



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado



**MODELAGEM MOLECULAR APLICADA AO ESTUDO DE LIGANTES  
CANDIDATOS A FÁRMACOS COM ATIVIDADES  
ANTILEISHMANIAIS**

**Bruno Martins Reboredo**

Prof. Dr. Marcos Serrou do Amaral

Campo Grande - 2012



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado



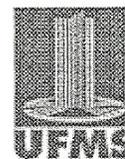
**MODELAGEM MOLECULAR APLICADA AO ESTUDO DE LIGANTES  
CANDIDATOS A FÁRMACOS COM ATIVIDADES  
ANTILEISHMANIAIS**

**Bruno Martins Reboredo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química – Nível de Mestrado – da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do título de Mestre em Química (área de concentração: Físico-Química).

Prof. Dr Marcos Serrou do Amaral

Campo Grande - 2012



**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO – NÍVEL DE MESTRADO EM QUÍMICA**

**TERMO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO  
DE  
BRUNO MARTINS REBOREDO**

**MODELAGEM MOLECULAR APLICADA AO ESTUDO DE LIGANTES CANDIDATOS A  
FÁRMACOS COM ATIVIDADES ANTILEISHMANIAIS.**

Dissertação de Mestrado em Química submetida à Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação – Nível de Mestrado em Química (**Resolução nº 75/2012**) da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Química.

Aprovada com revisão pelos professores doutores:

---

Prof. Dr. MARCOS SERROU DO AMARAL  
Orientador e Presidente da Comissão Examinadora  
UFMS

---

Prof. Dr. FÁBIO DA SILVA MIRANDA  
UFF

---

Prof. Dr. ADILSON BEATRIZ  
UFMS

Campo Grande, 29 de outubro de 2012



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado



### AGRADECIMENTOS

São tantas as pessoas a agradecer, que é impossível mencionar todos. Entretanto quero registrar que estou profundamente grato:

Primeiramente a Deus, que me deu a motivação e a capacitação necessárias a realização deste trabalho.

Aos meus pais que, além de todo amor e dedicação com que me criaram, sempre nutriram em mim o desejo de avançar nos estudos.

À minha esposa e filho pela compreensão e apoio incessantes, especialmente nos últimos meses de execução deste trabalho.

Ao meu orientador MARCOS SERROU DO AMARAL pela orientação clara e objetiva dada nos momentos de dúvidas e, especialmente, pela disposição e ajuda intensas nos últimos meses de realização deste trabalho.

Ao amigo Coronel NIVALDO VIANA GRAMOSA, que me propiciou as condições necessárias junto ao Comando da 9ª Região Militar para que eu pudesse realizar este Mestrado, bem como a todos que me apoiaram ali durante todo este curso.

Aos colegas do Laboratório Multiusuário de Modelagem de Sistemas Complexos (LAB2M/UFMS) MARCOS VINÍCIUS RIFON GARCIA, WIVIRKINS NOGUEIRA MACIEL e REJANE GONÇALVES DINIZ KHODYUK pelo auxílio nos cálculos de Modelagem e Dinâmica Molecular, bem como MUNIRA ORTALE ZOGAIB, pelas simulações de Docking Molecular.

Aos amigos Coronel ADEMIR TOMAZ e Major ANDRÉ LUIS MIGUEZ OLIVEIRA, que me deram todo o apoio necessário junto ao Exército Brasileiro, nos últimos meses para que eu pudesse concluir este trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para que este projeto fosse concluído.



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado



## **RESUMO**

A quimioterapia para leishmaniose, uma doença responsável por 12 milhões de infecções no mundo, é ainda muito deficiente. Os medicamentos atuais são tóxicos ou ineficazes, ou ainda, requerem um tratamento com custo muito elevado para os países em desenvolvimento. É justamente nesses países que a doença é endêmica, fruto de condições de vida precária, que facilitam o desenvolvimento do protozoário e do vetor. A Nucleosídeo Hidrolase (NH) é uma enzima vital para o parasita e não é encontrada em mamíferos, tornando-se assim, um alvo seletivo importante para o desenvolvimento de inibidores. Alguns desses inibidores já foram desenvolvidos e testados *in vitro*, apresentando resultados satisfatórios, com constantes de inibição da ordem de nanomolar. No presente estudo, pretendeu-se avaliar o desempenho de tais inibidores através de cálculos computacionais em simulações de Docking Molecular e Dinâmica Molecular, procurando extrair comportamentos que possam ser úteis na proposta de novos fármacos com atividades antileishmaniais. Os resultados mostraram boa concordância com os dados experimentais, especialmente a quantidade de ligações de hidrogênio, que indicou ser fator importante a ser considerado na busca por inibidores eficientes de NHs.

**Palavras chave:** Leishmaniose. Nucleosídeo Hidrolase. Dinâmica Molecular. Docking.



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado



## **ABSTRACT**

The chemotherapy for leishmaniasis, a disease responsible for 12 million infections worldwide, is still very deficient. The current drugs are toxic or ineffective, or even require treatment with very high cost to developing countries. It is precisely in these countries that the disease is endemic, because the precarious living conditions, which Facilitate the development of the protozoon and vector. The nucleoside hydrolase (NH) is a vital enzyme to the parasite and is not found in mammals, making it a selective target important for the development of inhibitors. Some of these inhibitors have already been developed and tested in vitro, showing satisfactory results, with constant of inhibition at nanomolar concentrations. In the present study, we sought to evaluate the performance of these inhibitors through computational calculations in simulations of Molecular Docking and Molecular Dynamics, trying to find behaviors which may be useful in the proposal of new drugs with antileishmaniais activities. The results showed good agreement with the experimental data, especially the quantity of hydrogen bonds, that indicated be important factor to be considered in the search for efficient inhibitors of NHs.

**Keywords:** Leishmaniasis. Nucleoside Hidrolase. Molecular Dynamic. Docking.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIG. 1.1 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	14
FIG. 1.2 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA E MUCOCUTÂNEA .....	15
FIG. 1.3 – MECANISMO ENZIMÁTICO DA HIDRÓLISE DA INOSINA CATALISADA PELAS NHS.....	19
FIG. 1.4 – SÍTIO ATIVO DA Cf-NH.....	20
FIG. 1.5 – ENERGIA POTENCIAL DE LIGAÇÃO PARA UM PAR DE ÁTOMOS.....	27
FIG. 1.6 – ENERGIA POTENCIAL ANGULAR PARA TRÊS ÁTOMOS LIGADOS.....	28
FIG. 1.7 – ENERGIA POTENCIAL DO TORCIONAL PRÓPRIO. ....	29
FIG. 1.8 – ENERGIA POTENCIAL DO DIEDRAL IMPRÓPRIO. ....	30
FIG. 1.9 – REPRESENTAÇÃO DOS RAIOS DE VAN DER WAALS ( $R_{VDW}$ ).....	31
FIG. 1.10 – REPRESENTAÇÃO DO CAMINHO DO ALGORITMO DO MÁXIMO DECLIVE PARA UMA DIMENSÃO. ....	35
FIG. 1.11 - DIFERENÇA DE ENERGIA LIVRE ENTRE ESTADOS “LIGADO“ (1) E ”NÃO LIGADO” (2). ....	42
FIG. 1.12 - LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO. ....	43
FIG. 2.1 – MODELO DA Ld-NH CONSTRUÍDA ATRAVÉS DE MODELAGEM MOLECULAR POR HOMOLOGIA .....	46
FIG. 2.2 - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DAS NUCLEOSÍDEO HIDROLASES. ....	47
FIG. 2.3 – ESTRUTURA QUATERNÁRIA DA Cf-NH DISPONÍVEL NO PDB. ....	48
FIG. 2.4 - INIBIDORES PARA Cf-NH (MILES, 1999).....	49
FIG. 2.5 – INIBIDOR PIR PARA Cf-NH (PARKIN, 1997).....	50
FIG. 2.6 – SUBSTRATOS INOSINA E GUANOSINA DE Ld-NH (CUI, 2001).....	51
FIG. 3.1 - ENERGIA TOTAL DOS SISTEMAS SIMULADOS .....	58
FIG. 3.2 - ENERGIA POTENCIAL DOS SISTEMAS SIMULADOS .....	58



FIG. 3.3 - RMSD TEMPORAL DA ESTRUTURA DA PROTEÍNA.....	59
FIG. 3.4 - RMSD TEMPORAL DOS LIGANTES .....	60
FIG. 3.5- RMSF DO BACKBONE DA PROTEÍNA.....	61
FIG. 3.6 - INTERAÇÕES DA PROTEÍNA COM O PIR ANTES E DEPOIS DA DINÂMICA MOLECULAR.....	63
FIG. 3.7 - INTERAÇÕES DA PROTEÍNA COM O INIBIDOR 1 ANTES E DEPOIS DA DINÂMICA MOLECULAR.....	64
FIG. 3.8 - INTERAÇÕES DA PROTEÍNA COM O INIBIDOR 2 ANTES E DEPOIS DA DINÂMICA MOLECULAR.....	65
FIG. 3.9 - INTERAÇÕES DA PROTEÍNA COM O INIBIDOR 3 ANTES E DEPOIS DA DINÂMICA MOLECULAR.....	66
FIG. 3.10 - INTERAÇÕES DA PROTEÍNA COM O INIBIDOR 4 ANTES E DEPOIS DA DINÂMICA MOLECULAR.....	67
FIG. 3.11 – DISTÂNCIAS DO PIR AOS RESÍDUOS DO SÍTIO ATIVO – ASP 10, ASP 14, ASN 39, HIS 82, ASN 160 E GLU 166.....	74
FIG. 3.12 – DISTÂNCIAS DO PIR AOS RESÍDUOS DO SÍTIO ATIVO – ASN 168, TYR 225, TYR 229, HIS 241, ASP242.....	75
FIG. 3.13 – DISTÂNCIAS DO INIBIDOR 1 AOS RESÍDUOS DO SÍTIO ATIVO – ASP 10, ASP 14, ASN 39, HIS 82, ASN 160 E GLU 166.....	76
FIG. 3.14 – DISTÂNCIAS DO INIBIDOR 1 AOS RESÍDUOS DO SÍTIO ATIVO – ASN 168, TYR 225, TYR 229, HIS 241, ASP242 .....	77
FIG. 3.15 – DISTÂNCIAS DO INIBIDOR 2 AOS RESÍDUOS DO SÍTIO ATIVO – ASP 10, ASP 14, ASN 39, HIS 82, ASN 160 E GLU 166.....	78
FIG. 3.16 – DISTÂNCIAS DO INIBIDOR 2 AOS RESÍDUOS DO SÍTIO ATIVO – ASN 168, TYR 225, TYR 229, HIS 241, ASP242 .....	79
FIG. 3.17 – DISTÂNCIAS DO INIBIDOR 3 AOS RESÍDUOS DO SÍTIO ATIVO – ASP 10, ASP 14, ASN 39, HIS 82, ASN 160 E GLU 166.....	80
FIG. 3.18 – DISTÂNCIAS DO INIBIDOR 3 AOS RESÍDUOS DO SÍTIO ATIVO – ASN 168, TYR 225, TYR 229, HIS 241, ASP242 .....	81
FIG. 3.19 – DISTÂNCIAS DO INIBIDOR 4 AOS RESÍDUOS DO SÍTIO ATIVO – ASP 10, ASP 14, ASN 39, HIS 82, ASN 160 E GLU 166.....	82



FIG. 3.20 – DISTÂNCIAS DO INIBIDOR 4 AOS RESÍDUOS DO SÍTIO ATIVO – ASN 168, TYR 225, TYR 229, HIS 241, ASP242 .....	83
FIG. 3.21 – DISTRIBUIÇÃO RADIAL ENTRE OS PRINCIPAIS ÁTOMOS DOS INIBIDORES E DOS RESÍDUOS – ASP 10, ASP 14, ASN 39, HIS 82 .....	85
FIG. 3.22 – DISTRIBUIÇÃO RADIAL ENTRE OS PRINCIPAIS ÁTOMOS DOS INIBIDORES E DOS RESÍDUOS – ASN 160, GLU 166, ASN 168, TYR 225, TYR 229, HIS 241 .....	86
FIG. 3.23 – DISTRIBUIÇÃO RADIAL ENTRE OS PRINCIPAIS ÁTOMOS DOS INIBIDORES E DOS RESÍDUOS – ASP 242 .....	87

### **LISTA DE TABELAS**

TABELA 2.1 - ENZIMAS ALVO PARA A QUIMIOTERAPIA DE LEISHMANIOSES ...	44
TABELA 3.1 - CONSTANTES DE INIBIÇÃO DOS INIBIDORES PARA Cf-NH .....	55
TABELA 3.2 – ENERGIA LIVRE DE LIGAÇÃO DOS INIBIDORES PARA Cf-NH.....	55
TABELA 3.3 - CONSTANTES DE INIBIÇÃO PARA Ld-NH .....	56
TABELA 3.4 - ENERGIA LIVRE DE LIGAÇÃO DOS INIBIDORES PARA Ld-NH.....	56
TABELA 3.5 - CORRESPONDÊNCIA ENTRE ÁTOMOS DOS INIBIDORES.....	68
TABELA 3.6 - LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO PRESENTES EM PELO MENOS 50% DO TEMPO DE SIMULAÇÃO .....	69
TABELA 3.7 - CORRELAÇÃO DA QUANTIDADE DE LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO COM $K_i$ .....	70
TABELA 3.8 - CORRESPONDÊNCIA ENTRE ÁTOMOS DOS INIBIDORES.....	72
TABELA 3.9 - INTERAÇÕES HIDROFÓBICAS PRESENTES EM PELO MENOS 50 % DO TEMPO DE SIMULAÇÃO.....	72
TABELA 3.10 – MELHORES PARES DE INTERAÇÃO ENTRE RESÍDUOS E INIBIDORES .....	84



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

### ABREVIATURAS

Ala	- Alanina;
Arg	- Arginina;
Asn	- Asparagina;
Asp	- Ácido aspártico;
Atm	Átomo
C $\alpha$	- Carbono $\alpha$ ;
DRMQ	- Desvio da raiz média quadrática
Gli	- Glicina;
Gln	- Glutamina;
Glu	- Ácido glutâmico;
His	- Histidina;
Ile	- Isoleucina;
Lis	- Lisina;
Met	- Metionina;
Phe	- Fenilalanina;
Pro	- Prolina;
Rc	- Raio de corte;
R <sub>vdw</sub>	- Raio de van der Walls;
Ser	- Serina;
Thr	- Treonina;
Tir	- Tirosina;
Trp	- Triptofano;
Val	- Valina.
Ld-NH	- Nucleosídeo Hidrolase de <i>Leishmania donovani</i>
Cf-NH	- Nucleosídeo Hidrolase de <i>Chritidia fasciculata</i>



## SÍMBOLOS

Gb	- Gigabites;
MHz	- Megahertz;
GHz	- Gigahertz;
$r_i$	- Distância entre dois átomos
$\theta$	- Ângulo
$v$	- Energia potencial total
$\sigma_{ij}$	- Distância de equilíbrio entre os átomos $i$ e $j$ .
$q_i$	- Carga eletrostática no átomo $i$
$\epsilon$	- Permissividade
$\omega$	- Ângulo de torção
$V_{\phi n}$	- Constante que define a barreira de torção
$\nabla E$	- Gradiente de $E$
$\partial / \partial r$	- Derivada parcial em relação a $r$
$\partial / \partial p$	- Derivada parcial em relação a $p$
$H$	- Hamiltoniano do sistema
$E_c$	- Energia cinética
$E_u$	- Energia potencial



## SUMÁRIO

<b><u>1 INTRODUÇÃO</u></b> .....	13
<b>1.1 ASPECTOS BIOLÓGICOS</b> .....	13
<u>1.1.1 AS LEISHMANIOSES</u> .....	13
<u>1.1.2 AS ENZIMAS NUCLEOSÍDEO HIDROLASES (NHs)</u> .....	17
<b>1.2 ASPECTOS GERAIS DAS TÉCNICAS EMPREGADAS</b> .....	23
<u>1.2.1 MODELAGEM MOLECULAR</u> .....	23
<u>1.2.2 MECÂNICA MOLECULAR</u> .....	24
<i>1.2.2.1 TERMO PARA A ENERGIA POTENCIAL DE LIGAÇÃO</i> .....	27
<i>1.2.2.2 TERMO PARA A ENERGIA POTENCIAL ANGULAR</i> .....	28
<i>1.2.2.3 TERMO PARA O POTENCIAL TORCIONAL PRÓPRIO</i> .....	28
<i>1.2.2.4 TERMO PARA O POTENCIAL TORCIONAL IMPRÓPRIO E MOVIMENTOS ANGULARES FORA DO PLANO</i> .....	30
<i>1.2.2.5 TERMO PARA A ENERGIA POTENCIAL DE LENNARD-JONES</i> .....	31
<i>1.2.2.6 TERMO PARA ENERGIA POTENCIAL ELETROSTÁTICA</i> .....	32
<u>1.2.3 OTIMIZAÇÃO DA ESTRUTURA</u> .....	33
<i>1.2.3.1 MÉTODO DO MÁXIMO DECLIVE</i> .....	34
<i>1.2.3.2 MÉTODO DOS GRADIENTES CONJUGADOS</i> .....	35
<u>1.2.4 SIMULAÇÕES POR DOCKING MOLECULAR</u> .....	36
<u>1.2.5 SIMULAÇÕES POR DINÂMICA MOLECULAR</u> .....	37
<u>1.2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS</u> .....	40
<i>1.2.6.1 DESVIO DA RAIZ MÉDIA QUADRÁTICA</i> .....	40
<i>1.2.6.2 ENERGIA LIVRE DE GIBBS DE LIGAÇÃO</i> .....	41
<i>1.2.6.3 LIGAÇÃO DE HIDROGÊNIO</i> .....	43



<b>1.3 OBJETIVOS</b> .....	43
<b><u>2 METODOLOGIA</u></b> .....	44
<b>2.1 ESCOLHA DO ALVO</b> .....	44
<b>2.2 MODELAGEM MOLECULAR DOS INIBIDORES</b> .....	49
<b>2.3 SIMULAÇÕES POR DOCKING MOLECULAR</b> .....	51
<b>2.4 SIMULAÇÕES POR DINÂMICA MOLECULAR</b> .....	52
<u>2.4.1 ANÁLISES DAS SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR</u> .....	53
<b><u>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</u></b> .....	55
<b>3.1 RESULTADOS DO DOCKING MOLECULAR</b> .....	55
<b>3.2 RESULTADOS DA DINÂMICA MOLECULAR</b> .....	57
<u>3.2.1 ANÁLISE DOS GRÁFICOS DE ENERGIA TOTAL E POTENCIAL</u> .....	57
<u>3.2.2 ANÁLISE DOS GRÁFICOS DE RMSD DA PROTEÍNA</u> .....	59
<u>3.2.3 ANÁLISE DOS GRÁFICOS DE RMSD DO LIGANTE</u> .....	60
<u>3.2.4 ANÁLISE DOS GRÁFICOS DE RMSD ESPACIAL</u> .....	61
<u>3.2.5 PRINCIPAIS INTERAÇÕES</u> .....	62
3.2.5.1 <i>LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO</i> .....	67
3.2.5.2 <i>INTERAÇÕES HIDROFÓBICAS</i> .....	71
<u>3.2.6 ANÁLISE DOS GRÁFICOS DE DISTÂNCIA</u> .....	73
<u>3.2.7 ANÁLISE DOS GRÁFICOS DE DISTRIBUIÇÃO RADIAL</u> .....	85
<b><u>4 CONCLUSÃO</u></b> .....	88
<b><u>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u></b> .....	90



## 1 INTRODUÇÃO

### **1.1 ASPECTOS BIOLÓGICOS**

#### 1.1.1 AS LEISHMANIOSES

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários da Família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* e pertencem a dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, com uma variedade de espécies, apresentando diferentes manifestações clínicas e patológicas, que acometem tanto pessoas quanto animais (BERMAN, 1997). O protozoário é transmitido ao homem por fêmeas de insetos flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*. O cão doméstico (*Canis familiaris*) e a raposa do campo, também conhecida como raposinha (*Dusicyon vetulus*), são os principais reservatórios de infecção e manutenção da doença (GENARO, 2000).

As manifestações clínicas das leishmanioses dependem da associação entre as características de virulência da espécie de *Leishmania* infectante e da resposta imunológica do hospedeiro (PEARSON & SOUZA, 1996). De acordo com as manifestações, as leishmanioses podem ser classificadas em três grupos: leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral. A leishmaniose cutânea caracteriza-se por úlceras crônicas na pele, desenvolvidas no local da picada do inseto vetor e que podem levar meses para cicatrizar, é causada principalmente pelos protozoários *Leishmania major*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania guyanensis* (WHO, 2010). A leishmaniose mucocutânea causa, no início, úlceras na pele similares àquelas da leishmaniose cutânea que, entretanto, cicatrizam, para depois reaparecerem, principalmente, nas mucosas do nariz e da boca. Este tipo, geralmente, é acompanhado por infecções secundárias e destruição de grandes extensões do tecido (HANDMAN, 2000). A leishmaniose visceral, também conhecida como “kala-azar”, que quer



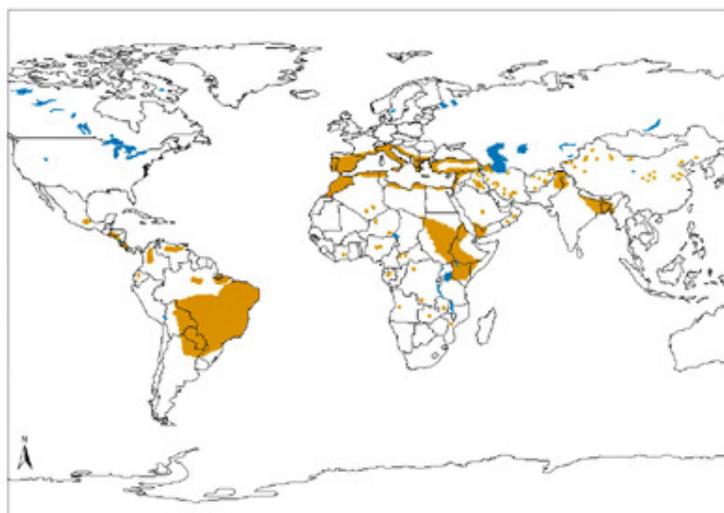
Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado



dizer febre negra em virtude do discreto aumento da pigmentação da pele ocorrido durante a doença é considerada uma doença sistêmica muito grave, com migração dos parasitas para o fígado, baço e medula óssea, podendo levar o hospedeiro à morte (MARZOCHI, 1981). É causada pelo protozoário *Leishmania donovani*.

Dados recentes da Organização Mundial de Saúde mostram que as leishmanioses ameaçam 350 milhões de pessoas, entre adultos e crianças, em 98 países do mundo (FIG. 1.1 e FIG. 1.2); sendo que 85 destes, são países em desenvolvimento. Mais de 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Irã, Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Brasil e Peru e mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão. Estima-se que 12 milhões de pessoas no mundo estão infectadas e que anualmente surgem 2 milhões de novos casos (1,5 milhões para a leishmaniose cutânea e 500 000 para leishmaniose visceral). Entretanto, somente cerca de 600 000 casos são relatados oficialmente a cada ano (WHO, 2010). Nas FIG. 1.1 e 1.2, as porções em azul indicam porções de água sem efluentes, propícias à proliferação de mosquitos vetores da leishmaniose.



**FIG. 1.1 – Distribuição geográfica da leishmaniose visceral**

([http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis\\_maps/en/](http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/), acessado em 01/03/12)



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado



**FIG. 1.2 – Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea e mucocutânea**  
([http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis\\_maps/en/](http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/), acessado em 01/03/12)

Outra informação relevante é que, desde a década passada, tem havido um aumento no número de casos de leishmaniose descritos entre os pacientes imunossuprimidos, principalmente os infectados com o vírus da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (LAGUNA, 1997; ROSATELLI, 1998) e segundo a Organização Mundial de Saúde, esta co-infecção é mais frequentemente manifestada no caso da leishmaniose visceral.

Além disso, não há uma forma de tratamento eficaz para os casos de leishmaniose, que podem causar deformidades ou serem fatais, mesmo quando tratados. Um dos principais fatores responsáveis pelo pouco sucesso no controle desta doença é o fato de que a maioria



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado



dos medicamentos utilizados, principalmente os antimoniais pentavalentes, são tóxicos e muitas vezes ineficazes devido a resistência dos parasitas. A anfotericina B, usada quando o tratamento com antimoniais é inapropriado, também é muito tóxica e, na formulação lipossomal, menos tóxica, requer internação e tem custo muito elevado para ser usada nos países em desenvolvimento (LIMA, 2007).

A pesquisa e o desenvolvimento de novos princípios ativos requerem alta tecnologia e investimentos vultosos em longo prazo. Estudos recentes apontam para um custo médio de 43,4 milhões de dólares para o desenvolvimento de um novo fármaco (LIGHT, 2011), podendo envolver até 30 anos de pesquisa (GOOZNER, 2004). Neste contexto, a falta de opções terapêuticas ou tratamentos mais adequados para as chamadas doenças parasitárias, como a leishmaniose, a doença do sono, a doença de chagas, a malária e a filarirose linfática, classificadas como “doenças negligenciadas”, têm constituído um grande problema de saúde pública nos países em desenvolvimento (BOULET, 2003). A negligência acontece por parte das grandes empresas farmacêuticas que investem muito pouco ou quase nada na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos para estas doenças. Segundo a Organização Médicos Sem Fronteiras, a razão principal para este descaso, reside no fato de que estas doenças afetam apenas pessoas com baixo poder aquisitivo. Logo, um detentor de patente nunca será capaz de gerar lucro pelo uso de preços elevados, e desta forma, pouca pesquisa e desenvolvimento são conduzidos (BOULET, 2003).

No Brasil, o aumento da incidência da leishmaniose associado às altas taxas de morbidade e à difusão da doença para novas áreas geográficas, inclusive urbanas, tem-se constituído um grande problema para a saúde pública (BRAZUNA, 2012; BRITO, 2012; SILVA, 2012).

Neste sentido, a pesquisa visando o desenvolvimento de novos antileishmânicos é de extrema importância para o Brasil, uma vez que este é um dos países mais atingidos pelas leishmanioses.



### 1.1.2 AS ENZIMAS NUCLEOSÍDEO HIDROLASES (NHs)

Observa-se que as enzimas NHs parasíticas têm sido estudadas extensamente como potenciais alvos para intervenção quimioterapêutica (PARKIN, 1995; GOPAUL, 1996; DEGANO, 1998; SHI, 1999; CUI, 2001; SANTANA, 2002; VERSÉES, 2003; FIGUEROA, 2012). Isto se deve a divergência no metabolismo de purinas entre o parasita e o hospedeiro. Considerando que um dos fatores metabólicos que distinguem os parasitas protozoários dos mamíferos é a falta da biossíntese “*de novo*” de purinas, estes parasitas dependem exclusivamente da purina do hospedeiro. Em função disso, os parasitas não são capazes de realizar a biossíntese de purinas e transformá-las em nucleosídeos purina ou bases nitrogenadas para suprir sua demanda de crescimento (LAFON, 1982). Sendo assim, o parasita depende da via de recuperação de purinas para sobreviver.

Estas enzimas são amplamente distribuídas na natureza, e já foram caracterizadas em bactérias (PETERSEN & MOLLER, 2001; OGAWA, 2001), leveduras (KURTZ, 2002), protozoários (PELLE, 1998; CUI, 2001) e insetos (RIBEIRO, 2003). Os genes responsáveis pelas características de identidade da NH estão presentes em plantas, anfíbios e peixes, mas, surpreendentemente, nenhuma atividade de NH nem genes que a codificam, até o momento, tem sido detectados em mamíferos. A via metabólica das NHs está bem estabelecida somente para os parasitas protozoários tais como *Tripanossoma*, *Leishmania* e *Giárdia*. Nestes organismos, as NHs são as enzimas responsáveis pela via de recuperação que tem como objetivo obter purinas do seu meio ambiente (HAMMOND, 1984). Nesta via, estas enzimas catalisam a hidrólise de nucleosídeos, permitindo a reciclagem de bases purinas e ribose.

As Nucleosídeos hidrolases (ou nucleosídeo N-ribohidrolases, NHs), presentes no gênero *Leishmania*, compreendem uma superfamília de metaloproteínas (principalmente ligadas ao íon Cálcio) relacionadas estruturalmente com uma topologia original de folhas-betas (MURZIN, 1995; ORENGO, 1997). Funcionalmente, as NHs são glicosidases que



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

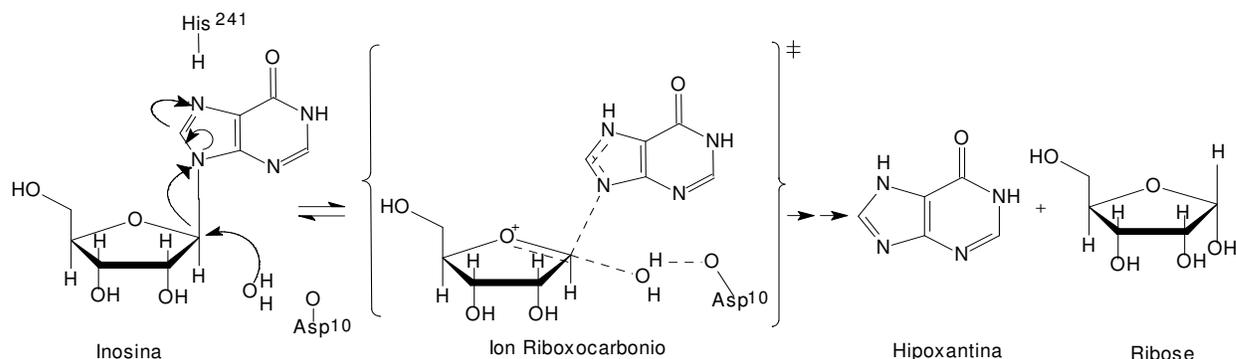
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado



catalisam a hidrólise de ligações N-ribosídicas de nucleosídeos purina e/ou pirimidina, formando o ácido nucléico livre e ribose:



As NHs estudadas até hoje são homodímeros (duas subunidades idênticas) como por exemplo a *Tv*-IAGNH (ONEGA, 2010) ou homotetrâmeros (quatro subunidades idênticas) como por exemplo *Lm*NH, *Cf*-IUNH e *Ld*NH (MEHRABANI, 2011; HEHEMANN, 2011; FIGUEROA, 2012) e apresentam grandes similaridades nas sequências de aminoácidos do centro ativo, o que indica que elas são intimamente relacionadas em estrutura e mecanismo catalítico. Cada monômero é funcional e contém um sítio ativo estreito e profundo. Duas alças flexíveis características ocorrem nas proximidades do sítio ativo e o íon  $\text{Ca}^{2+}$  está fortemente ligado a ele (VERSÉS, 2001; DEGANO, 1998). Este metal octacoordenado é quelado através de uma rede conservada de interações envolvendo os oxigênios da cadeia lateral dos aminoácidos Asp10, Asp15, Asp242, oxigênio carbonílico da cadeia principal Thr126 (numeração para *Cf*-IUNH) e três moléculas de água. Sobre a ligação do substrato, a fração ribose está fixada dentro do sítio ativo. No complexo enzima-substrato, duas moléculas de água ligadas ao íon cálcio são substituídas pelos grupos 2' e 3'-hidroxil do açúcar. A única molécula de água restante quelada ao  $\text{Ca}^{2+}$  continua interagindo com o Aspartato (Asp 10). Nas várias estruturas, esta molécula de água está localizada 3.2 – 3.3 Å da parte de trás da ligação C1'. A especificidade rigorosa das NHs pela fração ribose é estabelecida através de uma rede elaborada de interações conservadas na estrutura cristalográfica, envolvendo as hidroxilas-2'-, 3'- e 5' do açúcar e resíduos conservados Asp14, Asn160, Glu166, Asn168 e Asp242 (numeração para *Cf*-IUNH) e íon  $\text{Ca}^{2+}$ , como pode ser visto na FIG 1.3 (VERSÉS, 2003).



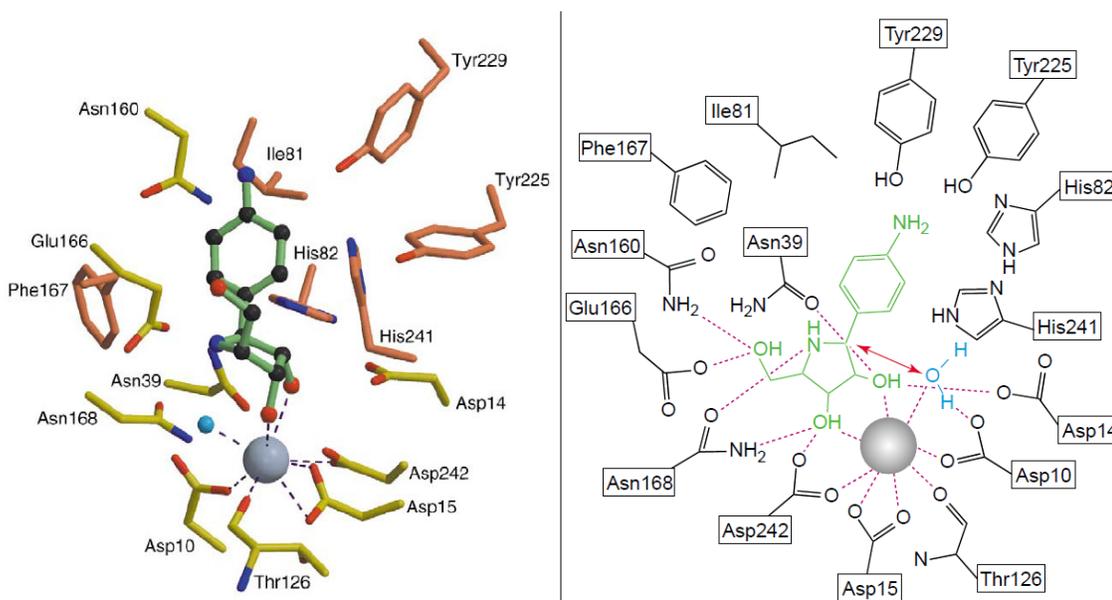
**FIG. 1.3 – Mecanismo enzimático da hidrólise da inosina catalisada pelas NHs (VERSÉES, 2003)**

As nucleosídeos hidrolases não específicas (NNHs) catalisam a hidrólise de nucleosídeos purínicos e pirimidínicos e também hidrolisam o *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-ribofuranosídeo-O-ligado ainda mais eficientemente. Em contraste, as nucleosídeos hidrolases específicas (SNHs) preferem nucleosídeos purina e são pobres catalisadores para pirimidina e *p*-nitrofenil  $\beta$ -D-ribofuranosídeo (PARKIN, 1991, ESTUPINAM & SCHRAMM, 1994; PARKIN, 1996). Esta diferença na preferência pelo substrato pode ser racionalizada em termos de mecanismos enzimáticos da hidrólise do N-ribosídeo, que inclui (1) assistência ao grupo de saída, (2) estabilização do íon ribooxocarbênio e (3) ativação de água (SCHRAMM, 1997). O substituinte *p*-nitrofenil é um bom grupo de saída, não necessita de ativação e tem um valor de *pKa* que é alto o suficiente para permitir a protonação por um ácido enzimático. As enzimas não específicas hidrolisam o *p*-nitrofenil  $\beta$ -D-ribofuranosídeo porque elas usam a estabilização do íon ribooxocarbênio como a maior contribuição para a catálise. Já as NH específicas para purina atuam mais sobre a protonação do grupo de saída que sobre a ativação do açúcar, sendo catalisadores menos eficientes para a hidrólise do *p*-nitrofenil  $\beta$ -D-



ribofuranosídeo. Assim, ácidos que protonem o grupo de saída da purina são importantes para estabilizar o estado de transição das SNHs (PARKIN, 1996; MAZZELLA, 1996)

A inosina-uridina nucleosídeo hidrolase da *C. fasciculata* (*Cf-IUNH*) pode ser usada como modelo para as NNHs. A estrutura obtida por cristalografia desta enzima complexada com o *p*-aminofenil-(1S)-iminoribitol (*p*APIR) (DEGANO, 1998), revela fatores importantes que corroboram a importância da ativação do grupo ribosil nas NNHs: (1) o ancoramento da hidroxila C5' em uma orientação ótima para a formação do íon carbênio, (2) a quelação direta de ambas as hidroxilas C2' e C3' com o  $\text{Ca}^{2+}$  ligado à enzima em uma geometria favorável a estabilização do íon oxocarbênio e (3) a ligação de hidrogênio imino a grupos enzimáticos que podem estabilizar eletrostaticamente o estado de transição do íon oxocarbênio (FIG. 1.3 e FIG 1.4). A única interação proposta para o grupo de saída, a protonação do N7 pela His241 (no substrato purina, p.e, inosina), não pode ser verificada na estrutura do cristal com o *p*-aminofenil-(1S)-iminoribitol (*p*APIR) (GOPAUL, 1996; DEGANO, 1998).



**FIG. 1.4 – Sítio Ativo da Cf-NH**

**Molécula de Cálcio em cinza e Molécula de Água em azul. (VERSÉES, 2003)**



O modelo para SNHs pode ser a inosina-adenosina-guanosina nucleosídeo hidrolase de *T. brucei brucei* (*Tbb-IAGNH*) (PARKIN, 1996; SCHRAMM, 1998). Contudo, ainda não há informações estruturais sobre esta enzima. Versées et al. (VERSÉES, 2003) propuseram que resíduos de triptofano na entrada do sítio ativo (*pocket*) das SNHs estão envolvidos em interações paralelas com a nucleobase (“parallel stacking interaction”). Portanto, estas interações também conhecidas como  $\pi$ - $\pi$  *stacking* são, pelo menos em parte, responsáveis pela especificidade da IAG-NHs (VERSÉES, 2003).

A NH de *L. donovani* (*LdNH*), é uma proteína de 314 aminoácidos por subunidade e sua estrutura quaternária se apresenta na forma de homotetrâmero, apesar de sua estrutura tridimensional ainda não ter sido resolvida por cristalografia (CUI, 2001).

A NH de *L. major* (*LmNH*) apresenta alta similaridade com a *LdNH* (95% de aminoácidos idênticos), apesar da total diferença entre as manifestações clínicas, e a NH de *Crithidia fasciculata* (*Cf-NH*) também apresenta alta similaridade com a *LdNH* (80% de aminoácidos idênticos). Entre os *Trypanosomatidae*, essas três inosina-uridina preferenciais e a riboidrolase não específica são altamente homólogas umas com as outras, sendo um pouco divergentes da purina-riboidrolase específica do *T. brucei brucei* (*Tb-IAG-NH*), com 27% de aminoácidos idênticos (PELLÈ, 2001). Contudo, elas são perfeitamente conservadas no seu sítio catalítico e aplicam mecanismos similares para a catálise (CUI, 2001). A conservação das nucleosídeo hidrolases entre as espécies *trypanosomatídeas* indica que esta enzima é fundamental para a captação de purinas. Em vista disso, inibidores específicos para a NH de uma espécie de parasita poderão ser ativos para uma grande variedade de espécies. Assim, a presença ubíqua e a conservação da sequência de aminoácidos das nucleosídeo hidrolases em *Leishmania* poderão fornecer um instrumento útil para estudos filogenéticos moleculares destas espécies e de diagnóstico para a doença, como demonstrado por Santana e col. (SANTANA, 2002).

Muitos parasitas protozoários estudados até o momento têm múltiplas nucleosídeo hidrolases com propriedades catalíticas distintas (Estupinam & Schramm, 1994; Parkin et al., 1991). Na *L. major*, além da nucleosídeo hidrolase não específica, foi identificada e clonada



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado



uma dUTP nucleotidohidrolase (Camacho et al., 1997, 2000). Na *L. donovani*, três diferentes nucleosídeo hidrolases foram purificadas (Koszalka & Krenitsky, 1979). Duas são ribonucleases com preferência por diferentes substratos: uma é uma purina nucleosidase e a outra cliva purinas e pirimidinas. A presença de diferentes nucleosídeo hidrolases em uma espécie de parasita pode refletir a resposta do parasita à composição de nucleosídeos existentes nos seus ambientes de sobrevivência. Isto pode também representar certos graus de redundância, onde a deficiência de uma enzima pode ser bem compensada pela presença de outras para assegurar a reserva de nucleosídeos. Contudo, uma análise funcional de nucleosídeo hidrolases no metabolismo de purinas e pirimidinas será necessária para um projeto mais racional de drogas.

As nucleosídeo hidrolases não específicas da *L. major* e da *L. donovani* têm alto valor de  $K_m$  (constante de equilíbrio Michaelis-Menten) para os substratos preferenciais – inosina, uridina e citidina (Shi et al., 1999). Ainda não é conhecido como o parasita faz para conseguir concentrações dos nucleosídeos pirimidínicos mais altas que as existentes no seu ambiente. As fontes de nucleosídeos durante o crescimento do parasita também não são conhecidas e um mecanismo plausível para a internalização dos produtos de degradação de ácidos nucleicos do hospedeiro ainda não está muito claro. Um dos principais caminhos para o desenvolvimento de quimioterápicos é buscar compostos que apresentem alta afinidade e especificidade pela proteína alvo. Sendo assim, o conhecimento da estrutura tridimensional da proteína, bem como o modo de ligação do substrato são fundamentais para projetar quimioterápicos eficazes. Apesar da estrutura tridimensional da LdNH ainda não ser conhecida, a sua alta similaridade com a NH de *L. major* permite que sua estrutura seja determinada com razoável confiança (Figuroa et al, 2008) por modelagem molecular por homologia, já que uma estrutura tridimensional de 2,5 Å da *L. major* já foi obtida por Raios-X (Shi et al., 1999).



## 1.2 ASPECTOS GERAIS DAS TÉCNICAS EMPREGADAS

### 1.2.1 MODELAGEM MOLECULAR

A modelagem molecular tem como objetivo principal reproduzir o comportamento real (experimental) de moléculas e sistemas moleculares. O aperfeiçoamento dos microcomputadores deu ao químico medicinal uma poderosa ferramenta para ser usada no desenvolvimento de fármacos. Uma grande variedade de programas computacionais e de métodos foi desenvolvida para visualizar as conformações tridimensionais tanto dos ligantes como de seus sítios-alvo. Ademais, pacotes gráficos também permitem que o químico medicinal avalie as interações entre uma substância e seu sítio-alvo antes de sintetizá-la. Isto significa que o químico medicinal precisa somente sintetizar e testar os compostos mais promissores, o que aumenta consideravelmente as chances de descobrir um fármaco potente. Isto também reduz consideravelmente o custo do desenvolvimento (LEMKE, 2002).

O surgimento e a evolução das técnicas computacionais, todavia, revolucionaram a área e aumentaram sobremaneira o número e a complexidade dos sistemas que podem ser estudados por esta técnica.

Neste contexto, a química teórica é utilizada como arcabouço pelos modelistas moleculares onde ela é basicamente compreendida pela química quântica (métodos *ab initio*, semi-empírico, funcional de densidade, e outros) e clássica (mecânica, dinâmica – determinístico e Monte Carlo – estocástico).

Não podemos esquecer que as propriedades físicas macroscópicas podem ser classificadas como (a) propriedades de equilíbrio estático tais como a constante de ligação de um inibidor a uma enzima, a energia potencial média de um sistema ou a função distribuição radial em um líquido, e (b) propriedades dinâmicas ou de não-equilíbrio, tais como a



viscosidade de um líquido, processos de difusão em membranas, a dinâmica de mudanças de fase, cinética de reação ou a dinâmica de defeitos em cristais.

A escolha da técnica depende da questão a ser respondida e da adequação do método para fornecer resultados realistas. Idealmente, a equação de Schrödinger em função do tempo descreve as propriedades de sistemas moleculares com grande acurácia, mas qualquer sistema mais complexo que o estado de equilíbrio de uns poucos átomos não pode ser descrito por esta abordagem de forma prática, também chamada de nível *ab initio*. Aproximações, portanto, se tornam obrigatórias. Quanto maior a complexidade de um sistema e quanto mais longo o tempo envolvido no processo em estudo, mais aproximações são requeridas. Num certo ponto (ao qual se chega muito rapidamente) a abordagem *ab initio* tem que ser aumentada ou substituída por uma parametrização semi-empírica ou empírica do modelo usado. Onde as simulações baseadas em princípios físicos de interações atômicas ainda falham devido à complexidade do sistema (como infelizmente ainda é o caso para a predição de estruturas de proteínas) a modelagem molecular está baseada inteiramente na análise por similaridade de dados estruturais e químicos já conhecidos. Os métodos de QSAR (Relações quantitativas entre estrutura e atividade) e muitas predições de estruturas de proteínas por modelagem comparativa pertencem a esta categoria (VAN DER SPOEL, 2002).

### 1.2.2 MECÂNICA MOLECULAR

Muitos dos sistemas com os quais lidamos em modelagem molecular são demasiado grandes para serem abordados pela mecânica quântica ou por métodos semiempíricos. Estes métodos levam em conta os movimentos dos elétrons de um sistema e mesmo que alguns sejam ignorados (como acontece nos esquemas semi-empíricos) um grande número de partículas deve ainda ser considerado e os cálculos acabam consumindo um tempo de processamento que os tornam inviáveis para sistemas grandes. Os métodos de campo de força, também conhecidos como Mecânica Molecular (MM), ignoram os movimentos dos elétrons e



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado



calculam a energia de um sistema como uma função apenas das posições nucleares. Isto torna a MM um método adequado para lidar com sistemas contendo um número grande de átomos. Em alguns casos, campos de forças podem trazer respostas tão acuradas quanto o mais elevado nível de cálculo da mecânica quântica, em um tempo computacional bem menor (HIGGINS, 2001). A MM, todavia, não pode prever propriedades que dependem da distribuição eletrônica em uma molécula tais como estados de transição ou distribuições de cargas.

A Mecânica Molecular é baseada num modelo mais simples das interações dentro de um sistema com contribuições de processos tais como o estiramento de ligações, o abrir e fechar de ângulos e as rotações em torno de ligações simples. Mesmo quando funções simples como a lei de Hooke são usadas para descrever estas contribuições, o campo de forças não responde muito bem, levando a valores incoerentes com resultados experimentais. Transferibilidade também é um atributo chave de um campo de forças, uma vez que ela permite que um conjunto de parâmetros desenvolvidos e testados em um número relativamente pequeno de casos seja aplicado a uma faixa muito mais ampla de problemas. Além disso, parâmetros desenvolvidos a partir de dados de pequenas moléculas podem ser usados para estudar moléculas muito maiores como as estruturas poliméricas por exemplo.

A maioria dos campos de força da modelagem molecular em uso hoje em dia para sistemas moleculares, GROMOS (JORGENSEN, 1988), AMBER (CORNELL, 1995; WEINER, 1984), MM2/MM3/MM4 (ALLINGER, 1977; NEVINS, 1996), podem ser interpretados em termos de um simples conjunto de quatro componentes correspondentes às forças intra e intermoleculares dentro do sistema. Penalidades energéticas estão associadas ao desvio de ângulos e ligações de seus valores de referência ou de equilíbrio, há uma função que descreve como a energia varia quando as ligações são giradas e, por fim, o campo de forças contém termos que descrevem a interação entre partes não ligadas do sistema. Campos de força mais sofisticados podem incluir termos adicionais, mas eles invariavelmente contêm estes quatro componentes. Uma característica atrativa desta representação é que os vários termos podem ser relacionados a variações em coordenadas internas específicas tais como



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado



comprimentos de ligações, rotação de ligações ou movimentos de átomos em relação a outros átomos. Isto torna mais fácil o entendimento de como variações nos parâmetros do campo de forças afetam sua performance e também ajudam no processo de parametrização. Uma forma funcional deste campo de forças é mostrada na equação 1.1:

$$v(\mathbf{r}^N) = \sum_{\text{ligações}} \frac{k_i}{2} (r_i - r_{i,0})^2 + \sum_{\text{ângulos}} \frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{\text{torções}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\omega - \gamma)] + \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \left( 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right) \quad (1.1)$$

Onde:

$v(\mathbf{r}^N)$  é a energia potencial total, que é uma função das posições ( $\mathbf{r}$ ) de  $N$  partículas (normalmente átomos). O primeiro termo modela as interações entre pares de átomos ligados, modelados aqui pelo potencial harmônico que dá o aumento na energia quando o seu comprimento  $r_i$  desvia do valor de referência  $r_{i,0}$ . O segundo termo é uma soma sobre todos os ângulos de valência (ângulos A—B—C) na molécula, novamente modelada usando um potencial harmônico. O terceiro termo é o potencial torcional que modela como a energia varia quando as ligações giram. A quarta contribuição é o termo não ligado. Este é calculado entre todos os pares de átomos ( $i$  e  $j$ ) que estão em diferentes moléculas ou na mesma molécula, mas separados por no mínimo 03 ligações (ou seja: tem uma relação 1,n onde  $n \geq 4$ ). Em campo de forças simples, o termo não ligado é usualmente modelado usando termo de potencial de Coulomb para interações eletrostáticas e termo de potencial de Lennard-Jones para as interações de *Van der Waals*, como feito na equação. (1.1).

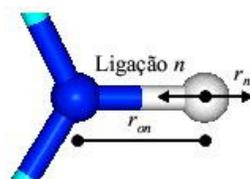


### 1.2.2.1 TERMO PARA A ENERGIA POTENCIAL DE LIGAÇÃO

Envolvendo a interação entre dois átomos ligados por meio de um potencial harmônico (lei de Hooke), este termo reproduziria o movimento vibracional entre pares de átomos e tem a forma:

$$v_l = \frac{1}{2} \sum_{n=1}^{N_b} k_{bn} (r_n - r_{i,0})^2 \quad (1.2)$$

Onde  $N_b$  é o número total de pares de átomos ligados e para cada par são definidos os valores específicos em que  $k_{bn}$  é a constante de força específica,  $r_i$  é a distância entre o par de átomos e  $r_{i,0}$  é o comprimento de referência da ligação (FIG.1.5).



**FIG. 1.5 – Energia potencial de ligação para um par de átomos.**

**$r_n$  oscila com o tempo segundo um potencial harmônico em torno da posição de equilíbrio  $r_{i,0}$ . (adaptado de WILTER, 2003)**



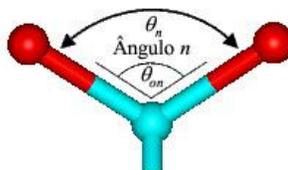
### 1.2.2.2 TERMO PARA A ENERGIA POTENCIAL ANGULAR

O desvio dos ângulos de seus valores de referência é também frequentemente descrito usando a lei de Hooke:

$$v_{\theta} = \frac{1}{2} \sum_{n=1}^{N_{\theta}} k_{\theta} (\theta_n - \theta_{0n})^2 \quad (1.3)$$

Onde  $N_{\theta}$  é o número total de trios de átomos,  $k_{\theta n}$  a constante de força angular,  $\theta_0$  o ângulo de equilíbrio e  $\theta$  a variação angular (FIG. 1.6).

A contribuição de cada ângulo é caracterizada por uma constante de força e um valor de referência. Como bem menos energia é necessária para distorcer um ângulo de sua posição de equilíbrio do que para estirar ou comprimir uma ligação, os valores numéricos das constantes de força são da ordem de  $10^5$  vezes menores.



**FIG. 1.6 – Energia potencial Angular para três átomos ligados.**

**O ângulo entre eles,  $\theta_n$  varia harmonicamente em torno do ângulo de equilíbrio  $\theta_{0n}$ .  
(adaptado de WILTER, 2003)**

### 1.2.2.3 TERMO PARA O POTENCIAL TORCIONAL PRÓPRIO

Termos para estiramento de ligação e deformação angular são geralmente conhecidos como termos de “graus de liberdade restritos” uma vez que quantidades substanciais de energia são requeridas para causar desvios significativos dos valores de referência. A maior



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

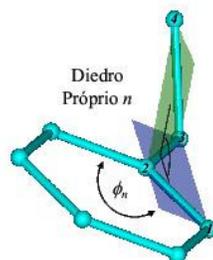
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado



parte das variações relativas na estrutura e nas energias é devida as inter-relações entre as contribuições torcionais e não ligadas. Muitos campos de força são utilizados para modelar moléculas flexíveis nas quais as principais mudanças conformacionais são devidas a rotações em torno de ligações. Para simular isso, é essencial que o campo de forças represente os perfis de energia de tais mudanças corretamente. A maior parte dos campos de força para moléculas orgânicas utiliza potenciais torcionais explícitos, também chamados de potenciais próprios, com uma contribuição de cada quarteto de átomos A-B-C-D ligados sequencialmente no sistema. Os potenciais torcionais são quase sempre expressos como uma expansão em séries de co-senos. Uma forma funcional é:

$$v(\varphi) = \sum_{n=0}^N \frac{V_{\varphi n}}{2} [1 + \cos(m\varphi_n - \gamma_n)] \quad (1.4)$$

onde  $\varphi$  é o ângulo de torção;  $n$  é a multiplicidade ou o número de pontos mínimos na função quando a ligação é girada de  $360^\circ$ ;  $\gamma$  é o fator de fase que determina onde o ângulo de torção passa por um mínimo e  $V_{\varphi n}$  é a constante que define a barreira de torção (FIG 1.7).



**FIG. 1.7 – Energia potencial do torcional próprio.**

**O plano do anel (plano azul) pode assumir seis ângulos de torção (mínimos) em relação ao plano verde. (adaptado de WILTER, 2003)**

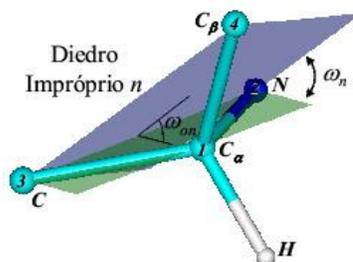


#### 1.2.2.4 TERMO PARA O POTENCIAL TORCIONAL IMPRÓPRIO E MOVIMENTOS ANGULARES FORA DO PLANO

Há várias formas de introduzir termos para vibrações fora do plano em um campo de forças. Uma abordagem seria tratar os quatro átomos como um ângulo de torção impróprio, ou seja, um ângulo de torção em que os quatro átomos envolvidos não estão ligados na sequência 1-2-3-4, conforme ilustra a FIG. 1.8. Um potencial torcional é então usado para manter o ângulo de torção impróprio entre  $0^{\circ}$  e  $180^{\circ}$ :

$$v(\omega) = k(1 - \cos 2\omega) \quad (1.5)$$

Existem muitas outras formas de incorporar vibrações fora do plano, mas a definição do torcional impróprio é a mais largamente usada uma vez que ela pode ser facilmente incorporada aos termos torcionais próprios no campo de forças. Termos para vibrações fora do plano podem também ser usados para atingir geometrias particulares como, por exemplo, para garantir a estrutura planar de anéis aromáticos ou para manter a estereoquímica de centros quirais.



**FIG. 1.8 – Energia potencial do diedral impróprio.**

$\omega_0$  seria o ângulo entre os planos definidos pelos átomos 1,2,3 (plano verde) e os átomos 2,3,4 (plano azul). (adaptado de WILTER, 2003)

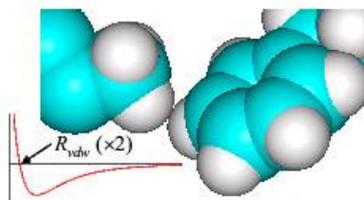


### 1.2.2.5 TERMO PARA A ENERGIA POTENCIAL DE LENNARD-JONES

Este termo inclui no campo de forças as interações de *van der Waals* entre átomos não ligados quimicamente. É um potencial de curto alcance (da ordem de Å) com um termo repulsivo, em virtude do princípio de exclusão de Pauli, que diz que dois elétrons não podem compartilhar os mesmos números quânticos, e um atrativo derivado das forças de dispersão, conhecidas também como forças de London, que surgem a partir de pequenos dipolos oscilantes criados pela flutuação da nuvem eletrônica.

$$v_{vdW} = \sum_{i < j}^{N_i} \left( \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) \quad (1.6)$$

Para um dado átomo  $i$  é computada sua energia de interação com os átomos  $j$ , de um total de  $N_i$ , pois são excluídos seus primeiros e segundos vizinhos ligados, que são tratados pelos potenciais anteriores, ao passo que para os terceiros vizinhos parâmetros menores no potencial de Lennard-Jones são considerados. Os parâmetros  $A_{ij}$  e  $B_{ij}$  dependem dos tipos de pares de átomos (e se são terceiros vizinhos ou não) e  $r_{ij}$  é a distância entre eles (FIG. 1.9).



**FIG. 1.9 – Representação dos raios de *van der Waals* ( $R_{vdw}$ ).**

**O  $R_{vdw}$  é definido como a metade da distância em que o potencial de Lennard-Jones do átomo vale zero. (WILTER, 2003)**



### 1.2.2.6 TERMO PARA ENERGIA POTENCIAL ELETROSTÁTICA

Na definição dos parâmetros de carga para os átomos segundo um campo de forças, valores de cargas parciais  $q_i$  são atribuídos, de forma a se tentar reproduzir a diferença de eletronegatividade que eventualmente existe entre dois átomos ligados covalentemente. Pontes salinas e ligações de hidrogênio, portanto, seriam decorrentes das interações eletrostáticas e teriam grande importância na estabilização das estruturas secundárias das proteínas e na especificidade entre ligante e proteína.

$$v_{el} = \sum_{i < j}^{N_i} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon\epsilon_0 r_{ij}} \quad (1.7)$$

Na eq. 1.7,  $q_i$  e  $q_j$  são as cargas parciais para dois átomos quaisquer do sistema separados por uma distância  $r_{ij}$ ;  $\epsilon_0$  é a permissividade do espaço livre,  $\epsilon$  é a constante dielétrica do meio e, para um dado átomo  $i$ ,  $N_i$  é o número restante de átomos  $j$ , subtraindo seus primeiros e segundos vizinhos ligados, sendo sua interação com os terceiros vizinhos reduzida por uma constante. Contudo, o mais comum em DM é aplicar-se um raio de corte ( $R_c$ ), isto é, dado um átomo  $i$  a partir do qual se delimita uma esfera de raio  $R_c$ , toma-se para cálculo de interação eletrostática e de *van der Waals* somente os átomos não ligados contidos nesta esfera.

Um sistema molecular seria mais precisamente descrito por uma abordagem que utilizasse a mecânica quântica. Contudo, face ao grande número de átomos envolvidos e de dificuldades computacionais para esta abordagem, as funções potenciais, de perfil empírico, são uma proposta de modelagem válida derivada de aproximações de teorias não clássicas e aplicam-se bem ao problema, uma vez que são calibradas a partir de informações experimentais e por cálculos quânticos sobre pequenas moléculas (BROOKS, 1983).



### 1.2.3 OTIMIZAÇÃO DA ESTRUTURA

As forças numa configuração inicial para uma estrutura molecular tridimensional, derivadas da EQ. 1.1 podem ser demasiadamente grandes, decorrendo grandes acelerações locais, implicando grandes velocidades e grandes deslocamentos que não satisfazem as condições para DM que, conseqüentemente, não funcionará. Assim, é necessária a minimização de sua energia, que é importante também para a remoção de qualquer tensão local. A EQ. 1.1 gera uma hipersuperfície que apresenta mínimos locais, dos quais um ou mais podem ser globais (mínimos globais degenerados). Estes mínimos locais podem ser em números elevadíssimos já que dependem do número de graus de liberdade do sistema. E como este número é altíssimo para um sistema de macromoléculas biológicas, chegar a um mínimo global ao varrer-se completamente uma superfície multidimensional torna-se, hoje, praticamente inexecutável. Portanto, o que se faz é procurar um mínimo ao se varrer uma parte da hipersuperfície potencial de forma a encontrar-se um ponto com a menor energia potencial local. O objetivo da consecução de um mínimo é ter uma conformação espacial que tenha relaxado as distorções nas ligações químicas, nos ângulos entre ligações e nos contatos de *Van der Waals*. Um ponto mínimo (tanto local quanto global) é determinado quando as forças que atuam sobre o sistema são nulas. O mínimo global seria a configuração espacial para o sistema biológico cuja energia potencial total (EQ. 1.1) seria a menor dentre todas as outras, para qualquer ponto tomado na hipersuperfície.

Apesar de existirem diversos métodos de otimização de geometria ou minimização de energia, abordaremos aqui apenas os dois principais e mais largamente utilizados, o método de declive máximo (*steepest descent*) e o dos gradientes conjugados.



### 1.2.3.1 MÉTODO DO MÁXIMO DECLIVE

O método do máximo declive (WIBERG, 1965) é um método de primeira derivada que converge vagarosamente nas proximidades do mínimo, mas é poderoso para configurações distantes de um mínimo de energia. De um modo geral, com este algoritmo é possível melhorar estruturas cristalográficas pouco refinadas, otimizar as construídas graficamente ou construir estruturas a partir de informações de RMN ou por modelagem comparativa a estruturas conhecidas.

A força resultante sobre um átomo  $i$  é obtida pelo gradiente da energia potencial (dada pela Equação 1.8) em  $i$ :

$$F_i = -\nabla E(\{r_i\}) \quad (1.8)$$

O passo ou incremento nas coordenadas  $\Delta r_{i,n}$  de um átomo  $i$ , é dado na direção e sentido da força resultante sobre este átomo:

$$\Delta r_{i,n} = k_n \left( \frac{F_{i,n}}{|F_{i,n}|} \right) \quad (1.9)$$

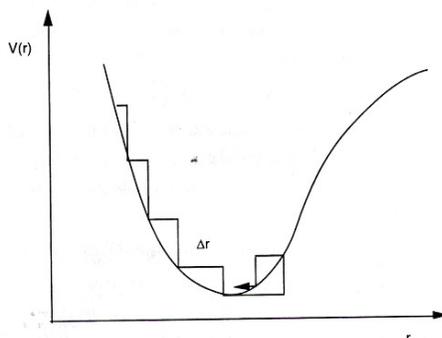
onde  $k_n$  é um parâmetro de ajuste do tamanho do passo e  $\frac{F_{i,n}}{|F_{i,n}|}$  é o vetor unitário na direção e sentido da força resultante sobre  $i$  no passo  $n$ . O algoritmo de minimização para o método do máximo declive é, então:

$$r_{i,n+1} = r_{i,n} + k_n \left( \frac{F_{i,n}}{|F_{i,n}|} \right) \quad (1.10)$$

Em que  $\mathbf{r}$  vai dar a nova posição do átomo  $i$  no passo  $n + 1$  e  $k_n$  é o parâmetro de ajuste do tamanho do passo. O que se obtém ao final da minimização é um conjunto de coordenadas



$\{r_i\}$  que, aplicado na Equação 1.8, aproxima a força de zero, obtendo-se assim um mínimo local. A FIG. 1.10 exemplifica o método para uma dimensão.



**FIG. 1.10 – Representação do caminho do algoritmo do máximo declive para uma dimensão.**

### 1.2.3.2 MÉTODO DOS GRADIENTES CONJUGADOS

Um método mais sofisticado de busca de um mínimo da função energia, além de utilizar a informação sobre a primeira derivada (gradiente), leva em conta o caminho já percorrido na busca do mínimo. Este método, denominado “gradientes conjugados” permite em geral uma convergência mais rápida que o método do máximo declive que utiliza somente a informação do gradiente na coordenada atualizada. O método dos gradientes conjugados utiliza para a determinação do passo seguinte, além do valor do gradiente no ponto atual, o valor do gradiente obtido no passo anterior. Neste método o deslocamento das coordenadas  $\{\Delta r_{i,n}\}$  é dado por:

$$\Delta r_{i,n} = \alpha_n \delta_{i,n} \quad (1.11)$$

onde:

$$\delta_{i,n} = \left( \frac{F_{i,n}}{|F_{i,n}|} \right) + \delta_{i,n-1} \left( \frac{|F_{i,n}|^2}{|F_{i,n-1}|^2} \right) \quad (1.12)$$



e  $\alpha_n$  é um parâmetro ajustável a cada passo. O valor ideal de  $\alpha_n$  é obtido por um processo de minimização do potencial na direção definida pelo vetor  $\delta_{i,n}$  ( $F_i = -\Delta V(\{r_i\})$ ).

A vantagem da utilização do gradiente conjugado vem do fato que as expressões matemáticas 1.11 e 1.12 garantem que a direção do gradiente no novo ponto ( $r_{i,n+1} = r_{i,n} + \Delta r_{i,n}$ ) será sempre ortogonal ao gradiente do ponto anterior ( $r_{i,n}$ ), e conseqüentemente a todos os anteriores, e que a direção  $\delta_{i,n}$  será “conjugada” a todas as direções anteriores. Esta propriedade determina um caminho mais direto ao fundo do poço de potencial, evitando o retorno sobre caminhos já percorridos, ao contrário do algoritmo do máximo declive que utiliza informação em um ponto e que, portanto, não pode excluir esta possibilidade. Na prática, para os sistemas macromoleculares, o algoritmo do máximo declive se mostra mais efetivo e rápido nos passos iniciais quando se está muito longe do mínimo, entretanto, quando se está perto de atingir o mínimo, o método do gradiente conjugado é muito mais rápido e preciso. Desta forma pode-se combinar os dois métodos utilizando inicialmente o máximo declive com um critério de convergência relativamente fraco e o método dos gradientes conjugados para o refinamento final.

#### 1.2.4 SIMULAÇÕES POR DOCKING MOLECULAR

A simulação por docking molecular objetiva prever o modo de ligação de uma pequena molécula na região de ligação de um alvo molecular. Num processo de reconhecimento molecular ambos, enzima e inibidor, sofrem mudanças conformacionais e há ocorrência simultânea de grande número de interações entre eles. A abordagem de um sistema como esse pode envolver o tratamento de inúmeros graus de liberdade, e, para que se obtenham bons resultados sem abrir mão de baixo custo computacional são necessários eficientes algoritmos de docking. Faz parte também do problema de docking quantificar a afinidade entre a enzima e o inibidor para discriminar corretamente entre diferentes modos de



ligação do mesmo ligante e/ou para determinar, entre ligantes distintos, aqueles com maior afinidade de ligação com a molécula receptora. (MORGON, 2007).

A afinidade de um inibidor em relação a uma enzima é formalmente estimada pela energia livre de ligação de Gibbs ( $\Delta G_L$ ). A pesquisa de desenvolvimento de fármacos requer a avaliação da afinidade de grande número de compostos, contudo, uma estimativa precisa de  $\Delta G_L$  envolve um tempo computacional além do alcance da viabilidade. Por essa razão se fez necessário o desenvolvimento métodos de avaliação mais rápidos, que, incluído nos algoritmos de docking, fossem capazes de ordenar com boa eficiência um conjunto de inibidores de acordo com sua afinidade. (KITCHEN, 2004)

### 1.2.5 SIMULAÇÕES POR DINÂMICA MOLECULAR

Dinâmica molecular é uma técnica com a qual se estudam os movimentos em um sistema de partículas por simulação. Ela pode ser empregada tanto em sistemas de elétrons, átomos ou moléculas, como em sistemas macromoleculares. Seus elementos essenciais são o conhecimento do potencial de interação entre as partículas e das equações de movimento clássicas que governam a dinâmica dessas partículas. O potencial pode variar do simples, como o gravitacional para interações entre estrelas, ao complexo, composto por vários termos, como o que descreve as interações entre átomos e moléculas. Para muitos sistemas, entre os quais os biomoleculares, as equações da dinâmica clássica são adequadas. Porém, para alguns problemas, como a evolução de galáxias, são incluídos efeitos relativísticos, enquanto que para outros, como reações químicas envolvendo tunelamento, são necessárias correções quânticas (KARPLUS & PETSKO, 1990).

O estado microscópico de um sistema pode ser especificado em termos das posições e momentos das suas partículas. Assim, na mecânica clássica, pode-se escrever o Hamiltoniano  $H$  de um sistema molecular clássico como a soma das energias cinética  $C$  e potencial  $V$  em



função das séries de coordenadas generalizadas  $q_i$  e de momentos generalizados  $p_i$  de todos os  $N$  átomos do sistema:

$$H(\{q_i, p_i\}) = C(\{p_i\}) + V(\{q_i\}) \quad (1.13)$$

Onde  $q_i = q_1, q_2, \dots, q_{Nat}$  e  $p_i = p_1, p_2, \dots, p_{Nat}$

A energia potencial  $V(\{q_i\})$  contém os termos de interação inter e intramoleculares, de curto e longo alcance, e pode ser substituída pela função potencial  $V(\{r_i\})$  da Equação 1.1, tal que as coordenadas  $q_i$  sejam as coordenadas cartesianas e  $r_i$  e  $p_i$  seus momentos conjugados. A energia cinética assume a forma:

$$C(\{p_i\}) = \sum_{i=1}^{Nat} \frac{p_i^2}{2m_i} \quad (1.14)$$

Onde  $m_i$  é a massa do átomo  $i$ .

A partir do  $H$  é possível construir as equações de movimento que governam a evolução temporal do sistema e suas propriedades dinâmicas. Como a energia potencial dada pela Equação 1.1 independe das velocidades e do tempo,  $H$  é igual a energia total do sistema e as equações do movimento de Hamilton:

$$q_i = \frac{\partial H}{\partial p_i} \quad (1.15)$$

$$p_i = -\frac{\partial H}{\partial q_i} \quad (1.16)$$

conduzem às equações do movimento de Newton:

$$r_i = \frac{p_i}{m_i} = v_i \quad (1.17)$$

$$p_i = m_i r_i = -\frac{\partial V(\{r_i\})}{\partial r_i} = F_i \quad (1.18)$$



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado



respectivamente, em que  $r_i$  (ou  $v_i$ ) e  $a_i$  são a velocidade e a aceleração do átomo  $i$ , enquanto  $F_i$  é a força sobre o átomo  $i$ . A Equação 1.18 é equivalente a Eq 1.8 ( $F_i = -\nabla V(\{r_i\})$ ) (GOLDSTEIN, 1980; BERENDSEN & VAN GUNSTEREN, 1986).

A DM consiste, portanto, na resolução numérica das Equações 1.17 e 1.18 e na integração das mesmas passo a passo no tempo, de maneira eficiente e acurada. Como resultado obtêm-se as energias e trajetórias para todas as partículas (ou átomos) e para o sistema como um todo, a partir das quais várias propriedades podem ser calculadas. O tempo deixa de ser contínuo, sendo discretizado nos sistemas moleculares em passos menores (geralmente 20 vezes menores) que o período das vibrações dos átomos de hidrogênio, o movimento molecular mais rápido. Em sistemas com hidrogênio explícito usualmente aplica-se um passo de tempo de  $5,0 \times 10^{-16}$  segundos, enquanto que para sistemas com hidrogênio implícito, esse passo pode ser alargado para  $2,0 \times 10^{-15}$  segundos. Neste procedimento é essencial que a energia potencial seja uma função contínua das posições das partículas e que as posições variem suavemente no tempo. As forças  $F_i$  sobre cada átomo, que são obtidas a partir da derivada espacial da função energia potencial como é mostrado na Equação 1.18, podem desta maneira ser consideradas constantes no intervalo entre dois passos. A estabilidade da dinâmica é assim favorecida, as partículas seguem suas trajetórias clássicas mais acuradamente e a energia total do sistema tende a conservar-se.

Uma limitação para a simulação da dinâmica molecular reside, portanto, no fato de que para cada nanosegundo de simulação são necessários milhões de passos com o passo de tempo acima. A simulação de 1 ns da dinâmica de uma macromolécula com 200 átomos pode levar horas de tempo de UCP em um supercomputador, utilizando-se um algoritmo eficiente. Uma descrição e análise da eficiência de algoritmos para simulação de dinâmica molecular pode ser encontrada em Berendsen & van Gunsteren (BERENDSEN, 1986) e Allen & Tildesley (ALLEN, 1987). Este último inclui rotinas em linguagem FORTRAN para alguns métodos de simulação.



### 1.2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As simulações de DM geram uma quantidade enorme de dados cuja análise cuidadosa é fundamental para o sucesso do método. Os dados mais importantes gerados em arquivos são as posições e velocidades de cada átomo do sistema ao longo do tempo. A partir deles todo o resto pode ser depreendido. Contudo é prático e muito relevante também, o registro das mais diversas energias presentes, tanto gerais quanto de interação entre átomos e/ou grupos do sistema, além da temperatura, pressão, forças e outras propriedades físicas macroscópicas. As análises estatísticas utilizadas para esta dissertação estão detalhadas a seguir.

#### *1.2.6.1 DESVIO DA RAIZ MÉDIA QUADRÁTICA*

O Desvio da Raiz Média Quadrática (DRMQ) (SPIEGEL; 1994) é o cálculo feito para comparação entre estruturas e, no caso dos resultados de DM, pode ser estendido à comparação entre as diversas conformações espaciais assumidas pelo sistema ao longo do tempo em relação à estrutura média deste conjunto, excluindo-se o solvente. Este parâmetro pode dar uma idéia do quanto a estrutura tridimensional flutuou ao longo do tempo bem como permitir a observação de flutuações locais, como por exemplo, quais os resíduos com maior mobilidade durante uma dinâmica, para o caso de proteínas. O desvio padrão é dado pela Equação 1.19,

$$DRMQ = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \quad (1.19)$$

onde  $n$  é o número total de amostras,  $X_i$  é a coordenada tridimensional de cada átomo da amostra  $i$  e  $\bar{X}$  a posição média do átomo entre todas as amostras. Uma boa fonte sobre desvio padrão e erro padrão em populações e amostragens pode ser vista em Box et al. (BOX, 1978) e Zar (ZAR, 1999).



### 1.2.6.2 ENERGIA LIVRE DE GIBBS DE LIGAÇÃO

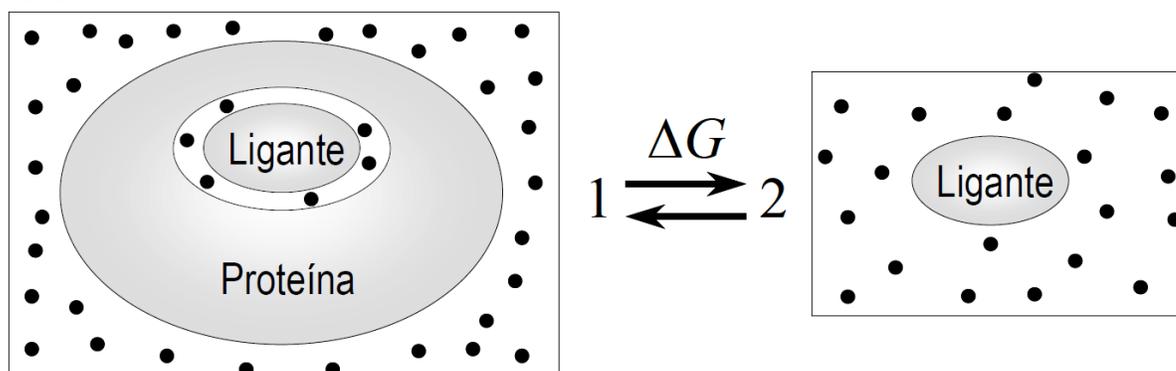
Para sistemas do tipo complexo de proteína e ligante, há várias formas de se estimar a variação da Energia Livre de Gibbs de ligação ( $\Delta G_L$ ) [KOLLMAN (1993)], tais como o método da Perturbação da Energia Livre, ou o método de Integração Termodinâmica, os quais usam o ciclo termodinâmico entre estados diferentes. Contudo estes métodos são muito rigorosos, de alto custo computacional, que precisam ir lentamente de um estado inicial para um estado final, armazenando-se estados intermediários. Como alternativa a essas abordagens, um método semi-empírico, baseado em DM, assumindo-se respostas lineares do sistema para sua Energia Livre de Gibbs em função de sua energia interna, foi proposto por ÅQVIST et al. (2002) e denominado, em inglês, Linear Interaction Energy (LIE). Sua principal vantagem, além da simplicidade, é a de poder ser aplicado sobre resultados de simulações para sistemas tipo proteína/ligante, sem a necessidade de estados intermediários, portanto, de forma bem mais rápida e direta que nos outros métodos. A energia de interação entre o ligante e seu meio (proteína, solvente, íons etc. — FIG. 1.11) segundo o método LIE está dividida em duas partes: uma eletrostática e outra de van der Waals. Equacionando-se:

$$\Delta G_L = \Delta G_{vdW} + \Delta G_{el} \approx \alpha \left( [E_{vdW}]_{prot} - [E_{vdW}]_{sol} \right) + \beta \left( [E_{el}]_{prot} - [E_{el}]_{sol} \right) \quad (1.20)$$

Em que  $[E_{vdW}]_{prot}$  e  $[E_{el}]_{prot}$  são, respectivamente, as energias médias de van der Waals e eletrostática entre o ligante e o meio circundante contendo proteína mais o solvente,  $[E_{vdW}]_{sol}$  e  $[E_{el}]_{sol}$  as energias médias do ligante em estado livre, interagindo só com o solvente (e íons se o caso), sendo  $\alpha$  e  $\beta$  dois parâmetros empíricos, usados para fazer o ajuste linear de  $\Delta G_L$  em função das energias de interação. Nestes parâmetros estaria oculta a variação da



entropia, e a variação de volume entre os sistemas no estado ligado e não ligado seria negligenciada.



**FIG. 1.11 - Diferença de energia livre entre estados “ligado“ (1) e ”não ligado” (2).**

No estado 1 são computadas as energias de interação entre o ligante e o meio, incluindo a proteína; já no estado 2, o meio é só o solvente e, se o caso, outras partículas (e. g. íons)

A energia do sistema pode ser decomposta nas energias de interações entre cada grupo definido. Como num caso particular, o sistema em que se tenham os grupos proteína, ligante e solvente, teria suas energias, portanto, discriminadas segundo a EQ. 1.20.

$$E = E_{PP} + E_{PL} + E_{PS} + E_{LL} + E_{LS} + E_{SS} \quad \text{Estado 1 Ligado}$$

$$E = E_{LL} + E_{LS} + E_{SS} \quad \text{Estado 2 Não Ligado} \quad (1.20)$$

Em que os subíndices da energia na equação acima são: *PP* – proteína/proteína; *PL* – proteína/ligante; *PS* – proteína/solvente; *LL* – ligante/ligante; *LS* – ligante/solvente e *SS* – solvente/solvente. Logo, tomando-se a energia de interação do ligante com respeito ao meio, no estado 1, isto é,  $E_1^L = E_{PL} + E_{LS}$ , menos a energia de interação do ligante no estado 2,



$E_2^L = E_{LS}$ , decompostas para os termos de van der Waals e eletrostático, aplicados na Eq. 1.20, chega-se a  $\Delta G_L$ .

### 1.2.6.3 LIGAÇÃO DE HIDROGÊNIO

As ligações de hidrogênio não são simplesmente eletrostática, pois possuem grau de direção, além de algumas características de ligações covalentes. É verificada quando da interação próxima entre átomos de hidrogênio ligado covalentemente a um átomo definido Doador com outro átomo não ligado definido Aceptor (FIG. 1.12), ambos eletronegativos.

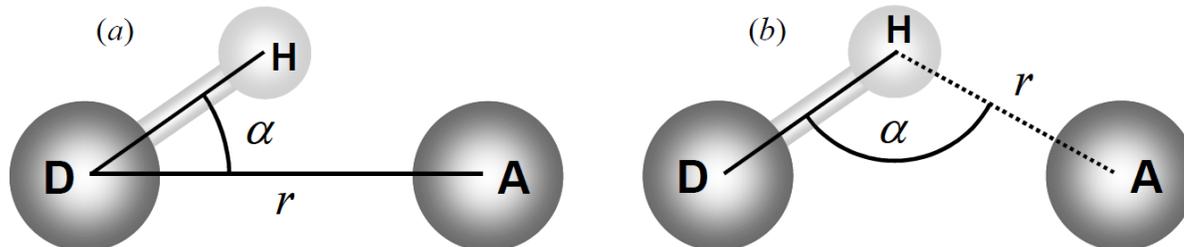


FIG. 1.12 - Ligações de Hidrogênio.

São três as convenções para determinação de ligações, dados  $r$ , distância e  $\alpha$ , ângulo: (a) em que  $r$  é tomado entre D-A inferior a  $3,6\text{Å}$ , com  $\alpha$  variando entre  $0^\circ$  e  $60^\circ$ ; (b) em e  $r$  é tomado entre H-A inferior a  $2,7\text{Å}$ , com  $\alpha$  variando entre  $120^\circ$  e  $180^\circ$ ; ou uma combinação de critérios entre (a) e (b).

## 1.3 OBJETIVOS

Realizar estudo teórico-computacional de ligantes candidatos a fármacos antileishmaniais, avaliando seu mecanismo de interação junto ao alvo terapêutico.



## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 ESCOLHA DO ALVO**

Foi realizado um levantamento bibliográfico extenso, do qual se pôde extrair a informação de 22 enzimas já consideradas como possíveis alvos para o tratamento quimioterápico das leishmanioses, exibidas na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1 - Enzimas alvo para a quimioterapia de leishmanioses**

<b>Alvo (no parasita)</b>	<b>Função</b>	<b>Fármacos Desenvolvidos</b>
Enzima Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase na Membrana Celular (3.6.3.9) Enzima Lisofosfatidilcolina Aciltransferase (2.3.1.23)	Controle da Transdução de sinais na Membrana Celular	Miltefosina, Edelfosina, Imofosina
Enzimas H <sup>+</sup> ATPase (3.6.3.6) e Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase (3.6.3.9)	Regular a Fluidez da Membrana	Anfotericina B
Enzima N-Miristoil Transferase (NMT) (2.3.1.97)	Múltiplos Processos celulares, incluindo Transporte de Proteínas e Transdução de Sinais	S-(2-oxo)pentadecil-CoA
Enzima Nucleosídeo Hidrolase (NH) (3.2.2.1)	Síntese de purinas	-
Enzima Hipoxantina Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT) (2.4.2.8) Enzima Xantina Fosforibosiltransferase (XPRT) (2.4.2.22) Enzima Adenilsuccinato Sintetase (ADSS) (6.3.4.4)	Síntese de purinas	Alopurinol, Formicina B
Enzima GMP Reductase (1.7.1.7)	Síntese de purinas	Ácido Micofenólico
Enzima DNA Topoisomerase II (5.99.1.3)	Relaxar a torção da dupla hélice do DNA	Cloridrato de Mepacrina, Clorpromazina, Hidroxiquinolina
Enzima Di-Hidrofolato Redutase (DHFR) (1.5.1.3)	Redução do ácido Di-Hidrofolico a Ácido TetraHidrofolico, responsável pela síntese de purinas e	2,4 diaminoquinazolinás



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

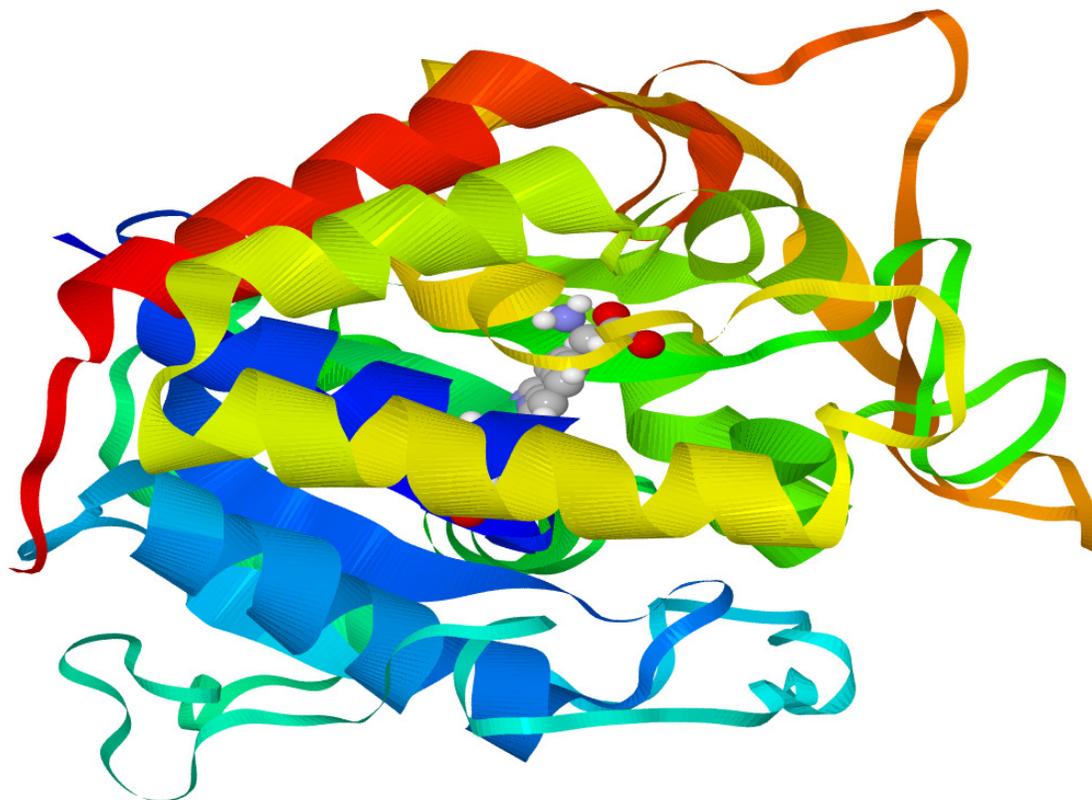


Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado

	pirimidinas	
Enzima Ornitina Descarboxilase (ODC) (4.1.1.17) Enzima S-adenosil-L-metionina Descarboxilase (AMDC) (4.1.1.50) Enzima Tripanotiona Redutase (TR) (1.6.4.8)	Síntese de Poliaminas	Diamidinas (Pentamidina)
Enzima Tubulina GTPase (3.6.5.6)	Síntese de Tubulinas	Trifluralina
Enzima 14 $\alpha$ -demetilase (1.14.13.70)	Síntese de Esteróides	Itraconazol, Cetoconazol e Fluconazol
Enzima Hidroximetil Glutaril Coenzima A (HMG-CoA) (1.1.1.34)	Síntese de Esteróides	Lovastatina, Terbinafina
Enzima Telomerase (2.7.7.49)	Síntese de DNA e RNA	Cis-Pt-Oxaminiquina-C12 Cis-Pt-Guanetidina-C12 Cis-Pt-Pentamidina-C12
Enzima Oxido Nítrico Sintetase (NOS) (1.14.13.39)	Produção de Óxido Nítrico	
Enzima hexoquinase (2.7.1.1)	Produção de ATP.	Glucantime, Pentostan
Enzima Fosfofrutoquinase (PFK) (2.7.1.11)	Síntese de Nucleotídeos Trifosfatados	Glucantime, Pentostan
Proteínas Ribossômicas	Síntese de Proteínas	Paromomicina (Aminosidina)

(Os números entre parênteses indicam o número EC da enzima, conforme classificação da Enzyme Commission)

No presente trabalho escolheu-se utilizar como alvo a enzima Nucleosídeo Hidrolase, responsável pela obtenção de purinas do parasita e ausente em mamíferos. Por esta razão, essa enzima possui alta seletividade no tratamento terapêutico, constituindo-se em um dos principais alvos para o projeto racional de fármacos antileishmaniais.



**FIG. 2.1 – Modelo da Ld-NH construída através de Modelagem Molecular por Homologia (FIGUEROA, 2008)**

A nucleosídeo hidrolase de *L. donavani* (Ld-NH) é uma proteína de 314 resíduos aminoácidos (Figura 2.1), que apresenta 96,2% de similaridade com a NH de *L. major* e 88,3% com a NH de *C. fasciculata*, apesar da total diferença entre as manifestações clínicas. Entre os tripanossomastídeos, as três iosina-uridina preferenciais e a riboidrolase não específica são altamente homólogas umas com as outras, sendo um pouco divergentes da purina- riboidrolase específica do *T. brucei brucei*. Contudo, elas são perfeitamente conservadas no seu sítio catalítico e aplicam mecanismos similares para a catálise (Cui et al., 2001). A conservação das nucleosídeo hidrolases entre as espécies tripanossomastídeas indica que esta enzima é fundamental para a captação de purinas.



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**



Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado

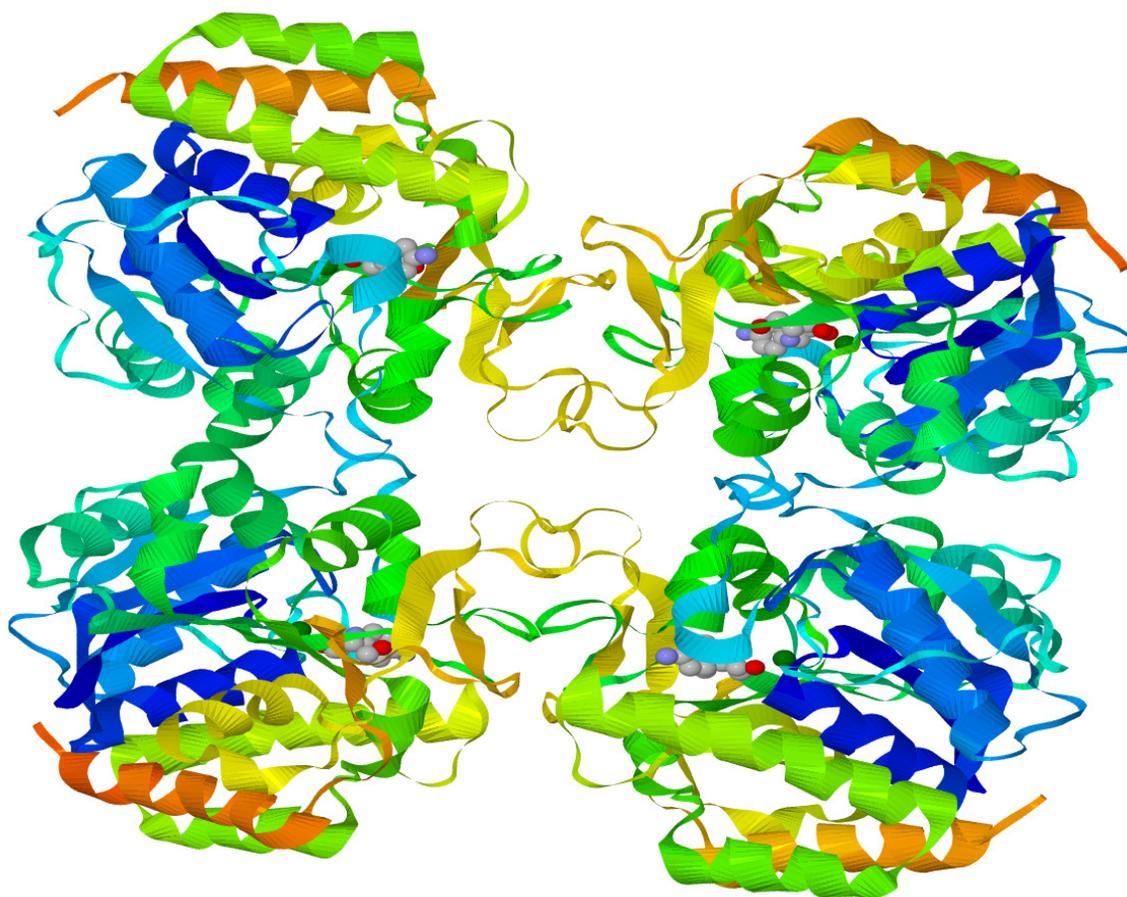
		*	*			
Ld-NH	MPRKIILD	CD	PGIDDAVA	IF	LAHGNP-E	VE LLAITTVVGN
Lm-NH	MPRKIILD	CD	PGIDDAVA	IF	LAHGNP-E	EIE LLAITTVVGN
Cf-IU-NH	MPKKIILD	CD	PGLDDAVAI	L	LAHGNP-E	EIE LLAITTVVGN
Tb-IAG-NH	MAKTVILD	HHD	GNKDDFVAMI		LLLSNP	KKVN LIGCICTDAD
		+	++			+
Ld-NH	RNARLVADVA		GIVGV-PVAA		GCTKPLVRGV	RNASQIHGE- - - - - TGMG
Lm-NH	QNARLVADVA		GIVGV-PVAA		GCTKPLVRGV	RNASHIHGE- - - - - TGMG
Cf-IU-NH	RNAQLVADIA		GITGV-PIAA		GCDKPLVRKI	MTAGHIHGE- - - - - SGMG
Tb-IAG-NH	GKIMCAMHRL		TKTPLFPIGK		STATAVNAFP	TEWRFSAKNL DDMPFLNIVE
Ld-NH	NVSYPPPEFKT		KLDGRHAV-Q		LIIDLIMSHE	PKTITLVPTG
Lm-NH	NVSYPPPEFKT		KLDGRHAV-Q		LIIDLIMSHE	PKTITLVPTG
Cf-IU-NH	TVAYPAEFKN		KVDERHAV-N		LIIDLIMSHE	PKTITLVPTG
Tb-IAG-NH	DVALWEKLP		EN-EAHNGQ		LLADLVMSK	EK-VTVCVTG
						*
Ld-NH	RLEPRIVDRV		KEVVMGGGY		HT-GNA-SPV	---AEFNVF
Lm-NH	RLEPRIVDRV		KEVVMGGGY		HT-GNA-SPV	---AEFNVF
Cf-IU-NH	RLEPRIVDRV		KEVVMGGGY		HE-GNA-TSV	---AEFNII
Tb-IAG-NH	KYGEAFTSKV		EECVIMGGAV		DVGGNVFLPT	TDGSAEWNIY
					+	+
Ld-NH	-NESWNV	TMV	GLDLTHQALA		TPAVQKR	VKE VGTKPAAFML
Lm-NH	-NESWNV	TMV	GLDLTHLALA		TPAVQKR	VRE VGTKPAAFML
Cf-IU-NH	-NESWQV	TMV	GLDLTHQALA		TPPILQR	VKE VDTNPAREFML
Tb-IAG-NH	CCPNIRCVLF		SLDATN---	T	VPVRSVDV	KG FGAQNQYLLS
Ld-NH	YE---KERNT		YATVHDP	CAV	AYVIDPT	VMT TEQVP--VDI
Lm-NH	YE---KEHDT		YGKVHDP	CAV	AYVIDPT	VMT TERVP--VDI
Cf-IU-NH	YQ--SNRYMA		AAAVHDP	CAV	AYVIDP	SVM T ERVP--VDI
Tb-IAG-NH	HEEILRDGDA		YYA-WDALTA		AYILEPTIAT	LEPVALD
						VDV SK-GKSE-GRT
						+
Ld-NH	VADFRYPRPK		HCHTQVAVKL		DFDKFWCLVI	DALKRIGDPQ
Lm-NH	VADFRYPRPK		NCRTQVAVKL		DFDKFWCLVI	DALERIGDPQ
Cf-IU-NH	VADFRNPRPE		HCHTQVAVKL		DFEKFWGLVL	DALERIGDPQ
Tb-IAG-NH	PRASGEGKP-		--CAHVARNP		SKQMFHDLVF	-ASTRVY

FIG. 2.2 - Alinhamento das sequências de aminoácidos das nucleosídeo hidrolases.

Ld-NH: *L. donovani*, Lm-NH: *L. major*, Cf-IU-NH: inosina-uridina de *C. fasciculata*, Tb-IAG-NH: purina específica inosina-adenosina-guanosina de *T. brucei brucei* (CUI, 2001).



Para a elaboração do modelo, foi escolhida a nucleosídeo hidrolase de *C. fasciculata* (Cf-NH) por possuir estrutura cristalográfica no PDB (código 2MAS), disponibilizada por Parkin et al. (PARKIN, 1997) e existirem vários inibidores já publicados com resultados experimentais para comparação e adequação com os resultados a serem obtidos por Modelagem e Dinâmica Molecular, analisando os cálculos de acordo com os resultados experimentais encontrados na literatura.



**FIG. 2.3 – Estrutura Quaternária da Cf-NH disponível no PDB.**

**Figura gerada no Jmol com coloração selecionada por grupos espaciais de simetria.**

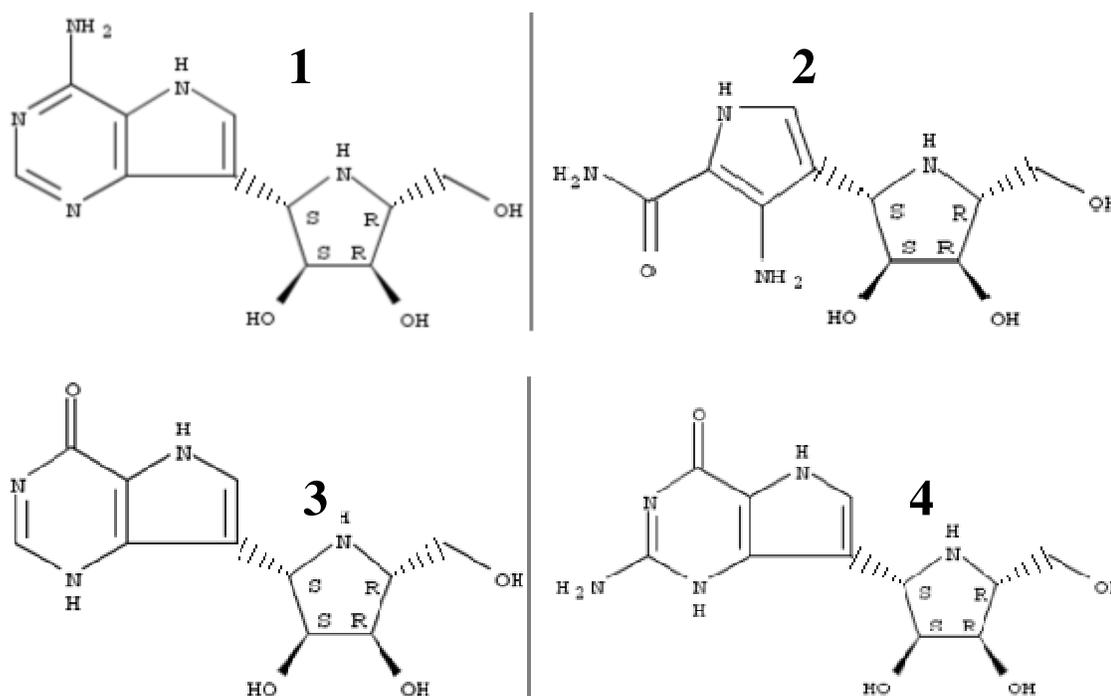
(Jmol, <http://www.jmol.org>)



Como a *C. fasciculata* não é patogênica para o homem, utilizou-se também alguns resultados experimentais de inibidores de LdNH para confirmar a semelhança do modelo obtido a partir da Cf-NH, já que há 88,3% de similaridade na sequência de aminoácidos de ambas as estruturas e apenas 1 aminoácido divergente no sítio ativo. Além disso, para sugerir um fármaco anti-leishmanial, será mais adequada a comparação com os resultados obtidos na estrutura da LdNH.

## 2.2 MODELAGEM MOLECULAR DOS INIBIDORES

Foram escolhidos e modelados os inibidores da FIG. 2.4 com atividade antileishmanial comprovada por Miles et al. (MILES, 1999):



**FIG. 2.4 - Inibidores para Cf-NH (MILES, 1999).**



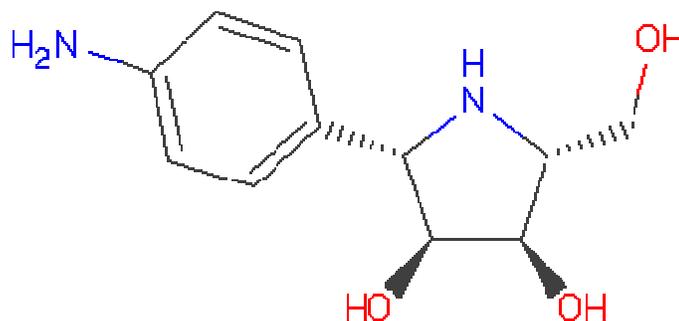
Inibidor 1: 4-amino-7-[(2*S*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-pyrrolidinyl]-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidine; (CAS registry number 249503-25-1);

Inibidor 2: [2*R*-(2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,5 $\alpha$ )]-5-[4-amino-5-(carbonylamino)-3-pyrrolyl]-2-(hydroxymethyl)-3,4-pyrrolidinediol; (CAS registry number 222631-52-9);

Inibidor 3: 7-[(2*S*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-pyrrolidinyl]-1,5-dihydro-4*H*-pyrrolo-[3,2-*d*]pyrimidin-4-one (CAS registry number 09799-67-7);

Inibidor 4: 2-amino-7-[(2*S*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-pyrrolidinyl]-1,5-dihydro-4*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-one (CAS registry number 209799-75-7).

Além desses, foi utilizado também o inibidor *p*-aminofenil-(1*S*)-iminoribitol (PIR) (FIG 2.5), presente na estrutura cristalográfica da Cf-NH (PARKIN, 1997).



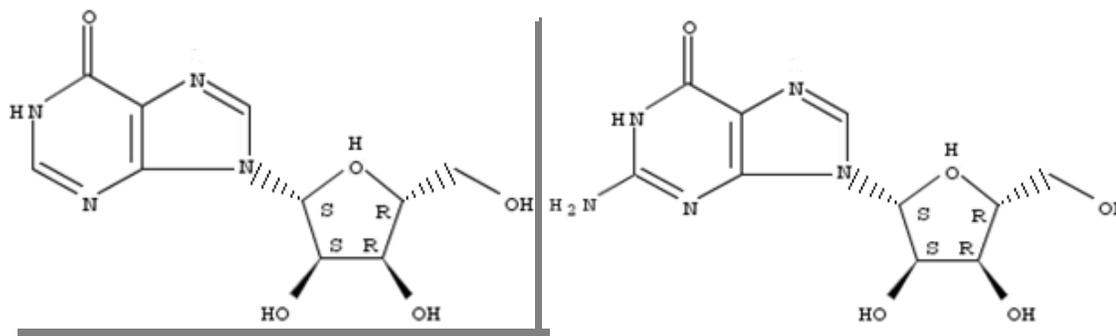
**FIG. 2.5 – Inibidor PIR para Cf-NH (PARKIN, 1997).**

Para as simulações com Ld-NH foram utilizados os Substratos Inosina e Guanosina, cujos resultados experimentais foram obtidos por Cui et al. (CUI, 2001). A estrutura de tais substratos pode ser vista na FIG 2.6.



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado



**FIG. 2.6 – Substratos Inosina e Guanossina de Ld-NH (CUI, 2001).**

Os inibidores foram consultados no SciFinder (SCIFINDER, 2010) para verificação das estruturas, com atenção especial para as isomerias R,S. Em seguida, foram desenhados no software Ghemical (HASSINEN, 2001) e tiveram suas geometrias otimizadas por Mecânica Molecular e, em seguida, pelo método semi-empírico AM1. Os arquivos gerados pelo Ghemical, foram convertidos pelo OpenBabel (O'BOYLE, 2011) para o formato do Gaussian (GAUSSIAN, 2009) onde tiveram suas estruturas minimizadas com o método Hartree-Fock 6-31G\*\*.

As estruturas minimizadas foram adicionadas ao servidor PRODRG (SCHÜTTELKOPF, 2004) para simples adição de cargas full, sem alteração da quiralidade e sem minimização de energia. Os arquivos de saída PDBQ, contendo as cargas, foram armazenados para as simulações por Docking Molecular.

## 2.3 SIMULAÇÕES POR DOCKING MOLECULAR

Foi utilizado o software AutoDock (SANNER, 1999) , para a realização do Docking Molecular, valendo-se da estrutura cristalográfica da Cf-NH, disponível no site do PDB (BERNSTEIN, 1977), sob o código 2MAS (PARKIN, 1997). Dessa estrutura foi retirado o



PIR, inibidor presente, bem como as moléculas de água, seguindo o protocolo estabelecido no manual do AutoDock. Foram adicionadas cargas Kollman nos ligantes (inibidores 1 a 4) e na proteína, que foi mantida rígida, e o grid foi centralizado nas coordenadas X, Y, Z: (106.26 , 35.579, 81.902) com dimensões cúbicas de 60 Å de lado.

## 2.4 SIMULAÇÕES POR DINÂMICA MOLECULAR

Após o Docking Molecular, foi selecionada a conformação de menor energia de cada inibidor para realização da Dinâmica Molecular. Nessa etapa foi utilizado o software Amber (AMBER, 2012), com cálculos de Mecânica Molecular. As estruturas foram então submetidas ao Antechamber, software pertencente ao pacote AmberTools (AMBER, 2012), para geração dos parâmetros necessários à dinâmica de cada inibidor, como ligações, ângulos e diedros.

Em seguida a estrutura da proteína com o inibidor foi solvatada, através do software Tleap, constante do AmberTools, com água do modelo SPC/E (BERENDSEN, 1987) em uma caixa com 15 Å de distância entre a proteína e a borda. Foram adicionados íons sódio para neutralização do sistema, que já contava com um átomo de Cálcio, que consta no arquivo original do PDB e participa das interações no sítio ativo. As etapas seguintes se sucederam da seguinte forma:

- Minimização de energia com restrição de posição: foi aplicado um campo de força de 500 Kcal/mol sobre a proteína, o cálcio e o inibidor, deixando as moléculas do solvente se acomodarem.
- Minimização de energia sem restrição de posição: o sistema inteiro teve sua energia minimizada;
- Dinâmica Molecular com restrição de posição: foi aplicado um campo de força de 10 Kcal/mol sobre o complexo proteína, cálcio e inibidor em uma simulação de 1000 ps, para



estabilizar a temperatura, que iniciou em 0 K (moléculas paradas) e foi até 309 K (temperatura corporal).

- Dinâmica Molecular sem restrição de posição: foi realizada simulação de 5,0 ns com tempo de integração de 2 fs e raio de corte para interações de longo alcance de 10 Å (distância além da qual se desprezam as contribuições energéticas).

Todas as simulações foram realizadas em cluster computacional de 6 nós com 8 processadores cada, disponível no Laboratório Multiusuário de Modelagem de Sistemas Complexos (LAB2M/UFMS). A performance média de cada dinâmica foi aproximadamente de 500 ps/dia com uso de 8 processadores.

Foi realizado também dinâmica molecular da proteína isolada, totalizando seis simulações completas.

#### 2.4.1 ANÁLISES DAS SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR

Após a realização das dinâmicas, os resultados foram analisados inicialmente com o script `process_mdout.perl`, que está incluído no pacote do AmberTools. Através desse script foram produzidos arquivos com as informações sobre a variação de Energia Total, Energia Potencial, Energia Cinética e Temperatura ao longo do tempo. Com o software Qtiplot (VASILIEF, 2010), foram gerados gráficos a partir desses arquivos, através dos quais se pode observar o comportamento de equilíbrio dinâmico do sistema, com pequenas variações, mas sempre numa faixa estreita de energia e temperatura.

Após confirmação da estabilização do sistema, foram utilizados os softwares Ptraj e Cpptraj, incluídos no pacote AmberTools, para geração de gráficos de Desvio da Raiz Média Quadrática (DRMQ) ou RMSD (em inglês) da proteína e do ligante, ao longo do tempo. Também foram gerados gráficos de Flutuação da Raiz Média Quadrática (RMSF) do



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado



esqueleto (backbone) da proteína, que é a flutuação da distância movimentada por cada resíduo aminoácido do backbone da proteína.

Em seguida, analisaram-se as interações de cada sistema antes e depois da simulação, com o software Ligplot+ (LASKOWSKI, 2010). Para um estudo mais detalhado do comportamento dessas interações ao longo da dinâmica, foi utilizada a ferramenta Hbond do software Cpptraj para monitorar as ligações de hidrogênio ao longo do tempo, usando o critério de Fabíola et al. (FABIOLA, 2002), que considera ligações de Hidrogênio quando a distância entre o átomo doador e aceptor do hidrogênio for menor que 3,5 Å e o ângulo formado entre Doador, Hidrogênio e Aceptor for maior que 90°. As ligações que não alcançaram pelo menos 50 % de ocorrência ao longo da dinâmica, foram desprezadas, conforme critério usual estabelecido nos tutoriais do Amber.

Semelhantemente, usou-se o critério de Moreland et al. (MORELAND, 2005) para interações hidrofóbicas, considerando-as quando ocorriam entre carbonos separados por no máximo 3,9 Å.

Foram realizados ainda gráficos de distâncias entre os principais átomos que poderiam estabelecer ligações de Hidrogênio, com o objetivo de captar a variação dessas distâncias ao longo do tempo. Para isso foi utilizado o software Ptraj, já mencionado e o aplicativo Grace (GRACE, 1991) para produção dos gráficos.

De posse dos gráficos de distância, foi feita uma seleção das melhores interações de cada resíduo aminoácido com cada inibidor e gerados gráficos de Distribuição Radial, que mostram as distâncias mencionadas como distribuição de frequências, ou histogramas com tamanhos de classes de 0.1 Å. Para realização desses gráficos foram utilizados novamente os softwares Ptraj e Grace.



### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 RESULTADOS DO DOCKING MOLECULAR**

Os resultados gerados pelo Docking Molecular encontram-se dispostos nas Tabelas 3.1 a 3.4.

**Tabela 3.1 - Constantes de Inibição dos inibidores para Cf-NH**

K <sub>i</sub> (em nm) para inibidores de Cf-NH					
Inibidor:	PIR	Inibidor 1	Inibidor 2	Inibidor 3	Inibidor 4
Configuração de Menor Energia:	41,38	6,04	5,79	4,00	1,48
Configuração de Maior Energia:	190,23	24,77	29,45	20,95	3,27
Experimental:	30 ± 2	7 ± 1,4	3 ± 0,6	42 ± 8,4	84 ± 16,8
Referência do Experimental:	Parkin, 1997	Miles, 1999	Miles, 1999	Miles, 1999	Miles, 1999

A energia livre de ligação e a constante de inibição se relacionam por:  $\Delta G_L = R.T.\ln(K_i)$ , onde  $R=1,987$  cal/mol.K e  $T=298,15$  K. Assim, as divergências nos valores de  $K_i$  são minimizadas quando comparamos os valores de  $\Delta G_L$ , como pode ser visto na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2 – Energia livre de ligação dos inibidores para Cf-NH**

$\Delta G_L$ (em Kcal/mol.K) para inibidores de Cf-NH					
Inibidor:	PIR	Inibidor 1	Inibidor 2	Inibidor 3	Inibidor 4
Configuração de Menor Energia:	-10,07	-11,21	-11,24	-11,46	-12,04
Configuração de Maior Energia:	-9,17	-10,38	-10,27	-10,47	-11,58
Experimental:	-10,26 ± 0,04	-11,12 ± 0,13	-11,63 ± 0,11	-10,06 ± 0,13	-9,65 ± 0,13
Diferença ao Experimental:	1,5 %	0,0 %	2,4 %	2,7 %	18,3 %



Considerando a faixa de erro experimental exibida na Tabela 3.2, percebemos que os valores para o inibidor 1 estão em consonância com o valor experimental. Para os demais inibidores, quando comparamos os valores de  $\Delta G_L$  máximo e mínimo, restaram as seguintes divergências em relação aos valores experimentais: PIR, 1,5%; Inibidor 2, 2,4%; Inibidor 3, 2,7%; e Inibidor 4, 18,3%.

**Tabela 3.3 - Constantes de Inibição para Ld-NH**

K <sub>i</sub> (em $\mu\text{m}$ ) para inibidores de Ld-NH				
Inibidor:	Inibidor 1	Inibidor 2	Inosina	Guanosina
Configuração de Menor Energia:	3,58	9,05	67,62	1,64
Configuração de Maior Energia:	40,28	35,74	1.070,00	12,21
Experimental:	-	-	329 $\pm$ 143	144 $\pm$ 23
Referência do Experimental:	Cui, 2001	Cui, 2001	Cui, 2001	Cui, 2001

Da mesma forma como foi feito para os inibidores de Cf-NH, os valores de K<sub>i</sub> foram convertidos para  $\Delta G_L$  e os resultados estão apresentados na Tabela 3.4, a seguir.

**Tabela 3.4 - Energia livre de ligação dos inibidores para Ld-NH**

$\Delta G_L$ (em Kcal/mol.K) para inibidores de Ld-NH				
Inibidor:	Inibidor 1	Inibidor 2	Inosina	Guanosina
Configuração de Menor Energia:	-7,43	-6,88	-5,69	-7,89
Configuração de Maior Energia:	-6,00	-6,07	-4,05	-6,70
Experimental:	-	-	-4,75 $\pm$ 0,34	-5,24 $\pm$ 0,10
Diferença ao Experimental:	-	-	0,0 %	25,4 %



Aqui percebe-se que a Inosina mantém-se dentro dos limites de erro experimental e da mesma forma como na análise anterior, a divergência observada pela Guanosina, quando expressa na forma de  $\Delta G_L$ , é reduzida para 25,4%.

Tanto o Inibidor 4 na Cf-NH, quanto a Guanosina na Ld-NH apresentaram valores de energia livre de ligação calculadas abaixo do valor experimental, sendo -11,58 Kcal/mol.K contra -9,78 Kcal/mol.K para o Inibidor 4 e -6,7 Kcal/mol.K, contra -5,34 Kcal/mol.K para a Guanosina, já descontados os erros experimentais. Esse resultado pode ser consequência da facilitação que o software permite para que o inibidor entre no sítio ativo, quando esse processo deve ser mais complexo na prática, consumindo mais energia.

É importante ressaltar ainda que, embora utilizando uma estrutura cristalográfica, o docking é realizado sem a presença de água, o que pode ser outro motivo das divergências encontradas.

## **3.2 RESULTADOS DA DINÂMICA MOLECULAR**

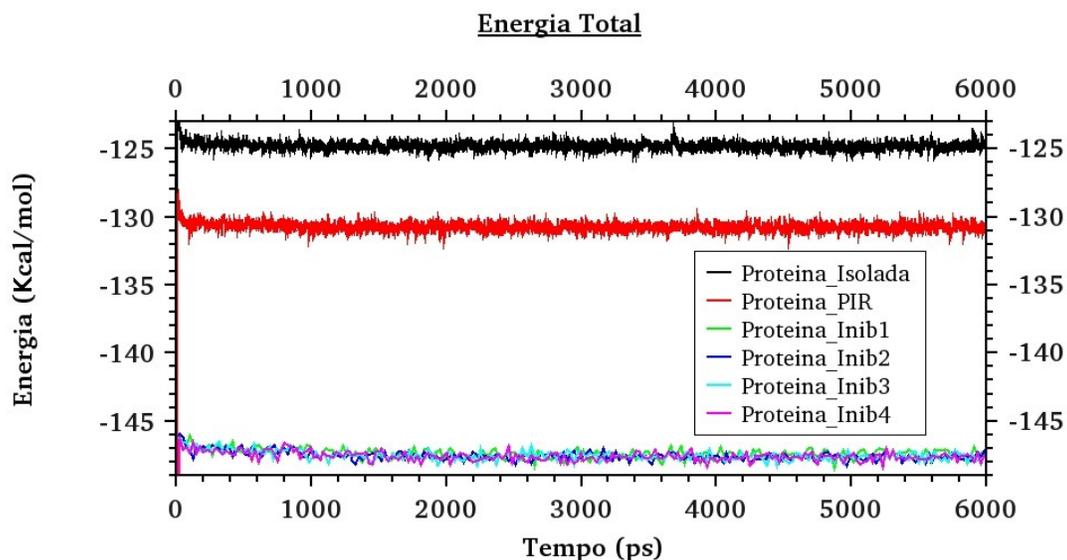
### **3.2.1 ANÁLISE DOS GRÁFICOS DE ENERGIA TOTAL E POTENCIAL**

Uma das primeiras análises a serem feitas é a verificação da estabilização do nível de energia, o que revela a natureza do equilíbrio termodinâmico alcançado durante a simulação. Pode-se perceber, conforme as figuras a seguir, que todas as simulações realizadas alcançaram esse equilíbrio termodinâmico, tendo a proteína isolada o maior nível de energia, o que revela a contribuição dos inibidores no abaixamento desse nível energético, mais acentuado nos Inibidores 1 a 4 do que no PIR.

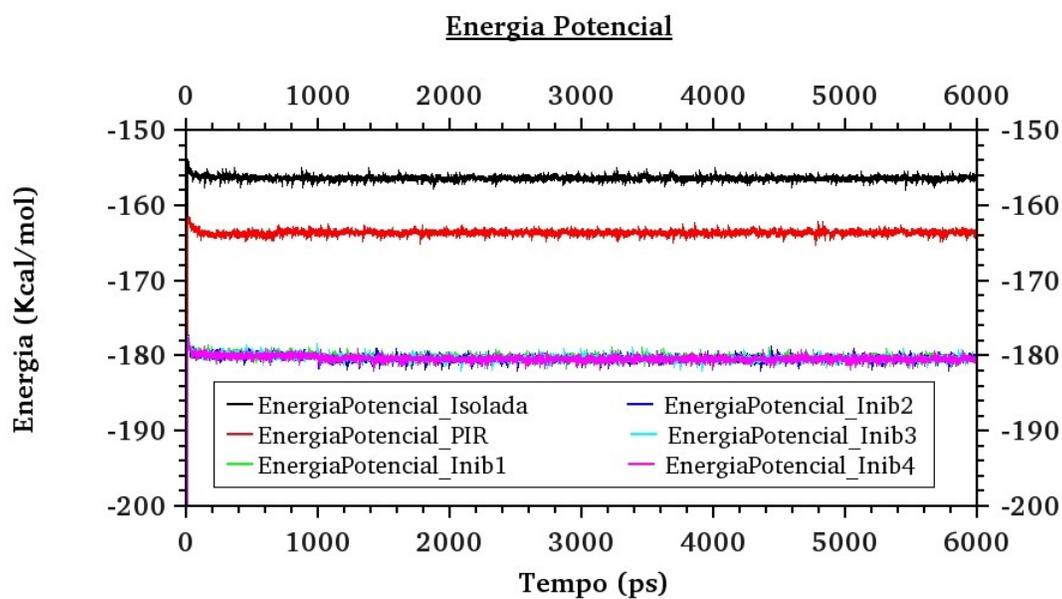


Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado



**FIG. 3.1 - Energia Total dos Sistemas simulados**

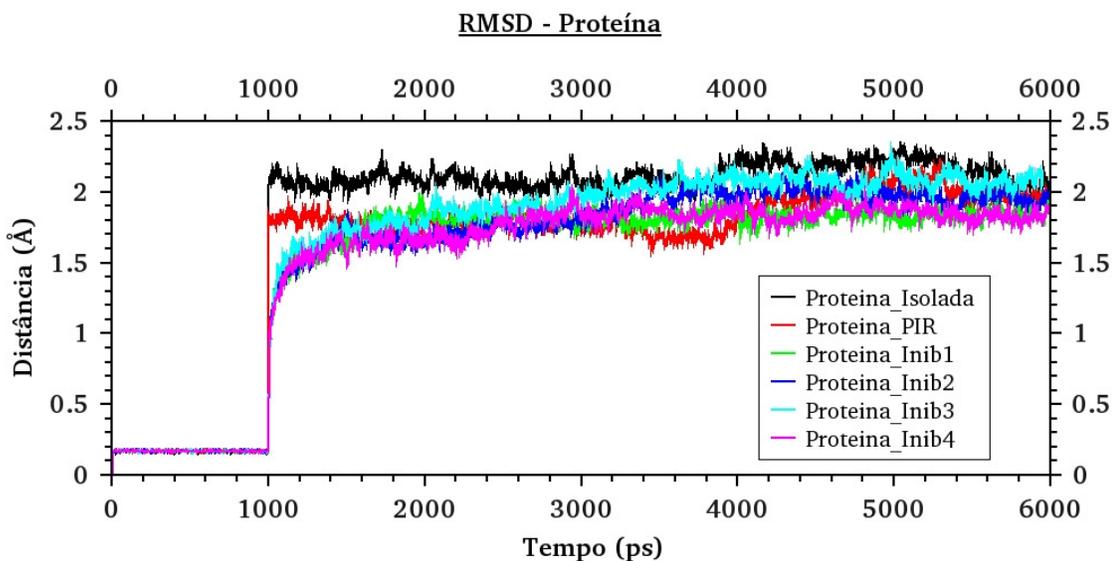


**FIG. 3.2 - Energia Potencial dos Sistemas simulados**



### 3.2.2 ANÁLISE DOS GRÁFICOS DE RMSD DA PROTEÍNA

Outra análise importante a ser feita é a conferência do Desvio da Raiz Média Quadrática (DRMQ) ou, em inglês, RMSD (*Root Mean Square Deviation*), que representa a variação da posição da proteína ao longo da dinâmica, em relação à sua posição no primeiro ps de simulação.



**FIG. 3.3 - RMSD Temporal da estrutura da proteína**

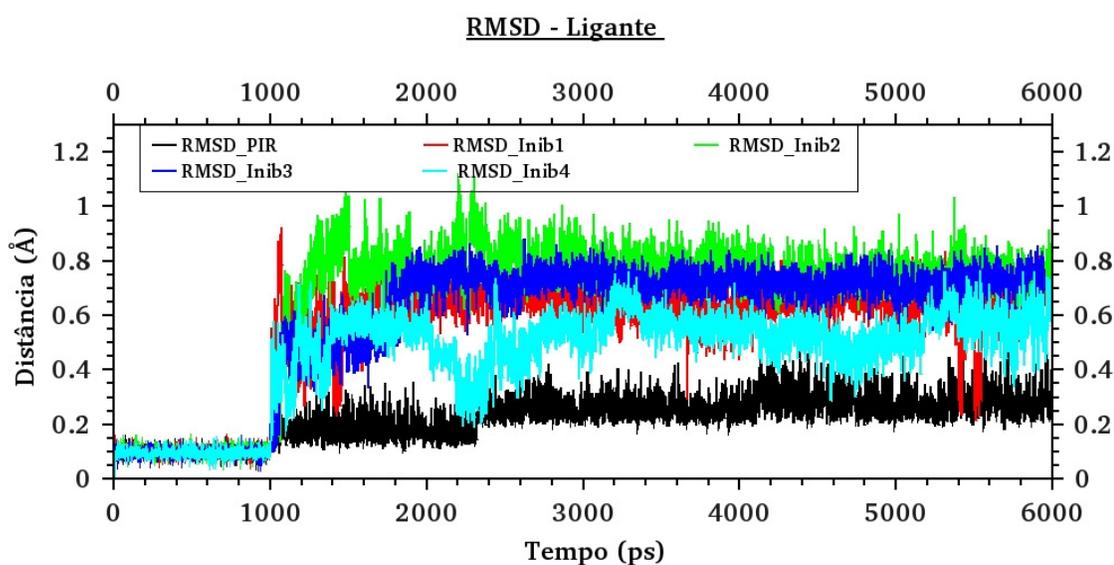
Como pode ser percebido, durante os primeiros 1000 ps, a proteína estava com restrição de posição (devido à aplicação de um campo de força externo no valor de 10 Kcal/mol, para a estabilização da temperatura do sistema), portanto “parada” nesse período.

Também pode ser percebido que o RMSD ficou abaixo de 2,5 Å, indicando pouca movimentação da proteína durante todas as simulações. Entretanto, é possível notar que, na presença dos inibidores essa variação é menor ainda, indicando que os inibidores diminuem a movimentação da proteína, por estarem presos a ela.



### 3.2.3 ANÁLISE DOS GRÁFICOS DE RMSD DO LIGANTE

À semelhança do RMS da proteína, é útil notar especificamente a variação da posição do ligante ao longo da dinâmica, em relação à sua posição no primeiro ps de simulação.



**FIG. 3.4 - RMSD Temporal dos Ligantes**

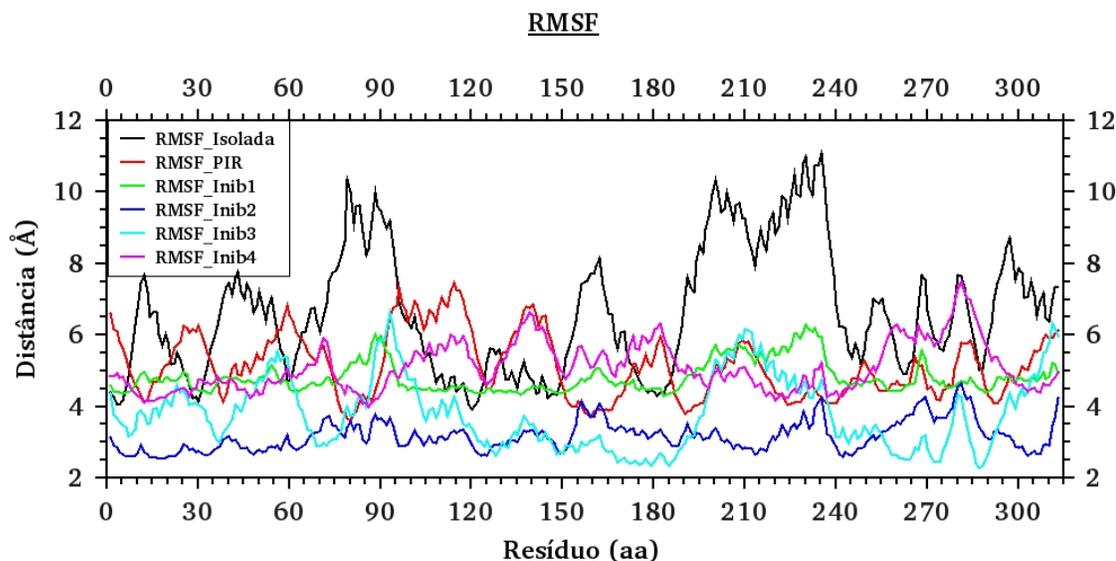
Aqui podemos notar uma variação abaixo de 1 Å para todos os inibidores, indicando que todos estão relativamente presos à proteína. É possível notar ainda que o PIR (em preto) parece se movimentar menos do que os demais inibidores, o que pode ter acontecido devido ao fato de que o primeiro frame dessa simulação foi retirado de uma estrutura cristalográfica e, portanto, bem estabilizado naquela posição.



### 3.2.4 ANÁLISE DOS GRÁFICOS DE RMSD ESPACIAL

O RMSD também pode ser avaliado com relação aos resíduos de aminoácidos, indicando a variação da posição de cada resíduo durante a dinâmica. Nesse caso, recebe o nome de RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*).

Para essa análise, é comum consideramos apenas o backbone (esqueleto) da proteína, composto pelos átomos de Carbono e Nitrogênio da cadeia principal de aminoácidos, desprezando as cadeias laterais, que se movimentam muito, o que dificultaria a visualização da movimentação do backbone.



**FIG. 3.5- RMSF do backbone da proteína**

Através da análise do gráfico acima podemos perceber, pela comparação da curva da proteína isolada (em preto) com as demais curvas, que há notável diminuição da variação de posição entre os resíduos 60 a 100 e 180 a 240 na presença dos inibidores, provavelmente



fruto das interações com resíduos do sítio ativo que estão nessa região, como His 82, Tyr 225 e Tyr 229.

Além disso, podemos notar que quando a proteína está com o Inibidor 2, as variações são perceptivelmente menores do que em todos os outros inibidores, exceção apenas para o inibidor 3 nas faixas de 150 a 190 e 255 a 295, sendo que nesta última não há aminoácidos do sítio ativo. Isso provavelmente está relacionado com o fato do inibidor 2 ter o menor valor de  $K_i$ , apresentando a maior atividade inibitória conforme experimentos de Miles et al. (MILES, 1999).

### 3.2.5 PRINCIPAIS INTERAÇÕES

Através do Software LIGPLOT foram geradas as principais interações entre os aminoácidos da proteína Cf-NH e os Inibidores, conforme pode ser visto a seguir. As interações aqui consideradas são aquelas em que a distância entre o átomo doador de hidrogênio e o átomo receptor é menor do que 3,5 Å.

É importante notar que a numeração foi modificada pelo Tleap, quando o programa verificou que a sequência da proteína disponível no PDB começava em 2, ele renumerou todos os resíduos para que começassem em 1, daí as divergências encontradas nas figuras 3.6 a 3.10. Durante o texto, entretanto, sempre nos referiremos à numeração original, constante na estrutura do site do PDB.

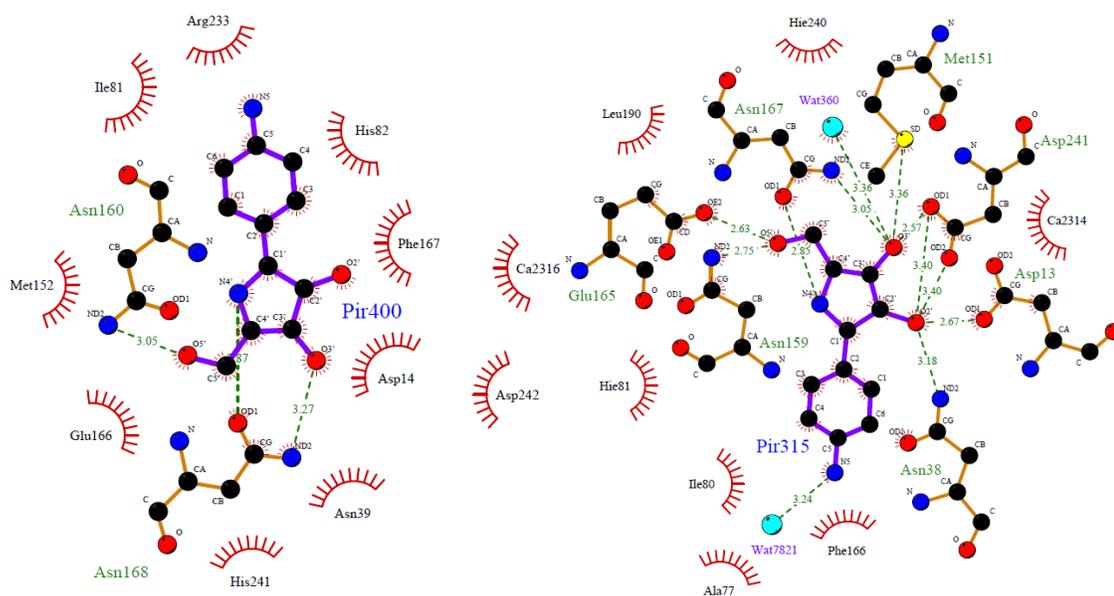


Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado



Quanto às principais interações observadas no PIR, podemos destacar os resíduos aminoácidos ASP14, ASN39, GLU166 e ASP242 (representados na figura da direita abaixo como Asp13, Asn38, Glu165 e Asp241), que não estavam interagindo no início da dinâmica e ao final interagiram.



**FIG. 3.6 - Interações da Proteína com o PIR antes e depois da dinâmica molecular**

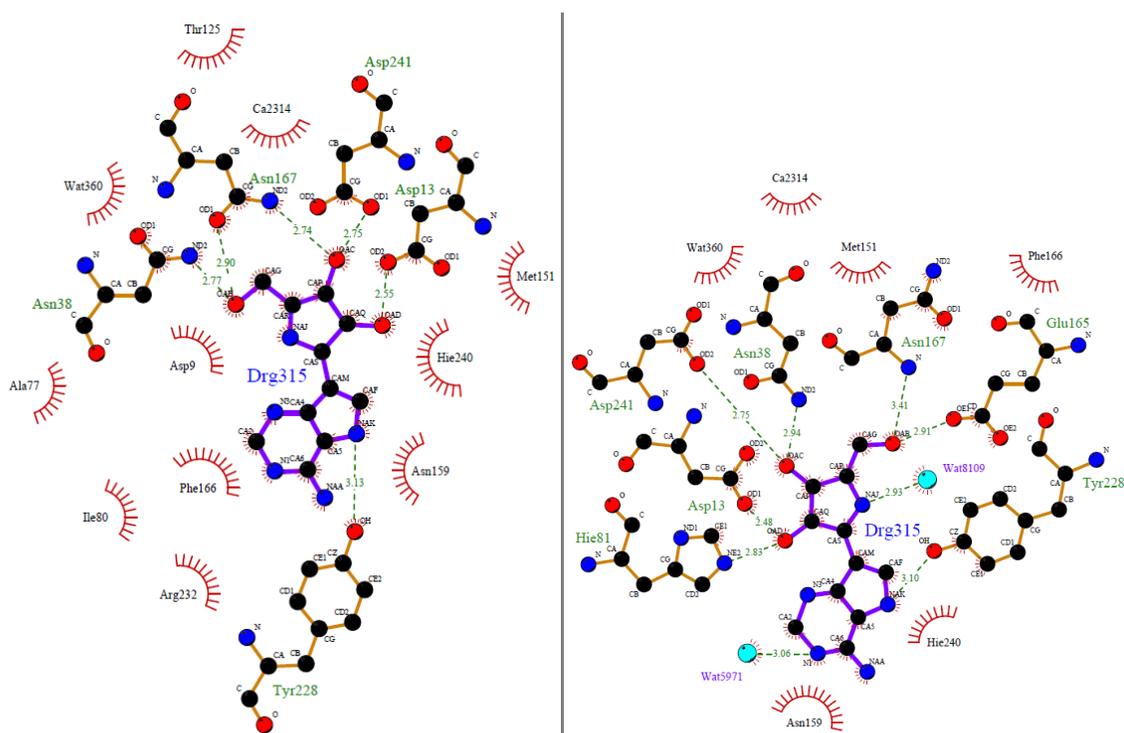


Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado



Quanto às principais interações observadas no Inibidor 1, podemos destacar os resíduos aminoácidos HIS82 e GLU166 (representados na figura abaixo como His81 e Glu165), que não estavam interagindo no início da dinâmica e ao final interagiram.



**FIG. 3.7 - Interações da Proteína com o Inibidor 1 antes e depois da dinâmica molecular**

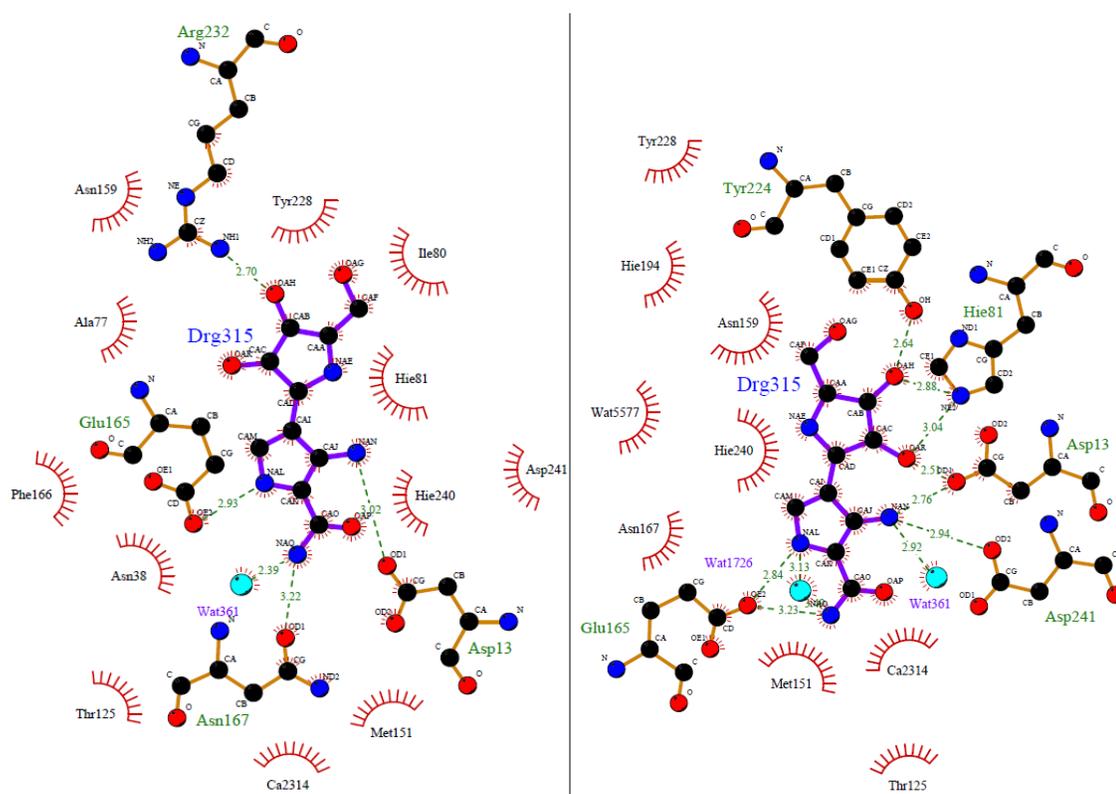


Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado



Quanto às principais interações observadas no Inibidor 2, podemos destacar os resíduos aminoácidos HIS82, TYR225 e ASP242 (representados na figura abaixo como His81, Tyr224 e Asp241), que não estavam interagindo no início da dinâmica e ao final interagiram.



**FIG. 3.8 - Interações da Proteína com o Inibidor 2 antes e depois da dinâmica molecular**

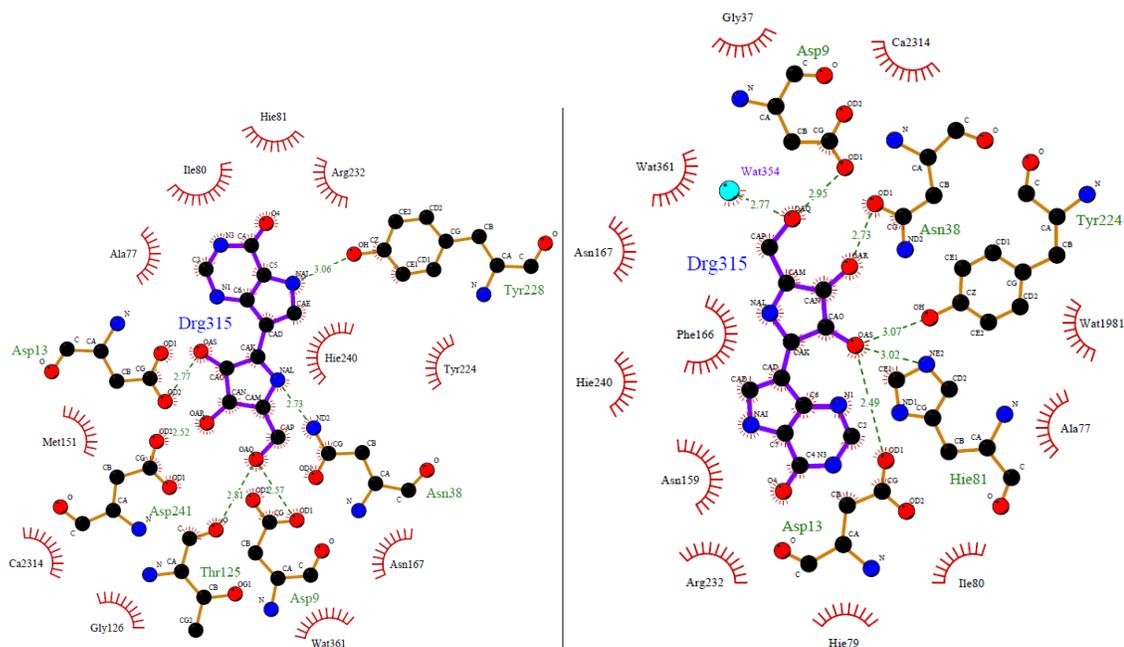


Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado



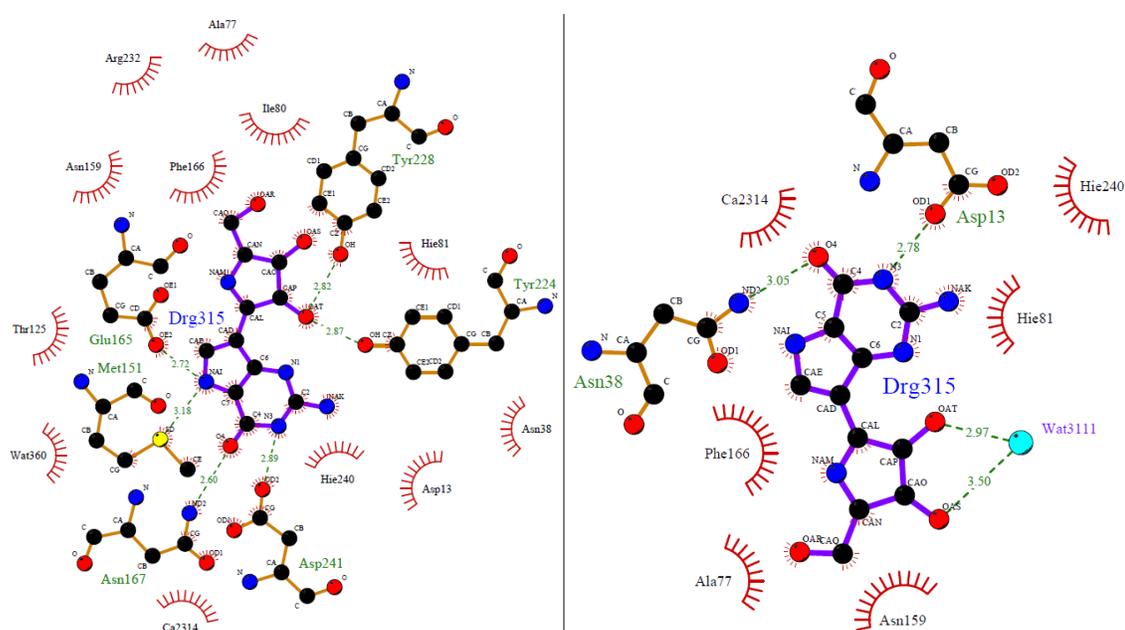
Quanto às principais interações observadas no Inibidor 3, podemos destacar os resíduos aminoácidos HIS82 e TYR225 (representados na figura abaixo como His81 e Tyr224), que não estavam interagindo no início da dinâmica e ao final interagiram.



**FIG. 3.9 - Interações da Proteína com o Inibidor 3 antes e depois da dinâmica molecular**



Quanto às principais interações observadas no Inibidor 4, podemos destacar os resíduos aminoácidos ASP14 e ASN39 (representados na figura abaixo como Asp13 e Asn38), que não estavam interagindo no início da dinâmica e ao final interagiram.



**FIG. 3.10 - Interações da Proteína com o Inibidor 4 antes e depois da dinâmica molecular**

### 3.2.5.1 LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO

Por se tratar de uma interação forte as ligações de hidrogênio têm papel fundamental nas análises de interação proteína-ligante. Aqui foram utilizados os critérios de Fabíola et al. (FABIOLA, 2002), considerando ligações de Hidrogênio quando a distância entre o átomo doador e aceptor do hidrogênio for menor que 3,5 Å e o ângulo formado entre Doador, Hidrogênio e Aceptor for maior que 90°.



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado



Para facilitar a comparação entre os átomos dos diversos inibidores, criamos uma numeração única, baseada na semelhança existente entre os inibidores apresentados na FIG 2.4 e exemplificação do Inibidor 1 na última linha da Tabela 3.5. A numeração criada pode ser conferida na tabela abaixo:

**Tabela 3.5 - Correspondência entre átomos dos inibidores**

Numeração Criada	Correspondência de Átomos entre os Inibidores				
	PIR	INIBIDOR 1	INIBIDOR 2	INIBIDOR 3	INIBIDOR 4
Átomo 1	O2'	OAD	OAR	OAS	OAT
Átomo 2	O3'	OAC	OAH	OAR	OAS
Átomo 3	O5'	OAB	OAG	OAQ	OAR
Átomo 4	N4'	NAJ	NAE	NAL	NAM
Átomo 5	N5	NAA	NAQ	O4	O4
Átomo 6	-	NAK	NAL	NAI	NAI
Átomo 7	-	N1	OAP	N3	N3
Átomo 8	-	N3	NAN	N1	N1
Átomo 9	-	-	-	-	NAK

Para o cálculo das ligações de hidrogênio, utilizou-se a ferramenta hbond do software Cpptraj, constante no pacote do AmberTools. Essa ferramenta fornece o percentual de frames da dinâmica que continham cada ligação de hidrogênio identificada de acordo com os critérios estabelecidos. Conforme usual, considerou-se apenas as ligações de hidrogênio que estavam presentes em pelo menos 50% dos 5000 frames pesquisados, 1 a cada ps.

Com base nos resultados, foi montada a Tabela 3.6, a seguir:



**Tabela 3.6 - Ligações de Hidrogênio presentes em pelo menos 50% do tempo de simulação**

Átomo da Proteína	Átomo do Inibidor					Total de Interações
	PIR	INIBIDOR 1	INIBIDOR 2	INIBIDOR 3	INIBIDOR 4	
ASP10:OD1	-	-	-	Atm 3: 68%	-	<b>1</b>
ASP14:OD1	Atm 1: 97%	Atm 1: 99% Atm 2: 99%	Atm 1: 65% Atm 8: 87%	Atm 1: 98%	Atm 7: 86% Atm 9: 96%	<b>8</b>
ASP14:OD2	-	Atm 1: 72% Atm 2: 88%	-	-	Atm 9: 58%	<b>3</b>
ASN39:OD1	-	-	-	Atm 2: 91%	-	<b>1</b>
ASN39:ND2	Atm 1: 89%	Atm 1: 50% Atm 2: 98%	-	-	Atm 5: 77%	<b>4</b>
HIS82:NE2	-	Atm 1: 93%	Atm 1: 67%	Atm 1: 98%	-	<b>3</b>
ASN160:ND2	Atm 3: 99%	-	-	Atm 6: 85%	-	<b>2</b>
GLU166:OE1	-	-	Atm 6: 83%	-	-	<b>1</b>
GLU166:OE2	Atm 3: 100%	Atm 3: 100%	Atm 5: 66% Atm 6: 90%	-	-	<b>4</b>
ASN168:OD1	Atm 4: 97%	-	-	-	-	<b>1</b>
ASN168:N	-	Atm 3: 68%	-	-	-	<b>1</b>
ASN168:ND2	Atm 2: 89%	-	Atm 5: 53%	-	-	<b>2</b>
TYR225:OH	-	-	Atm 1: 70%	Atm 1: 72%	Atm 9: 86%	<b>3</b>
TYR229:OH	-	Atm 6: 91%	-	-	-	<b>1</b>
HIS241:ND1	-	-	Atm 4: 59%	-	-	<b>1</b>
HIS241:NE2	-	-	Atm 4: 72%	-	-	<b>1</b>
ASP242:OD1	Atm 2: 100%	Atm 2: 81%	-	-	-	<b>2</b>
ASP242:OD2	Atm 2: 78%	-	Atm 8: 90%	-	-	<b>2</b>
<b>Total de Interações</b>	<b>8</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>41</b>



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado



A Tabela 3.6 fornece informações muito coerentes com os resultados experimentais, uma vez que os inibidores 1 e 2 têm valores muito próximos de  $K_i$  (7nM e 3nM, respectivamente), em seguida, o PIR apresenta valor de  $K_i$  de 30nM, e por último os inibidores 3 e 4 com valores de 42nM e 84nM, respectivamente. O que concorda plenamente com a mesma ordem, quando classificados pelo Total de interações de ligações de hidrogênio, constantes na última linha da tabela 3.6. Com um coeficiente de correlação de 94%.

Além da quantidade total de interações é possível perceber correlações semelhantes ao analisar a quantidade de átomos ou resíduos da proteína com que cada inibidor interage. No primeiro caso, duas interações no mesmo átomo contam apenas como uma e, no segundo, duas ou mais interações no mesmo resíduo contam como uma apenas.

**Tabela 3.7 - Correlação da Quantidade de Ligações de Hidrogênio com  $K_i$**

INIBIDOR	Interações totais	Átomos da proteína que interagem	Resíduos da proteína que interagem	$K_i$ (nM)
INIBIDOR 2	11	9	7	3
INIBIDOR 1	11	8	7	7
PIR	8	8	6	30
INIBIDOR 3	6	6	6	42
INIBIDOR 4	5	4	3	84
Correlação com o $K_i$	-0,94	-0,96	-0,97	-

Obviamente, seriam necessárias outras simulações com muitos outros inibidores para que essa correlação fosse ratificada com maior validade estatística, o que é impossível de se obter com apenas 5 pontos.



Também é possível perceber que o Ácido Aspártico 14 é o aminoácido campeão de interações, com 27% de todas as ligações de hidrogênio concentradas nele, sendo também o único aminoácido que faz ligação de hidrogênio com todos os inibidores. Além disso, os dois melhores inibidores, inibidor 1 e inibidor 2, interagem fortemente com o ASP 14, o que reforça a importância dessa interação para o desempenho do inibidor.

Em seguida temos o GLU 166 e ASN 39, ambos com 5 interações totais, corroborando a importância das interações com esses aminoácidos no sítio ativo. Entretanto, não menos importante do que a interação com esses aminoácidos é a interação com a maior quantidade de aminoácidos possível, pois se observa que os dois melhores inibidores interagem com 7 aminoácidos cada, conforme vemos na Tabela 3.7

### 3.2.5.2 INTERAÇÕES HIDROFÓBICAS

Apesar de menos intensas, as interações hidrofóbicas têm muita importância nos estudos proteína-ligante, pois movimentam grandes blocos de átomos, podendo favorecer a ocorrência de outras interações que, de outra forma, estariam impossibilitadas de ocorrer.

Da mesma forma como foi feito com as ligações de hidrogênio, foi criada a tabela 3.8 para facilitar a comparação entre os átomos de carbono correspondentes dos diversos inibidores.

Na tabela foram incluídos apenas os átomos de carbono que participaram de interações hidrofóbicas em pelo menos 50 % dos frames de simulação. Foram consideradas interações hidrofóbicas aquelas que ocorriam entre carbonos separados por no máximo 3,9 Å, conforme critério usual estabelecido por Moreland et al. (MORELAND, 2005).



**Tabela 3.8 - Correspondência entre átomos dos inibidores**

Numeração Criada	Correspondência de Átomos entre os Inibidores				
	PIR	INIBIDOR 1	INIBIDOR 2	INIBIDOR 3	INIBIDOR 4
Átomo 1	C3	CA4	CAJ	C6	C6
Átomo 2	C4	CA5	CAK	C5	C5
Átomo 3	C4'	CAR	CAA	CAM	CAN
Átomo 4	C2'	CAQ	CAC	CAO	CAP
Átomo 5	C3'	CAP	CAB	CAN	CAO
Átomo 6	C5'	CAG	CAF	CAP	CAQ
Átomo 7	C1	CAF	CAM	CAE	CAE
Átomo 8	-	CA2	-	C2	C2
Átomo 9	-	CA6	CAO	C4	C4
Átomo 10	C1'	CAS	CAD	CAK	CAL

**Tabela 3.9 - Interações Hidrofóbicas presentes em pelo menos 50 % do tempo de simulação**

Atm da Proteína	Átomo do Inibidor					Total de Interações
	PIR	INIBIDOR 1	INIBIDOR 2	INIBIDOR 3	INIBIDOR 4	
ASP14:CG	-	Atm 4: 62% Atm 5: 51%	-	-	-	<b>2</b>
ALA78:CB	Atm 2: 70%	-	-	-	-	<b>1</b>
MET152:CG	-	-	Atm 9: 61%	-	-	<b>1</b>
MET152:CE	-	-	Atm 2: 51%	-	-	<b>1</b>
ASN160:CG	-	Atm 8: 69%	-	-	-	<b>1</b>
GLU166:CD	-	-	Atm 7: 52%	-	-	<b>1</b>
PHE167:CD1	Atm 1: 82%	-	-	-	Atm 7: 56%	<b>2</b>
PHE167:CD2	-	-	-	Atm 1: 56%	-	<b>1</b>
PHE167:CB	Atm 1: 58%	-	-	Atm 7: 79%	-	<b>2</b>
PHE167:CG	Atm 1: 83% Atm 2: 66%	Atm 6: 87%	-	-	-	<b>3</b>
ASN168:CG	Atm 3: 84%	-	-	-	-	<b>1</b>
HIS241:CE1	-	Atm 7: 75%	-	-	-	<b>1</b>
HIS241:CG	-	-	Atm 10: 70%	-	-	<b>1</b>
HIS241:CD2	-	-	Atm 10: 54%	-	Atm 1: 64%	<b>2</b>
<b>Total de Interações</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>20</b>



Da tabela 3.9, podemos perceber que os inibidores 1 e 2, bem como o PIR, apresentam mais interações hidrofóbicas do que os inibidores 3 e 4, o que está bem de acordo com os resultados experimentais, uma vez que os inibidores 1 e 2 e o PIR apresentam valores de  $K_i$  menores do que os inibidores 3 e 4, conforme mostrado na última coluna da tabela 3.7.

Nesse quesito, a PHE 167 é a grande responsável pelas interações hidrofóbicas, respondendo por 40% de todas. Entretanto, os dois melhores inibidores não interagiram (inibidor 2) com ela ou interagiram pouco (inibidor 1) e, de fato, somente o PIR foi responsável por 50% das interações da PHE 167, provavelmente fruto do anel benzênico apolar que só é encontrado em sua estrutura, pois nos demais inibidores os anéis estão com heteroátomos que tendem a aumentar a polaridade da molécula e diminuir as interações hidrofóbicas.

Outra característica importante desse aminoácido é a possibilidade de fazer ligações do tipo  $\pi$ -stacking, ocorridas entre anéis aromáticos paralelos, que podem ser tão fortes ou mais do que ligações de hidrogênio (GOODMAN, 2009).

### 3.2.6 ANÁLISE DOS GRÁFICOS DE DISTÂNCIA

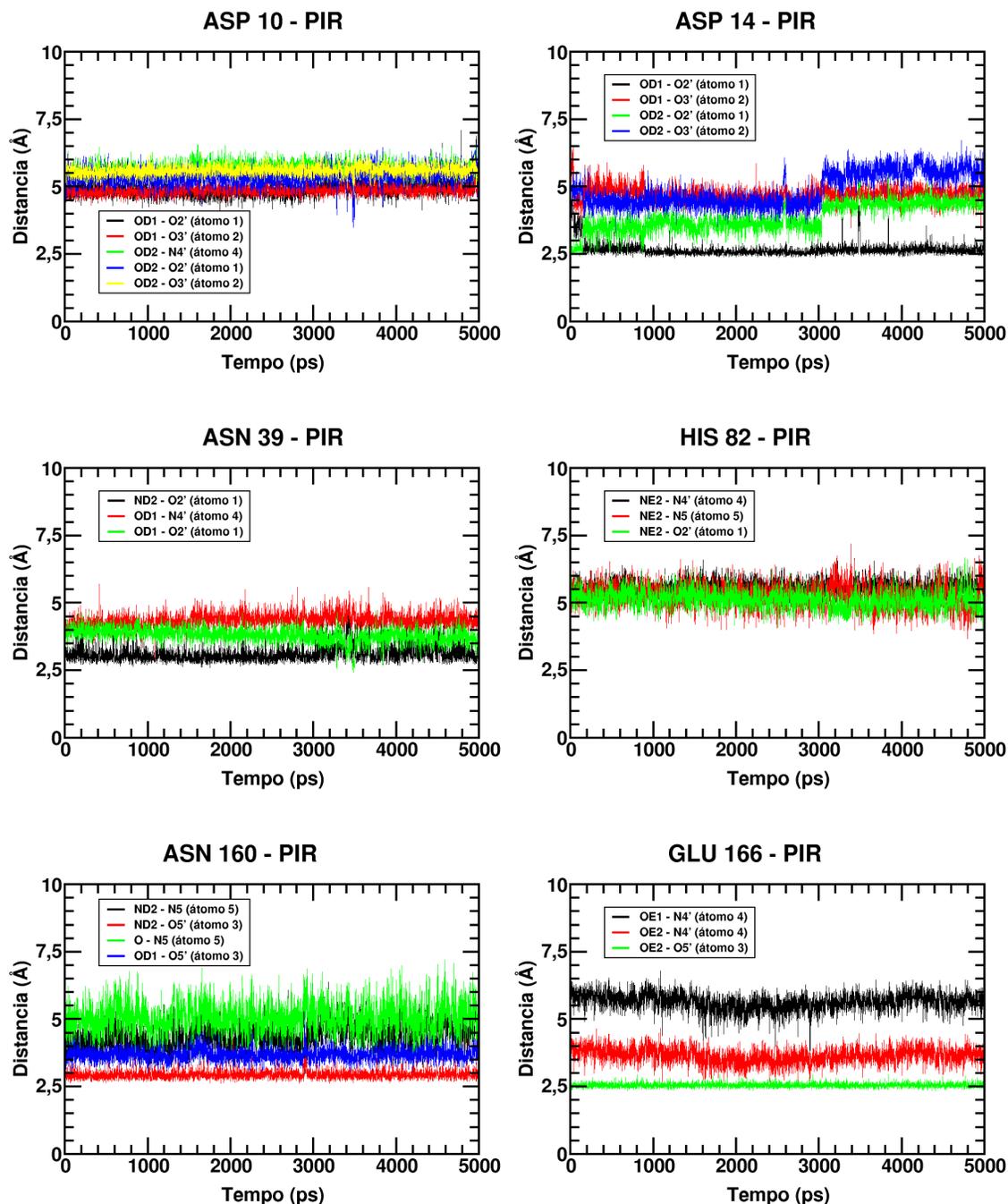
Com o objetivo de levantar mais informações sobre outros átomos da proteína que pudessem ser alcançados por alterações nos inibidores estudados, monitorou-se a distância entre os átomos dos resíduos da Tabela 3.6 com outros átomos dos inibidores que estivessem a uma distância de até 6,5 Å em pelo menos 10% do tempo de simulação. Para melhor visualização dos gráficos, limitou-se às 5 menores distâncias por resíduo, quando necessário.

Os gráficos podem ser visualizados nas FIG. 3.11 a 3.20.



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado



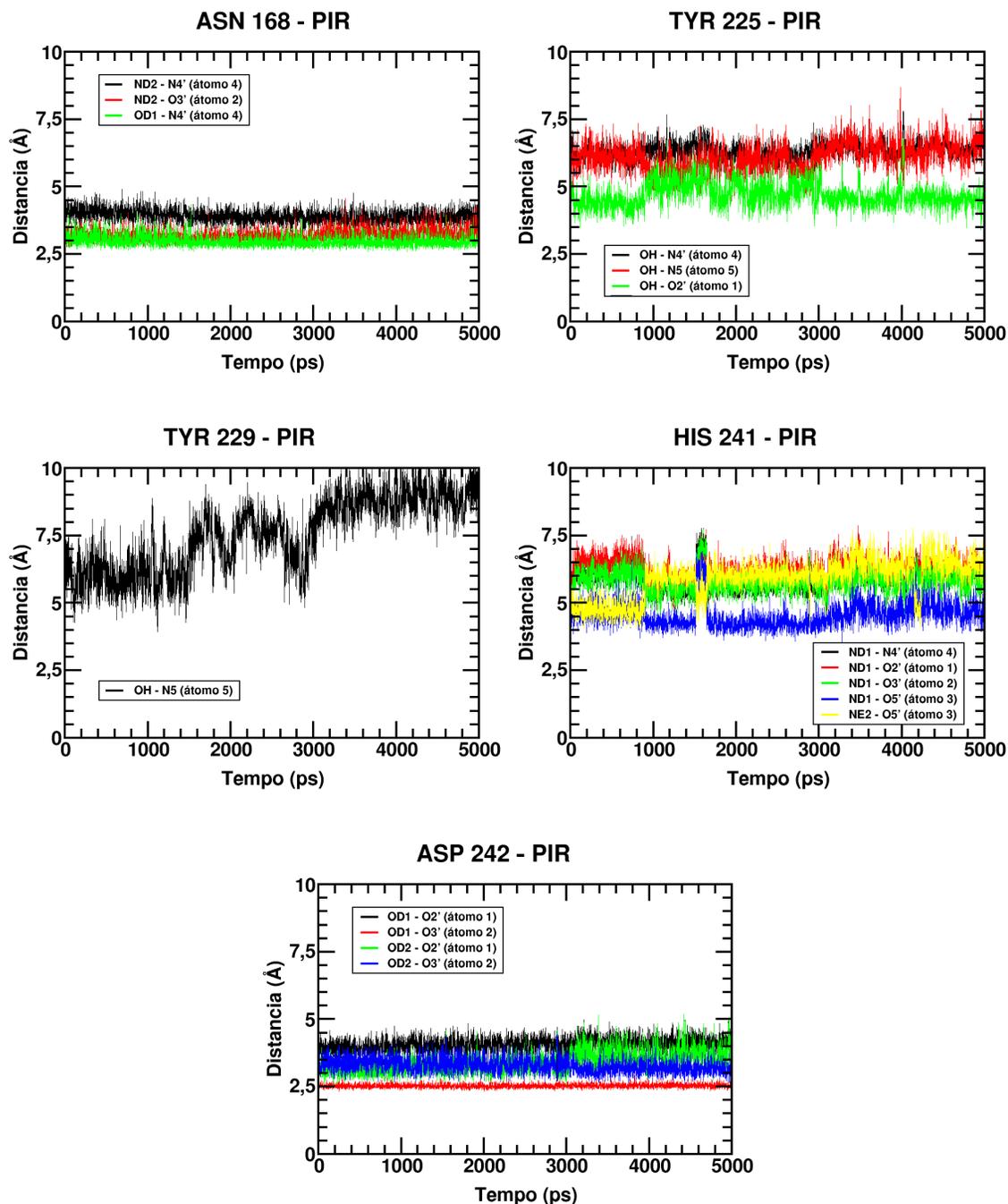
**FIG. 3.11 – Distâncias do PIR aos resíduos do sítio ativo – ASP 10, ASP 14, ASN 39, HIS 82, ASN 160 e GLU 166**



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**



Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado

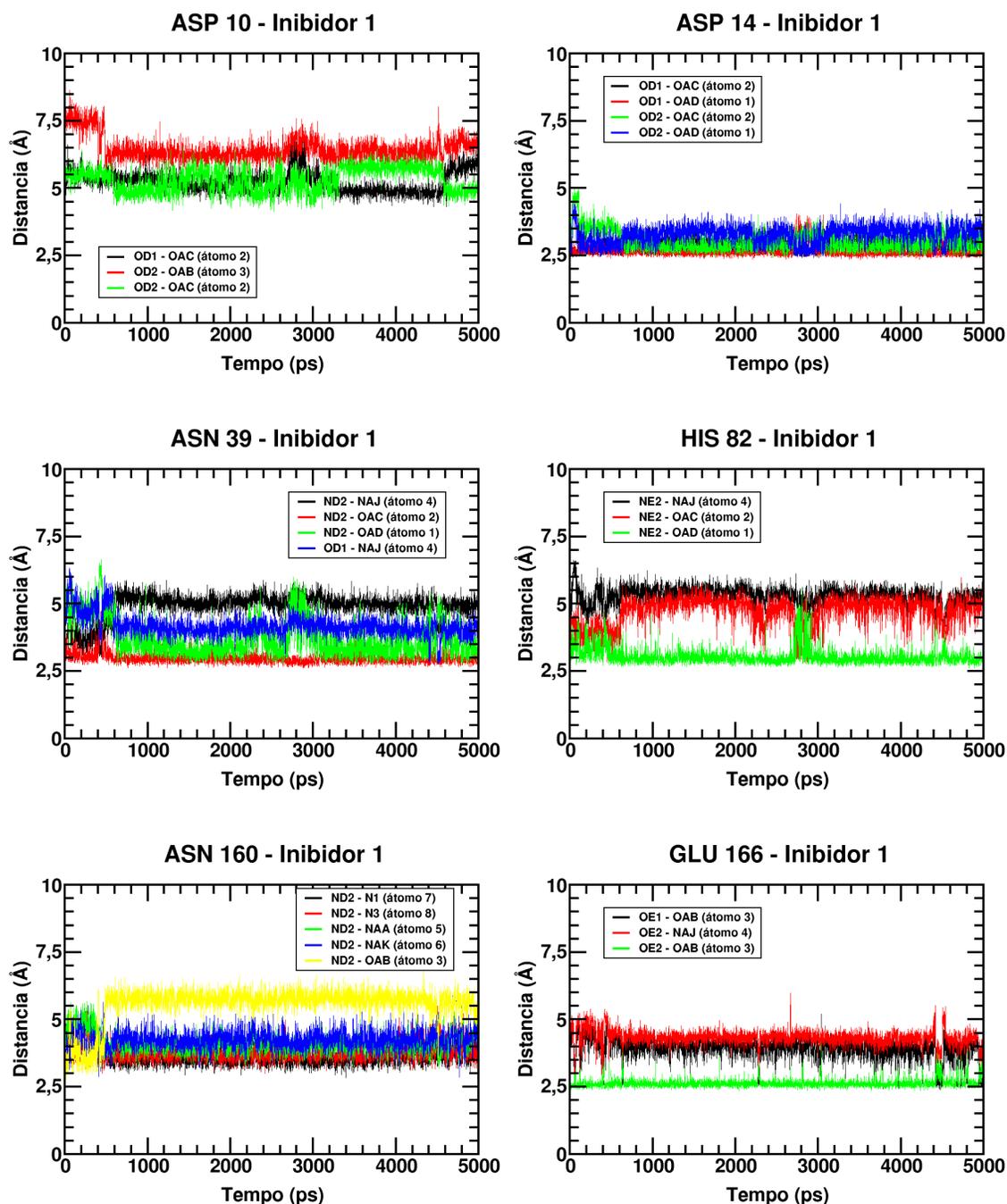


**FIG. 3.12 – Distâncias do PIR aos resíduos do sítio ativo – ASN 168, TYR 225, TYR 229, HIS 241, ASP242**



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado

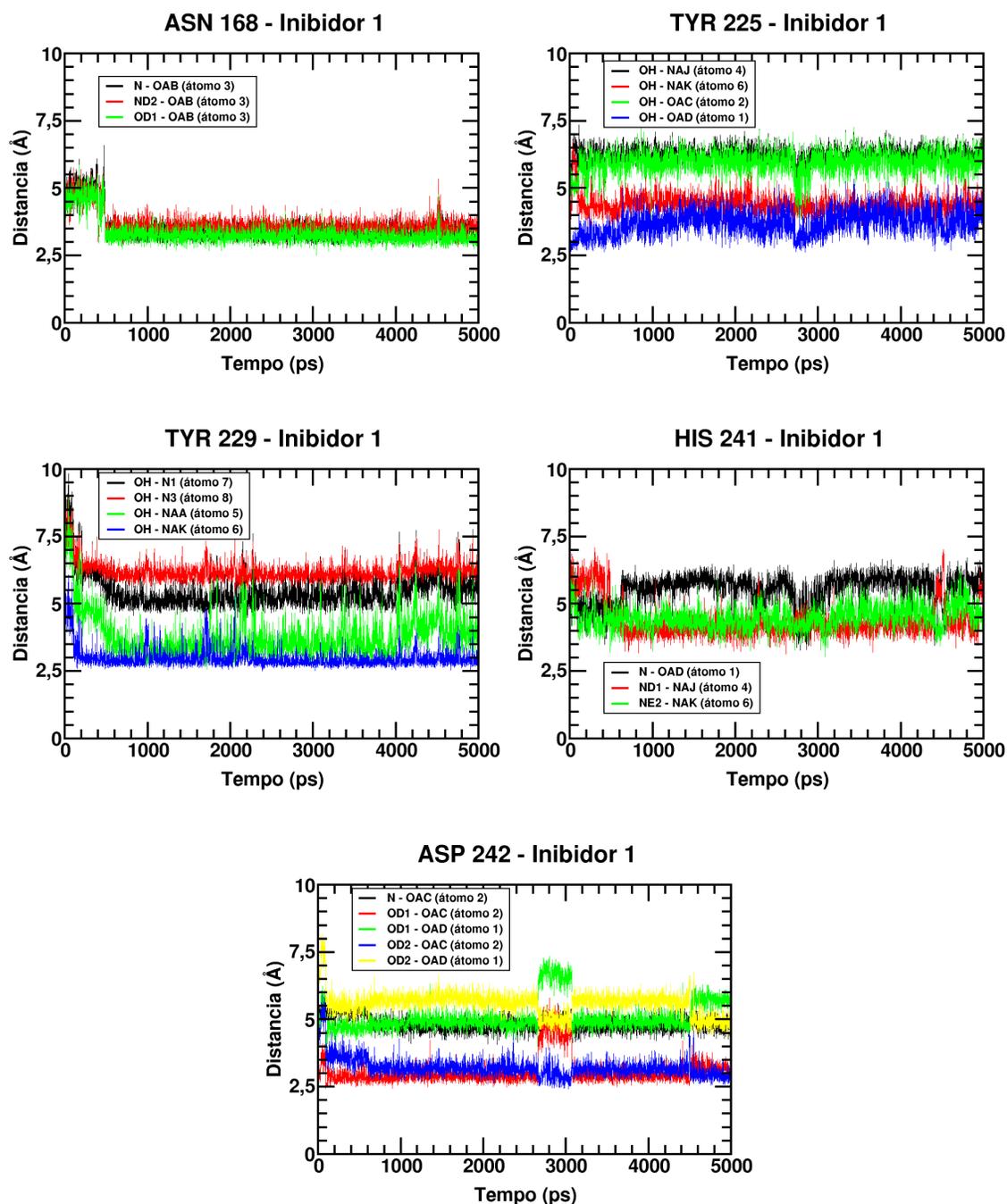


**FIG. 3.13 – Distâncias do Inibidor 1 aos resíduos do sítio ativo – ASP 10, ASP 14, ASN 39, HIS 82, ASN 160 e GLU 166**



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado

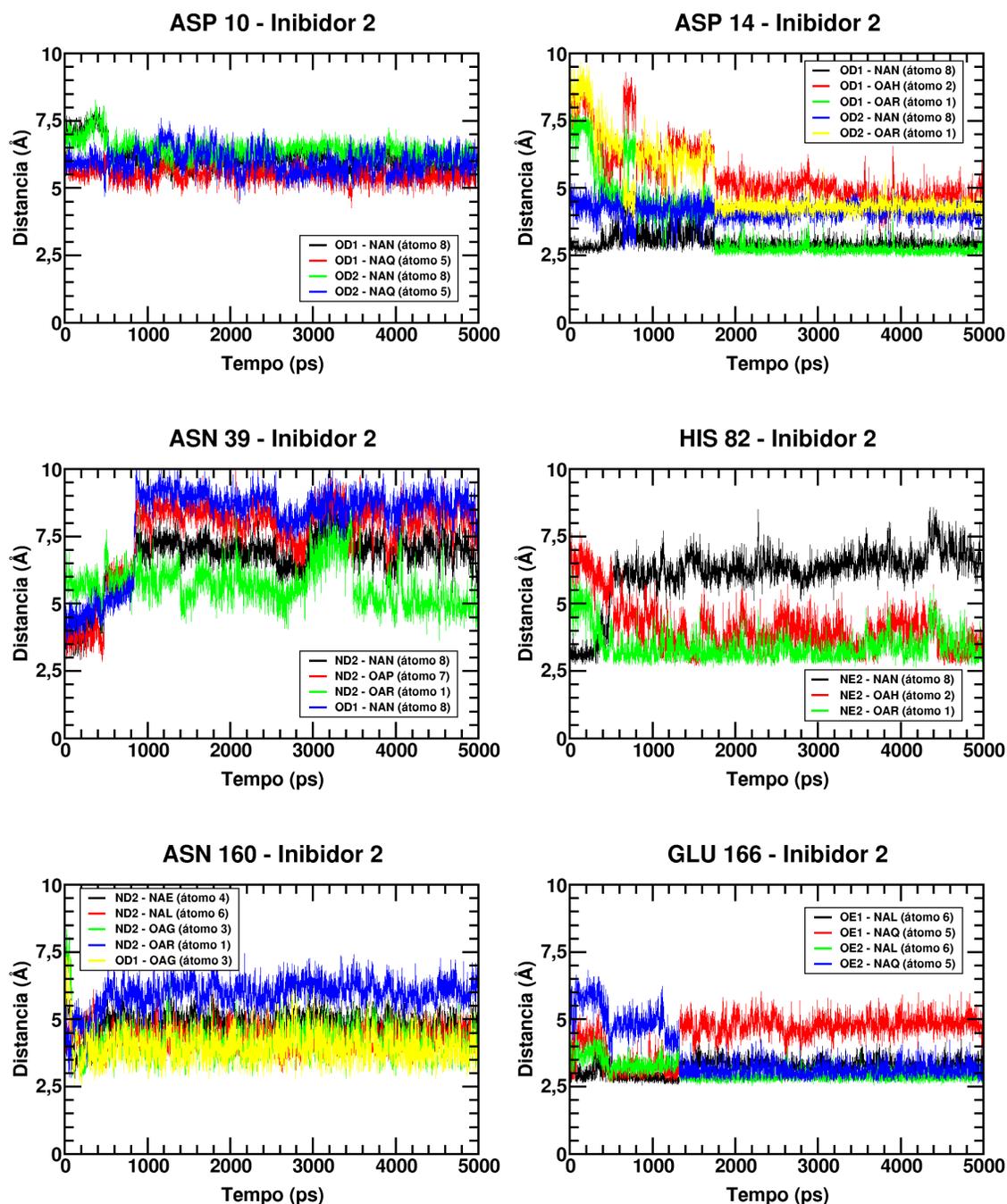


**FIG. 3.14 – Distâncias do Inibidor 1 aos resíduos do sítio ativo – ASN 168, TYR 225, TYR 229, HIS 241, ASP242**



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado

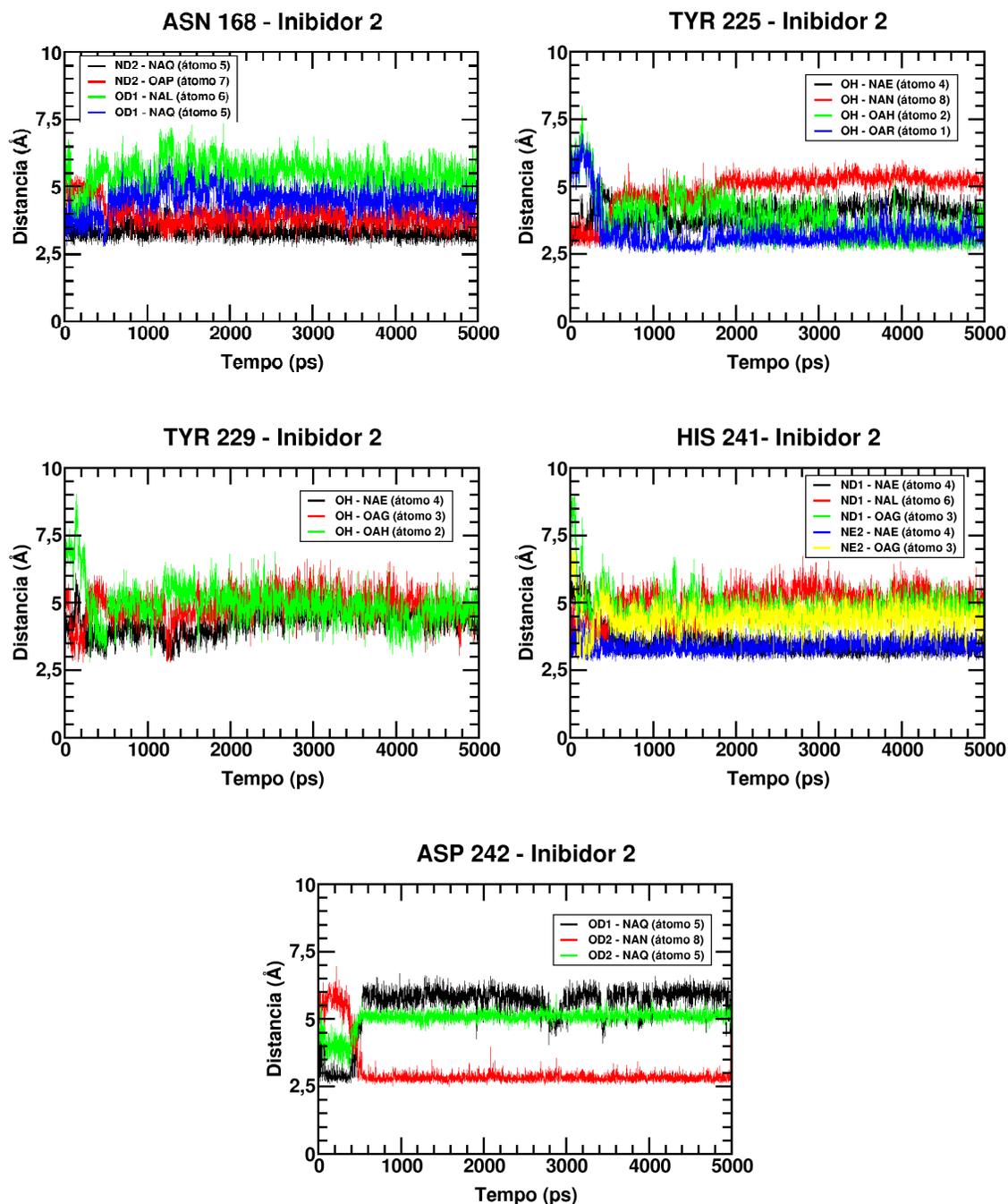


**FIG. 3.15 – Distâncias do Inibidor 2 aos resíduos do sítio ativo – ASP 10, ASP 14, ASN 39, HIS 82, ASN 160 e GLU 166**



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado

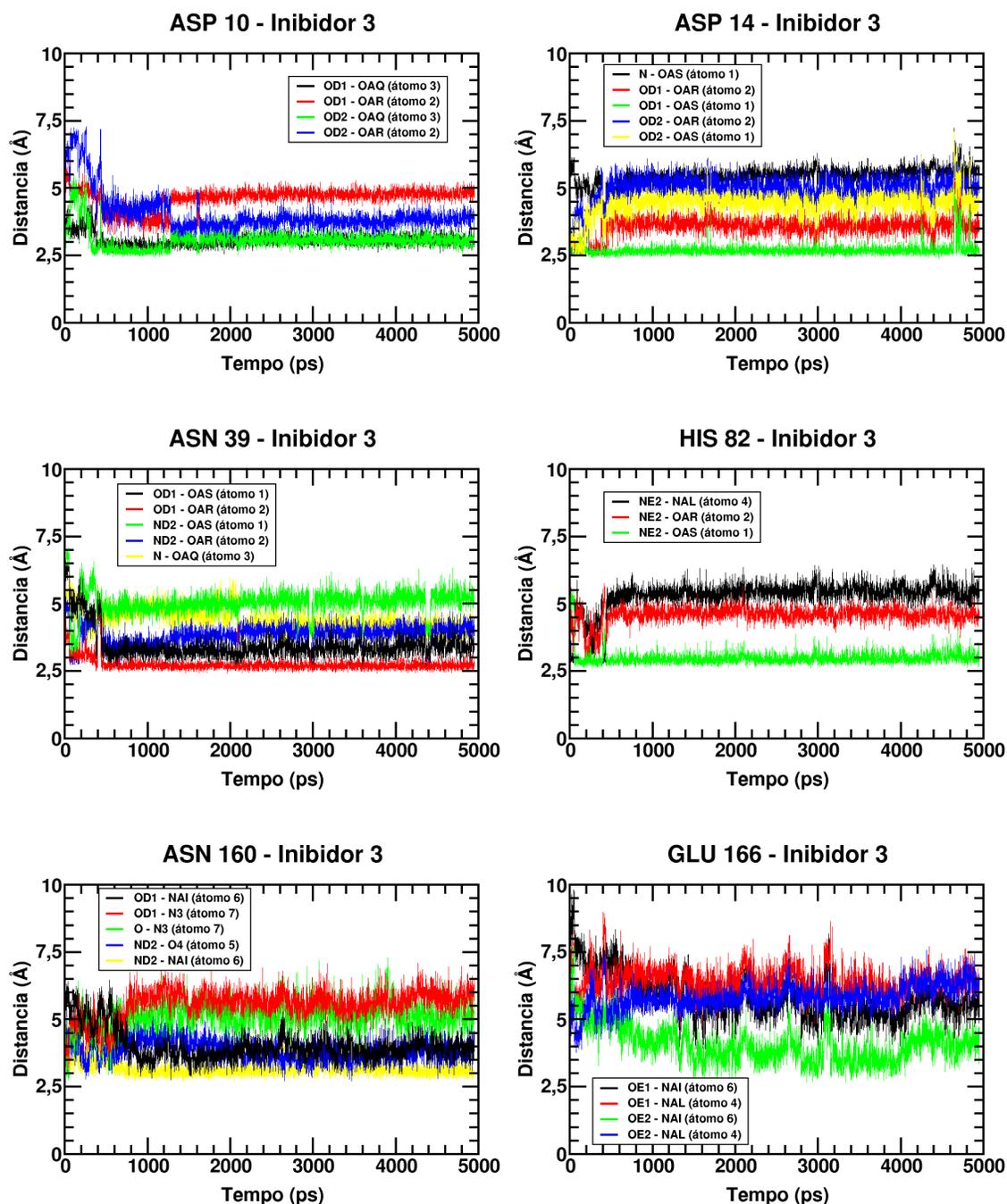


**FIG. 3.16 – Distâncias do Inibidor 2 aos resíduos do sítio ativo – ASN 168, TYR 225, TYR 229, HIS 241, ASP242**



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado



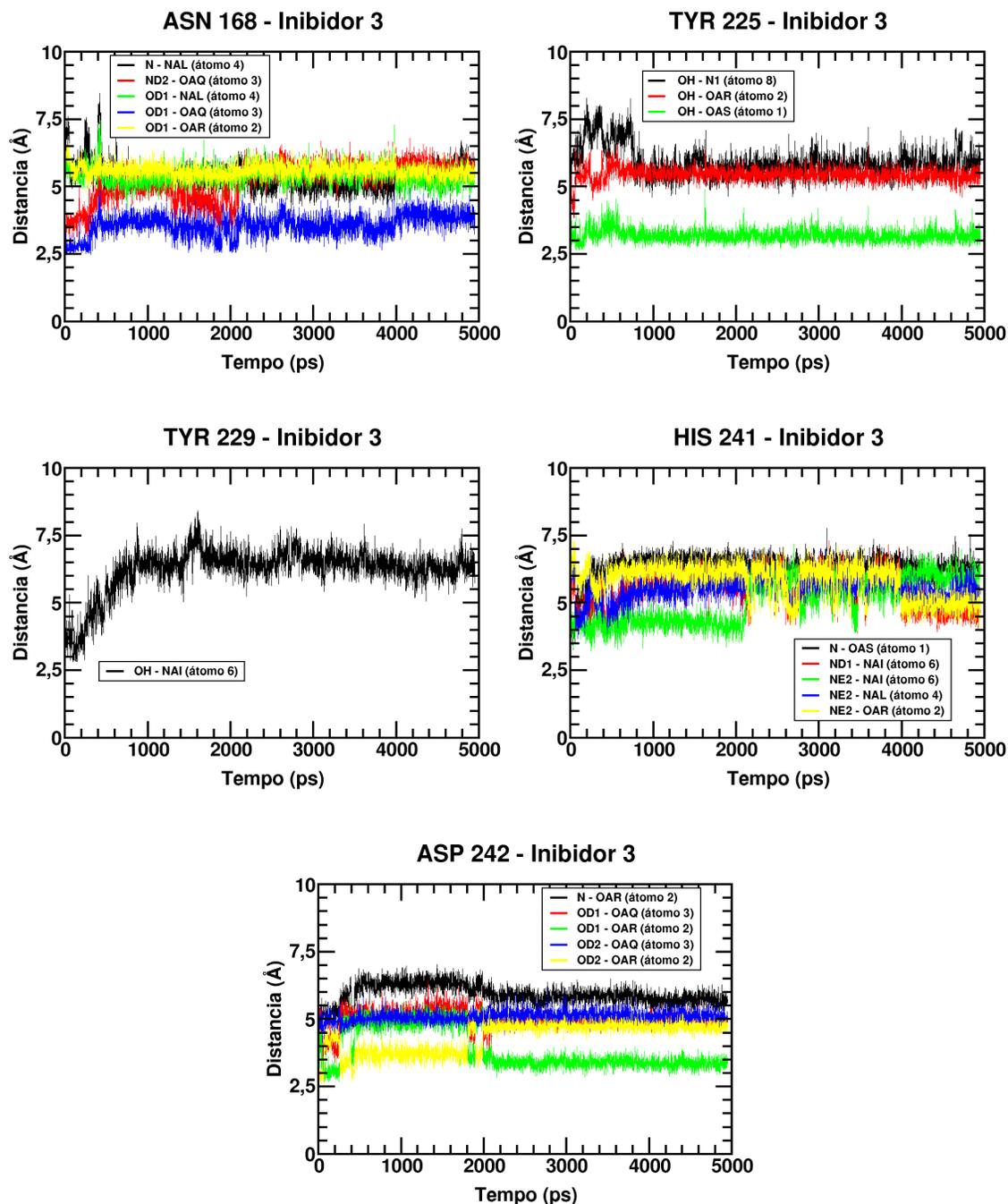
**FIG. 3.17 – Distâncias do Inibidor 3 aos resíduos do sítio ativo – ASP 10, ASP 14, ASN 39, HIS 82, ASN 160 e GLU 166**



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**



Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado

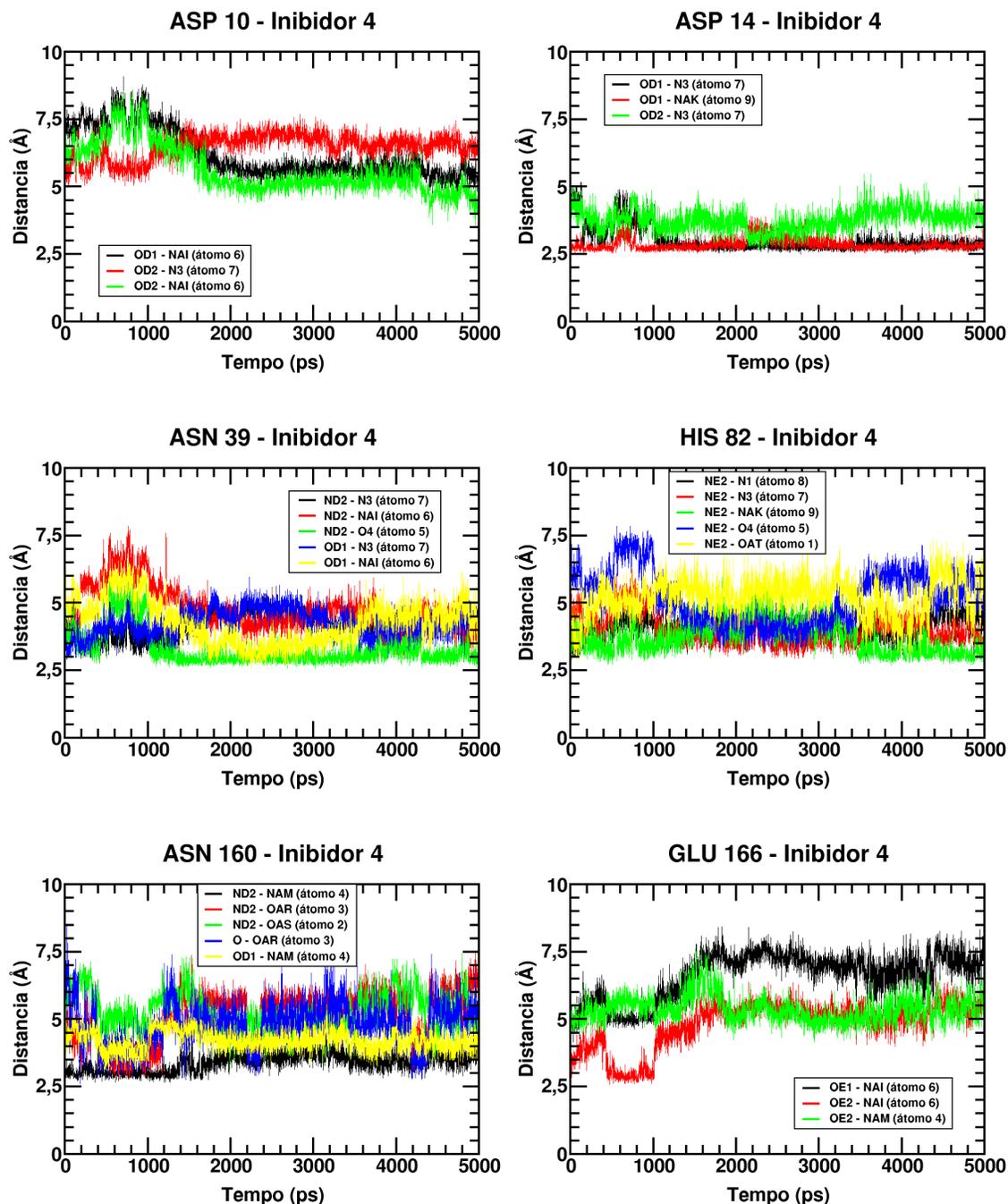


**FIG. 3.18 – Distâncias do Inibidor 3 aos resíduos do sítio ativo – ASN 168, TYR 225, TYR 229, HIS 241, ASP242**



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado



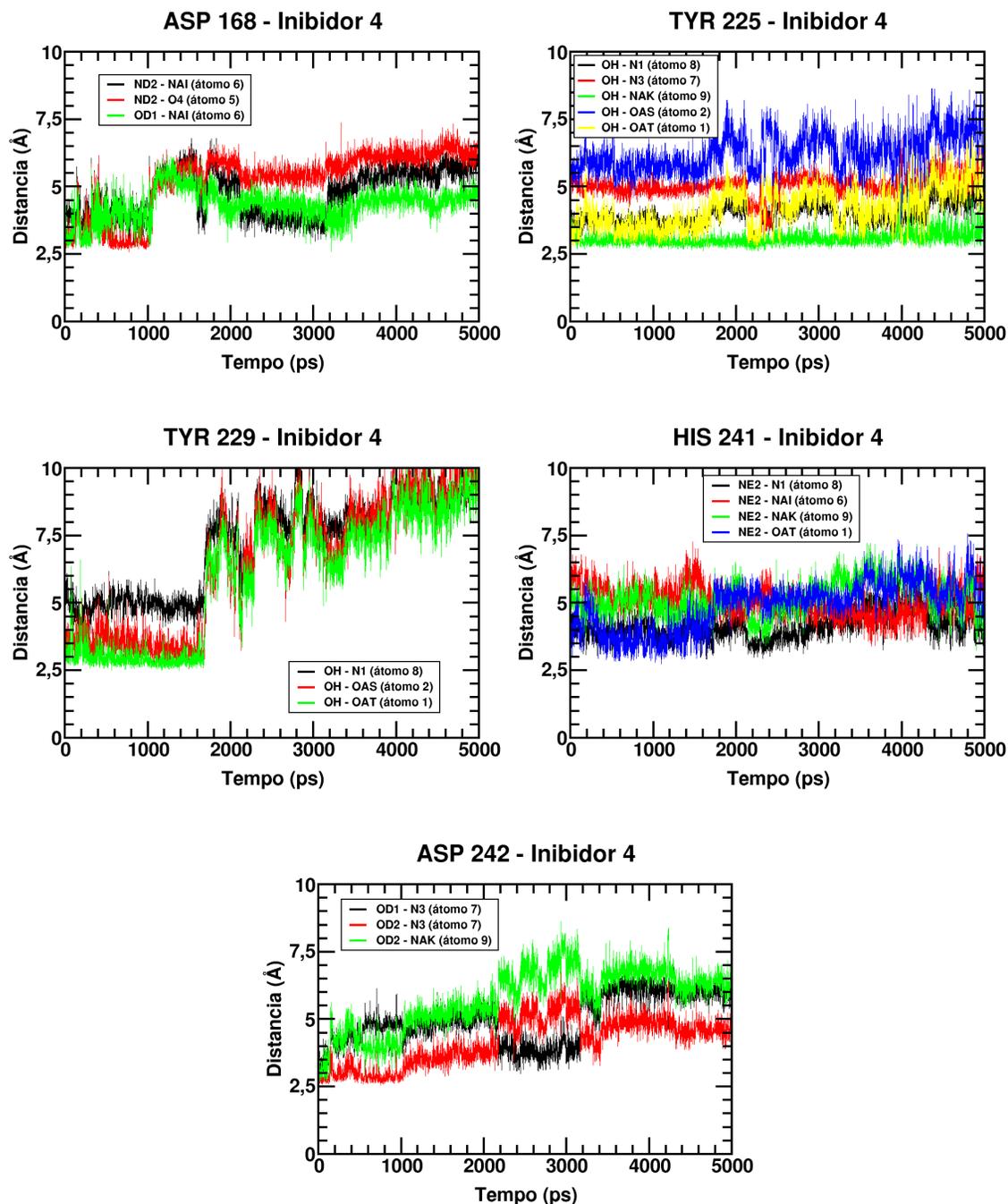
**FIG. 3.19 – Distâncias do Inibidor 4 aos resíduos do sítio ativo – ASP 10, ASP 14, ASN 39, HIS 82, ASN 160 e GLU 166**



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**



Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado



**FIG. 3.20 – Distâncias do Inibidor 4 aos resíduos do sítio ativo – ASN 168, TYR 225, TYR 229, HIS 241, ASP242**



Com base nos gráficos de distância, escolheu-se o melhor par de átomos de cada resíduo e inibidor, elaborando-se a Tabela 3.10:

Os números entre parêntesis indicam o número do átomo de acordo com a numeração criada na Tabela 3.5.

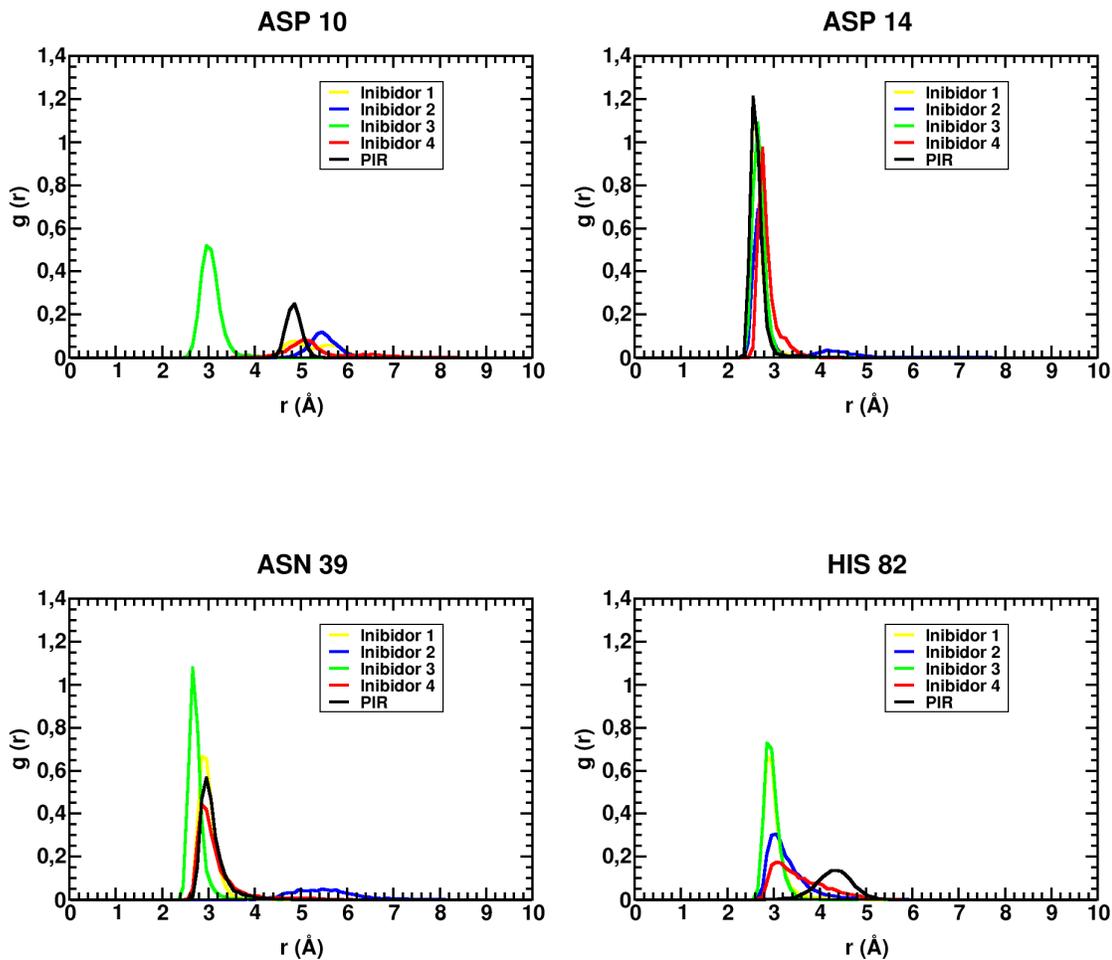
**Tabela 3.10 – Melhores pares de interação entre resíduos e inibidores**

Resíduo aa.	Átomo do Resíduo - Átomo do Inibidor				
	PIR	INIBIDOR 1	INIBIDOR 2	INIBIDOR 3	INIBIDOR 4
ASP10	OD1 - O3' (2)	OD2 - OAC (2)	OD1 - NAQ (5)	OD1 - OAQ (3)	OD2 - NAI (6)
ASP14	OD1 - O2' (1)	OD1 - OAD (1)	OD1 - OAR (1)	OD1 - OAS (1)	OD1 - NAK (9)
ASN39	ND2 - O2' (1)	ND2 - OAC (2)	ND2 - OAR (1)	OD1 - OAR (2)	ND2 - O4 (5)
HIS82	NE2 - O2' (1)	NE2 - OAD (1)	NE2 - OAR (1)	NE2 - OAS (1)	NE2 - NAK (9)
ASN160	ND2 - O5' (3)	ND2 - N1 (7)	OD1 - OAG (3)	ND2 - NAI (6)	ND2 - NAM (4)
GLU166	OE2 - O5' (3)	OE2 - OAB (3)	OE2 - NAL (6)	OE2 - NAI (6)	OE2 - NAI (6)
ASN168	OD1 - N4' (4)	OD1 - OAB (3)	ND2 - NAQ (5)	OD1 - OAQ (3)	OD1 - NAI (6)
TYR225	OH - O2' (1)	OH - OAD (1)	OH - OAR (1)	OH - OAS (1)	OH - NAK (9)
TYR229	OH - N5 (5)	OH - NAK (6)	OH - NAE (4)	OH - NAI (6)	OH - OAT (1)
HIS241	ND1 - O5' (3)	ND1 - NAJ (4)	NE2 - NAE (4)	NE2 - NAI (6)	NE2 - N1 (8)
ASP242	OD1 - O3' (2)	OD1 - OAC (2)	OD2 - NAN (8)	OD1 - OAR (2)	OD2 - N3 (7)

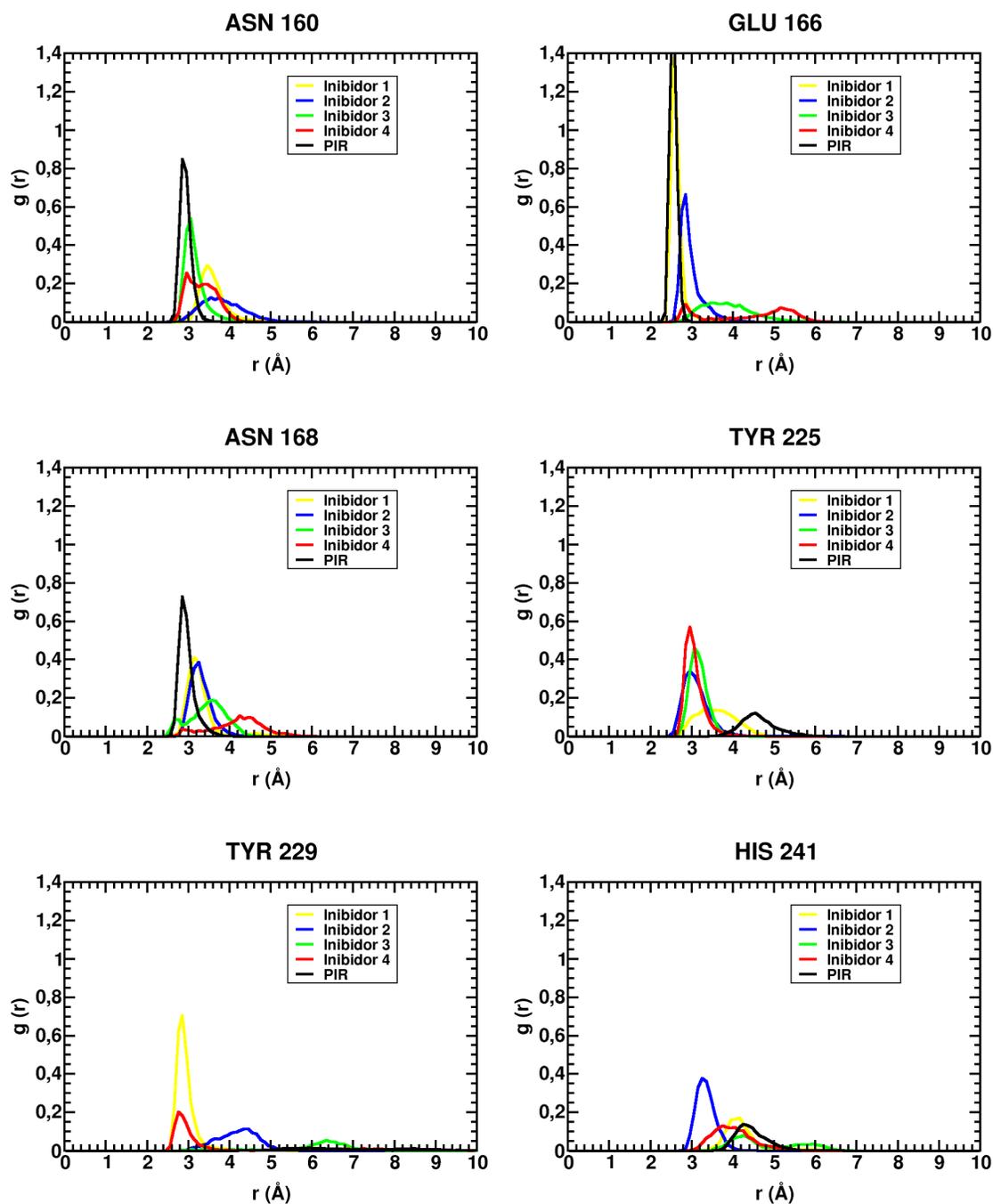


### 3.2.7 ANÁLISE DOS GRÁFICOS DE DISTRIBUIÇÃO RADIAL

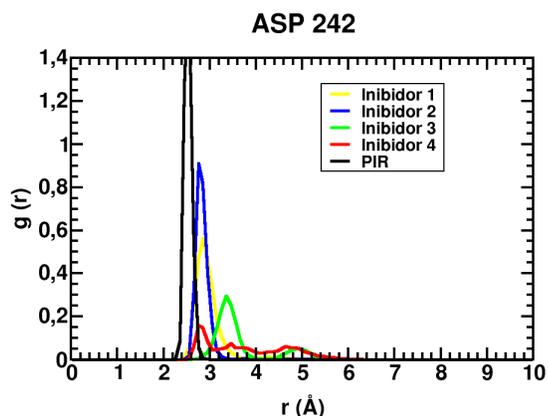
Para efeito de comparação entre os inibidores, foram gerados gráficos de distribuição radial, indicando as probabilidades de distância entre cada par da Tabela 3.10. Esses gráficos são encontrados nas FIG. 3.21 a 3.23



**FIG. 3.21 – Distribuição radial entre os principais átomos dos inibidores e dos resíduos – ASP 10, ASP 14, ASN 39, HIS 82**



**FIG. 3.22 – Distribuição radial entre os principais átomos dos inibidores e dos resíduos – ASN 160, GLU 166, ASN 168, TYR 225, TYR 229, HIS 241**



**FIG. 3.23 – Distribuição radial entre os principais átomos dos inibidores e dos resíduos – ASP 242**

Dos gráficos de distribuição radial apresentados, podemos perceber aproximação maior do inibidor 3 com ASP 10. Entretanto, com o auxílio dos gráficos de distância da FIG 3.13, notamos que isso ocorre às custas de seu afastamento com GLU 166, o que está reforçado na FIG 3.22.

Também podemos destacar pela FIG 3.22 e auxílio da FIG 3.13, que apenas o Inibidor 1 interage com TYR 229 (o Inibidor 4 pode ser descartado com base na FIG 3.20). Isso se deve, principalmente, aos átomos de nitrogênio (átomos 5 e 6), que estão dispostos de maneira exclusiva nessa molécula. O que indica ser esse um caminho possível para a busca de interações com esse resíduo.

Por último, destacamos que, partindo-se do inibidor 2, considerado o melhor inibidor pelos valores de  $K_i$ , poderíamos sugerir, com base no gráfico da FIG 3.21, a exploração de interações com ASN 39. Como ponto de partida, poderia ser buscada uma aproximação do nitrogênio NAN desse inibidor (átomo 8) com o nitrogênio ND2 da ASN 39.



#### **4 CONCLUSÃO**

Durante o presente trabalho foi possível conhecer e aplicar diversos conhecimentos e ferramentas do universo da química teórica e computacional. Além disso, a importante interface com a bioquímica e biologia possibilitou a escolha do alvo no combate à leishmaniose, bem como o levantamento detalhado de todas os alvos (enzimas) envolvidos na terapia antileishmaniose.

Foram realizados diversas simulações de dockagem molecular, chegando-se a simulações que representaram bem os dados experimentais.

Da mesma forma as simulações de Dinâmica Molecular permitiram verificar diversos conhecimentos que podem ser aplicados na elaboração de novos inibidores, entre eles podemos citar:

- O inibidor 2, considerado o melhor pelos resultados experimentais, foi o que proporcionou os menores valores de RMSF, da ordem de 2,5 Å a 4 Å, com média em 3,2 Å;

- A quantidade de ligações de hidrogênio é preponderante nos melhores inibidores analisados e alta correlação se obteve entre essas ligações e o desempenho do inibidor;

- O papel do ASP 14 nas interações não deve ser desprezado, pois esse aminoácido atua com ligações de hidrogênio entre todos os inibidores estudados e fortemente com os dois melhores inibidores; Em seguida GLU 166 e ASN 39 também devem ser considerados para ligações de hidrogênio;

- As interações hidrofóbicas podem atuar no favorecimento das interações com o inibidor e, nesse caso, a PHE 167 é o principal aminoácido a ser considerado, pois com seu anel aromático pode fazer interações  $\pi$ -stacking com outro anel aromático de um inibidor.

- A disposição dos nitrogênios NAA e NAK do inibidor 1, mostrou ser eficiente na busca por interações com o resíduo TYR 229, indicando que essa mesma disposição pode ser buscada em outros inibidores.



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado



- O inibidor 2, considerado o melhor inibidor já testado por Miles et al. (MILES, 1999), pode ser potencializado buscando interações com o resíduo ASN 39, sugestivamente através de aproximação do nitrogênio NAN do inibidor com o nitrogênio ND2 da ASN 39, que está a cerca de 7 Å de distância do mesmo. Uma das formas que isso poderia ser feito seria pela adição de um grupo etil, terminado em nitrogênio ou oxigênio, ao nitrogênio NAN, o que favoreceria a aproximação citada em cerca de 4 Å, diminuindo a distância para 3 Å e, portanto, com potencial para realizar uma ligação de hidrogênio.

De fato, a quantidade de ligações de hidrogênio parece ser a melhor estratégia para a potencialização dos inibidores estudados, dada a alta correlação encontrada com os resultados experimentais. Nesse sentido, surgem diversas possibilidades de modificação desses inibidores, através de adições de grupos que minimizem as distâncias de interesse, como a citada no parágrafo anterior. Um estudo pormenorizado da viabilidade de síntese desses novos compostos hipotéticos poderia conduzir às possibilidades mais promissoras, mantendo um compromisso entre a viabilidade de síntese e o aumento do número de ligações de hidrogênio.

Dessa forma, espera-se ter contribuído no estudo e compreensão das formas de interação entre as Nucleosídeo Hidrolases e seus potenciais inibidores, o que certamente pode nortear a elaboração de novos fármacos com atividades antileishmaniais potencializadas.



## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLINGER, N. L.; **Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms.** *J. Am. Chem. Soc.*, 99 (25), pp 8127–8134, 1977.

AMBER 12, Case, D.A.; Darden, T.A.; Cheatham, T.E.; Simmerling, C.L.; Wang, J.; Duke, R.E.; Luo, R.; Walker, R.C.; Zhang, W.; Merz, K.M.; Roberts, B.; Hayik, S.; Roitberg, A.; Seabra, G.; Swails, J.; Goetz, A.W.; Kolossvai, I.; Wong, K.F.; Paesani, F.; Vanicek, J.; Wolf, R.M.; Liu, J.; Wu X.; Brozell, S.R.; Steinbrecher, T.; Gohlke, H.; Cai, Q.; Ye, X.; Wang, J.; Hsieh, M. J.; Cui, G.; Roe, D.R.; Mathews, D.H.; Seetin, M.G.; Salomon-Ferrer R.; Sagui, C.; Babin, V.; Luchko, T.; Gusarov, S.; Kovalenko, A.; Kollman, P.A. University of California, San Francisco, 2012.

BERMAN, J. D. **Human Leishmaniasis: Clinical, Diagnostic and Chemotherapeutic Developments in the last 10 years.** *Clin Infect Dis*, 24:684-703, 1997.

BERENDSEN, H.J.C.; Grigera, J.R.; Straatsma, T.P. **The missing term in effective pair potentials.** *J. Phys. Chem.*, 1987, 91, 6269–6271.

BERNSTEIN, F.C; Koetzle, T.F.; Williams, G.J.; Meyer Jr. E.E.; Brice M.D.; Rodgers, J.R.; Kennard O.; Shimanouchi, T.; Tasumi, M. **The Protein Data Bank: A Computer-based Archival File For Macromolecular Structures.** *J. of Mol. Biol.*, 112 (1977): 535.

BOULET, P.; GARRISON, C.; HOEN, E. **Patentes de medicamentos em evidência – Compartilhando experiência prática sobre patentes de produtos farmacêuticos – Médicos Sem Fronteiras - maio 2003.**

BOUTELLIER, M., Horenstein, B. A., Semenyaka, A., Schramm, V. L., Ganem, B., (1994). **Amidrazone Analogues of D-Ribofuranose as Transition State Inhibitors of Nucleoside Hydrolase.** *Biochemistry*, vol. 33, No. 13, 3994-4000.

BRAZUNA, Júlia Cristina Maksoud et al. **Profile and geographic distribution of reported cases of visceral leishmaniasis in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul, Brazil, from 2002 to 2009.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, v. 45, n. 5, Oct. 2012.



BRITO, Maria Edileuza Felinto de et al. **Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, v. 45, n. 4, Aug. 2012.

CAMACHO, A.; Arrebola, R.; Pena-Diaz, J.; Ruiz-Perez, L.M.; Gonzalez-Pacanowska, D., (1997). **Description of a novel eukaryotic deoxyuridine-triphosphate nucleotidohydrolase in *Leishmania major*.** *Biochem. J.* 325: 441–447.

CAMACHO, A.; Hidalgo-Zarco, F.; Bernier-Villamor, V.; Ruiz-Perez, L.M.; Gonzalez-Pacanowska, D. (2000). **Properties of *Leishmania major* dUTP nucleotidohydrolase, a distinct nucleotide-hydrolyzing enzyme in kine-toplastids.** *Biochem. J.* 346: 163–168.

CORNELL, W. D.; CIEPLAK, P.; BAYLY, C. I.; GOULD, I. R.; MERZ, K. M.; FERGUSON, D. M.; SPELLMEYER, D. C.; FOX, T.; CALDWELL, J. W.; KOLLMAN, P. A. **A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins and Nucleic Acids.** *Journal of the American Chemical Society.* 117: 5179-5197, 1995.

CUI, L.; Rajasekariah, G. R.; Martin, S. K. (2001). **A Nonspecific Nucleoside Hydrolase from *Leishmania donovani*: implications for purine salvage by the parasite.** *Gene* 280:153-162.

ESTUPIÑÁN, B.; SCHRAMM, V. L. **Guanosine-Inosine-preferring nucleoside N-glycohydrolase from *Crithidia fasciculata*.** *J Biol Chem.* 269:23068-23073, 1994

FABIOLA, F., R. Bertram, A. Korostelev, and M.S. Chapman, **An Improved Hydrogen Bond Potential: Impact on Medium Resolution Protein Structures.** *Protein Sci.*, 2002. 11: p. 1415-1423.

FIGUEROA-Villar, J. D.; Rocha, Maria R. M.; França, T. C. C.; Reboredo, B. M.; Rennó, M. N.; Tinoco, L. W. **The 3D Structure of *Leishmania donovani* Nucleoside Hydrolase. A potential target for chemotherapy.** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 19, p. 64-73, 2008.



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**



Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado

FIGUEROA-Villar, J. D.; Rennó, M. N.; França, T. C. C.; Nico, D.; Sousa, C. B. P.; Tinoco, L. W. **Kinetics and docking studies of two potential new inhibitors of the nucleoside hydrolase from *Leishmania donovani***. *European Journal of Medicinal Chemistry* v. 56, p. 301-307, 2012.

GAUSSIAN 09, Revision A.1, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, Jr., J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. **Gaussian, Inc.**, Wallingford CT, 2009.

GENARO, O. **Leishmaniose visceral americana**. In: **Neves, D. P. (10ª ed) Parasitologia humana**. São Paulo, Editora Atheneu. Cap 10, p.56-72 (2000).

GOODMAN, J. M.; Paton, R. S. **Hydrogen Bonding and  $\pi$ -Stacking: How Reliable are Force Fields? A Critical Evaluation of Force Field Descriptions of Nonbonded Interactions**. *Journal of Chemical Information*, 2009, v. 49, p.944-955

GOOZNER, M. **The \$800 Million Pill: The Truth Behind the Cost of New Drugs**. Berkeley, CA: University of California Press, 2004.

GOPAUL, D. N.; Meyer, S. L.; Degano, M.; Sacchettini, J. C.; Schramm, V. L. (1996). **Inosine-uridine nucleoside hydrolase from *Crithidia fasciculata*. Genetic characterization, crystallization, and identification of histidine 241 as a catalytic site residue**. *Biochemistry* 35: 5963–5970.

GRACE. Version 2. Disponível em: <[http:// plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/](http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/)>. Acesso em: 25 ago. 2012



HASSINEN, T.; Peräkylä, M. **New energy terms for reduced protein models implemented in an off-lattice force field.** *Journal of Computational Chemistry* 2001, 22, 1229-1242

HAMMOND, D. J.; GUTTERIDGE, W. E. Purine and pyrimidine metabolism in the Trypanosomatidae. *Mol Biochem Parasitol.* 13:243-261, 1984.

HANDMAN, E. Cell Biology of Leishmania. *Advances in Parasitology* 44: 1-39 (2000).

HEHEMANN, J.-H., Marsters, C. and Boraston, A. B. **Ab initio phasing of a nucleoside hydrolase-related hypothetical protein from Saccharophagus degradans that is associated with carbohydrate metabolism.** *Proteins*, v. 79, p. 2992–2998, 2011.

HIGGINS, D., TAYLOR, W. *Bioinformatics Sequence, structure and databanks*, Oxford University Press, 2001.

JARDIM, A.; Bergeson, S. E.; Shih, S.; Carter, N.; Lucas, R. W.; Merlin, G.; Myler, P. J.; Stuart, K.; Ullman, B. **Xanthine Phosphoribosyltransferase from *Leishmania donovani*. Molecular Cloning, Biochemical characterization, and genetic analysis.** *J. Biol. Chem.* 1999 274: 34403-34410.

JORGENSEN, W. L.; Tirado-Rives, J. **The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin.** *Journal of the American Chemical Society* v. 110 (6): 1657-1666, 1988

KITCHEN, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J. **Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications.** *Nature Reviews Drug Discovery* 2004, 3, (11), 935-949.

KOSZALKA, G.W.; Krenitsky, T. A. (1979). **Nucleosidases from *Leishmania donovani*. Pyrimidine ribonucleosidase, purine ribonucleosidase, and a novel purine 20 - deoxyribonucleosidase.** *J. Biol. Chem.* 254: 8185–8193.



KURTZ, J-E.; EXINGER, F.; ERBS, P.; JUND, R. The URH1 uridine ribohydrolase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet.* 41:132-141, 2002.

LAFON, S.W., Nelson, D.J., Berens, R.L., Marr, J.J., 1982. **Purine and pyrimidine salvage pathways in *Leishmania donovani***. *Biochem. Pharmacol.* 31, 231–238.

LAGUNA, F.; ADRADOS, M.; ALVAR, J. **Visceral leishmaniasis in patients infected with the human immunodeficiency virus**. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16 (12), 898-903

LASKOWSKI R A, Swindells M B (2011). **LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery**. *J. Chem. Inf. Model.*, 51, 2778-2786

LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. Ed. Lippincott Williams & Wilkins. 5ª ed., 2002.

LIGHT, Donald W; WARBURTON, Rebecca. **Demythologizing the high costs of pharmaceutical research**. *BioSocieties* 6, 34-50. Mar. 2011.

LIMA, Edson Borges de et al. **Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana**. *An. Bras. Dermatol.*, Rio de Janeiro, v. 82, n. 2, Apr. 2007.

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SOUZA, W. J.; AMENDOEIRA, M. R. **Leishmaniose Visceral (Calazar)** *Jornal Brasileiro de Medicina.* 41 (5): 61-84, 1981.

MAZZELLA, L. J.; PARKIN, D.W.; TYLER, P. C.; FURNEAUX, R. H. AND SCHRAMM, V.L. **Mechanistic Diagnoses of N-Ribohydrolases and Purine Nucleoside Phosphorylase** *J. Am Chem Soc.* 118, 2111- 2112, 1996.

MEHRABANI, D.; Motazedian, M. H; Asgari, Q.; Hatam, G. R.; Owji S. M.; Oryan, A. **Leishmania major in Tatera indica in Estahban, Southern Iran: Microscopy, culture, isoenzyme and PCR**. *Pak J Med Sci* v. 27 (4), p. 734-738, 2011.



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**



Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado

MORELAND, J. L.; Apostol Gramada, Oleksandr V. Buzko, Qing Zhang, Philip E. Bourne. **The Molecular Biology Toolkit (MBT): a modular platform for developing molecular visualization applications.** *BMC Bioinformatics* 6: 21 (2005).

MILES, R.W.; Tyler P. C.; Evans G. B.; Furneaux R. H.; Parkin D. W.; Schramm V. L. **Iminoribitol Transition State Analogue Inhibitors of Protozoan Nucleoside Hydrolases.** *Biochemistry*, Sep. 11, 1999, vol. 38, No. 40, 13147-13154.

MORGON, N. H.; Coutinho, K. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular.** 1a ed.; Livraria da Física: São Paulo, 2007

MURZIN, A. G.; BRENNER, S. E.; HUBBARD, T.; CHOTIA, C.: SCOP. **A structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures.** *J. Mol. Biol.* 247: 536-540, 1995.

NEVINS, N.; Lii, J. H.; Allinger, N. L. **Molecular mechanics (MM4) calculations on conjugated hydrocarbons.** *Journal of Computational Chemistry* Volume 17, Issue 5-6, pages 695–729, April 1996.

O'BOYLE, N. M.; Banck, M.; James, C. A.; Morley C.; Vandermeersch, M.; Hutchison, G. R. **Open Babel: An open chemical toolbox.** *J. Cheminf.* (2011), 3, 33

OGAWA, J.; TAKEDA, S.; XIE, S-X.; HATANAKA, H.; ASHIKARI, T.; AMACHI, T.; SHIMIZU, S. **Purification, characterisation, and gene cloning of purine nucleoside from Ochrobactrum anthropi.** *Appl. Environ Microbiol.* 67:1783-1787, 2001.

ONEGA, M.; Domarkas, J.; Deng, H.; Schweiger, L. F.; Smith, T. A. D.; Welch, A. E.; Plisson, C.; Gee, A. D.; Hagan, D. **An enzymatic route to 5-deoxy-5-[<sup>18</sup>F]fluoro-d-ribose a [<sup>18</sup>F]-fluorinated sugar for PET imaging.** *Chem. Commun.*, v. 46, p. 139-141, 2010

ORENGO, C. A.; MICHIE, A. D.; JONES, S.; JONES, D.T.; SWINDELLS, M. B.; THORNTON, J. M. CATH. **A hierarchi classification of protein domain structures.** *Structure.* 5:1093-1108, 1997.



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**



Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado

PARKIN, D. W., Limberg, G., Tyler P. C., Furneaux, R. H., Chen, X. Y., Schramm V. L. **Isozyme-Specific Transition State Inhibitors for the Trypanosomal Nucleoside Hydrolases.** *Biochemistry*, 1997, vol. 36, No. 12, 3528-3534.

PEARSON, R. D. AND SOUZA, A. Q. **Clinical spectrum of leishmaniasis.** *Clinical Infectious diseases* 22:1-11 (1996).

PELLE, R.; Schramm, V. L.; Parkin, D. W. (1998). **Molecular cloning and expression of a purine-specific N-ribohydrolase from *Trypanosoma brucei brucei*. Sequence, expression, and molecular analysis.** *J. Biol. Chem.* 273: 2118–2126.

PETERSEN, C.; MOLLER, L. B.: **The RihA, RihB, and RihC ribonucleoside hydrolases of *Escherichia coli*. Substrate specificity, gene expression, and regulation.** *J. Biol. Chem.* 276: 884-894, 2001.

RIBEIRO, J. M.; VALENZUELA, J. G. **The salivary purine nucleosidase of the mosquito, *Aedes aegypti*.** *Insect Biochem Mol Biol.* 33:13-22, 2003.

ROSATELLI, J. B.; SOUZA, C. S.; SOARES, F. A. **Generalized cutaneous leishmaniasis in acquired immunodeficiency syndrome.** *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 10 (3), 229-232, 1998.

SANNER, Michel F. Python. **A Programming Language for Software Integration and Development.** *J. Mol. Graphics Mod.*, 1999, Vol 17, February. p 57-61.

SANTANA, D. M.; Borja-Cabrera, G. P.; de Souza, E. P.; Sturm, N. R.; Palatnik, C. B.; Campbell, D. A. (2002). **Nucleoside hydrolase from *Leishmania (L.) donovani* is an antigen diagnostic for visceral leishmaniasis.** *Mol. & Biochem. Parasitol.* 120 (2): 315-319.

SCHRAMM, V. L. **Enzymatic N-riboside scission in RNA and RNA precursors.** *Curr Opin Chem Biol.* 1, 323-331, 1997.

SCHÜTTELKOPF A. W.; Aalten, D. M. F (2004). **PRODRG - a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes.** *Acta Crystallogr.* D60, 1355–1363.



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado



SCIFINDER, web version. **Chemical Abstracts Service**. Columbus, OH. Disponível em <<https://scifinder.cas.org/>>. Acesso em: 15 jun. 2010.

SHI, W.; Schramm, V. L.; Almo, S. C. (1999). **Nucleoside hydrolase from *Leishmania major*. Cloning, expression, catalytic properties, transition state inhibitors, and the 2.5Å crystal structure.** *J. Biol. Chem.* 274, 21114–21120.

SILVA, Rubens Antonio da et al. **Magnitude e tendência da Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de São Paulo, Brasil, 1975 a 2008.** *Rev. bras. epidemiol.*, São Paulo, v. 15, n. 3, Sept. 2012.

VAN DER SPOEL, D.; VAN BUUREN, A. R.; APOL, E.; MEULENHOF, P. J.; TIELEMAN, D. P.; SIJBERS, A.L.T.M.; HESS, B.; FEENSTRA, K. A.; LINDAHL, E.; VAN DRUNEN, R.; BERENDSEN, H. J.C. **GROMACS User manual version 3.1.4**, Department of Biophysical Chemistry, University of Groningen, The Netherlands, 2002.

VASILIEF, Ion. **Qtplot**. Version 0.9.8. Disponível em: <<http://soft.proindependent.com/download.html>>. Acesso em: 25 ago. 2012

VERSÉES, W.; STEYAERT, J. **Catalysis by nucleoside hydrolases.** *Current Opinion in Structure Biology.* 13:731-738, 2003.

WEINER, S. J.; Kollman, P. A.; Case, D. A.; Singh, U.C.; Ghio, C.; Alagona, G.; Profeta Jr, S.; Weiner, P. **A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins.** *J. Am. Chem. Soc.* 106, 765-784 (1984)

WHO, World Health Organization. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis.** Geneva, 22-26 March 2010.

WHO. World Health Organization. **Essential leishmaniasis maps.** Disponível em: <[http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis\\_maps/en/](http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/)>. Acesso em: 01 mar. 2012.



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

Centro de Ciências Exatas e Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado



**WILTER, A. Estudo por modelagem e dinâmica molecular da protease de variantes do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 resistentes a drogas antivirais.** Universidade Federal do Rio de Janeiro. Centro de Ciências da Saúde. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2003.