



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**CLÁUDIO AUGUSTO MAGALHÃES PARANHOS**

**ESTUDOS *IN SILICO* DE POTENCIAIS INIBIDORES  
DA ENZIMA HISTONA DEACETILASE**

**ILHÉUS-BAHIA  
NOVEMBRO, 2015**

**CLÁUDIO AUGUSTO MAGALHÃES PARANHOS**

**ESTUDOS *IN SILICO* DE POTENCIAIS INIBIDORES  
DA ENZIMA HISTONA DEACETILASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Santa Cruz, para obtenção do título de mestre em Química.

Área de concentração: Físico-Química Teórica.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Cesário Rangel.

**ILHÉUS-BAHIA  
NOVEMBRO, 2015**

P233 Paranhos, Cláudio Augusto Magalhães.

Estudos in silico de potenciais inibidores da enzima histona deacetilase / Cláudio Augusto Magalhães Paranhos. – Ilhéus : UESC, 2015.

85f. : il.

Orientador : Fernando Cesário Rangel.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Química.

Inclui referências e anexos.

1. Histonas. 2. Metaloenzimas. 3. Nucleoproteínas. 4. Química farmacêutica. I. Rangel, Fernando Cesário. II. Título.

CDD – 547.752

**CLÁUDIO AUGUSTO MAGALHÃES PARANHOS**

**ESTUDOS *IN SILICO* DE POTENCIAIS INIBIDORES  
DA ENZIMA HISTONA DEACETILASE**

Ilhéus, 27 de novembro de 2015.

---

Prof. Dr. Fernando Cesário Rangel  
Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC  
(Orientador)

---

Prof. Dr. Luiz Carlos Salay  
Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC  
(Examinador)

---

Prof. Dr. Davi Aleksandro Cardoso Ferreira  
Universidade de Brasília – UnB  
(Examinador)

**DEDICO ESSE TRABALHO,**

*À memória de Valdemar Melo, o Tio Vavá, que lutou bravamente na 2ª. Guerra Mundial, aquele a quem, instintivamente, eu chamava de anjo da guarda; vitimado pelo Mal de Chagas e a sua amada esposa, a Tia Lita (Crisolita Melo) vitimada pelo câncer, que tanto me ensinaram para a vida; sempre presentes no apoio à família e muito amados por todos;*

*À memória de Alair da Rocha Castro, um grande amigo da família, tido por colegas como o maior conhecimento em Medicina da região, de quem tive a honra de receber os primeiros ensinamentos sobre epidemiologia regional da Doença de Chagas e cardiopatias; e ao grupo de oncologia da região sul da Bahia, que há tanto vem investindo e avançando nessa luta.*

*À estimada mestra e amiga Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria de Fátima Dias Costa, a quem, qualquer que seja o meu trabalho, sempre terá meu reconhecimento, respeito e consideração dedicados;*

*Ao mestre e nobilíssimo colega Prof. Dr. Ajax Mercês Atta, e seu valoroso e inesquecível ensinamento, de que um aluno aplicado deve ser respeitado, considerado e valorizado;*

*Ao colega Ari Paranhos Silva, a quem considero o maior exemplo de Farmacêutico Bioquímico que já tive a honra de conhecer, e que, muito acima dos laços familiares, me direcionou e despertou para a beleza e aplicabilidade da Química em nossa Profissão;*

*Aos meus AMIGOS, que não caberia aqui nominar, mas que são a razão, o motivo e o estímulo para me preparar mais e melhor no cumprimento da minha missão na Terra, dádiva que é a mim concedida por Deus, e a qual prometo honrar e louvar eternamente!*

**AGRADEÇO,**

Aos meus amados pais<sup>†</sup>, que me proporcionaram a verdadeira educação, contida em seus ensinamentos e exemplos de vida na construção natural de uma verdadeira família;

A minha companheira Laura, pelo amor em todo esse período de convivência, refletido em seu sorriso de tamanha graciosidade, que hoje traz no ventre o fruto que brota dessa união, nossa amada Ceci;

Ao colega e amigo Alex Alves sempre participante nesses trabalhos; e ao Prof. Dr. Kleber Mundim que me enriqueceu com seus ensinamentos, atenção, respeito e humildade;

Ao meu extraordinário orientador Prof. Dr. Fernando Cesário Rangel, que me fez acreditar e chegar até esse momento, mostrando um mundo de conhecimentos inimagináveis;

Ao Prof. Dr. Raíldo Mota de Jesus, pela iniciativa, constante estímulo e disponibilidade;

Aos colegas amigos, Max Menezes<sup>†</sup>, Fabrício Rios, Renato Costa e equipe da CAR, Ester Jeunon, Selem Rachid, Miguel Fascio, Antônia Lúcia, Anselmo Brito, Antônio Jorge e Catriane, que sempre vibraram com minhas conquistas e me incentivam a seguir vencendo;

Aos dedicados e competentes docentes do PPGQUIM, PPGMC e PROCIMM;

À família, próximos ou distantes, representados por Suka, Tahi, Mariângela, Indira, Patrícia, Jana, Said e André sempre com muita atenção, vibração e torcendo pelo nosso sucesso;

Aos colegas de pós e do grupo da Química Computacional da UESC; da iniciação científica no ICS, FAMED e FAR, da UFBA, e do DCB da UCSal.

Aos mestres orientadores, Roberto Araújo, Geóvana Novaes, Maria Thereza, Fátima Costa, Lectícia Scardino, Erlon Rodrigues, Dirce Franco<sup>†</sup>, Cleuber Fontes, João Lício, Hygia Guerreiro, Eustáquio Borges, Andreijus Korolkovas<sup>†</sup>, Juceni David, Manoel Barral, Aníbal Silvano e Gildásio<sup>†</sup>;

Aos professores da formação básica que contribuíram para minha habilitação e minha vida, Cosme Reis, Idacy, Carmita, Matheus, Garrido, Leninha, Ir. Dalvany, Samuel, Ely, Iara, Ir. Glória, Nelson Nascimento, Vanda, Amélia, John e Eneida<sup>†</sup>;

Aos Mestres das lutas e das Artes Marciais, pois sem seus ensinamentos meu corpo não teria a capacidade de harmonizar e sintonizar com a minha mente, fazendo fluir a energia para resistir a esse desafio e seguir firme e impávido, n' "O Caminho"; o meu respeitável OSSU!

Como Biólogo, que também sou, agradeço à natureza por me trazer *Pituka*, criatura especial que parece perceber aqueles momentos de maior tensão e preocupação durante os meus estudos e trabalhos, aparecendo repentinamente para fazer um mimo e acalmar meu espírito!

Não foi preciso recorrer a ditos nem frases de vultos históricos, que sequer tive a oportunidade de conhecer, quando se teve e se tem o convívio de ilustres personalidades e seres iluminados, que marcam e nos conduzem por toda uma vida!

No início da minha formação, quando pedi para acompanhá-lo em um evento internacional:

*“Você não precisa estar à sombra de ninguém, já tem seu brilho próprio e, no momento certo, o sucesso acontecerá!” (Prof. Dr. Luiz Erlon Rodrigues, em 1987)*

Quando, nas circulações pela UESC, em momentos de quase desistência e descontentamento, o ex-professor, então amigo e irmão na Arte Real:

*“Não desanime: só por estarmos aqui, nós já somos vencedores, nada nem ninguém poderá apagar isso!” (Prof. Dr. Samuel Macedo Guimarães, em 2014)*

## **ESTUDOS *IN SILICO* DE POTENCIAIS INIBIDORES DA ENZIMA HISTONA DEACETILASE**

### **RESUMO**

As doenças negligenciadas prevalecem em condições de pobreza no Brasil e outros países em desenvolvimento, assim como as doenças crônico-degenerativas, representam um preocupante problema em saúde pública. A complexidade dos agentes etiológicos, falta de recursos para pesquisas e restrições com o uso de fármacos disponíveis, têm implicado seriamente na necessidade de se buscar novas alternativas terapêuticas. Um alvo terapêutico que tem se mostrado bastante efetivo é o grupo de enzimas Histona Deacetilase (HDAC), pois através de sua inibição, pode-se evitar transcrição e silenciamento de genes específicos. Esse trabalho foi realizado através de estudos *in silico*, com estratégias de docagem molecular (DM) em moléculas bioativas visando compreender a sua forma de ação e interação, fornecendo embasamento para pesquisas em Química Computacional na busca por novos fármacos para o combate a doenças. Os ligantes escolhidos foram as Betaínas Hidroxâmicas, pois os ácidos hidroxâmicos mostraram-se potentes inibidores da HDAC, em sua forma zwitteriônica e a sua interação eletrostática com a betaína é significativamente relevante. Para o estudo da atividade inibitória dessas moléculas, foram utilizadas técnicas de docagem molecular, cujos resultados dos cálculos de Mecânica Molecular (MM) estão revelando análogos betaínicos como promissores candidatos a fármacos.

Palavras Chave: Inibidores da HDAC; Betaínas Hidroxâmicas; Docagem Molecular e Química Computacional



# ***IN SILICO* STUDIES ON POTENTIAL ENZYME HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS**

## **ABSTRACT**

Neglected diseases prevalent in poor regions, in Brazil and other developing countries, as well as chronic degenerative diseases, represent a serious problem in public health. The complexity of etiologic agents the lack of resources for research and restrictions on the use of available drugs, take seriously the need to find new therapeutic alternatives. A therapeutic target that has been proved very effective is the group of histone deacetylase enzymes (HDACs) because through its inhibition, it can be avoided the transcriptional and silencing of specific genes. This work was done by *in silico* studies, with strategies of molecular docking (MD) in bioactive molecules in order to understand their mode of action and interaction, providing basis for research in computational chemistry in the search for new drugs to combat diseases. Hidroxâmics betaines, were the closen ligandssince the hydroxamic acid shown to be potent HDAC inhibitors in its zwitterionic form and its electrostatic interaction with the betaine is significantly relevant. To study the inhibitory activity of these molecules have been used molecular docking techniques, and the results of calculations of the Molecular Mechanics (MM) are showing similar betáínicos as promising drug candidates.

Keywords: HDAC inhibitors; Hidroxâmics Betaines; Molecular Docking and Computational Chemistry

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ilustração esquemática de condensação da cromatina.....	4
Figura 2 – Classes de HDAC e suas respectivas estruturas e localização na célula.....	5
Figura 3 – Caracterização do domínio catalítico das subclasses de HDAC.....	6
Figura 4 – Esquema de reações catalisadas por enzimas e sob a ação de inibidor enzimático; observa-se que o inibidor pode competir ou não, com o substrato, pelo sítio ativo da enzima.....	14
Figura 5 – Modelo ilustrativo de inibição competitiva.....	15
Figura 6 – Gráfico comparativo entre atividade enzimática e os tipos de inibição.....	17
Figura 7 – Estruturas básicas de iHDAC, destacando grupo funcional.....	19
Figura 8 – Fórmula estrutural geral dos ácidos hidroxâmicos.....	24
Figura 9 – Estrutura molecular plana de betaína.....	27
Figura 10 – Estrutura molecular geral de Betaínas Hidroxâmicas.....	28
Figura 11 – Forças interatômicas analisadas em Mecânica Molecular.....	30
Figura 12 – Modelo geral ilustrativo das etapas do procedimento de docagem molecular.....	49
Figura 13 – Ilustração explicativa sobre aspectos da complementaridade em docagem molecular.....	52
Figura 14 – Quadro comparativo entre os métodos químicos computacionais, sua resolutividade e precisão, de acordo com a complexidade do sistema.....	58
Figura 15 – Imagem do espaço químico reacional, destacando os subsistemas que devem ser tratados por MM e QM e a zona fronteira (QM/MM), em processo de interação de ácido hidroxâmico em sítio catalítico da HDAC.....	59
Figura 16 – Representação em modelo de fitas, da HDAC8 com o ligante (MS-344) acoplado.....	62
Figura 17 – Fórmula estrutural plana de moléculas selecionadas e criadas para o estudo; onde se observam as análogas betaínicas (3 e 4) e análogos betaínicos baseados em TSA e SAHA (1, 2, 5 e 6).....	63
Figura 18 – Moléculas dos ácidos hidroxâmicos e seus correspondentes análogos betaínicos, desenvolvidas e estudadas nesse trabalho.....	67
Figura 19 – Imagem da interação entre a betaína hidroxâmica com o sítio ativo da HDAC8, destacando aminoácidos interagentes em regiões laterais do sítio ativo da enzima.....	70
Figura 20 – Imagem da conformação molecular do TSA, em destaque para a estrutura sem baetaína ligada ao anel aromático.....	71

Figura 21 – Imagem da conformação molecular do TSA-BH, em destaque para betaína ligada ao anel.....	72
Figura 22 – Gráfico de energia total da molécula de TSA sem a ligação com a betaína (TSA-BH).....	72
Figura 23 – Gráfico de energia total da molécula de TSA com a betaína ligada (TSA-BH).....	73
Figura 24 – Acoplamento virtual de ligante betaína hidroxâmica no sítio ativo da HDAC8...73	

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Seleção de programas de docagem criados desde o ano de 1988 até o ano de 2011, e os respectivos países onde foram criados.....	50
Tabela 2 – Resultados dos cálculos obtidos da análise dos compostos estudados: energias de ligação ( $\text{Kcal.mol}^{-1}$ ) e frequência de poses selecionadas no programa (AutoDock 4.2.5), Apresentado durante o 7º.Simpósio Brasileiro em Química Medicinal, novembro de 2014 (BrazMedChem2014).....	66
Tabela 3 - Comparativo entre os resultados dos cálculos das moléculas estudadas (SAHA e SAHA-BH), energias de ligação, constante de inibição ( $K_i$ ) em nM e $\mu\text{M}$ ( ), e frequência de poses.....	68
Tabela 4 - Comparativo entre os resultados dos cálculos das moléculas estudadas (TSA-H e TSA-BH), energias de ligação, constante de inibição ( $K_i$ ) em nM e $\mu\text{M}$ (1), e frequência de poses.....	69
Tabela 5 - Comparativo entre os resultados dos cálculos das moléculas estudadas (AH-3 e BH-3), energias de ligação, constante de inibição ( $K_i$ ) em nM e $\mu\text{M}$ (1), e frequência de pose.....	69
Tabela 6 - Comparativo entre os resultados dos cálculos das moléculas estudadas (AH-4 e BH-4), energias de ligação, constante de inibição ( $K_i$ ) em nM e $\mu\text{M}$ (1), e frequência de poses.....	69

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>ADME/T</b>	absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade
<b>ADT</b>	<i>autodock tools</i>
<b>AG</b>	algoritmo genético
<b>AGL</b>	algoritmo genético lamarckiano
<b>AH</b>	ácido hidroxâmico
<b>AM1</b>	<i>Austin Model 1</i>
<b>AMBER</b>	<i>Assisted Model Building with Energy Refinement</i>
<b>AOE</b>	2-amino-8-oxo-9, 10-epoxi-decanóico
<b>Asp</b>	aminoácido, ácido aspártico
<b>BH</b>	betaína hidroxâmica
<b>CADD</b>	<i>computer-aided drug design</i>
<b>CHARMM</b>	<i>chemistry at harvard macromolecular mechanics</i>
<b>CNDO</b>	<i>complete neglect of differential overlap</i>
<b>CpG</b>	dinucleotídeos do genoma
<b>CRZ</b>	cruzifaína ou cruzafina
<b>DATASUS</b>	controle de dados e informações do sistema único de saúde
<b>DC</b>	doença de chagas
<b>DFT</b>	<i>density functional theory</i>
<b>DM</b>	docagem molecular
<b>DNA</b>	<i>desoxyribonucleic acid</i>
<b>DNDI</b>	<i>Drugs for Neglected Diseases Initiative</i>
<b>DNMT</b>	DNA metil transferase
<b>EMEA</b>	<i>European Medicines Agency</i>
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>Gly</b>	Aminoácido Glicina
<b>GROMOS</b>	<i>Groningen Molecular Simulation</i>

<b>HAT</b>	Histona Acetil Transferase
<b>HDAC</b>	Histona Deacetilase
<b>HF/MP2</b>	método <i>ab initio</i> , Hartree Fock e MP2
<b>HOMO</b>	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
<b>iHDAC</b>	inibidor da HDAC
<b>INDO</b>	<i>Intermediate Neglect Differential Overlap</i>
<b>IUPAC</b>	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<b>kDA</b>	unidade de medida correspondente a <i>kilo Dalton</i>
<b>kDNA</b>	material genético contido em cinetoplastos de células eucarióticas
$K_i$	constante de inibição
$K_M$	constante de Michaelis-Menten
<b>LBVS</b>	<i>ligand-based virtual screening</i>
<b>LGA</b>	<i>Lamarchian Genetic Algorithm</i>
<b>LUMO</b>	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
<b>MD</b>	do inglês: <i>Molecular Dynamics</i>
<b>MMC</b>	método de monte carlo
<b>MM</b>	método da Mecânica Molecular
<b>MOPAC</b>	Programa de Cálculo de Orbitais Moleculares
<b>MP2</b>	método <i>ab initio</i> pós-Hartree-Fock, Möller-Plesset de segunda ordem
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>NDDO</b>	<i>Neglect of Diatomic Differential Overlap</i>
<b>NOX</b>	Número de Oxidação
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>OPLS</b>	<i>Optimized Potentials for Liquid Simulations</i>
<b>OPS</b>	<i>Organización Panamericana de la Salud</i>
<b>OMS</b>	do espanhol, <i>Organización Mundial de la Salud</i>
<b>P&amp;D</b>	pesquisa e desenvolvimento
<b>PDB</b>	<i>Protein Data Bank</i>
<b>pH</b>	Potencial de Hidrogênio

<b>PM3</b>	Método Paramétrico numero 3
<b>PM6</b>	Método Paramétrico numero 6
<b>QM/MM</b>	<i>Quantum Mechanics/Molecular Mechanics</i>
<b>QSAR</b>	<i>quantitative structure-activity relationship</i>
<b>REA</b>	Relação Estrutura-Atividade
<b>RM1</b>	<i>Recife Model 1</i>
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>RMSD</b>	<i>Roth Mean Square Deviation</i>
<b>RMS</b>	<i>Rooth Mean Square</i>
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i>
<b>Rpd3</b>	<i>Reduced Potassium Dependency 3</i>
<b>SAHA</b>	Suberoilânida Ácido Hidroxâmico
<b>SAR</b>	<i>Structure-Activity Relationship</i>
<b>SBVS</b>	<i>structure-based virtual sceening</i>
<b>SCC-DFTB</b>	<i>self consistent charge – density functional based tight biniding</i>
<b>SIAB</b>	Sistema de Informação e Atenção Básica do Ministério da Saúde
<b>SVM</b>	<i>Support Vector Machines</i>
<b>TR</b>	Tripanotiona Redutase
<b>TSA</b>	Tricostatina A
<b>VPA</b>	<i>Valproic ácid</i>
<b>VS</b>	<i>virtual screening</i>
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	íon divalente do elemento Zinco
<b>ZDO</b>	<i>zero differential overlap</i>

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>viii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 As bases genéticas.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Aspectos epigenéticos.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 As Histonas.....</b>	<b>3</b>
<b>1.4 A Histona Deacetilase (HDAC).....</b>	<b>4</b>
<b>2. QUÍMICA MEDICINAL.....</b>	<b>6</b>
<b>2.1 Aspectos da Química Medicinal.....</b>	<b>7</b>
2.1.1 A interação entre fármaco e o bioreceptor.....	8
2.1.1.1 Propriedades biofarmacêuticas.....	10
2.1.1.2 Bioisosterismo.....	11
<b>2.2 Pesquisa e desenvolvimento (P&amp;D) de fármacos.....</b>	<b>11</b>
<b>2.3 Mecanismos de ação enzimática.....</b>	<b>13</b>
2.3.1 Inibidores da Enzima HDAC (iHDAC).....	17
2.3.1.1 Butirato de Sódio (BS ou SB).....	20
2.3.1.2 Ácido Valpróico (AVP ou VPA).....	20
2.3.1.3 Benzamidas.....	20
2.3.1.4 Tetrapeptídeos Cíclicos (TPCs).....	21
2.3.1.5 Sirtuínas.....	21
2.3.1.6 Ácidos Hidroxâmicos (AHs).....	22
<b>2.4 Perspectivas farmacológicas.....</b>	<b>23</b>
2.4.1 Caracterização e estudo dos ácidos hidroxâmicos.....	24
2.4.2 Betaínas.....	25
2.4.3 Betaínas Hidroxâmicas (BHs).....	27
<b>3. QUÍMICA COMPUTACIONAL.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Métodos em química computacional.....</b>	<b>29</b>
3.1.1 Métodos Clássicos.....	29
3.1.1.1 Mecânica Molecular (MM).....	29
3.1.1.2 Dinâmica Molecular.....	36



3.1.2	Métodos Quânticos.....	37
3.1.2.1	Métodos semi-empíricos.....	38
3.1.2.2	Métodos <i>ab initio</i> .....	39
3.1.2.3	Método DFT (do inglês, <i>Density Functional Theory</i> ).....	40
<b>3.2</b>	<b>Modelagem Molecular.....</b>	<b>41</b>
3.2.1	Técnicas de triagem.....	44
<b>3.3</b>	<b>Docagem Molecular.....</b>	<b>48</b>
3.3.1	A evolução da docagem molecular.....	48
3.3.2	Algoritmos.....	54
<b>3.4</b>	<b>Métodos Híbridos.....</b>	<b>58</b>
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>60</b>
4.1	Objetivo geral.....	60
4.2	Objetivos específicos.....	60
<b>5.</b>	<b>DETALHES COMPUTACIONAIS.....</b>	<b>60</b>
5.1	A preparação da molécula alvo.....	61
5.2	A preparação dos ligantes.....	62
5.2.1	Descrição das moléculas estudadas.....	63
5.3	O procedimento de docagem.....	64
5.4	O programa de docagem utilizado.....	64
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
6.1	Resultados parciais divulgados.....	66
6.2	A caracterização das moléculas estudadas.....	66
6.3	Resultados finais da docagem molecular.....	68
6.3.1	Resultados dos cálculos de Mecânica Molecular (MM).....	68
<b>7.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>74</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>74</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>83</b>
	<b>Anexo A.....</b>	<b>84</b>
	<b>Anexo B.....</b>	<b>85</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A diversidade de situações de risco, deficiência de medidas profiláticas, de esquemas terapêuticos e a falta de um maior conhecimento sobre a fisiopatologia evolutiva de algumas doenças, implicam direta e indiretamente em fatores econômicos, educacionais, e a um sério comprometimento para a saúde pública, afetando principalmente nações com populações mais carentes e desprezadas.

A OMS (Organização Mundial da Saúde) considera “Doenças Negligenciadas (termo que surgiu em torno do ano 2000)”, aquelas doenças que afetam principalmente essas populações, impedindo o desenvolvimento social e econômico de países, contribuindo para a desigualdade social, pois acometem indivíduos durante sua vida ativa (COURA; VIÑAS; JUNQUEIRA, 2014), e que não despertam o interesse de indústrias do ramo farmacêutico em disponibilizar recursos e investimentos para a pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novas alternativas terapêuticas (FERREIRA, 2012; GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

São apontados três tipos de falhas que contribuem para o agravamento dessas doenças, e que precisam ser criteriosamente investigadas: são elas, as falhas da ciência, de mercado e do sistema de saúde (PORTAL CHAGAS DO MINISTÉRIO DA SAÚDE; PORTAL DO GOVERNO, 2014; BBC-BRASIL, 2012).

Parcerias para o desenvolvimento de produtos, tais como as DNDI (do inglês: *Drugs for Neglected Diseases Initiatives*) entre a Fiocruz e o Instituto Pasteur, representam uma esperança para mudanças no quadro atual de doenças infectocontagiosas, parasitárias (JORGE; CASTRO, 2000; DNDI, 2013) e crônico-degenerativas.

A aplicação de tecnologia avançada auxiliando na descoberta e em um melhor conhecimento sobre alvos farmacológicos, já estão produzindo resultados positivos e bastante promissores (PEREIRA et al, 2015).

### 1.1 As bases genéticas

A transcrição em células eucarióticas é influenciada pela forma como o DNA é empacotado, realizado na cromatina, a qual possui um crítico papel de determinar o controle de todos os processos nucleares que envolvem o metabolismo do DNA (OLIVEIRA, 2012; LEAL, 2013). A estrutura conformacional da cromatina é diretamente influenciada pelas

modificações pós-translacionais do núcleo das histonas. A expressão gênica tem sua regulação fortemente influenciada pelo processo de acetilação, que está ligado à repressão transcricional (EL-SAYED<sup>†</sup> et al., 2005; NOGUEIRA, 2009).

Os estudos genéticos vêm demonstrando uma variabilidade e diversificação característica para certos microrganismos, despertando para uma atenção criteriosa e sempre atualizada nos estudos e pesquisas (BRENER, 1997; DIAS et al., 2009; FERREIRA, 2012; GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010; SILVA; LEITE, 2011) o que tem contribuído fortemente para a evolução e o desenvolvimento da farmacoterapia (MENDITI; KANG, 2007; VARGAS, 2013).

## 1.2 Aspectos epigenéticos

Durante o ciclo vital ocorrem fenômenos que envolvem alterações, as quais podem ser herdadas na expressão gênica, porém sem modificar a sequência de bases do DNA, diferente das mutações e potencialmente reversíveis, esses fenômenos se constituem no objeto de estudos da Epigenética (*Imprinting Genômico*); podendo acontecer, tanto por herança mitótica como meiótica, e explicam como organismos que apresentam sequências idênticas de DNA possuem evidentes diferenças fenotípicas (LEAL, 2013; MULLER; PRADO, 2008).

Os mecanismos epigenéticos são determinantes no controle de processos celulares regulares e parece estarem ligados à integração de sinais endógenos e ambientais durante a vida de uma célula ou organismo, podendo ser afetados por alterações do ambiente ou mudanças nos hábitos de vida (MULLER; PRADO, 2008).

Esses processos envolvem acetilação (lisina) e metilação (lisina ou arginina) de histonas. A desacetilação controlada pelas enzimas histonas deacetilases (HDACs) condensa a cromatina e impede a transcrição; DNA-Metiltransferases (DNMTs) recrutam as HDACs e outras proteínas de ligação à cromatina no sítio promotor do gene para desacetilação das histonas, quando as ilhas de CpG (dinucleotídeos do genoma) encontram-se hipermetiladas e as histonas desacetiladas, isso provoca a inativação gênica, os nucleossomos ficam mais compactados, a cromatina condensada, os grupos metil fornecem barreira física para a acessibilidade aos fatores de transcrição e inibem o acesso de proteínas reguladoras que promovem a transcrição (OLIVEIRA, 2012) (Figura 1).

Pesquisas já conseguiram associar a metilação do DNA com a suplementação de betaínas (ricas em grupos metil) provocando inativação gênica, fato que despertou a atenção para essas substâncias (OLIVEIRA, 2012; LEAL, 2013).

Microrganismos podem liberar moléculas sinalizadoras químicas baseadas em cisteína (cruzipaina), supostamente envolvidas com apoptose (morte celular programada), esse conhecimento pode ser aplicado como um considerável recurso no combate ao parasita (OLIVEIRA, 2012); sendo assim então, o código das histonas pode ser um foco de estudos muito interessante.

Alguns organismos possuem um padrão próprio de código epigenético apresentando uma característica variação antigênica que deve influenciar sua virulência. Em certos microrganismos, proteases com múltiplas funções têm sido selecionadas como alvos para o desenvolvimento de novos fármacos. Alguns exemplos desses fármacos são substâncias tais como a tricostatina, a benzamida e derivados do ácido hidroxâmico (MULLER; PRADO, 2008).

O indivíduo ao apresentar características epigenotípicas pode estar mais susceptível a influências ambientais que o próprio fator genotípico, podendo torna-lo mais vulnerável às variabilidades orgânicas e ao sistema imune do hospedeiro.

### **1.3 As Histonas**

Histonas são proteínas básicas pequenas constituintes do octâmero central dos nucleossomos, constituindo a unidade fundamental da cromatina; estando então as histonas e outras proteínas, envolvidas na organização e estruturação da cromatina, mantendo seu equilíbrio dinâmico (MENDIT; KANG, 2007; MORENO, 2008).

São constituídas de um domínio globular, no qual o filamento de DNA se enrola em uma cauda amino-terminal flexível sobressaindo-se do conjunto, carregada positivamente, cerca de um em cada quatro aminoácidos é de lisina ou arginina, o que contribui para interações e ligações com grupos fosfato negativamente carregados, do DNA; as caudas das histonas estão sujeitas a modificações pós traducionais do tipo acetilação, fosforilação, metilação e outras, afetando a função dos cromossomos (Figura 1), alterando carga eletrostática, criando, estabilizando, rompendo ou ocluindo domínios de interação na cromatina (MENDITTI; KANG, 2007).

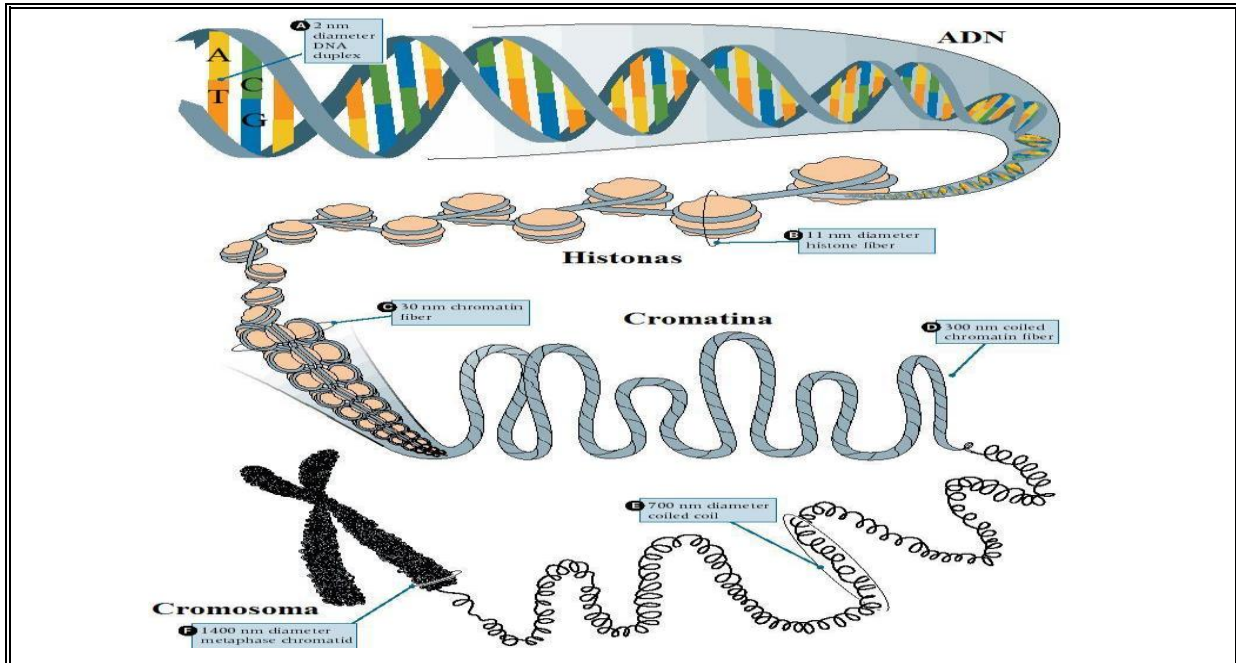


Figura 1 – Ilustração esquemática de condensação da cromatina.

Fonte: budaquantico.blogspot.com, 2015

As modificações podem estar associadas a genes ativos (acetilação) ou a genes, ativos e silenciosos, a depender de sua posição (metilação); modificações em histonas constituem a principal categoria transcricional de controle na regulação epigenética, representando uma complexidade informacional, que ficou conhecida como a Hipótese do Código das Histonas, que em combinação com o código do DNA permite a modulação da expressão gênica, realizada pela ação de enzimas específicas, as quais controlam a condensação da cromatina (MENDITTI; KANG, 2007; MORENO, 2008).

#### 1.4 A Histona Deacetilase (HDAC)

Histona Deacetilase, um grupo de metaloenzimas que apresentam em seu sítio ativo o íon divalente zinco ( $Zn^{2+}$ ), atuam removendo, através de catálise coordenada, grupos acetil ( $\epsilon$ -N-acetil lisina da histona) introduzidos covalentemente pela acetiltransferase, HAT; especificamente em histonas, as HDACs atuam aumentando as cargas positivas nas caudas aminoterminais, e reforçando as ligações com o DNA (Figura 1), o que conduz à condensação e previne a transcrição (GREGORETTI; LEE; GOODSON, 2004; MENDITTI; KANG, 2007), essas enzimas também estão envolvidas no recrutamento de complexos co-ativadores e co-repressores da transcrição, tornando-se, portanto, um alvo promissor no combate a patologias.

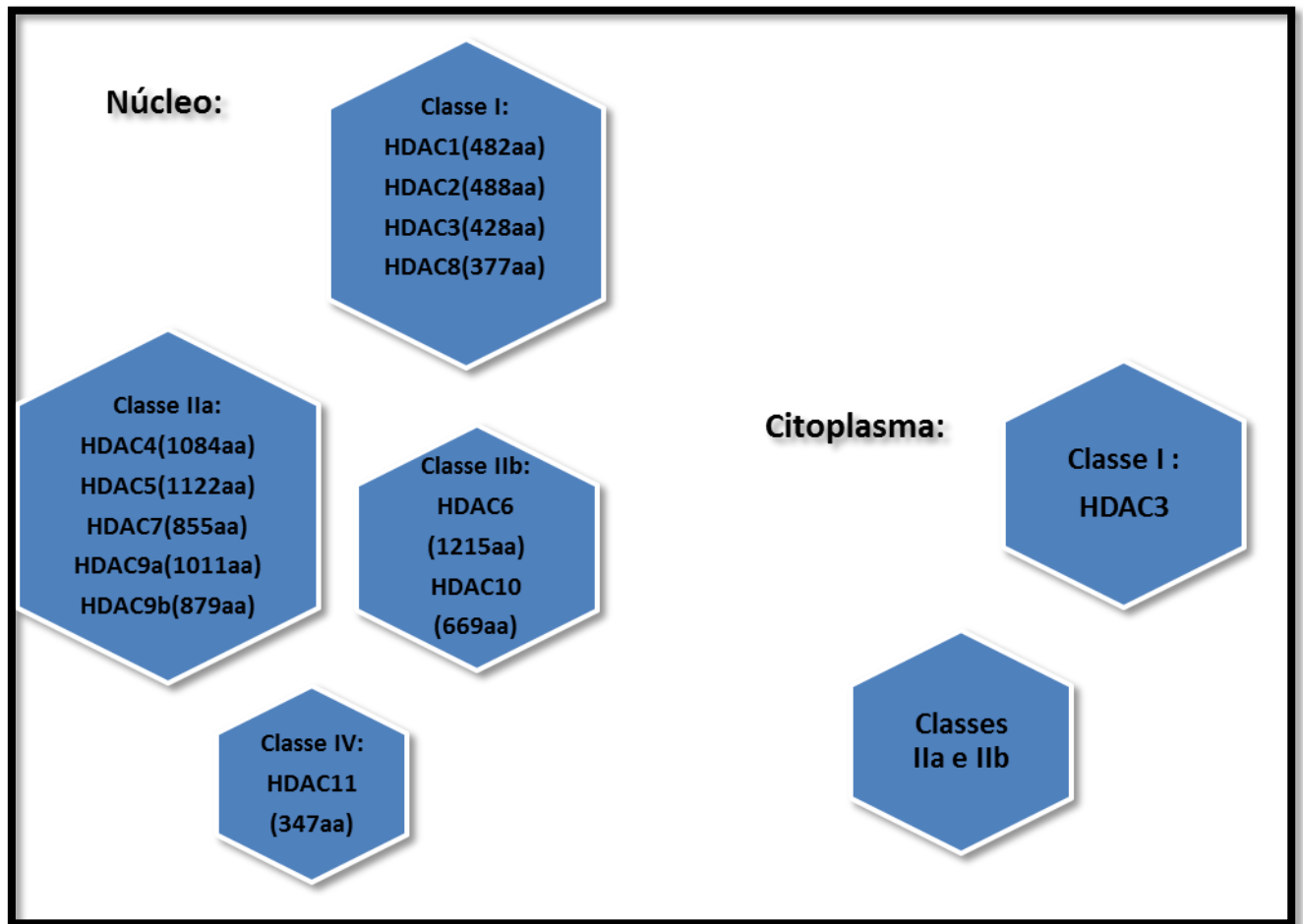


Figura 2 – Classes de HDAC e suas respectivas estruturas e localização na célula.

Fonte: Dados do trabalho



















Estão divididas em quatro classes, destacou-se a classe I, na qual está incluída a HDAC8, que são proteínas expressivas na maioria dos tecidos, com peso molecular variando entre 22 e 55 kDa (Figura 2), apresentando homologia em seus sítios catalíticos, e localização nuclear, embora a HDAC8 tenha sido encontrada em citoplasma de células de invertebrados (GREGORETTI; LEE; GOODSON, 2004) com similaridade à Rpd3 (proteína dependente de potássio reduzido 3) de leveduras.

A atividade das HDACs pode sofrer influência indireta, a depender de complexos fatores transcricionais envolvidos com modificações epigenéticas; são estudadas como alvos terapêuticos, muito promissores, contra o câncer (MORENO, 2008; SETO; YOSHIDA, 2014).

O sítio ativo da HDAC (Figura 3) é muito rico em espécies químicas carregadas negativamente, tais como aspartatos, o que deve favorecer interações com grupos positivamente carregados, aspecto interessante para o estudo de drogas inibidoras, pois, com a

inibição dessa enzima o desenvolvimento de patógenos deverá ser afetado (DELCUVE; KAHN; DA VIE, 2012; FERREIRA; MORAIS; MUNDIM, 2014; GUPTA et al., 2014).

Sistemas de monitoramento da atividade enzimática de HDACs têm sido realizados com sucesso, com a aplicação de sondas fluorogênicas (GONÇALVES; MARSAIOLI, 2014), e aprofundar o conhecimento sobre alvos farmacológicos, através de recursos tecnológicos aplicados à Química Medicinal, é um trabalho de relevante contribuição científica.

Class	Isoform	Yeast counterpart	Size	Co-factor	Location	Expression	Catalytic domain
(I)	HDAC1	RPD3	58	Zn <sup>++</sup>	N	Ubiquitous	 482 aa
	HDAC2		59		N		 488 aa
	HDAC3		50		N, C		 428 aa
	HDAC8		44		N		 377 aa
(IIa)	HDAC4	HDA1	120	Zn <sup>++</sup>	N, C	Specific	 1084 aa
	HDAC5		130		N, C		 1122 aa
	HDAC7		110		N, C		 952 aa
	HDAC9		160		N, C		 1011 aa
(IIb)	HDAC6	HDA2	160	Zn <sup>++</sup>	N, C	Specific	 1215 aa
	HDAC10		70		N, C		 (Inactive) 669 aa
(III)	SIRT1	Sir2	120	NAD <sup>+</sup>	N	Variable	 NAD 747 aa
	SIRT2		45		C		 NAD 389 aa
	SIRT3		28		M		 NAD 399 aa
	SIRT4		35		M		 NAD 314 aa
	SIRT5		36		M		 NAD 310 aa
	SIRT6		39		N		 NAD 355 aa
	SIRT7		48		N		 NAD 400 aa
(IV)	HDAC11	RPD3/HDA1	39	Zn <sup>++</sup>	N	Ubiquitous	 347 aa

*TRENDS in Microbiology*

Figura 3 – Caracterização do domínio catalítico das subclasses de HDAC.

Fonte: [www.cell.com](http://www.cell.com), 2015

## 2. QUÍMICA MEDICINAL

A farmacologia tem evoluído de um estágio rudimentar, quando se confundia com magia e religião, até o uso de ferramentas obtidas do desenvolvimento tecnológico, de um profundo conhecimento teórico e apresentando comprovação experimental (RANG et al., 1993; SILVA, 1994; VILLAS BOAS, 2003).

Os fármacos são substâncias químicas obtidas inicialmente de fontes naturais, desenvolvidas em laboratórios ou sintetizadas e produzidas em escala industrial (pureza >



98%) que, ao interagirem com o sistema orgânico vivo, têm a capacidade de alterá-lo ou modificá-lo funcionalmente, modulando uma resposta fisiológica, aplicadas com finalidade curativa, preventiva ou para fins de diagnóstico de patologias.

A atividade farmacológica de uma substância é determinada pela estrutura das moléculas envolvidas, o que implica no reconhecimento pelo receptor farmacológico do composto bioativo, considerando suas propriedades físico-químicas. Qualitativamente, essa atividade deve ser proporcional à contribuição de diferentes descritores, o que determinará uma modulação do efeito pretendido (KOROLKOVAS, 1988).

O principal problema que se enfrenta, com relação ao uso de fármacos em seres humanos, é a dificuldade em se obter substâncias com atividade seletiva e o mínimo ou nenhum efeito tóxico, decorrentes de sua natureza química, implicando uma elevada demanda de pesquisa.

A química medicinal surgiu no início do século passado, apresentando como objeto de estudo, as propriedades moleculares dos fármacos (KOROLKOVAS, 1988); segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), é a disciplina que estuda os aspectos relacionados à descoberta ou invenção dos fármacos, aspectos moleculares envolvidos em seu mecanismo de ação e aqueles que governam a absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade (ADME/T), incluindo a compreensão da relação entre a estrutura química e sua atividade terapêutica (REA; ou do inglês, SAR: *Structure-Activity Relationship*), incluindo planejamento e o desenho estrutural de novas substâncias que possuam propriedades farmacoterapêuticas úteis, capazes de representarem novos fármacos (BARREIRO; FRAGA, 2001; SILVA, 2004).

## 2.1 Aspectos da Química Medicinal

A ação farmacológica pode ser resumida em três fases:

- ✓ Fase farmacêutica (de exposição): ocorre desintegração da forma em que o fármaco é administrado. A fração da dose disponível para a absorção constitui medida da disponibilidade farmacêutica e é o resultado da técnica farmacêutica aplicada;
- ✓ Fase farmacocinética: engloba as etapas de absorção, distribuição, biotransformação e excreção do fármaco. A fração da dose que chega à circulação geral reflete a disponibilidade biológica. Em um processo farmacológico, a molécula do fármaco



pode sofrer ações determinadas pelas características específicas do organismo biológico;

- ✓ Fase farmacodinâmica: a partir do processo de interação entre o fármaco com seu biorreceptor; Desta interação resulta um estímulo que, após uma sequência de fenômenos químicos e bioquímicos, modulam um efeito fisiológico, assim como precisa, necessariamente, exercer ações efetivas e decisivas nesse organismo, para promover, com eficácia, o efeito terapêutico esperado (KOROLKOVAS, 1988; SILVA, 2004).

A ação farmacológica pode desencadear um efeito terapêutico ou colateral, e de acordo com o tipo de interação, os fármacos podem ser classificados segundo o mecanismo de ação, em estruturalmente específicos e estruturalmente inespecíficos:

- ✓ Fármacos estruturalmente específicos são altamente seletivos, pois sua atividade resulta da interação com sítios bem definidos de determinadas biomacromoléculas (receptores ou bioreceptores), apresentando uma relação definida entre a estrutura do fármaco e a atividade exercida; a esse grupo pertencem as drogas que interagem com enzimas (VILAS BOAS, 2003).
- ✓ Fármacos estruturalmente inespecíficos: sua atividade é resultante de uma interação com pequenas moléculas ou íons, encontrados no organismo, e suas propriedades físico-químicas; a solubilidade, o pKa, o poder oxido-redutor e a capacidade de adsorção definem as ações e efeitos biológicos (BARREIRO; FRAGA, 2001; THOMAS, 2003; VILAS BOAS, 2003).

### 2.1.1 A interação entre fármaco e o bioreceptor

A capacidade que a molécula bioativa (ligante) apresenta de formar um complexo com o sítio ativo do bioreceptor, define sua afinidade por este receptor; essa interação requer uma atividade intrínseca que se observa na resposta biológica, podendo ser expressa em termos de eficácia intrínseca; essa interação deve acontecer em três pontos, resultando assim, em um aumento de sua atividade (BARREIRO; FRAGA, 2001; THOMAS, 2003).

Durante a ação farmacológica pode-se observar a importância de fatores tais como, distâncias interatômicas, forças intermoleculares, solubilidade, grau de ionização e estereoquímica, os quais representam aspectos que afetam a farmacocinética.

Sabe-se que a atividade farmacológica de um determinado composto pode ser definida por fatores específicos e característicos, chamados em química farmacêutica de descritores (BARREIRO; FRAGA, 2001; THOMAS, 2003).

As principais forças intermoleculares envolvidas podem ser as eletrostáticas (ligações iônicas, íon-dipolo, dipolo-dipolo), de dispersão de London (van der Waals), hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e as ligações covalentes, as quais irão influenciar diretamente no grau de afinidade e especificidade destas interações, as quais implicam em eventos onde moléculas não polares apresentando dipolos induzidos momentâneos se aproximam, resultando em uma flutuação local variante de densidade eletrônica entre grupos não polares adjacentes; o que pode ocorrer em ligações C-H ou C-C de cadeias não polares e interações não polares entre cadeias, promovendo a saída de água de solvatação entre estas, também pode ocorrer um ganho entrópico, levando a uma desestabilização do sistema durante a interação.

A Ligação de hidrogênio é a mais importante interação não covalente existente nos sistemas biológicos. Ocorre entre heteroátomos eletronegativos (por exemplo, O e N) e átomos de hidrogênio ligados a átomos ou grupos elétron-retiradores (O-H, N-H, C-F<sub>2</sub>-H).

A ligação covalente representa um tipo de interação pouco comum decorrente da formação de ligações *sigma* entre o fármaco e o sítio de ligação; esses complexos (fármaco-receptor) são difíceis de serem desfeitos, levando à inibição enzimática irreversível ou inativação do receptor.

Fatores como o volume do ligante, distâncias interatômicas e arranjo espacial entre os grupos farmacofóricos são de fundamental importância na interação entre a molécula bioativa e a biomacromolécula receptora, constituindo os fatores estereoquímicos envolvidos nessa interação:

- ✓ A biomacromolécula apresenta, na grande maioria dos casos, um sítio de ligação específico para um determinado ligante, e que devido à natureza quiral dos seus aminoácidos constituintes, na maioria dos casos, influenciam na atividade biológica diferenciada, promovida por fármacos enantioméricos, o que implica na denominada configuração absoluta.
- ✓ Em alguns casos a posição dos grupamentos farmacofóricos de um ligante cíclico ou olefínico, isto é, que apresente isomeria cis-trans ou E-Z, determina o que se conhece como configuração relativa, na interação.
- ✓ Ao analisar-se o arranjo espacial variável das moléculas, devido à rotação das ligações *sigma*, e verificar-se que estereoisômeros se encontram em equilíbrio tão rápido que,

em condições comuns, não podem ser isolados, mas podem ser convertidos de um para outro, mediante rotação e deformação e sem ruptura de ligações, esses passam a receber a denominação de confômeros.

- ✓ Por fim, as distâncias interatômicas de micromoléculas também constituem importantes fatores determinantes na estereoquímica da interação fármaco-receptor.

Formalizando, pode-se analisar a atividade farmacológica considerando-a como uma função de diferentes descritores em uma relação de proporcionalidade:

$$f(\mathbf{x}, \mathbf{y}, \mathbf{z}) = \mathbf{x} + \mathbf{y} + \mathbf{z} \quad (2.00)$$

O estudo da relação entre a molécula bioativa e a macromolécula bioreceptora (SAR ou REA) pode ser realizado usando descritores físico-químicos: analisando-se moduladores do receptor, associando-os a efeitos correspondentes, a atividade de grupos químicos e sua influência na interação fármaco-receptor em condições plasmáticas, que provocam, por exemplo, impedimento estérico, repulsão eletrostática e interações lipofílicas, conduzindo a uma interpretação básica em química medicinal: semelhanças estruturais entre moléculas diferentes são traduzidas em interações semelhantes com o alvo farmacológico; Sendo assim, existem requisitos mínimos para a modulação de um determinado sítio receptor, e a representação gráfica desses requisitos é denominada de Mapa Farmacofórico.

Em um mapa farmacofórico são destacados grupos funcionais que geralmente se referem a tipos de substituintes presentes no composto em estudo, que se liguem à molécula do receptor-alvo, e recebem a denominação de Grupos Farmacofóricos (GRUPO DE BIOINFORMÁTICA ESTRUTURAL da UFRGS, 2015, <http://www.ufrgs.br/bioinfo/>).

#### 2.1.1.1 Propriedades biofarmacêuticas

As propriedades físico-químicas implicam diretamente naquelas chamadas de Propriedades Biofarmacêuticas, as principais são hidrossolubilidade, lipofilia, grau de ionização, difusividade e polimorfismo, e irão determinar sua interação com o sistema biológico definindo a eficácia terapêutica; essas propriedades precisam contribuir para que haja uma facilitação na absorção e distribuição, aumentando a concentração do fármaco nos sítios ativos, e facilitando uma orientação específica na superfície do receptor, para que seja

desencadeada a sequência de eventos moleculares que irá conduzir ao efeito farmacológico, do contrário o resultado pode vir a ser precário ou totalmente ineficaz (BARREIRO, 2001).

#### 2.1.1.2 Bioisosterismo

A identificação de semelhanças da quantidade, distribuição e comportamento eletrônico, entre estruturas diferentes, foi definida como isosterismo; isósteros são átomos, íons ou moléculas em que as camadas periféricas de elétrons podem ser consideradas idênticas. Em estudos e trabalhos da química farmacêutica foram introduzidos compostos com a mesma ação farmacológica ou até mesmo antagônica, constituindo a mais ampla definição de isósteros, apresentada por Friedman como bioisósteros em 1951, classificado e subdividido por Burger em 1970 (BARREIRO; FRAGA, 2001; THOMAS, 2003).

Em isosterismo clássico, os compostos, ao sofrerem substituição por um átomo ou grupo de átomos, dão origem a um composto com disposição estérica e configuração eletrônica idêntica à do protótipo; e segue, em geral, as exigências preconizadas pelas definições de Grimm e Erlenmeyer; o bioisosterismo não-clássico, não atende a essas regras, mas produzem atividade biológica similar, com o manejo de grupos interconvertíveis.

A busca por fármacos que apresentem características mais adequadas e assegurem uma resposta terapêutica mais eficaz, tem sido o maior desafio para os cientistas. Conhecimentos sobre bioisosterismo constituem-se em uma importante ferramenta nas estratégias de modificação molecular utilizadas pelos químicos medicinais no processo de modificação racional de compostos protótipos.

As variações de propriedades físico-químicas de compostos, através de estratégias de modificação molecular aliadas à modelagem molecular e outras ferramentas tecnológicas, vem possibilitando muito sucesso na síntese de novas substâncias bioativas (BARREIRO; FRAGA, 2001; THOMAS, 2003).

## 2.2 Pesquisa e desenvolvimento (P&D) de fármacos

A quimioterapia enfrenta problemas, cujas perspectivas de solução são desafiadoras, revelando uma necessidade crescente de que sejam desenvolvidas ações estratégicas eficientes através dos trabalhos de equipes multidisciplinares muito bem sincronizadas; a compreensão e o entendimento da importância dos sistemas químicos no processo de modulação de sistemas biológicos têm contribuído muito para a evolução das pesquisas e o desenvolvimento de

fármacos, aumentando as possibilidades de alternativas para obtenção de soluções farmacológicas mais racionais (AGUIAR; SOUZA, 2010; AMIN, 2013; DIAS et al., 2009; FERREIRA, 2012).

O objetivo da terapêutica com a aplicação de fármacos no tratamento de doenças infecciosas tem sido atingir o próprio agente causal, limitado pelo nível de atividade tóxica que essas substâncias alcançam no organismo, dada a sua baixa especificidade, pois parece que muitos metabólitos altamente reativos, formados em decorrência do mecanismo de ação de fármacos, podem atuar em outros sistemas bioquímicos, especialmente no organismo humano, desencadeando uma série de efeitos indesejáveis, restringindo seu uso e eficácia terapêutica (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

Esse relevante inconveniente tem deliberado muito esforço na busca pelo melhoramento dos fármacos em uso, e na pesquisa por novas alternativas farmacológicas (BIGATÃO, 2011). A busca por novos alvos terapêuticos, tem se apresentado como uma dessas alternativas com fortes possibilidades de êxito.

O processo evolucionário do planejamento de fármacos que inicialmente era fenotípico, no qual se priorizava o efeito final dos compostos bioativos, para que em seguida fosse investigado o mecanismo de ação e a relação entre estrutura e atividade, atualmente trata-se de um planejamento genotípico, visando-se o conhecimento da doença em bases moleculares, etapa essa realçada pelo sequenciamento do genoma humano; uma abordagem na qual se considera o planejamento racional de fármacos, em que a busca por alvos moleculares responsáveis por determinada atividade farmacológica e mecanismo de ação seja prioritária.

A partir dos alvos são planejados compostos potencialmente mais ativos e depois se procuram as relações com a atividade, de forma que possam permitir o aprimoramento dessa atividade, sendo de grande relevância para as pesquisas em doenças negligenciadas e crônico-degenerativas (FERREIRA, 2012).

Entre os mais promissores, estão alguns novos derivados de triazol que são capazes de inibir enzimas como C14- $\beta$ -esterol desmetilase. Os ensaios pré-clínicos do posaconazol e do ravuconazol, demonstraram atividade anti-*T. cruzi* relevante, resultando na avaliação em estudos clínicos de fase II, do posaconazol e um pró-fármaco do ravuconazol (E1224) para a doença de Chagas, porém enfrentando dificuldades, em decorrência do alto custo de produção (BASTOS, 2013).

Em P&D de novos fármacos, é necessária uma adequada diversificação de estratégias, envolvendo um trabalho multidisciplinar e interdisciplinar (DIAS et al., 2009; FERREIRA,

2012; SILVA; LEITE, 2011) o que ampliará um leque de alternativas terapêuticas consideravelmente mais eficazes (ROCHA, J., 2010).

A OMS vem desenvolvendo programas de incentivo à Química Medicinal para Doenças Negligenciadas (FERREIRA, 2012; LEITE et al., 2009), mas os recursos e investimentos ainda são insuficientes, pois as constantes variabilidades e adaptações biológicas dos parasitas reduzem a eficácia do repertório de fármacos disponíveis (DELCUVE; KAHN; DA VIE, 2012).

As pesquisas e estudos têm demonstrado que a atividade de alguns fármacos se dá por inibição enzimática em vias metabólicas vitais dos organismos, pois as enzimas desenvolvem um importante papel na bioquímica dos processos biológicos, revelando-se como alvos moleculares farmacologicamente muito eficazes (DIAS et al., 2009; FERREIRA, 2012; FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2011).

As inovações científicas e tecnológicas têm contribuído efetivamente para a evolução nas pesquisas por novos fármacos, intensificando a busca por inibidores enzimáticos, tais como os inibidores da cruzaina (CRZ) (SILVA; LEITE, 2011), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (LEITE et al., 2009; ROCHA, J., 2010), tripanotona redutase (TR) (PITA; PASCUTTI, 2012); adicionando-se aos alvos enzimáticos mais estudados e pesquisados, estão a C14-?-esterol desmetilase, a hipoxantina-guanina fosforibosil transferase, a diidrofolato redutase, a esqualeno sintetase, a oxidosqualeno ciclase (BASTOS, 2013) e, entre outros, encontram-se, com especial destaque e diversificada aplicabilidade, os inibidores da histona deacetilase (iHDAC), em decorrência do seu papel fundamental na regulação da expressão gênica (DELCUVE; KAHN; DA VIE, 2012).

### 2.3 Mecanismos de inibição enzimática

Reações catalisadas por enzimas (*E*) aceleram a transformação de um substrato (*S*) em um produto (*P*), diminuindo a energia de ativação para essa reação (*EA*),



e que podem ter sua velocidade decrescida, pela ação de inibidores específicos (Figura 4).

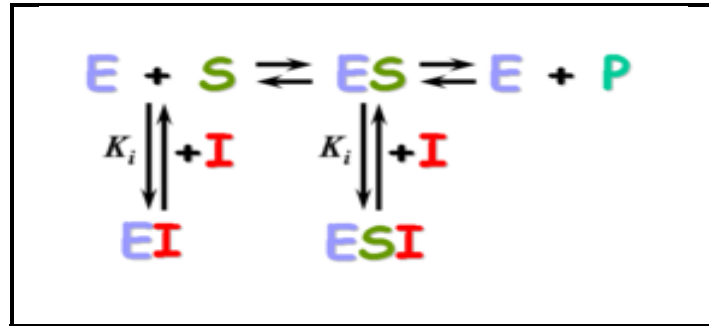


Figura 4 – Esquema de reações catalisadas por enzimas e sob a ação de inibidor enzimático; observa-se que o inibidor pode competir ou não, com o substrato, pelo sítio ativo da enzima.  
Fonte: [www.scielo.com.br](http://www.scielo.com.br)

Inibidores enzimáticos são compostos que, ao se combinarem com enzimas, impedem que esta possa interagir normalmente com o substrato (Figura 4). Isso pode, inclusive, explicar a toxicidade de substâncias nocivas e a ação de muitas drogas; sendo de fundamental importância para se compreender o mecanismo de ação dessas substâncias, além de fornecer relevantes informações sobre as enzimas (ROCHA, J., 2010).

São três mecanismos de inibição enzimática reversível (LEITE et al, 2009; LEITE et al., 2011; MARQUES; YAMANAKA, 2008): competitivo, não-competitivo e incompetitivo.

Os inibidores enzimáticos do tipo competitivo (Figura 5) devem competir com o substrato, para se combinarem ao sítio ativo da enzima, impedindo a interação entre enzima e substrato, enquanto estiver ocupando o sítio ativo, parecendo aumentar a  $K_M$  (Constante de Michaelis), mas por se tratar de uma ligação reversível, o inibidor está constantemente se dissociando e se associando à enzima, possibilitando então nesse intermédio, uma interação do substrato com o sítio ativo. Essa interação pode ser escrita de forma semelhante à interação entre enzima e substrato, porém o inibidor não é quimicamente transformado em produto:



Atenta-se que na expressão 2.02 a formação de  $EI$  é dependente de  $[I]$ , tal como a formação de  $ES$  depende de  $[S]$  na expressão 2.01, a velocidade de uma reação de inibição competitiva depende diretamente das concentrações relativas de  $S$  e  $I$ , em uma determinada concentração fixa da enzima ( $E$ ); Quando  $[S] \gg [I]$  aumenta a probabilidade da enzima se ligar mais ao  $S$  do que ao  $I$ .

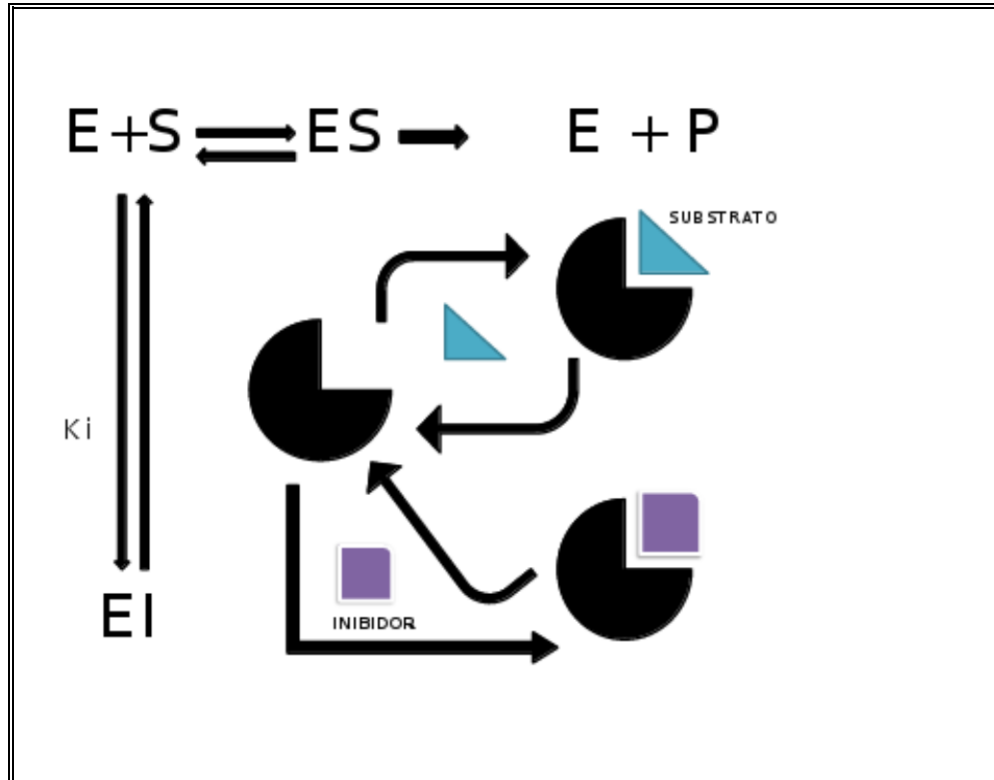


Figura 5 – Modelo ilustrativo de inibição competitiva.

Nota-se que as moléculas de inibidor e substrato devem possuir aspectos estruturais em comum e que a presença de um inibidor reversível não afeta a  $k_{cat}$  (Constante de Catálise), verificando-se que, quando  $[S] \rightarrow \infty$ ,  $v_0$  (velocidade inicial) se aproxima de  $V_{máx}$  (velocidade máxima da reação), e a *Equação de Michaelis-Menten* de uma reação que sofre inibição competitiva, assume a forma,

$$v_0 = V_{máx}[S] / ?K_M + [S] \quad (2.03)$$

onde ? é um fator que modifica  $K_M$ , e cujo valor (? : grau de inibição) depende da concentração e afinidade do inibidor pela enzima:

$$? = 1 + [I] / K_i \quad (2.04)$$

a  $K_i$  (constante de inibição) representa a constante de dissociação do complexo, enzima-inibidor ( $EI$ ):

$$K_i = [E][I] / [EI] \quad (2.05),$$



a qual, quanto menor for seu valor, significa que o inibidor está ligado mais fortemente à enzima.

Podem ser reconhecidos, cineticamente, inibidores competitivos, analisando-se o efeito de  $[I]$  sobre a relação  $V$  e  $[S]$ , obedecendo a seguinte equação, que tem incorporada a  $K_i$  de  $[EI]$ :

$$1/V = K_M/V_{m\acute{a}x}(1+[I]/K_i)1/[S] + 1/V_{m\acute{a}x} \quad (2.06)$$

Ao se testar o poder inibitório de medicamentos, a análise de valores da constante de inibição ( $K_i$ ) é muito útil junto aos fatores determinantes da eficácia farmacoterapêutica (ver Figura 6).

No caso da inibição enzimática do tipo não-competitiva essa relação entre o grau de inibição e  $[S]$  inexistente; sendo a inibição dependente exclusivamente de  $[I]$ ; o que indica que a formação de  $EI$  ocorra em um sítio da enzima diferente daquele ao qual o substrato se ligue:



onde os complexos  $EI$  e  $ESI$  são inativos e existem duas constantes de dissociação ( $K_i^{ES}$  e  $K_i^{ESI}$ ).

Na inibição enzimática do tipo incompetitiva (ou incompetitiva), observa-se uma combinação reversível do inibidor, exclusivamente com o complexo  $ES$ , originando o complexo  $ESI$ , o qual não pode gerar produtos:

$$K_i = [ESI] / [ES][I] \quad (2.09)$$

Esse tipo de inibição não se reverte com o aumento da concentração de substrato  $[S]$ , sendo mais comumente encontrada em reações enzimáticas com mais de um substrato.

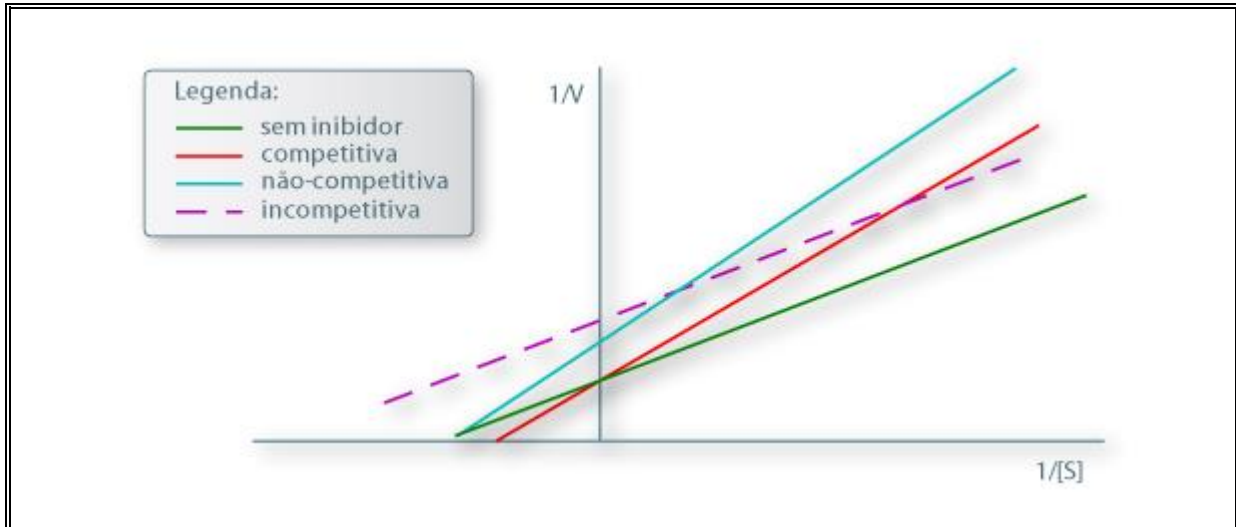


Figura 6 – Gráfico comparativo entre atividade enzimática e os tipos de inibição.

Fonte: [www.labvirtual.eq.uc.pt](http://www.labvirtual.eq.uc.pt), 2015

Uma substância que modifique covalentemente a cadeia lateral de aminoácidos em proteínas, pode ser um inibidor enzimático irreversível potencial. Esses tipos de inibidores atuam como agentes marcadores de afinidade (*affinity labels*) ou como inativadores enzimáticos com base no mecanismo (*mechanism-based inactivators*), provocando modificações covalentes na enzima (AGUIAR; DE SOUZA, 2010; GIACOBBO, 2011; JAYTHILAKA, 2014; ZULANTAY et al, 2011).

Ao se analisar as informações obtidas com relação à função das histonas e à ação das HDACs sobre aspectos vitais e genéticos de organismos, deve-se observar que uma ação parasiticida pode decorrer da inibição da HDAC e ser satisfatoriamente efetiva, assim como também deva acontecer contra o crescimento descontrolado de células tumorais.

### 2.3.1 Inibidores da Enzima HDAC (iHDAC)

Algumas moléculas que inibem a atividade catalítica de enzimas atuam impedindo reversivelmente sua interação com o substrato e promovendo alterações no desenvolvimento celular (LEITE et al., 2009; LEITE et al., 2011; MARQUES; YAMANAKA, 2008). No caso da HDAC, sua inibição resulta na abertura da cromatina, provocando o acúmulo de histonas acetiladas e leva ao aumento da expressão de genes específicos silenciados, provocando alterações de morfologia, metabolismo, diminuição da proliferação, aumento do grau de diferenciação e apoptose nas células, o que conduz à parada do ciclo celular (na fase G1 e/ou

G2), sendo geralmente associada com a ativação transcricional. Conseqüentemente, o estudo dos inibidores enzimáticos é fundamental para se compreender o mecanismo de ação dessas substâncias, além de fornecer relevantes informações sobre as enzimas (ROCHA, J., 2010).

Veldic e colaboradores (2007) em seu estudo sugeriu que a inibição da HDAC poderia revelar fármacos candidatos a potenciais estabilizadores do humor, e segundo Mill e colaboradores (2008), o estresse ambiental pode induzir modificações em histonas e alterações na expressão gênica repercutindo em depressão. A ação desses inibidores pode ser potencializada com o uso concomitante de inibidores da metilação, promovendo um efeito aditivo (SANTOS, 2009).

Os inibidores da HDAC são uma família de compostos que vêm se destacando pela sua potencial aplicação na terapêutica contra câncer e doenças degenerativas, e seu estudo tem contribuído substancialmente para a compreensão dos mecanismos genéticos e epigenéticos, além da possibilidade de serem aplicados em vários tipos de patologias infectocontagiosas, parasitárias (JAYTHILAKA, 2014; VERVERIS et al., 2013).

A possibilidade dos inibidores provocarem alterações morfológicas exige muito critério e atenção por parte dos pesquisadores, para assegurar a eficácia terapêutica e minimizar os riscos para o organismo humano (AMIN, 2013; CARRASCO, 2011).

Diversas classes estruturais de iHDAC, tanto naturais como sintéticas, são classificadas com base em suas estruturas moleculares e sua especificidade (JAYTHILAKA, 2014; VERVERIS, 2013), destacam-se alguns, tais como os Ácidos Hidroxâmicos, Tetrapeptídeos Cíclicos, Benzamidas, Cetonas Eletrofílicas e Ácidos Graxos Alifáticos de Cadeia Curta, apresentando como semelhanças na maioria desses compostos, a presença de um anel aromático e um grupo funcional com capacidade de quelação ao sítio catalítico da HDAC (Figura 7).

Um montante considerável de pesquisas vem sendo realizado e apresentando resultados significativos para os iHDACs (SILVA; LEITE, 2011), algumas já apontaram ácido valpróico (AVP) e butirato de sódio (BS) com ação inibidora ou diminuição da atividade das HDACs no sistema nervoso, dependendo da forma como são aplicadas e da área afetada (ARENT et al., 2010; VERVERIS et al., 2013).

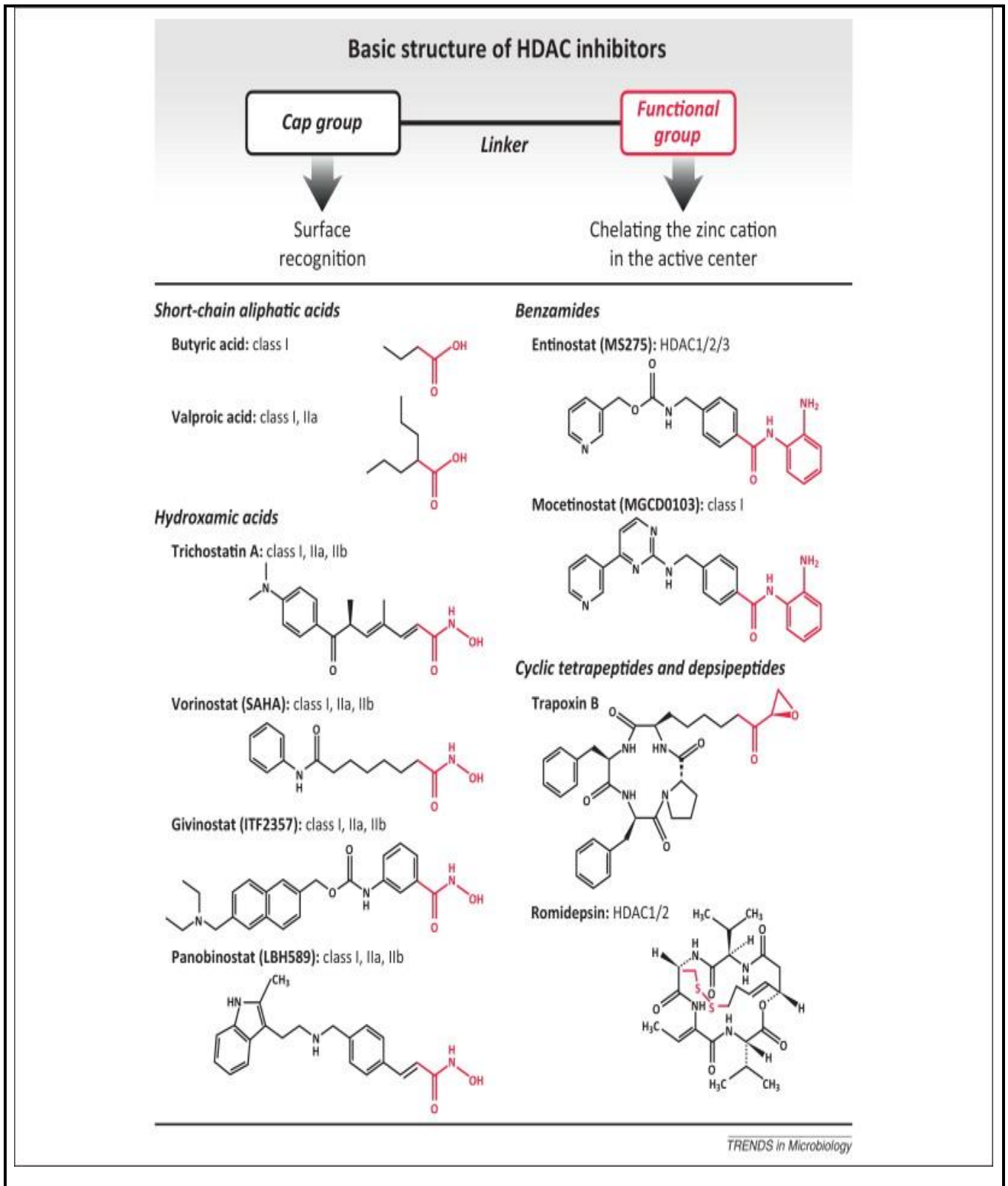


Figura 7 – Estruturas básicas de iHDAC, destacando grupo funcional.

Fonte: [www.cell.com](http://www.cell.com), 2015

### 2.3.1.1 Butirato de Sódio (NaB ou BS)

O Butirato de Sódio é reconhecido como um potente inibidor reversível, não competitivo, da desacetilação de histonas, auxilia mecanismos anti-câncer, tais como apoptose, diferenciação e parada do ciclo celular, potencializando os efeitos citotóxicos de alguns fármacos, sugerindo ser um promissor agente terapêutico em leucemias, tanto como adjuvante quanto isoladamente. Fenilbutirato de sódio encontra-se em ensaios clínicos para o tratamento de doença de Huntington, esclerose lateral amiotrófica, leucemia linfocítica crônica e linfoma, e o butirato de pivaloiloximetil ou Pivanex, um pró-fármaco do ácido butírico, encontra-se em ensaios clínicos para o tratamento de doenças como melanoma maligno, leucemia linfocítica crônica e linfoma (LEAL, 2013; SANTOS et al., 2009).

### 2.3.1.2 Ácido Valproico (AVP ou VPA)

O Ácido valproico tem sido testado em enfermos com infecção por HIV, doenças degenerativas e outros processos patológicos, agindo na forma de seu sal (valproato de sódio) e em associações, como agente desmetilante; estudos *in silico*, têm comprovado a ação do VPA em células tumorais e derivados muito mais potentes (LUGO, 2011), e no sistema nervoso, parece apresentar outros alvos moleculares como Ácido Gama-Amino-Butírico (GABA) e Proteína Quinase C (PKC) (ARENT et al., 2010).

### 2.3.1.3 Benzamidas

Benzamidas são inibidores das Classes I, II e III de HDAC, que apresentam uma estrutura composta pela 2-aminoanilida, a qual contata com aminoácidos específicos presentes no sítio ativo em forma de túnel, situados no núcleo dessas enzimas, com ou sem a participação do íon zinco; destacam-se o MS-275 (SNDX-275 ou Entinostat) e o MGCD0103 (Mocetinostat), ambos seletivos para a classe I das HDAC. O Entinostat inibe as enzimas HDAC através da sua ligação ao local ativo, quelando-se ou não ao íon zinco, resultando na acetilação de histonas e na regulação dos genes envolvidos na diferenciação e apoptose, sendo aplicado em diversos estudos clínicos de doenças degenerativas. O Mocetinostat age como Entinostat, porém provocando uma hiperacetilação de histonas e apoptose, apresentando uma relevante atividade antiproliferativa em células tumorais (LEAL, 2013; OLIVEIRA, L., 2012).

#### 2.3.1.4 Tetrapeptídeos Cíclicos (TPCs)

A classe dos peptídeos cíclicos tem demonstrado viabilidade em virtude de fármacos com terapêutica comprovada; foram obtidos resultados favoráveis do Depsipeptídeo ou FK228 (Romidepsin, Istodax) e do Vorinostat (Zolinza) os quais já obtiveram aprovação da FDA e da EMEA para o tratamento de linfomas (VERVERIS et al., 2013).

Trata-se de uma classe composta por um tetrapeptídeo cíclico que pode ou não apresentar um grupo funcional muito comum em iHDAC hidrofóbicos, denominado de L-AOE (ácido S-2-amino-9,10-epoxi-8-oxodecanóico), em que o grupo epoxicetona parece ser o responsável essencial pela atividade (redução ou ataque nucleofílico) que inativa estes compostos. Romidepsin (Istodax®) é o fármaco mais conhecido desta classe, porém não possui o grupo AOE, tendo sido inicialmente isolado de uma bactéria, é considerado um pró-fármaco, pois seu mecanismo de ação envolve a redução da ligação dissulfeto da molécula, tornando-o ativo (ditiol monocíclico) após ser captado por parte das células; sua atividade induz a diferenciação, interrompendo o crescimento e provocando apoptose, podendo exercer ação inibitória a metástases e angiogênese (LEAL, 2013; WEST; JOHNSTONE, 2014).

#### 2.3.1.5 Sirtuínas

Sirtuínas são também uma classe de iHDAC promissora, por estarem envolvidas em processos biológicos vitais com relevante atividade em doenças do envelhecimento, repercutindo também em doenças metabólicas, neurodegenerativas e câncer; compostos associados à ativação de sirtuínas são derivados do fenol (quercetina, piceatanol e resveratrol) que ativam as sirtuínas conferindo benefícios para os diversos tipos de patologias neurodegenerativas, inflamatórias, autoimunes e tumores.

O Resveratrol apresenta, entre os seus benefícios, uma capacidade preventiva em doenças cardiovasculares, habilidade para induzir a vasodilatação devido a sua interação com o óxido nítrico, e pode tornar-se uma solução possível para o câncer ou para uma maior sensibilização aos quimioterápicos quando o organismo desenvolve resistência, atuando em vários tipos de câncer. Seu mecanismo de atuação, pode ser através do bloqueio do crescimento de células tumorais, bloqueio do ciclo celular, apoptose, ou através do aumento da atividade anti-inflamatória e anti-oxidante (LEAL, 2013; SETO; YOSHIDA, 2014).

### 2.3.1.6 Ácidos Hidroxâmicos (AHs)

A classe de iHDAC que mais tem sido submetida a ensaios clínicos nas mais diversas patologias, são os ácidos hidroxâmicos (AHs), revelando fármacos como o Vorinostat, Panabinstat (LBH589), CHR-3996, CHR-2845, SB939, Givinostat (ITF2357) e Belinostat (PXD101). Na presença de AHs, tais como Tricostatina (TSA) e Suberoilânida do Ácido Hidroxâmico (SAHA), a HDAC perde atividade rapidamente, devido à forte ligação destes ácidos com metais, que é a característica responsável por estimular sua ampla experimentação como agentes terapêuticos.

Os AHs inibem o sítio ativo hidrofóbico da HDAC, sob a forma tautomérica do seu ânion e quela-se ao átomo de zinco ( $Zn^{2+}$ ); para que seja atingida uma ação terapêutica eficaz, é necessária uma alta concentração de AHs (BIELIAUSKAS; WEERASINGHE; PFLUM, 2007; CARRASCO, 2011; GUERRA-BUBB et al., 2013; GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010; KANDAKLATA, 2013; LIZ; SILVEIRA; BRAGA, 2013).

Concentrações de TSA em níveis inferiores aos preconizados na literatura (100 nM) podem promover acetilação de histonas em células tronco embrionárias, sem causar prejuízos na proliferação celular (OLIVEIRA et al., 2011).

Estudos das energias dos orbitais de fronteira de AHs cíclicos associaram atividade biológica ao caráter eletrofílico da função hidroxâmica (BRAVO; CLAVIJO; WHEISS-LÓPEZ, 2001), outros estudos comprovaram que métodos semi-empíricos comparativos, embora com restrições, podem ser usados em sistemas que contenham funções AHs, e que em se tratando da velocidade desses métodos, apontou-se para seu uso em estudos de interação entre enzimas e AHs (SANT'ANNA; SOUZA, 2002).

Estudos de QSAR, rotas de síntese e análise molecular, têm sugerido que análogos de AHs podem revelar-se potentes inibidores da proliferação celular, tornando-os alvos promissores para P&D de fármacos (WANG et al., 2003; ZHAO et al., 2013; ZHU et al., 2014).

O LBH589 está em estágio avançado de ensaios clínicos em linfomas, leucemias e mieloma múltiplo; moléculas mais seletivas, como a CHR-3996 9 (inibidor seletivo da Classe I das HDACs) têm demonstrado potencial atividade anti-neoplásica e a SB939, um inibidor de HDAC com propriedades farmacocinéticas e físico-químicas melhoradas, por não interferir com outras enzimas que apresentam ligações com o zinco, favorece a ação anti-proliferativa

contra vários tipos de tumores e distúrbios hematológicos; os fármacos ITF2357 e o PXD101, que são inibidores da classe I e II das enzimas HDAC, vêm obtendo amplo destaque nos ensaios clínicos, se mostrando promissores no tratamento de doenças hematológicas; o Vorinostat (SAHA – ab 144480), é o fármaco mais evoluído na classe dos iHDAC, foi o primeiro iHDAC aprovado pela FDA (*Food and Drugs Administration*) e EMEA (*European Medicines Agency*) para uso em linfomas; está sendo utilizado em diversos ensaios clínicos, puro ou em associação, para diversas doenças; apresenta IC50 de aproximadamente 10nM em inibição de células livres, atinge o IC50 em 72Hs, sua concentração de atividade é de 01 – 10  $\mu$ M a T = 37°C em HDAC-8; e parece apresentar uma importante relação com a possibilidade de combate *in vivo* ao vírus HIV (BIELIAUSKAS; WEERASINGHE; PFLUM, 2007; VERVERIS et al., 2013).

## 2.4 Perspectivas Farmacológicas

A interação entre o fármaco e o receptor é estudada através de análises dedutivas sobre atividades funcionais e geométricas dos descritores físico-químicos, obtendo-se informações relacionadas ao impedimento estérico, repulsão eletrostática e interações lipofílicas, o que vem contribuir para as interpretações da química medicinal através dos estudos e análises do mapa farmacofórico (SHULTZ et al., 2011; VERLI, 2012).

Os fármacos que interagem com enzimas, são moléculas cujo arranjo espacial dos grupamentos funcionais é uma condição necessária para complementar o sítio de ligação da biomacromolécula (interação estereo-específica), pela sua afinidade, complexar com o sítio ativo desta molécula, e dessa interação se constatar uma eficácia intrínseca satisfatória (VILAS BOAS, 2003).

Para que o processo interativo decorra, as principais forças intermoleculares envolvidas podem ser: as forças eletrostáticas, dispersão de London (interações de van der Waals), forças hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e ligações covalentes, influenciando diretamente no grau de afinidade e especificidade da interação. São concomitantemente importantes as distâncias interatômicas, solubilidade, grau de ionização e estereoquímica; o volume do ligante, as distâncias interatômicas e arranjo espacial entre os grupos farmacofóricos são os fatores estereoquímicos envolvidos nessa interação (BARREIRO; FRAGA, 2001; THOMAS, 2003).



### 2.4.1 Caracterização e estudo dos ácidos hidroxâmicos

Todos os derivados de Ácidos Carboxílicos têm um carbono de NOX = +3 (exceto o ácido fórmico, no qual o carbono tem NOX = +2), e que os ácidos hidroxâmicos são aqueles derivados cujo radical (R) que substitui em reposição à hidroxila da carboxila é uma função de nitrogênio do tipo, R = NHOH, apresentando tautomeria (Figura 8).

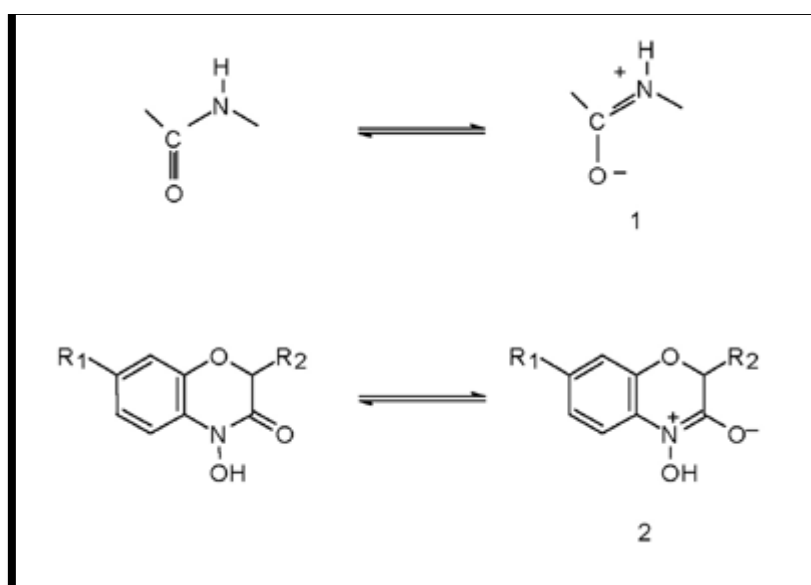
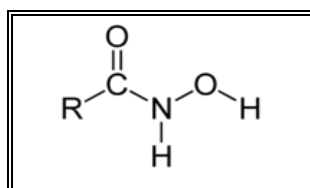


Figura 8 – Fórmula estrutural geral dos ácidos hidroxâmicos, e respectivos tautômeros.

Em alguns casos a posição dos grupamentos farmacofóricos de um ligante cíclico ou olefínico (isomeria cis-trans ou E-Z; ver Figura 8) determina a configuração relativa na interação (Figura 8). Cálculos de entropia e entalpia para grande número de moléculas aumentam o custo computacional e podem inviabilizar o processo; usam-se programas que minimizam esses problemas, beneficiando o processo de docagem com a inclusão de moléculas de água conservadas. Considera-se o estado de protonação, posição dos hidrogênios nos átomos polares das cadeias laterais e conformação da amida nos resíduos de glutamina e asparagina dos sítios de ligação (FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2011).

Complexos Cu-hidroxamatos favorecem mais a formação de complexos ternários com aminoácidos que apresentem grupo imidazol na histidina do que com aqueles que possuem apenas os grupos amina e carboxilato (FERNANDES; PANIAGO; CARVALHO, 1997).

AHs cíclicos, na forma 2-beta-O-D-Glicosídeos atuam sobre insetos, fungos e bactérias de vegetais; e a forma 2-4-diidroxí-7-metoxí-1,4-benzoxazin-3-ona (DIMBOA) inibem enzimas envolvidas em várias vias metabólicas (SANT'ANNA; SOUZA, 2002).

Estudos das energias HOMO (do inglês, *Highest Occupied Molecular Orbital*) e LUMO (do inglês, *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) de AHs cíclicos sugeriram que a maior atividade biológica estaria associada ao caráter eletrofílico da função hidroxâmica (BRAVO; CLAVIJO; WHEISS-LÓPEZ, 2001).

A tautomeria do ânion de AHs parece justificar a capacidade desses ácidos de quelar-se tanto a metais como também a compostos não metálicos; essa capacidade é afetada por efeito do solvente, devido à solvatação que favorece a ionização (dissociam-se tendo o Nitrogênio ou o Oxigênio ácido), uma vez ionizado na forma ceto ou iminol, pode estar na configuração E ou Z. A forma Z favorece a redução de energia desses ácidos na presença de substituintes metil, ciano e benzil. O isômero E da forma tautomérica ceto apresenta uma forte ligação de hidrogênio intramolecular (em torno de 1,9Å, *p/ ab initio*).

Estudos sugerem que a forma ceto é favorecida em solventes polares, enquanto a forma iminol é favorecida em solventes apolares, e indicaram estabilidade do isômero Z; essa pequena diferença de energia sugere que todas as formas podem estar presentes em solventes comuns.

Substituintes também podem favorecer a forma iminol, e embora a forma zwitteriônica seja instável, o substituinte betaína permite sua estabilização. É provável que a forma iônica dos AHs ocorra por desprotonação do oxigênio do grupo OH, há evidências experimentais e teóricas de que o nitrogênio também possua a mesma capacidade de desprotonação, variando de acordo com o tipo de solvente utilizado (LUGO, 2011; MONTEL, 2011).

Moléculas de AHs podem ser criteriosamente alteradas, para que se possa minimizar o problema das altas concentrações no espaço químico-biológico, obtendo-se análogos de maior afinidade pelo sítio ativo do receptor. Nesse trabalho foi sugerida a betaína como substituinte.

#### 2.4.2 Betaínas

As betaínas são substâncias amplamente encontradas na natureza, que vem despertando interesse, principalmente, pelo seu papel como osmorregulador; São aminoácidos totalmente

N-metilados (Figura 9) que desempenham importante atividade no metabolismo de diversos organismos biológicos, pois seu acúmulo nas células é capaz de conferir proteção contra o estresse osmótico por permitir a continuidade da atividade metabólica em condições que normalmente inativariam as células (TEIXEIRA et al., 2006).

Ao contrário de muitos sais, a betaína apresenta uma boa compatibilidade com enzimas, sendo assim o teor dela nas células e organelas celulares pode ser elevado sem que prejudique o metabolismo; seu principal efeito fisiológico, portanto é como osmólito (protegendo as células, proteínas e enzimas, de estresse ambiental) e como doador de radicais metil (transmetilação), participando do ciclo da metionina.

Betaínas têm mostrado proteger órgãos internos, melhorar os fatores de risco de doenças vasculares, além de serem importantes nutrientes (CRAIG, 2004).

O Cloridrato de Betaína já foi usado como fonte de ácido clorídrico (HCl) no tratamento de hipocloridria; também já foram utilizadas no tratamento de doenças hepáticas, hipercalemia, homocistinúria e em distúrbios gastrointestinais (CRAIG, 2004).

Afetaram o tempo máximo de esporulação e a biologia de esporocistos e oocistos de *E. acervulina*, mas pouco influenciaram no desenvolvimento de estágios endógenos (TEIXEIRA et al., 2006).

No processo descrito para a preparação de betaínas, a amina terciária de partida é inicialmente quaternizada com um ácido até que não seja mais detectável qualquer halogênio organicamente ligado; a solução de betaína pronta apresenta a pureza requerida em relação à amina de partida e ao composto de halogênio orgânico (AIGNER; VYBIRAL; SEITZ, 1995).

A betaína ( $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$ , nomenclatura pela IUPAC: acetato de trimetilamônio) é então, um derivado trimetilado da glicina (Glicilbetaína-N,N,N-trimetil-glicina), que naturalmente ocorre como íon dipolar contendo vários grupos metila quimicamente reativos, podendo doá-los em reações catalisadas por enzima; e apresenta as seguintes propriedades:

- ✓ Massa molar = 116.13g/mol,
- ✓ PF = 301°C(>300°C decompõe-se) e
- ✓ Solubilidade em água = 611 g/l(a 19°C)
- ✓ E apresenta  $\text{DL}_{50} = 830\text{mg/kg}$  (INPI, 2006).

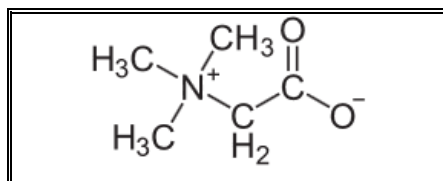


Figura 9 – Estrutura molecular plana de betaína.

Estudos realizados através de cálculos semi-empíricos e *ab initio*, em famílias de betaínas piridínicas, revelaram um fenômeno de inversão HOMO-LUMO, não observado em outro sistema do tipo doador-aceitador, podendo alterar o caráter doador ou aceitador dos grupos presentes na molécula (PEIXOTO, 2002).

Estudos da incorporação específica de íons na superfície de micelas zwitteriônicas de sulfobetainas, a torna mais aniônica e atrai íons  $\text{H}_3\text{O}^+$  da solução para a pseudofase micelar, diminuindo o pH local e catalisa a reação de hidrólise ácida (PRIEBE, 2009).

#### 2.4.3 Betaínas Hidroxâmicas (BHs)

Em termos gerais o íon ônio ou onium pode referir-se a um cátion (com seu contraíon) derivado pela adição de um próton a um hidreto mononuclear, relacionado do nitrogênio (por exemplo, o íon amônio  $\text{H}_4\text{N}^+$ ) e relacionado ao grupo 17 (família dos halogênios) ou também derivados formados por substituição desses íons por grupos univalentes pertencentes ao grupo 15 (família do nitrogênio) e grupo 16 (família do oxigênio), como o dimetilsulfônio ( $(\text{CH}_3)_2\text{S}^+$ ) e o tetrametilamônio ( $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_4\text{N}^+$ ). Os derivados que surgem são, geralmente, designados por um nome específico de classe, tal como íon *imínio* ( $\text{R}_2\text{C}=\text{NH}_2^+$ ) e *nitrílio* ( $\text{RC}\equiv\text{NH}^+$ ).

Existe uma conhecida ambiguidade histórica na definição do zwitteríon pela sua peculiaridade característica; nesse contexto, um grupo específico está sendo definido como zwitteríon  $\pi$ -conjugados, ao qual pertence um tipo de moléculas com um sistema doador-aceptor; a betaína é uma classe particular por apresentar um átomo ônio que não o hidrogênio; esses estudos vêm contribuindo para esclarecimentos de nomenclatura e comportamento químico principalmente em análises de orbitais de fronteira (HOMO e

LUMO) entre outros, vislumbrando um novo cenário na química de compostos heteroaromáticos (BEVERINA; PAGANI, 2014).

Betaínas reúnem características bastante favoráveis para formarem análogos com os AHs, formando as Betaínas Hidroxâmicas (EVANS; NAIK, 1977), (Figura 10) e aumentar a afinidade pela HDAC. Pois, em virtude da presença do nitrogênio quaternário, podem apresentar características muito peculiares para essas interações.

As metodologias de síntese para tais compostos já são conhecidas, e alguns destes já foram utilizados como surfactantes devido a sua característica como tensoativo anfótero; são bons detergentes com ação germicida, muito utilizados associados a detergentes não iônicos e também em amaciantes de roupas (MARSCHNER; HARDY, 1992).

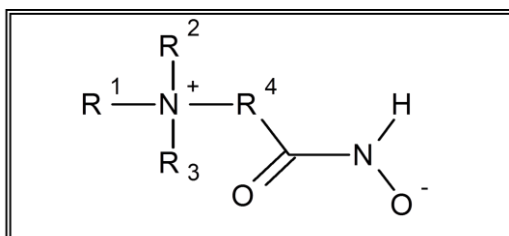


Figura 10 – Estrutura molecular geral de Betaínas Hidroxâmicas.

### 3. QUÍMICA COMPUTACIONAL

Propriedades químicas podem ser previstas e fundamentadas pela química teórica, consolidada desde que a expressão de Schrödinger começou a ser aplicada para descrever a estrutura eletrônica de sistemas e de interações moleculares, em 1926.

Atualmente a ciência da computação pode resolver problemas químicos, aplicando resultados da química teórica, introduzidos em computadores, obtendo informações teóricas a respeito de moléculas e sólidos, confirmando dados experimentais e/ou prevendo fenômenos, ainda não observados, mediante a aplicação de vários métodos e estratégias (FERNANDES, 2011; MORGON, 2001).

### 3.1 Métodos em Química Computacional

Vários modelos estão sendo utilizados em estudos e pesquisas no planejamento de fármacos e compostos bioativos. Para que seja feita uma análise bem elaborada e segura, a escolha eficiente de ferramentas e métodos adequados ao processo depende das propriedades que se deseja avaliar, da precisão desejada e da capacidade computacional disponível para a realização dos cálculos; podemos dividir os métodos em duas principais categorias, os métodos clássicos e os métodos quânticos, porém outros métodos podem ser utilizados de acordo com as características e necessidades do estudo (SANT'ANNA, 2009).

#### 3.1.1 Métodos Clássicos

##### 3.1.1.1 Mecânica Molecular (MM)

Mecânica Molecular (MM) é uma metodologia cujos cálculos definem tipos atômicos para a determinação de parâmetros e funções que constituem o campo de força de interação, na qual é destacado um parâmetro de considerável importância para a camada tratada por MM, principalmente para reações em meio enzimático, que é a carga atômica; esta interfere diretamente na contribuição eletrostática sobre o sistema da mecânica quântica (QM) (TELES, 2011).

Baseando-se na aproximação de Born-Oppenheimer que, em decorrência da ação que o campo potencial exerce sobre os núcleos, considera o movimento nuclear, e os elétrons são considerados indiretamente, supondo que a densidade eletrônica pode ajustar-se instantaneamente a qualquer alteração geométrica dos núcleos, assumindo uma liberdade de movimento para estes, em que todas as interações nucleares são aditivas.

A superfície de Born-Oppenheimer é conhecida em mecânica molecular como superfície de energia potencial, multidimensional, que possui mínimos locais em relação a certas conformações moleculares estáveis, e em uma primeira aproximação, a molécula é descrita pela estrutura correspondente ao mínimo global da superfície potencial (COELHO et al, 1999).

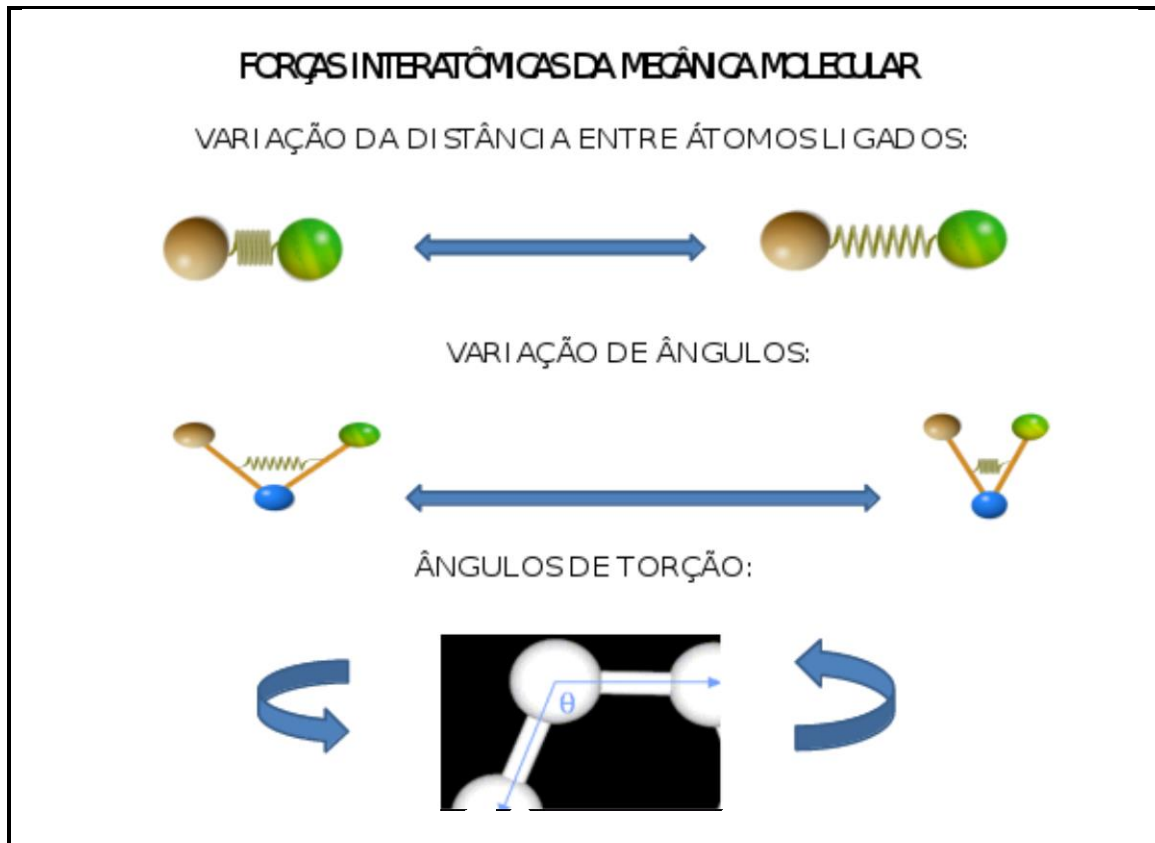


Figura 11 – Forças interatômicas analisadas em Mecânica Molecular.

Em MM os cálculos utilizam uma série de equações derivadas empiricamente para essa superfície, nas quais o formalismo matemático está baseado em um modelo de mecânica clássica de estrutura molecular, usando um modelo de uma molécula composta por átomos que se mantêm unidos por ligações; nesses modelos são aplicados parâmetros tais como constantes de forças de tensão da ligação, flexão da ligação, são permitidas interações entre átomos não ligados, construindo uma expressão da energia potencial que se trata da união das posições atômicas (Figura 11).

Ao minimizar a expressão para diversos confôrmeros, a MM pode prever geometrias de equilíbrio e energias relativas, efetuando os cálculos das energias de estiramento da ligação ( $V_{ten}$ ), flexão do ângulo de ligação ( $V_{flex}$ ), flexão fora do plano ( $V_{ffp}$ ), torções em torno das ligações ( $V_{tor}$ ), as interações entre esses movimentos (que são os termos cruzados:  $V_{crz}$ ), atrações e repulsões de van der Waals entre átomos não ligados ( $V_{vdw}$ ) e interações eletrostáticas entre átomos ( $V_{el}$ ); o resultado da soma dessas contribuições é a energia potencial da MM ( $V$  é chamada de energia estérica) para um sistema molecular com uma ou várias moléculas:

$$\mathbf{V} = \mathbf{V}_{\text{ten}} + \mathbf{V}_{\text{flex}} + \mathbf{V}_{\text{ffp}} + \mathbf{V}_{\text{tor}} + \mathbf{V}_{\text{crz}} + \mathbf{V}_{\text{vdW}} + \mathbf{V}_{\text{el}} \quad (3.00)$$

As moléculas são consideradas como uma série de átomos ligados entre si por forças elásticas ou harmônicas, que derivam das funções de energia potencial associadas às contribuições estruturais: comprimento de ligação ( $r$ ), ângulos de ligação ( $\theta$ ), ângulos diedros ( $\varphi$ ) e interações não-ligantes ( $d$ ); esse conjunto de funções é conhecido como campo de força, que representa a energia potencial molecular em relação a uma geometria de referência em um determinado sistema de coordenadas.

As expressões explícitas de cada termo definem o campo de força da MM, uma vez que as derivadas da função energia potencial determinam as forças que atuam sobre os átomos, podendo ser aplicadas, em detrimento da precisão da MQ, a sistemas mais complexos (em torno de 1000 átomos), pelo fato de que seus cálculos são muito mais rápidos, implicando em economia de tempo computacional (LEVINE, 2001).

$$V = \sum V_r + \sum V_\theta + \sum V_\varphi + \sum V_d \quad (3.01)$$

A energia ( $V$ ) de uma molécula em um campo de força é o somatório de todas as contribuições, a qual é conhecida como a energia estérica da molécula, considerada como sendo a diferença entre a energia da molécula real e da molécula hipotética.

Em se tratando da molécula hipotética, todos os parâmetros estruturais são valores ideais ou naturais, os quais são definidos para uma situação em que não existem quaisquer tensões entre as coordenadas internas do sistema molecular.

Na equação 3.01,  $V_r$  é a energia da  $i$ -ésima ligação na qual o comprimento  $r$  difere do seu valor ideal  $r_{0_1}$  dado por:

$$V_r = \sum_i \frac{k_i}{2} (r - r_{0_2})^2 \quad (3.02)$$

$V_\theta$  é a energia de deformação de ligação, dada pela equação:

$$V_\theta = \sum_\theta \frac{K_{\theta(\theta-\theta_0)}^2}{2} \quad (3.03)$$



onde  $K_\theta$  é a constante de força,  $\theta$  o ângulo de ligação e  $\theta_0$  o ângulo de ligação ideal.  $V_\phi$  é a energia decorrente da torção em torno de uma ligação, dada por:

$$V_\phi = \sum_\phi \frac{K_\phi (1 \pm \cos n\phi)}{2}$$

onde a constante de força é  $K_\phi$ ,  $\phi$  o ângulo torsional (Figura 11),  $n$  a periodicidade de  $K_\phi$ , e  $V_d$  é a energia da interação entre átomos não ligados, que é dada por:

$$V_d = \sum F_r \left\{ \frac{-2}{\alpha^6} + \exp[12(1 - \alpha)] \right\} \quad (3.05)$$

Na equação 3.05,  $F_r$  representa a constante de força,  $\alpha = \frac{r}{r_1^* + r_2^*}$ , onde  $r_1^*$  e  $r_2^*$  constantes de *van der Waals* e  $r$  é a distância entre os átomos não ligados. Não há rigidez de critérios com relação ao número ou tipos de funções de energia potencial a serem empregados, sendo uma escolha feita de acordo com as propriedades moleculares que se pretende reproduzir; sejam, cálculos das propriedades geométricas, cálculos das propriedades geométricas e vibracionais, cálculos das propriedades geométricas e termodinâmicas, cálculos das propriedades geométricas, vibracionais e termodinâmicas.

Os cálculos da MM nas expressões da energia potencial derivam de três tipos básicos de campo de força:

- ✓ Campo de Força Central – considera apenas distâncias interatômicas (inclusive comprimentos de ligação),
- ✓ Campo de Força de Valência Geral – considera comprimentos e ângulos de ligação, ângulos diedros, coordenadas de deformação fora do plano e adicionam os termos cruzados,
- ✓ Campo de Força de Urey-Bradley – consideram os comprimentos e ângulos de ligação, ângulos diedros, coordenadas de deformação fora do plano e as interações entre átomos ligados por um centro comum.

O campo de força de valência simples, que é um campo de força central, no qual são incluídos ângulos de ligação e diedros, e coordenadas de deformação fora do plano, reproduz bem as propriedades geométricas moleculares de energias mínimas, alturas de barreiras de rotação interna, entalpias de formação e funções termodinâmicas, mas não as propriedades vibracionais.

Embora os cálculos para a generalização de uma função potencial permitam que os resultados obtidos apresentem uma concordância com os cálculos experimentais, sua complexidade requer um desgastante trabalho matemático e uma considerável dificuldade em se selecionar os termos cruzados, pois é impossível a inclusão de todos, então essa escolha deve ser empírica.

O campo de força aplicado no programa utilizado nesse trabalho foi o Tripos ([www.tripos.com](http://www.tripos.com), 2015) utilizado em moléculas pequenas, proteínas e para o desenho de drogas. Para o cálculo da energia potencial de tensão ( $V_{tens}$ ) das ligações, são usadas funções quadráticas, assim como para calcular a energia potencial de flexão ( $V_{flex}$ ) das ligações, onde  $\theta_{IJK}^0$  é o valor de referência p/ ângulo de ligação do tipo  $IJK$ :  $V_{flex,ijk} = \frac{1}{2} K_{IJK} (\theta_{ijk} - \theta_{IJK}^0)^2$ ; A energia de torção ( $V_{tor}$ ) em pares de átomos 1-4 usa uma forma mais simples, contendo apenas um parâmetro,  $\frac{1}{2} V_n [1 + \cos(n\phi - \phi_0)]$ , em que  $n$  vem do número de mínimos contidos em  $360^\circ$  do potencial de torção e  $\phi_0$  determina a posição dos mínimos.

As interações de van der Waals, em que são consideradas todas a partir de 1-4, sendo que 1-2 e 1-3 são consideradas implícitas nos termos dos parâmetros de tensão e flexão das ligações:  $V_{vdW, ij}$  é igual às forças de atração devido à dispersão de London adicionada à repulsão devido a repulsão de Pauli, e nesse caso o Tripos calcula como Potencial de Lennard-Jones 12 - 6.

Ligações Conjugadas, em cálculos do Tripos, as distâncias de ligação de referência e as constantes de força de tensão dependem não apenas dos tipos de átomos, como também da ordem de ligação na estrutura de Lewis. A Parametrização, como todos os parâmetros de campos de força, influenciam em todas as propriedades moleculares calculadas, sendo assim um processo iterativo (LEVINE, 2001).

Em cálculos de MM a função de energia potencial ( $V$ ) para uma molécula de  $N$  átomos, definida em termos das  $3N$  coordenadas,  $x_i$ , quando deformadas de sua geometria de energia potencial ( $V_0$ ) pode ser escrita na forma de uma expansão em séries de Taylor. Pode-se fazer uma aproximação harmônica, desconsiderando os termos superiores aos quadráticos no ponto de equilíbrio, uma vez que os deslocamentos  $\Delta x_i, \Delta x_j, \Delta x_k$  são infinitesimais.

Considerando  $V_0 = 0$ , na geometria de equilíbrio e aplicando-se o de mínimo de energia potencial a essa geometria, o termo  $\frac{\partial U}{\partial x_i}$  deve ser teoricamente igual zero, ficando a energia potencial dependente apenas das segundas derivadas:

$$V = \frac{1}{2} \sum_{ij=1}^{3N} \left( \frac{\partial^2 U}{\partial x_i \partial x_j} \right)_0 \Delta x_i \Delta x_j \quad (3.06)$$

Para que seja obtida uma relação de campo de força harmônico as segundas derivadas da equação 3.06 devem ser substituídas pelos símbolos  $f_{ij}$ :

$$V = \frac{1}{2} \sum_{ij=1}^{3N} f_{ij} \Delta x_i \Delta x_j \quad (3.07),$$

descrevendo assim um sistema de osciladores harmônicos acoplados no qual os subscritos  $i = j$  são os termos da diagonal principal e  $i \neq j$  são os termos fora da diagonal da matriz das constantes de força; quando apenas os termos da diagonal são considerados os osciladores estão desacoplados:

$$V = \frac{1}{2} \sum_{ij=1}^{3N} f_{ij} \Delta x_i^2 \quad (3.08)$$

Pode-se então, descrever a curva de energia potencial pela Lei de Hooke:

$$V = \frac{1}{2} k (\Delta x)^2 \quad (3.09),$$

onde  $k$  é a constante de força do oscilador harmônico. Este resultado pode ser formulado em termos das coordenadas internas moleculares dando origem aos campos de força com potenciais harmônicos.

Para os deslocamentos,  $\Delta x_i$ , fora do limite de validade da aproximação harmônica, os termos superiores da equação 3.08 devem ser considerados; isto significa que efeitos anarmônicos estão incluídos. A aproximação mais utilizada para descrever esses efeitos, consiste em truncar a expansão em séries de Taylor após o termo cúbico, para os comprimentos de ligação e para os ângulos de ligação. A função potencial para estas coordenadas assume a forma:

$$V = \frac{1}{2}k_r(r - r_0)^2 + k'(r - r_0)^3 \quad (3.10),$$

$$V = \frac{1}{2}k_\theta(\theta - \theta_0)^2 + k'_\theta(\theta - \theta_0)^3 \quad (3.11),$$

onde  $k_r, k'_r, e k_\theta, k'_\theta$ , são os parâmetros de energia que representam as constantes de forças harmônicas e os subscritos correspondem às coordenadas internas referidas; esse tipo de função adequa-se a comprimentos de ligação muito afastados do limite demarcado pela Lei de Hooke. Pode-se optar por outros refinamentos, principalmente na função torsional, em que a função energia potencial seja substituída por uma função periódica do tipo:

$$V_\theta = \frac{1}{2}k_\theta(1 + s \cos n\theta) \quad (3.12),$$

em que  $s = +1$  ou  $-1$ , a depender da existência da forma eclipsada ( $\Phi=0$ ) correspondente a um máximo ou mínimo de energia potencial torsional, e  $n$  é a periodicidade da energia potencial torsional;  $V_\theta$  aqui, também pode ser substituída por uma expansão da série de Taylor, truncada após o terceiro termo.

Outro importante refinamento é a inclusão do termo  $vdW$  na equação 3.02, descrevendo assim, em função da distância entre os núcleos, as interações entre átomos separados por mais do que duas ligações. A energia potencial total das interações entre um par de átomos é a soma das energias das forças atrativas (forças de dispersão de London) e das forças repulsivas (repulsões de van der Waals). As funções de energia potencial, mais utilizadas para descrever estas interações, são o potencial de Lenard-Jones ( $V_{LJ}$ ) e o potencial de Buckingham ( $V_{Buck}$ ), cujas respectivas equações podem ser acrescentadas com termos referentes às interações eletrostáticas  $\frac{q_i q_j}{r_{ij}}$ .

De acordo com a técnica empregada, os vários métodos de MM para que se encontre o mínimo de energia potencial, encontrando a coordenada em que a energia é um mínimo, partindo-se de uma coordenada inicial, podem ser agrupados da seguinte forma:

- ✓ Métodos de Primeira Ordem: calculam apenas as primeiras derivadas da função de energia potencial e geralmente se utilizam o algoritmo Steepest Descent;
- ✓ Métodos de segunda ordem: calculam as primeiras e segundas derivadas da função de energia potencial, utilizando o algoritmo Newton-Raphson.

No caso de se localizar o mínimo da função de energia potencial, o uso de coordenadas atômicas cartesianas é mais favorável que coordenadas internas; o processo após se transformar as coordenadas em cartesianas, em decorrências das aproximações, deve ser resolvido iterativamente aplicando-se os métodos padrões. Esse processo deve ser repetido até que sejam encontrados valores suficientemente pequenos (zero ou próximos de zero) de forma que na iteração final a primeira derivada possa ser anulada.

As primeiras e segundas derivadas da função de energia potencial podem ser determinadas numericamente ou analiticamente, ou ainda, as primeiras derivadas avaliadas analiticamente e as segundas derivadas obtidas numericamente; ocasionalmente o algoritmo Simplex tem sido aplicado.

Após essa sequência de cálculos, a energia potencial obtida pode ser utilizada para calcular os números de onda vibracionais que adicionando aos dados de momentos de inércia, calculados a partir da geometria final, podem ser utilizados para cálculos de contribuições utilizadas na avaliação de funções termodinâmicas para o estado gasoso (ALBUQUERQUE, 2008; LEVINE, 2001).

Alguns dos métodos de destaque da MM são o CHARMM (*Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics*), o AMBER (*Assisted Model Building with Energy Refinement*), o GROMOS (*Groningen Molecular Simulation*) e o OPLS (*Optimized Potentials for Liquid Simulations*) (SILVA, 2012); a sequência, então, seria escolher o tipo de coordenadas a ser adotado, selecionar função potencial e parâmetros para realizar os cálculos de minimização de energia, até finalizar calculando-se os espectros vibracionais e as funções termodinâmicas obtendo-se o resultado conclusivo (ALBUQUERQUE, 2008; LEVINE, 2001).

### 3.1.1.2 Dinâmica Molecular

A Dinâmica Molecular consiste em uma forma de simulação computacional, cujas bases teóricas são muito bem fundamentadas para simular o comportamento mecânico de sistemas moleculares, englobando vários resultados que foram produzidos por grandes nomes da mecânica clássica, com o objetivo de estudar o comportamento de um sistema de partículas em função do tempo, tratando-as de modo não quântico. Na Dinâmica Molecular Clássica as técnicas consistem em resolver as equações de Newton e outras relacionadas, para uma coleção de partículas, obtendo-se a velocidade e a posição da partícula, em cada instante da simulação, e fornecendo informações sobre o comportamento dinâmico microscópico, dependente do tempo, dos átomos individuais que compõem o sistema.

A solução numérica é obtida a partir de uma série de etapas sequenciadas da equação de movimento, que pode ser descrita para um sistema atômico simples, na forma:

$$F_i = m_i a_i, \quad (3.13),$$

em que  $a_i = \frac{d^2 r_i}{dt^2}$ ,  $F_i$  é a força que atua sobre cada partícula do sistema em um instante de tempo  $t$ , e  $a_i$  é a aceleração do átomo  $i$  de massa  $m_i$  (FERREIRA; dos SANTOS; ANDRICOPULO, 2011).

Ao se definir o campo de força, possibilita-se o cálculo das forças que atuam em cada átomo, calculando-se a derivada primeira da energia potencial, obtida do campo de força escolhido, em relação às posições desses átomos; a partir desse ponto, integram-se as equações de movimento para que sejam obtidas as velocidades, cuja integral proporciona a mudança de posição do átomo; com as novas informações sobre posição e velocidade da partícula, obtêm-se as energias potencial e cinética do sistema.

Repetindo-se sucessivamente esse procedimento pode-se construir o conjunto de posições e velocidades de cada partícula no decorrer do tempo, o que é denominado de trajetória.

Dessa forma é possível estudar propriedades físicas de solventes, comportamento de uma molécula em solução, incluindo-se mudanças conformacionais e disposição do solvente ao redor dela, essa molécula em estudo pode ser simples ou uma macromolécula complexa, mistura de líquidos, separação de fases e formação de estruturas complexas, tais como micelas, micelas reversas, microemulsões e filmes (NAMBA; da SILVA; da SILVA, 2008).

### 3.1.2 Métodos Quânticos

Schrödinger, em seus estudos, concluiu que só seria possível a determinação correta da energia de um sistema atômico com a inclusão de um comportamento ondulatório que foi proposto por De Broglie para todas as partículas (núcleos e elétrons) que constituem esse sistema, o que foi descrito em uma equação que mescla os princípios de Hamilton com a dualidade onda-partícula:

$$\hat{H}\Psi = \hat{E}\Psi \quad (3.14)$$

Essa equação não possui solução analítica para sistemas moleculares, necessitando-se recorrer a aproximações e simplificações para viabilizar sua resolução. A aproximação de Born-Oppenheimer é bastante utilizada e vem funcionando bem; esta divide o hamiltoniano do sistema, separando o movimento nuclear do movimento eletrônico, o que é justificado pela grande diferença de massa existente entre elétrons e núcleos; implicando-se em resolver a equação de Schrödinger para a parte eletrônica e em seguida para o movimento nuclear, assim demonstrada para um sistema molecular:

$$\hat{H}(\mathbf{r}, \mathbf{R})\Psi(\mathbf{r}, \mathbf{R}) = \hat{E}\Psi(\mathbf{r}, \mathbf{R}) \quad (3.15)$$

Nessa equação “ $\mathbf{R}$ ” se refere às coordenadas nucleares e “ $\mathbf{r}$ ”, às coordenadas eletrônicas. O hamiltoniano ( $\hat{H}$ ) contém termos de energia cinética e de atração eletrostática entre elétrons e núcleos:

$$\hat{H} = \mathbf{T}_N + \mathbf{T}_e + \mathbf{V}_{Ne} + \mathbf{V}_{NN} + \mathbf{V}_{ee} \quad (3.16)$$

onde cada termo representa uma fração das interações existentes no sistema, relacionados aos índices,  $N$  e  $e$ , respectivamente, núcleos e elétrons.

Baseados nesses princípios e aliados à evolução constante da ciência e da tecnologia, alguns métodos, classificados como quânticos, têm sido desenvolvidos, e aplicados de acordo com as características e possibilidades do sistema em estudo (LEVINE, 2001). Destaca-se o método do campo autoconsistente Hartree-Fock; nessa aproximação considera-se o modelo de partícula independente e o princípio de exclusão de Pauli para escrever a função de onda atômica, cuja formula geral é:

$$\hat{F}_{\varphi_i} = \varepsilon_i \varphi_i \quad i = 1, 2, 3, \dots, n \quad (3.17)$$

Onde  $\varphi_i$  é o  $i$ ésimo spin-orbital, o operador  $\hat{F}$  é o operador de Fock ou de Hartree-Fock, que é o Hamiltoniano HF efetivo, e o autovalor  $\varepsilon_i$  é a energia do spin-orbital  $i$  (LEVINE, 2001).

### 3.1.2.1 Métodos semi-empíricos

Esses métodos foram desenvolvidos com o objetivo de economizar tempo de máquina e promover redução de memória; para que isso fosse alcançado, muito esforço foi necessário na

introdução de parâmetros empíricos ou previamente calculados, para que se obtivesse a resolução da equação de Schrödinger, com a eliminação de algumas das muitas integrais necessárias aos cálculos quânticos (SANT'ANNA, 2002; SANT'ANNA, 2009).

Constituem métodos que utilizam o mesmo formalismo quanto-mecânico como aqueles que empregam conjuntos de bases incluindo apenas elétrons da camada de valência do sistema, pois são esses os elétrons envolvidos numa reação química, e outros fenômenos moleculares. Apresentam como vantagem, em relação ao método *ab initio*, uma maior velocidade de processamento, pois os cálculos são simplificados, reduzindo custo de memória e de tempo computacional (MAGALHÃES, 2009; ROCHA, G., 2010).

A função de onda semi-empírica ( $|\Psi^s\rangle$ ) escreve-se como sendo um produto semi-simetrizado da parte que descreve os elétrons das camadas internas do átomo (*core*) e da parte que descreve os elétrons da camada de valência, na qual a densidade eletrônica é a mais afetada em reações químicas.

Para efetuar os cálculos dos métodos semi-empíricos, pode-se aplicar a aproximação ZDO (*Zero Differential Overlap*), reduzindo as integrais para de dois elétrons e dois centros, no máximo, às aproximações integrais, CNDO (*Complete Neglect of Differential Overlap*), INDO (*Intermediate Neglect Differential Overlap*) e NDDO (*Neglect of Diatomic Differential Overlap*), daí parâmetros são introduzidos, ajustados ou retirados do experimento. Apresentam restrições a sistemas que contenham elementos para os quais tenham sido desenvolvidos parâmetros correspondentes. São exemplos desses, os métodos AM1 (Modelo Austin 1), PM3 (Método Paramétrico 3), MOPAC (Programa de Cálculo de Orbitais Moleculares), RM1 (Recife Model 1) e PM6 (Método Paramétrico 6) (ROCHA, G., 2010).

### 3.1.2.2 Métodos *ab initio*

Esse termo (do latim, *ab initio*) significa desde o início ou a partir dos princípios fundamentais, sugerindo aplicar cálculos realizados a partir de constantes físicas fundamentais, usando equações exatas, que envolvem uma população eletrônica total da molécula, sem o uso dos parâmetros experimentais e sem aproximações adicionais (LEVINE, 2001; MAGALHÃES, 2009).

O primeiro método de cálculo da estrutura eletrônica foi o Método Hartree Fock, que emprega a equação de Schrödinger completa para tratar todos os elétrons de um sistema químico (SANT'ANNA, 2009).



Trata-se de um método que emprega funções de base e Gaussianas, porém as bases mínimas apresentam diversas deficiências, as quais, para aprimorá-las, fez-se necessário a inclusão de funções. Também, não possuem aproximações além daquelas do formalismo, representando orbitais através dos conjuntos de base.

Um conjunto de base mínimo contém apenas um número de funções necessário para acomodar todos os elétrons de um átomo, limitado pela impossibilidade de se ajustar os orbitais ao ambiente molecular.

Para se descrever os orbitais com uma maior flexibilidade, aplica-se um conjunto de base de valência dividida, onde as funções que representam elétrons de valência são subdivididas em um componente interno e compacto e outro componente mais externo e difuso. Especificidades e adaptabilidades vão sendo obtidas com conjuntos de base de polarização e conjunto de bases de funções difusas, permitindo uma melhor descrição de pares de elétrons de alta energia.

Os métodos *ab initio* dão uma predição quantitativa de alta qualidade para uma grande variedade de sistemas, mas são complexos e implicam em uso de muitas integrais, o que consome memória, tempo demasiado e alto custo computacional (ALMEIDA, 2000).

### 3.1.2.3 Método DFT (do inglês, *Density Functional Theory*)

Entre os principais objetivos da química quântica estão, a previsão de propriedades quantitativamente ou tendências qualitativas dessas propriedades, e explicar a natureza da ligação química, abrindo então, espaço para a Teoria do Funcional de Densidade, que surgiu e desenvolveu-se como uma alternativa aos métodos tradicionais de *ab initio* e semi-empíricos para a determinação de estrutura eletrônica molecular.

Trata-se de uma alternativa aos modelos baseados em orbitais moleculares, na qual é considerado que a energia de um conjunto de elétrons sob a influência de um campo externo, seja um funcional único de densidade eletrônica; Essa dependência é expressa nos termos de funcional de troca e funcional de correlação.

A Teoria do Funcional de Densidade (mais conhecida pela sigla, DFT) está baseada na noção de que a energia total do sistema eletrônico,  $E$ , seja determinada pela distribuição da densidade eletrônica, uma vez que essa densidade nos orbitais de fronteira dos átomos fornece uma forma útil para a caracterização detalhada das interações doador-aceptor, as quais vão acontecer de acordo com as densidades dos orbitais de fronteira, HOMO e LUMO, definindo assim o tipo de reação (ABREU, 2004; GRANT, 1996; VASSECCHI et al., 2008).

Em cálculos de DFT, a energia total é expressa em termos da densidade eletrônica em lugar da função de onda, aplicando, no cálculo, um Hamiltoniano aproximado e uma expressão aproximada para a densidade eletrônica total, podendo ter precisão, mais espaço em memória e velocidade, por um baixo custo computacional, comparando-se com os métodos *ab initio* padrões:

$$E_{\text{DFT-D}} = E_{\text{DFT}} + E_{\text{disp}} \quad (3.18)$$

A DFT apresenta como inconveniente o fato de não existir um modo sistemático de aprimoramento para melhorar a forma do funcional, mas vem sendo amplamente aplicada, por exemplo, a sistemas moleculares orgânicos, organometálicos e sistemas bioquímicos.

### 3.2 A Modelagem molecular

Os altos custos, tempo dispendido e a estrutura física, que dão suporte às pesquisas e desenvolvimento (P&D) de fármacos e demais compostos bioativos, ainda são problemas de relevância decisiva e constituem-se em dificuldades e preocupações que limitam o melhoramento e a invenção de novos fármacos. Alia-se a esses desafios, a tarefa complexa de se conhecer a estrutura molecular de uma substância química através dos poucos métodos experimentais disponíveis.

A cristalografia de raios-X ainda consta como a técnica mais eficiente para a obtenção de informações que conduzam à descrição precisa para estabelecer a conformação molecular, embora apresente limitações que impõem dúvidas. O uso e a aplicação de modelos visa representar de maneira mais simplificada, objetos e fenômenos físicos reais para tornar os estudos melhor controláveis e economicamente mais viáveis.

Modelagem molecular consiste em um trabalho criterioso no qual são geradas e manipuladas estruturas moleculares, muitas vezes se chegando a representações realistas dessas estruturas, nas quais possam ser realizados cálculos de suas propriedades físico-químicas, em uma tentativa mais segura de prever resultados experimentais (CORRÊA, 2010; RODRIGUES, 2001). Revelou-se uma alternativa que, com a ajuda dos métodos computacionais capazes de agregar precisão de dados com velocidade e redução dos custos, em muito contribui para a compreensão e resolução de complexos problemas encontrados nos

mais diversos fenômenos da natureza; e com o avanço tecnológico dos recursos computacionais, a modelagem vem se desenvolvendo significativamente.

Trata-se de um conjunto de ferramentas voltadas para a construção, edição, visualização, análise e armazenamento de sistemas moleculares complexos: em seus estudos, Sant'Anna (2002) define a Modelagem molecular, segundo a IUPAC, como sendo a investigação das estruturas e propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica, visando fornecer uma representação tridimensional, sob um dado conjunto de circunstâncias.

Para que esse processo possa ser otimizado, devem ser aplicados cálculos de energias de conformação, propriedades termodinâmicas, de orbitais moleculares e estatísticos, obtidos da química teórica aplicada como instrumento matemático, e os recursos da computação gráfica entram como uma excelente ferramenta para manusear os modelos que auxiliam na interpretação das relações entre a estrutura e a atividade biológica.

As informações podem exercer forte influência no processo de compreensão da interação fármaco-receptor, tais como: mapa de potencial eletrostático, contorno da densidade eletrônica, a energia e os coeficientes dos orbitais de fronteira (HOMO e LUMO), entre outras. Com a visualização tridimensional do complexo fármaco-receptor e as informações estruturais que a maioria dos programas de modelagem molecular pode realizar, gerando o desenho de estruturas e os cálculos de otimização geométrica e análise conformacional, é provável obter resultados que venham gerar arquivos de saída que possam ser utilizados como arquivos de entrada em outros programas, facilitando e acelerando os trabalhos.

A potencial capacidade dessa ferramenta em planejar teoricamente a estrutura de novas moléculas que apresentem propriedades estruturais e eletrônicas ideais para estabelecer o encaixe mais estável com o sítio receptor, é uma excelente justificativa para sua aplicação no planejamento de fármacos e compostos bioativos (MAGALHÃES, 2009).

A metodologia geral implica em, primeiramente desenhar a estrutura da molécula, em seguida promover a otimização dessa estrutura molecular, buscando parâmetros geométricos o mais próximo possível daqueles valores obtidos experimentalmente.

Desse ponto, pode-se selecionar um programa que efetue cálculos com a capacidade de representar adequadamente uma estrutura molecular sem, necessariamente, se ter obtido dados previamente inseridos em sua elaboração. A qualidade de um programa de modelagem molecular deve relacionar-se à capacidade de reconhecer e transferir parâmetros embutidos no programa, para uma nova molécula que apresente as mesmas características estruturais e

eletrônicas das moléculas utilizadas para sua confecção, o que pode ser realizado de modo direto ou indireto.

A modelagem molecular e suas representações gráficas permitem explorar aspectos tridimensionais de reconhecimento molecular e gerar hipóteses que levam ao planejamento e síntese de novos ligantes. A maior parte dos programas de modelagem molecular tem a capacidade de retratar entidades químicas com alto grau de precisão, resultado que é confirmado através de dados obtidos por métodos experimentais comparativos (ALENCAR, 2010).

Para que sejam obtidas informações sobre propriedades moleculares, os métodos mais utilizados em modelagem molecular são os métodos clássicos de mecânica molecular e dinâmica molecular, e a aproximação quântica, que inclui os métodos *ab initio* e métodos semi-empíricos.

Um dos principais objetivos da modelagem molecular aplicada ao planejamento de fármacos é a descoberta do farmacóforo; cuja definição tem sido refinada para incluir restrições topográficas e tridimensionais (BARREIRO et al, 1997).

O planejamento de fármacos auxiliados por computador (*Computer-Aided Drug Design - CADD*) é um desses recursos, visto que a modelagem molecular possibilita o tratamento tridimensional dos modelos moleculares e o cálculo de propriedades químicas e físicas dos sistemas estudados (RODRIGUES et al.,2012).

Conforme já foi citado, podem-se adotar duas aproximações, o método indireto, onde se incluem os métodos QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*) independentes do receptor ou da enzima, ou seja, as interações do ligante com a macromolécula são consideradas indiretamente, por meio de correlações estrutura-atividade de moléculas conhecidas (ZHAO et al., 2013), e o método direto, no qual as interações do ligante com a macromolécula são consideradas explicitamente, identificando-se possíveis sítios de ligação e modos de interação, e possibilitando também a proposição de alterações específicas no ligante, com o objetivo de aumentar grau de afinidade com relação ao alvo (DIAS et al., 2009; FERREIRA, 2012; FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2011; GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010); nesse último caso, a estratégia principal utilizada para seleção de ligantes potenciais, é a docagem molecular, e foi a estratégia de escolha, aplicada neste trabalho.

### 3.2.1 Técnicas de triagem

Levando-se em consideração a diversidade de alvos biológicos (macromoléculas receptoras) promissoras para descoberta e planejamento de fármacos, técnicas de triagem biológica automatizada em alta escala (HTS – *high throughput screening*) e de triagem virtual (VS – *virtual screening*) estão se destacando entre as várias estratégias modernas que visam descobertas de novas substâncias bioativas. A HTS, embora parecesse, inicialmente, que se tornaria uma grande esperança para a descoberta de substâncias bioativas, logo demonstrou limitações decorrentes de uma série de inconsistências nos resultados dos ensaios.

Usufruindo do desenvolvimento nos estudos da estrutura biológica e da tecnologia computacional, a VS vem se destacando como um dos maiores avanços em planejamento de fármacos da atualidade. Trata-se de um método *in silico*, portanto computacional, empregado no estudo de grandes bases de dados de compostos (moléculas pequenas) que possam interagir com bioreceptores para, posteriormente, passarem por avaliações bioquímicas experimentais, possibilitando um estudo direcionado de moléculas em acordo com as características químicas adequadas para modular atividade biológica de diversos alvos moleculares (FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2011).

As estratégias de VS, então, podem ser desenvolvidas com base na estrutura do alvo molecular ou do ligante, podendo envolver aplicação das técnicas mais simples, como a busca por similaridade ou docagem molecular, até as estratégias mais complexas, com aplicação de métodos estatísticos e de aprendizagem de máquinas; aprimorando o processo de busca de novos candidatos a fármacos e acelerando o processo contínuo do seu planejamento (RODRIGUES, et al., 2012).

As estratégias da VS podem ter como base a estrutura da molécula bioativa (LBVS – *ligand-based virtual screening*) ou a estrutura do bioreceptor (SBVS – *structure-based virtual screening*), avaliando-se milhares de moléculas (extraídas de Bibliotecas Virtuais), tanto se baseando na estrutura do ligante (LBVS) como no acoplamento em sítios específicos de bioreceptores (SBVS).

O sucesso da VS é justificado por apresentar versatilidade, elevado desempenho, economia e facilidade de uso; com isso a quantidade de compostos que vem sendo estudados tem crescido amplamente. Conforme os critérios de estudo e pesquisa, faz-se necessário compreender algumas das limitações desse método.

Os modelos analisados por SBVS são simplificados, não representam em sua totalidade a interação entre o composto bioativo e o bioreceptor. Pode ocorrer uma fração de compostos

que, embora obtenham uma boa pontuação, não apresentam afinidade com o bореceptor, portanto sem bioatividade (falso positivo); e ainda existe o risco de existirem compostos com baixa pontuação que podem ser descartados durante os ensaios, mas que apresentariam boa atividade biológica (falso negativo).

Todos os métodos apresentam vantagens e desvantagens; o que pode preservar e, certamente, minimizar os erros é um planejamento estratégico racional e bem fundamentado nas informações técnicas e nas limitações de cada método.

Observa-se uma relevante diversidade de compostos descobertos em muitos trabalhos que apontam resultados de destacada magnitude com contribuição técnica e científica; mas ainda são frequentes os resultados conclusivos sobre o impacto do uso dessas técnicas.

Os fármacos estão sendo planejados de forma a poderem atuar em uma modulação seletiva da resposta biológica de macromoléculas alvo, fazendo-se necessário atentar criteriosamente para os seguintes aspectos durante a investigação:

- ✓ Seleção do alvo molecular: estabelecer, através de estudos e com aplicação das mais diversas e seguras técnicas, a correlação da macromolécula com a disfunção ou aspectos patogênicos da doença, em busca de seletividade; o que pode ser obtido através de estudos em que se adquiram conhecimentos a respeito do metabolismo, fisiopatologia e genética, tanto de hospedeiros como de agentes ou fatores etiológicos. A partir daí a validação é fator crucial, e a aplicação de técnicas de biologia molecular (silenciamento de genes e RNA de interferência) ou ainda com a simulação do efeito farmacológico analisando-se compostos químicos. Uma vez comprovada a relação, purificada a substância, e estabelecida a estrutura tridimensional da macromolécula, se dá início ao processo de identificação de novos ligantes.
- ✓ Organização da base de dados dos compostos: como a quantidade de micromoléculas disponíveis é da ordem de muitos milhões, a seleção e organização de uma ou mais bases de dados de compostos (coleções dirigidas), é de fundamental relevância, dada a impossibilidade de se realizar a experimentação de todos. Vários fatores influenciam diretamente a geração dessas bases de dados; destacam-se as propriedades moleculares e físico-químicas, o que tem desencadeado o desenvolvimento de uma série de técnicas, regras e conceitos atualmente aplicados em P&D de novos fármacos.
- ✓ A partir desses aspectos muito bem definidos e estabelecidos, é que se deve partir para a análise virtual (VS) e/ou experimental (HTS-avaliação biológica in vitro) dos compostos selecionados.

Em LBVS, o maior desafio é descobrir novas classes de compostos que apresentem atividade biológica. Os compostos bioativos conhecidos podem ser utilizados como referência para comparações por similaridade química com outras moléculas das bases de dados, ou serem empregados na validação de modelos, juntamente com compostos inativos. As principais técnicas aplicadas em LBVS incluem o estudo das relações quantitativas entre a estrutura e atividade (QSAR), o uso de impressões digitais moleculares (*molecular fingerprints*), o emprego de farmacóforos (*pharmacophores*) e a utilização de inteligência artificial na aprendizagem de máquinas (*machine learning*) como as máquinas de vetor suporte (SVM - *Support Vector Machines*).

As estratégias de VS por similaridade química ou modelos farmacofóricos atingem uma maior amplitude do que por QSAR. A LBVS tem demonstrado qualidade de integração com outros métodos, sendo aplicada com êxito na seleção e identificação de novos compostos bioativos a serem experimentados, tanto *in vitro* como através de métodos computacionais.

A SBVS avalia bases de dados simulando interações entre ligante e bioreceptor apresentando uma resolutividade mais precisa do que a LBVS, na descoberta de novos ligantes. Porém a sua maior limitação é requerer um maior conhecimento prévio da estrutura tridimensional da proteína (bioreceptor); essa informação pode ser obtida experimental ou computacionalmente (por homologia); para sua boa aplicabilidade, devem ser tomados alguns cuidados imprescindíveis.

- ✓ Para o preparo dos ligantes é necessário se calcular as cargas atômicas e a correta representação de estereoisômeros, tautômeros e estados de protonação.
- ✓ Para a preparação da proteína receptora, há necessidade de uma escolha acertada do modelo tridimensional, definição do estado de protonação dos resíduos e a presença de moléculas de água na cavidade de interação.
- ✓ A escolha do modelo a ser empregado deve levar em consideração a resolução e flexibilidade das estruturas, presença de ligantes e variações conformacionais, principalmente no sítio de ligação, conforme foi realizado nesse estudo.

O uso do complexo ligante-proteína contribui para que a SBVS seja bem sucedida. Conhecendo criteriosamente a estrutura e as características dos resíduos, pode se estabelecer as regiões de melhor flexibilidade e, caso o programa de docagem possua essa funcionalidade, pode-se priorizar os resíduos a serem tratados como flexíveis.



Consideram-se também a presença de moléculas de água conservadas que são deveras relevantes para a formação do complexo ligante-proteína e de forte influência nos resultados dos trabalhos de docagem.

Cálculos de entropia e entalpia para grande número de moléculas aumentam o custo computacional e podem inviabilizar o processo; mas já existem programas que conseguem minimizar esses problemas, e até beneficiar o processo de docagem, com a inclusão de moléculas de água conservadas.

É consideravelmente importante o estado de protonação, posição dos hidrogênios nos átomos polares das cadeias laterais e conformação da amida nos resíduos de glutamina e asparagina nos sítios de ligação.

Assim como também é de fundamental importância atentar para a escolha eficiente de ferramentas e métodos adequados, a serem aplicados no processo de modelagem (SANT'ANNA, 2009).

Esse complexo resultado dependerá das atividades de uma equipe multidisciplinar bem organizada, entrosada e sistematizada, em uma busca pela facilidade e otimização do processo de desenvolvimento desses compostos, utilizando um conjunto de métodos computacionais, como ferramentas do planejamento racional de fármacos. Nessa abordagem, a docagem molecular destaca-se por sua excelente estratégia de triagem virtual (RODRIGUES et al., 2012) e grande aplicabilidade no estudo de doenças (FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2011; GIACOBBO, 2011; GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010; LATTES; LASALA, 2014; RODRIGUES, 2001).

Uma vez finalizadas as etapas de preparação do ligante e receptor, o próximo passo da SBVS passa a ser então a docagem molecular. (FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2011).

As pesquisas com aplicação de modelagem molecular usando docagem ou associações desta com outros métodos de simulação (FERREIRA, 2011; GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010), já tem revelado resultados muito promissores (KANDAKLATA, 2013), o que garante a confiabilidade nos resultados e motiva os pesquisadores a fazerem uso frequente de estratégias e ferramentas computacionais em P&D de fármacos (CHEN, 2013; WEST; JOHNSTONE, 2014).



### 3.3 Docagem Molecular

Ao se aplicar Modelagem Molecular nas investigações e estudos sobre fármacos, um método muito eficiente é o de ancoragem (ou docagem, do inglês: *DOCKING*), sendo um dos métodos de planejamento baseado na estrutura do alvo, mais amplamente utilizados, tanto na indústria como nas instituições de pesquisa (FERREIRA, 2012).

#### 3.3.1 A evolução da docagem molecular

Introduzida no início dos anos de 1980, baseada em um antigo modelo do tipo chave-fechadura, o qual evoluiu sendo substituído pelo modelo mão-e-luva (encaixe induzido). Ao se deparar com a problemática da flexibilidade das moléculas em estudo, e o fato de que a busca pelo melhor encaixe é inerente ao processo de docagem molecular, implicando que, sendo o reconhecimento do ligante pelo receptor um processo dinâmico, o tratamento dos modelos levando-se em consideração a flexibilidade promoveria muito mais realismo à simulação.

Esse método consiste em um rastreamento por uma orientação preferencial de uma molécula (ligante: molécula pequena ou até mesmo uma proteína) com relação a outra molécula, a macromolécula (receptor: enzima, DNA, canais iônicos, receptor farmacológico, etc), para formar um complexo estável, usando esse conhecimento com o propósito de prever a resistência da associação ou a afinidade de ligação entre as duas moléculas, fator central na transdução de sinais em nível celular, desempenhando um papel fundamental na concepção e planejamento racional de fármacos (NAMBA; da SILVA, V.; da SILVA, C., 2008).

O acoplamento entre a molécula do fármaco e a proteína alvo, recebendo a ajuda do computador, pode ser descrito como um problema de ajuste estéreo-específico para promover a interação, tornando-se uma técnica muito bem aplicada em diferentes etapas do processo de pesquisa e desenvolvimento (P&D) de fármacos, para prever o modo de ligação no sítio ativo e para se avaliar e classificar os modos de ligação propostos virtualmente.

A computação é então aplicada em um processo de simulação do reconhecimento molecular, com o objetivo de conseguir uma conformação entre o ligante (fármaco) e a macromolécula receptora (proteína) de tal forma otimizada, que a energia livre global do sistema possa ser minimizada; o resultado obtido por sua vez, é utilizado para prever o modo de ligação de pequenas moléculas (conhecidas ou novas) no sítio de ligação de

macromoléculas alvo, com subsequente avaliação e classificação dos modos de ligação propostos, usando-se o ensaio virtual (CORRÊA, 2010).

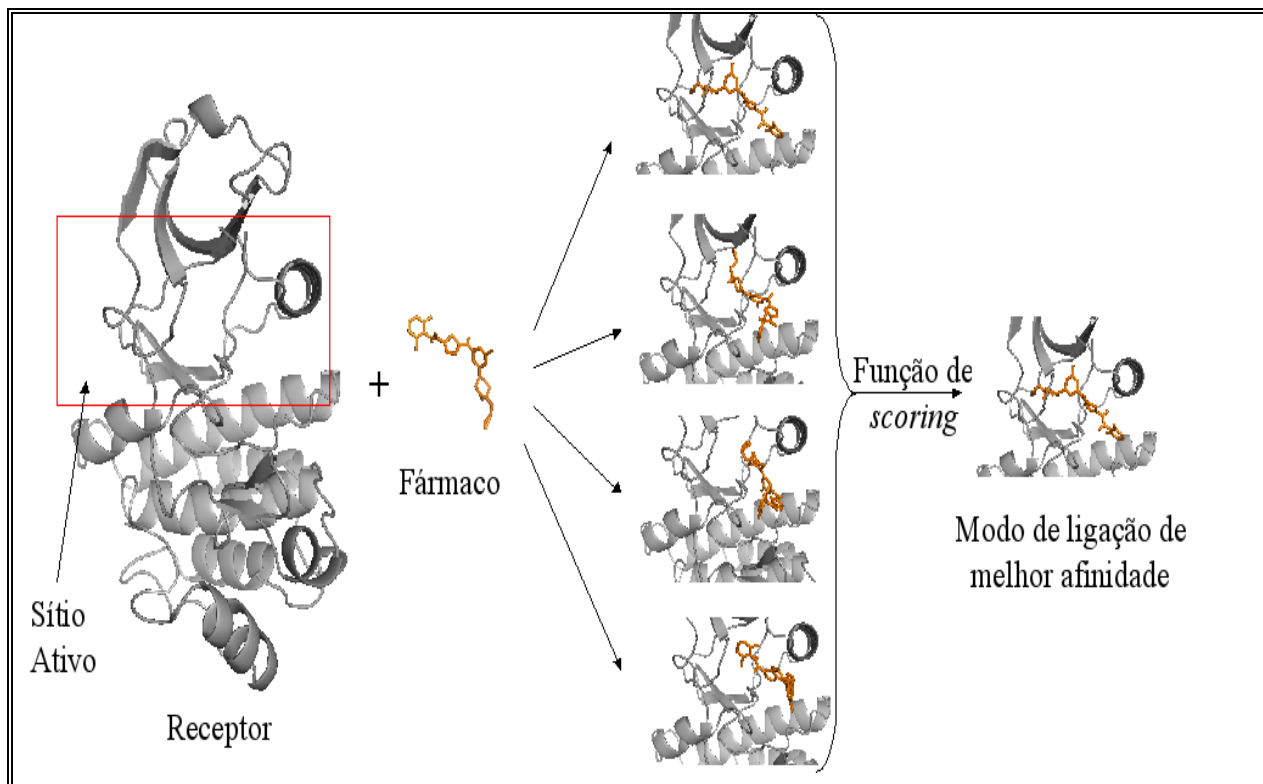


Figura 12 – Modelo geral ilustrativo das etapas do procedimento de docagem molecular.  
Fonte: ALENCAR (2010).

Desde então a aplicação da docagem molecular em química medicinal e biologia estrutural tem sido uma constante de grande amplitude evolutiva, tornando-se uma ferramenta valiosa em projetos de planejamento de fármacos (FERREIRA; dos SANTOS; ANDRICOPULO, 2011).

Através da aplicação de docagem molecular, podem ser criados modelos de interação entre compostos líderes e os receptores, também é possível a otimização de compostos líderes que apresentem modo de interação conhecido e, por triagem virtual, identificar novos compostos (HUANG; ZOU, 2010; NETZ, 2011).

Existem disponíveis (comercialmente ou de uso público) bancos de dados com grande quantidade de moléculas para serem docadas na estrutura do alvo em estudo, através de um programa computacional de docagem, e essas moléculas são, paulatinamente, amostradas em milhares de possibilidades estruturais de conformação e pontuadas de acordo com a sua complementaridade com o alvo, para serem testadas em ensaios experimentais, como pode ser

observada na Figura 12 (CASSIANO; dos SANTOS; SENA JUNIOR, 2012; MALTAROLLO; HONÓRIO, 2012; RODRIGUES, et al., 2012).

Destacam-se, particularmente, duas abordagens mais comuns, uma usando técnicas de correspondência, descrevendo ligante e proteína como superfícies complementares, e outra simulando o processo de encaixe/acoplamento entre ligante e proteína, efetuando o cálculo das energias de interação aos pares.

O ponto de partida nesse processo, de notável relevância e definitivo para que seja alcançado o sucesso na predição, é a escolha racional e adequada do programa de docagem a ser utilizado; em um universo em torno de, aproximadamente, trinta programas disponíveis (de uso acadêmico, livres ou pagos), selecionamos alguns de importância histórica e relevância para esse trabalho que estão em destaque no Quadro 1.

Tabela 1 – Seleção de programas de docagem criados desde o ano de 1988 até o ano de 2011, e os respectivos países onde foram criados.

<i>Programa</i>	<i>Origem (País)</i>	<i>Publicação (ano)</i>
DOCA	EUA	1988
AutoDock	EUA	1990
FlexX	Alemanha	1996
DARWIN	EUA	2000
FlexE	Alemanha	2001
FRED	Reino Unido	2003
Surflex	EUA	2003
MANDIOCA	EUA	2005
AutoDock Vina	EUA	2010
AADS	Índia	2011
BetaDock	Coréia do Sul	2011
LigDockCSA	Coréia do Sul	2011
PythDock	Coréia do Sul	2011
VoteDock	Polônia	2011


Seguindo-se o processo de docagem molecular, passa-se por duas etapas fundamentais, que são: a determinação do modo de ligação e a predição da afinidade do ligante pelo sítio de interação. É fundamental seguir os protocolos de docagem, inicialmente descritos como uma combinação desses dois componentes:

- ✓ Algoritmo de busca pelos graus de liberdade da configuração e conformação. O qual deve exaustivamente elucidar todos os possíveis modos de ligação entre o ligante e o receptor.
- ✓ Função de pontuação ou avaliação, chamadas função de escore, as quais são utilizadas com o intuito de estimar a afinidade de uma dada posição (orientação) do ligante no sítio ativo do receptor. Essa função conduz a uma posição de entrada que reflete um valor probabilístico indicando a interação mais favorável; a maioria delas é obtida com base em campos de força, por cálculos de mecânica molecular, indicando o nível de energia (negativo) em que o sistema é mais estável, portanto que a interação seja a mais provável; pode-se alternativamente obter informações a partir de um grande banco de dados de complexos ligante-proteína, embora um grande montante de resultados em cristalografia de raios-X possam gerar falsos positivos, pela pouca precisão com que são especificadas as afinidades dos ligantes; uma alternativa é recalcular as energias do topo de pontuação usando programas computacionais mais precisos e intensivos (NAMBA; da SILVA, V.; da SILVA, C., 2008).


Para um entendimento mais claro, faz-se necessário detalhar as abordagens aplicadas nas etapas de docagem molecular: complementaridade, transformada de Fourier e simulação.

- ✓ Pela forma de **complementaridade**, são aplicados métodos com os quais se descreve as estruturas geométricas de ligante e proteína em um conjunto de características que os tornam acopláveis. Podendo incluir superfícies moleculares e superfícies complementares, onde a superfície molecular do receptor é descrita em termos de área de superfície acessível ao solvente e a do ligante como sua superfície correspondente, forma essa que ajuda a encontrar a posição complementar que coincide com o alvo molecular; também podem ser descritas as características hidrofóbicas da proteína aplicando-se curvas nos átomos da cadeia principal (Figura 13).

- ✓ Outra forma, é aplicando-se a **transformada de Fourier**; embora essa abordagem não tenha a precisão ideal, pode-se percorrer milhares de ligantes em fração de segundo, indicando seguramente, se eles podem se ligar ao sítio ativo da proteína e até em interações proteína-proteína e como base de abordagens farmacofóricas.
- ✓ A forma por **simulação** do processo de docagem molecular já apresenta uma maior complexidade. Nessa abordagem, proteína e ligante são colocados calculada e relativamente distantes para em seguida movimentar a molécula do ligante até encontrar sua posição mais adequada no sítio ativo da proteína. Esses movimentos envolvem transformações de corpo rígido, tais como rotações e translações, e mudanças intramoleculares no ligante, incluindo rotações do ângulo de torção, o que induz a um custo energético total do sistema, necessitando efetuar o cálculo dessa energia, a cada movimento concluído.



*Java Protein Dossier*

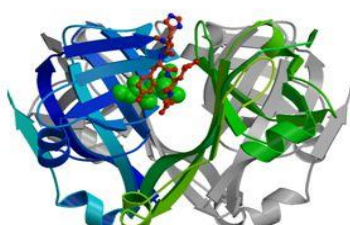
**Parâmetros** 

---

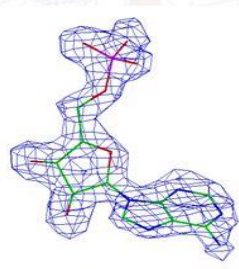
## Curvatura na Superfície (Curvature)

**Importância:** Docking = Processo de encaixar duas moléculas em três dimensões.

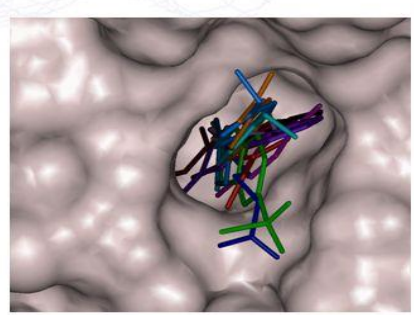
Em aplicações de docking, a condição de complementaridade das superfícies das interfaces determina que a curvatura média das superfícies que interagem sejam opostas em sinal e iguais em magnitude.



**Estrutura alvo**



**Ligante**



**Droga líder**

<http://www.cbi.cnpia.embrapa.br>

*Paula Kuser Falcão*

Figura 13 – Ilustração explicativa sobre aspectos da complementaridade em Docagem Molecular.

Fonte: [www.slideplayer.com.br](http://www.slideplayer.com.br), 2015

Destacam-se como vantagens da docagem molecular, a evidente facilidade em tornar flexível a modelação do ligante, e ser um processo fisicamente mais próximo do

reconhecimento molecular real, mas com a desvantagem de requerer mais tempo para avaliar a posição ideal da ligação, que com aplicação de técnicas baseadas em grade (do inglês: *grid*) e de otimização rápida, pode-se obter uma significativa redução desses problemas (Figura 13).

No processo de docagem molecular, a mecânica de encaixe é obtida a partir da estrutura da proteína, geralmente obtida com aplicação de técnicas biofísicas, como cristalografia de raios-X ou Ressonância Magnética Nuclear (RMN), que ao aliar-se a um banco de dados de ligantes potenciais, servem como entrada num programa de encaixe, cujo sucesso depende do algoritmo de busca e da função de pontuação.

Em muitos métodos, trata-se apenas o ligante como flexível, por ser uma molécula pequena e com poucos átomos, porém a flexibilidade da macromolécula receptora, em função de seu tamanho e complexidade, ainda é tratada de uma forma mais restrita.

Nesse momento, se faz necessário analisar de forma mais criteriosa, a questão da flexibilidade, por tratar-se de uma abordagem fundamental na consideração do processo de docagem.

A flexibilidade do ligante está na dependência das possibilidades conformacionais de sua estrutura molecular, o que pode ser gerado na ausência do receptor e posteriormente acoplado, ou na presença da cavidade de ligação do receptor, explorando a flexibilidade rotacional de todos os ângulos diedros, usando-se fragmentos com base de encaixe, aplicando-se avaliação de energia de campos de força para selecionar conformações energeticamente razoáveis, ou por métodos teóricos.

Quanto à flexibilidade do receptor, inicialmente devem-se aplicar diferentes abordagens para considerar a flexibilidade conformacional da proteína, de forma computacionalmente viável.

Embora estejamos em um momento em que é notável um crescente avanço tecnológico, até então o nível alcançado em planejamento computacional de fármacos, ainda implica em muita dificuldade para se trabalhar com a flexibilidade do receptor, pois a expansividade dos cálculos os torna muito complexos e não se deve negligenciar essa limitação.

Importante salientar que a reprodução de um modo de ligação experimental normalmente é considerada bem-sucedida quando o desvio médio quadrático (RMSD) calculado encontra-se abaixo de 2,0Å entre a orientação cristalográfica, que é tida como experimental, e a orientação teórica obtida durante o cálculo.

O RMSD (*Root Mean Square Deviation*) corresponde ao desvio quadrático médio, o qual é aplicado para a comparação entre uma conformação de referência e as conformações que são assumidas pela molécula em função do tempo, o que, nesse programa, auxilia na

escolha da melhor conformação molecular, determinando a frequência de poses docadas, seguindo a seguinte relação:

$$RMSD_{(t_1, t_2)} = \left[ \frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i \|r_i(t_1) - r_i(t_2)\|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (3.19)$$

Na equação 3.18,  $M = \sum_{i=1}^N m_i$ ,  $r_i(t)$  é a posição do átomo  $i$  no tempo  $t$ , e  $m_i$  é a massa do átomo  $i$  (RODRIGUES et al, 2012).

Os programas DOCK, FlexX e Surflex pertencem à categoria dos métodos baseados em fragmentos, enquanto que o programa AutoDock é um representante dos métodos evolucionários fazendo-se indispensável o conhecimento dos algoritmos aplicados no programa que se pretende utilizar (ALENCAR, 2010).

### 3.3.2 Algoritmos

Algoritmos são instruções explícitas, claras e bem definidas que o computador recebe para que possa realizar suas atividades; Segundo Manzano (2000), trata-se de um processo de cálculo matemático ou de uma resolução de um grupo de problemas semelhantes.

Em ciência da computação, pode-se traduzir como a descrição de um conjunto de comandos que, ao serem obedecidos, resultam em uma sucessão finita de ações, isso significa que, para ser considerado correto, o algoritmo precisa possuir três qualidades:

- ✓ Cada um dos passos do algoritmo deve ser uma instrução que possa ser realizada;
- ✓ A ordem desses passos deve ser precisamente determinada;
- ✓ Todos os algoritmos devem ter fim;

Então algoritmos são definidos como sendo a descrição de um conjunto de comandos que, devidamente obedecidos, resultam numa sucessão finita de ações (HALPERIN; WOLFSON; NUSSINOV, 2002; LUCAS, 2002).

Para que um algoritmo possa ser desenvolvido, deve-se começar com uma afirmação genérica da solução do problema, e prossegue-se até o algoritmo final, aumentando sistematicamente o nível de detalhamento, para saber se já se tem o nível suficiente de detalhes no algoritmo, depende do agente que irá executá-lo; os computadores possuem um conjunto muito limitado de instruções, e o algoritmo deve ser expresso nos termos dessas



instruções. Assim vêm sendo aplicados em inúmeras áreas do conhecimento (RODRIGUES et al., 2012).

Os algoritmos de busca são, em termos gerais, um conjunto de regras e parâmetros aplicados com o objetivo de explorar a flexibilidade da estrutura dos ligantes em simulações de docagem molecular, para tal, faz-se necessário que sejam usados algoritmos eficientes e que possam encaixar realisticamente cada molécula do ligante no sítio ativo do receptor, obtendo-se, no mesmo instante, conformações energeticamente viáveis, em um grande número de algoritmos; essa busca não é aleatória, mas sim com um princípio sedimentado na química ou geometria dos átomos envolvidos (RODRIGUES, et al., 2012).

Os algoritmos mais amplamente usados podem ser agrupados nas seguintes categorias:

- ✓ Métodos baseados em campos de força, tais como simulações de Dinâmica Molecular (DM, ou do inglês: *MD - Molecular Dynamics*) ou Método de Monte Carlo (MMC),
- ✓ Métodos evolucionários (que empregam o algoritmo genético, AG),
- ✓ Métodos baseados em fragmentos (ou construção gradual) e
- ✓ Métodos baseados na complementaridade de ligante-receptor.

Os algoritmos baseados em fragmentos, que são métodos ditos de ancoragem e crescimento (*anchor-and-grow*), dividem o ligante em regiões rígidas e flexíveis. Uma ou mais âncoras rígidas são identificadas pela análise das ligações livres. Em um primeiro passo, essas âncoras são docadas, e em seguida as partes flexíveis são adicionadas sequencialmente, com a varredura sistemática dos ângulos de torção.

Foi nesse processo de tentativas para a resolução de problemas, que se desenvolveu a computação evolucionária, e em meados da década de 70, John H. Holland propôs uma técnica de algoritmo baseada nas teorias de Darwin, que contestou as ideias evolucionistas de Lamarck, a qual explicava o processo de evolução das espécies, originando os Algoritmos Genéticos (AGs).

No estudo aqui apresentado, primeiramente foi aplicado um tipo de algoritmo evolucionário o algoritmo genético (AG), o qual cria uma população de possíveis respostas para o problema a ser tratado (inicialização) para depois submetê-la ao processo de evolução, constituído pelas seguintes etapas: avaliação, seleção, cruzamento, mutação, atualização e finalização (JONES et al., 1997; ZUBEN, 2000).



Os AGs são métodos generalizados de busca e otimização que simulam os processos naturais de evolução, baseados em aptidão e adaptação de indivíduos de uma dada população (conjunto de possíveis respostas).

Seguindo esse princípio, Holland decompôs o funcionamento dos AGs nas etapas de inicialização, avaliação, seleção, cruzamento, mutação, atualização e finalização. Simplificando, um algoritmo genético cria uma população de possíveis respostas para o problema a ser tratado, que constitui a inicialização, para depois submetê-la ao processo de evolução, constituído, em sequência, pelas seguintes etapas:

- ✓ Avaliação: avalia-se a aptidão das soluções (indivíduos da população) em que é feita uma análise para que seja estabelecido o quão satisfatoriamente elas respondem ao problema proposto;
- ✓ Seleção: indivíduos são selecionados para a reprodução. A probabilidade de uma dada solução vir a ser selecionada é proporcional a sua aptidão;
- ✓ Cruzamento: características das soluções escolhidas são recombinadas, gerando novos indivíduos;
- ✓ Mutação: características dos indivíduos resultantes do processo de reprodução são alteradas, acrescentando assim variedade à população;
- ✓ Atualização: os indivíduos criados nesta geração são inseridos na população;
- ✓ Finalização: deve-se verificar se as condições de encerramento da evolução foram atingidas, retornando para a etapa de avaliação, em caso negativo, e encerrando a execução, em caso positivo.

Os AGs constituem-se em um método robusto, utilizado geralmente para resolver problemas em pesquisas numéricas, otimização de funções, aprendizado de máquinas e outras aplicações; seu uso é citado como método de busca global que não utiliza gradiente de informação, podendo ser combinado com outros métodos para refinamento de buscas, quando há aproximação de um máximo ou mínimo global; é atualmente muito utilizado em bioinformática e aplicado com sucesso em problemas com difícil manipulação através das técnicas tradicionais (MAGALHÃES, 2006).

Embora possua um comportamento de busca aleatória, sua utilização assegura que nenhum ponto do espaço de busca venha a ter probabilidade zero de ser examinado. Todo processo de busca e otimização pode ser subdividido em componentes, como o espaço de busca, onde são consideradas todas as possibilidades de solução de um determinado problema

e a função de avaliação, que é uma maneira de avaliar os membros do espaço de busca (JONES et al., 1997; ZUBEN, 2000).

Diferentemente da manipulação iterativa de técnicas tradicionais, as técnicas de computação evolucionária operam sobre uma população de candidatos em paralelo, podendo fazer busca em diferentes áreas do espaço de solução, alocando um número de membros apropriado para busca em várias regiões.

Quatro aspectos diferenciam os Algoritmos Genéticos dos métodos tradicionais de busca e otimização:

- ✓ AGs trabalham com uma codificação do conjunto de parâmetros e não com os próprios parâmetros,
- ✓ AGs trabalham com uma população e não com um único ponto,
- ✓ AGs utilizam informações de custo ou recompensa e não derivadas ou outro conhecimento auxiliar,
- ✓ AGs utilizam regras de transição probabilísticas e não determinísticas,
- ✓ AGs apresentam características como, busca codificada, generalidade, paralelismo explícito, busca estocástica, busca cega, eficiência mediana, paralelismo implícito, facilidade no uso de restrições.

Em alguns casos o algoritmo genético pode ser modificado, ao se introduzir passos de busca conformacional local entre cada passo, possibilitando que as mudanças fenotípicas (adaptações conformacionais da molécula ao ambiente) possam ser adquiridas pelas próximas gerações, este é uma espécie de híbrido do Algoritmo Genético que se chama Algoritmo Genético Lamarckiano (ou em inglês: *Lamarckian Genetic Algorithm, LGA*), AGL (MAGALHÃES, 2006; MEDEIROS, 2006). O método de busca local utilizado é baseado no algoritmo de otimização de Solis e Wets (SW), que foi desenvolvido por Solis e Wets em 1981, esse algoritmo (AGL) foi o tipo utilizado nesse estudo.

Nesses algoritmos, uma solução candidata chama-se de indivíduo, e ao conjunto de indivíduos simultaneamente avaliados denomina-se de população. Partindo-se de uma população de conformações, orientações e translações randômicas do ligante, o programa executa o número de avaliações energéticas e gerações (iterações) requisitadas pelo usuário e seleciona os indivíduos sobreviventes (os melhores adaptados). Uma taxa de mutação e cruzamento é especificada e introduzida no problema a fim de possibilitar uma melhor adaptação das gerações futuras (MAGALHÃES, 2006; MEDEIROS, 2006).

AGLs são, portanto, muito eficientes em buscas de soluções ótimas ou próximas da ótima, com poucas limitações, em um sistema de passos com extensa variabilidade, que é um problema característico em pesquisas e desenvolvimento de fármacos e outros compostos que apresentam bioatividade.

### 3.4 Métodos Híbridos

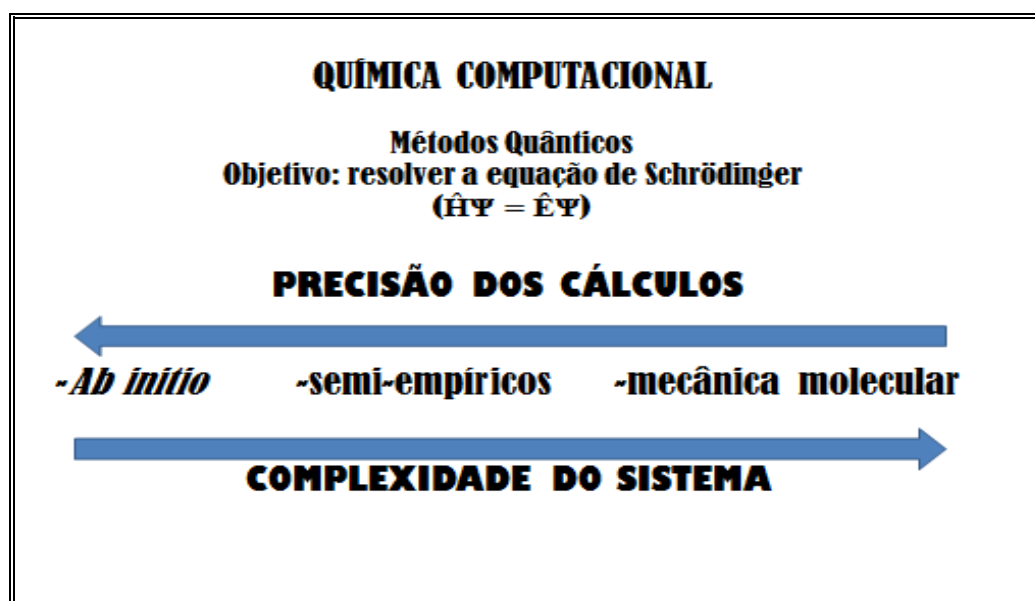


Figura 14 – Quadro comparativo entre os métodos químicos computacionais, sua resolutividade e precisão, de acordo com a complexidade do sistema.

Observa-se, na apresentação dos métodos utilizados em química computacional, que a aplicabilidade de cada um deles está diretamente ligada ao tipo de sistema em estudo e a capacidade computacional disponível para esses estudos.

Os métodos clássicos promovem excelente economia computacional, mas não são métodos que apresentem uma boa precisão, devido à série de aproximações e parametrizações que são aplicadas; já os métodos quânticos, que apresentam uma precisão muito mais próxima do que seria ideal, exigem um custo computacional de tal forma elevado, que para alguns sistemas de maior complexidade chegam a ser inviáveis (Figura 14).

Como alternativa eficiente e oportuna, para que seja obtida a resolução dessa problemática, surgiram estratégias que conseguem aliar as vantagens de cada método com o controle das suas limitações, esses são os métodos conhecidos como híbridos.

Os métodos híbridos ou combinados, também conhecidos como métodos QM/MM (do inglês: *Quantum Mechanics/Molecular Mechanics*) foram usados pela primeira vez por Washel e Levitt (1976), e resultam da combinação de várias aproximações, aproveitando suas vantagens e contornando suas limitações. Nos quais se tratam uma menor região com os cálculos quânticos (Figura 15), diminuindo o custo computacional (CHEN, 2013; KANDAKLATA, 2013; TELES, 2011; WEST; JOHNSTONE, 2014).

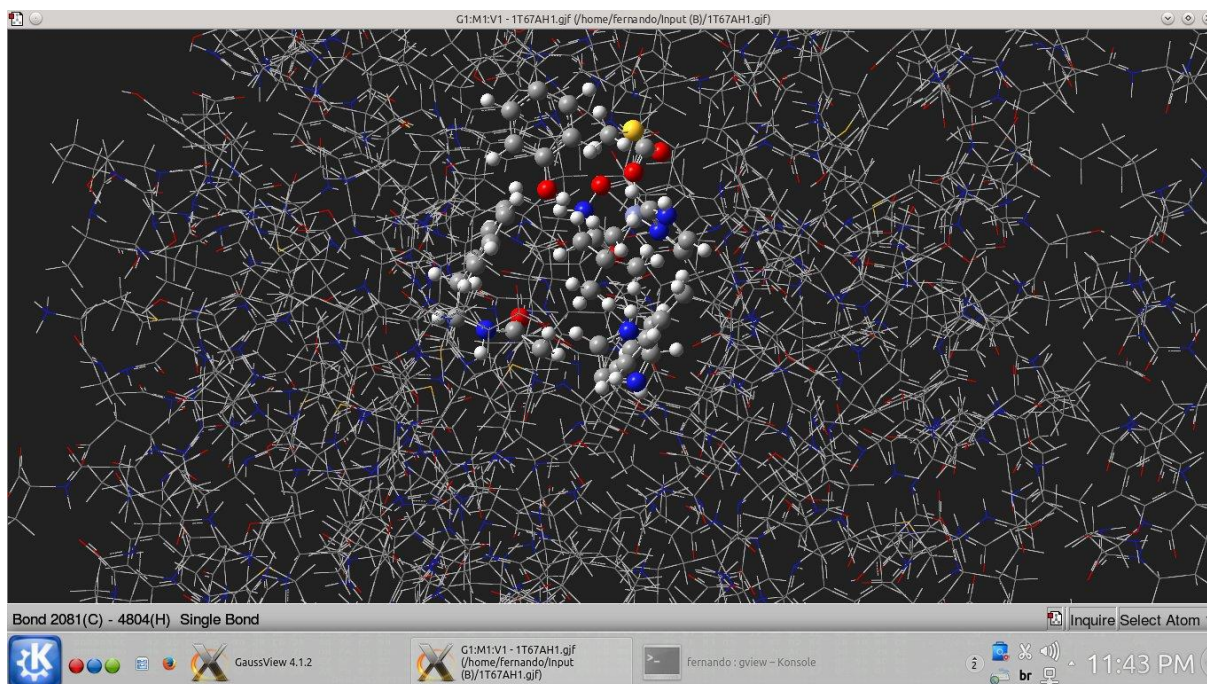


Figura 15 – Imagem do espaço químico reacional, destacando os subsistemas que devem ser tratados por MM e QM e a zona fronteira (QM/MM), em processo de interação de ácido hidroxâmico em sítio catalítico da HDAC.

A dificuldade está em se definir a fronteira quântico/clássica. Um método que vem tendo destaque e sendo muito utilizado é o método ONIOM (*our own n-layered integrated MO and MM method*); Desenvolvido por Morokuma e colaboradores, esse método é descrito como uma superposição de cálculos cujo esquema teórico possibilita que qualquer sistema molecular possa ser dividido em diferentes níveis, ligados de acordo com uma ordem conveniente ao problema em questão, e ao se integrar as partes, seus resultados são extrapolados atingindo valores de energia mais precisos sobre todo o sistema; isso permite uma otimização do fenômeno enzimático, diminuindo o custo computacional (BRAGA; MORGON, 2006; TELES, 2011).

Portanto o método ONIOM é aplicado a sistemas compostos por muitos átomos e que, com os resultados obtidos, possam ser realizadas previsões precisas e seguras. A energia do sistema simulado pelo método ONIOM é obtida através da combinação das energias computadas pelos métodos teóricos aplicados, como uma energia geral resultante de uma aproximação tal como se todo o sistema tivesse sido calculado pelo método de maior precisão (HEERDT; MORGON, 2011; NEIRA, 2002; TELES, 2011).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral a realização de estudos *in silico* da atividade de potenciais candidatos a fármacos no controle e combate a doenças infecto-parasitárias e crônico-degenerativas.

### 4.2 Objetivos específicos

- ✓ Estudar, por meio de métodos de docagem molecular, as interações das betaínas hidroxâmicas com o sítio ativo da enzima HDAC, de forma a avaliar, dentre os possíveis inibidores, os mais promissores.
- ✓ Calcular a energia de interação ligante/receptor de compostos selecionados previamente pelo método de docagem molecular, para que possam, e em seguida, serem submetidos aos cálculos de QM/MM, utilizando-se o método híbrido ONIOM (*our own n-layered integrated MO and MM method*).

## 5. DETALHES COMPUTACIONAIS

Para a execução desse trabalho foram disponibilizados quatro microcomputadores, nos quais foram preparados os sistemas que efetuaram os cálculos, em estações Linux Fedora 12.04, utilizando-se os bancos de dados, programas e softwares necessários. A avaliação *in silico* foi executada por planejamento direto, a partir do qual foram estudadas as interações

das betaínas hidroxâmicas e dos ácidos hidroxâmicos com o sítio ativo da histona deacetilase; Nesse caso, foram executados cálculos MM de docagem e em seguida serão realizados os cálculos de QM/MM.

### 5.1 A preparação da molécula alvo

A partir da busca pelas estruturas cristalográficas de HDACs, a estrutura disponível que se mostrou mais adequada foi a da molécula da HDAC8, a qual foi pesquisada a partir das informações extraídas do repositório PDB (do inglês: *Protein Data Bank*), que é um banco de dados tridimensionais de estruturas biológicas, contendo informações sobre sua estrutura molecular, descrição quantitativa da estrutura e experimentos relacionados à sua obtenção, em formato unificado de arquivo. Essa pesquisa foi realizada acessando o site <http://www.rcsb.org>, 2015 utilizando-se a chave de busca, foi adotado o arquivo 1T67, o qual corresponde à HDAC8 complexada com um inibidor, um ácido hidroxâmico (MS-344); com esse resultado, o arquivo obtido da estrutura da HDAC8, foi em seguida importado para visualização e, por conseguinte, a realização da docagem.

O PDB da estrutura da enzima HDAC8 foi aberto com o software *AutoDockTools* (ADT), para selecionar a região onde foi realizado o processo de docagem; essa região engloba todos os átomos do sítio ativo da enzima, inclusive o átomo de Zinco ( $Zn^{2+}$ ), conforme se observa na Figura 16.

Ao ser importada deu-se início ao preparo da estrutura da enzima, com a remoção do ligante, das moléculas de água, dos íons e cofatores, promovendo assim o relaxamento da estrutura do complexo; os arquivos da enzima HDAC8 foram preparados em formato PDBQS (seguindo os parâmetros utilizados para calcular contribuição da energia de dessolvatação da macromolécula pelo ligante, de acordo com o *AutoDockTools*), a molécula foi visualizada, até acrescentar ADT (interface gráfica que auxilia o trabalho de encaixe e fornece informações de conformações e agrupamentos) e Gasteiger (adicionando todos os átomos de hidrogênio ao ligante, para obter um funcionamento adequado dos cálculos), removidos os resíduos e adicionados parâmetros de solvatação. A partir desse ponto a molécula foi escrita em um arquivo “PDBQS”.

Para a execução desse trabalho foi utilizado o programa *AutoDock*, o qual nesse formato apresenta um PDB alargado, o PDBQT, usado para a coordenação dos arquivos e com a inclusão de cargas atômicas parciais, átomos tipos e informações sobre graus de liberdade de torção, tendo sido criados durante os procedimentos, os arquivos na interface



gráfica, sempre que fosse oportuno e necessário. Foi especificado o nome do arquivo como 1T67 (HDAC complexada ao ácido hidroxâmico MS-344). Do qual foi removido o ligante, moléculas de H<sub>2</sub>O, íons e cofator.

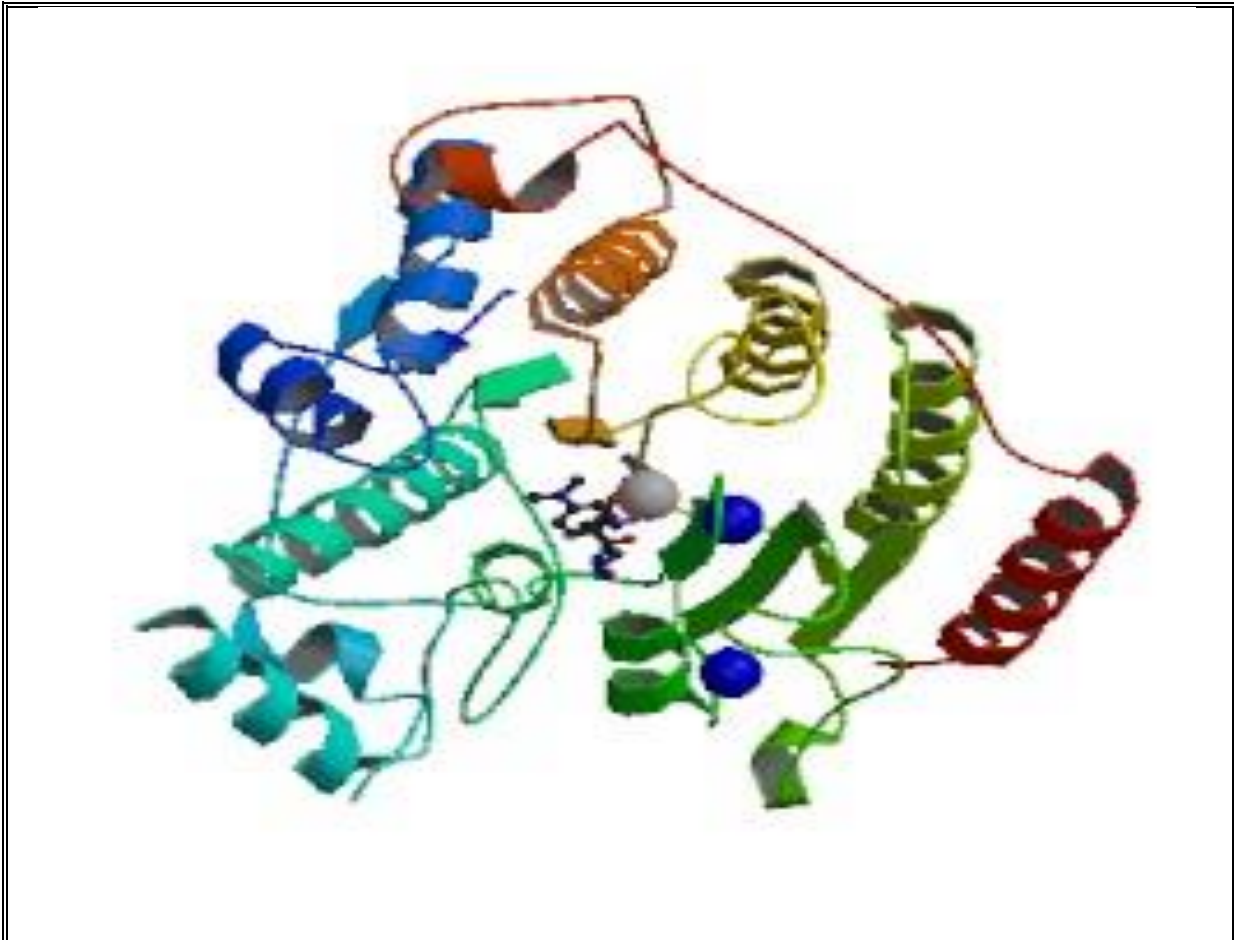


Figura 16 – Representação em modelo de fitas, da HDAC8 com o ligante (MS-344) acoplado. Fonte: RCSB/PDB.

## 5.2 A preparação dos ligantes

Inicialmente, foi realizada a construção e pré-otimização das moléculas candidatas a fármacos, com campo de força UFF (do inglês: *Universal Force Field*), através do software Avogadro (Figura 17). Os arquivos foram abertos com software *AutoDockTools*, no qual foram selecionados todos os números de ligações rotacionáveis; o mesmo software com o qual foi aberto o PDB da estrutura da enzima HDAC8.

As moléculas selecionadas para esse estudo foram: Suberoilânida do Ácido Hidroxâmico (SAHA), Tricostatina A Hidroxâmica (TSA-H), e mais dois ácidos hidroxâmicos estruturados e denominados como Molécula 3 (AH-3) e Molécula 4 (AH-4)

respectivamente; para todas essas quatro moléculas foram preparados análogos betaínicos, aqui denominados Análogos 1(SAHA-BH), 2 (TSA-BH), 3(BH-3) e 4(BH-4) e que seriam os compostos candidatos a fármacos (SOUZA et al., 2013).

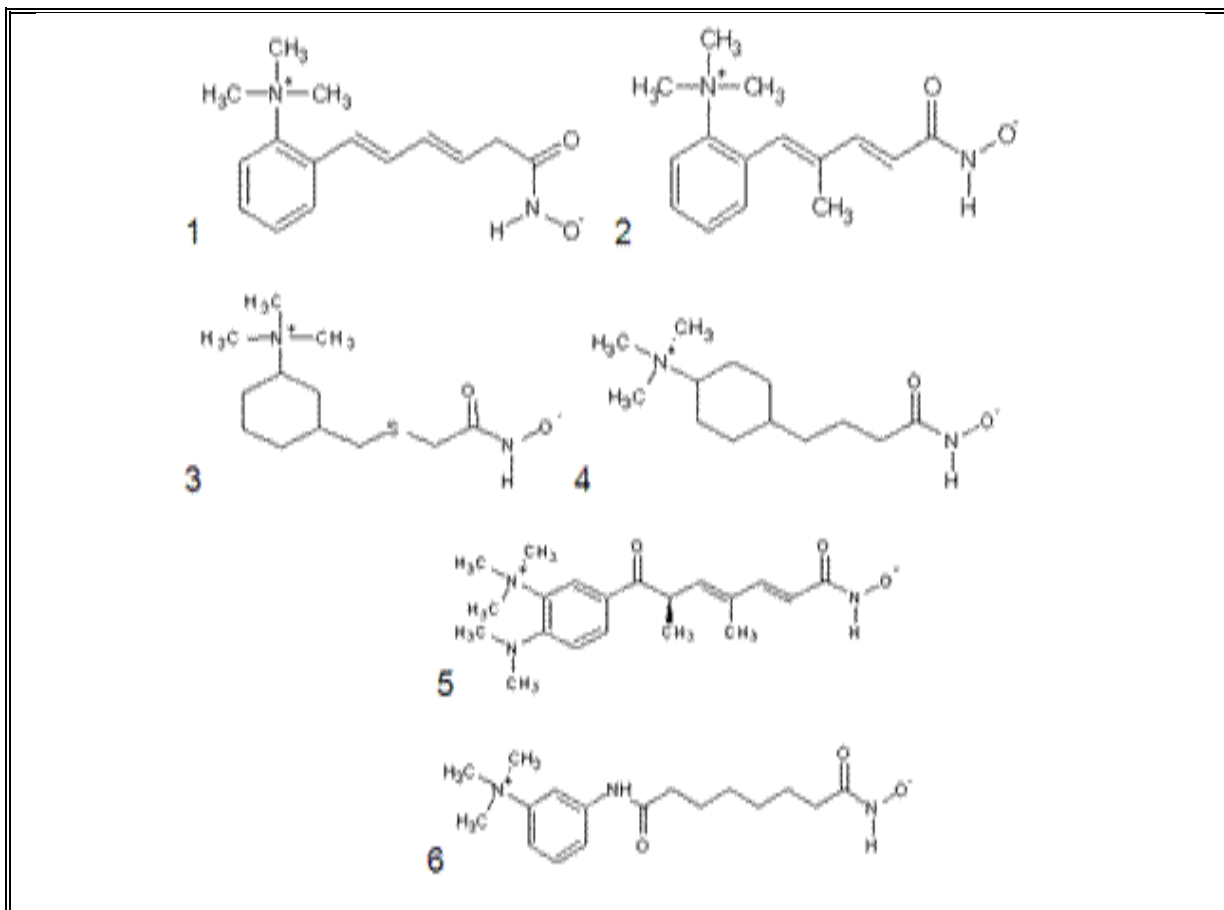


Figura 17 – Fórmula estrutural plana de moléculas selecionadas e criadas para o estudo; onde se observam as análogas betaínicas (3 e 4) e análogos betaínicos baseados em TSA e SAHA (1, 2, 5 e 6).

### 5.2.1 Descrição das moléculas estudadas

Partindo-se da fórmula geral dos ácidos hidroxâmicos (Figura 13), a molécula SAHA apresenta uma cadeia de seis carbonos ligados da carboxila hidroxâmica até à carbonila terminal, na qual está ligada uma amina aromática; a molécula de TSA-H apresenta uma cadeia também com a mesma quantidade de carbonos, porém, com duas ligações duplas, sendo uma entre os carbonos 2 e 3 e outra entre os carbonos 5 e 6, os carbonos 4 e 6 apresentam cada, um radical metila, e um anel aromático ligado à carbonila terminal, sendo que esse anel apresenta uma dimetilamina em posição para. A molécula 3 (AH-3) apresenta



função hidroxâmica e em sua cadeia um átomo de enxofre separa o carbono 2 do carbono 3, ligado ao carbono 3 foi colocado um radical de cadeia hexacíclica. A molécula 4 (AH-4) difere da molécula 3, apenas por apresentar um átomo de carbono substituindo o enxofre na cadeia.

As moléculas análogas, que são candidatas a fármacos, foram construídas a partir de cada uma das moléculas dos ácidos hidroxâmicos correspondentes, às quais, em cada uma foi ligada uma molécula de betaína (trimetil amina) através do nitrogênio, da seguinte forma: no Análogo 1 (SAHA-BH) a betaína foi ligada na posição orto do anel aromático, assim como no Análogo 2 (TSA-BH); no Análogo 3 (BH-3) a betaína foi ligada ao carbono 3 da cadeia hexacíclica, tendo sido ligada na mesma posição correspondente na estrutura do Análogo 4 (BH-4).

Em cada estudo, as moléculas de ácidos hidroxâmicos e as candidatas a fármacos, foram inseridas no sítio ativo da macromolécula (HDAC8), com a restrição de ligação com o átomo de zinco ( $Zn^{+2}$ ).

### 5.3 O procedimento de docagem

A partir do planejamento direto, foi realizada a docagem, tendo sido utilizado como método de busca o Algoritmo Genético Lamarckiano (AGL); e as estruturas foram selecionadas por inspeção visual das poses dos complexos obtidos, levando-se em consideração a complementaridade do sítio ativo e a consistência da conformação adotada.

Após a inspeção, algumas estruturas foram selecionadas para que fossem realizados os cálculos de QM/MM, com a utilização dos programas Gaussian 9 e AutoDock 4.2, durante o processo de docagem foram gerados, para cada estrutura, 100 confôrmeros, os quais foram agrupados com RMS igual a 2,0 Å.

### 5.4 O programa de docagem utilizado

O programa utilizado nesse estudo foi o *AutoDock 4.2* em uma versão atualizada para 4.2.5, que permite um procedimento de ancoragem de ligantes flexíveis para receptores flexíveis; trata-se de um programa de distribuição gratuita e amplamente testado, que inclui uma série de melhorias em relação a versões anteriores (ALENCAR, 2010), as quais têm por objetivo simplificar os procedimentos de encaixe para melhor atender às demandas de

ancoragem, combinando os métodos de avaliação de grade rápida baseada em energia e busca eficiente de liberdade de torção.

O *software* relacionado (*AutoDock VINA*) usa uma função de pontuação simples que permitiu uma maior resolutividade. O acoplamento foi efetuado usando o método mais eficiente para varrer o espaço conformacional do ligante, o Algoritmo Genético Lamarckiano (AGL), método baseado em campo de força, que calcula energia de interação alvo-ligante e a energia interna do ligante (sujeito a restrições moleculares devido à interação com o alvo) por meio do campo de força molecular (TRIPOS), descrita em termos eletrostáticos e potencial de Lenard-Jones, levando em consideração a entropia e fenômenos de solvatação, e a função de pontuação empírica de energia, que fornece resultados reprodutíveis para atrações de ligantes com cerca de 10 ligações flexíveis: um algoritmo genético cria uma população de possíveis respostas para o problema a ser tratado (inicialização) para depois submetê-la ao processo de evolução, constituído pelas etapas de avaliação, seleção, cruzamento, mutação, atualização e finalização.

*AutoDock 4.2* usa um campo de força de energia livre semi-empírico cujos parâmetros foram obtidos de muitos complexos de ligante-proteína, com o objetivo de se conhecer estrutura e a constante de inibição ( $K_i$ ); nesse campo de força são incluídas seis avaliações de pares de energia e a entropia conformacional estimada ( $\Delta S_{\text{conf}}$ ):

$$\Delta G = (V_{\text{bound}}^{\text{L-L}} - V_{\text{unbound}}^{\text{L-L}}) + (V_{\text{bound}}^{\text{P-P}} - V_{\text{unbound}}^{\text{P-P}}) + (V_{\text{bound}}^{\text{P-L}} - V_{\text{unbound}}^{\text{P-L}} + \Delta S_{\text{conf}}) \quad (5.00),$$

resultando em um somatório das energias de ligante (L), da macromolécula (P), do acoplamento ligante-macromolécula (L-P) e da entropia ( $\Delta S$ ); incluindo avaliação de dispersão/repulsão, ligações de hidrogênio, ligação eletrostática e de dessolvatação, para as energias de cada termo.

Após a otimização das geometrias, as energias de ligação entre o fármaco e a proteína foram calculadas, e as melhores poses obtidas dessas moléculas, as quais foram selecionadas na docagem, serão utilizadas como geometria de partida para a realização dos cálculos QM/MM.

As geometrias do ligante, da proteína e do complexo ligante-proteína serão otimizadas pelo método ONIOM, modelo B3LYP/6-31G(d): OPLS. A partir dos resultados obtidos, foram realizados os estudos comparativos das propriedades moleculares dos ácidos hidroxâmicos e das betaínas hidroxâmicas correspondentes que foram propostas por meio da avaliação dos orbitais de fronteira (HOMO e LUMO), energias e propriedades eletrostáticas

das moléculas (polarizabilidade, cargas atômicas, etc.). O programa utilizado para a realização dos cálculos foi o Gaussian 09.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Resultados parciais divulgados

Em novembro do ano de 2014 foram apresentados durante o 7<sup>th</sup> *Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry - BrazMedChem2014* (ANEXOS, pgs.,86 e 87) ,os resultados parciais desse trabalho, os quais já demonstravam uma redução das energias de ligação para os análogos betaínicos e uma pequena diferença entre as moléculas de TSA hidroxâmico e TSA betaínico (Quadro 2).

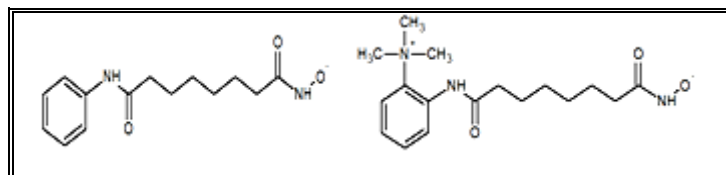
Tabela 2 – Resultados dos cálculos obtidos da análise dos compostos estudados: energias de ligação ( $\text{kcal.mol}^{-1}$ ) e frequência de poses selecionadas no programa (AutoDock 4.2.5), Apresentado durante o 7<sup>o</sup>.Simpósio Brasileiro em Química Medicinal, novembro de 2014 (BrazMedChem2014).

Compostos	Energia de ligação ( $\text{kcal.mol}^{-1}$ )	Frequência de poses
SAHA	-7,2	80
SAHA-Betaínico	- 10,5	54
TSA	- 10,26	65
TSA-Betaínico	- 9,59	54
Molécula 3	- 7,6	98
Molécula 3 – Betaínica	- 11,4	98
Molécula 4	- 8,2	100
Molécula 4 – Betaínica	- 11,6	84

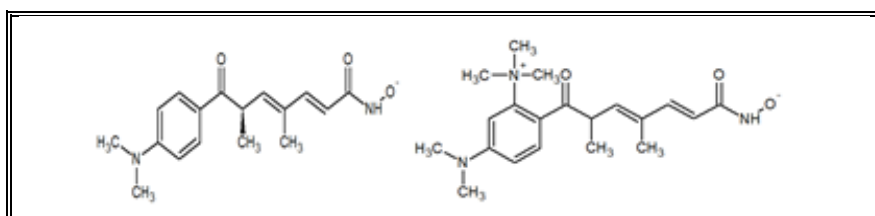
### 6.2 A caracterização das moléculas estudadas

Quatro moléculas de Betaínas Hidroxâmicas foram selecionadas neste trabalho, de um total de 60 (sessenta) conformações experimentadas; a Figura 18 apresenta as estruturas das

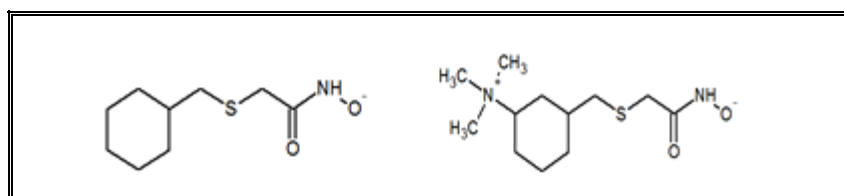
moléculas de Ácidos Hidroxâmicos ( $R^4\text{-CO-NH-O}^-$ ) estudadas e analisadas, em comparação com as estruturas análogas betaínicas correspondentes ( $R^1(R^2)(R^3)\text{N}^+\text{-R}^4\text{-CO-NH-O}^-$ ), em sua forma zwitteriônica.



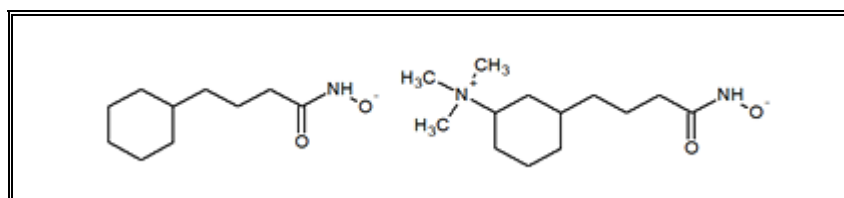
#### Molécula SAHA e Análogo Betaínico SAHA-BH



#### Molécula TSA Hidroxâmico e Análogo Betaínico TSA-BH



#### Molécula 3 Ácido Hidroxâmico e Análogo Betaínico BH-3



#### Molécula 4 Ácido Hidroxâmico e Análogo Betaínico BH-4

Figura 18 – Moléculas dos ácidos hidroxâmicos e seus correspondentes análogos betaínicos, desenvolvidas e estudadas nesse trabalho.

Sabe-se que, em aminas, o nitrogênio (N) apresenta hibridização do tipo  $sp^3$  e os grupos ligados formam um tetraedro, no qual o quarto vértice está ocupado pelo par de elétrons não

ligado ou por um quarto grupo, como no caso das betaínas hidroxâmicas (sal de amônio quaternário), e que a natureza e as características dos grupos que se ligam ao N-quaternário irão influenciar o caráter básico do nitrogênio.

Os análogos betaínicos estudados diferem dos respectivos ácidos hidroxâmicos correspondentes apenas pela inclusão de um grupo betaínico em sua molécula.

### 6.3 Resultados finais da docagem molecular

#### 6.3.1 Resultados dos cálculos de Mecânica Molecular

Foram realizados os cálculos das energias de interação entre os inibidores e a enzima histona deacetilase. Os ligantes são classificados como ácidos hidroxâmicos e seus análogos na forma de betaínas hidroxâmicas. A partir dos valores obtidos foram calculadas as constantes de inibição. Os resultados das docagem realizadas são apresentados nas tabelas seguintes:

Tabela 3 – Comparativo entre os resultados dos cálculos das moléculas estudadas (SAHA e SAHA-BH), energias de ligação, constante de inibição ( $K_i$ ) em nM e  $\mu\text{M}^{(1)}$ , e frequência de poses

Molécula	Energia de ligação ( $\text{kcal.mol}^{-1}$ )	$K_i$	Frequencia de poses
SAHA	-7,28	4,61 $\mu\text{M}$	80
SAHA-BH	-10,71	14,19 nM	64

<sup>1</sup> As unidades de Constantes de Inibição ( $K_i$ ) variam sempre que for necessário otimizar o espaço nas tabelas e facilitar a visualização, evitando-se numerais muito extensos.

Tabela 4 – Comparativo entre os resultados dos cálculos das moléculas estudadas (TSA-H e TSA-BH), energias de ligação, constante de inibição ( $K_i$ ) em nM e  $\mu\text{M}^{(1)}$ , e frequência de poses

<b>Molécula</b>	<b>Energia de ligação (kcal.mol<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>K_i</math></b>	<b>Frequencia de poses</b>
<b>TSA-H</b>	<b>-10,26</b>	<b>30,54 nM</b>	<b>65</b>
<b>TSA-BH</b>	<b>-9,59</b>	<b>94,39 nM</b>	<b>54</b>

Tabela 5 – Comparativo entre os resultados dos cálculos das moléculas estudadas (AH-3 e BH-3), energias de ligação constante de inibição ( $K_i$ ) em nM e  $\mu\text{M}^{(1)}$ , e frequência de poses

<b>Molécula</b>	<b>Energia de ligação (kcal.mol<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>K_i</math></b>	<b>Frequência de poses</b>
<b>AH-3</b>	<b>-7,65</b>	<b>2,47 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>97</b>
<b>BH-3</b>	<b>-11,35</b>	<b>4,77 nM</b>	<b>98</b>

Tabela 6 – Comparativo entre os resultados dos cálculos das moléculas estudadas (AH-4 e BH-4), energias de ligação, constante de inibição ( $K_i$ ) em nM e  $\mu\text{M}^{(1)}$ , e frequência de poses

<b>Molécula</b>	<b>Energia de ligação (kcal.mol<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>K_i</math></b>	<b>Frequência de poses</b>
<b>AH-4</b>	<b>-8,19</b>	<b>990,8 nM</b>	<b>78</b>
<b>BH-4</b>	<b>-11,62</b>	<b>3,02 nM</b>	<b>76</b>

Pode-se observar pelos resultados que as energias de interação inibidor-proteína foram mais negativos (maior energia de interação e portanto, menores constantes de inibição) para as betaínas hidroxâmicas do que para os ácidos hidroxâmicos, com exceção do análogo

betaínico da molécula 2 (TSA-BH), que apresentou um discreto aumento de energia de interação em relação ao correspondente TSA-Hidroxâmico (Tabela 2).

O aumento da energia de interação, ao se comparar os análogos, pode ser explicada pelo favorecimento da interação dos grupos oniom  $[N(CH_3)_3]^+$  com grupos carregados negativamente presentes no sítio ativo da a enzima HDAC. Nesse caso os aminoácidos envolvidos nas interações foram o Asp-101 e Gly-15, Figura 19.

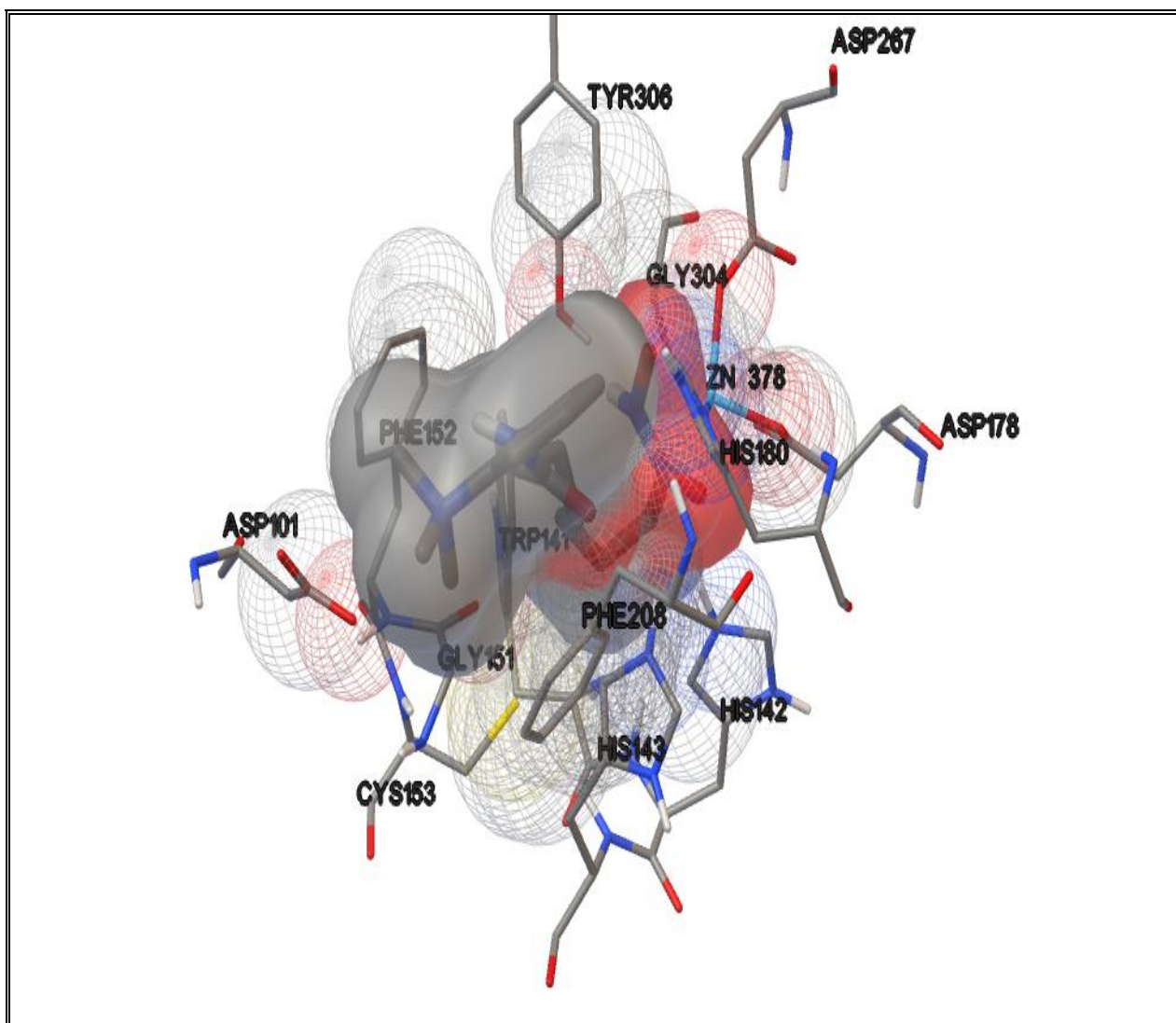


Figura 19 – Imagem da interação entre a betaína hidroxâmica com o sítio ativo da HDAC8, destacando aminoácidos interagentes em regiões laterais do sítio ativo da enzima.

É importante ressaltar que além das interações eletrostáticas entre inibidores e aminoácidos, favorecidas pelo carga positiva do grupo  $[N(CH_3)_3]^+$  presente nas estruturas das betaínas, existe também uma estabilização do grupo hidroxamato, devido à própria forma

zwitterionica o que possibilita uma melhor interação com o zinco, em comparação com o ácido hidroxâmico análogo.

Considerando-se a molécula do análogo 2 (TSA-BH) nota-se que o grupo betaínico está orientado em posição orto do anel aromático e que esta apresenta uma cadeia ramificada e com ligações duplas; essa betaína hidroxâmica apresenta uma estrutura rígida devido ao impedimento estérico entre os grupos  $[N(CH_3)_3]^+$  e  $C=O$  adjacentes, (Tabela 2). Para avaliar a barreira de energia rotacional, na ligação entre o carbono carbonílico e o anel aromático, foram feitos calculos, no nível B3LYP/6-31G\*\*, das estruturas simplificadas para o TSA (Figura 20) e TSA-BH (Figura 21).

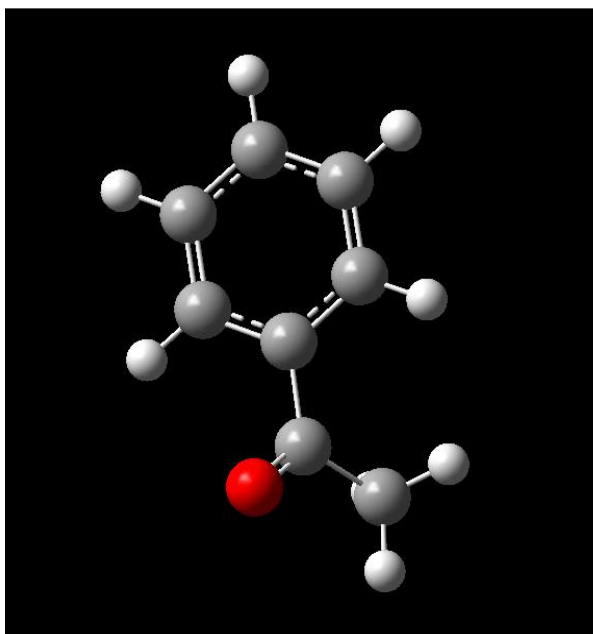


Figura 20 – Imagem da conformação molecular do TSA, em destaque para a estrutura sem baetaína ligada ao anel aromático.

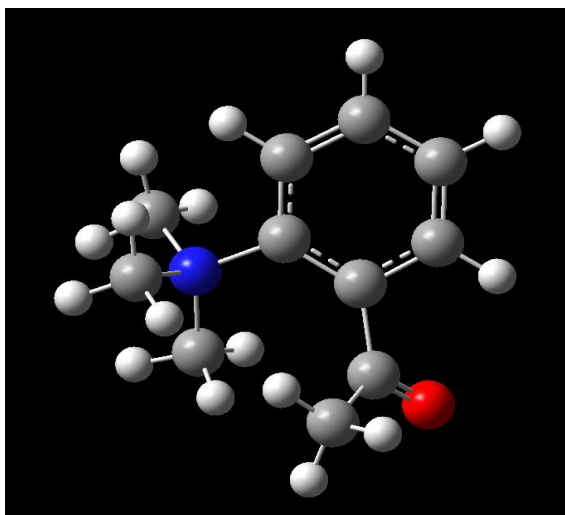




Figura 21 – Imagem da conformação molecular do TSA-BH, em destaque para betaína ligada ao anel aromático.

Como resultado, observa-se que a barreira energética rotacional para a estrutura do TSA-BH (Figura 23, aproximadamente 20 kcal mol<sup>-1</sup>) é muito maior do que a barreira obtida para o TSA (Figura 22, aproximadamente 1,25 kcal mol<sup>-1</sup>). Esse impedimento prejudica a rotação do anel na estrutura, reduzindo as possibilidades conformacionais, o que pode desfavorecer a interação dessa estrutura como os aminoácidos do sítio ativo.

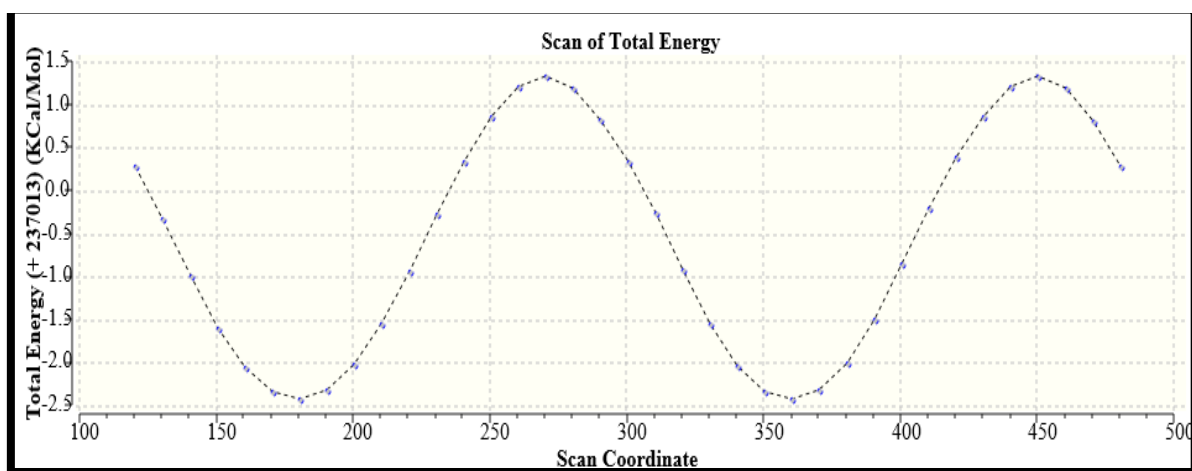


Figura 22 – Gráfico de energia total da molécula de TSA sem a ligação com a betaína.

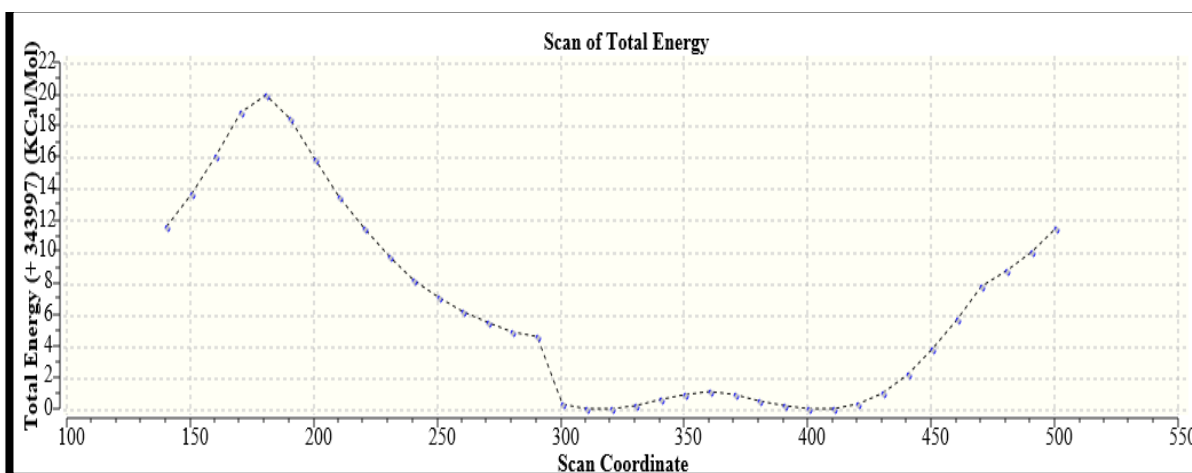


Figura 23 – Gráfico de energia total da molécula de TSA como betaína ligada (TSA-BH).

As moléculas 3 e 4 que não apresentam anel aromático, mas sim uma estrutura cíclica hexagonal, na qual verifica-se a presença de um heteroátomo (S – Enxofre) na cadeia lateral não ramificada do análogo 3, cujo grupo betaínico encontra-se na posição 3 da cadeia cíclica. Comparando-se as estruturas 3 e 4 percebe-se que com a presença do enxofre ocorre uma diminuição na energia de interação. Isso pode ser atribuído às repulsões entre o heteroátomo e os grupos carregados negativamente nos aminoácidos presentes no sítio ativo.

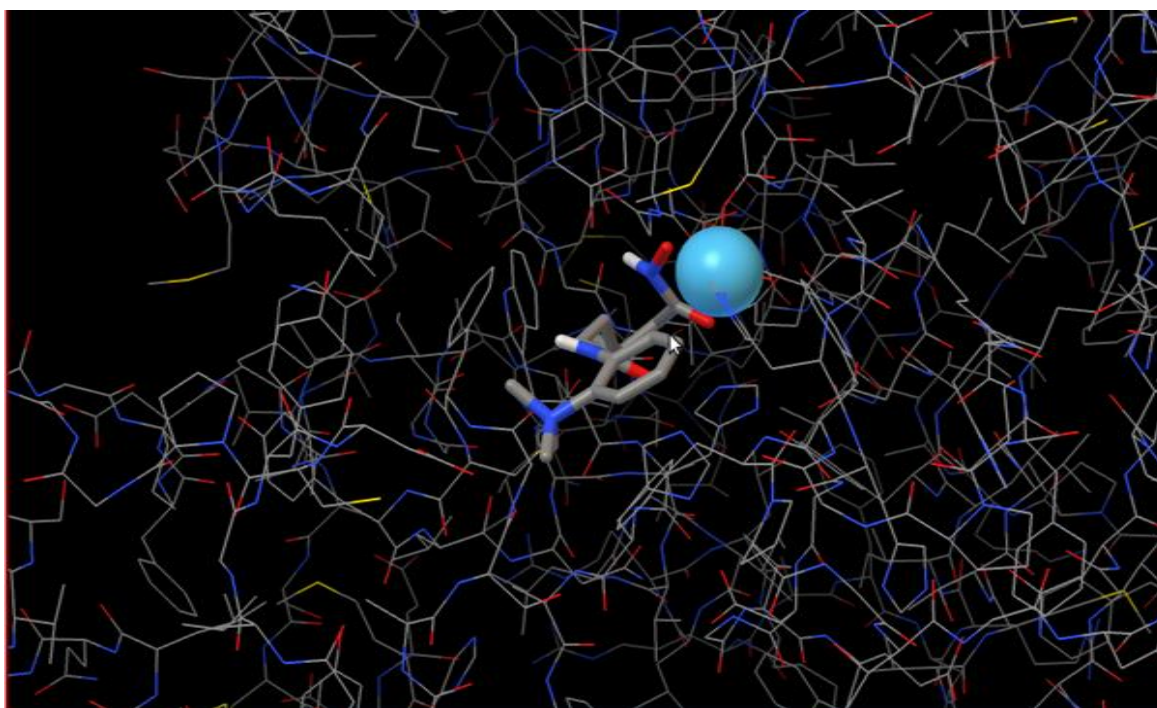


Figura 24 – Acoplamento virtual de ligante betaína hidroxâmica no sítio ativo da HDAC8.

Os resultados desse estudo foram obtidos com RMS = 2.0 e Temperatura = 298,15°K, esses resultados estão apresentados nas Tabelas 1 a 4, na Figura 23 pode-se obter uma visão virtual do sítio ativo da HDAC, no qual ocorre a interação entre o ligante e a enzima.

A Figura 24 mostra a interação entre a betaína hidroxâmica e o sítio ativo da HDAC-8, com o zinco em destaque, na qual se observa o arranjo espacial e a disposição conformacional entre as moléculas interagentes.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como resultados dos estudos realizados pelo método de docagem molecular, percebe-se que, de fato, análogos betaínicos de ácidos hidroxâmicos interagiram mais fortemente com a enzima (HDAC-8) do que seus respectivos ácidos hidroxâmicos. Observou-se uma diminuição da energia (maior energia de interação) e conseqüentemente diminuição da constante de inibição  $K_i$  (o que favorece a inibição) nos cálculos com as betaínas hidroxâmicas, com exceção das moléculas TSA e TSA-BH. Isso pode estar correlacionado com a diminuição das possibilidades de conformações de interação com o sítio ativo devido ao impedimento rotacional da ligação entre o carbono carbonílico e o anel aromático no TSA-BH.

Entre as moléculas que apresentaram resultados mais significativos, destacaram-se: a betaína hidroxâmica 4 (BH-4) como a mais promissora candidata a fármaco, e a TSH-Betaínica por ter apresentado um aumento de energia intramolecular, sugerindo que possa ser preterida nas próximas etapas de estudos.

Para que se prossiga nos estudos da química computacional, já estão sendo iniciados os cálculos através do método híbrido ONIOM, e com esses resultados espera-se evoluir rápida e seguramente em direção aos processos de rotas de síntese, para que seja possível realizar os experimentos *in vitro*, em busca da eficácia farmacológica.

## 8. REFERÊNCIAS

AGUIAR, C. C.; DE SOUZA, O. N. – **Avanços no Processo de Modelagem Molecular Comparativa por Homologia da Estrutura Tridimensional da Enzima Corismato Sintase de *Plasmodium falciparum***; Salão de Iniciação Científica da UFRGS, XXII, 2010. Porto Alegre. Anais, 2010.

AIGNER, R.; VYBIRAL, R.; SEITZ, H. – HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT – **Processo para a preparação de betaína**. Patente nº PI9500360-6, 1995.

ALENCAR, S. A. de. – **Utilização de ferramentas computacionais para o estudo do impacto funcional e estrutural de nsSNPs em genes codificadores de proteínas**. ICB-UFMG, 2010. 113 f. Tese (Doutorado em Bioinformática) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010. Disponível em: <https://www.google.com.br>. Último acesso em: 09/11/15 às 10:39.

AMIN, J. A. et al. – **Cyclodextrin-capped histone deacetylase inhibitors**. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, East Sussex, UK, v.23, p. 3346-8, 2013. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/236205622> A cyclodextrin-capped histone deacetylase inhibitor. Último acesso em: 09/11/15 às 11:00.

- ARENT, C. O. et al. – **Neuroanatomical profile of antimanic effects of histone deacetylases inhibitors**. Mestrado em Ciências da Saúde - Instituto de Neurociências Nacional e de Medicina Translacional (INCT- TM), Unidade de Ciências da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina, Criciúma, SC, Brasil, 2010. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21424678>. Acesso em: 02/08/2015
- BARREIRO, E. J. et al. RODRIGUES, C. R.; ALBUQUERQUE, M. G.; SANT'ANNA, C. M. R.; ALENCASTRO, R. B. de. – **Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal**. Química Nova, v.20, p. 300-310, 1997. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v20n3/4950.pdf>. Acesso em: 20/08/2013.
- BARREIRO, E. J; FRAGA, C. A. – **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. Cap. 1, p. 29-35. Porto Alegre: Artmed, 2001.
- BASTOS, T. M. – **Avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* de nitrosilo/nitro complexos de rutênio em modelos experimentais in vitro e in vivo**. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia- UEFS; Feira de Santana-BA, 2013.
- BBC BRASIL - PUFF, J. – **Novos casos de Doença de Chagas no Brasil se concentram no Pará e Amapá**; Da BBC Brasil, em São Paulo. Atualizado em 31 de maio, 2012 - 13:26 (Brasília) 16:26 GMT.
- BIELIAUSKAS, A.V.; WEERASINGHE, S.V.W.; PFLUM, M.K.H. – **Structural requirements of HDAC inhibitors: SAHA Analogs functionalized adjacent to the hidroxamic acid**; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 17 2216-2219, 2007.
- BIGATÃO, H.M. - **Antichagásicos potenciais: planejamento e estudo da síntese de biosósteros imidazólicos e triazólicos do hidroximetilnitrofural** – Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP, 2011.
- BRAGA, A. A. C.; MORGON, N. H. – **Cálculos teóricos de afinidades por próton de n-alquilaminas usando o método ONIOM**. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13084-971 Campinas – SP; Química Nova, Vol. 29, No. 2, 187-193, 2006.
- BRENNER, Z. – **Trypanosoma cruzi: Morgologia e ciclo evolutivo**. DIAS, J. C. P., and COURA, J. R., org. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997. 486 p. ISBN 85-85676- 31-0. Available from SciELO Books < <http://books.scielo.org> >.
- BULFFER, R. F.(et al.) - **Metodología UV para la determinación de los antichagásicos Nifurtimox y Benznidazol en sangre** - Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 45(3), 2011.
- CARRASCO, M. P. – **Novel folate-hidroxamate based antimetabolites: synthesis and biological evaluation**. Medicinal Chemistry (Shāriqah (United Arab Emirates)) 7(4) 265-74, 2011.
- CASSIANO, C. J. M.; dos SANTOS, F. G. F.; SENA JUNIOR, D. M. de – **Efeitos dos métodos de cálculo de cargas parciais na docagem molecular**. XV Semana de Iniciação Científica da URCA, Campus Pimenta URCA, 2012.

CHAGAS, F. O. das – **Cultura mista, manipulação química e genética de micro-organismos: estratégias para diversificação de metabolismo secundário**; Tese de Doutorado da Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto; Ribeirão Preto-SP, 2014.

CHEN, G. et al. – **Discovery of a small molecular compound simultaneously targeting RXR and HADC: Design, synthesis, molecular docking and bioassay**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.23, Issue 13, 1 3891-3895, 2013.

CORRÊA, B. A. M. – **Modelagem Molecular, Docking e Estudos Teóricos do Espectro Eletrônico de Absorção de Derivados da Benzofenona** – Dissertação de mestrado, PPGCF-UFRJ, 2010.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A.; JUNQUEIRA, A. C. V.. **Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries**. PMID: PMC4296489. doi: 10.1590/0074-0276140236. *Memorial Institut Oswaldo Cruz*. v. 109(7): 856–862. Nov., 2014.

CRAIG, S.A.S. - **Betaine in human nutrition** – *Journal of Clinical Nutrition*, 80(3):539-549, Sociedade Americana de Nutrição Clínica; Sept., 2004

DELCUVE, G. P.; KHAN, D. H. and DAVIE, J. R. – **Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors**; *Clinical Epigenetics*, 4:5 doi:10.1186/1868-7083-4-5, Mar., 2012.

DIAS, L. C. et al. – **Quimioterapia da doença de Chagas: estado de arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos**. *Química Nova*, vol. 32, N. 9, 2444-2457, 2009.

DNDI - DEMAND FORECASTING CHAGAS LATAM – **Manual do usuário**, versão 3.0, Jun., 2013.

EL-SAYED, N. M. et al. – **The Genome Sequence of Trypanosoma cruzi, Etiologic Agent of Chagas Disease**. [www.sciencemag.org](http://www.sciencemag.org); *SCIENCE* vol 309 15 Jul. 2005.

EVANS, W.P., NAIK, A.R. - **Hydroxamic betaines**. UNITED STATES PATENT-US4020100 A, 26, Apr. 1977.

FERNANDES, F. M. S. S. – **Perspectivas da Química Computacional** - Centro de Ciências Moleculares e Materiais (CCMM) Departamento de Química e Bioquímica (DQB), Faculdade de Ciências (FC), Universidade de Lisboa (UL); Publicado em *Química, Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*, 123, 47-53, 2011.

FERNANDES, M. C. M. M.; PANIAGO, E. B.; CARVALHO, S. – **Copper (II) Mixed Ligands Complexes of Hydroxamic Acids with Glycine, Histamine and Histidine**. *Journal Brazilian Chemistry Society*, vol. 8, Nº. 5, 537-548; © Sociedade Brasileira de Química (SBQ); Printed in Brazil, 1997.

FERREIRA, D. C.; MORAIS, S. F. de A.; MUNDIM, K. C. – **Química Estudo da Estrutura Eletrônica do Complexo SAHA-Histona Deacetilase**. Sociedade Brasileira de Química (SBQ) 37a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de; Natal-RN, 2014.

FERREIRA, E. I. – **Planejamento de fármacos na área de doença de Chagas: avanços e desafios**. *Revista Virtual de Química*, 4 (3), 225-246, (2012).



FERREIRA, L. L. G.; dos SANTOS, R. N.; ANDRICOPULO, A. D. – **Estudos de Docagem Molecular e Dinâmica Molecular no Planejamento de Novos Inibidores da Enzima Aldolase**. 34<sup>a</sup> Reunião da Sociedade Brasileira de Química; Florianópolis-SC, 2011.

FERREIRA, R. S.; OLIVA, G. E.; ANDRICOPULO, A.D. – **Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos**. Química Nova, v. 34, n. 10, 1770-1778, (2011).

GALVÃO FILHO, S. S.; CADAVID, D. I. V.; PORTO, F.M.; SOSA, E.; VALERO, E. – RELAMPA – REVISTA LATINO-AMERICANA DE MARCA PASSO E ARRITIMIA, 2008. Artigo de Congresso Páginas 84 a 100. **Simposio Tratamiento no Farmacológico de la Cardiopatía Chagásica - Atualização da Doença de Chagas**. DECA Departamento de Estimulação Cardíaca Artificial da SBCCV, Copyright (2014).

GIACOBBO, B. C. – **Organização, classificação e simulações de docagem molecular de compostos inibidores e candidatos a inibidores da enzima InhA de Mycobacterium tuberculosis**. XII Salão de Iniciação Científica, PUCRS, 2011.

GREGORETTI, I. V.; LEE, Y. and GOODSON, H. V. - **Molecular Evolution of the Histone Deacetylase Family: Functional Implications of Phylogenetic Analysis**; doi:10.1016/j.jmb.2004.02.006 J. Mol. Biol. (2004) 338, 17–31; 2004.

GUERRA-BUBB, J. M. et al. – **Synthesis and HDAC inhibitory activity of isosteric thiazoline-oxazole largazole analogs**. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 23, Issue 21, 1 6025-6028; 2013.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. E. – **Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas**. Estudos Avançados. v.24 n.70, São Paulo, 2010.

GUPTA, N., et al. – **Pharmacophore modelling, validation, 3D virtual screening, docking, design and in silico ADMET simulation study of histone deacetylase class-1 inhibitors**. DOI: 10.1007/s00044-014-1057-2. Medicinal Chemistry Research , 2014.

HALPERIN, I.; MA, B.; WOLFSON, H.; NUSSINOV, R.<sup>†</sup> – **Principles of Docking: An Overview of Search Algorithms and a Guide to Scoring Functions**; PROTEINS: Structure, Function and Genetics. 47:409–443; 2002.

HEERDT, G.; MORGON, N. H. – **Validação computacional de métodos compostos no estudo de propriedades moleculares**; Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13083-970 Campinas - SP, Brasil; Quim. Nova, Vol. 34, No. 5, 868-873, 2011.

HUANG, S-Y.; ZOU, X. – **Review - Advances and Challenges in Protein-Ligand Docking**; **International Journal of Molecular Sciences**. ISSN 1422-0067 www.mdpi.com/journal/ijms; Int. J. Mol. Science (2010), 11, 3016-3034; doi:10.3390/ijms11083016. Accepted: 4 August 2010 / Published: 18 Aug., 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL-INPI – **Processo para a preparação de betaínas** – Patente n.PI9500360-6 – Revista 1523, Despacho 11.1, Art.18, Parágrafo 2. do CPI, 14/03/2000. Revista de Propriedade Industrial, n.1854, 18 de Jul., 2006.

JAYTHILAKA, N. – **Inhibition of the function of class IIa HDACs by blocking their interaction with MEF2**. Journal of Clinical Investigation, 124(1): 30-39, 2014.

- JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C.; LEACH, A. R.; TAYLOR, R. – **Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking**; J. Molecular Biology, 267, 727-748; 1997.
- KANDAKATLA, N. – **In silico studies on modified hydroxamic acid and valporic acid as potential inhibitors for HDAC2**. Bangladesh Journal of Pharmacology, v.8, n.3 328-335; 2013.
- LATTES, R.; LASALA, M. B. – **Chagas disease in the immunosuppressed patient**. First published: Full publication history, DOI: 10.1111/1469-0691.12585; 2014.
- LEAL, V. B. da S. – **Fármacos que têm por alvo o epigenoma**; Universidade Fernando Pessoa; Faculdade de Ciências da Saúde; Dissertação de mestrado; Porto - Portugal, 2013.
- LEITE, A. C. et al. – **Screening of Trypanosoma cruzi glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase enzyme inhibitors**. Revista Brasileira de Farmacognosia. Brazilian Journal of Pharmacognosy 19(1ª) 1-6, 2009.
- LEITE, M.; TROSSINI, G. H. G.; RANDO, D. G.; FERREIRA, E. I.; ANDRICOPULO, A. D. – **Avaliação bioquímica e docagem molecular de uma série de derivados de chalconas e semicarbazonas candidatos a inibidores de cruzaina**; 34ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química; Florianópolis-SC, 2011.
- LEVINE, I. N. – **Química Cúantica**; 5ª edición; PEARSON EDUCACIÓN S. A.; ISBN: 84-205-3096-4; Madrid, 2001.
- LIZ, D. G. de; SILVEIRA, G. P.; BRAGA, A. L. – **Synthesis of hidroxic acid and proline derivatives of diselenide as mimetics enzyme to GPX**. P. 359-359. In Blucher Chemistry Proceedings, São Paulo, v.1, n.1, Set., 2013.
- LUCAS, D. C. – **Algoritmos Genéticos: uma Introdução**; APOSTILA. dlucas@inf.ufrgs.br; Mar., 2002.
- LUGO, J. A. B. – **“Síntesis y evaluación in silico e in vitro de derivados del ácido valproico como antineoplásicos”** – Tesis que para obtener el grado de maestro en ciencias de la farmacología; Instituto politécnico nacional escuela superior de medicina sección de estudios de posgrado e investigación; México, 2011.
- MAGALHÃES, C. S. – **Algoritmos genéticos para o problema de docking proteína-ligante**. Tese de Doutorado; LNCC - Petrópolis-RJ, Jun., 2006.
- MAGALHÃES, U. de O. – **Modelagem molecular e avaliação da relação estrutura – atividade acoplados a estudos físico-químicos, farmacocinéticos e toxicológicos in silico de derivados heterocíclicos com atividade leishmanicida**; Dissertação de Mestrado; PGCF – FF – UFRJ; Rio de Janeiro-RJ, 2009.
- MALTAROLLO, V. G.; HONÓRIO, K. M. – **Análise da Seletividade de Ligantes pelo Receptor PPARδ Empregando Docagem Molecular e Perfil Hidrofóbico do Sítio de Ligação**. 35ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química; Águas de Lindóia-SP, 2012.
- MANZANO, J. A. N.G.; **Estudo Dirigido: ALGORITMOS**. Editora Érica, 2000.

MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H. – **Biossensores baseados no processo de inibição enzimática**; Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000700034>. Química Nova vol.31 no.7 São Paulo 2008.

MARSCHNER, F. W. ; HARDY, E. E. – **Processo para produção de um complexo de betaína cocoamida, processo para a produção de uma composição tensoativa, agente de acondicionamento e composição tensoativa (Patente: PI9302103-8)**. EUA, N°. 07/891, 519, 01/06/1992.

MEDEIROS, F. L. L. – **Algoritmo genético híbrido como um método de busca de estados estacionários de sistemas dinâmicos**; INPE-13913-TDI/1058; São José dos Campos-SP, 2006.

MENDITI, KBC; CHUNG KANG, H - **O Papel das Proteínas Histonas nas Neoplasias Hematológicas The Role of Histones Proteins in Hematological Neoplasias**; Revista Brasileira de Cancerologia, 53(4): 453-460; 2007.

MONTEL, A. L. B. - **Estudo do Mecanismo de Ação e Desenvolvimento de Medicamentos Tripanocidas** – Tese de Doutorado pelo Instituto de Química-UnB, 2011.

MORENO, A.D. – Dissertação de Mestrado: **Estudo da expressão dos genes da classe I das histonas desacetilases (HDACs 1,2,3 e 8) em leucemia linfóide aguda de crianças e adolescentes**; Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto –USP; Ribeirão Preto-SP, 2008.

MORGON, N. H. - **Computação em química teórica: informações técnicas**. Química Nova, Vol. 24, No. 5, 676-682, 2001.

MULLER, H. R. e PRADO, K. B. – **Epigenética: um novo campo da genética; Epigenetics: a new genetic field**; RUBS, v.1, n.3, p.61-69, set./dez. Curitiba-PR, 2008.

NAMBA, A. M.; da SILVA, V. B.; da SILVA, C. H. T. P. – **Docagem molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos**. Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Eclet. Quím. vol.33 no.4 São Paulo Out./Dec. 2008. Ribeirão Preto-SP, Brasil, 2008.

NEIRA, M. E. – **El metodo ONIOM**; 10 de Sep., 2002.

NETZ, P. A. – **Interações entre Benzotiadiazóis e DNA: docagem e simulação**. 34ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química; Florianópolis-SC, 2011.

NOGUEIRA, F. B. - **Estudo dos genes que codificam as proteínas antioxidantes em populações do Trypanosoma cruzi sensíveis e resistentes ao benzonidazol** – Tese de Doutorado, DBCM-CPqRR, Belo Horizonte-MG, 2009.

OLIVEIRA, J. C. de – **Epigenética e doenças humanas**; doi:10.5433/1679-0367.2012v33n1p21; Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, v. 33, n. 1, p. 21-34, jan./jun. Londrina-PR, 2012.

OLIVEIRA, L. de C. – Dissertação de Mestrado: **Efeito de Drogas Moduladoras da estrutura da cromatina sobre a interação entre Macrófagos Murinos e Paracoccidioides brasiliensis**; Universidade de Brasília Faculdade de Medicina Pós-graduação em Patologia Molecular; Brasília, 2012.



PEIXOTO, P.H.R. – **Estrutura eletrônica e polarizabilidades de betaína**. Tese de Mestrado do Departamento de Física – UFPE, 2002.

PEREIRA, I. R. et al.. **A Human Type5 Adenovirus-Based Trypanosomacruzi Therapeutic Vaccine Re-programs Immune Response and Reverses Chronic Cardiomyopathy**. Response and Reverses Chronic Cardiomyopathy. PLOS Pathogens 11(1):e1004594.doi:10.1371/journal.ppat.1004594; Jan., 2015.

PITA, S. S. R.; PASCUTTI, P. G. – **Análise farmacofórica da Tripanotiona Redutase (TR) de Trypanosoma cruzi complexada com inibidores peptídeo miméticos**. Revista Virtual de Química, 4 (6), 788-804, 2012.

PORTAL CHAGAS- MS – Portal da Saúde – Ministério da Saúde – [www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br). GNU/GPL v2.0; **FIOCRUZ Copyright © Fundação Oswaldo Cruz - Ministério da Saúde**. CAMPUS Sede: Av. Brasil, 4365 - Manguinhos, Rio de Janeiro CEP: 21.045-900 Tel.:(0xx21)2562-1414; Copyright © 2015

PORTAL DO GOVERNO; **Portal da Saúde – Ministério da Saúde – [www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br)**. GNU/GPL v 2.0; Copyright © 2014.

PRIEBE, J.P. – **Estudo da reação de transferência do grupo fosforila do 2,4-dinitrofenil etil fosfato para nucleófilos e efeitos da incorporação de íons em micelas zwitteriônicas de sulfobetainas** – Tese de Doutorado em Química da UFSC, Florianópolis, 2009.

ROCHA, G. B. da. – **Métodos Semi-empíricos para o Tratamento de Sistemas Macromoleculares: de Compostos de Coordenação à Proteínas - Novos algoritmos e novos hardwares**. V-Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos. Petrópolis- Rio de Janeiro, 2010. Acesso em 23/01/2015.

ROCHA, J. R. da – **Planejamento de Inibidores das Enzimas Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase e Diidroorotato Desidrogenase de Trypanosoma cruzi** – Tese (Doutorado em), USP. São Carlos, 2010.

RODRIGUES, C. R. – **Modelagem Molecular**; Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola N° 3 – Mai., 2001.

RODRIGUES, R. P. et al. – **Estratégias de triagem virtual no planejamento de fármacos**. Revista Virtual de Química, 4 (6), 739-776; 2012.

SANT'ANNA, C. M. R. – **Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (Recomendação da IUPAC para 1997)**; Química Nova, v. 25, p. 505-512, 2002.

SANT'ANNA, C. M. R. – **Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: uma introdução**. Revista Virtual de Química 1 (1), 49-57, (2009).

SANT'ANNA, C. M. R.; SOUZA, V.P. de – **Estudo semi-empírico de ácidos hidroxâmicos: ácido formoidroxâmico e derivados do aleloquímico DIMBOA**; Recebido em 22/3/00; aceito em (5/2/01).

SANTOS, A. O.; ALBUQUERQUE, C. N. de. – **Otimização da rota de síntese do megazol, potencial agente antichagásico**. CFC-USP, 2001. Disponível em: <http://www.bv.fapesp.br/pt/auxilios/15747/>. Acesso em: 23 /11/2014.

SANTOS, M. P. dos – **Butirato sódico potencia os efeitos citotóxicos de antineoplásicos sobre células linfoblásticas humanas.** Faculdade de Medicina-UFRS, 2009.

SANTOS, M. P. dos; BRUNETTO, A. L.; SCHWARTSMANN, G.; ROESLER, R.; ABUJANRA, A. L. – **Sodium butyrate enhances the cytotoxic effects of antineoplastic drugs in human lymphoblastic T-cells; Leukemia Research.** Volume 33, Issue 2, Pages 218-221. Feb., 2009.

SETO, E.; YOSHIDA, M. – **Erasers of Histone Acetylation: The Histone Deacetylase Enzymes;** doi: 10.1101/cshperspect.a018713 Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2014. 6: Copyright © 2014.

SETO, E.; YOSHIDA, M. – **Erasers of Histone Acetylation: The Histone Deacetylase Enzymes;** doi: 10.1101/cshperspect.a018713 Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2014. 6: Copyright © 2014.

SHULTZ, M. et al. – **The design, synthesis and structure–activity relationships of novel isoindoline-based histone deacetylase inhibitors.** Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 21, Issue 16, 4909-4912, 2011.

SILVA, A. C.A. da – **Novas imidazolidinas potencialmente esquistossomicidas: bioatividade de 2-tioxo-imidazolidin-4-onas frente a vermes adultos de *schistosoma mansoni* (cepa BH)** Universidade Federal de Pernambuco Centro de ciências Biológicas, departamento de antibióticos. Recife-PE, 2004.

SILVA, E. B.; LEITE, A. C. L. – **Síntese e avaliação da atividade biológica de novos protótipos a fármacos antichagásicos.** XIX CONIC III CONITI VII JOIC, CTG-UFPE, 2011.

SOUZA, A. A.; RANGEL, F. C.; ANDRADE, E. da S.; MONTEI, A. L. B. – **Modelagem Molecular de Potenciais Inibidores de Histona Deacetilase com Atividade Tripanocida.** ISBN: 978-85-85905-06-453° Congresso Brasileiro de Química, Rio de Janeiro/RJ, de 14 a 18 de Out., 2013.

TEIXEIRA, M. et al. – **“Estudo do Uso da Betaína na Biologia e Morfologia de Estádios Evolutivos de Eimeria acervulina em Frangos de Corte Infectados Experimentalmente com Oocistos Esporulados”** – Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária 15,4, 193-198, 2006.

TELES, A. L. B. – Dissertação de mestrado: **Estudo do mecanismo catalítico da pirofosforilase do fungo *moniliophthora pernicioso* por métodos QM/MM;** Programa de pós-graduação em biotecnologia da UEFS/FIOCRUZ; Feira de Santana-BA, 2011

VERLI, H. – **SAR ou REA Relação entre a estrutura e a atividade farmacológica;** Grupo de Bioinformática Estrutural, Centro de Biotecnologia/Faculdade de Farmácia Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2012.

VERVERIS, K.; HIONG, A.; KARAGIANNIS T. C.; LICCIARDI, P. V. – **Histone deacetylase inhibitors (HDACIs): multitargeted anticancer agents.** PMID: PMC3584656; doi:10.2147/BTT.S29965. Biologics. 2013; 7: 47–60. Published online Feb. 25, 2013.

WANG, D. et al. – **QSAR Studies of PC-3 cell line inhibition activity of TSA and SAHA-like hydroxamic acids** - Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 14 (2004) 707–711, 2003.

WEST, A. C.; JOHNSTONE, R. W. – **New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment**. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology v.50. 112-122, 2014.

ZHAO, L. et al. – **A novel two-step QSAR modeling work flow to predict selectivity and activity of HDAC inhibitors**. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 23, Issue 4, 929-933, 2013.

ZHU, Z.; JIANG, W.; MCGINLEY J. N.; THOMPSON, H. J. – **Defining the role of histone deacetylases in the inhibition of mammary carcinogenesis by dietary energy restriction (DER): effects of suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) and DER in a rat model**. Cancer Prev Res (Phila); 6(4): 290-8, (2013) Apr. The American Society for Clinical Investigation. Review Series; New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. Published in Volume 124, Issue 1 (Jan. 2, 2014) J. Clinical Investigation 124(1): 30-39 (2014). doi:10.1172/JCI69738. Copyright © 2014.

ZUBEN, V. – **Algoritmos Genéticos (AGs); IA707 – DCA/FEEC/Unicamp; Tópico 6 – Algoritmos Genético (AG's); Adaptado de notas de aula produzidas pelo Prof. Ricardo Gudwin (DCA/FEEC/Unicamp) e de IYODA, 2000.**

ZULANTAY, I. et al. – **Tratamiento de la enfermedad de Chagas con Nifurtimox en pacientes crónicos: evaluación parasitológica de la eficacia terapêutica, resultados preliminares**. Biomédica; 31(Sup.3): 3-315, 2011.

# ANEXOS

## ANEXO A – Comprovante de aceite de trabalho em simpósio.



The 7<sup>th</sup> Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry  
Campos do Jordão-SP, Brazil, November 9-12, 2014  
<http://www.brazmedchem.iqsc.usp.br>  
[brazmedchem@iqsc.usp.br](mailto:brazmedchem@iqsc.usp.br)

---

### Comprovante

Atestamos que o trabalho enviado pelo Sr. Cláudio Augusto Magalhães Paranhos intitulado *A docking study of potential inhibitors of histone deacetylase with trypanocidal activity* onde constam os coautores Paranhos, C. A. M.; Souza, A. A.; Rangel, F. C. foi aceito para apresentação na sessão de painéis no Sétimo Simpósio Brasileiro em Química Medicinal (BrazMedChem2014) a ser realizado de 9 a 12 de novembro no Centro de Convenções de Campos do Jordão-SP.

Comitê Científico do BrazMedChem2014

## ANEXO B – Resumo de trabalho apresentado em simpósio.

The 7<sup>th</sup> Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry (BrazMedChem2014)

## A docking study of potential inhibitors of histone deacetylase with trypanocidal activity

Paranhos, C. A. M.<sup>1\*</sup>; Souza, A. A.<sup>1</sup>; Rangel, F. C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) Campus Soane Nazaré de Andrade, Rodovia Jorge Amado, km 16, Bairro Salobrinho. CEP: 45662-900, Ilhéus – BA

Keywords: Molecular Docking, Hidroxamic Betaines, Hidroxamic Acids

### Introduction

The Histone Deacetylase (HDAC) inhibition has shown antimicrobial, antiviral and antiparasitic activities. Among the inhibitors of this enzyme, a class of compounds which has been highlighted are hydroxamic acids,<sup>1-3</sup> which are potent inhibitors of HDAC. The mechanism of the inhibition it's by chelation of the zinc atom. However, the major difficulty associated with the use of these compounds is the high concentration required to achieve the pharmacological effect. A way around this problem would be to increase the receptor/ligand binding affinity. In addition to the ability of chelation of zinc, common to hydroxamic acids, hydroxamic betaines<sup>4</sup> have onium (cationic functional group) ions which can interact with amino acids in the side chains increasing the binding affinity receptor/ligand. This can be widely exploit for innovation in the field of antiparasitics and anticancer drugs. In this work, we performed a study *in silico* the interaction of new drug candidates with HDAC employing the methodology of molecular docking.

### Results and Discussion

Some structures of hydroxamic acids ( $R^4\text{-CO-NH-O}^-$ ) and also their betainic analogues ( $R^1(R^2)(R^3)N^+-R^4\text{-CO-NH-O}^-$ ) in zwitterionic form, shown in Figure 1, were studied.

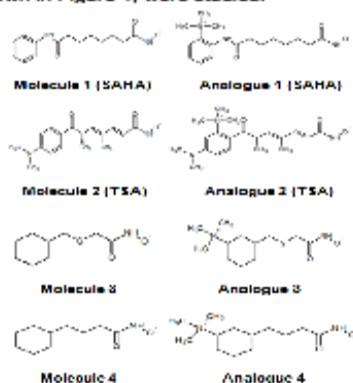


Figure 1. Hidroxamic betaines and their analogous hidroxamic acids.

The onium group present in analogous betaines of hydroxamic acids, increased interaction with the enzyme HDAC-8, observed by lowering the binding energy when compared to the corresponding hidroxamic acid. The results obtained with RMS 2.0 are shown in Table 1.

Table 1.

Compound	Binding energy (Kcal/mol)	Frequency
SAHA	-7.2	80
SAHA-Betaine	-10.5	54
TSA	-6	34
TSA-Betaine	-6	34
Molecule 3	-7.6	98
Molecule 3-Betaine	-11.4	98
Molecule 4	-8.2	100
Molecule 4-Betaine	-11.6	84

The onium group in betainic analogous hydroxamic acid SAHA, well known in the literature,<sup>5-7</sup> increased interactions with HDAC-8 due to the fact that group, positively charged, interacted with Asn-101 and Gly-151 amino acids. Figure 2 shows the hidroxâmico betaine interaction

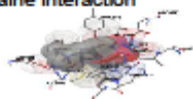


Figure 2. Interaction SAHA with betain group-HDAC-8.

### Conclusions

The molecular docking calculations showed that hydroxamic betaines are promising molecules as drug candidates. This is due to electrostatic interactions of the onium group present in betaines, which increase receptor-ligand affinity. For best results of interaction energy QM-MM calculations should be performed

### Acknowledgements

Authors acknowledge FAPESB (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia) for financial support.

- Nam, N.; Huong, T. L.; Dung, D. T. M.; *et al.* *Eur. J. Med. Chem.* 2013, 70, 477
- Cincinelli, R.; Musso, L.; Giannini, G.; *et al.* *Eur. J. Med. Chem.* 2014, 79, 251
- Shi, Z.; Ouyang, D.; Zhu, J.; *et al.* *Int. Immunopharmacol.* 2012, 12, 580
- UNITED STATES PATENT. Evans, W.P., Naik, A.R. Hydroxamic betaines, US4020100 A, 26, abr, 1977.
- Mydllo, J.H., *et al.* 1988. *Prostate.* 12: 343-355.
- Munstar, P.N., *et al.* 2001. *Cancer Res.* 61: 8492-8497
- Sun, P.C., *et al.* 2010. *J. Biomed. Sci.* 17: 76

The 7<sup>th</sup> Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry (BrazMedChem2014)