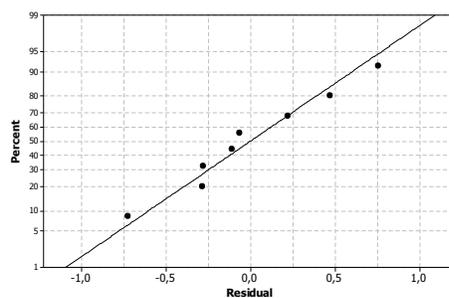
(a)



(b)



(c)



(d)

Estes modelos além de descreverem os pontos estratégicos de desprotonação relacionados com a atividade, estão de acordo com o estudo de SAR feito por Fesen et al., 1994, onde descreve que, presença de três hidroxilas no anel bezopiranona e de hidroxilas orto no anel fenila, nos C3', C4' e C5' sejam de fundamental importância para a atividade.

Os valores de acidez em fase gasosa para os quinze compostos flavonóides, que possuem de três a seis grupos hidroxila ácidos, foram calculados e são mostrados na Tabela 2. Em geral, os grupos mais ácidos são os das posições 4'-OH e 7-OH ou 3'-OH, e o menos ácido é o grupo 5-OH, seguindo a ordem de acidez: 4'-OH > 7-OH > 3'-OH > 3-OH > 6-OH > 5'-OH > 5-OH. Para os compostos que não possuem o grupo 4'-OH, o grupo 7-OH é o mais ácido. O grupo 4'-OH é o mais ácido para os compostos: **4-6, 8, 10, 12 e 15**, enquanto que o 7-OH ou 3'-OH é a posição mais ácidas para **1-3, 13** ou **7, 9, 11, 14**, respectivamente (ver Tabela 2). Para todos os casos, a carga em qualquer das posições 4'-OH ou 7-OH podem ser estabilizadas através da ressonância entre os anéis B e C ou A e C. Quando há dois grupos hidroxilas adjacentes no anel B, a ligação de hidrogênio intramolecular é outro fator importante para a estabilização de ânions, ou seja, dos compostos **1, 5, 6, 10 e 12**. Para os compostos **1-3 e 13** a carga na posição 7-OH pode ser estabilizada por meio da ressonância entre os anéis A e C. Para todos os estudos de ânions, o grupo 5-OH é sempre o menos ácidos, com exceção dos compostos **3 e 6**, que não apresentam hidroxila na posição 5-OH, o que não surpreende, pois é provável que uma ligação de hidrogênio entre as posições 5 e o oxigênio 4-ceto existe na forma neutra, portanto, fazendo a remoção do próton energeticamente mais desfavorável. Como pode ser visto a partir dos resultados, a estabilização da taxa através de ressonância e ligações de hidrogênio são dois importantes fatores determinantes para o processo de desprotonação e acidez resultante. Nossos resultados estão completamente de acordo com dados da literatura.

Os padrões de ligações de hidrogênio são mantidos no curso da molécula base aos produtos desprotonação, mesmo a desprotonação do B implica a reorganização do conformero mais estável.

O ânion mais estável 4'-OH e o primeiro mínimo relativo 7-OH da quercetina em torno de 10,9 kcal/mol são estabilizados pela deslocalização da carga negativa que se espalha a partir do sítio de desprotonação para o grupo 4-ceto no anel C. Os outros ânions 3-OH e 5-OH são encontrados 15,9 e 15,0 kcal/mol acima do mínimo global, por causa da repulsão eletrônica entre dois átomos de oxigênio adjacente. Essa diferença na estabilização dos ânions é de certa forma reduzida pela presença do meio de água (as lacunas são 0,5, 5,2 e 4,1 kcal/mol para o 7-OH, 3'-OH, e 5-OH, em comparação ao mínimo 4'-OH, respectivamente).

Para os compostos **4-6**, **8**, **12** e **15**, o ânion mais estável na fase gasosa é o da posição 4'-OH. Para os compostos **1-3** e **13** o ânion mais estável na fase gasosa é o 7-OH. Os compostos restantes têm estabilidade na espécie 3'-OH, que pode ser explicado pelo fato de que ele é o único ânion em que a carga negativa está confinado no anel B, como se pode afirmar, analisando as suas estruturas de ressonância. Para as outras espécies, a carga negativa pode, em princípio, ser deslocalizados ao longo da molécula inteira, com uma consequente estabilização do ânion. Em solução os valores de energia relativa indicam o ânion 4'-OH como o conformero mais estável, mesmo que seja praticamente isoenergéticas com o 7-OH ( $\Delta E = 0,1$  kcal / mol). Os grupos 3'-OH, 4'-OH e 3-OH são encontrados em 9,4, 0,7 e 3,5 kcal/mol acima do mínimo 7-OH.

O grupo 5-OH é energeticamente menos favorecido devido a repulsão eletrônica entre o oxigênio carregado negativamente ligado ao carbono C5 e do oxigênio da carbonila

em anel C. A ordem de estabilidade entre 4'-OH e 7-OH é revertida na presença de água. A diferença energética entre todos os ânions parece ser decididamente menor.

Os ânions quercetina são sistemas planares em que a carga negativa é deslocalizada no anel B e C ou no anel A e C. Conseqüentemente, a desprotonação do sítio 4' para o ânion mais estável, no qual a ligação de hidrogênio padrão é o efeito estabilizador principal. A interação da ligação de H torna-se menos importante em meio aquoso, onde as interações íon-dipolo predominam. O grupo 3'-OH torna-se a mais estável. Estes resultados estão de acordo com dados da literatura (Leopoldini et al., 2006).

A acidez em fase gasosa para o fenol foi de 345,1 kcal/mol, o qual foi utilizado como um sistema de referência, enquanto o valor correspondente em solução de água foi de 303,8 kcal/mol (ver Tabela 2). A acidez experimental obtidas por transferência de fase de gás equilíbrios de prótons, de 346,9 kcal/mol (MCMAHON E KEBARLE, 1977) parece estar bem reproduzida. No fenol, a desprotonação do grupo ácido conduz a uma espécie aniônica em que o par de elétrons é deslocalizada sobre o anel aromático (Esquema 1), a carga negativa provoca uma redução na energia de solvatação total, que é particularmente forte para os solventes próticos como a água.

Todos os valores relativos de acidez para o fenol e os flavonóides quinze foram determinados considerando o ânion mais estável. Com base nos valores de acidez crescente de gás fase, os flavonóides podem ser ordenados do seguinte modo: Gossypin (313,7 kcal/mol)> quercetina (315,9 kcal/mol)> Quercetagetin (316,2 kcal/mol)> ramnetina (317,2 kcal/mol)> Myricetrin (317,8 kcal/mol)> fisetina (319,4 kcal/mol)> Miricetina (320,3 kcal/mol)> Morin (320,4 kcal/mol)> luteolina e o 6-MeO-luteolina (320,6 kcal/mol)> Robinetin (322,4 kcal/mol)> Baicalein (323,7 kcal/mol)> Kaempferol (324,1 kcal/mol)> quercetrina (329,8 kcal/mol)> Avicularin (333,5 kcal/mol). Como se pode observar, a

acidez encontra-se em um intervalo de 313,7-333,5 kcal/mol. Adicionalmente, indicações da literatura (MARTINS, LEAL et al., 2004) para canferol, miricetina, quercetina apresentam a mesma ordem de acidez obtida em nossa investigação, apesar de algumas diferenças em valores absolutos terem sido encontrados. De fato, nossos resultados de acidez em fase gasosa são mais baixos. Finalmente, as contribuições para a estabilidade ânion surgir de formação da ligação entre o oxigênio negativo e as hidroxilas adjacentes. Por exemplo, os valores de acidez para kaempferol, o que falta a funcionalidade de orto-dihidroxi, confirmam o efeito estabilizador das ligações de hidrogênio.

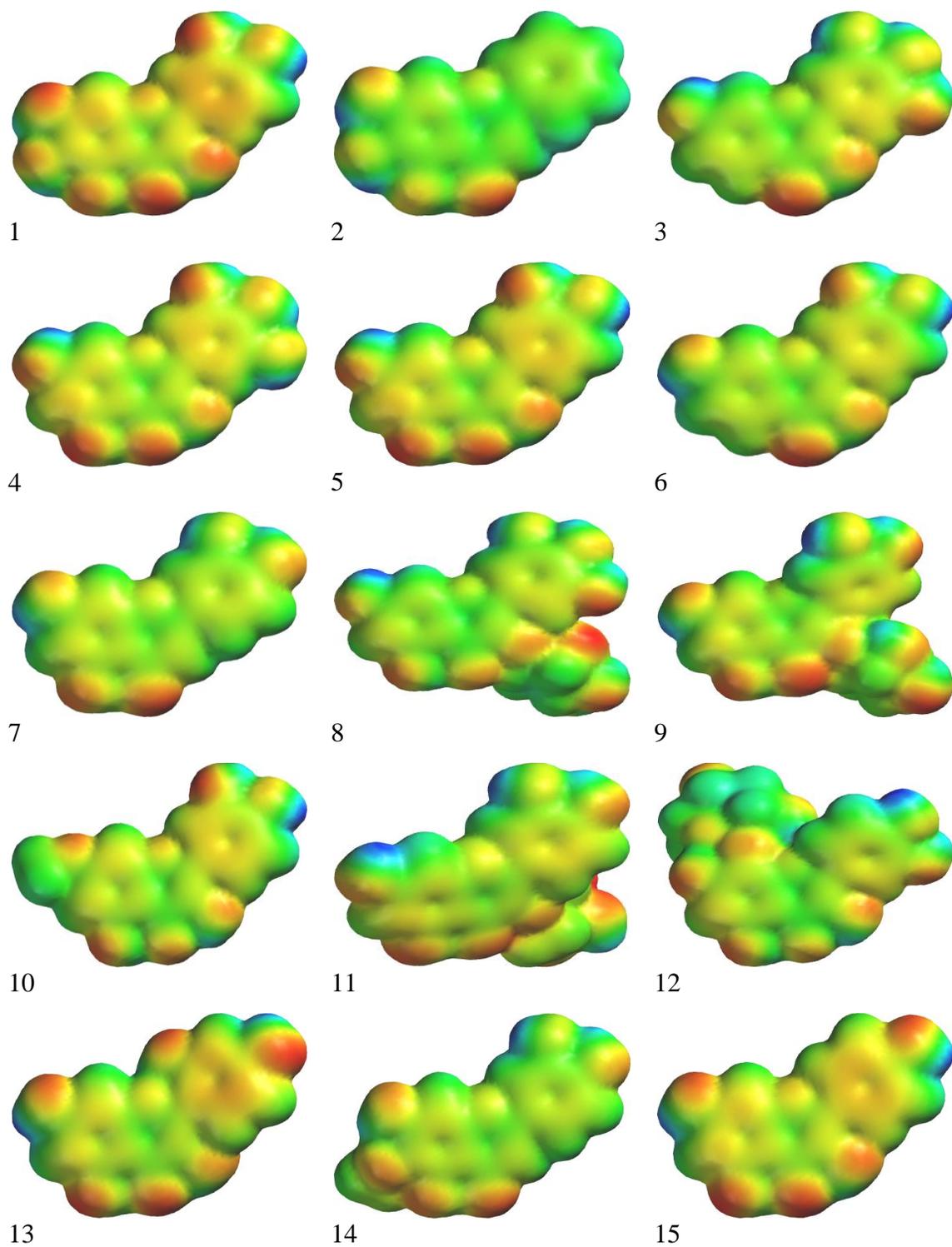
Em meio aquoso, a tendência é até certo ponto diferente da fase gasosa uma: Avicularin (291,2 kcal/mol)> ramnetina (294,6 kcal/mol)> Miricetina (295,1 kcal/mol)> Quercetagen (295,3 kcal/mol)> Robinetin (295,5 kcal/mol)> Gossypin (295,7 kcal/mol)> Morin (295,9 kcal/mol)> 6-MeO-luteolina (296,0 kcal/mol)> Myricetrin (296,3 kcal/mol)> Baicalen, luteolina, e kaempferol (296,6 kcal/mol)> quercetina (296,7 kcal/mol)> fisetina (296,8 kcal/mol)> quercetrina (300,8 kcal/mol). É interessante notar que os valores de acidez absoluta para todos os compostos são muito menores que os correspondentes na fase gasosa.

O mapa do potencial eletrostático é uma superfície que corresponde a uma isodensidade de 0,002 u. e se torna importante para o entendimento de interações do tipo covalentes que ocorrem em superfícies moleculares. Portanto, foram calculados os mapas do potencial eletrostático para os 15 flavonóides estudados, a fim de exemplificar as regiões nucleofílicas (potencial eletrostático negativo) e eletrofílicas (potencial eletrostático positivo) sobre os átomos de hidrogênio.

Na figura 11, podemos observar que os compostos flavonóides **1, 4-6, 8, 10, 12 e 15** apresentam a região eletrostática mais positiva (potencial eletrostático positivo, em azul)

sobre a posição 4' do anel B, enquanto que os compostos **2**, **3** e **13** e os compostos **7**, **9**, **11** e **14** apresentam a região eletrostática mais positiva sobre as posições 7 e 3', respectivamente.

Dados da literatura (JOVANOVIC, STEENKEN et al., 1994; LEMANSKA, SZYMUSIAK et al., 2001; HIMO, NOODLEMAN et al., 2002; MARTINS, LEAL et al., 2004; LEOPOLDINI, RUSSO, CHIODO et al., 2006) relacionam a facilidade de perda do hidrogênio com a atividade antioxidante de alguns compostos flavonóides, estes estudos verificaram que a atividade antioxidante dos flavonóides aumentava com os valores de acidez. Pode-se observar na Figura 11, que os hidrogênios mais ácidos pertencem à hidroxila ligada ao carbono 4', pois estes hidrogênios são os mais positivos segundo a superfície do potencial eletrostático e dos valores calculados de acidez (ver Tabela 2). Isto significa que, quando essas moléculas perdem um cátion H<sup>+</sup>, o hidrogênio sai com maior facilidade da hidroxila ligada ao carbono 4'.



**Figura 11.** Mapas do potencial eletrostático para os compostos flavonóides estudados. O aumento da carga é representado do vermelho (região negativa) ao azul (região positiva).

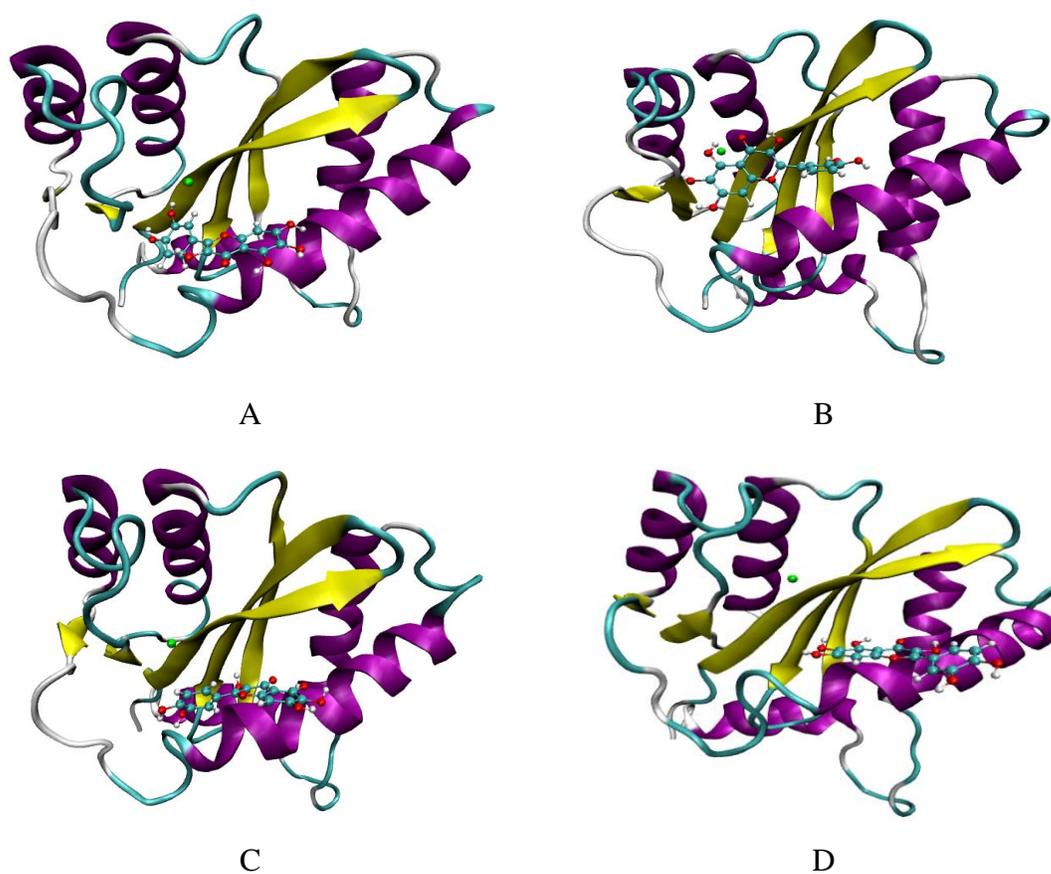
Como a reação entre os inibidores e a integrase ocorre em meio aquoso, podemos observar através dos mapas dos potenciais eletrostáticos e dos valores de energia de desprotonação na Tabela 2, que os compostos **1**, **3-15** em meio aquoso possuem valores de energia de desprotonação mais baixos nas hidroxilas ligadas aos carbonos 7 e 4', como estes valores são próximos a posição mais favorável para a saída do cátion  $H^+$  é da hidroxila ligada ao carbono 7 ou 4', o que está de acordo com dados da literatura (LEMANSKA, SZYMUSIAK et al., 2001) em que indicam que a provável posição para saída do hidrogênio é das posições 7 do anel A ou 4' do anel B. Portanto, pode-se concluir que os ânions provenientes das moléculas desprotonadas na posição 4' ou 7 são os mais estáveis conforme previsto pela superfície de potencial eletrostático, valores calculados de acidez e por dados da literatura.

## 5.2 CÁLCULO DE $pK_a$ PARA ENZIMA INTEGRASE

A molécula **1**, composto flavonóide com maior valor de atividade anti-HIV-1 IN, foi complexada com a enzima integrase. Os átomos de hidrogênio da enzima foram adicionados de acordo com os cálculos teóricos de  $pK_a$ , baseados em um tratamento estatísticos do potencial eletrostático para os aminoácidos, como implementado por Field, Bash et al., 1990, em que o estado de protonação para um determinado resíduo é dado pelo potencial eletrostático, o qual é influenciado por átomos vizinhos. De acordo com os resultados para os cálculos de  $pK_a$ , realizados através do método “*cluter method*”, nenhum estado de ionização de aminoácidos foi predito, ou seja, não foi observado resíduos de aminoácidos fora do estado padrão de ionização.

### 5.3 DINÂMICA MOLECULAR QM/MM

Conforme explicado na Metodologia, simulações de DM com o método híbrido QM/MM de 1,0 ns para a enzima integrase complexada com o composto flavonóide quercetagetina foram realizadas. As estruturas finais obtidas após simulações de DM QM/MM de 1,0 ns são mostradas na Figura 12, enquanto que na Figura 13 são mostradas as interações entre as quatro conformações do inibidor e os principais resíduos de aminoácidos, ou seja, aqueles que têm maior interação com o inibidor.



**Figura 12.** Representação da interação entre a enzima IN, o inibidor quercetagetina, em quatro conformações diferentes, e o cátion Mg<sup>2+</sup>.

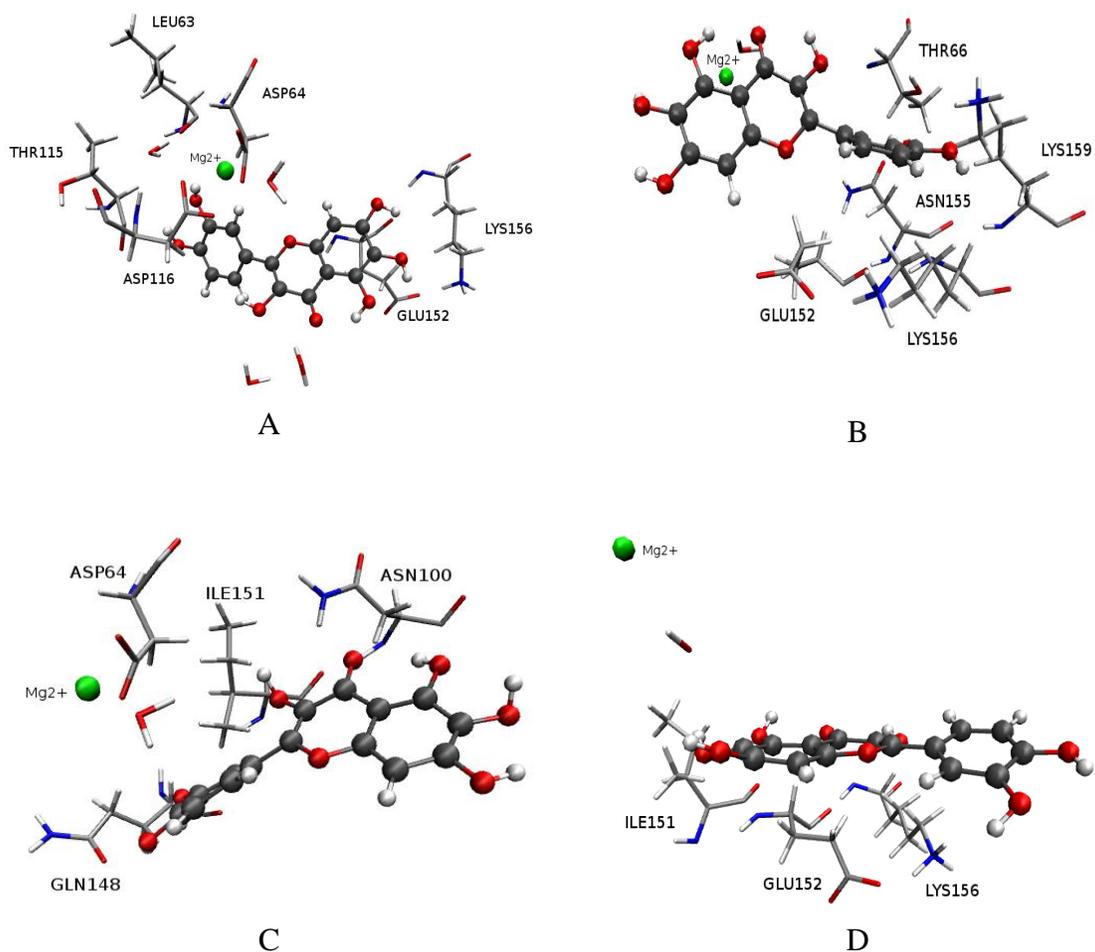
De acordo com a Figura 12, podemos observar que após as dinâmicas ambas as conformações se mantêm alinhadas no centro ativo interagindo com os principais resíduos de aminoácidos, o que está de acordo com dados cristalográficos (GOLDGUR, CRAIGIE et al., 1999).

Os resíduos Asp116, Asp64, Glu152, Lys156, Thr115 e Leu63 são de fundamental importância para a atividade anti-HIV-1 para a conformação A, podemos observar na Figura 8a que as hidroxilas do anel B interagem com os resíduos Asp116 e Asp64 através de ligações de hidrogênio, e com  $Mg^{2+}$  através de uma atração eletrostática criada pelos elétrons  $\pi$  do anel aromático. Estas interações são responsáveis pela orientação adotada pelo inibidor, o qual se localiza na interface entre a IN e o DNA.

Na conformação B podemos observar que o resíduo Thr66 não interage diretamente com o inibidor (Figura 8b), mas estabiliza a cavidade criada pelos resíduos Asn155 e Lys156 através de uma ligação de hidrogênio com Lys159.

Outro resíduo que parece ser essencial para a atividade é o resíduo carregado negativamente Glu152. Seu papel parece ser semelhante ao Thr66: ele interage com Lys156 e Gln148 resíduos, estabilizando a estrutura da cavidade ao redor do inibidor.

Finalmente, como observado na Figura 13, existem algumas moléculas de água que interagem com o inibidor, estabilizando o complexo. Em particular, uma molécula de água, que faz parte da esfera de coordenação do íon  $Mg^{2+}$ , interage com os elétrons- $\pi$  do anel de benzeno central (Figura 13).



**Figura 13.** Representação das interações mais importantes entre os resíduos da integrase e as quatro diferentes conformações do inibidor (quercetagetina) na enzima IN.

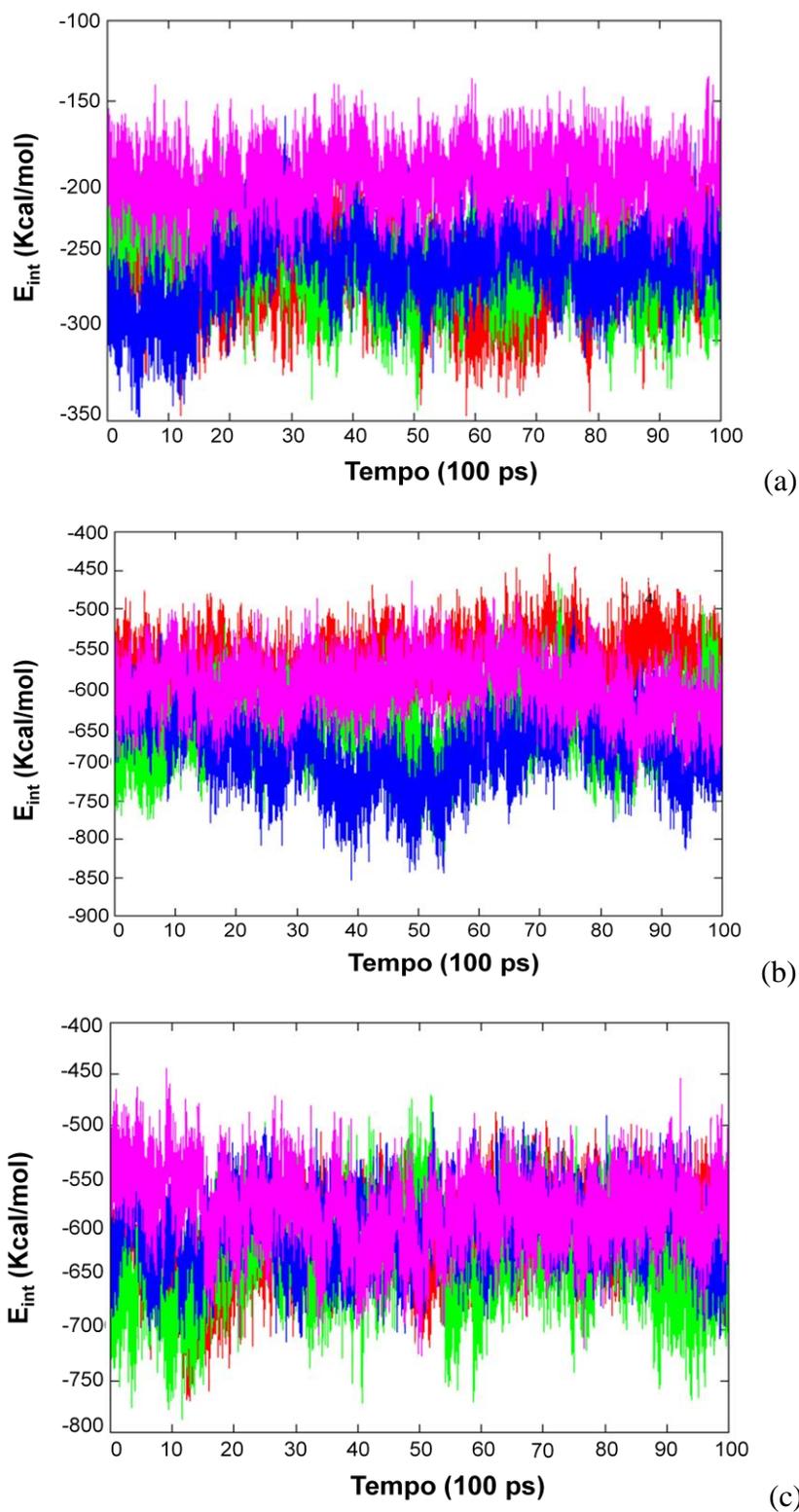
A Tabela 4 mostra os valores das energias de interação proteína-inibidor para os quatro sistemas, com o inibidor neutro e desprotonado nas hidroxilas ligadas ao carbono 4' do anel B e carbono 7 do anel A. A partir da Tabela 2 e Figura 13, podemos inferir que dependendo do estado de ionização, o inibidor poderá interagir de três formas diferentes:

- a) O inibidor interagindo na forma neutra, provavelmente irá adotar a conformação A;
- b) O inibidor interagindo na forma ionizada na posição 4' a conformação adotada pelo inibidor será a C;
- c) O inibidor interagindo na forma ionizada na posição 7 provavelmente a conformação adotada pelo inibidor será a B.

**Tabela 4.** Energia de interação média entre a enzima integrase e os compostos neutros (segunda coluna) e desprotonados nas posições 4' (terceira coluna) e 7 (quarta coluna).

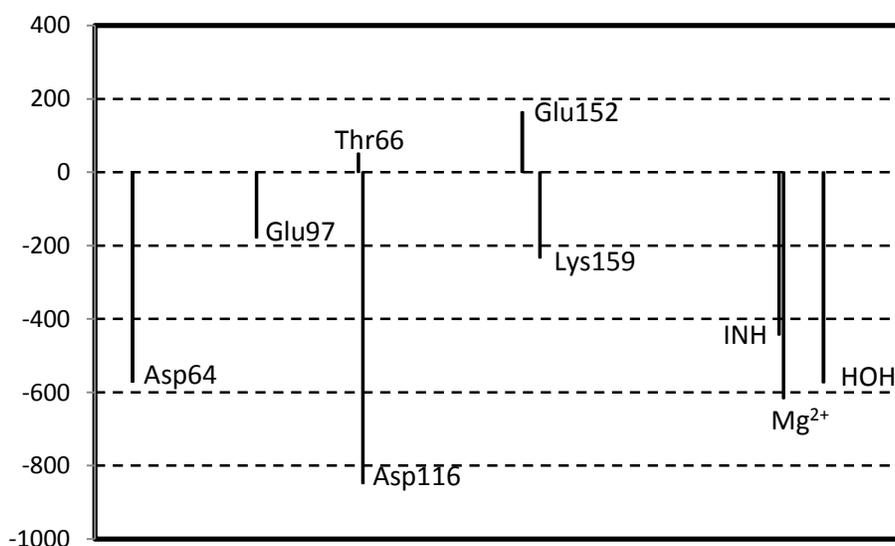
Conformação	$E_{int}$ (kcal/mol)	$E_{int}$ (kcal/mol)	$E_{int}$ (kcal/mol)
	Neutro	Posição 4'	Posição 7
A	-258,35	-570,26	-612,80
B	-251,86	-649,41	-629,17
C	-252,60	-680,47	-600,40
D	-200,34	-601,07	-582,46

Estes resultados mostram que dependendo do estado de protonação do inibidor quercetagetina, a forma de interação com a enzima IN pode variar de acordo com a conformação e as diferentes posições de interação. Levando em consideração o menor valor de energia de interação (-680 kcal/mol) a molécula pode interagir preferencialmente na forma desprotonada na posição 4', a qual é a mais estável, este resultado está de acordo com os cálculos teóricos de acidez para o composto **1** e dados da literatura.



**Figura 14.** Representação da energia de interação para (a) molécula neutra e seus íons (b) 4' e (c) 7 para cada sistema dos últimos 100 ps de DM.

A partir da Figura 15, podemos observar a contribuição individual dos resíduos para a energia de interação total, como o inibidor interage com os resíduos Asp64, Glu97, Asp116 e Lys159. Essas interações favorecem a estabilização do complexo inibidor de proteína, como observado na Figura 8a. Em particular, Asp64, Asp116 e Leu63 interagem com o íon  $Mg^{2+}$  e um dos átomos de hidrogênio do grupo hidroxila do inibidor, esta interação parece ser essencial para a manutenção da estrutura do complexo proteína-metal-inibidor.



**Figura 15.** Gráfico da energia de interação por resíduo.

A partir dos resultados de energia de interação por resíduo observamos que o complexo enzima-inibidor, a estrutura próxima ao centro ativo e a região do centro ativo não sofre grandes variações depois de 1 ns de dinâmica, as regiões de  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -sheet se mantêm alinhadas, entretanto as regiões de loop onde estão os aminoácidos mais importantes do centro ativo sofrem pequenas variações nas posições com a mudança na conformação do inibidor.

## 6 CONCLUSÃO

Este trabalho nos fornece uma percepção do comportamento da quercetagetina, potencial inibidor do HIV-1 integrase, no sítio ativo da enzima através de cálculos de DM QM/MM efetuados para a enzima integrase complexada com o flavonóide quercetagetina para determinar a energia de interação proteína-inibidor. Como observado na análise das interações individuais, a influência dos resíduos Asp64, Lys156, Glu152, Asp116, Thr115 e Lys159 parece ser importante para a interação estabelecida entre o inibidor e o sítio ativo. Essas interações, em conjunto com a estabelecida com as moléculas de água da cavidade criada pela proteína e  $Mg^{2+}$ , podem ser responsáveis pela atividade anti-HIV. Portanto, a orientação do inibidor no complexo fica próxima a orientação adotada pelo 5CITEP na estrutura cristalina.

As interações estabelecidas entre o inibidor com os resíduos de aminoácidos, a água e o cátion  $Mg^{2+}$  são essenciais à atividade catalítica. Estes resultados podem ser úteis no planejamento racional de novos e potentes compostos com atividade anti-HIV-1.

Os cálculos de acidez dos grupos hidroxilas dos compostos flavonóides (Tabela 2) confirmam a observação experimental, em que as posições 7-OH e 4'-OH das moléculas são as que preferencialmente desprotonam. E quanto maior for a acidez dos compostos, maior é a sua facilidade para interagir com a enzima.

Em conclusão, temos investigado por meio da teoria do funcional de densidade em fase gasosa e em solução a acidez de alguns compostos flavonóides amplamente reconhecido como possíveis inibidores de integrase. O elevado nível de cálculos eletrônicos nos permitiu calcular o acidez absoluta, bem como as acidez dos vários grupos hidroxila que pertencem à mesma molécula polifenólicos. Os grupos hidroxila ligados ao

carbono 4' do anel B e 7 do anel A mostraram maior acidez, ou seja, são os locais mais prováveis de desprotonação, devido à maior possibilidade de deslocalizar o par de elétrons. A posição 4' é favorecida quando pontes de hidrogênio entre hidroxilas adjacentes estão presentes. Os compostos mais ácidos são aquelas caracterizadas por um elevado grau de  $\pi$ -deslocalização de elétrons, o qual rende desprotonação de espécies aniônicas estabilizado por fenômenos de ressonâncias. Este trabalho pode fornecer alguma informação útil sobre o mecanismo de inibição que ocorre através da quelação de metais de transição. Os resultados obtidos nesse trabalho podem ajudar no planejamento de novos inibidores da enzima integrase.

**REFERÊNCIAS<sup>1</sup>**

Alkhatib, G., M. Locati, et al. HIV-1 coreceptor activity of CCR5 and its inhibition by chemokines: Independence from G protein signaling and importance of coreceptor downmodulation. Virology, v.234, n.2, Aug 4, p.340-348. 1997.

Alves, C. N., S. Marti, et al. Calculation of binding energy using BLYP/MM for the HIV-1 integrase complexed with the S-1360 and two analogues. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v.15, n.11, Jun 1, p.3818-3824. 2007a.

\_\_\_\_\_. A quantum mechanics/molecular mechanics study of the protein-ligand interaction for inhibitors of HIV-1 integrase. Chemistry-a European Journal, v.13, n.27, p.7715-7724. 2007b.

\_\_\_\_\_. A quantum mechanic/molecular mechanic study of the wild-type and N155S mutant HIV-1 integrase complexed with diketo acid. Biophysical Journal, v.94, n.7, Apr 1, p.2443-2451. 2008.

Alves, C. N., J. C. Pinheiro, et al. A quantum chemical and statistical study of flavonoid compounds with anti-HIV activity. Journal of Molecular Structure-Theochem, v.491, Nov 19, p.123-131. 1999.

\_\_\_\_\_. A multiple linear regression and partial least squares study of flavonoid compounds with anti-HIV activity. Journal of Molecular Structure-Theochem, v.541, May 31, p.81-88. 2001.

Antosiewicz, J., J. A. Mccammon, et al. Prediction of Ph-Dependent Properties of Proteins. Journal of Molecular Biology, v.238, n.3, May 6, p.415-436. 1994.

Becke, A. D. Density-Functional Thermochemistry .3. The Role of Exact Exchange. Journal of Chemical Physics, v.98, n.7, Apr 1, p.5648-5652. 1993.

Beladi, I., R. Puzstai, et al. ACTIVITY OF SOME FLAVONOIDS AGAINST VIRUSES. Annals of the New York Academy of Sciences, v.284, n.MAR4, p.358-364. 1977.

Berger, E. A. HIV entry and tropism: the chemokine receptor connection. Aids, v.11, p.S3-S16. 1997.

Brown, P. O. Integration. In Retroviruses. In: J. C. Cooffin, S. H. Hughes, *et al* (Ed.). Plainview. NY: Cold Spring Harbor Press, 1997. Integration. In Retroviruses

Brown, P. O., B. Bowerman, et al. Correct Integration of Retroviral DNA Invitro. Cell, v.49, n.3, May 8, p.347-356. 1987.

Byrd, R. H., P. H. Lu, et al. A Limited Memory Algorithm for Bound Constrained Optimization. Siam Journal on Scientific Computing, v.16, n.5, Sep, p.1190-1208. 1995.

Cabrera, M., M. Simoens, et al. Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agents: Biological evaluation and structure-activity relationships. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v.15, n.10, May, p.3356-3367. 2007.

Chow, Y. K., M. S. Hirsch, et al. USE OF EVOLUTIONARY LIMITATIONS OF HIV-1 MULTIDRUG RESISTANCE TO OPTIMIZE THERAPY. Nature, v.361, n.6413, Feb, p.650-654. 1993.

Cooper, D. A., R. T. Steigbigel, et al. Subgroup and resistance analyses of raltegravir for resistant HIV-1 infection. New England Journal of Medicine, v.359, n.4, Jul 24, p.355-365. 2008.

Cushnie, T. P. T. e A. J. Lamb. Antimicrobial activity of flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents, v.26, n.5, Nov, p.343-356. 2005.

D'angelo, J., J. F. Mouscadet, et al. HIV-1 integrase: the next target for AIDS therapy? Pathologie Biologie, v.49, n.3, Apr, p.237-246. 2001.

Dewar, M. J. S., E. G. Zoebisch, et al. The Development and Use of Quantum-Mechanical Molecular-Models .76. Am1 - a New General-Purpose Quantum-Mechanical Molecular-Model. Journal of the American Chemical Society, v.107, n.13, p.3902-3909. 1985.

Ditchfie.R, W. J. Hehre, et al. Self-Consistent Molecular-Orbital Methods .9. Extended Gaussian-Type Basis for Molecular-Orbital Studies of Organic Molecules. Journal of Chemical Physics, v.54, n.2, p.724-&. 1971.

Dougherty, D. A. Cation-pi interactions in chemistry and biology: A new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. Science, v.271, n.5246, Jan 12, p.163-168. 1996.

Dynamo. Molecular Simulation Library 2000.

Evering, T. H. e M. Markowitz. Raltegravir (MK-0518): An integrase inhibitor for the treatment of HIV-1. Drugs of Today, v.43, n.12, Dec, p.865-877. 2007.

Fauci, A. S. The Human Immunodeficiency Virus - Infectivity and Mechanisms of Pathogenesis. Science, v.239, n.4840, Feb 5, p.617-622. 1988.

Fauci, A. S. e P. J. Fischinger. The Development of an Aids Vaccine - Progress and Promise. Public Health Reports, v.103, n.3, May-Jun, p.230-236. 1988.

Fesen, M. R., K. W. Kohn, et al. Inhibitors of Human-Immunodeficiency-Virus Integrase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.90, n.6, Mar 15, p.2399-2403. 1993.

Fesen, M. R., Y. Pommier, et al. Inhibition of Hiv-1 Integrase by Flavones, Caffeic Acid Phenethyl Ester (Cape) and Related-Compounds. Biochemical Pharmacology, v.48, n.3, Aug 3, p.595-608. 1994.

Field, M. J., P. A. Bash, et al. A Combined Quantum-Mechanical and Molecular Mechanical Potential for Molecular-Dynamics Simulations. Journal of Computational Chemistry, v.11, n.6, Jul, p.700-733. 1990.

Folks, T. M., S. W. Kessler, et al. Infection and Replication of Hiv-1 in Purified Progenitor Cells of Normal Human-Bone Marrow. Science, v.242, n.4880, Nov 11, p.919-922. 1988.

Foster, J. P. e F. Weinhold. Natural Hybrid Orbitals. Journal of the American Chemical Society, v.102, n.24, p.7211-7218. 1980.

Frankel, A. D. e J. A. T. Young. HIV-1: Fifteen proteins and an RNA. Annual Review of Biochemistry, v.67, p.1-25. 1998.

Frisch, M. J., G. W. Trucks, et al. Gaussian 03, Revision C.02, Gaussian, Inc. . Wallingford, CT 2004.

Gabor, M. e Eperjess.E. Antibacterial Effect of Fisetin and Fisetinidin. Nature, v.212, n.5067, p.1273-&. 1966.

Garcia-Viloca, M., J. Gao, et al. How enzymes work: Analysis by modern rate theory and computer simulations. Science, v.303, n.5655, Jan 9, p.186-195. 2004.

Gilson, M. K. Multiple-Site Titration and Molecular Modeling - 2 Rapid Methods for Computing Energies and Forces for Ionizable Groups in Proteins. Proteins-Structure Function and Genetics, v.15, n.3, Mar, p.266-282. 1993.

Goldgur, Y., R. Craigie, et al. Structure of the HIV-1 integrase catalytic domain complexed with an inhibitor: A platform for antiviral drug design. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.96, n.23, Nov, p.13040-13043. 1999.

Goldwirt, L., A. Barrail-Tran, et al. Quantification of raltegravir (MK0518) in human plasma by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v.878, n.3-4, Feb, p.456-460.

Grater, F., S. M. Schwarzl, et al. Protein/ligand binding free energies calculated with quantum mechanics/molecular mechanics. Journal of Physical Chemistry B, v.109, n.20, May, p.10474-10483. 2005.

Guo, W. L., Y. F. Guo, et al. Molecular dynamics and quantum mechanics investigation on mechanic-electric behaviors of nanotubes. International Journal of Nonlinear Sciences and Numerical Simulation, v.3, n.3-4, p.469-472. 2002.

Hammer, S. M. Management of newly diagnosed HIV infection. New England Journal of Medicine, v.353, n.16, Oct 20, p.1702-1710. 2005.

Harborne, J. B. e C. A. Williams. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry, v.55, n.6, Nov, p.481-504. 2000.

Havsteen, B. BIOCHEMICAL EFFECTS OF FLAVONOIDS. Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung, v.170, n.1, p.36-41. 1980.

\_\_\_\_\_. Flavonoids, a Class of Natural-Products of High Pharmacological Potency. Biochemical Pharmacology, v.32, n.7, p.1141-1148. 1983.

Havsteen, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology & Therapeutics, v.96, n.2-3, Nov-Dec, p.67-202. 2002.

He, Y. X., J. W. Cheng, et al. Potent HIV fusion inhibitors against Enfuvirtide-resistant HIV-1 strains. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.105, n.42, Oct, p.16332-16337. 2008.

Hensen, C., J. C. Hermann, et al. A combined QM/MM approach to protein-ligand interactions: Polarization effects of the HIV-1 protease on selected high affinity inhibitors. Journal of Medicinal Chemistry, v.47, n.27, Dec, p.6673-6680. 2004.

Himo, F., L. Noodleman, et al. Relative acidities of ortho-substituted phenols, as models for modified tyrosines in proteins. Journal of Physical Chemistry A, v.106, n.37, Sep 19, p.8757-8761. 2002.

Hsieh, R. J. e J. E. Kinsella. Lipoxygenase Generation of Specific Volatile Flavor Carbonyl-Compounds in Fish-Tissues. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.37, n.2, Mar-Apr, p.279-286. 1989.

Hu, C. Q., K. Chen, et al. ANTI-AIDS AGENTS .10. ACACETIN-7-O-BETA-D-GALACTOPYRANOSIDE, AN ANTI-HIV PRINCIPLE FROM CHRYSANTHEMUM-MORIFOLIUM AND A STRUCTURE-ACTIVITY CORRELATION WITH SOME RELATED FLAVONOIDS. Journal of Natural Products, v.57, n.1, Jan, p.42-51. 1994.

Jorgensen, W. L. e C. Jenson. Temperature dependence of TIP3P, SPC, and TIP4P water from NPT Monte Carlo simulations: Seeking temperatures of maximum density. Journal of Computational Chemistry, v.19, n.10, Jul 30, p.1179-1186. 1998.

Jorgensen, W. L., D. S. Maxwell, et al. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. Journal of the American Chemical Society, v.118, n.45, Nov 13, p.11225-11236. 1996.

Jovanovic, S. V., S. Steenken, et al. Flavonoids as Antioxidants. Journal of the American Chemical Society, v.116, n.11, Jun 1, p.4846-4851. 1994.

Katz, R. A. e A. M. Skalka. The Retroviral Enzymes. Annual Review of Biochemistry, v.63, p.133-173. 1994.

Lee, C. T., W. T. Yang, et al. Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron-Density. Physical Review B, v.37, n.2, Jan 15, p.785-789. 1988.

Lemanska, K., H. Szymusiak, et al. The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. Free Radical Biology and Medicine, v.31, n.7, Oct 1, p.869-881. 2001.

Leopoldini, M., N. Russo, et al. Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.54, n.17, Aug 23, p.6343-6351. 2006.

\_\_\_\_\_. Gas and liquid phase acidity of natural antioxidants. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.54, n.8, Apr, p.3078-3085. 2006.

Lu, M., J. Seufert, et al. Pancreatic beta-cell-specific repression of insulin gene transcription by CCAAT enhancer-binding protein beta - Inhibitory interactions with basic helix-loop-helix transcription factor E47. Journal of Biological Chemistry, v.272, n.45, Nov 7, p.28349-28359. 1997.

Manouilov, K. K., Fedorov, Ii, et al. LYMPHATIC TARGETING OF ANTI-HIV NUCLEOSIDES - DISTRIBUTION OF 3'-AZIDO-3'-DEOXYTHYMIDINE (AZT) AND 3'-AZIDO-2',3'-DIDEOXYURIDINE (AZDU) AFTER ADMINISTRATION OF DIPALMITOYLPHOSPHATIDYL PRODRUGS TO MICE. Antiviral Chemistry & Chemotherapy, v.6, n.4, Jul, p.230-238. 1995.

Marchand, C., X. C. Zhang, et al. Structural determinants for HIV-1 integrase inhibition by beta-diketo acids. Journal of Biological Chemistry, v.277, n.15, Apr 12, p.12596-12603. 2002.

Marinello, J., C. Marchand, et al. Comparison of raltegravir and elvitegravir on HIV-1 integrase catalytic reactions and on a series of drug-resistant integrase mutants. Biochemistry, v.47, n.36, Sep 9, p.9345-9354. 2008.

Marti, S., M. Roca, et al. Theoretical insights in enzyme catalysis. Chemical Society Reviews, v.33, n.2, Feb, p.98-107. 2004.

Martins, H. F. P., J. P. Leal, et al. Toward the prediction of the activity of antioxidants: Experimental and theoretical study of the gas-phase acidities of flavonoids. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, v.15, n.6, Jun, p.848-861. 2004.

McMahon, T. B. e P. Kebarle. Intrinsic Acidities of Substituted Phenols and Benzoic-Acids Determined by Gas-Phase Proton-Transfer Equilibria. Journal of the American Chemical Society, v.99, n.7, p.2222-2230. 1977.

Molfetta, F. A., C. N. Alves, et al. A quantum chemical and statistical study of biflavonoid compounds with anti-HIV activity. Journal of Molecular Structure-Theochem, v.577, n.2-3, Jan 31, p.187-195. 2002.

Molfetta, F. A., K. M. Honorio, et al. A study on the anti-HIV activity of biflavonoid compounds by using quantum chemical and chemometric methods. Journal of Molecular Structure-Theochem, v.674, n.1-3, Apr 9, p.191-197. 2004.

Nicklaus, M. C., N. Neamati, et al. HIV-1 integrase pharmacophore: Discovery of inhibitors through three-dimensional database searching. Journal of Medicinal Chemistry, v.40, n.6, Mar 14, p.920-929. 1997.

Pais, G. C. G., X. C. Zhang, et al. Structure activity of 3-aryl-1,3-diketo-containing compounds as HIV-1 integrase inhibitors. Journal of Medicinal Chemistry, v.45, n.15, Jul 18, p.3184-3194. 2002.

Pommier, Y., A. A. Johnson, et al. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. Nature Reviews Drug Discovery, v.4, n.3, Mar, p.236-248. 2005.

Powers, A. E., S. F. Marden, et al. Effect of long-cycle structured intermittent versus continuous HAART on quality of life in patients with chronic HIV infection. Aids, v.20, n.6, Apr, p.837-845. 2006.

Raghavan, K., J. K. Buolamwini, et al. 3-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship (Qsar) of Hiv Integrase Inhibitors - a Comparative Molecular-Field Analysis (Comfa) Study. Journal of Medicinal Chemistry, v.38, n.6, Mar 17, p.890-897. 1995.

Reed, A. E., R. B. Weinstock, et al. Natural-Population Analysis. Journal of Chemical Physics, v.83, n.2, p.735-746. 1985.

Riceevans, C. A. e N. J. Miller. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. Biochemical Society Transactions, v.24, n.3, Aug, p.790-795. 1996.

Steigbigel, R. T., D. A. Cooper, et al. Raltegravir with optimized background therapy for resistant HIV-1 infection. New England Journal of Medicine, v.359, n.4, Jul 24, p.339-354. 2008.

Tan, G. T., J. F. Miller, et al. Hiv-1 and Hiv-2 Reverse Transcriptases - a Comparative-Study of Sensitivity to Inhibition by Selected Natural-Products. Biochemical and Biophysical Research Communications, v.185, n.1, May 29, p.370-378. 1992.

Tatli, Ii, Z. S. Akdemir, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive potential of major phenolics from *Verbascum salviifolium* Boiss. Zeitschrift Fur Naturforschung Section C-a Journal of Biosciences, v.63, n.3-4, Mar-Apr, p.196-202. 2008.

Tisdale, M., R. E. Myers, et al. CROSS-RESISTANCE ANALYSIS OF HUMAN-IMMUNODEFICIENCY-VIRUS TYPE-1 VARIANTS INDIVIDUALLY SELECTED FOR RESISTANCE TO 5 DIFFERENT PROTEASE INHIBITORS. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.39, n.8, Aug, p.1704-1710. 1995.

Trinitapoli, J. Religious teachings and influences on the ABCs of HIV prevention in Malawi. Social Science & Medicine, v.69, n.2, Jul, p.199-209. 2009.

Tuske, S., S. G. Sarafianos, et al. Structures of HIV-1 RT-DNA complexes before and after incorporation of the anti-AIDS drug tenofovir. Nature Structural & Molecular Biology, v.11, n.5, May, p.469-474. 2004.

UNAIDS. Report on the global AIDS epidemic, Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. 2009 2009.

Warshel, A. e M. Levitt. Theoretical Studies of Enzymic Reactions - Dielectric, Electrostatic and Steric Stabilization of Carbonium-Ion in Reaction of Lysozyme. Journal of Molecular Biology, v.103, n.2, p.227-249. 1976.

Zhao, H., N. Neamati, et al. Design, synthesis and structure-activity relationship of HIV-1 integrase inhibitors. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, v.212, Aug 25, p.21-Medi. 1996.

<sup>1</sup> De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 6023.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)