



ESTRATÉGIAS DE MODELAGEM MOLECULAR NO ESTUDO DE
DERIVADOS 4-OXOQUINOLINA FOSFORADOS COM ATIVIDADE ANTI-HIV

THIAGO CHELLES CARESTIATO

Macaé
Outubro de 2014

THIAGO CHELLES CARESTIATO

ESTRATÉGIAS DE MODELAGEM MOLECULAR NO ESTUDO DE
DERIVADOS 4-OXOQUINOLINA FOSFORADOS COM ATIVIDADE ANTI-HIV

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como um dos requisitos para a obtenção do título de farmacêutico.

Orientadoras: Prof^a Paula Alvarez Abreu
Prof^a Magaly Girão Albuquerque

Macaé

Outubro de 2014

Carestiato, Thiago Chelles

Estratégias de modelagem molecular no estudo de derivados 4-oxo-quinolina fosforados com atividade anti-HIV/ Macaé, RJ, 2014.

Orientadoras: Prof^a Paula Alvarez Abreu e Prof^a Magaly Girão Albuquerque

50 páginas

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé, 2014.

1. *Vírus da imunodeficiência humana*. 2. Modelagem molecular. 3. antivirais I. Universidade Federal do Rio de Janeiro. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por todos os momentos vividos nestes cinco anos e sei que, quando se tem fé e confiança, pode-se chegar até onde se almeja.

Agradeço aos meus pais, meu irmão e minha avó pelo apoio, pela dedicação e por sempre acreditarem no meu potencial e que nada me faria desistir, nem em momentos mais difíceis.

Agradeço a minha namorada, Ana Elisa Guimarães, que sempre me apoiou e me fez acreditar que eu sempre podia dar mais de mim naquilo que eu tinha mais dificuldade.

Agradeço aos meus colegas de turma pelo carinho, apoio e pela amizade que levarei para sempre.

Aos meus colegas do Laboratório de Modelagem Molecular e Pesquisa em Ciências Farmacêuticas (Lamcifar) pelo apoio e companheirismo.

Agradeço às minhas orientadoras de Iniciação Científica (IC) e Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) pela oportunidade dada desde o início e por me aturarem com correções de relatórios de IC e na monografia de TCC.

À banca por ter aceitado avaliar este trabalho.

A todos que já falei, agradeço por acreditarem no meu potencial, na minha profissão, nas minhas ideias, nos meus sonhos, principalmente, quando nem eu mais acreditava.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Ciclo resumido da replicação viral do HIV. **15**
- Figura 2:** Enzima transcriptase reversa em complexo com uma fita de primer-RNA (azul claro e azul escuro, respectivamente) destacando os domínios da subunidade p66: “dedos” (amarelo), “polegar” (vermelho), “palma” (verde), conexão (lilás) e RNAseH (roxo) e a subunidade p51 (cinza) **18**
- Figura 3:** Estruturas de alguns inibidores de transcriptase reversa da classe dos análogos de nucleosídeos (NRTIs): zidovudina (AZT), estavudina (D4T) e didanosina (DDI). **19**
- Figura 4:** Estruturas de alguns inibidores de transcriptase reversa da classe dos análogos de nucleotídeos (NtRTIs): tenofovir e adefovir **20**
- Figura 5:** Estruturas de alguns inibidores de transcriptase reversa da classe dos não nucleosídeos Exemplos de (NNRTIs): nevirapina, efavirenz e delavirdina. **20**
- Figura 6:** Estrutura de oxoquinolinas descritas na literatura com atividade anti-HIV. **23**
- Figura 7:** Mapa de potencial eletrostático dos derivados oxoquinolínicos fosforados. Faixa: -20 a +30 KJ **36**
- Figura 8:** Metabólito predito por reação de O-desalquilação para o derivado mais ativo **41**
- Figura 9:** Sobreposição da pose de menor energia obtida no *redocking* (amarelo) e a pose original obtida por cristalografia e difração de raios-X (verde) (código PDB = 3QIP). **43**

- Figura 10:** Sobreposição da pose de menor energia obtida no *redocking* flexível (rosa) na transcriptase reversa e a pose original obtida por cristalografia e difração de raios-X (3QIP) (verde). **43**
- Figura 11:** Sobreposição da pose do derivado mais ativo (**3g**, amarelo) obtida por *docking* flexível com a estrutura da nevirapina (azul) co-cristalizada com a transcriptase reversa **44**
- Figura 12:** Sobreposição da pose do derivado menos ativo (**3e**, amarelo) obtida por *docking* flexível com a estrutura da nevirapina (azul) co-cristalizada com a transcriptase reversa **44**
- Figura 13:** Sobreposição da pose da molécula mais ativa (**3g**) obtida por *docking* rígido (verde) com a estrutura da nevirapina co-cristalizada com a transcriptase reversa em azul. **45**
- Figura 14:** Sobreposição da pose da molécula menos ativa (**3e**) obtida por *docking* rígido (verde) com a estrutura da nevirapina co-cristalizada com a transcriptase reversa em azul. **46**
- Figura 15:** Interações da nevirapina (verde) com os resíduos de aminoácidos da TR (cor por átomo). **47**
- Figura 16:** Interações entre os derivados de oxoquinolinas forforados e a TR (cor por átomo). A) molécula mais ativa (**3g**, vermelho) e B) molécula menos ativa (**3e**, azul). **47**
- Figura 17:** Sobreposição da pose do metabólito de 3g obtida por *docking* rígido em laranja com a molécula 3g em azul. B) Sobreposição da pose da molécula 3g obtida por *docking* rígido em azul com a estrutura da nevirapina co-cristalizada com a transcriptase reversa em verde. **48**
- Figura 18:** Interações entre o metabólito da molécula mais ativa (amarelo) e a TR (cor por átomo). **49**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descritores estereoeletrônicos calculados para os derivados oxoquinolinas relacionados com a atividade biológica (EC50): energia HOMO/LUMO (EHOMO e ELUMO), momento de dipolo molecular (μ), massa molecular (MM), área superficial molecular (ASM), número de grupos aceptores (nON) e doadores (nOHNH) de ligação hidrogênio, coeficiente de partição octanol/água (cLogP), solubilidade (Log S), número de átomos (nA), número de ligações rotacionáveis (nrot), volume molecular (VM), área de superfície polar topológica (TPSA). S é a solubilidade em água à temperatura de 20-25°C em mol/L.

Tabela 2: Carga eletrostática (q, e) dos átomos C6 e C7 ligados aos substituintes R1 e R2, respectivamente, nos derivados oxoquinolinas

Tabela 3: Valores das propriedades farmacocinéticas obtidas *in silico* para os derivados oxoquinolinas e AZT (zidovudina): absorção intestinal humana (HIA), biodisponibilidade oral (F), ligação às proteínas plasmáticas (PPB). Os valores de HIA, F e PPB são fornecidos em percentagem da dose administrada de um composto.

Tabela 4: Valores das propriedades toxicológicas *in silico* para os derivados 4-oxoquinolinas fosforadas: carcinogênese (Carc), toxicidade aguda em roedores por exposição oral (LD₅₀), probabilidade de mutagenicidade em ensaio de reversão da mutação bacteriana (AMES), risco mutagênico (RM), risco tumorigênico (RT), efeito irritante (EI) e risco reprodutivo (RR), Probabilidade de não ser mutagênico ou carcinogênico (-).

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

Å Ångstrom

AG Algoritmo Genético

AIDS Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AZT Zidovudina

cLogP Lipofilicidade calculada

D4T Estavudina

DDI Didanosina

DNA Ácido Desoxirribonucleico

dNTPs Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EC50 Valor da Concentração efetiva para inibir 50% da infecção/produção de novos vírus

HIV Vírus da Imunodeficiência Humana

HOMO Orbital Molecular Ocupado de Maior Energia

IN - Integrase

Kcal Quilocalorias

LogS Solubilidade em água

LUMO Orbital Molecular Ocupado de Menor Energia

MMFF Campo de Força de Mecânica Molecular

NNRTI Inibidores Não-Nucleosídeos da Transcriptase Reversa

NRTI Inibidores Nucleosídeos da Transcriptase Reversa

NtRTI Inibidores Nucleotídeos da Transcriptase Reversa

RMN Ressonância Magnética Nuclear

RMS Raiz Média Quadrática

RNA Ácido Ribonucleico

SAR Relação Estrutura-Atividade

TR Transcriptase Reversa

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 Introdução..... | 12 |
| 1.1 Infecção pelo HIV: Um importante problema de saúde pública..... | 12 |
| 1.2 Estrutura e ciclo do vírus HIV..... | 13 |
| 1.2.1 Enzimas virais como alvo terapêutico no HIV..... | 16 |
| 1.2.1.1 Transcriptase reversa e seus inibidores..... | 16 |
| 1.3. Desafios na terapia com antirretrovirais..... | 20 |
| 1.4 Modelagem Molecular no desenvolvimento de fármacos..... | 23 |
| 1.4.1 Estudo da relação estrutura-atividade..... | 24 |
| 1.4.2 Docking Molecular..... | 25 |
| 1.4.3 Predição de propriedades Farmacocinéticas e de toxicidade in silico..... | 26 |
| 2 Justificativa..... | 28 |
| 3 Objetivos..... | 29 |
| 3.1 Objetivos gerais..... | 29 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 29 |
| 4 Metodologia..... | 30 |
| 4.1 Avaliação da Relação Estrutura-Atividade..... | 30 |
| 4.2 Avaliação das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas in silico | 30 |
| 4.3 Docking Molecular de derivados 4-oxoquinolinas fosforados na TR do HIV..... | 31 |
| 5 Resultados e Discussão..... | 33 |
| 5.1 Análise da relação estrutura-atividade..... | 33 |
| 5.2 Análise do perfil farmacocinético e de toxicidade in silico..... | 36 |
| 5.3 – Docking Molecular de oxoquinolinas na TR do HIV..... | 41 |
| 6 Conclusão..... | 50 |
| 7 Referências..... | 51 |

RESUMO

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), causada pelo vírus da imunodeficiência humana é um grande problema de saúde pública. O objetivo deste trabalho foi avaliar a relação estrutura-atividade de 12 derivados 4-oxoquinolina fosforados com atividade anti-HIV descrita, avaliar o possível modo de ligação e interações com a transcriptase reversa (TR) e o perfil farmacocinético e toxicológico *in silico*. Dentre os descritores estereoelétrônicos calculados, os mais correlacionados com a atividade anti-HIV (EC_{50}) foram massa, volume e área moleculares. O mapa de potencial eletrostático também mostrou características importantes. O *docking* molecular foi realizado na TR do HIV, usando o programa Autodock 4.2 e o algoritmo genético Lamarkiano. A comparação dos modos de ligação dos derivados mais ativos (**3g**) e menos ativos (**3e**) com o da nevirapina mostra que o derivado mais ativo apresenta maior similaridade ao modo de ligação da nevirapina como a presença de uma interação do tipo empilhamento π - π (π -*stacking*) com a Tyr188 e conservação de grupos farmacofóricos. A predição do metabólito de **3g** foi realizada e foi observada a possibilidade do metabólito também apresentar atividade de acordo com a análise das interações com a TR no estudo de *docking*. Além disso, foram analisadas propriedades ADMETox *in silico*, sendo observado que **3g** apresentou baixo risco tóxico, e boa biodisponibilidade oral e absorção intestinal de acordo com as predições.

Palavras-chaves: modelagem molecular, oxoquinolinas, transcriptase reversa, HIV.

ABSTRACT

The acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), caused by the human immunodeficiency virus infection is a major public health problem. The objective of this study is to evaluate the structure-activity relationships of 12 phosphorous 4-oxoquinoline derivatives with anti-HIV activity described, assessing the possible binding mode and interactions with reverse transcriptase (RT) and the *in silico* pharmacokinetic and toxicological profile. Stereoeletrônicos descriptors were calculated and correlated with the anti-HIV activity showing that mass, volume and area were the most correlated descriptors with EC50. The molecular *docking* was performed in the RT HIV using the AutoDock 4.2 software and Lamarkian genetic algorithm. The analysis of the binding mode of the most active compound (**3g**) and the least active one (**3e**) showed a slightly different binding mode between them and the most active compound showed similarity with the binding mode of nevirapine as the π - π stacking interaction with Tyr188 and conservation of pharmacophoric groups. The prediction of possible metabolites of **3g** was performed showing the possibility that the metabolite also present activity according to the interactions with the RT in docking studies. Furthermore, *in silico* ADMETox properties were analyzed, and it was observed that **3g** presented low toxic risk and good oral bioavailability and intestinal absorption according to the predictions.

Keywords: molecular modeling, oxoquinoline, reverse transcriptase, HIV

1. INTRODUÇÃO

1.1. Infecção pelo HIV: um importante problema de saúde pública

Os primeiros casos da síndrome da imunodeficiência (AIDS) no mundo foram detectados no início da década de 1980, principalmente, em homens homossexuais. Posteriormente, quadro semelhante foi encontrado em pacientes hemofílicos (UNAIDS/WHO, 2010).

No Brasil, assim como no mundo, a propagação da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) sofreu transformações ao longo do tempo em seu perfil epidemiológico. Ocorreu aumento da transmissão por contato heterossexual e crescimento substancial de casos em mulheres, o que vem sendo apontado como o mais importante fenômeno para o atual momento da epidemia (BRITO, et al, 2000)

Atualmente, a epidemia não se restringe mais aos grandes centros urbanos, atingindo 59% dos 5.507 municípios brasileiros. Outro dado é que no período de 1980 a 2012 foram notificados ao Sistema de Informação de agravos de notificação (SINAN) do Ministério da Saúde 656.701 casos de HIV, sendo 210.383 casos entre 1980 e 1989 (32,1%) e 446.318 casos de 2000 a 2012 (67,9%). Esses dados mostram que essa epidemia ainda vem se disseminando pelo país (DA SILVA et al., 2013).

No ano de 2012, foram notificados 39.185 casos de HIV no Brasil. Este valor vem mantendo-se estável nos últimos cinco anos. A taxa de detecção nacional foi de 20,2 casos por 100.000 habitantes. A maior taxa de detecção de HIV foi observada na Região Sul, 30,9 casos por 100.000 habitantes, seguida pela Região Norte (21,0), Região Sudeste (20,1), Região Centro-Oeste (19,5) e Região Nordeste (14,8) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A taxa de mortalidade no país está diminuindo, pois passou de 9,6, em 1996, para 6 em 2005, o que tem ocorrido, principalmente, com a introdução e garantia de acesso gratuito ao tratamento antirretroviral (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A adesão ao tratamento reduz o risco de falha virológica, aumenta a sobrevida, reduz o risco de progressão para a AIDS e o desenvolvimento de cepas virais resistentes, além de melhorar a qualidade de vida do paciente. Os determinantes da adesão podem ser agrupados em categorias, que incluem: o paciente; o profissional

de saúde; a relação profissional-paciente; a doença; o serviço de saúde; e o regime terapêutico (BONOLO et al, 2007)

1.2. Estrutura e ciclo do vírus HIV

O HIV é classificado como membro da família Retroviridae, subfamília Orthoretrovirinae, gênero Lentivirus (FLINT et al., 2004). O vírus apresenta forma esférica, possui em seu interior duas cópias de um genoma de RNA fita simples e as proteínas: transcriptase reversa, integrase e protease. A partícula do vírus é constituída pelo capsídeo, onde estão inseridas as glicoproteínas (gp) como: gp120 e gp41, além de proteínas de membrana. O capsídeo é circundado por uma dupla camada lipídica, derivado da célula hospedeira durante a maturação do vírus (Kaufman et al., 2004).

O ciclo de replicação deste vírus está dividido em duas etapas: a fase precoce, que se refere aos passos de infecção da célula até a integração do DNA viral no genoma do hospedeiro e a fase tardia que resulta na expressão de genes virais e continua com a liberação e maturação do vírus (ANGELIS, 2006) (Figura 1).

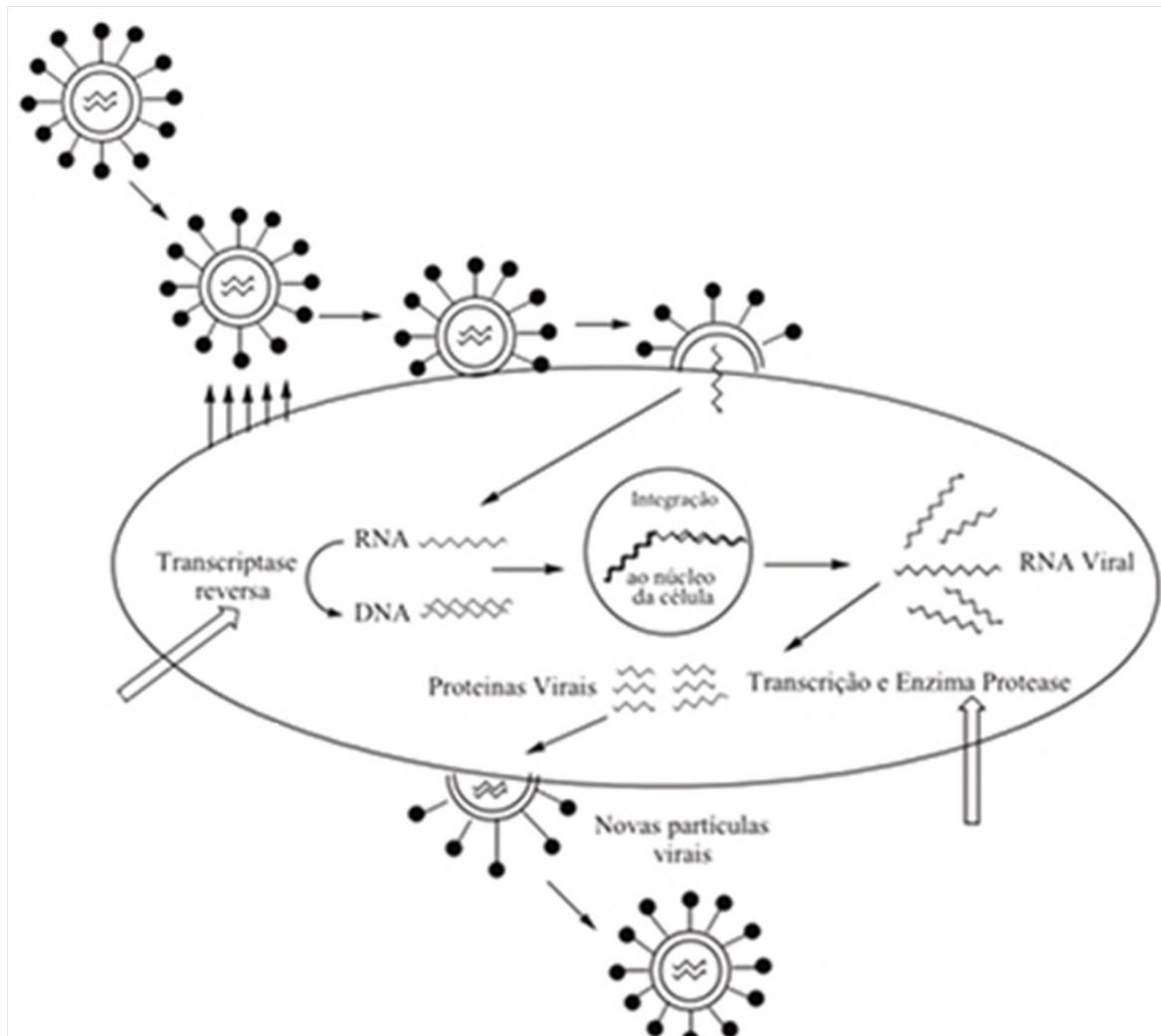


Figura 1. Ciclo resumido da replicação viral do HIV (Adaptado de DE SOUZA, 2003).

A entrada do HIV na célula é mediada pela ligação do vírus ao receptor celular CD4, expresso na superfície de linfócitos T, monócitos, células dendríticas e da microglia (VERA, 2007). Para iniciar a infecção, a glicoproteína gp120 presente na superfície do vírus se liga ao receptor celular CD4 primário.

Essa ligação ao receptor provoca uma alteração conformacional que permite que a gp120 se ligue a um co-receptor (acoplado à proteína G dos receptores de quimiocina CCR5). Em seguida, ocorre fusão das membranas celular e viral, processo mediado pela gp41. O nucleocapsídeo viral penetra no citoplasma celular, liberando o RNA do vírus que, pela ação da transcriptase reversa, é convertido em DNA.

A reação de integração envolvendo o DNA viral e o DNA alvo do hospedeiro é iniciada no citoplasma pela formação de um complexo de pré-integração formado

pelo DNA e pela integrase. Essa integração requer a integrase viral, que insere dois terminais de DNA viral nos cromossomos do hospedeiro (GROTTO, 2006).

A expressão gênica é regulada por proteínas virais. Os RNAs virais transcritos são expressos a partir das sequências repetitivas longas terminais (LTR, do inglês, *long terminal repeat*) e a proteína acessória Tat que aumenta a velocidade de transcrição. Na ausência de Tat, as RNA polimerases são, geralmente, incapazes de transcrever sequências maiores que algumas centenas de nucleotídeos, além disso, Tat não se liga em sítios no DNA, mas a uma dobra na região 5'-terminal do RNA em formação, conhecida como TAR (elemento responsivo da Tat) (PUGLISI, et al., 1992; ABOU-ELA, 1995).

O gene *gag* codifica proteínas da matriz, capsídeo e nucleocapsídeo virais e o gene *env* codifica as glicoproteínas do envelope (gp120 e gp41) (SWANSTROM; WILLS, 1997). Os virions passam por um processo morfológico, conhecido como maturação, que consiste na clivagem das poliproteínas gag-pol pela protease viral, gerando as enzimas e estruturas virais dos capsídeos.

Após esta etapa, o complexo de nucleoproteínas é delimitado por um envelope no qual estão presentes tanto proteínas celulares de membrana quanto glicoproteínas gp120 e gp41 que passam por um processo de brotamento na membrana, onde ocorre a formação de novas partículas virais (GROTTO, 2006).

1.2.1. Enzimas virais como alvo terapêutico no HIV

As enzimas virais são os principais alvos terapêuticos já descritos para o HIV. Existem diversos fármacos em uso clínico que agem como inibidores de transcriptase reversa (das classes dos análogos de nucleosídeos/nucleotídeos e dos não nucleosídeos), inibidores de protease e inibidores de integrase (FDA, 2011).

1.2.1.1. Transcriptase reversa e seus inibidores

A transcriptase reversa é um heterodímero assimétrico constituído pelas subunidades p66 e p51. A subunidade p66, com 560 aminoácidos, possui um domínio com atividade RNase H e quatro domínios relacionados à atividade da polimerase. A subunidade p51, com 440 aminoácidos, possui quatro domínios, mas não apresenta atividade catalítica e promove apenas apoio estrutural (KOHLSTAEDTK et al., 1992).

A estrutura da transcriptase reversa pode ser comparada a uma mão direita, sendo composta por quatro domínios: “dedos” (resíduos 1-85 e 118-155) e “polegar” (resíduos 237-318) que estão relacionados com a incorporação de novos nucleotídeos e ligação de *primer*, “palma” (resíduos 86-117 e 156-236) que se liga a fita de ácido nucleico e “conexão” (resíduos 319-426) que faz a ligação com a região da RNase H (SARAFIANOS, 2009) (Figura 2).

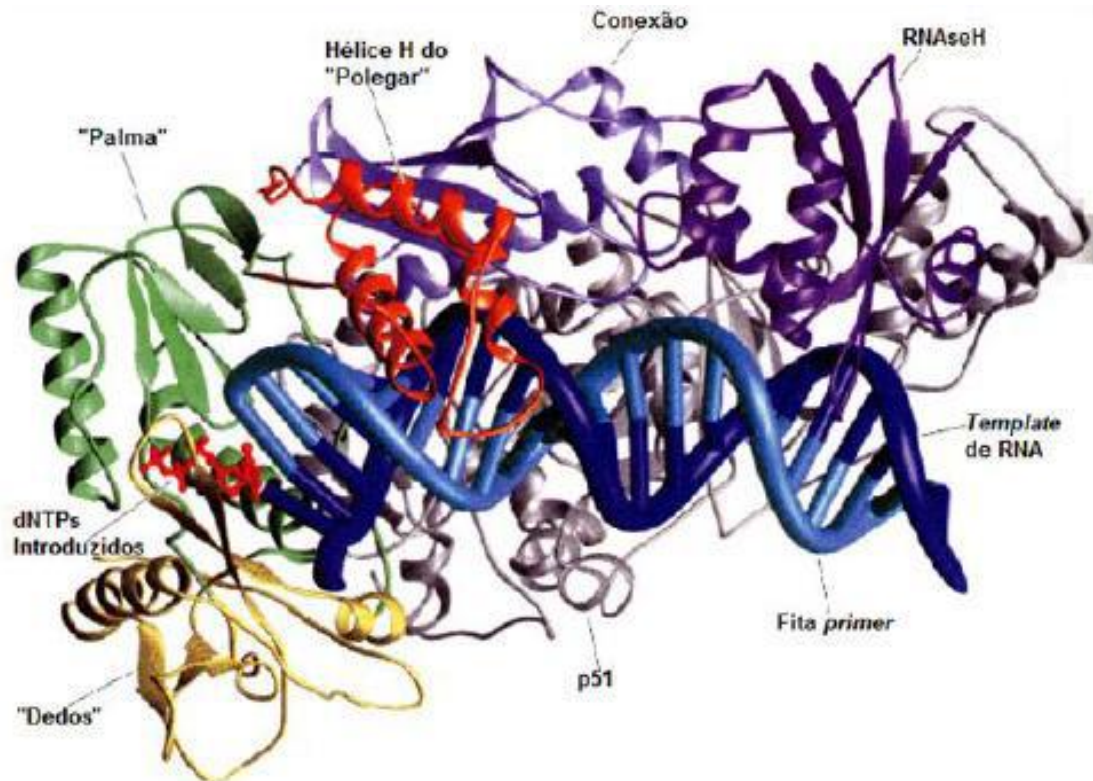


Figura 2. Enzima transcriptase reversa em complexo com uma fita de primer-RNA (azul claro e azul escuro, respectivamente) destacando os domínios da subunidade p66: “dedos” (amarelo), “polegar” (vermelho), “palma” (verde), conexão (lilás) e RNaseH (roxo) e a subunidade p51 (cinza) (Adaptado de HUANG et al., 1998)

A transcriptase reversa (TR) promove a síntese de uma cópia de DNA de fita dupla, catalisando as reações de polimerização de DNA dependente de RNA e DNA, além clivar a fita de RNA do híbrido RNA-DNA formado durante o processo (atividade ribonuclease H) (PEÇANHA et al., 2002).

Esse processo consiste numa alteração conformacional na posição do “polegar” da subunidade p66, que passa para uma conformação aberta. Essa mudança de conformação promove interações entre os resíduos da alfa-hélice e o DNA. Em um segundo momento, ocorre a etapa de translocação que é caracterizada por movimentos rotacionais e translacionais da TR em relação à dupla hélice de DNA (SARAFIANOS, 2009).

Os inibidores de transcriptase reversa podem ser divididos em: inibidores nucleosídeos (INTRs), que são análogos de nucleosídeos e se ligam competitivamente ao sítio catalítico do nucleotídeo, e os não nucleosídicos (INNTRIs) que se ligam a um sítio alostérico, inibindo a enzima de forma não competitiva em relação ao substrato nucleotídeo.

Para os INTRs serem eficazes contra o HIV, eles precisam ser fosforilados por enzimas celulares para que possam ser convertidos em sua forma ativa (trifosfato) e, então, provocarem a interrupção da síntese do DNA viral. A eficiência desta conversão ao metabólito ativo na presença de enzimas catabólicas é importante em terapias antivirais (SARAFIANOS, 2009).

Os INTRs competem com os dNTPs endógenos pelo sítio catalítico da transcriptase reversa. Uma vez que um INTR é incorporado, ele interrompe o crescimento da cadeia no processo de transcrição viral, atuando no início do ciclo de replicação viral pela inibição da síntese de DNA pró-viral, antes da integração na célula hospedeira (CIHLAR, 2010).

Os análogos de nucleosídeos são uma classe de inibidores da TR de HIV-1 que tem demonstrado eficácia no tratamento e incluem zidovudina (AZT), estavudina (D4T) e didanosina (Figura 3). Infelizmente, o tratamento com os análogos de nucleosídeos, eventualmente, resulta no aparecimento de resistência no vírus HIV.

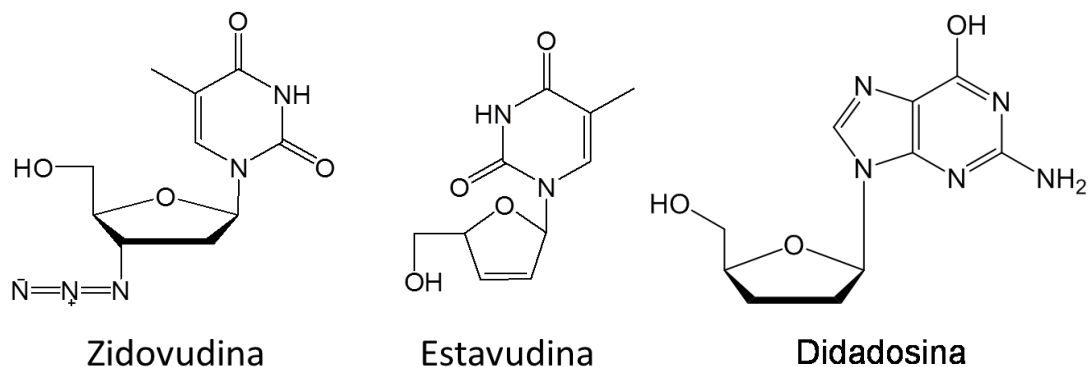


Figura 3. Estruturas de alguns inibidores de transcriptase reversa da classe dos análogos de nucleosídeos (NRTIs): zidovudina (AZT), estavudina (D4T) e didanosina (DDI).

Os inibidores de transcriptase reversa da classe dos análogos de nucleotídeos, NtRTIs, precisam de um menor número de etapas de fosforilação para se tornarem ativos quando comparados aos NRTIs. O seu diferencial é a presença de um grupo fosfonato resistente à hidrólise (BOZAL et al., 2011). Exemplos de fármacos desta classe são tenofovir e adefovir (Figura 4).

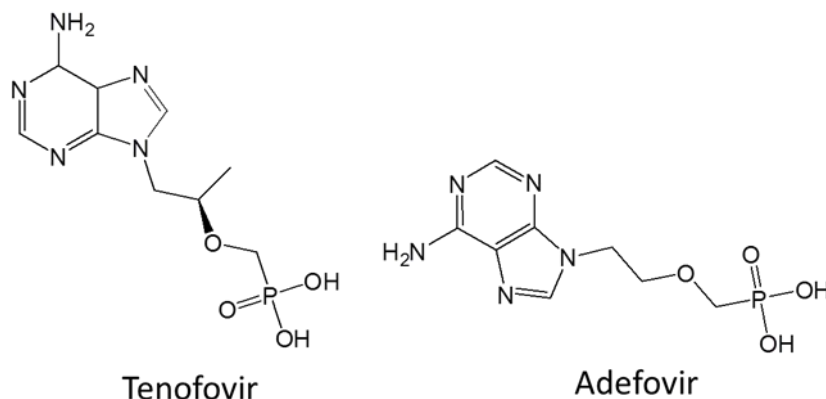


Figura 4. Estruturas de alguns inibidores de transcriptase reversa da classe dos análogos de nucleotídeos (NtRTIs): tenofovir e adefovir.

Os NNRTIs se ligam em um sítio alostérico, hidrofóbico, a uma distância de cerca de 10 Å do sítio catalítico. A interação entre o fármaco e a TR induz alterações conformacionais que afetam as atividades catalíticas da enzima. Este local de ligação localiza-se no domínio da “palma” da subunidade p66 da proteína (BÉTHUNE, 2010).

A ligação dos NNRTIs ao seu alvo leva a um reposicionamento da folha-β, localizada na subunidade p66, especialmente de dois resíduos de tirosina (Tyr-181 e Tyr-188), além dos três resíduos de ácido aspártico catalíticos (Asp-110, Asp-185 e Asp-186), o que inativa a TR (PEÇANHA, 2002). Quando ligados ao seu sítio, alguns inibidores desta classe apresentam uma conformação similar a de uma borboleta (*butterfly-like*) (MICELI, 2012).

Dentre as interações mais comuns observadas entre os NNRTIs e a enzima estão as interações hidrofóbicas que envolvem as cadeias laterais de cinco resíduos (Tyr181, Tyr188, Phe227, Trp229 e Tyr318), além das interações eletrostáticas (Lys101 e Lys103). Exemplos de fármacos desta classe são nevirapina, efavirenz e delavirdina (Figura 5).

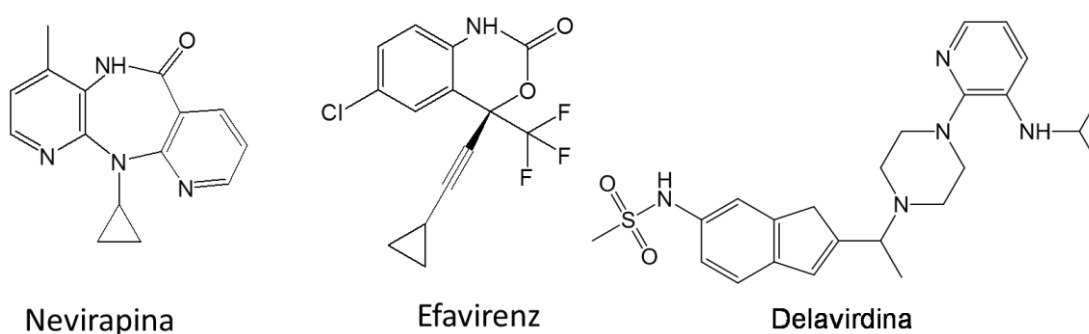


Figura 5. Estruturas de alguns inibidores de transcriptase reversa da classe dos não nucleosídeos Exemplos de (NNRTIs): nevirapina, efavirenz e delavirdina.

1.3. Desafios na terapia com antirretrovirais

Os primeiros antirretrovirais desenvolvidos (análogos de nucleosídeos, inibidores de transcriptase reversa), permitiram benefícios temporários, em razão da baixa eficácia na recuperação da capacidade imunológica e os efeitos limitados sobre a redução da carga viral. Com o advento de novas classes, como os inibidores de protease e os inibidores de transcriptase reversa não-nucleosídicos, foi possível alcançar, mediante a terapia antirretroviral combinada, êxitos significativos no tratamento de pessoas infectadas pelo HIV (ANDERSON, 2010).

A terapia antirretroviral altamente ativa (HAART) resultou em uma diminuição drástica da morbidade e mortalidade pelo HIV (SILICIANO et al., 2010). No entanto, existem importantes barreiras no sucesso do tratamento a médio e longo prazo. As principais dificuldades estão associadas com a toxicidade dos medicamentos, adesão do paciente ao tratamento e resistência viral (FALCI et al., 2006). Além disso uma série de alterações morfológicas (lipodistrofia) e metabólicas, como o aumento do colesterol total, dos triglicerídeos, do colesterol LDL e diminuição do colesterol HDL (SILVA et al., 2005).

A combinação de inibidores da protease com inibidores da transcriptase reversa, análogos e não análogos de nucleosídeos (NRTIs, NNRTIs) é capaz de promover a recuperação do sistema imune com o aumento sustentado da contagem de células T CD4+ e manutenção de níveis indetectáveis de carga viral do HIV (GOUGEON, 2003).

A eficácia dos antirretrovirais não depende apenas dos benefícios conferidos, mas também dos efeitos adversos associados, do nível de toxicidade dos medicamentos e da adesão dos pacientes ao esquema terapêutico. Muitos destes medicamentos apresentam reações adversas como náuseas, vômitos, anemia, fadiga, neutropenia e lipodistrofia, o que pode acarretar na redução da adesão ao tratamento (ANDERSON, 2010).

O elevado índice de replicação do HIV leva a uma alta taxa de mutação por ciclo. O tempo de meia vida das células infectadas é curto, o que promove a rápida infecção de novas células pelo HIV. A transcriptase reversa é a principal enzima em que ocorrem mutações, pois apresenta um erro por genoma, e não consegue atuar corrigindo os nucleotídeos incorporados erroneamente, permitindo o aparecimento de diversas cepas mutantes (CLAVEL, 2004).

Mutações podem surgir também por recombinação genômica, quando uma célula é infectada com dois vírus diferentes e os RNAs de ambos os vírus são encapsulados numa mesma partícula viral ao final do processo (SCHUPBACK, 2003).

Algumas mutações são capazes de diminuir a susceptibilidade do vírus ou provocar resistência a um ou mais fármacos. O uso de inibidores de transcriptase reversa da classe dos análogos de nucleosídeos levou rapidamente à seleção de variantes do vírus resistentes a esses fármacos. O desenvolvimento dos inibidores de transcriptase reversa da classe dos não-nucleosídicos e dos inibidores de protease ofereceu opções adicionais ao tratamento nos casos de resistência. Atualmente, as terapias combinadas, têm sido capazes de suprimir a replicação do HIV e reduzir a probabilidade de desenvolver resistência aos medicamentos (MARLI et al., 2010).

No entanto, após alguns anos desta terapia, a resistência aos fármacos surgiu como falha do tratamento. O número de pacientes com AIDS causada por cepas multirresistentes e a incidência de resistência primária aumentaram em muitas partes do mundo. Portanto, o desenvolvimento de novos fármacos é essencial para o controle da doença (SILICIANO et al., 2010).

A classe das 4-oxoquinolinas são quinolonas com atividades biológicas já descritas na literatura como agentes anti-bacterianos de largo espectro de atividade, por exemplo. As propriedades biológicas de muitas quinolonas como antivirais também têm sido estudadas atualmente (RISCADO, 2007).

Nos últimos anos, foi descoberta a fluorquinolona K-37 (II) que apresentou atividade anti-HIV, e cuja atividade está relacionada a inibição da enzima Tat (DE Souza, 2003). Santos e Colaboradores, 2009 realizaram a síntese, atividade anti-HIV e estudo de SAR de uma série de oxoquinolinas (III) com EC₅₀ entre 2,5 a 4,5 µM para aquelas com melhores valores de atividade.

Luo e Colaboradores, 2009 desenvolveram uma série de oxoquinolinas com atividade anti-HIV, com atuação na inibição da integrase. Dos doze compostos sintetizados, dois apresentaram quase 100% de inibição (IV).

Ahmed e Colaboradores, 2010 desenvolveram derivados de quinolina (V) com atividade anti-HIV que foram comparados com o AZT, sendo que o composto mais ativo da série apresentou um IC₅₀ de 2,35 µM, enquanto o AZT apresentou um valor de 1,04 µM e o índice de seletividade foi maior do que o do AZT.

O composto WM5 (VI) foi o mais potente inibidor da replicação do HIV descrito por Cecchetti, et al., 2000 com valor de EC₅₀ de 0,1 µM e CC₅₀ de 7 µM e índice de seletividade de 70. A partir deste composto Tabarrini et al., 2005 mostrou a atividade anti-HIV de uma série de oxoquinolinas (VII).

Faro e Colaboradores, 2009 desenvolveram uma série de doze compostos oxoquinolínicos com atividade anti-HIV, com a presença do grupo fosfonato em sua estrutura. Essa série foi testada em células infectadas e tratadas com diferentes concentrações, onde foi medido a atividade biológica (EC₅₀) e a citotoxicidade (VIII) (FARO ET AL, 2009).

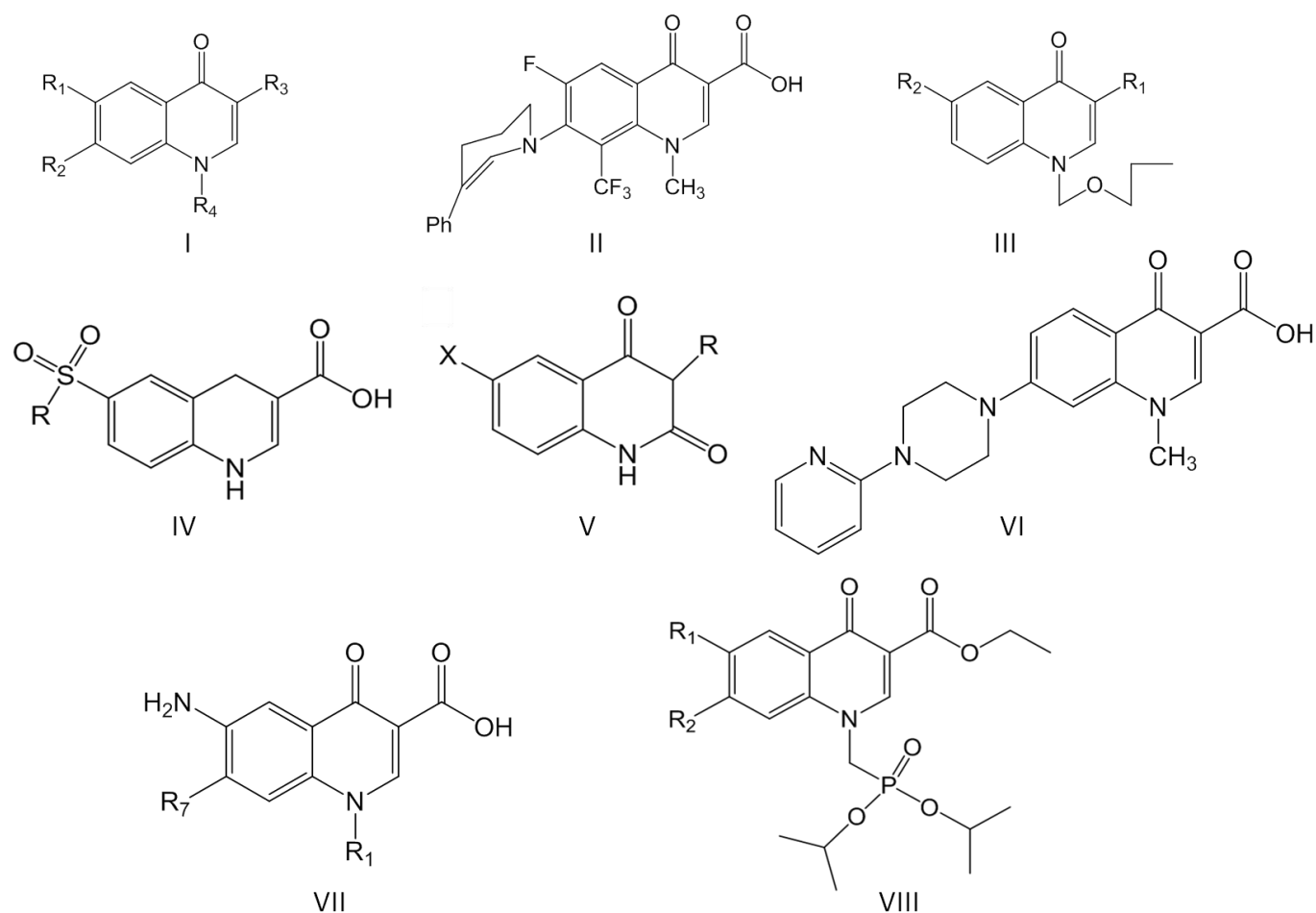


Figura 6. Estrutura de oxoquinolinas descritas na literatura com atividade anti-HIV.

1.4. Modelagem molecular no desenvolvimento de fármacos

A aplicação de técnicas computacionais tem sido bastante utilizada no planejamento de novos fármacos e surgiu como uma alternativa barata, onde é possível associar a velocidade e precisão. A modelagem molecular é uma metodologia que possibilita promover a otimização de compostos bioativos e consegue desenvolver algoritmos capazes de calcular uma estrutura molecular específica, além de prever certas propriedades físico-químicas em ambientes diferentes (SANTANA, 2009; CARVALHO, 2003).

O planejamento de fármacos auxiliado por computador (CADD, do inglês, *Computer-Aided Drug Design*) é uma ferramenta utilizada para auxiliar no processo de descoberta de fármacos. As estratégias utilizadas variam de acordo com a informação sobre o alvo (e.g., enzima ou receptor), podendo ser classificadas em método direto, *i.e.* planejamento de fármacos baseado na estrutura do alvo, e método indireto, *i.e.* planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante (TANG *et al.*, 2006).

O método direto considera a estrutura tridimensional do alvo (*i.e.* macromolécula), que pode ser obtida por métodos experimentais, como difração de raios-X de cristal e ressonância magnética nuclear, ou por métodos teóricos, como modelagem comparativa. No método direto podem ser analisados os possíveis sítios de ligação na macromolécula e os principais modos de interação entre o ligante e a proteína. Assim, podem ser realizadas modificações no ligante com o intuito de aumentar o grau de afinidade entre o ligante e a proteína. Um exemplo de método direto é a técnica de *docking* molecular (ACHARYA & LLOYD, 2005).

No método indireto, a estrutura tridimensional do alvo é desconhecida ou não é usada. Nesse caso, os dados de atividade biológica e as características estruturais e estereoquímicas de uma série de ligantes (ativos e inativos) podem ser utilizados para avaliar a influência na interação com a macromolécula-alvo. Um exemplo de método indireto é o estudo da relação estrutura-atividade que permite gerar um modelo que pode ser utilizado no processo de planejamento de novos fármacos (JORGENSEN, 2004).

Um dos fatores que torna ainda mais difícil a terapia anti-HIV é a alta incidência de efeitos colaterais causados pelos fármacos atualmente disponíveis. Isto proporciona uma grande necessidade de descoberta e desenvolvimento de novos e

eficientes fármacos que atuem sobre a transcriptase reversa (TR), sobre a protease (PR) e em outros pontos do ciclo de replicação viral (SOUZA, 2003; DE MELO, 2006). O grande desafio é descobrir possíveis alvos que efetivamente interrompam o ciclo do vírus, sem causar dano à célula normal. Estes procedimentos envolvem o uso de modelagem molecular. Estas e outras técnicas computacionais têm sido utilizadas por diversos grupos para pesquisar os vários aspectos necessários para desenvolvimento de inibidores da HIV (DE MELO, 2006).

1.4.1. Estudo da relação estrutura-atividade

As propriedades físico-químicas, assim como a atividade biológica de compostos orgânicos dependem de suas estruturas moleculares. Com o objetivo de se estabelecer uma relação entre a estrutura química e a atividade biológica, podem ser usados métodos computacionais (HANSCH et al., 1990).

O estudo da relação estrutura-atividade procura estudar compostos utilizando a correlação entre estrutura e atividade, e assim é possível selecionar os compostos mais promissores. Pode-se dizer que esses estudos são considerados ótimas ferramentas para acelerar e obter êxito no processo de desenvolvimento de novos fármacos. Para obter uma correlação significativa, é crucial que descritores apropriados sejam empregados, quer sejam teóricos, empíricos ou derivados de dados experimentais (ARROIO, 2010).

Para estudos da relação estrutura-atividade podem ser utilizados descritores quânticos calculados por métodos *ab initio*, semi-empírico, funcional de densidade, entre outros (ROSSETI, 2006; REBOREDO, 2012). Os descritores quânticos podem ser representados pelas energias de HOMO, LUMO, densidades eletrônicas e mapas de potencial eletrostático. As energias do orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO, do inglês, *Highest Occupied Molecular Orbital*) e do orbital molecular desocupado de menor energia (LUMO, do inglês, *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) possuem um papel fundamental na determinação da reatividade dos compostos e das suas bandas eletrônicas. A energia de HOMO é diretamente relacionada ao potencial de ionização. Esse potencial caracteriza a susceptibilidade da molécula ao ataque de eletrófilos. A energia do LUMO é relacionada à afinidade eletrônica e caracteriza a suscetibilidade ao ataque por nucleófilos (ALBUQUERQUE, 2008).

As densidades eletrônicas nos orbitais de fronteira mostram uma possível interação entre doadores e receptores de elétrons. A maioria das reações químicas ocorre no local de maior densidade eletrônica nos orbitais de fronteira, sendo que a densidade de HOMO representa áreas susceptíveis a ataques eletrofílicos, enquanto a densidade de LUMO representa as áreas mais susceptíveis a ataques nucleofílicos (SOUZA, 2007).

O mapa de potencial eletrostático molecular, geralmente calculado pela interação de um átomo de prova com carga unitária positiva sobre a superfície da molécula, mostra a localização dos potenciais eletrostáticos na molécula. A região de repulsão, potencial positivo, é geralmente representada em cor azul, e a região de atração, potencial negativo, é geralmente representada em cor vermelha. (SOUZA, 2007)

1.4.2. Docking molecular

A modelagem molecular permite a visualização tridimensional do complexo fármaco-receptor e fornece informações sobre os requisitos estruturais essenciais que permitem uma interação adequada do fármaco no seu sítio receptor (RODRIGUES, 2001).

Neste sentido, o *docking* molecular é um método de ajuste ou docking molecular que permite explorar o modo de interação dos compostos nos sítios de ligação (ASSUMÇÃO, 2006). Num processo de reconhecimento molecular ambos, enzima e inibidor, sofrem mudanças conformacionais e há ocorrência simultânea de grande número de interações entre eles (REBOREDO, 2012).

Os métodos de *docking*, em geral, envolvem uma função de energia contendo parâmetros eletrostáticos, de van der Waals, de ligação hidrogênio e, algumas vezes, hidrofóbicas, os quais geram modelos matemáticos que predizem as melhores orientações de um ligante, segundo um *score* de energia (ANDRADE, 2012; ALMEIDA, 2011). Esse *score* permite pontuar e ordenar as várias poses do complexo ligante-receptor, enquanto que a afinidade de um ligante em relação a um receptor pode ser estimada pela energia livre de ligação de Gibbs (ALMEIDA, 2011).

1.4.3. Predição de propriedades farmacocinéticas e de toxicidade *in silico*

A principal forma de administração de um fármaco é pela via oral e, após a administração, devem ocorrer as etapas de dissolução, solubilização e, finalmente, absorção do fármaco (LI, 2001).

A absorção de um fármaco ocorre por dois mecanismos: o transcelular, onde o fármaco sofre difusão passiva através das membranas, devido à diferença de concentração, e o transporte ativo, que requer gasto de energia, seja mediado por proteínas transportadoras ou carreadores. Após serem absorvidos, os fármacos alcançam a circulação sistêmica e são rapidamente distribuídos (MODA, 2007).

Ao alcançarem a via sistêmica, os fármacos podem se ligar em diferentes proporções às proteínas plasmáticas, que possuem papel central no transporte de fármacos, afetando sua distribuição, excreção e seus efeitos farmacológicos (MODA, 2007). As etapas de metabolização e de excreção de um fármaco dependem da entrada do mesmo nos órgãos ou sistemas alvo (THOMAS, 2003).

A metabolização é um processo no qual os fármacos são quimicamente transformados em metabólitos, geralmente, mais solúveis em água do que o fármaco original, facilitando o processo de excreção. A metabolização ocorre em duas fases.

A fase I inclui reações de oxidação, redução e hidrólise catalisadas por diferentes enzimas. Existem 57 isoformas de CYPs responsáveis pela maioria das reações de oxidação de mais de 90% dos fármacos. Dentre as principais CYPs estão CYP3A4, CYP2D6 e CYP2C9, sendo CYP3A4, a forma mais abundante no fígado e responsável pelo metabolismo de aproximadamente 50% dos fármacos (LI, 2001).

Na fase II, um grupo funcional do fármaco original ou do metabólito da fase I é conjugado com um grupo polar como ácido glicurônico, sulfato, glutatona ou acetato. Esses conjugados polares são excretados, principalmente, na urina ou nas fezes (GOODMAN & GILMAN'S, 2010).

Desde a absorção de um fármaco até a sua excreção, alguns fatores podem influenciar na sua chegada ao alvo específico. Dentre elas estão a solubilidade em água, a ligação às proteínas plasmáticas e a penetração na barreira hematoencefálica. Em geral, uma baixa solubilidade em água está relacionada a uma alta lipofilicidade.

A lipofilicidade pode ser expressa pela medida do coeficiente de partição óleo/água (LogP, partição entre uma fase orgânica e uma fase aquosa) que representa a passagem do meio extracelular para o meio intracelular através da bicamada lipídica (VAN DE WATERBEEND, 2001).

A biodisponibilidade de um fármaco administrado por via oral está relacionada à sua absorção e um dos filtros usados para estimar esta propriedade foi proposto por Lipinski e colaboradores (Lipinski et al., 2001), sendo conhecida como “Regras-Cinco” de Lipinski.

De acordo com esta regra, uma boa absorção e permeação é mais comum quando o número de grupos aceptores de ligação hidrogênio é menor ou igual a 10, o número de grupos doadores de ligação hidrogênio é menor ou igual a 5, o peso molecular é menor ou igual a 500 Da e o LogP é menor ou igual a 5 (LIPINSKI et al., 2001).

Um número excessivo de grupos doadores e aceptores de ligação hidrogênio, assim como um alto peso molecular dificultam a permeabilidade através da bicamada da membrana enquanto uma lipofilicidade elevada reduz a absorção.

A toxicidade é um dos principais desafios no desenvolvimento de fármacos, uma vez que um número significativo de moléculas candidatas é reprovado em ensaios clínicos (VAN DE WATERBEEMD & GIFFORD, 2003). Muitas vezes, o próprio metabólito pode potencializar o efeito do fármaco ou ser mais tóxico do que o composto original (LI, A.P., 2001).

2. JUSTIFICATIVA

Estima-se que mais de 50 milhões de indivíduos estejam infectados pelo HIV em todo o mundo. O grau de morbidade e mortalidade causados pelo HIV e o impacto global da infecção sobre a economia e sobre os recursos no atendimento aos portadores do vírus são enormes e continuam crescendo.

O advento da terapia antirretroviral altamente ativa tem influenciado profundamente o curso das infecções por HIV no mundo, reduzindo o índice de mortalidade em mais de 80%, desde a sua introdução em meados da década de 1990 (Gallo & Montagnier, 2002). Entretanto, a resistência viral à terapia anti-HIV faz com que seja necessária a busca por novos antivirais e, com isso, tem se incentivado o desenvolvimento de inibidores de protease, transcriptase reversa e integrase, além de fármacos que atuem em outras etapas do processo de replicação viral.

A modelagem molecular fornece informações importantes para o processo de descoberta de fármacos e permite a obtenção de propriedades específicas de uma molécula que podem influenciar na interação com a macromolécula alvo. Os estudos de modelagem molecular podem propiciar a obtenção de novos inibidores de HIV mais potentes e se mostram uma ferramenta importante no planejamento de novos fármacos (RODRIGUES, 2001).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é avaliar a relação estrutura-atividade de 12 derivados de oxoquinolinas fosforados com atividade antiviral, avaliar o possível modo de ligação e interações com a transcriptase reversa do HIV e analisar as propriedades farmacocinéticas e toxicológicas *in silico*.

3.2. Objetivos específicos

Analisar as propriedades estereoelétrônicas de 12 derivados oxoquinolinas fosforados e correlacionar com a atividade anti-HIV já descrita.

Avaliar o modo de ligação e interação dos derivados mais e menos ativos na transcriptase reversa do HIV para correlacionar com a atividade biológica e estabelecer uma comparação com a nevirapina.

Avaliar o perfil farmacocinético *in silico* dos derivados pela análise dos parâmetros: solubilidade em água (LogS), coeficiente de partição octanol/água (LogP), absorção intestinal humana, biodisponibilidade oral e ligação às proteínas plasmáticas.

Analisar o perfil toxicológico *in silico* dos derivados com relação aos riscos tumorigênicos, mutagênicos, irritantes e reprodutivos, toxicidade aguda em roedores por exposição oral (LD₅₀) e probabilidade de apresentar carcinogênese e mutagenicidade em ensaio de reversão da mutação bacteriana (AMES).

Realizar a predição dos sítios de metabolização no composto mais ativo (**3g**) e predição da CYP envolvida nesta reação, além de avaliar o possível modo de ligação do metabólito predito na TR.

4. METODOLOGIA

4.1. Avaliação da relação estrutura-atividade

O estudo da relação estrutura-atividade (SAR) de 12 derivados oxoquinolinas fosforados foi realizado para avaliar as características estereoelétricas relacionadas com a atividade contra HIV-1. As substâncias foram sintetizadas pelo grupo da Prof^a Maria Cecília Souza do Instituto de Química Orgânica da Universidade Federal Fluminense (UFF) e testadas quanto à atividade anti-HIV pelo grupo da Prof^a Izabel Paixão do Instituto de Biologia da UFF (FARO et al, 2012).

Inicialmente, a estrutura 3D foi construída e os compostos foram submetidos a uma análise conformacional e otimização de geometria no programa SPARTAN'04 (Spartan'04 WaveFunction, 2004) a por método de mecânica molecular, usando o campo de força MMFF94. O conformero mais estável de cada composto foi submetido a uma nova otimização da geometria por método quântico semi-empírico, usando o Hamiltoniano AM1, disponível no mesmo programa.

Em seguida, foram realizados cálculos *ab initio* (*single point*) em que se calculam os parâmetros eletrônicos de um arranjo único dos átomos, usando o método DFT, B3LYP e a base 6-31G* para obter os seguintes descritores: volume molecular, área de superfície molecular, peso molecular, momento de dipolo, energia do orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO) e energia do orbital molecular desocupado de menor energia (LUMO). Além disso, foram calculados os mapas de potencial eletrostático molecular numa superfície na faixa de -20 a +30 kcal/mol e de distribuição dos orbitais e de densidade de HOMO e LUMO de cada composto.

4.2. Avaliação das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas *in silico*

Foi utilizado o programa Osiris Property Explorer (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>) (SANDER THOMAS, 2014) para o cálculo teórico da solubilidade em água (LogS), coeficiente de partição octanol/água (cLogP) e risco tóxico (mutagênico, tumorigênico, irritante e reprodutivo). Além da análise da biodisponibilidade oral segundo a Regra-dos-Cinco de Lipinski (LIPINSKI, 2001) que

define um conjunto de parâmetros capazes de identificar compostos administrados por via oral com problemas de absorção e permeabilidade.

As propriedades farmacocinéticas de absorção intestinal humana, biodisponibilidade oral e ligação às proteínas plasmáticas foram preditas por modelos de Holograma QSAR (HQSAR, do inglês, *hologram quantitative structure-activity relationship*) usando o servidor PK/DB (*Database for Pharmacokinetic Properties*) (<http://miro.ifsc.usp.br/pkdb/>) (MODA et al., 2008).

Além disso, a toxicidade dos derivados foi avaliada como toxicidade aguda de compostos químicos em roedores por exposição oral expressa em LD₅₀, probabilidade de apresentar mutagenicidade em ensaio de reversão da mutação bacteriana (AMES) e carcinogênese, foram feitos no programa AdmetSAR (<http://www.admetexp.org/predict/>) (Cheng, 2012).

Finalmente, foi realizada a análise dos prováveis sítios de metabolização para o composto mais ativo no programa MetaPrint2D-React (<http://www-metaprint2d.ch.cam.ac.uk>) e foi realizada a predição da enzima CYP envolvida na metabolização usando o programa AdmetSAR (Cheng, 2012).

4.3. Docking molecular de derivados 4-oxoquinolinas fosforados na TR do HIV

O *docking* dos derivados de 4-oxoquinolinas foi realizado na transcriptase reversa do HIV usando o programa Autodock 4.2 e Autodock Tools 1.5.4 (MORRIS, 2009).

Inicialmente, foi realizado o *redocking* de um ligante co-cristalizado com a TR do HIV, a nevirapina, no sítio de ligação da transcriptase reversa, para validação do método sendo utilizada a estrutura cristalográfica da transcriptase reversa, depositada no banco de dados de proteína sob o código PDB 3QIP.

Nessa validação o ligante é extraído da sua estrutura cristalográfica original e colocado novamente no seu sítio de ligação. A confiabilidade dos resultados de *docking* depende da similaridade entre a pose do ligante na estrutura cristalográfica e aquela obtida a partir do *redocking*.

Em seguida, foi realizado o *docking* das moléculas mais ativa e menos ativa da série de 4-oxoquinolinas fosforadas na TR, as estruturas dos ligantes obtidas no Spartan 04 foram exportadas para o programa Autodock 4.2 e estrutura 3D da TR

(código PDB: 3QIP) também foi exportada para o programa e cargas atômicas parciais *Gasteiger* foram adicionadas.

Para o cálculo do grid, foram usadas as dimensões [caixa] de 60x56x50 Å pontos e o espaçamento de 0,375 Å, sendo o centro posicionado no nitrogênio do anel pirimidínico da nevirapina que corresponde a seguinte localização nos eixos x, y e z (X= 10,998; Y= 13,983; Z= 17,767 Å).

Foi realizado o *docking* usando o método em que a proteína foi mantida rígida e outro em que alguns resíduos do sítio foram mantidos flexíveis (Leu100, Lys101, Lys103, Tyr181, Tyr188 e Leu234), estes resíduos foram selecionados por fazerem parte do sítio ativo da proteína e por serem resíduos que apresentaram flexibilidade comparando outras estruturas da TR disponíveis no PDB complexadas com diferentes ligantes. O *docking* molecular foi realizado utilizando o algoritmo genético Lamarckiano e um número de 50 poses foram solicitadas (HUEY et al., 2007)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

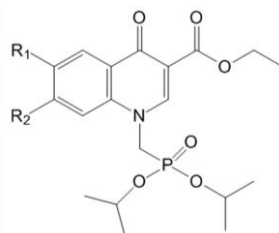
5.1. Análise da relação estrutura-atividade

Neste estudo, foram utilizadas abordagens de modelagem molecular para realizar uma análise da relação estrutura-atividade de 12 derivados de oxoquinolinas com atividade anti-HIV. Os derivados sintéticos apresentam diferentes substituintes nos átomos de carbono 6 e carbono 7 do anel quinolina, os compostos **3f** e **3g** com o flúor como substituinte foram os que apresentaram um melhor perfil de atividade biológica ($EC_{50} = 0,4$ e $0,2 \mu\text{M}$, respectivamente) da série (Faro et al., 2012), podendo estar relacionado ao menor volume deste substituinte e maior eletronegatividade, sendo que a atividade não dependeu da sua posição no anel (Tabela 1).

O cálculo das propriedades estereoeletrônicas foi realizado para avaliar uma possível correlação com a atividade biológica (Tabela 1). Os descritores estereoeletrônicos calculados foram energia de HOMO e LUMO (E_{HOMO} e E_{LUMO}), momento de dipolo molecular (μ), massa molecular (MM), área da superfície molecular (ASM), número de grupos aceptores (nON) e doadores (nOHNH) de ligação hidrogênio, coeficiente de partição octanol/água (cLogP), número de átomos (nA), número de ligações rotacionáveis (nrot), volume molecular (VM) e área de superfície polar topológica (TPSA)

Os descritores que se mostraram mais correlacionados com os valores de EC_{50} foram massa molecular, volume e área, sendo que os compostos mais ativos tiveram menores volumes, área e massa molecular.

Tabela 1. Descritores estereoeletrônicos calculados para os derivados oxoquinolinas relacionados com a atividade biológica (EC_{50}): energia HOMO/LUMO (E_{HOMO} e E_{LUMO}), momento dipolo molecular (μ), massa molecular (MM), área superficial molecular (ASM), número de grupos aceptores (nON) e doadores (nOHNH) de ligação hidrogênio, coeficiente de partição octanol/água (cLogP), solubilidade (Log S), número de átomos (nA), número de ligações rotacionáveis (nrot), volume molecular (VM), área de superfície polar topológica (TPSA). S é a solubilidade em água à temperatura de 20-25°C em mol/L.



| | R ₁ | R ₂ | EC ₅₀ | E _{HOMO} | E _{LUMO} | MM | VM | ASM | μ | cLogP | LogS | TPSA | nA | nON | nOHNH | nrot |
|-----------|-----------------|-----------------|------------------|-------------------|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|-----|-------|------|
| 3a | H | H | 7,3 | -6,2 | 1,6 | 395,4 | 396,7 | 432,1 | 4,9 | 2,01 | -4,88 | 91,95 | 27 | 7 | 0 | 9 |
| 3b | Cl | - | 8,1 | -6,3 | -1,8 | 429,8 | 409,9 | 447,1 | 5,6 | 2,62 | -5,62 | 91,95 | 28 | 7 | 0 | 9 |
| 3c | - | Cl | 21 | -6,4 | -1,7 | 429,8 | 409,9 | 447,4 | 4,2 | 2,62 | -5,62 | 91,95 | 28 | 7 | 0 | 9 |
| 3d | Br | - | 56 | -6,3 | -1,8 | 474,3 | 414,6 | 451,9 | 5,7 | 2,74 | -5,72 | 91,95 | 28 | 7 | 0 | 9 |
| 3e | - | Br | 61,2 | -6,4 | -1,8 | 474,3 | 414,6 | 452,2 | 4,2 | 2,74 | -5,72 | 91,95 | 28 | 7 | 0 | 9 |
| 3f | F | - | 0,4 | -6,3 | -1,7 | 413,4 | 401,6 | 438,1 | 5,5 | 2,11 | -5,2 | 91,95 | 28 | 7 | 0 | 9 |
| 3g | - | F | 0,2 | -6,4 | -1,7 | 413,4 | 401,6 | 438,2 | 4,3 | 2,11 | -5,2 | 91,95 | 28 | 7 | 0 | 9 |
| 3h | CH ₃ | - | 21,3 | -6,1 | -1,5 | 409,4 | 414,9 | 452 | 4,9 | 2,35 | -5,23 | 91,95 | 28 | 7 | 0 | 9 |
| 3i | - | CH ₃ | 9 | -6,2 | -1,5 | 409,4 | 414,9 | 451,8 | 5,2 | 2,35 | -5,23 | 91,95 | 28 | 7 | 0 | 9 |
| 3j | NO ₂ | - | 38 | -6,7 | -2,4 | 440,4 | 418,4 | 458,2 | 8,1 | 1,09 | -5,34 | 137,7 | 30 | 10 | 0 | 10 |
| 3k | - | NO ₂ | 22 | -6,7 | -2,6 | 440,4 | 418,4 | 458,0 | 4,5 | 1,09 | -5,34 | 137,7 | 30 | 10 | 0 | 10 |
| 3l | NH ₂ | - | 16 | -5,5 | -1,4 | 440,4 | 407,2 | 443,1 | 6,5 | 1,33 | -4,96 | 117,9 | 28 | 8 | 2 | 9 |

A análise do mapa de potencial eletrostático molecular mostrou que os compostos mais ativos, **3f** ($R_1=F$) e **3g** ($R_2=F$), apresentaram regiões negativas, relacionadas ao átomo de flúor que tem efeito indutivo de retirar elétrons do anel, quando comparados com **3a** ($R_1=R_2=H$), **3h** ($R_1=CH_3$), **3i** ($R_2=CH_3$) e **3l** ($R_1=NH_2$) que tem grupos doadores de elétrons (exceto **3a**) por efeito indutivo (grupo metila) ou de ressonância (grupo amino) aumentam a densidade eletrônica do anel oxoquinolínico.

Por outro lado, uma densidade de elétrons muito alta do substituinte, como no caso de **3j** ($R_1=NO_2$) e **3k** ($R_2=NO_2$) onde o grupo nitro apresenta um forte efeito indutivo e de ressonância de retirar elétrons, não favoreceu a atividade biológica. É possível observar que o volume menor do flúor também influenciou a atividade biológica (Figura 7).

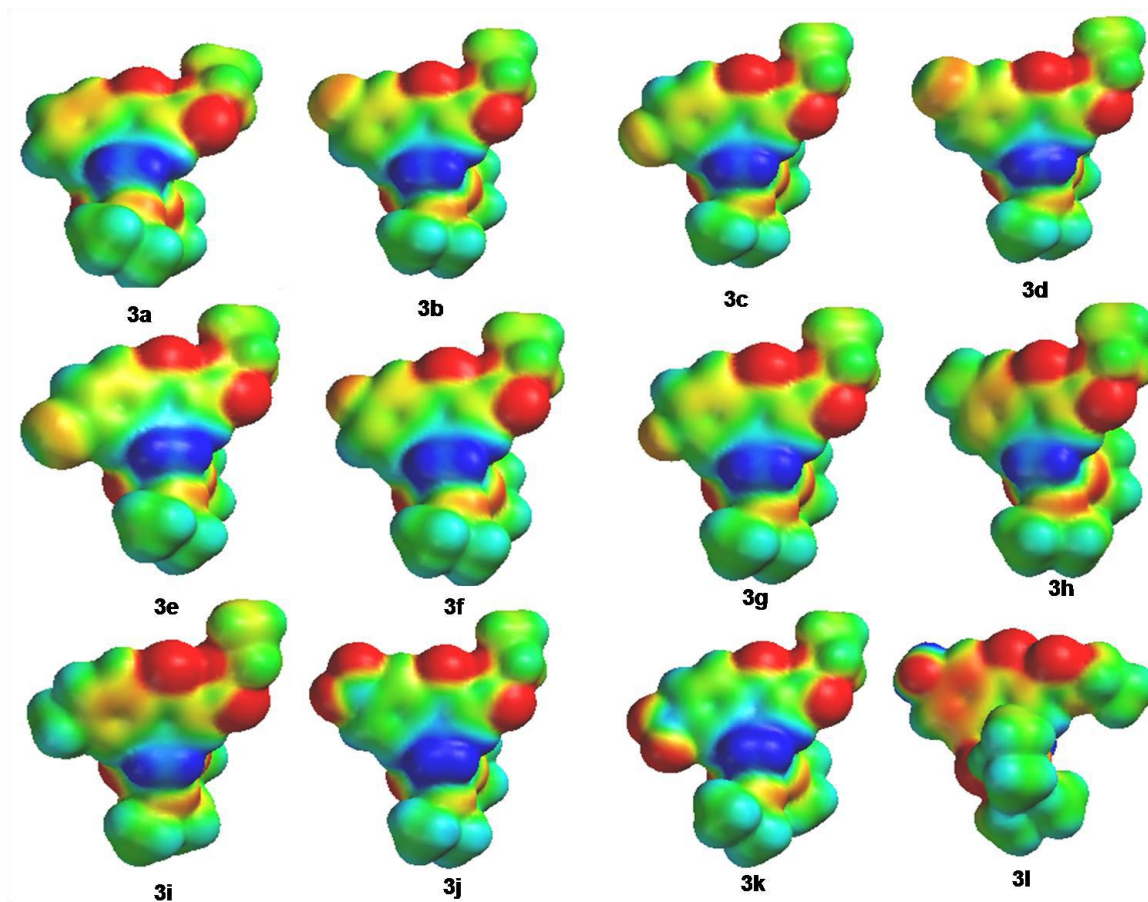


Figura 7. Mapa de potencial eletrostático dos derivados oxoquinolínicos fosforados. Faixa: -20 a +30 KJ

Quando se compara a carga eletrostática do átomo de carbono 7 ($qC7$, Tabela 4) nos derivados substituídos nesta posição, foi observado que um dos

compostos mais potentes, contendo o substituinte flúor (**3g**), apresentou o maior valor positivo, indicando maior deficiência de elétrons. Este fato reforça a importância do grupo flúor eletronegativo (Tabela 2).

Tabela 2. Carga eletrostática (q, e) dos átomos C6 e C7 ligados aos substituintes R₁ e R₂, respectivamente, nos derivados oxoquinolinas.

| Composto | R ₁ | R ₂ | qC6 (e) | qC7 (e) |
|-----------|-----------------|-----------------|---------|---------|
| 3a | H | H | +0,364 | -0,209 |
| 3b | Cl | H | +0,147 | - |
| 3c | H | Cl | - | +0,228 |
| 3d | Br | H | +0,090 | - |
| 3e | H | Br | - | -0,004 |
| 3f | F | H | +0,342 | - |
| 3g | H | F | - | +0,435 |
| 3h | CH ₃ | H | -0,085 | - |
| 3i | H | CH ₃ | - | -0,005 |
| 3j | NO ₂ | H | -0,145 | - |
| 3k | H | NO ₂ | - | -0,261 |
| 3l | NH ₂ | H | -0,367 | - |

Os compostos que tem substituintes doadores de elétrons, como metila (**3h** e **3i**) e amino (**3l**) vão doar elétrons para o anel mantendo uma densidade eletrônica no anel oxoquinolínico. Já os grupos aceptores de elétrons como cloro, bromo e flúor são grupos desativadores fracos, por serem mais eletronegativos do que o carbono exercem um efeito indutivo retirador de elétrons e reduzem a densidade eletrônica no anel.

5.2. Análise do perfil farmacocinético e de toxicidade *in silico*

Foi realizada uma análise preditiva das propriedades farmacocinéticas dos 12 derivados oxoquinolinas e da zidovudina (AZT), como fármaco de referência, na base de dados PK/DB usando modelos *in silico* para avaliação da absorção intestinal humana, biodisponibilidade oral e ligação às proteínas plasmáticas.

Em relação a absorção intestinal humana, observou-se que a absorção intestinal foi alta para os 12 compostos e similar ao AZT, principalmente para o derivado **3f**, um dos mais ativos desta série (Tabela 3).

Em relação à biodisponibilidade oral, os fármacos são classificados em três grupos (aqueles com baixa biodisponibilidade apresentam valores $\leq 40\%$, média = 41-80% e alta $> 80\%$) (MODA et al., 2007). Todos os derivados de oxoquinolinas fosforados apresentaram uma biodisponibilidade média assim como o AZT.

A literatura mostra que a zidovudina é bem absorvida em nível intestinal, tendo apresentado biodisponibilidade de 60-70% para todas as doses estudadas (GOODMAN & GILMANS, 2009), o que foi correspondente ao predito no programa.

A análise da Regra-dos-Cinco de Lipinski também foi realizada e define um conjunto de parâmetros capazes de identificar compostos com problemas de absorção e permeabilidade. De acordo com esta regra, uma boa absorção e permeação é mais comum quando o número de grupos aceptores de ligação hidrogênio é menor ou igual a 10, o número de grupos doadores de ligação hidrogênio é menor ou igual a 5, a massa molecular é menor ou igual a 500 Da e o LogP é menor ou igual a 5 (Lipinski *et al.*, 2001). A análise dos parâmetros ADME mostrou que os compostos obedeceram à regra de Lipinski, indicando uma boa biodisponibilidade oral.

Tabela 3. Valores das propriedades farmacocinéticas obtidas *in silico* para os derivados de oxoquinolinas fosforados e AZT (zidovudina): absorção intestinal humana (HIA), biodisponibilidade oral (F), ligação às proteínas plasmáticas (PPB). Os valores de HIA, F e PPB são fornecidos em percentagem da dose administrada de um composto.

| Compound | R ₁ | R ₂ | HIA (%) | F (%) | PPB (%) |
|------------|-----------------|-----------------|---------|-------|---------|
| 3a | H | H | 83,54 | 70,00 | 49,79 |
| 3b | Cl | H | 89,06 | 64,07 | 63,81 |
| 3c | H | Cl | 86,31 | 70,52 | 63,46 |
| 3d | Br | H | 87,40 | 56,65 | 50,71 |
| 3e | H | Br | 82,60 | 60,35 | 49,87 |
| 3f | F | H | 88,73 | 78,98 | 44,23 |
| 3g | H | F | 84,61 | 67,91 | 45,55 |
| 3h | CH ₃ | H | 83,48 | 64,43 | 55,79 |
| 3i | H | CH ₃ | 83,01 | 67,14 | 56,18 |
| 3j | NO ₂ | H | 77,79 | 71,37 | 53,00 |
| 3k | H | NO ₂ | 77,96 | 65,74 | 52,67 |
| 3l | NH ₂ | H | 76,08 | 69,79 | 52,89 |
| AZT | | | 87,43 | 67,74 | 42,67 |

Quando se trata de ligação às proteínas plasmáticas, os compostos apresentam valores entre 44,23 e 63,81%, o que pode diminuir a intensidade máxima de ação do fármaco, por diminuir a concentração máxima atingida no receptor, alterando, assim, sua resposta clínica, o que deve ser considerado na dose administrada do fármaco. Dados da literatura mostram que no caso do AZT, após ser absorvido cerca de 30-38% se liga às proteínas plasmáticas, onde sua passagem para as células ocorre por difusão passiva devido a sua lipofilicidade (DrugBank, 2014). A análise preditiva também mostrou valores de ligação às proteínas plasmáticas estão próximos ao valor experimental no caso do AZT.

Foi realizada uma análise preditiva das propriedades toxicológicas dos 12 derivados oxoquinolinas e dos fármacos zidovudina e nevirapina como referência na base de dados AdmetSAR, considerando as seguintes propriedades: carcinogênese, toxicidade aguda em roedores por exposição oral (LD₅₀) e mutagenicidade em ensaio de reversão da mutação bacteriana (Ames) (Tabela 4).

Tabela 4. Valores das propriedades toxicológicas *in silico* para os derivados 4-oxoquinolinas fosforadas: carcinogênese (Carc), toxicidade aguda em roedores por exposição oral (LD₅₀), probabilidade de mutagenicidade em ensaio de reversão da mutação bacteriana (AMES), risco mutagênico (RM), risco tumorigênico (RT), efeito irritante (EI) e risco reprodutivo (RR), Probabilidade de não ser mutagênico ou carcinogênico (-).

| # | Carc | LD ₅₀ | AMES | RM | RT | EI | RR |
|------------|----------|------------------|----------|-------|-------|-------|-------|
| 3a | 0,75 (-) | 3,35 | 0,53 (-) | Baixo | Baixo | Baixo | Baixo |
| 3b | 0,70 (-) | 3,11 | 0,63 (-) | Baixo | Baixo | Baixo | Baixo |
| 3c | 0,70 (-) | 3,11 | 0,63 (-) | Baixo | Baixo | Baixo | Baixo |
| 3d | 0,74 (-) | 3,12 | 0,61 (-) | Baixo | Baixo | Baixo | Baixo |
| 3e | 0,74 (-) | 3,12 | 0,61 (-) | Baixo | Baixo | Baixo | Baixo |
| 3f | 0,73 (-) | 3,10 | 0,60 (-) | Baixo | Baixo | Baixo | Baixo |
| 3g | 0,73 (-) | 3,10 | 0,60 (-) | Baixo | Baixo | Baixo | Baixo |
| 3h | 0,75 (-) | 3,35 | 0,53 (-) | Baixo | Baixo | Baixo | Baixo |
| 3i | 0,75 (-) | 3,35 | 0,53 (-) | Baixo | Baixo | Baixo | Baixo |
| 3j | 0,56 (-) | 2,76 | 0,45 (-) | Baixo | Baixo | Baixo | Baixo |
| 3k | 0,56 (-) | 2,76 | 0,45 (-) | Baixo | Baixo | Baixo | Baixo |
| 3l | 0,72 (-) | 2,94 | 0,50 (-) | Alto | Alto | Alto | Baixo |
| NVP | 0,93 (-) | 2,67 | 0,59 (-) | Baixo | Baixo | Baixo | Baixo |
| AZT | 0,74 (-) | 2,04 | 0,91 (-) | Baixo | Baixo | Baixo | Baixo |

A análise dos riscos de toxicidade dos derivados oxoquinolinas mostrou que apenas o derivado **3l** (R₂=NH₂) apresentou alto risco mutagênico, tumorigênico e irritante, o que está relacionado ao substituinte amino na posição C6 do anel oxoquinolina, mas não é possível avaliar se a presença deste grupo em outra posição do anel tem influência nos riscos de toxicidade, visto que só existe este derivado contendo este substituinte.

Os derivados **3j** (R₁=NO₂), **3k** (R₂=NO₂) e **3l** (R₁=NH₂) apresentaram a probabilidade de apresentar mutagenicidade no ensaio de reversão da mutação bacteriana (AMES), que funciona como um sistema de alerta precoce para carcinogenicidade e/ou teratogenicidade em potencial (HANSEN,2009). Esses três compostos têm um átomo de nitrogênio no substituinte R₁ ou R₂, sendo que **3j** e **3k** apresentam um grupo nitro e **3l** uma amina.

Na análise de carcinogênese, os valores observados para os derivados 4-oxoquinolinas fosforados se encontraram bem próximos ao do AZT, apenas **3j** e **3k** mostraram menor probabilidade de não serem mutagênicos.

Os compostos apresentaram valores de LD₅₀ superiores aos do AZT e nevirapina, ou seja, precisam de uma dose superior para causar um dano letal *in vivo*, segundo a predição do programa.

Além disso, foi realizado um estudo de prováveis sítios de metabolização do derivado mais ativo (**3g**) no programa MetaPrint2D-React, que indica os átomos na molécula que são mais frequentemente relatados como sítios de metabolização num banco de dados metabólitos.

Foi predito que este derivado pode sofrer uma reação de O-desalquilação, seguida de uma reação de hidrólise, formando o metabólito correspondente (Figura 8). Assim, caso este derivado seja metabolizado, há uma probabilidade entre 66% e 100% de ocorrer esta reação.

A reação de O-desalquilação é uma reação de fase 1 e depende de enzimas citocromo P450. No programa AdmetSAR, foi realizada a predição da enzima CYP envolvida nesta reação de metabolização, sendo que a CYP que apresentou maior probabilidade de ser responsável pela reação foi a CYP3A4 com 63%.

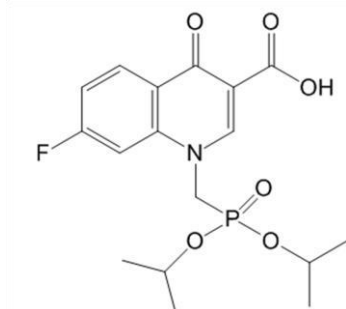


Figura 8. Metabólito predito por reação de O-desalquilação para o derivado mais ativo

Estudos *in vivo* em humanos e estudos *in vitro* com microssomas hepáticos humanos demonstraram que a nevirapina também sofre extensa biotransformação via CYP3A4 (DrugBank, 2014).

Levando em consideração este metabólito formado, com a presença de um ácido carboxílico em sua estrutura e comparando com moléculas já descritas na literatura, este se parece estruturalmente com as fluorquinolonas, agentes antimicrobianos que atuam inibindo a topoisomerase II como ciprofloxacino que são fármacos de amplo espectro microbiano, que apresentam pouca ligação a proteínas plasmáticas e alta distribuição no

organismo e o grupo ácido carboxílico é de grande importância para a sua atividade biológica.

5.3. *Docking* molecular de oxoquinolinas na TR do HIV

Os derivados **3g** e **3e** com melhor e pior perfil de atividade biológica, respectivamente, foram avaliados por *docking* molecular como potenciais ligantes na transcriptase reversa do HIV.

Antes de realizar o *docking* destes derivados, o protocolo de *docking* foi validado usando a estrutura cristalográfica da transcriptase reversa ligada à nevirapina que foi obtida no PDB sob código 3QIP. O ligante (nevirapina) foi retirado da estrutura, e foi realizado o *redocking*.

As 50 conformações ficaram localizadas em um único agrupamento (*cluster*) de menor energia. A comparação por sobreposição estrutural do complexo de menor energia obtido no *redocking* com a estrutura disponível no PDB revelou uma pose similar à original com energia de ligação de -9,3 kcal/mol e desvio médio da raiz quadrada (RMSD) igual a 1,08 Å e o que demonstrou uma boa capacidade preditiva da metodologia de *docking* usando os parâmetros descritos (Figura 9).

O RMSD de referência é um parâmetro importante a ser avaliado no *redocking*, porque ele relaciona o resultado obtido no *docking* com uma estrutura de referência, como a estrutura cristalográfica e valores abaixo de 2 Å são considerados satisfatórios (RODRIGUES et al., 2012).

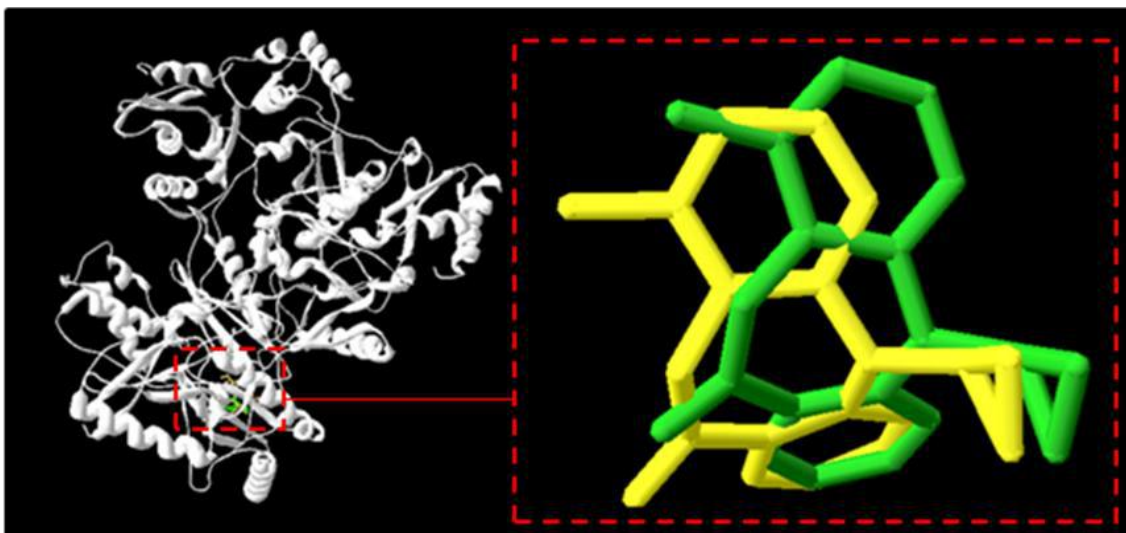


Figura 9. Sobreposição da pose de menor energia obtida no *redocking* (amarelo) e a pose original obtida por cristalografia e difração de raios-X (verde) (código PDB = 3QIP).

Usando a estratégia do *docking* flexível no *redocking* da nevirapina, sete resíduos do sítio ativo foram considerados flexíveis (Val179, Tyr181, Tyr188, Phe227, Trp229, Leu234 e Pro236) e foi observada uma semelhança de sobreposição, com um valor de RMSD de 1,21 Å, confirmando a confiabilidade do método. Entretanto, o valor de RMSD foi maior do que no caso do *redocking* rígido e o valor de energia foi de -5,0 kcal/mol, sendo maior também do que no *docking* rígido (Figura 10).

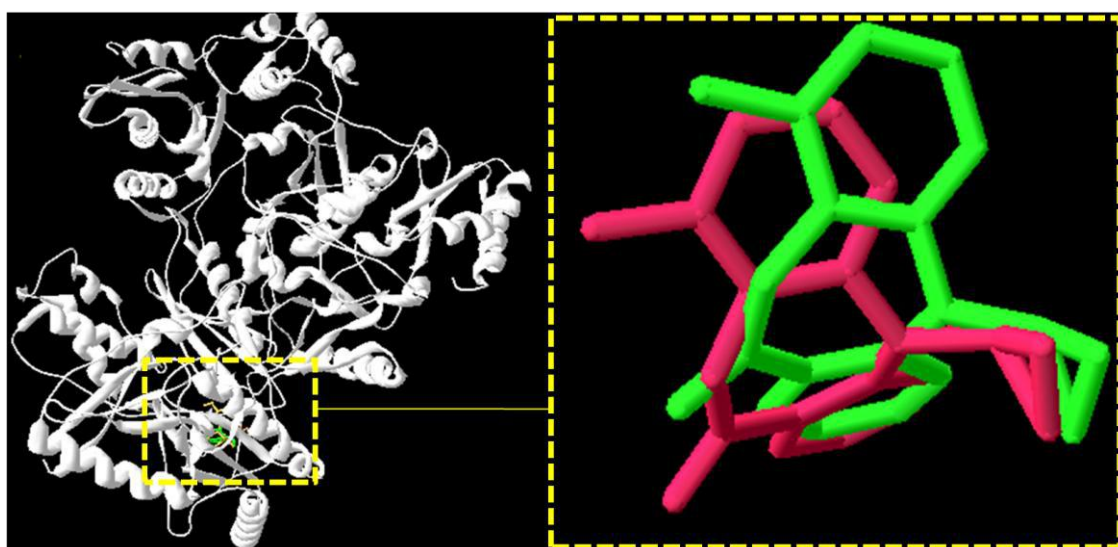


Figura 10. Sobreposição da pose de menor energia obtida no *redocking* flexível (rosa) na transcriptase reversa e a pose original obtida por cristalografia e difração de raios-X (3QIP) (verde).

Em seguida, foi realizado o *docking* dos derivados mais ativos (**3g**, $R_2=F$) e menos ativos (**3e**, $R_2=Br$) da série, usando as estratégias de *docking* flexível (Figura 11) e rígido (Figura 12).

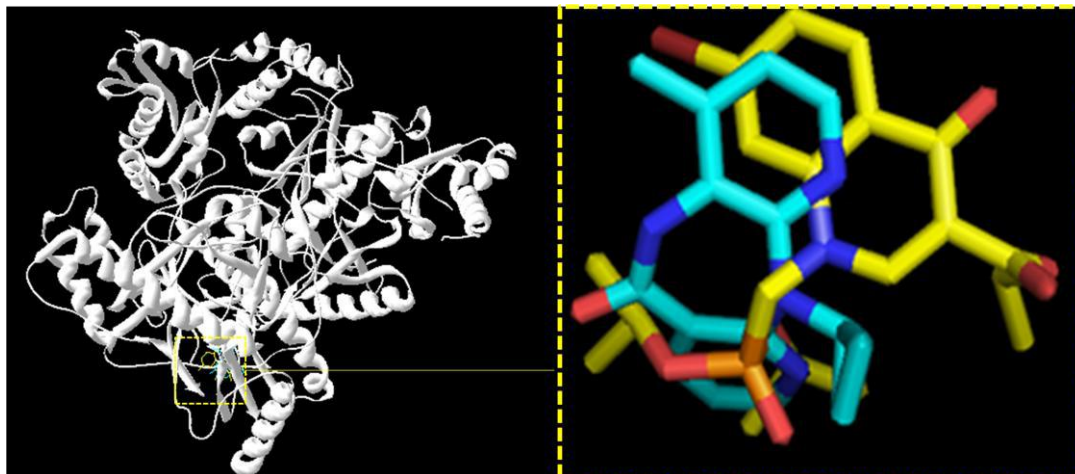


Figura 11. Sobreposição da pose do derivado mais ativo (**3g**, amarelo) obtida por *docking* flexível com a estrutura da nevirapina (azul) co-cristalizada com a transcriptase reversa.

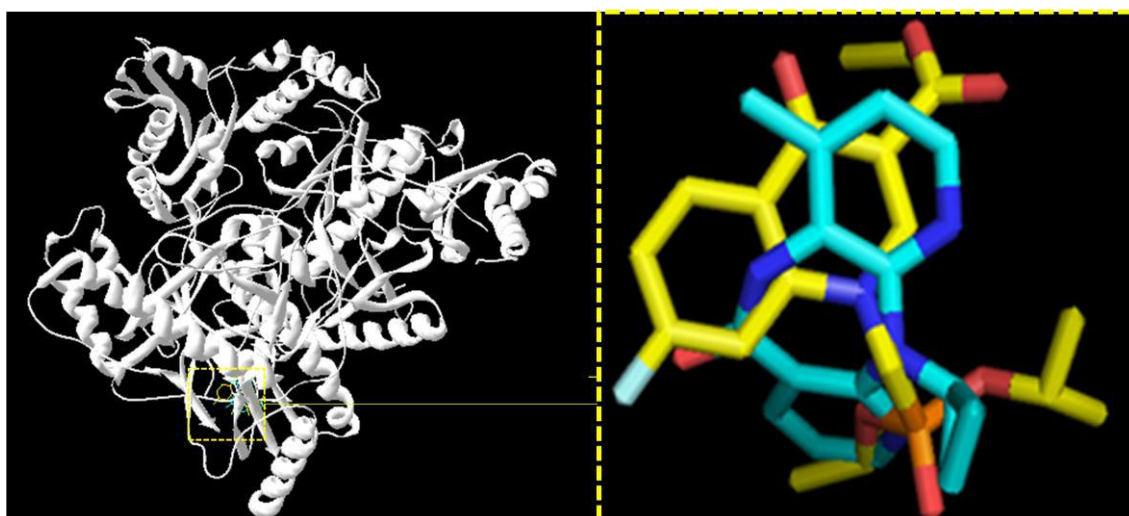


Figura 12. Sobreposição da pose do derivado menos ativo (**3e**, amarelo) obtida por *docking* flexível com a estrutura da nevirapina (azul) co-cristalizada com a transcriptase reversa.

No caso do *docking* flexível foram observados valores de energia de ligação de -4,2 kcal/mol para o derivado mais ativo, e de -4,5 kcal/mol para o derivado menos ativo, o que energeticamente não pode ser considerada uma diferença significativa, entretanto, observou-se que as moléculas destes derivados localizaram-se em posições diferentes.

No *docking* rígido do derivado mais ativo (**3g**), o agrupamento de menor energia apresentou 24 poses, onde o menor valor de energia de ligação é igual

a -9,8 kcal/mol (Figura 13). No *docking* rígido do composto menos ativo (**3e**), foram obtidas 50 poses, sendo a menor energia de ligação igual a -9,6 kcal/mol.

Segundo Morris (2009), quando se acrescenta flexibilidade nas cadeias laterais, principalmente em casos de *docking* com ligantes pequenos, têm-se um espaço conformacional maior a ser buscado, o que aumenta o problema do *docking*, devido ao aumento dos graus de liberdade, podendo resultar em soluções diferentes daquelas do *docking* rígido.

Neste estudo, foi observada uma diferença na energia de ligação nas melhores poses no *docking* rígido e flexível, a energia de ligação foi muito alta no *docking* flexível quando comparada ao *docking* rígido, o que pode ser justificado por esta limitação do *docking* flexível, sendo selecionados os resultados do *docking* rígido para as análises posteriores.

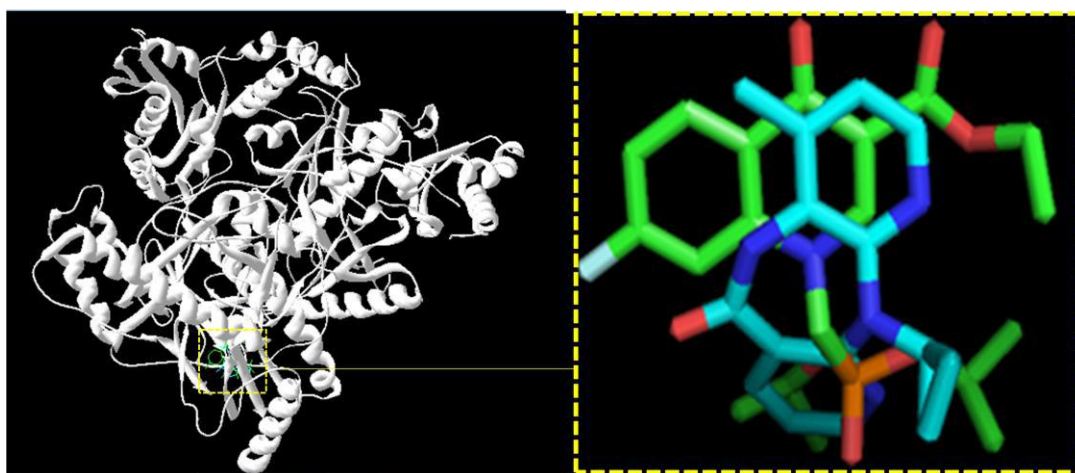


Figura 13. Sobreposição da pose da molécula mais ativa (**3g**) obtida por *docking* rígido (verde) com a estrutura da nevirapina co-cristalizada com a transcriptase reversa em azul.

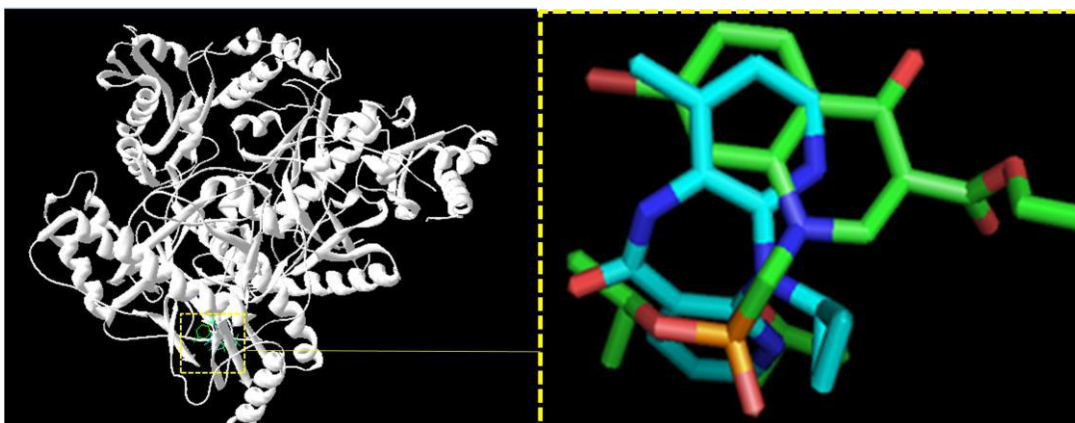


Figura 14. Sobreposição da pose da molécula menos ativa (**3e**) obtida por *docking* rígido (verde) com a estrutura da nevirapina co-cristalizada com a transcriptase reversa em azul.

Na sobreposição da pose de **3g** (obtida por *docking* rígido) com a nevirapina (raios-X), é possível observar que o átomo de flúor do derivado **3g** ($R_2=F$) ocupa uma posição similar ao do átomo de oxigênio da carbonila do grupo éster da nevirapina. Da mesma forma, os anéis aromáticos da oxoquinolina (**3g**) e piridina não substituído (nevirapina) ocupam posições semelhantes.

Há, também, similaridade na posição ocupada pelo átomo de oxigênio do éster (**3g**) com aquela ocupada pelo átomo de nitrogênio da piridina (nevirapina). Além disso, foi observado que um dos grupos propila (**3g**) ocupa posição semelhante àquela ocupada pelo grupo ciclopropila (nevirapina), enquanto que o outro grupo propila ocupa posição similar àquela ocupada pelo anel piridina não substituído (nevirapina).

Estes dados apontam para a possibilidade de ocorrer interações similares entre estes grupos de **3g** com os mesmos resíduos de aminoácidos do sítio de ligação da nevirapina, uma vez que alguns grupos farmacofóricos ocupam as mesmas posições no sítio.

Apesar da energia de ligação ser semelhante para os derivados mais e menos ativos, foi observado que no *docking* do derivado menos ativo (**3e**, $R_2=Br$), o anel da nevirapina sobrepôs com o outro anel da oxoquinolina, o flúor não sobrepôs com um grupo polar da nevirapina como a carbonila, mas sim com a metila, enquanto um dos grupos propila sobrepôs com o oxigênio da carbonila. Esta diferença pode levar a interações diferentes.

A análise comparativa das interações mostrou que a maioria dos resíduos que estão a uma distância de 4 Å das oxoquinolinas também fazem contato com a nevirapina (Figura 15 e Figura 16).

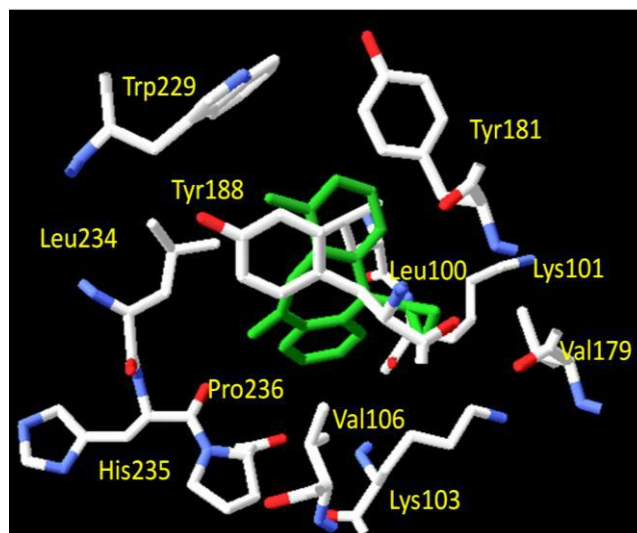


Figura 15. Interações da nevirapina (verde) com os resíduos de aminoácidos da TR (cor por átomo).

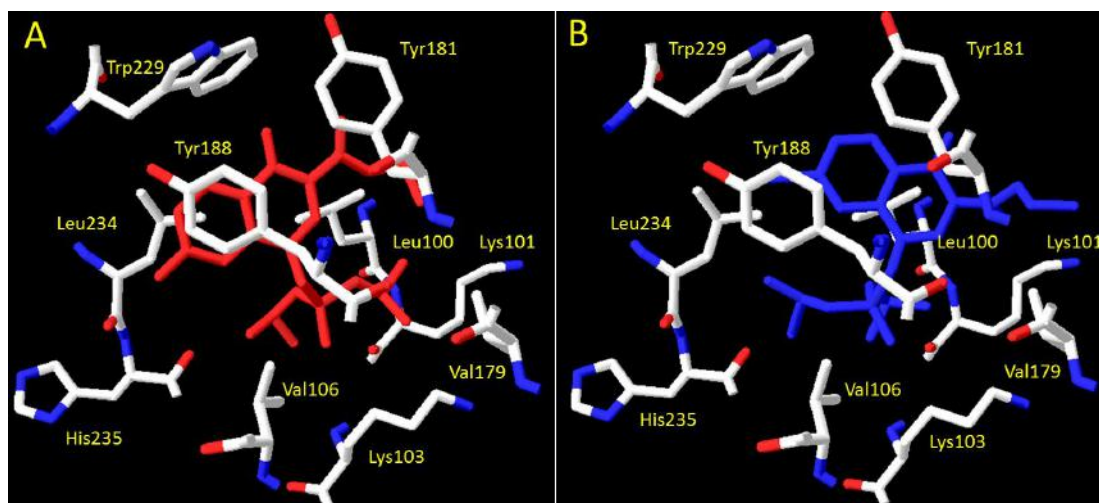


Figura 16. Interações entre os derivados de oxoquinolinas forforados e a TR (cor por átomo). A) molécula mais ativa (**3g**, vermelho) e B) molécula menos ativa (**3e**, azul).

O derivado **3g** apresentou uma interação do tipo empilhamento π - π (π - π *stacking*) com a Tyr188, além da possibilidade de interação hidrofóbica com a Leu100, Val106, Tyr181, Trp229 e Leu234. Ainda possui interações eletrostáticas com a Lys101 e Lys103. A nevirapina interagiu com os mesmos resíduos de aminoácidos por interações hidrofóbicas e interações eletrostáticas que a molécula mais ativas e também a menos ativa.

No caso da molécula mais ativa, entretanto, foi possível observar uma interação π - π *stacking* com uma distância de 4 Å e interações hidrofóbicas com o resíduo Tyr181 que não ocorre na molécula menos ativa. Segundo Hannongbua e colaboradores (2009), interações com os resíduos Tyr181 e

Tyr188 são de extrema importância para a inibição da transcriptase reversa do HIV no sítio alostérico, uma vez que quando um inibidor se liga ao sítio ativo, ocorre um reposicionamento das folhas beta e por serem os resíduos que mais sofrem resistência aos antiretrovirais, devido às mutações.

Assim como no complexo nevirapina-TR também não foram observadas interações por ligação hidrogênio entre os derivados oxoquinolinas e a TR. Segundo Hannongbua e colaboradores (2009), quando adicionados moléculas de água no sítio ativo da transcriptase reversa, há um aumento de possibilidades de interações por ligação hidrogênio. Porém, neste estudo com os derivados oxoquinolinas não foi possível avaliar, por exemplo, a possibilidade de ligações hidrogênio via moléculas de água.

Foi realizado também o *docking* rígido com o principal metabólito previsto para o derivado mais ativo da série (**3g**) com a perspectiva de se avaliar possíveis interações deste com a TR. O grupo éster na biotransformação pode ser hidrolisado, o que pode levar ao respectivo ácido. Desta forma, pode ser avaliada a possibilidade do ácido ser ativo. Foram observadas 24 poses no agrupamento de menor energia no *docking*, sendo a energia de ligação de -8,5 kcal/mol, que foi maior do que a do **3g** (Figura 17).

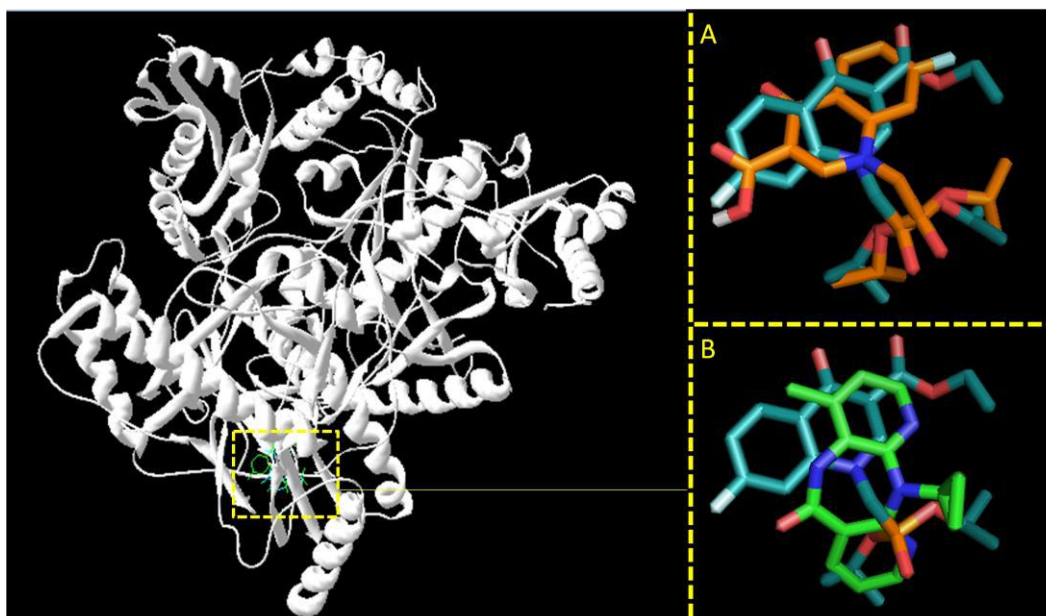


Figura 17. A) Sobreposição da pose do metabólito de 3g obtida por *docking* rígido em laranja com a molécula 3g em azul. B) Sobreposição da pose da molécula 3g obtida por *docking* rígido em azul com a estrutura da nevirapina co-cristalizada com a transcriptase reversa em verde.

No *docking* rígido do metabólito de **3g** em comparação com **3g**, foi possível observar sobreposição entre um dos anéis da oxoquinolina e também sobreposição do grupo fosfonato, entretanto, a presença do grupo ácido no lugar do éster fez com que houvesse uma inversão no encaixe deste metabólito sendo que o flúor do metabólito ficou em posição próxima a um dos anéis piridina da nevirapina e o grupo hidroxila da carboxila ficou próximo da carbonila da nevirapina.

Desta forma, apesar de uma inversão na posição de alguns grupos, foi observado que grupos farmacofóricos do metabólito sobrepõem com os grupos farmacofóricos da nevirapina, evidenciando uma semelhança de encaixe na proteína.

A análise comparativa das interações mostrou que a maioria dos resíduos que estão a uma distância de 4 Å do metabólito também interagem com a nevirapina.

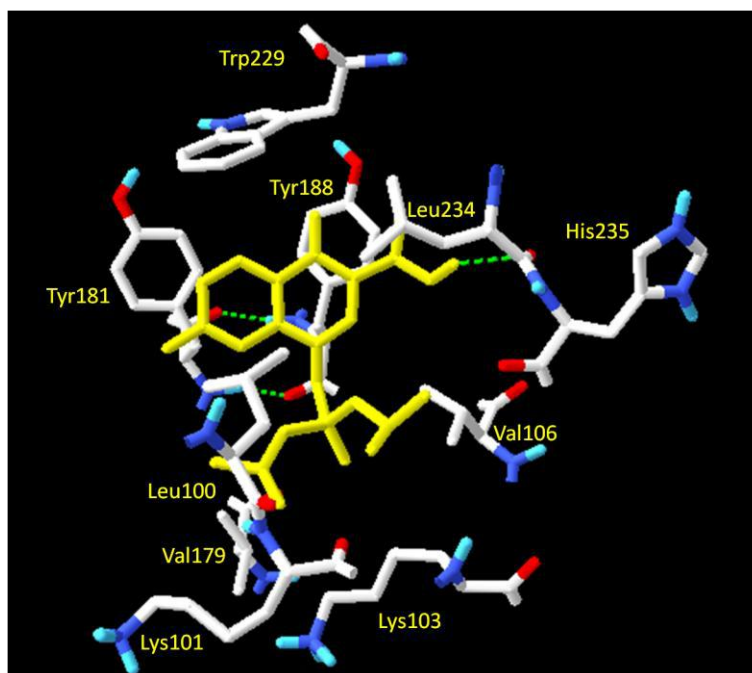


Figura 18. Interações entre o metabólito da molécula mais ativa (amarelo) e a TR (cor por átomo).

O derivado **3g** apresentou uma interação do tipo π - π *stacking* com Tyr181, além da possibilidade de interação hidrofóbica com Leu100, Val106, Val179 e Tyr188, além de interações eletrostáticas com Lys101 e Lys103. Além

disso, foi observada a possibilidade de ligação hidrogênio com Leu234. Segundo Peçanha (2002), a ligação dos NNRTIs ao seu alvo leva a um reposicionamento da folha-beta, especialmente dos resíduos Tyr181 e Tyr188 o que inativa a transcriptase reversa. Isso sugere que tanto o metabólito quanto o composto mais ativo poderiam levar a inativação da enzima, visto que ambos mantêm essas interações. A hidrólise do grupo éster de **3g** resultando no grupo ácido carboxílico do metabólito de **3g** promove diminuição da lipofilicidade da molécula, o que favorece a sua excreção.

Segundo Parish (2013), a introdução do grupo fosfonato na nevirapina promoveu um melhor encaixe do ligante no sítio alostérico, de modo a ser mais eficaz contra mutações, principalmente na Tyr181. A adição deste grupo permitiu novas interações com a superfície da enzima, além de ter uma potência parecida com o efavirenz. É possível que o grupo fosfonato tenha importância também na interação com a TR no caso desta série como espaçador para que a isopropila faça as interações.

6 CONCLUSÕES

Neste estudo, foi realizada uma análise de SAR de uma série de 12 oxoquinolinas fosforadas com atividade contra o HIV-1. Massa molecular, volume e área foram os descritores que mais se correlacionaram com EC_{50} . O mapa de potencial eletrostático também mostrou características importantes relacionadas com a atividade biológica.

Além disso, **3g** apresentou baixo risco tóxico *in silico* quanto aos efeitos mutagênicos, tumorigênicos, irritante e na reprodução, probabilidade de não ser carcinogênico e mutagênico no teste de Ames, Além disso, todos os compostos apresentaram valores de absorção intestinal próximos a fármacos biodisponibilidade oral e ligação a proteínas plasmáticas similares ao AZT e obedeceram à regra dos 5 de Lipinski. mostrando o perfil promissor para futuros estudos.

As análises de *docking* na transcriptase reversa das moléculas mais ativa (**3g**) e menos ativa (**3e**) mostraram que o *docking* rígido apresentou melhor energia de ligação, e através das interações obtidas foi possível diferenciar a molécula mais ativa, da menos ativa e compará-las com o modo de ligação da nevirapina mostrando a importância de interações como π - π *stacking* com Tyr188 e hidrofóbica com Tyr181, dentre outras. A presença do grupo fosfonato pode promover novas interações com a superfície da enzima. Além disso, foi observada a possibilidade do metabólito do composto mais ativo (**3g**) ser ativo de acordo com as interações e predição da CYP envolvida nesta reação, além de avaliar o possível modo de ligação do metabólito predito na TR. Estes estudos podem auxiliar no planejamento de novos antivirais contra o HIV.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUL-ELA, F.; KARN, J.; VARANI, J.; The structure of the human immunodeficiency virus type-1 TAR RNA reveals principles of RNA recognition by Tat protein, **J. Mol. Biol.**, p.253, 313, 1995

ACHARYA KR, LLOYD MD. The advantages and limitations of protein crystal structures. **Trends Pharmacol Sci**; v.26, p. 10-14, 2005.

AHMED,N, . BHRAHMBHATT,K.G, SABDE,S ,DEBASHI, D. Synthesis and anti-HIV activity of alkylated quinoline 2,4-diols, **Bioorganic & Medicinal Chemistry** v.18,p. 2872–2879, 2010.

ALBUQUERQUE, C.A **Modelagem Molecular aplicada ao desenvolvimento de sistemas nanoscópicos bioativos**. Itajubá. Tese de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Materiais para Engenharia. Universidade Federal de Itajubá, 2008.

ALMEIDA, J.R (2011). **Estudos de Modelagem Molecular e relação estrutura-atividade da acetilcolinesterase e inibidores em Mal de Alzheimer**. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.

ANDERSON, P. L., ROWER J. E., Zidovudine and Lamivudine for HIV Infection, **NIH Public Access, Clin. Med. Rev. Ther**, 2010.

ANDRADE, P (2012). **Planejamento, síntese e avaliação da atividade biológica de potenciais inibidores da enzima trans-sialidasi de Trypanossoma cruzi**. Ribeirão Preto. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.

ANGELIS,D.S.A. (2006). **Avaliação do perfil de resistência genotípica aos anti-retrovirais de crianças infectadas pelo HIV-1 mantendo supressão viral prolongada em vigência de tratamento**. Tese de Mestrado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

ARROIO, A; HONÓRIO, K.M; DA SILVA, A.B.F. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos da relação estrutura-atividade. **Química Nova**, v.33,n.3, 2010.

BÉTHUNE, M.P. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), their discovery, development, and use in the treatment of HIV-1 infection: A review of the last 20 years (1989–2009). **Antiviral Research** n.85, p.75–90, 2010.

BONOLO, P.F; GOMES, R.R.F.M; GUIMARÃES, M.D.C. Adesão a terapia anti-retroviral (HIV/AIDS): fatores associados a medidas de adesão. **Epidemiol. Serv. Saúde**.v.16, n.4, p.261-278, 2007

BOZAL B, USLU B, OZKAN SA. A Review of Electroanalytical Techniques for Determination of Anti-HIV Drugs. **International Journal of Electrochemistry**. v;1, 1-17, 2011.

BRITO, A. M., CASTILHO, E. A., SCWARCWALD, C. L. AIDS and HIV infection in Brazil: a multifaceted epidemic. **Revista da Sociedade de Medicina Tropical**, v.34: p.207-217, 2000.

CARVALHO, I; PUPO, M.T; BORGES, A.D.L.B; BERNARDES,L.S.C. Introdução a modelagem molecular de Fármacos no Curso Experimental de Química Farmacêutica. **Quim. Nova**, v. 26,n.3, p.428-438, 2003.

Cecchetti, V.; Parolin, C.; Moro, S.; Pecere, T.; Filipponi, E.; Calistri, A.; Tabarrini, O.; Gatto, B.; Palumbo, M.; Fravolini, A.; Palu` , G. 6-Aminoquinolones as New Potential Anti-HIV Agents. **J. Med. Chem.** v. 43, p. 3799-3802, 2000.

CHENG, F; WEIHUA,L; ZHOU, Y; SHEN, J; WU, Z; LIU,G; LEE, P.W; TANG, Y. admetSAR: a comprehensive source and free tool for evaluating chemical ADMET properties. **J. Chem. Inf. Model**, v.52, n.11, p.3099-3105, 2012.

CIHLAR, T; RAY, A. Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors: 25 years after zidovudine. **Antiv Res** v.85, p.39–58, 2010.

CLAVEL, F; HANCE, A.J. HIV Drug Resistance. **New England Journal of Medicine**, n.350,p.1023-1035, 2004.

CUNICO W., GOMES, C.R.B.; VELLASCO JUNIOR, W.T. HIV - recentes avanços na pesquisa de fármacos. **Quím. Nova** vol.31 no.8 São Paulo 2008.

DE CLERQ, E; TABARRINI, O; STEVENS, M; CECHETTI, V; SEBATINI, S. Structure modifications of 6-aminoquinolines with potent anti-HIV activity. **J.med Chem**, v.47, p.5567, 2004.

DE MELO, E.B; BRUNI, A.T; FERREIRA,M.M.C. Inibidores da HIV-Integrase: Potencial abordagem farmacológica para o tratamento da AIDS. **Química Nova**, v.26,n.3, p.555-562,2006

DRUGBANK. <http://www.drugbank.ca/drugs/>

FALCI, D ; BAY, M ; SPRINZ, E. Simplificação do Tratamento Anti-retroviral com a Utilização de Inibidor de Protease Reforçado com Baixas Doses de Ritonavir como Monoterapia de Manutenção em indivíduos HIV positivos com Supressão Viral. **Tendências em HIV/AIDS**, São Paulo, v.1, n.1, p.24-27, 2006.

FARO, L.V; DE ALMEIDA, J.M; CIRNE-SANTOS, C.C; GIONGO,V.A; BRANCO. L.R.C.; OLIVEIRA, I.B; BARBOSA,J.E.F; CUNHA, A.C; FERREIRA,V.F; DE SOUZA,M.C; PAIXÃO, I.C.N.P; DE SOUZA, M.C.B.V. Oxoquinoline acyclonucleoside phosphonate analogues as a new class of

specific inhibitors of human immunodeficiency virus type 1. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** v.22 p.5055–5058, 2012.

FDA. Food and drug administration. [homepage na internet]. **Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection.**

<http://www.fda.gov/ForConsumers/ByAudience/ForPatientAdvocates/HIVandAIDSAactivities/ucm118915.htm>. Acessado em 08/09/2014.

FLINT, S.J; ENQUIST, L.W; KRUG, R.M; RECANIELLO, V.R; SKALKA, A.M. Principle of Virology: Molecular Biology Pathogenesis and Control. **Ed. Mas Press**, p.627, 2004

GALLO, R; MONTAGNIER, L. Prospects for the future. **Science**, v. 298, p. 1730-1731, 2002.

GOODMAN E GILMAN'S. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**; Brunton, L.L; Lazo, J.S; Parker, K.L; Buxton, L.L; Blumenthals, D.L. 10ª Edição, Ed. Mc.Graw-Hill, 2010.

GOUGEON, M. L. Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, n. 5, p. 392-404, 2003.

GROTTO, R.M.T; PARDINI, M.I.M.C.M. Biologia molecular do HIV-1 e genética da resistência humana à AIDS. **Arq Ciênc Saúde**, n.13(3),p.61-64, 2006

HANNONGBUA, S; TREESWWAN, W. Bridge water mediates nevirapine binding to wild type and Y181C HIV-1 reverse transcriptase—Evidence from molecular dynamics simulations and MM-PBSA calculation. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v27, p.921-929, 2009.

HANSCH C, SAMMES PG, TAYLOR JB. Comprehensive medicinal chemistry: the rational design Mechanistic study and therapeutic application of chemical compounds, **Oxford**, 1990.

HANSEN, K; MIKA, S; SCHOROETER, T; SUTTER, A. Benchmark Data Set for in Silico Prediction of Ames Mutagenicity. **J. Chem. Inf. Model**, v.49, p.2077-2081, 2009.

JORGENSEN WL. The Many Roles of Computation in Drug. **Discovery Science**, v.303, p.1813-1818, 2004.

KAUFMAN, D; LICHTERFIELD, M; ALTFELD, M. Limited durability of immune control following treated acute HIV infection. **Program and abstracts of the 11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections**, p.8-11, 2004

KOHLSTAED, L.A, WANG J, FRIEDMANI J.M, RICE P.A, STEITZ T.A .Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. **Science** 256(5065): 1783-1790, 1992.

LI AP. Screening for human ADME/Tox Drug properties in Drug Discovery. **Drug Discov Today**.v.6, p.357-365, 2001.

LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug Discovery and development settings. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 46(1-3):3-26, 2001..

LUO,Z.G, ZENG,C.C,YANG,L.F HONG,Q,H,WANG,C.X, Hu,L.M. Synthesis of 6-sulfamoyl-4-oxoquinoline-3-carboxylic acid derivatives as integrase antagonists with anti-HIV activity, **Chinese Chemical Letters** v.20 p.789–792, 2009

MARLI,G. V.;CHURCH, D. L.;NUNWEILER, K.D; CANNON,K; WAINBERG,M. A;GILL, M.J , Higher levels of Zidovudine resistant HIV in the colon compared to blood and other gastrointestinal compartments in HIV infection, **Retrovirology**, v. 13. n. 1, p. 1-13,2010

MICELI, L.A (2012). **Novos Protótipos de Antivirais baseados em diterpenos de algas marinhas. Avaliação da Relação Estrutura-Atividade e Interações enzima-ligante.**Niterói. Tese de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Biologia das Interações. Universidade Federal Fluminense.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde - **Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais Boletim Epidemiológico** - Aids e DST.Ano II - nº 1,2013

MODA, T. L.; TORRES, L. G.; CARRARA, A. E.; ANDRICOPULO, A. D. PK/DB: a database for pharmacokinetic properties and predictive in silico ADME models. **Bioinformatics** v. 24, n. 19, p. 2270, 2008.

PUGLISI, J. D.; TAN, R. Y.; CALNA, B. J.; FRANKEL, A. D.; **Science** v.76,p,257,1992

PARRISH, J; TONG, L; WANG, M; CHEN,X; LANSDON, E.B; CANNIZZARO, C; ZHENG,X. Synthesis and biological evaluation of phosphonate analogues of Nevirapine. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** v.23, p.1493–1497, 2013.

PEÇANHA, E.P; ANTUNES, O.A; TANURI,A . Estratégias Farmacológicas para Terapia Anti-Aids. **Quim. Nova**, Vol. 25, No. 6B, 1108-1116, 2002

REBOREDO, B.M (2012) **Modelagem Molecular aplicada ao estudo de ligantes candidatos a fármacos com atividade Antileishmaniais.** Campo Grande. Tese de Mestrado. Centro de Ciências Exatas e Tecnologia. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

RISCADO, C.S (2007). **Desenvolvimento de Metodologia sintética para a síntese de quinolonas contendo substituintes triazólicos.** Tese de

Mestrado. Programa de Pós Graduação em Química Orgânica da Universidade Federal Fluminense.

RODRIGUES, C.R. Processos Modernos no Desenvolvimento de Fármacos: Modelagem Molecular. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**. n.1, p.43-49, 2001.

RODRIGUES, R. P.; MANTOANI, S. P.; de ALMEIDA, J. R.; PINSETTA, F. R.; SEMIGHINI, E. P.; da SILVA, V. B.; da SILVA, C. H. O. Estratégias de triagem virtual no planejamento de fármacos. **Rev Virtual de Quim**, v. 4, n. 6, p. 739-776, 2012.

ROSSETI, H.L. **Utilização de Métodos de Modelagem Molecular para caracterização do sistema (nBuCp)₂ Zr(CH₃)₂ imobilizado em sílica e ativado com MAO**. Porto Alegre. Tese de Mestrado, Instituto de Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

SANDER , T . **Actelion Pharmaceuticals Ltd., Gewerbestrasse 16, 4123 Allschwil, Switzerland. 2014**. Disponível em: <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>. Acesso em agosto de 2014.

SANT'ANNA; RODRIGUES, C.M. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução. **Rev. Virtual Quim**, v.1, n.1, p.49-57, 2009.

SANTOS,C.F; ABREU,A.P; CASTRO, C.H; PAIXÃO, I. C. P. P; CIRNE-SANTOS, C.C;GIONGO,V;BARBOSA,J.E; SIMONETTI, B.R; GARRIDO,V; BOU-HABIB,C.D; SILVA, D.O; BATALHA, P. N; TEMEROZO, R.J; SOUZA, M.T; NOGUEIRA, M.C; CUNHA,C.A; RODRIGUES,C.R; FERREIRA,F.V; DE SOUZA,M.C.B.V; Synthesis, antiviral activity and molecular modeling of oxoquinoline derivatives, **Bioorganic & Medicinal Chemistry** v. 17, p. 5476–5481, 2009.

SARAFIANOS, S.G; MARCHAND, B; DAS, K; HIMMEL, D.M; PARNIAK, M.A; HUGHES, S.H; ARNOLD, E. Structure and Function of HIV-1 Reverse Transcriptase:Molecular Mechanisms of Polymerization and Inhibition. **J. Mol. Biol.** n. 385, p.693–713, 2009

SEIDL, E.M.F; MELCHÍADES, A.; FARIAS, V.; Brito A.. Pessoas vivendo com HIV/AIDS variáveis associadas à adesão ao tratamento anti-retroviral. Instituto de Psicologia, Universidade de Brasília.**Cad. Saúde Pública** , RJ v. 23, n. 10, p. 2305-2316, 2010.

SILICIANO, R.F. Perspective What do we need to do to cure HIV infection, **International Aids Society – USA – Topics in HIV Medicine**. n.18(3) p.104-108, 2010.

SILVA, P. et al. Alterações metabólicas e terapia nutricional em pacientes HIV positivo usando medicamentos antirretrovirais. **Nutrição Brasil**, v. 4, n. 2, p. 99-105, 2005

SILVA, R.A.R. Aids epidemic in Brazil: Analysis of current profile. **Journal of nursing UFPE on line**, .7, n.10, p.6039-6046, 2013

SOUZA, A.M.T. (2007) **Aplicação De Métodos Computacionais No Estudo da Relação Estrutura-Atividade E Perfil Toxicológico De Novos Compostos Antiparasitários e Antimicobacterianos**. Rio de Janeiro, Tese Doutorado, Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense

SWANSTROM, R.; WILLS, J.W. Retroviral gene expression: synthesis, assembly and processing of viral proteins. **Retroviruses**. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press; p.263-334, 1997.

TABARRINI, O.; STEVENS, M., CECCHETTI, V.; SABATINI, S.; DELL'UOMO, M.; MANFRONI, G.; PALUMBO, M.; PANNECOUQUE, C.; DE CLERCQ, E.; FRAVOLINI, A. Structure modifications of 6-aminoquinolones with potent anti-HIV activity. **J Med Chem**. v. 47, n. 22, p. 5567-78, 2004.

TANG. Y.; ZHU, W.; CHEN, K.; JIANG, H. New technologies in computer-aided drug design: Toward target identification and new chemical entity discovery. **Drug Disc. Today Techn**. v.3, n.3, p.307-313, 2006

VAN DE WATERBEEMD H AND GIFFORD E. ADMET in silico modeling: towards prediction paradise? **Nature Rev Drug Disco**, v.2, p.192-204, 2003.

VERAS, N.M.C; MORAES, D.S.M; OLIVEIRA,C.P; CERQUEIRA,D.M; FINK,H.T.K; SILVA,R.R; MARTINS, C.R.F. Resistência do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 aos inibidores de protease em amostragem do Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal no ano de 2002. **Ciências Saúde** v. 18, n. 1, p. 25-31, 2007.