

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Vera Lúcia de Almeida

Estudos de QSAR de furanobenzoamidinas frente à *Pneumocystis carinii*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. Síntese de análogos furânicos S-isotioureídos

Belo Horizonte
2011

UFMG/ICEx/DQ 876

T.377

Vera Lúcia de Almeida

Estudos de QSAR de furanobenzoamidinas frente à *Pneumocystis carinii*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. Síntese de análogos furânicos S-isotioureidos

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau Doutor em Ciências- Química.

Belo Horizonte

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

	Almeida, Vera Lúcia
A447e	
2011	Estudos de QSAR de furanobenzoamidinas frente à <i>Pneumocystis carinii</i> ,
T	<i>Candida albicans</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i> . Síntese de análogos furânicos S-
	isotioureidos. / Vera Lúcia de Almeida. 2011.
	XX; 154f. : il.
	Orientador: Claudio Luis Donnici
	Co-Orientador: Carlos Alberto Montanari
1.1.1.1	Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais.
	Departamento de Química.
	Bibliografia: 120-130
	1. Química orgânica – Teses 2. Química medicinal – Teses 3. Síntese orgânica – Teses I. Donnici, Claudio Luis, Orientador II. Montanari, Carlos Alberto, Co-Orientador III. Título.



UFMG

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEx
31278-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3499-5732
FAX: 031 - 3499-5700
E-MAIL: ppgquimic@exatm.ql.ufmg.br



"Estudos de QSAR de Furanobenzoamidinas Frente a *Pneumocystis carinii*,
Candida albicans e *Cryptococcus neoformans*. Síntese de Análogos Furânicos S-
isotioureídeos"

Vera Lúcia de Almeida

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Claudio Luis Dornici - Orientador
UFMG

Prof. Carlos Alberto Montanari - Co-Orientador
USP-São Carlos

Prof. Viviane Martins Rebello dos Santos
UFOP

Prof. Célia Maria Cordeiro
UFOP

Prof. Thais Horta Álvares da Silva
UFMG

Prof. Lucieneir Paiva Duarte
UFMG

Belo Horizonte, 05 de dezembro de 2011.

Dedico este trabalho aos meus pais Jose Tomé de Almeida (in memorian) e Geralda Estanislau de Almeida (in memorian) pela presença constante, pelo amor e por tantas vezes se sacrificarem para que eu pudesse realizar os meus sonhos. Aos meus irmãos e companheiros Vlamir e Vladimir, ao meu filhote Francisco. Ao querido Júlio pelo apoio e incentivo na finalização desta tese.

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Claudio Luis Donnici pela orientação, paciência, compreensão e amizade. Obrigada por me ter incentivado a continuar.

Ao Professor Dr. Carlos Alberto Montanari por ter me recebido em seu laboratório, pela orientação e contribuição neste trabalho.

Ao professor Dr. Júlio César Dias Lopes pela leitura deste trabalho e pelas discussões valiosas.

As professoras do Instituto de Ciências Biológicas –ICB/UFMG, Dra. Miriam Teresa Paz Lopes e Dra. Maria Aparecida de Resende pela colaboração nos ensaios antitumorais e antifúngicos, respectivamente.

A doutoranda Sheila Rodrigues Oliveira pela leitura deste trabalho, a realização dos espectros e dos ensaios biológicos... Meus sinceros agradecimentos.

Aos professores do Departamento Química que sempre foram muito disponíveis, pelas discussões, empréstimo de reagentes e pela amizade.

Ao Dr. Luciano José Nogueira pela realização dos ensaios biológicos

Aos meus amigos do laboratório Sílvio Vargas, Luciano, Andrelly José, Ramom Cleber, Maria Elena, Andrei Leitão, Luiza Del Carmem, André Oliveira. Agradeço pelas discussões, pela amizade e companheirismo.

As minhas grandes amigas Rita Aparecida, Angélica, Vanderlucia, Joelma e Maria Elena pela amizade sincera e por compreenderem as minhas ausências.

As minhas amigas da FUNED Carolina e Priscilla sempre tão prestativas, solidárias e companheiras. A Cláudia Gontijo por sempre me incentivar, apoiar e pela amizade sincera e tranqüila.

A Nilva Dias Lopes pela ajuda e por me apoiar em todas as vezes que precisei...

As secretarias da Pós-Graduação do Departamento de Química que sempre me ajudaram e sempre foram tão solícitas.

Aos funcionários do Departamento de Química.

Ao CNPq e a Fapemig (PRO-NEX-EDT 479/07 e PPM III 0207/091) pelo suporte financeiro.

*Se as coisas são inatingíveis... Ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!*

Mário Quintana

Resumo

Este trabalho apresenta os resultados obtidos nos estudos de modelagem molecular, ancoragem molecular e QSAR realizados com um grupo de bis-amidinas bicatiônicas frente à *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Pneumocystis carinii*. Bem como síntese, determinação estrutural e atividade biológica (antifúngica e antitumoral) de quatro novos derivados S-isotioureidos. Os resultados obtidos nos estudos de ancoragem molecular realizados com bis-amidinas bicatiônicas e as seqüências d-(CGCGAATTGCG)₂ e o-(CGAATTG)₂ do B-ADN mostraram que a metodologia empregada pode ser uma ferramenta útil na predição da conformação para esta classe de compostos. No entanto as energias calculadas não possuem correlação estatística com o log ΔT_m dos complexos ligantes-fragmentos do B-ADN, refletindo apenas uma tendência geral de afinidade dos compostos amidínicos pelo fragmento do B-ADN. Os estudos de QSAR-2D indicaram que as atividades frente a *C. albicans* e a *C. neoformans* estão correlacionadas com parâmetros lipofílicos.. Os estudos de QSAR-3D usando o método CoMFA mostraram que a contribuição estereoquímica é um parâmetro importante para a atividade frente aos dois fungos e que grupos volumosos no grupo amidínico levam a diminuição da potência destes compostos. Isto corrobora os estudos de QSAR-2D e o conhecimento prévio sobre a importância da conformação isoélica e a complementaridade a fenda menor do ADN para a atividade biológica destes compostos. A síntese dos compostos furanobenzamidínicos propostos inicialmente baseados em estudos computacionais prévios se mostrou de difícil execução nas condições do laboratório. Assim foi proposta a síntese de análogos S-isotioureidos, furan-2,5-diildimetanodiil dicarbamimidotioato (**Ia**), furan-2,5-diildimetanodiil bis(N, N'-dimetilcarbamimidotioato (**Ib**), oxibis(metanodiilfuran-5,2-diilmetanodiil) dicarbamimidotioate (**Ila**) e oxibis(metanodiillfuran-5,2-diilmetanodiil) bis(N-metilcarbamimidotioato) (**Ilb**) que foram sintetizados por rota sintética simples e eficiente. Os compostos foram caracterizados por métodos espectrométricos usuais Infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e carbono e espectrometria de massas. Os compostos furan-2,5-diildimetanol (**2**), [oxibis(metanodiilfuran-5,2-diil)dimetanol (**3**), 4,4'-[furan-2,5-diilbis(metanodiiloxi)]dibenzonitrile (**7**), furan-2,5-diildimetanodiil dicarbamimidotioato e os compostos S-isotioureidos sintetizados apresentaram atividade antifúngica frente a todos os microorganismos testados. O composto **2** foi o que apresentou maior potência frente aos fungos do gênero *Candida* testados. O composto **3** foi o que apresentou maior potência frente aos fungos do gênero *Paracoccidioides* (MG05, PB01, PB18, PB1017) isolados clinicamente (IC). Os compostos tioureídos testados são pouco tóxicos para células sádias (IC₅₀>10⁻⁴ para BHK21) e apresentaram atividade contra todas as linhagens de células cancerígenas testadas. Os compostos **Ib** e **Ilb** apresentaram atividade similar frente a célula de carcinoma mamário humano 4T1(M). O composto **Ila** foi o que apresentou maior potência frente as células tumorais de melanoma (MeWo) e frente ao glioma de rato C6 os três compostos testados apresentaram atividade antitumoral similar.

Abstract

This work presents the results obtained in the studies of docking and QSAR carried out with a group of bis cationic bisamidines against *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Pneumocystis carinii*. As well as synthesis, structural determination and biological activity (antifungal and antitumor) of four new derivatives S-isothioureidos.

The results obtained in studies of docking carried out of bis cationic bisamidines groove binders, d(CGCGAATTCGCG) 2 and o(CGAATTCG) 2 DNA sequences showed that the employed methodology can be a useful tool to predicting the conformational preference for this class of compounds. However, the calculated energies have not statistical correlation with the log ΔT_m of the complexes ligand-B-ADN fragments, reflecting only a general affinity tendency between amidinic compounds to fragment of the B-ADN.

The QSAR-2D studies indicated that the activity against *C. albicans* and *C. neoformans* are correlated with lipophilic parameters. Although this isolated parameter can not explain the biological data in an appropriate way. The results obtained from 2D-QSAR studies corroborate our previous knowledge about the importance of isohelical conformation and complementarity to the minor groove of DNA in the biological activity of these compounds. The 3D-QSAR studies using CoMFA showed that the steric contribution is an important parameter for activity against *C. albicans* and *C. neoformans* and that bulky groups in the amidinic group decrease the potency of these compounds.

The proposed compounds (**FB1** to **FB4**) based on previous computational studies were not synthesized. On the other hand the synthesis of four novel S-isothioureids compounds, furan-2,5-diyl dimethanediyl dicarbamimidothioate (**Ia**), furan-2,5-diil dimethanediil bis(N, N'-dimethylcarbamimidothioate (**Ib**), oxybis(methanediylfuran-5,2-diylmethanediyl) bis(N, N'-dimethylcarbamimidothioate (**IIa**) e oxybis(methanediylfuran-5,2-diylmethanediyl) bis(N-methylcarbamimidothioate (**IIb**) were synthesized by an easy and efficient classical synthetical route. All the compounds were characterized by infrared, H^1 NMR, C^{13} NMR and mass spectrometry.

The furan-2,5-diil dimetanol (**2**), [oxibis(metanodiilfuran-5,2-diil)]dimetanol (**3**), (4,4'-[furan-2,5-diilbis(metanodiiloxi)]dibenzonitrile) (**7**), **Ia**, **Ib**, **IIa** and **IIb** compounds showed activity against all the tested funguses. The compound **3** was more powerful by *Paracoccidioides*.

The thioureids compounds tested are not toxic for healthy cells ($IC_{50} > 10^{-4}$ for BHK21) and they presented activity against all of carcinogenic tested cells. The **Ib** and **IIb** compounds presented similar activity against cell of mammary human carcinoma 4T1 (M). The compound **IIa** was more powerful front the tumorais cells of melanoma (MeWo). The **Ia**, **Ib** e **IIb** compounds were presented activity antitumoral similar by mouse's glioma C6

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1- Exemplos de alcalóides isolados de plantas	1
Figura 1.2 - Exemplos de fármacos desenvolvidos usando planejamento racional	2
Figura 1.3 - Etapas de obtenção de novos fármacos	4
Figura 1.4 - Fases da ação de fármacos	5
Figura 1.5 - Modelo de interação chave-fechadura proposto por Emil-Fischer para explicar as interações entre enzimas e seu substrato	6
Figura 1.6 - Modelo de receptor encaixe-induzido proposto por Kosland e colaboradores	6
Figura 1.7- Utilização da quimioinformática no descobrimento de fármacos	9
Figura 1.8- Representação gráfica dos níveis de energia e conformações moleculares no processo de minimização molecular	14
Figura 1.9- Representação da interação ligante-alvo	16
Figura 1.10 - Representação gráfica da componente 1 versus componente 2 obtido na PCA, onde se observa a separação dos compostos representados por círculos dos compostos representados por triângulos	21
Figura 1.11 - Representação do diagrama tipo dendrograma onde observamos formação de 4 grupos considerando similaridade de 50%	21
Figura 1.12 - Classificação de um composto desconhecido (K) utilizando a técnica KNN-K. O círculo foi classificado na categoria dos triângulos devido a proximidade destas figuras.	22
Figura 1.13 - Representação gráfica do SIMCA onde observamos a separação em dois grupos (ativos e inativos). O composto representado por uma bolinha será classificado segundo a distância que estará dos diferentes grupos	23
Figura 1.14 - Representação gráfica de análise por correlação onde no eixo X temos a variável independente e no eixo Y a variável dependente	24
Figura 1.15 - Esquema geral de proposição de modelos de QSAR	28
Figura 1.16 - Análise de QSAR-3D utilizando metodologia CoMFA: interação entre a sonda e a molécula são determinadas um grid e cada ponto no espaço torna-se um descritor eletrostático e/ou estereoquímico	30
Figura 1.17- Estrutura secundária do ADN segundo o modelo de Watson-Crick: Visualização esquemática de ligações de hidrogênio, doadores e receptores nas extremidades das bases A:T e C:G	31
Figura 1.18 - Exemplos de compostos intercalantes que se ligam a fita dupla do ADN	32
Figura 1.19 - Classificação de amidinas segundo número de substituintes	36

Figura 1.20 - Estruturas tautoméricas de amidinas	36
Figura 1.21 - Estrutura de S-alquilisotiouréias testadas por Bandelin; Tuschhoff (1952)	37
Figura 1.22 - Equação de síntese de S-alquilisotioureias	38
Figura 2.1 - Estrutura dos compostos planejados de forma racional por estudos de QSAR	40
Figura 2.2 - Estruturas de novos compostos tipo S-isotioureído potencialmente antifúngicos.	41
Figura 4.1 - Posições dos substituintes no grupo amidínico	45
Figura 4.2 - Procedimento geral da ancoragem molecular manual flexível utilizada	47
Figura 4.3 - Átomos da pentamidina utilizados no alinhamento pelo método ponto a ponto	55
Figura 4.4 - Esquema ilustrativo da diluição seriada dos compostos testados	70
Figura 4.5 - Distribuição das concentrações de duas substâncias e quatro espécies de fungos testados em placa de 96 poços.	71
Figura 5.1 - Energia de interação calculada utilizando compostos do Banco de dados-1	79
Figura 5.2 - Energia de perturbação total calculada utilizando compostos do Banco de dados-1	79
Figura 5.3 - Energia de ligação total calculada utilizando compostos do Banco de dados-1	80
Figura 5.4 - Complexo d-B-ADN-ligante após procedimento MM-DM-MM	81
Figura 5.5 - Energias de ligação calculada utilizando compostos do Banco de dados-2	84
Figura 5.6 - Energia de perturbação total calculado utilizando compostos do Banco de dados-2	84
Figura 5.7 - Energia de interação calculado de utilizando compostos do Banco de dados-2	85
Figura 5.8 - Análise hierárquica das moléculas do banco de dados-2	87
Figura 5.9 - Gráfico de $\log \text{MIC}^{-1}$ real versus $\log \text{MIC}^{-1}$ predito do grupo de treino	89
Figura 5.10 - Teste gráfico da validade da análise de RML de valores preditos de $\log \text{MIC}^{-1}$ frente a <i>Candida albicans</i> versus valores de resíduos	90
Figura 5.11 - Gráfico de valores de $\log \text{MIC}^{-1}_{\text{real}}$ versus $\log \text{MIC}^{-1}_{\text{predito}}$	93
Figura 5.12 - Mapas de contorno obtidos nas análises de QSAR-3D (CoMFA) frente a <i>Candida albicans</i> a - Mapas de contorno da análise 4 b - Mapas de contorno da análise 2 c - Mapas de contorno da análise 6 d - Mapas de contorno da análise 9	98
Figura 5.13 - Mapas de contorno obtidos nas análises de QSAR-3D (CoMFA) frente a <i>Cryptococcus neoformans</i> a - Mapas de contorno da análise 4 b - Mapas de contorno da análise 7 c - Mapas de contorno da análise 8	102

Figura 5.14- Rota de síntese proposta para compostos furanobenzamidínicos FB1 e FB2	104
Figura 5.15- Rota de síntese proposta para compostos furanobenzamidínicos FB3 e FB4	105
Figura 5.16- Rota de síntese proposta para compostos isotioureídicos Ia , Ib , Ila e Ilb	106
Figura 5.17 - Obtenção do 5-(hidroximetil)-furan-2-carbaldeído a partir da ciclização da frutose	106
Figura 5.18- Obtenção do 5-(hidroximetil)-furan-2-carbaldeído a partir da ciclização da sacarose	106
Figura 5.19 – Ácido levulínico	106
Figura 5.20 –Esquema de fragmentação de Ia por ESI-MS (Modo positivo)	110
Figura 5.21- Esquema de fragmentação de Ib por ESI-MS (Modo positivo)	111
Figura 5.22- Esquema de fragmentação de Ila por ESI-MS (Modo positivo)	112
Figura 5.23- Esquema de fragmentação de Ilb por ESI-MS (Modo positivo)	113
Figura 5.24- Redução do MTT pela desidrogenase mitocondrial	116
Figura A1- Espectro na região do infravermelho (ν_{\max} , cm^{-1} , KBr) de 1	133
Figura A2- Espectro de RMN ^1H (δ , 200MHz, D_2O) de 1	133
Figura A3- Espectro de RMN ^{13}C (δ , 50MHz, D_2O) de 1	134
Figura A4- Subespectro de DEPT 135 (δ , 50MHz, D_2O) de 1	134
Figura A5- Espectro na região do infravermelho (ν_{\max} , cm^{-1} , ATR) de 2	135
Figura A6- Espectro de RMN ^1H (δ , 200MHz, D_2O) de 2	135
Figura A7- Espectro de RMN ^{13}C (δ , 50MHz, D_2O) de 2	136
Figura A8- Subespectro de DEPT 135 (δ , 50MHz, D_2O) de 2	136
Figura A9- Espectro de ESI-MS (modo positivo) de 3	137
Figura A10- Espectro na região do infravermelho (ν_{\max} , cm^{-1} , ATR) de 3	137
Figura A11- Espectro de RMN ^1H (δ , 200MHz, D_2O) de 3	138
Figura A12- Espectro de RMN ^{13}C (δ , 50MHz, D_2O) de 3	138
Figura A13- Subespectro de DEPT 135 (δ , 50MHz, D_2O) de 3	139
Figura A14- Espectro de RMN ^1H (δ , 200MHz, D_2O) de 5	139
Figura A15- Espectro de ESI-MS (modo positivo) de 7	140
Figura A16 - Espectro na região do infravermelho (ν_{\max} , cm^{-1} , ATR) de 7	140
Figura A17- Espectro de RMN ^1H (δ , 200MHz, CDCl_3) de 7	141

Figura A18- Espectro de RMN ^{13}C (δ , 50MHz, CDCl_3) de 7	141
Figura A19- Subespectro de DEPT 135 (δ , 50MHz, CDCl_3) de 7	142
Figura A20- Espectro de ESI-MS, modo positivo, de la	143
Figura A21 - Espectro na região do infravermelho (ν_{max} , cm^{-1} , ATR) de la	143
Figura A22- Espectro de RMN ^1H (δ , 200MHz, D_2O) de la	144
Figura A23- Espectro de RMN ^{13}C (δ , 50MHz, D_2O) de la	144
Figura A24- Subespectro de DEPT 135 (δ , 50MHz, D_2O) de la	145
Figura A25- Espectro de massa ESI-MS modo positivo, de lb	146
Figura A26- Espectro na região do infravermelho (ν_{max} , cm^{-1} , ATR) de lb	146
Figura A27- Espectro de RMN ^1H (δ , 200MHz, D_2O) de lb	147
Figura A28- Espectro de RMN ^{13}C (δ , 50MHz, D_2O) de lb	147
Figura A29- Subespectro de DEPT 135 (δ , 50MHz, D_2O) de lb	148
Figura A30- Espectro de massa ESI-MS, modo positivo, de Ila	149
Figura A31- Espectro na região do infravermelho (ν_{max} , cm^{-1} , ATR) de Ila	149
Figura A32- Espectro de RMN ^1H (δ , 200MHz, D_2O)de Ila	150
Figura A33- Espectro de RMN ^{13}C (δ , 50MHz, D_2O) de Ila	150
Figura A34- Subespectro de DEPT 135 (δ , 50MHz, D_2O) de Ila	151
Figura A35- Espectro de massa ESI-MS, modo positivo, de Ilb	152
Figura A36- Espectro na região do infravermelho (ν_{max} , cm^{-1} , KBr) de Ilb	152
Figura A37- Espectro de RMN ^1H (δ , 200MHz, D_2O) de Ilb	153
Figura A38- Espectro de RMN ^{13}C (δ , 50MHz, D_2O) de Ilb	153
Figura A39- Subespectro de DEPT 135 (δ , 50MHz, D_2O) de Ilb	154

LISTA DE TABELA

Tabela 1.1- Concentração inibitória de derivados tipo precursores dendriméricos funcionalizados com grupo tioureído frente à <i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> e <i>Candida Krusei</i> .	38
Tabela 4.1- Compostos bisbenzamidínicos e respectivos valores de ΔT_m (°C), $\log \Delta T_m$ e % de cistos de <i>P. carinii</i> /g de pulmão de rato (Boykin et al., 1998)	43
Tabela 4.2- Compostos bisbenzamidínicos e atividade biológica frente aos <i>Pneumocystis carinii</i> (Boykin et al., 1998; Hall et al., 1998;), <i>Cryptococcus neoformans</i> e <i>Candida albicans</i> (Del Poeta et al., 1998; Lombardy et al., 1996; 1998; Francesconi et al., 1999)	49
Tabela 4.3- Condições de análise utilizados no procedimento de CoMFA frente a <i>Candida albicans</i>	56
Tabela 4.4- Condições de análise utilizados no procedimento de CoMFA frente a <i>Cryptococcus neoformans</i>	57
Tabela 5.1- Energia do complexo d-B-ADN-ligante (E_{comp}), energia do d-B-ADN no complexo ($E_{ADN_{comp}}$), energia do ligante no complexo ($E_{lig_{comp}}$) e na sua conformação de menor energia, energias de interação (E_{int}), de perturbação (E_{pert}), de ligação (E_{lig})	76
Tabela 5.2- Energia do complexo o-B-ADN-ligante, energia do o-B-ADN no complexo, e energia do ligante no complexo e na sua conformação de menor energia e valores de ΔT_m , Energias de interação (E_{int}), de perturbação (E_{pert}) e de ligação (E_{lig}) dos complexos o-B-ADN-ligante	82
Tabela 5.3- Análise estatística de dados da atividade biológica frente a <i>Candida albicans</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i>	87
Tabela 5.4- Valores reais e calculados de $\log MIC^{-1}$ frente a <i>C. albicans</i> e lipolo componente-Z dos compostos bisbenzamidínicos do grupo de treino	89
Tabela 5.5- Resultados da análise da atividade biológica frente a <i>C. albicans</i> utilizando RML para moléculas do Banco de dados-2	91
Tabela 5.6- Valores reais e calculados de $\log MIC^{-1}$ (mol/L) frente ao <i>C. neoformans</i> dos compostos bisbenzamidínicos do grupo de treino	92
Tabela 5.7- Valores reais e calculados de $\log MIC^{-1}$ frente a <i>C. neoformans</i> e valores de lipolo Z dos compostos bisbenzamidínicos do grupo de teste e do grupo de validação lateral.	94
Tabela 5.8- Resultados da análise CoMFA frente ao fungo <i>Candida albicans</i>	95
Tabela 5.9- Valores calculados de $\log MIC^{-1}$ para os compostos do grupo de treino frente a <i>Candida albicans</i> utilizando diferentes análises	96
Tabela 5.10- Valores reais e calculados de $\log MIC^{-1}$ frente a <i>Candida albicans</i> dos compostos bisbenzamidínicos do grupo de teste utilizando diferentes análises	97
Tabela 5.11- Resultados das análises CoMFA frente a <i>Cryptococcus neoformans</i>	99
Tabela 5.12- Valores calculados de $\log MIC^{-1}$ para os compostos do grupo de treino	100

frente a *Cryptococcus neoformans*

Tabela 5.13- Valores reais e calculados de $\log \text{MIC}^{-1}$ (mol/L) frente a *Cryptococcus neoformans* dos compostos bisbenzamidínicos do grupo de teste, validação externa e moléculas planejadas **101**

Tabela 5.14- Atividade antifúngica *in vitro* dos compostos sintetizados **115**

Tabela 5.15- Atividade citotóxica *in vitro* (IC_{50} mmol/L) dos compostos **Ib**, **Ila** e **Ilb** frente as linhagens de células BHK21, 4T1, A549, MeWo e C6 **117**

Abreviaturas

σ	desvio padrão
δ	deslocamento químico
ν	número de onda
ΔT_m	variação na temperatura de desnaturação
ADME	adsorção, distribuição, metabolismo e excreção
ADN	ácido dextroribonucléico
AMB	anfotericina B
AMBER	Construção Assistida de Modelos com Refinamento de Energia (<i>do ingles Assisted Model Building with Energy Refinement</i>)
ARN	ácido ribonucléico
ASD	ágar sabouroud dextrosado
A:T	adenina: timina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CSD	<i>The Cambridge Structural Database</i>
CDD	cromatografia em camada delgada
$CDCl_3$	clorofórmio deuterado
CFU	unidade formadora de colônia
CIM	concentração inibitória mínima
CLAE	cromatografia líquida de alta pressão
CoMFA <i>Field Analysis</i> s	Análise comparativa do campo molecular (<i>do inglês Comparative Molecular</i>
CoMSIA	Análise compaartiva por índice de similaridade molecular (<i>do inglês Comparative Molecular Similarity Indices Analysis</i>)
d	duplete
d-B-ADN	dodecâmero do B ácido dextroribonucléico
DIE's	doenças infecciosas emergentes
DMSO	dimetilsulfóxido
DEPT	<i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>
$EADN_{\text{compl}}$	energia do ADN no complexo
$EADN_{\text{pert}}$	energia de perturbação do ADN
EBI	Instituto Europeu de bioinformática (<i>do ingles European Bioinformatics Institute</i>)
E_{compl}	energia do complexo

E _{int}	energia de interação
E _{lig}	energia de ligação
E _{lig_{compl}}	energia do ligante no complexo
E _{lig_{menor energia}}	energia de menor energia do ligante
E _{lig_{pert}}	energia de perturbação do ligante
E _{pot}	energia potencial
ESI-MS	espectrometria de massa por <i>electrospray</i>
ESP	potencial eletrostático molecular (do inglês <i>electrostatic potential</i>)
E _{total_{pert}}	energia de perturbação total
F	Valor F do teste estatístico de Fischer
HCA	Análise por agrupamento hierárquico (do inglês <i>Hierarchical Cluster Analysis</i>)
HIV	vírus da imunodeficiência humana (do inglês <i>Human immunodeficiency virus</i>)
HMF	5-hidroximetilfurfuraldeído
IC	isolados clinicamente
IC ₅₀	concentração que inibe crescimento de 50% das células
IFI'S	infecções fúngicas invasivas (do inglês <i>invasive fungal infections</i>)
ITC	calorimetria de titulação isotérmica (do inglês <i>isothermal titration calorimetry</i>)
IV	infravermelho
v	Comprimento de onda
J	Índice topológico de Balaban
j	constante de acoplamento
KNN	Regra dos vizinhos mais próximos (do inglês <i>K-Nearest Neighbours</i>)
log P	logaritmo do coeficiente de partição
LOO <i>leave-one-out</i>)	Técnica de validação cruzada que ora exclui e ora inclui um dado (do inglês
LSO (do inglês <i>leave-some-out</i>)	Técnica de validação cruzada que ora exclui e ora inclui um grupo de dados
meq	miliequivalente grama
m	múltiplo
MIC	concentração inibitória mínima
m/z	relação massa/ carga
MM	mecânica molecular
MM-DM-MM molecular	procedimento de mecânica molecular –dinâmica molecular –mecânica

MNDO	cálculos semi-empíricos de orbital molecular (MO), que usam como aproximação uma negligência modificada de recobrimento diatômico <i>Modified neglect of diatomic overlap</i>
MOPS	ácido-2-(N-morfolino)-propanosulfônico
MTT	brometo de 3-(4, 5'-dimetiltiazol-2'-ila-2,5-difeniltetrazol
n	tamanho da amostra
NCE's	novas entidades químicas (do inglês <i>new chemical entities</i>)
NCS	N-cloro succinimida
NCCLS	organização internacional interdisciplinar, sem fins lucrativos, educacional e de desenvolvimento de normas/padrões, que promove o desenvolvimento e uso de normas/padrões e diretrizes consensuais voluntárias na comunidade de atenção à saúde (do inglês <i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>).
CLS	Novo nome para NCCLS (do inglês <i>Clinical Laboratory Standard Institute</i>)
NDB	Banco de dados de ácido nucleicos (do inglês <i>Nucleic acid database</i>)
NIH <i>Health</i>)	Trata-se de um Instituto nacional de saúde americano (<i>National Institutes of Health</i>)
o-B-ADN	octamero do B-ácido dextroribonucleico
PBA	alinhamento baseado na proteína (do inglês <i>protein based alignment</i>)
PBS/ETDA	tampão fosfato/ ácido etilenodiamino tetra-acético
PC	componentes principais (do inglês <i>Principal components</i>)
PCA	análise de componentes principais (do inglês <i>Principal Components Analysis</i>)
PCP	pneumonia causada por <i>Pneumocystis carinii</i>
PDB	Banco de dados de proteínas (do inglês <i>The Protein Data Bank</i>)
PGRN	<i>Pharmacogenetics Research Network</i>
PIR	<i>Protein information resource</i>
PLS	mínimos quadrados parciais (do inglês <i>Partial Least Squares</i>)
Q ² (r ² _{cv})	coeficiente de correlação cruzada
QSAR <i>Relation</i>)	relação quantitativa estrutura atividade (do inglês <i>Quantitative Structure Activity Relation</i>)
r	coeficiente de correlação
RML	Regressão múltipla linear (do inglês <i>Regression Multiple Linear</i>)
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMS	<i>Root Mean Square</i>
RPMI 1640	meio utilizado para crescimento de microorganismos desenvolvido no <i>Roswell Park Memorial Institute</i>

s	simpleto
SAR	relação estrutura atividade do inglês <i>Structure Activity Relation</i>
SBA	alinhamento baseado na estrutura do inglês <i>structure based alignment</i>
SBF	soro fetal bovino
SIB	Instituto Suiço de bioinformatica (do ingles <i>Swiss Institute of Bioinformatic</i>)
SIMCA	<i>Soft Independent Modelling of Class Analogy ou SIMple Classification Analysis</i>
SN ₂	substituição nucleofílica de segunda ordem
SOCl ₂	cloreto de sulfonila
SOMFA	<i>Self-Organizing Molecular Field Analysis</i>
t	tripleto
ta	temperatura ambiente
teste de F	teste estatístico de hipóteses utilizado para verificar se as variâncias de duas populações com distribuição normal são diferentes, ou para verificar ou para verificar qual das duas populações com distribuição normal têm mais variabilidade
TTD	Banco de dados de alvos terapeuticos (do ingles <i>Therapeutic Target Database</i>)
UniProtKB	Banco de dados de proteina (do ingles <i>Universal Protein Resource</i>)
VDW	van Der Waals
VPD	voltametria de pulso diferencial

SUMÁRIO

Resumo	viii
Abstract	ix
Lista de figuras	x
Lista de tabelas	xiv
Abreviaturas	xvi
Apresentação	xxiii
1- INTRODUÇÃO	
1.1- Desenvolvimento de novos fármacos	1
1.2- Alvo biológico e as interações ligante-alvo	4
1.3- Quimioinformática	8
1.4- Banco de dados de estruturas moleculares	9
1.5- Modelagem molecular	10
1.6- Minimização de energia	13
1.7- Busca conformacional	14
1.8- Ancoragem molecular e <i>scoring</i>	16
1.9- Água em sistemas biológicos e modelagem molecular	18
1.10- Cargas parciais	18
1.11- Estudos de relação estrutura-atividade	
1.11.1- Reconhecimento de padrões	19
1.11.2- Análise de Componentes Principais (PCA- <i>Principal Components Analysis</i>)	20
1.11.3- Análise por agrupamento hierárquico (HCA- <i>Hierarchical Cluster Analysis</i>)	21
1.11.4- Regra dos vizinhos mais próximos (KNN- <i>K-Nearest Neighbors</i>)	21
1.11.5- SIMCA (<i>Soft Independent Modelling of Class Analogy</i>)	22
1.11.6- Análise de regressão	23
1.11.7- Relação Quantitativa Estrutura-Atividade (QSAR- <i>Quantitative Structure Activity Relation</i>)	24
1.12- Substâncias bioativas que interagem com o ADN	31
1.13- Compostos amidínicos	35
1.14- Atividade biológica de tioureído-derivados	36
2- IMPORTÂNCIA E JUSTICATIVA	39
3- OBJETIVOS	
3.1- Objetivos gerais	42
3.2- Objetivos específicos	42
4- PROCEDIMENTO	
4.1- Modelagem molecular	
4.1.1- Ancoragem molecular utilizando Metodologia-1 e energias envolvidas no complexo ADN-ligante	43
4.1.2- Ancoragem molecular utilizando Metodologia-2 e energias envolvidas no complexo ADN-ligante	48
4.1.3- Avaliação das bases nitrogenadas envolvidas na interação o-B-ADN-ligante e análise das ligações de hidrogênio presentes no complexo ADN-ligante	53
4.2- Estudos de reconhecimento de padrões e QSAR	
4.2.1- Estudos SAR e reconhecimento de padrão frente a <i>Pneumocystis carinii</i>	53
4.2.2- Estudos de reconhecimento de padrões frente a <i>Candida albicans</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i>	54
4.2.3- Estudos de QSAR-2D frente a <i>Candida albicans</i>	54
4.2.4- Estudos de QSAR-2D frente a <i>Cryptococcus neoformans</i>	55

4.2.5- Estudos de QSAR-3D	55
4.2.5.1- Estudos de QSAR-3D frente a <i>Candida albicans</i>	56
4.2.5.2- Estudos de QSAR-3D frente a <i>Cryptococcus neoformans</i>	57
4.3- Síntese	
4.3.1- Secagem de solventes e reagentes	58
4.3.2- Tratamento da resina Dowex 50WX2	58
4.3.3- Aparelhos utilizados	58
4.3.4- Preparação do 5-(hidroximetil)- 2-carbaldeidofurano (composto 1)	
4.3.4.1- Método 1	59
4.3.4.2- Método 2	59
4.3.5- Preparação do 2,5-di-(hidroximetil)-furano (composto 2) e 1,5-di [(5'-hidroximetil-2'-furano)il]3-oxapropano (composto 3)	60
4.3.6- Tentativa de preparação do furan-2,5-diildimetanodiil bis(4-metilbenzenosulfonato)- (composto 4)	61
4.3.7- Preparação do 2,5 bis(clorometil)furano (composto 5)	
4.3.7.1- Método 1	62
4.3.7.2- Método 2	62
4.3.8 - Preparação do 4,4'-[furan-2,5-diilbis(metanodiiloxi)]dibenzonitrila (composto 7)	63
4.3.9 - Tentativa de síntese do (4-carboximidato de etila-1-feniloximetil)-2,5-di(metanodiiloxi)]-furano (composto 16)	64
4.3.10- Síntese do 2,5-di[5-tioureido-metil] furano- (composto Ia)	65
4.3.11- Síntese do 2,5-dimetanodiil-bis(N, N'-dimetilcarbamidotioato)- furano (composto Ib)	65
4.3.12- Preparação do 1,5-bis-[5'-(clorometil)2'-furano]il]-3-oxa-propano (composto 15)	65
4.3.13- Síntese do 1,5-bis-[5'-carbamidotioato-2'-furano]il]-3-oxa-propano (IIa)	66
4.3.14- Síntese do 1,5-bis-[5'-N-metil-carbamidotioato-2'-furano]il]-3-oxa-propano (IIb)	66
4.4- Ensaios de atividade biológica <i>in vitro</i>	
4.4.1- Atividade antifúngica	68
4.4.1.1- Considerações Gerais	68
4.4.1.2- Aparelhos utilizados	69
4.4.1.3- Preparo do inóculo	69
4.4.1.4- Preparo das amostras	69
4.4.1.5- Determinação da concentração inibitória mínima	70
4.4.2- Estudo da Atividade Antitumoral e Atividade Citotóxica	
4.4.2.1- Considerações Gerais	72
4.4.2.2- Aparelhos utilizados	72
4.4.2.3- Origem das linhagens e meio de cultura celular	72
4.4.2.4- Procedimentos gerais	73
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO	
5.1- Estudos de Ancoragem molecular	
5.1.1- Ancoragem molecular utilizando Metodologia-1: análise de rotina a ser seguida	74
5.1.2- Ancoragem molecular utilizando metodologia-2	81
5.2- Estudos de reconhecimento de padrões e QSAR	
5.2.1- Estudos de reconhecimento de padrões frente a <i>Pneumocystis carinii</i>	86
5.2.2- Estudos de reconhecimento de padrões frente a <i>C. albicans</i> e <i>C. neoformans</i>	87
5.2.3- Estudos de QSAR-2D frente ao fungo <i>Candida albicans</i>	88
5.2.4- Estudos de QSAR-2D frente ao fungo <i>Cryptococcus neoformans</i>	92
5.2.5- Estudos de QSAR-3D frente ao fungo <i>Candida albicans</i>	94
5.2.6- Estudos de QSAR-3D frente ao fungo <i>Cryptococcus neoformans</i>	99
5.3- Resultados obtidos das preparações efetuadas	104
5.4 Atividade biológica <i>in vitro</i>	
5.4.1- Testes antifúngicos	116
5.4.2- Avaliação de toxicidade e da atividade antitumoral dos compostos isotioureidos	117
6- CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	122
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125

Apresentação

Este trabalho trata dos resultados da tese de doutoramento desenvolvido no laboratório do Núcleo de Estudos em Química Medicinal- NEQUIM e LASELORG- Laboratório de Síntese e Eletrossíntese Orgânica e está inserido no projeto de pesquisa entre o Departamento de Química-ICEx/UFMG e os Departamentos de Microbiologia, Farmacologia e Bioquímica-ICB/UFMG intitulados “*Síntese de novos compostos com Atividade Antitumoral e Antimicrobiana para Doenças Infecciosas Emergentes (DIE)*” e NIEAMBAV fomentados pela FAPEMIG (Proc. CEX 817/06 e EDT 479/07) - que visam à pesquisa inter-, multi- e trans-disciplinar (Química, Farmacologia, Micologia, Microbiologia e Bioquímica) para o desenvolvimento de novos agentes quimioterapêuticos para tratamento de doenças infecciosas emergentes (DIEs) ou infecções fúngicas invasivas (IFIs) e novos agentes antitumorais.

Os objetivos gerais deste trabalho são: (1) Realização de estudos de ancoragem molecular, QSAR e SAR de furanobenzoamidinas frente à *Pneumocystis carinii*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*; (2) Realização da síntese de compostos amidínicos e S-isotioureidos com atividade antifúngica.

A presente tese está dividida em seis capítulos. No capítulo 1 serão abordados alguns tópicos gerais relacionados à revisão da literatura. A abordagem destes temas se justifica como necessário ao embasamento para compreensão dos resultados e como texto base para futuros pesquisadores do grupo desde que esta é a primeira tese desenvolvida com planejamento teórico para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos. Nos capítulos 2 e 3 serão abordados, respectivamente, os tópicos justificativa e relevância do trabalho; e objetivos gerais e específicos. No quarto capítulo abordaremos as metodologias experimentais utilizadas para o estudo de quimioinformática, para a síntese dos compostos amidínicos ($R-C=NR(NR_2)$) e isotioureidos ($R-S-C=NR(NR_2)$) e testes antifúngicos e antitumorais realizados. No quinto capítulo apresentaremos discussão das metodologias experimentais e os resultados obtidos na modelagem molecular, na síntese e caracterizações espectrométricas dos compostos propostos, bem como das discussões e dos resultados da atividade antifúngica dos compostos sintetizados. No sexto capítulo concluiremos de maneira geral os resultados apresentados até então e as perspectivas futuras com tais resultados.

Finalmente, mostraremos as referências bibliográficas utilizadas e alguns espectros selecionados como anexos.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Desenvolvimento de novos fármacos

A busca do tratamento e da cura das doenças que afligem o ser humano é tão antiga quanto sua própria história. Desde o princípio da civilização, os homens primitivos buscam na natureza alívio para suas doenças. No início do século XIX, vários fármacos foram isolados de plantas (Simões et al., 2004). Podemos citar, como exemplos, a emetina (1817), a colchicina (1820), a quinina (1820), a morfina (1832) entre outros.

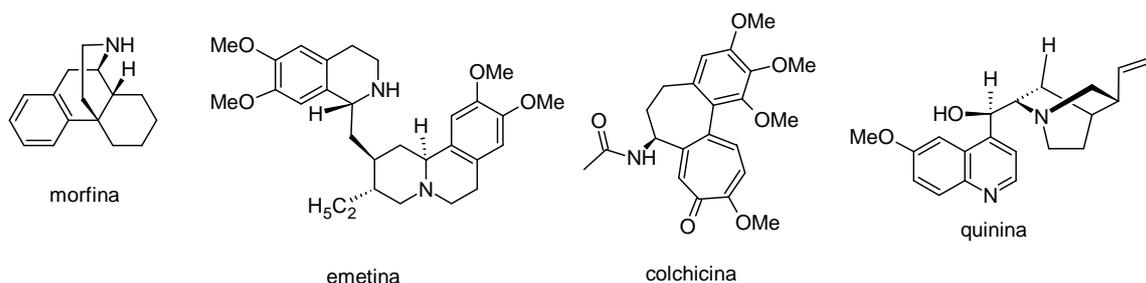


Figura 1.1 - Exemplos de alcalóides isolados de plantas

Fonte: Simões et al., 2004

Em 1860, Kolbe e Lautemann sintetizaram o ácido salicílico e em 1868 Hofmann sintetizou o ácido acetilsalicílico dando início a uma nova fase na descoberta de fármacos. O desenvolvimento da química orgânica sintética possibilitou uma nova forma de obtenção e fabricação de fármacos (Yunes e Cechinel Filho, 2007).

Diversas estratégias podem ser utilizadas na descoberta de novas substâncias bioativas. Podemos citar: acaso; extração de fontes naturais (plantas, animais, fungos e organismos marinhos); triagem empírica e triagem empírica racionalmente dirigida (testes experimentais e/ou *in silico*); estudos de efeitos adversos (informações clínicas e/ou observadas nos testes biológicos); modificação molecular clássica (bioisosterismo, simplificação molecular, introdução de grupos volumosos, variação da extensão da cadeia); obtenção de pró-fármacos; estudos de produtos de metabolismo; síntese combinatória e planejamento molecular auxiliado por computador (CAMD, do inglês *Computer-Assisted Molecular Design*).

Nos últimos anos, novas tecnologias e metodologias foram introduzidas na química medicinal levando a uma diminuição no tempo, esforço e recursos

financeiros necessários à obtenção de novas substâncias bioativas com potencial terapêutico.

Hoje, o planejamento racional molecular na busca de novos fármacos é muito difundido tanto na academia quanto na indústria, sendo encontrados vários medicamentos utilizados na terapêutica, que foram desenvolvidos dessa forma. Pode ser citados os inibidores da protease do HIV saquinavir, indinavir, ritonavir e nelfinavir, o anti-hipertensivo captopril e a dorzolamida para tratamento de glaucoma (Nogrady; Weaver, 2005).

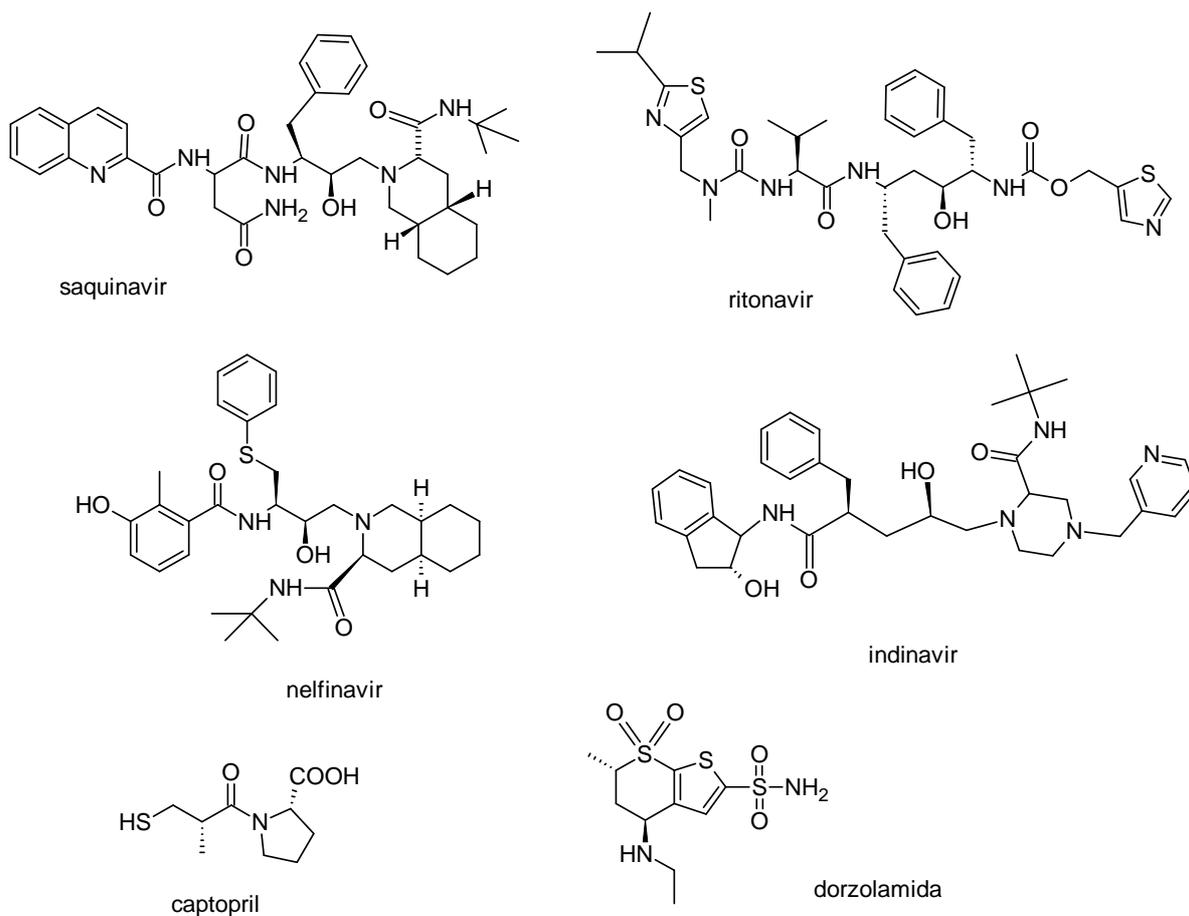


Figura 1.2 - Exemplos de fármacos desenvolvidos usando o planejamento racional

O planejamento de fármacos é uma área multidisciplinar que envolve aspectos da química, biologia, farmácia e das ciências médicas na invenção, descoberta, planejamento, identificação e síntese de compostos bioativos. Envolve também o estudo das propriedades farmacocinéticas destes compostos, o entendimento de seu mecanismo de ação a nível molecular e a construção de modelos de relação estrutura atividade (Sant'Anna, 2002).

O planejamento molecular racional, que foi a estratégia utilizada no presente trabalho, emprega técnicas de quimioinformática e bioinformática. A quimioinformática utiliza ferramentas computacionais para manipular grandes quantidades de dados referentes à estrutura molecular de compostos de baixo peso molecular e utiliza de forma sistemática a informação química para gerar dados para prever o comportamento de compostos desconhecidos *in silico*. A bioinformática emprega os conhecimentos da química, biologia, informática e estatística para estudos de sistemas biológicos como, por exemplo, o estudo da estrutura de proteínas, a análise da expressão gênica, a codificação de proteínas, etc. (Jonsdottir et al., 2005).

Várias etapas devem ser seguidas para a obtenção de um novo fármaco (Figura 1.3, pag. 4). Inicialmente, é realizada a etapa do planejamento e obtenção de substâncias bioativas, que envolve a determinação da doença que se quer tratar, do alvo biológico associado e do seu mecanismo de ação (Lima, 2007), assim como a sua síntese e/ou isolamento das substâncias bioativas. A próxima etapa abrange as estratégias de otimização do composto bioativo envolvendo modificações moleculares clássicas da Química Medicinal (tais como bioisosterismo, homologação, simplificação e hibridação molecular), ou o emprego de técnicas computacionais como a modelagem molecular e o QSAR para o planejamento de novos compostos mais potentes e menos tóxicos. Os compostos planejados são sintetizados e suas atividades farmacológicas são determinadas. Nesta etapa, identificamos os compostos denominados “*hits*”, que são os compostos que possuem características promissoras para se tornar um composto líder. Posteriormente temos a eleição de um composto líder que é um ligante com maior afinidade pelo sítio de ligação, menos tóxico e com propriedades farmacocinéticas (absorção, distribuição, metabolismo, excreção-ADME) adequadas (Lima, 2007).

Seguem-se várias etapas de modificação molecular do composto líder para aumentar a afinidade e a seletividade do ligante para com o alvo até a obtenção de candidatos a estudos pré-clínicos. Esse procedimento precisa ser acompanhado com estudos das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Paralelamente, é necessária a síntese dos compostos, a determinação da via de administração, a formulação farmacêutica para a posterior realização dos testes pré-clínicos. Finalizadas as fases pré-clínicas, o fármaco

deverá passar pelas fases clínicas I, II e III (Figura 1.3, pag. 4). Após a aprovação na fase clínica III, o fármaco estará apto a ser lançado no mercado (Xu; Hagler, 2002).

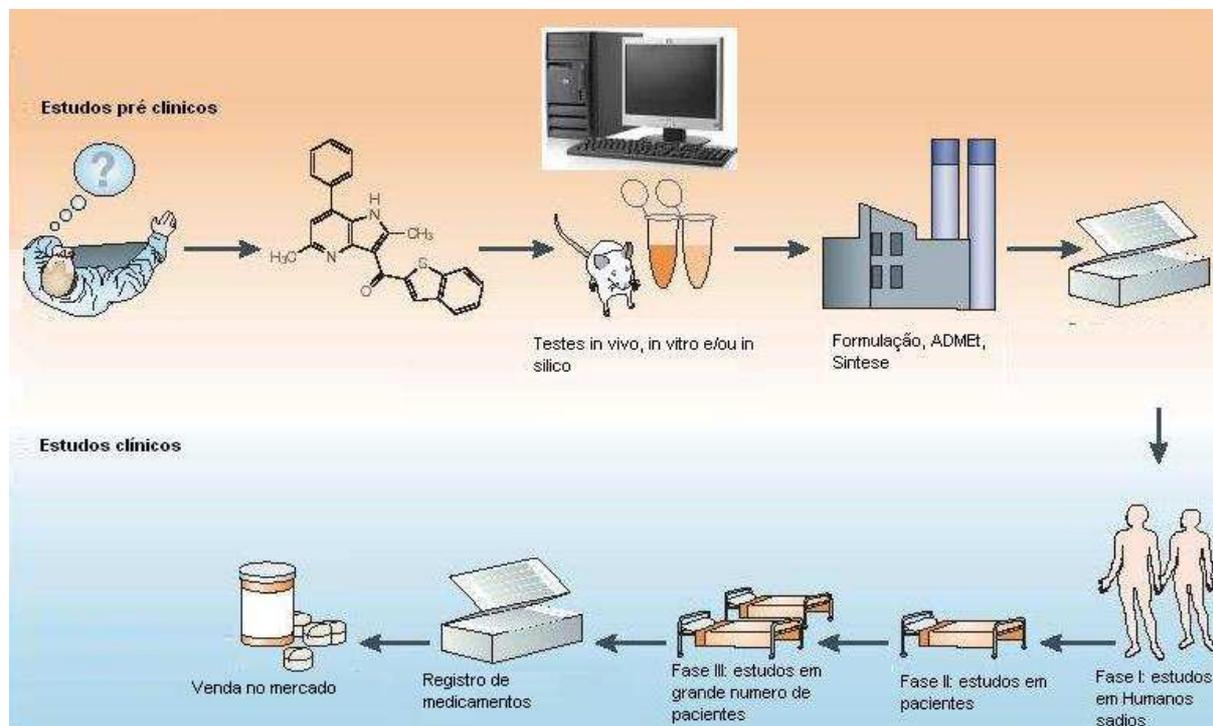


Figura 1.3- Etapas de obtenção de novos fármacos

Fonte: Adaptado de Lombardino; Lowe III, 2004

Portanto, a descoberta de fármacos é um processo complexo e de alto custo financeiro. Apesar do aumento no investimento para a busca e o desenvolvimento de novos compostos, o número de fármacos que tem chegado ao mercado tem declinado: apenas 11% dos potenciais fármacos que passam para a fase clínica I chegam ao mercado. Isto ocorre devido a problemas relacionados com a eficácia, toxicidade, metabolismo e propriedades farmacocinéticas (Lombardino; Lowe III, 2004; Ghose et al., 2006).

1.2- Alvo biológico e as interações ligante-alvo

A interação do fármaco com o sítio de ação é, geralmente, considerada o aspecto mais importante para a resposta biológica. Na realidade, para que essa interação ocorra, primeiro é necessário a entrada do fármaco em um compartimento (célula, organela, membrana), seguida pela etapa de reconhecimento molecular envolvendo a ligação ou interação com o alvo

produzindo a ativação ou bloqueio desse (Testa, 2000). Para que um fármaco produza uma ação biológica pode-se considerar conceitualmente a ocorrência simultânea de duas fases: a farmacocinética e a farmacodinâmica (Figura 1.4, pag. 5). A primeira fase consiste no caminho que o fármaco percorre no organismo e a segunda, a interação (ou ligação) a um alvo biológico específico (sítio de ligação), produzindo uma resposta biológica (Nogrady; Weaver, 2005).

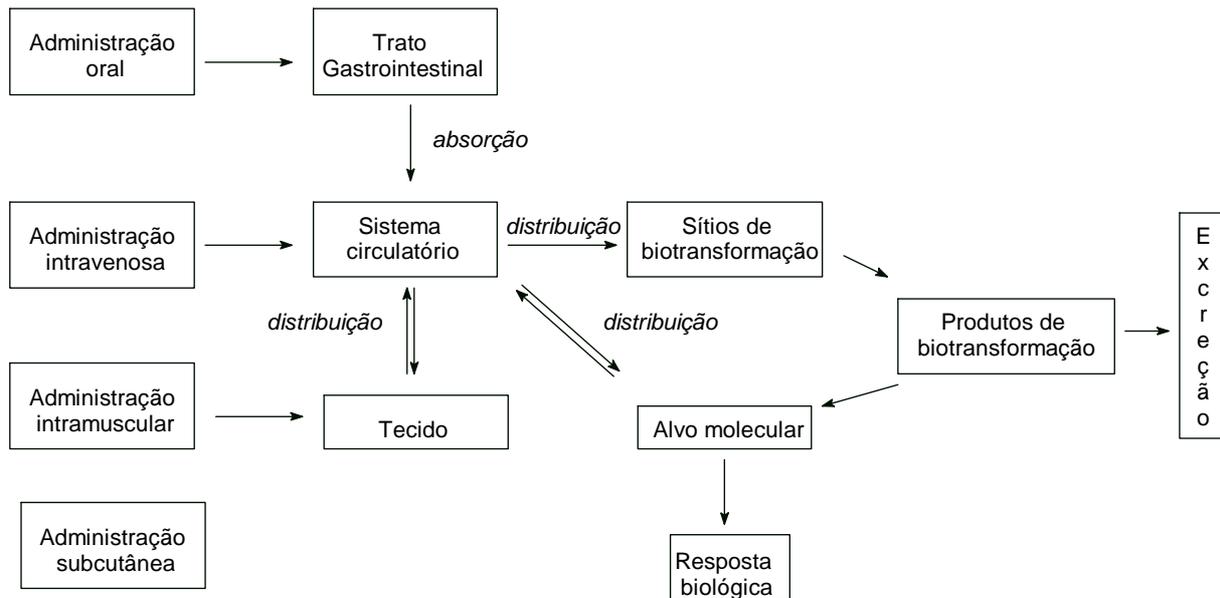


Figura 1.4 - Fases da ação de fármacos

Os quatro alvos moleculares principais são: (1) lipídios; (2) carboidratos; (3) ácidos nucleicos ADN e ARN e (4) proteínas: enzimas, receptores e proteínas carreadoras e estruturais.

A idéia de que as interações entre as enzimas e o seu substrato seriam complementares produzindo uma ação biológica foi introduzida por Emil-Fischer em 1894 (Bracken et al., 2001; Verli; Barreiro, 2005), com o seu modelo da chave-fechadura (Figura 1.5, pag. 6). Esse modelo foi extrapolado, posteriormente, para descrever a interação entre o fármaco e o seu alvo biológico (Verli; Barreiro, 2005).

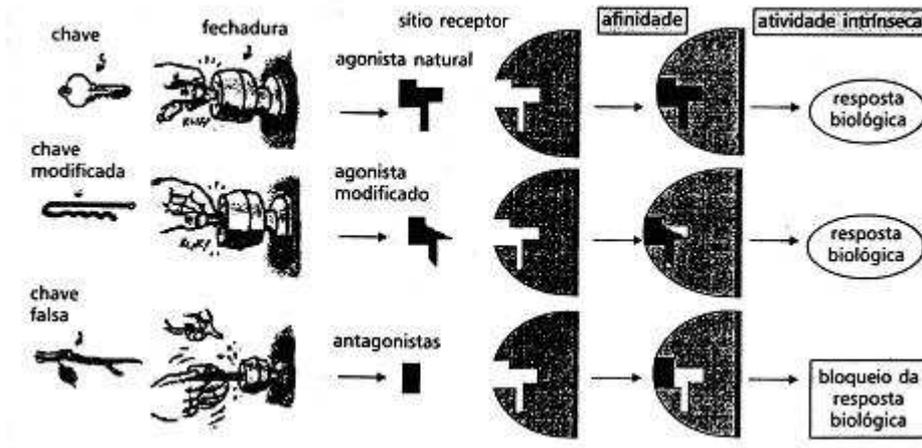


Figura 1.5 - Modelo de interação chave-fechadura proposto por Emil-Fischer para explicar as interações entre enzimas e seu substrato

Fonte: Verli; Barreiro, 2005

Outras teorias foram propostas para explicar a interação entre a substância bioativa e o seu alvo. Um dos modelos é o do encaixe induzido, proposto por Koshland e colaboradores (Koshland, 1958; Thoma; Koshland, 1960). Neste modelo, considera-se que na interação o ligante induz uma mudança conformacional no alvo e, ele mesmo, sofre também uma mudança conformacional (Figura 1.6).

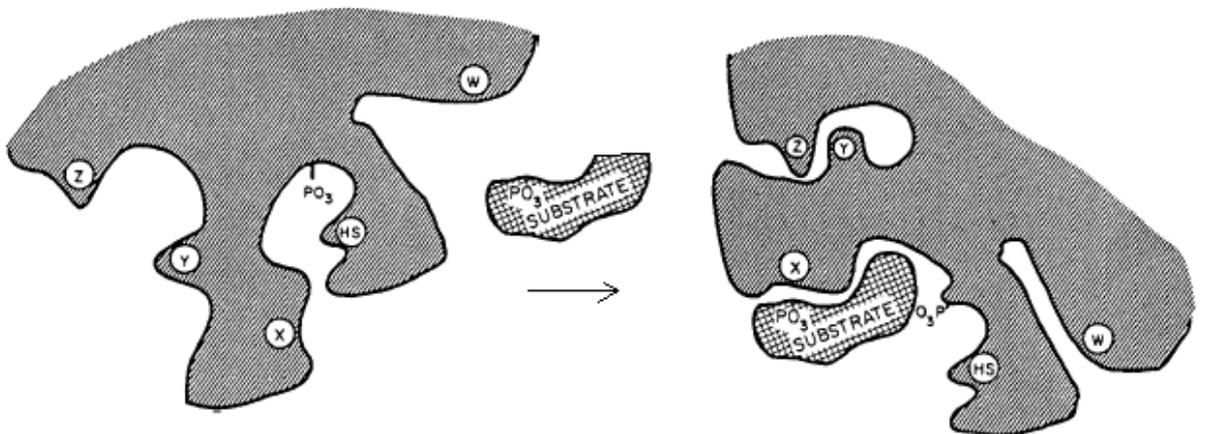


Figura 1.6 - Modelo de receptor encaixe-induzido proposto por Koshland e colaboradores

Fonte: Adaptado de Koshland, 1994.

Alguns fármacos interagem com o sítio de ligação por meio de uma reação química formando uma ligação covalente. Contudo, a maioria dos fármacos se liga ao sítio pelas interações intermoleculares fracas. Estas forças devem ser

fortes o suficiente para “prender” o fármaco, por certo período de tempo, ao seu alvo e fraca o suficiente para permitir a sua saída após produzir o efeito desejado. Os grupos presentes no composto bioativo que são importantes para a sua interação com o alvo são chamados grupos ligantes (Barreiro; Fraga, 2005). O grupo farmacofórico é aquela parte essencial da molécula com arranjo estereoquímico específico responsável pelo reconhecimento, interação ou ligação com o alvo biológico (Ghose et al., 2006). O estudo dos fatores que favorecem a interação de um fármaco com o alvo biológico pode ajudar no entendimento de como um conjunto de átomos, um grupo funcional ou uma subestrutura podem ser importantes para a atividade biológica. As informações obtidas podem ser utilizadas também para identificar as classes de compostos ativos, prever diferentes atividades por similaridade de um composto com atividades biológicas conhecidas, ou mesmo melhorar a potência e as propriedades farmacocinéticas de um composto de interesse farmacológico. Isto pode ser feito substituindo-se o grupo farmacofórico por grupo similar (isómero), ou modificando a parte da estrutura não envolvida na interação ou ainda obtendo um pró-fármaco.

Vários fatores são importantes na interação fármaco-receptor. Pode-se citar:

- Interações intermoleculares: interações eletrostáticas, dipolo-dipolo, van der Waals e ligações de hidrogênio.
- Fatores estereoquímicos: volume do ligante e arranjo espacial dos grupos farmacofóricos.

Um problema encontrado, frequentemente, no planejamento de fármacos é saber em qual conformação a molécula se liga ao seu alvo biológico, ou seja, qual é a conformação ativa. Tem sido sugerido que a conformação mais estável seja a conformação ativa uma vez que ela é a mais provável. Contudo, é possível que uma menos estável possa ser a conformação ativa. Isto porque a interação entre o ligante e o alvo resulta em um ganho de energia o qual compensa a energia requerida para adotar uma conformação de maior energia (José, 2007).

Na busca da conformação farmacofórica alguns procedimentos têm sido usados: modelagem molecular e busca da conformação de menor energia; estrutura do complexo formado entre o alvo molecular e o ligante determinada por cristalografia de raios X; comparação estrutural de compostos ativos utilizando similaridade e superposição e ancoragem molecular (*docking*) manual ou

automático. É necessário levar em consideração a flexibilidade do ligante e do alvo como também as moléculas de água presentes. A análise da flexibilidade do alvo é mais difícil de ser realizada uma vez que normalmente estas são macromoléculas de alto peso molecular e com vários graus de liberdade.

A água é um fator importante na interação de fármacos com seu alvo uma vez que o meio celular é aquoso e a água solvata o ligante e o seu alvo. Para que ocorra a interação é necessário dispêndio de energia para a dessolvatação de ambos, se o gasto de energia para dessolvatação é maior que o ganho na interação, o processo pode não ser efetivo. No entanto, a interação pode levar a um aumento entrópico, uma vez que as moléculas de água “ligadas” são liberadas para o meio favorecendo o sistema (Patrick, 2005).

1.3- Quimioinformática

A quimioinformática utiliza métodos computacionais para cálculo das propriedades moleculares para simulação do comportamento molecular (Xu; Hagler, 2002; Wishart, 2005) e, de uma forma geral, pode ser utilizada no planejamento de síntese, pesquisa em bancos de dados, elucidação estrutural baseada em dados espectroscópicos, modelagem molecular de compostos orgânicos e inorgânicos e simulação de sistemas biológicos. De uma forma mais sintética podemos dizer que é a aplicação de métodos da informática para resolver problemas químicos (Gasteiger, 2006).

No planejamento de novas substâncias bioativas a quimioinformática pode ser utilizada para:

- Otimização da molécula líder utilizando procedimentos de análise de reconhecimento de padrão, QSAR (do inglês quantitative structure activity relationship) e SAR (do inglês structure activity relationship);
- Definição e análise da diversidade estrutural;
- Cálculo de propriedades farmacocinéticas de fármacos;
- Predição de metabolismo de xenobióticos;
- Análise da interação ou ligação do ligante com alvo biológico através de técnicas de ancoragem molecular.

A utilização da quimioinformática na descoberta de fármacos é baseada na premissa que o conhecimento da estrutura dos compostos ativos e inativos e/ou seus alvos, pode levar à otimização do composto líder (Ghose et al., 2006). A

estratégia a ser utilizada dependerá dos conhecimentos que se têm do alvo e dos ligantes.

Pode-se ter diferentes tipos de aproximação para a obtenção de novos fármacos utilizando a quimioinformática. Podemos citar, como exemplo, o esquema geral proposto por Ghose e colaboradores (2006) para o planejamento de fármacos cujo alvo molecular é conhecido (Figura 1.7).

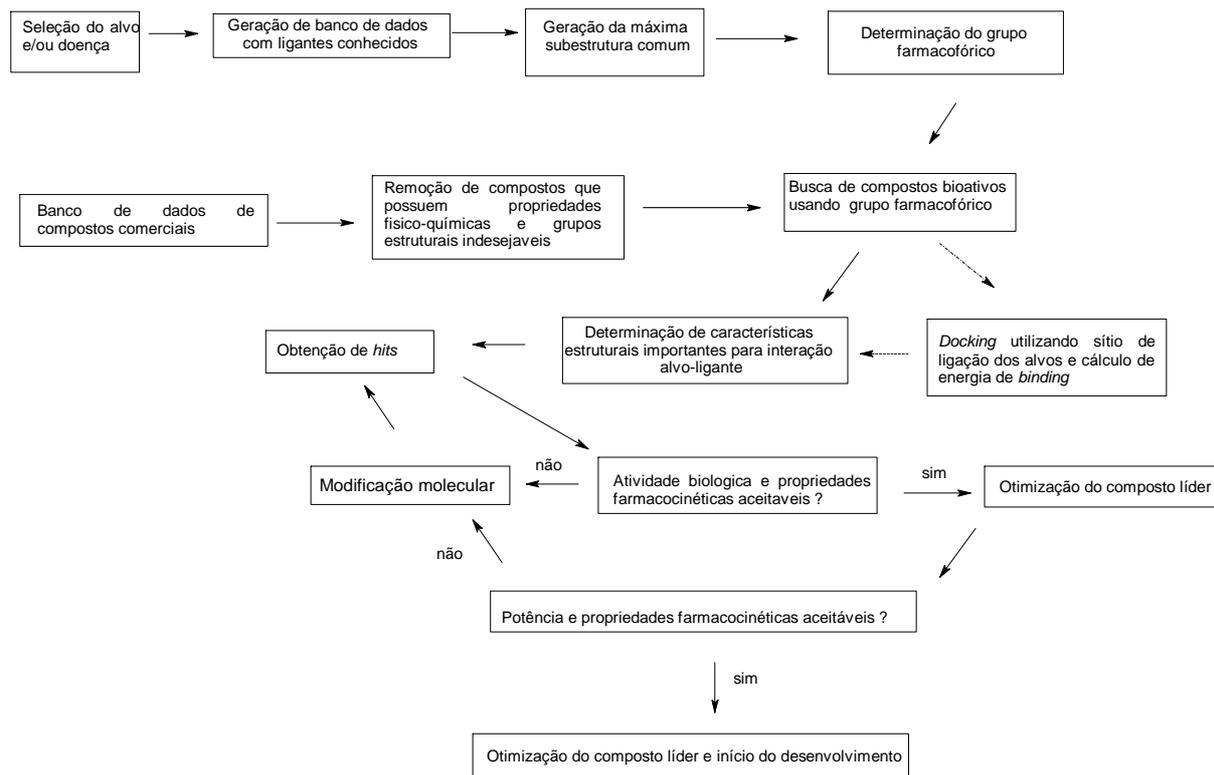


Figura 1.7 – Utilização da quimioinformática no descobrimento de fármacos

Fonte: Adaptado de Ghose et al., 2006

1.4- Banco de dados de estruturas moleculares

A determinação do alvo biológico é uma das etapas importantes na busca de fármacos. Existem bancos de dados públicos e comerciais, de estruturas de ligantes e de alvos biológicos. Podemos citar o PDB (*The Protein Data Bank*), DrugBank, NDB (*Nucleic Acid Database*), UniProtKB (*Universal Protein Resource*), PharmGKB, TTD (*Therapeutic Target Database*), e CSD (*The Cambridge Structural Database*). Todos os bancos citados com exceção do CSD são bancos de acesso livre.

O PDB é um dos maiores, mais completos e utilizados bancos de estruturas moleculares, possuindo informações sobre estruturas 3D de moléculas biológicas, incluindo proteínas e ácidos nucleicos, de diferentes organismos (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

O DrugBank contém informações sobre fármacos, seus alvos e outros dados farmacocinéticos e farmacológicos (dados experimentais de ADME, interações, farmacologia, farmacogenômica). A última versão (release 2.0) contém aproximadamente 1565 proteínas e/ou sequências de alvos terapêuticos (<http://www.drugbank.ca>).

No NDB encontram-se 3.757 estruturas 3D de ácidos nucleicos obtidas da difração de raios X e ressonância magnética nuclear (RMN) (<http://ndbserver.rutgers.edu/index.html>).

O UniProt (<http://www.ebi.ac.uk/swissprot/>) é um banco de dados de proteínas (descrição da função da proteína, seus domínios, variantes, etc), que foi desenvolvido pelos grupos EBI (*European Bioinformatics Institute*), SIB (*Swiss Institute of Bioinformatics*) e PIR (*Protein Information Resource*).

PharmGKB é um banco de dados de uso público desenvolvido pela Universidade de Stanford financiado por *National Institutes of Health (NIH)* e *Pharmacogenetics Research Network (PGRN)*, que contém informações sobre as relações entre fármacos, doenças e genes incluindo seus variantes. Seu principal objetivo é reunir informações sobre farmacogenômica (<http://www.pharmgkb.org/>).

O TTD contém informações sobre as proteínas e os ácidos nucleicos (alvos terapêuticos validados ou em desenvolvimento) descritos na literatura, fármacos e ligantes de cada um destes alvos (<http://xin.cz3.nus.edu.sg/group/ttd/ttd.asp>).

O CSD possui informações sobre estrutura cristalina e propriedades químicas de, aproximadamente, 400.000 compostos orgânicos inclusive complexos de coordenação metal-ligante. As estruturas foram obtidas por difração de raios X e difração de nêutrons (<http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/csd/>).

1.5- Modelagem molecular

Segundo a IUPAC (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/medchem>) a modelagem molecular é a investigação das estruturas e propriedades moleculares pelo uso da química computacional e das técnicas de visualização gráfica, visando obter as representações 3D gráficas das estruturas e suas propriedades).

Métodos matemáticos de cálculo baseados na mecânica molecular e mecânica quântica são utilizados para o cálculo das propriedades moleculares.

Na mecânica molecular (MM), a molécula é tratada como uma série de esferas (átomos) ligadas por molas (ligações). Equações derivadas da mecânica clássica (equações de Newton) são usadas para calcular as diferentes interações e energias resultantes, associadas ao estiramento e às deformações de ligações. Utilizam-se campos de força que constituídos por um somatório de termos de energia relacionados às posições de equilíbrio de um sistema: distância e ângulos de ligação, ângulos diedros, interações de van der waals, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas. Em geral, as constantes de força são avaliadas por meio de dados espectrométricos. Existem vários pacotes de programas que utilizam campos de força baseados na mecânica molecular, entre eles o AMBER (*Assisted Model Building with Energy Refinement*), CHARMM, DISCOVER, CFF95, OPLS (Hobza et al., 1997) nos quais utilizam diferentes funções de energia potencial para representar a energia interna de uma molécula.

O campo de força AMBER é um dos mais usados devido à sua simplicidade e à qualidade dos resultados obtidos. Este pacote foi desenvolvido para proteínas, ácidos nucleicos e moléculas orgânicas e pode ser expresso pela equação a seguir (Weiner et al., 1984; Rocha, 1998).

$$E_{\text{pot}} = \sum_{\text{ligação}} K_r (r - r_0)^2 + \sum_{\text{ângulo}} K_{\theta} (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{diedro}} V_n/2 (1 + \cos(n\phi - \gamma)) + \sum_{\text{vdw}} |A_{ij}/R_{ij}^{12} - B_{ij}/R_{ij}^6| + \sum_{\text{eletros}} q_i q_j / \epsilon R_{ij} + \sum_{\text{lig H}} |C_{ij}/R_{ij}^{12} - D_{ij}/R_{ij}^{10}|$$

Equação 1.1

A Equação 1.2 (primeiro termo da Equação 1.1) descreve a variação da energia potencial em função da deformação radial de ligações covalentes.

$$\sum_{\text{ligação}} K_r (r - r_0)^2$$

Equação 1.2

Onde K_r = constante de potencial; r = distância de ligação; r_0 = distância de ligação de equilíbrio

A Equação 1.3 (segundo termo da Equação 1.1) descreve a variação de energia com a deformação de ângulos de ligação.

$$\sum_{\text{ângulo}} K_{\theta} (\theta - \theta_0)^2$$

Equação 1.3

Onde κ_θ = constante de potencial; θ = ângulo de ligação; θ_0 ângulo de ligação de equilíbrio.

O termo expresso pela Equação 1.4 descreve a variação de energia com a torção de ângulos diedros.

$$\sum_{\text{diedro}} V_n/2 (1 + \cos (n\phi - \gamma))$$

Equação 1.4

onde $V_n/2$ = constante de potencial; n = periodicidade; ϕ ângulo diedro; γ = fase

O termo expresso pela Equação 1.5 simula as interações de van der Waals é conhecida como potencial de Lennard Jones

$$\sum_{\text{vdw}} |A_{ij}/R_{ij}^{12} - B_{ij}/R_{ij}^6|$$

Equação 1.5

Onde R_{ij} = distância entre átomos i e j ; A_i e B_{ij} são parâmetros de van der Waals para interações entre pares de átomos. O termo R^6 descreve as interações atrativas e o termo R^{12} descreve as interações repulsivas

O termo expresso pela Equação 1.6 descreve as interações eletrostáticas.

$$\sum_{\text{eletros}} q_i q_j / \epsilon R_{ij}$$

Equação 1.6

Onde q_i e q_j são cargas dos átomos i e j ; R_{ij} é a distancia entre os átomos i e j ; ϵ é a constante dielétrica do meio.

A equação 1.7 descreve um termo de potencial 10-12 para pares de átomos que podem participar de ligações de hidrogênio.

$$\sum_{\text{lig H}} |C_{ij}/R_{ij}^{12} - D_{ij}/R_{ij}^{10}|$$

Equação 1.7

Onde R_{ij} é a distância entre os átomos i e j ; C_{ij} e D_{ij} são parâmetros de van der Waals para interações entre pares de átomos.

Cabe ressaltar que a energia potencial total calculada (E_{pot}) utilizando o campo de força AMBER, e em outros campos de força, não possui um significado físico, podendo apenas ser utilizada para comparações de estabilidade entre conformações de uma mesma molécula ou para comparação de moléculas diferentes, desde que se utilizem os mesmos parâmetros nos cálculos (Rocha, 1998).

Nos métodos quanto-mecânicos utilizam-se as equações da mecânica quântica para descrição da molécula. As propriedades são calculadas

considerando as interações entre os elétrons e o núcleo, com maior precisão dos resultados, além de fornecer informações sobre a estrutura eletrônica, que não é considerada de forma explícita na mecânica molecular (Raha et al., 2007). Os métodos quânticos podem ser divididos em semi-empíricos e *ab initio*. No primeiro método, a molécula é estudada por meio da equação de Schrödinger e contém aproximações para algumas integrais, que surgem ao longo dos cálculos. No segundo método, a molécula também é descrita pela equação de Schrödinger, mas os cálculos não têm aproximações para as integrais (Patrick, 2005). O método *ab initio* é empregado apenas para moléculas pequenas, pois requer muita capacidade de memória e tempo computacional, consideravelmente, longo (Barreiro et al., 1997).

Pode-se citar como pacotes de programas que utilizam os métodos quânticos o AMPAC e o MOPAC. Este último (MOPAC v. 7.0. IN 47405) tem sido usado para prever as mais variadas propriedades dos sistemas biológicos, tais como, cargas parciais atômicas, momento de dipolo, potencial de van der Waals e ordens de ligação (Hobza et al., 1997). A aplicação dos diferentes métodos é determinada pelo equilíbrio entre a precisão necessária e o tempo de máquina bem como pela complexidade do sistema analisado (Raha et al., 2007; Zhou et al., 2008).

1.6- Minimização de energia

A minimização de energia é uma técnica de modelagem molecular, que tem como objetivo obter a conformação mais estável de uma molécula (Rocha, 1998). O processo de minimização de energia é feito usualmente utilizando-se programas de minimização de função, que calculam a energia de partida de uma molécula, variando os comprimentos de ligação, os ângulos de ligação e os de torção, levando a novas conformações energeticamente mais estáveis (Patrick, 2005). No entanto, algumas vezes a conformação encontrada é apenas uma conformação de mínimo local de energia (Figura 1.8, pag. 14). Os programas de minimização não têm como identificar se a conformação encontrada corresponde ao mínimo local ou mínimo global. Desta forma, para identificar a conformação mais estável é necessário gerar diferentes conformações utilizando técnicas de busca conformacional. Esta busca pode ser realizada de diferentes maneiras como, por exemplo, alterando sistematicamente todos os ângulos e comprimentos

de ligação (busca sistemática), utilizando métodos estocásticos como algoritmo genético e Monte Carlo (Patrick, 2005) ou utilizando dinâmica molecular.

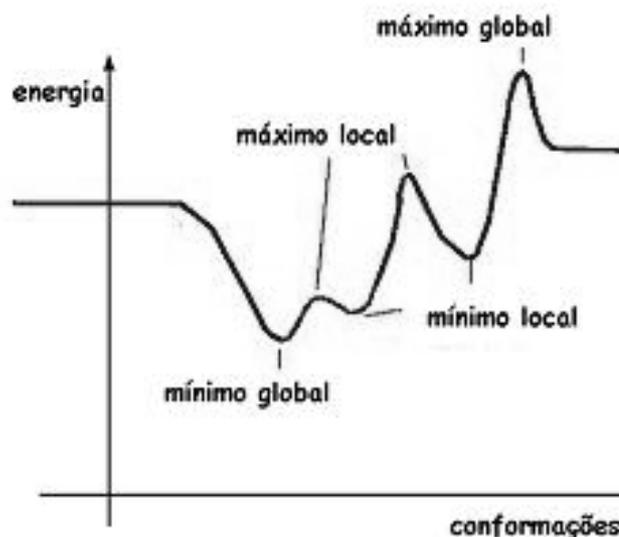


Figura 1.8 - Representação gráfica dos níveis de energia e conformações moleculares no processo de minimização molecular.

Fonte: Patrick, 2005

Os algoritmos utilizados para minimizar a energia de um sistema incluem técnicas de primeira ou segunda ordem. No primeiro método, utilizam-se derivadas primeiras da energia com relação às coordenadas, como por exemplo, o procedimento de declive máximo (*steepest descent*) e de gradiente conjugado. No segundo método são utilizadas derivadas de segunda ordem com relação às coordenadas como os procedimentos de Newton-Raphson ou quasi-Newton. Em sistemas moleculares pequenos, geralmente, se utilizam nos primeiros 100 ciclos de minimização técnicas de primeira ordem como, por exemplo, o algoritmo de declive máximo, por ser um método mais rápido. Em seguida utilizam-se métodos com derivadas de segunda ordem como, por exemplo, o procedimento de Newton-Raphson. Em sistemas muito grandes, como as macromoléculas, o método de escolha é o gradiente conjugado (Rocha, 1998).

1.7- Busca conformacional

A busca conformacional tem como objetivo a exploração do espaço conformacional de uma molécula, sendo que algumas vezes esta é uma tarefa muito difícil devido ao tamanho e flexibilidade da molécula. Vários procedimentos podem ser usados na busca conformacional, dentre os quais podemos citar:

busca sistemática, dinâmica molecular, Monte Carlo, anelação simulada (*Simulated annealing*) e algoritmo genético.

Na busca sistemática, os ângulos torcionais podem ser girados sistematicamente até cobrir todo o espaço conformacional e/ou podem ser girados apenas aqueles ângulos que são determinados previamente (Leach, 2001).

A dinâmica molecular (Jensen, 1999) é um procedimento que simula o movimento dos átomos nas moléculas, utilizando as equações de Newton. Durante o procedimento de dinâmica, o sistema sofre mudanças conformacionais (coordenadas atômicas). As forças que atuam na molécula são calculadas considerando o comprimento de ligação, ângulo de ligação, termos funcionais e interações não ligantes. A dinâmica pode ser usada para gerar diferentes conformações por aquecimento da molécula. Como resultado, a barreira de energia entre diferentes conformações é superada (Namba et al., 2008).

A técnica de Monte Carlo permite uma busca aleatória de conformações, geradas por alteração da posição do átomo em relação a outro. A energia potencial destas conformações é calculada. Este método é utilizado para moléculas com poucos graus de liberdade (Leach, 2001).

No método de anelação simulada, inicialmente o sistema está em altas temperaturas, o que permite que ocorram muitas variações conformacionais. Gradativamente, a temperatura vai sendo abaixada segundo um programa pré-determinado de resfriamento, permitindo que o sistema volte ao equilíbrio, até que mínimos locais ou mínimo global sejam encontrados (Rocha, 1998; Walter, 2004).

O algoritmo genético é um tipo de algoritmo evolutivo, que utiliza técnicas inspiradas pela biologia evolutiva como a hereditariedade, a mutação, a seleção natural e a recombinação (ou *crossing over*). Este método foi proposto na década de 60 por John H. Holland, que pretendia simular matematicamente todo o mecanismo da evolução biológica (Costa Filho ; Poppi, 1999; Ferreira et al., 2002). Algoritmos genéticos são implementados como uma simulação, em que uma população de representações abstratas de solução é selecionada em busca de soluções melhores. A evolução, geralmente, se inicia a partir de um conjunto de soluções criado aleatoriamente e é realizada através de gerações. A cada geração, a adaptação de cada solução na população é avaliada e alguns indivíduos são selecionados para a próxima geração, recombinados ou mutados

para formar uma nova população. Essa nova população então é utilizada como entrada para a próxima geração do algoritmo (Costa Filho ; Poppi, 1999).

1.8- Ancoragem molecular e *scoring*

Estudos da interação entre os ligantes e o alvo biológico (Figura 1.9) são importantes para o entendimento de como estes ocorrem e de quais são os fatores envolvidos (tipo de interação, fatores estereoquímicos, tamanho molecular) nessa interação (Kitchen et al., 2004). O método de ancoragem molecular tenta simular esta interação alvo-ligante (Halperin et al., 2002; Doman, et al., 2002; Kitchen et al., 2004).

Neste procedimento, bibliotecas virtuais de ligantes potenciais são construídas, cada ligante é posicionado no sítio de ligação e a classificação é feita considerando a energia de interação calculada (*scoring*) pelos programas (Haperin et al., 2002; Doman et al., 2002; Kitchen et al., 2004).

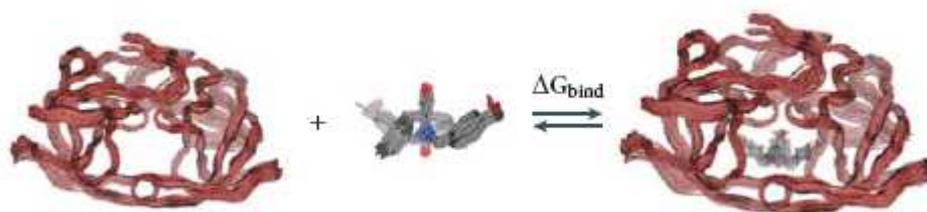


Figura 1.9 - Representação da interação ligante-alvo

Fonte: Kitchen et al., 2004

Existem vários programas utilizados para a realização da ancoragem molecular dentre os quais podemos citar: Dock, Surflex, Flex X, Glide, Gold (Kellenberger et al., 2004; Kontoyianni et al., 2004). É difícil determinar qual é o melhor programa uma vez que os resultados obtidos dependerão do grupo de dados, das estruturas dos alvos e das versões dos programas. Em geral, os melhores resultados são obtidos empregando o *scoring* de consenso isto é, a aplicação de múltiplas funções para a mesma estrutura e a escolha daquele composto, que os vários programas indicam ser o melhor (José, 2007). Para se propor novas substâncias bioativas, determinar o composto líder ou propor novas modificações neste composto (Klebe, 2006), as informações obtidas da ancoragem molecular podem ser combinadas com outras técnicas computacionais como QSAR e SAR.

Inicialmente, os métodos de ancoragem molecular eram baseados no princípio da chave-fechadura e, este era focado no uso de critérios geométricos, para determinar o grau de complementaridade entre ligante e o sítio de ligação. As funções de *scoring* baseadas em campos de força de mecânica molecular foram introduzidas para se fazer uma estimativa da interação proteína-ligante. Várias aproximações que levam em consideração informações químicas foram introduzidas. Estas informações orientam o ligante dentro do sítio de ligação, levando a um aumento da eficiência do método de ancoragem molecular (Fradera e Mestres, 2004).

Warren e colaboradores (2006) avaliaram dez programas de ancoragem molecular e 37 funções de *scoring* para determinar qual era a conformação que melhor completava o sítio de ligação de proteínas. Neste estudo, foram utilizadas oito proteínas e cerca de 138-219 compostos para cada alvo. Eles mostraram que não existe relação estatisticamente significativa entre *scores* obtidos nos estudos de ancoragem molecular e afinidade dos ligantes. No entanto, os programas foram capazes de reproduzir o modo de ligação observado e em muitos casos identificar o modo de ligação. Em grande parte dos trabalhos utilizando ancoragem molecular as proteínas são utilizados como alvos biológicos (Evans; Neidle, 2006). No entanto, a fenda menor do ADN é também um alvo importante e tem sido utilizada em diversos trabalhos (Jenkins et al., 1993; Montanari et al., 1998; Rocha, 1998; Oliveira et al., 2003; Campbell et al., 2006; Evans; Neidle, 2006; Wang; Laugton, 2007).

Análises de ancoragem molecular utilizadas para o estudo da interação entre ligantes e ADN indicam a afinidade relativa de diferentes ligantes frente ao ADN e a especificidade de ligação, por certas sequências nucleotídicas. O entendimento da interação ADN-ligante a nível molecular usando métodos computacionais tem sido utilizado junto com a aproximação experimental (Baginski et al., 2002). Estas são técnicas complementares e não excludentes. Em muitos casos, a energia livre experimental e estudos de ancoragem molecular virtual não convergem entre si. Usualmente, a energia livre experimental da ligação ADN-ligante é determinada utilizando ADN do timo de bezerro, enquanto na ancoragem molecular virtual dos complexos são utilizados pequenos fragmentos do ADN. Em ambos os casos a sequência e a estrutura molecular dos

complexos, a posição do ligante e seu sítio de localização no ADN podem ser diferentes.

1.9 - Água em sistemas biológicos e modelagem molecular

Nos organismos as biomoléculas estão envolvidas por moléculas de água e isto pode afetar a estabilidade relativa de diferentes conformações (Patrick, 2005). Existem casos em que as moléculas de água podem ser deslocadas, levando a um aumento da afinidade de ligação e/ou interação e um ganho entrópico, associado com a liberação de moléculas de água ordenadas. A molécula de água pode estabilizar o complexo entre a proteína e o ligante por formação de ligação de hidrogênio entre os dois componentes. Em outros casos, o deslocamento de moléculas de água está associado com a diminuição da afinidade de ligação e/ou interação dos ligantes com os alvos (Barillari et al., 2007).

O principal problema a ser considerado com as moléculas de água em planejamento racional de fármacos é saber quais moléculas são importantes na mediação na interação entre o alvo e o ligante e quais podem ser deslocadas (Barillari et al., 2007).

Desta forma, é aconselhável incluir moléculas de água no sistema a ser modelado. No campo de força AMBER (Rocha, 1998), o efeito de blindagem do solvente nas interações eletrostáticas a longa distância foi, primeiramente, incorporado incluindo uma constante dielétrica no termo que representa as interações (Equação 1.6, pag 12). No entanto, este tratamento simples pode superestimar as forças entre cargas a longa distância. Uma pequena correção utilizada consiste no uso de uma constante dielétrica dependente da distância.

1.10- Cargas parciais

Os elétrons de uma molécula estão, na maior parte do tempo, mais perto de um átomo mais eletronegativo do que de um eletropositivo, resultando em uma distribuição não uniforme de elétrons. Assim, algumas partes da molécula estão com cargas parciais positivas, enquanto outras, com cargas parciais negativas (Patrick, 2005). Podem-se citar alguns critérios desejáveis para classificar as cargas atômicas calculadas, teoricamente, como satisfatórias:

- A soma das cargas de todos os átomos na molécula deve resultar na carga total da molécula;
- As cargas devem refletir a simetria da molécula;

- As cargas devem ser consistentes com a eletronegatividade atômica;
- As cargas devem reproduzir satisfatoriamente o momento de dipolo e o potencial eletrostático molecular (ESP do *inglês electrostatic potential*).

O método de cálculo de cargas atômicas, derivadas do potencial eletrostático, baseia-se no cálculo de cargas pontuais diretamente da função de onda molecular. O cálculo de cargas é muito importante para as simulações de interações intermoleculares (Guadagnini ; Bruns, 1996), uma vez que elas são determinantes para as interações.

1.11- Estudos de relação estrutura-atividade (SAR)

O primeiro objetivo dos estudos de SAR na busca de novos fármacos é possibilitar predições de propriedades desejadas (atividade biológica, comportamento farmacocinético, toxicidade ou mesmo uma propriedade físico-química) de compostos líderes, candidatos a estudos pré-clínicos e clínicos, sendo uma ajuda para o desenho racional. Estes estudos podem auxiliar na identificação de grupos funcionais ou subestruturas que são importantes para o reconhecimento molecular, possibilitando a obtenção de novos compostos com melhor índice terapêutico e propriedades de ADME (adsorção, distribuição, metabolismo e excreção) assim como maior eficácia (menor dose para o mesmo efeito) com menores efeitos indesejáveis.

Os estudos de SAR utilizam técnicas quimiométricas. A quimiometria é definida como a disciplina que utiliza métodos estatísticos e matemáticos para selecionar e otimizar métodos preparativos e analíticos bem como procedimentos de análise e interpretação de dados (Sant'Anna, 2002).

1.11.1- Reconhecimento de padrões

Os métodos de reconhecimento de padrões podem ser aplicados com diferentes finalidades, entre elas pode-se citar a classificação de compostos, a detecção de padrões de agrupamento no conjunto de dados (como, por exemplo, a separação de compostos ativos de inativos) e a determinação de parâmetros importantes na separação de compostos em grupos. Entre os vários métodos quimiométricos utilizados podemos citar a Análise de Componentes Principais (PCA), análise por Agrupamento Hierárquico (HCA), Regra dos Vizinhos Mais Próximos (KNN) e SIMCA (*Soft Independent Modelling of Class Analogy*).

1.11.2- Análise de componentes principais (PCA- *Principal Components Analysis*)

O principal objetivo da PCA é reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados preservando ao mesmo tempo o máximo de informação (Barros Neto et al., 2006). As componentes principais podem ser consideradas como novas variáveis criadas a partir da combinação linear das variáveis originais, como mostrado na equação:

$$PC1 = a_{1,1}v_1 + a_{1,2}v_2 + a_{1,3}v_3 + a_{1,4}v_4 + a_{1,n}v_n \quad \text{Equação 1.8}$$

$$PC2 = a_{2,1}v_1 + a_{2,2}v_2 + a_{2,3}v_3 + a_{2,4}v_4 + a_{2,n}v_n \quad \text{Equação 1.9}$$

Onde:

v= variável; a= contribuição de cada variável original (*loadings*).

A resolução das PC's são os escores. As PC's são definidas em ordem decrescente da quantidade de variância que são capazes de explicar. A PC1 explica o máximo de variância (ou seja, informação máxima) do grupo de dados. A informação de quanto cada descritor contribui para a componente principal está contida nos pesos (Ferreira et al., 2002). Todas as componentes principais são ortogonais, sendo que a atividade biológica não é considerada diretamente.

Os resultados da PCA costumam ser visualizados em gráficos (Figura 1.10, pag. 21), facilitando a identificação de grupamentos.

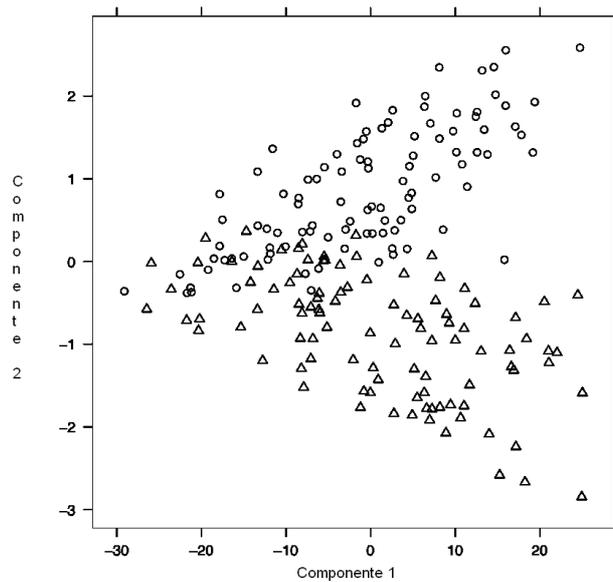


Figura 1.10 – Exemplo de uma representação gráfica da componente 1 versus componente 2 obtido na PCA, onde se observa a separação dos compostos representados por círculos dos compostos representados por triângulos

Fonte: http://www.bioinformaticszen.com/wp-content/uploads/2007/07/first_pca_components.png

1.11.3- Análise por agrupamento hierárquico (HCA - *Hierarchical Cluster Analysis*)

O HCA tem como objetivo agrupar os dados de forma a identificar semelhanças entre objetos de forma hierárquica. A base desta análise é o cálculo da distância entre os objetos em um espaço multidimensional usando medidas de distância como, por exemplo, a Euclidiana. Estas distâncias são usadas para produzir um diagrama conhecido como dendrograma, o qual permite a identificação de grupos (Levingstone, 1995). Os resultados são de natureza qualitativa (Figura 1.11).

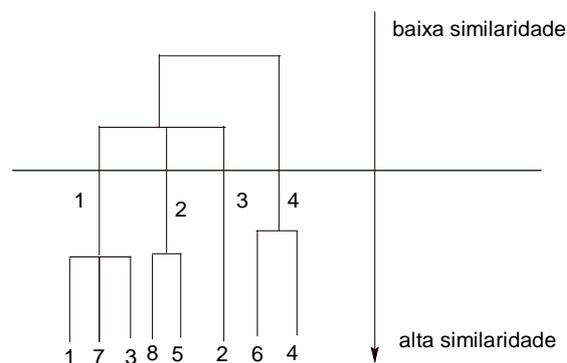


Figura 1.11 – Exemplo de uma representação do diagrama tipo dendrograma onde observamos formação de 4 grupos considerando similaridade de 50%

1.11.4- Regra dos vizinhos mais próximos (KNN- *K-Nearest Neighbors*)

O ponto de partida para a técnica de KNN (Figura 1.12) é o cálculo da distância entre a amostra a ser classificada e os seus vizinhos. Medidas de distâncias são utilizadas para expressar a similaridade entre compostos. A classificação de um composto desconhecido (K) na matriz de distância é feita considerando a classificação a seu vizinho mais próximo.

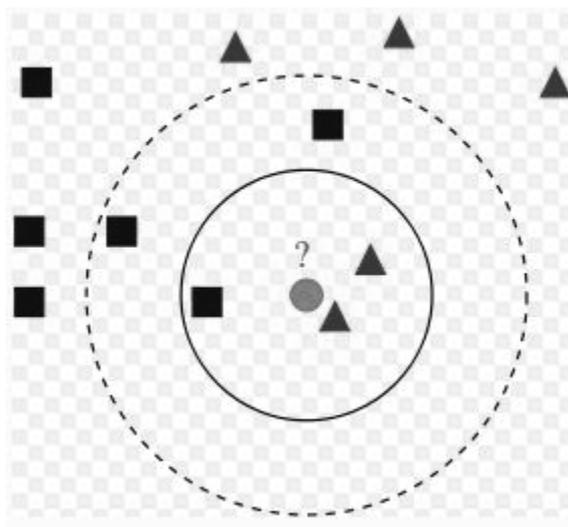


Figura 1.12 - Classificação de um composto desconhecido (K) utilizando a técnica KNN. O círculo foi classificado na categoria dos triângulos devido a proximidade destas figuras.

Fonte: https://www.projectrhea.org/rhea/index.php/Lecture_16_-_Parzen_Window_Method_and_K-nearest_Neighbor_Density_Estimate_Old_Kiwi

1.11.5- SIMCA (*Soft Independent Modelling of Class Analogy* ou *SIMple Classification Analysis*)

Os compostos são classificados e adequados a uma caixa (ou hiper-box de n-dimensões) com tantas dimensões quantas forem o número de PC's mais adequados para cada classe. A classificação é acompanhada pela projeção dos dados dos compostos testes dentro dos grupos dos compostos do grupo de treino. Essa classificação (Figura 1.13, pag. 23) é determinada pela magnitude dos resultados dos desvios padrões residuais (Waterbeemd, 1995; Levingston, 1995).

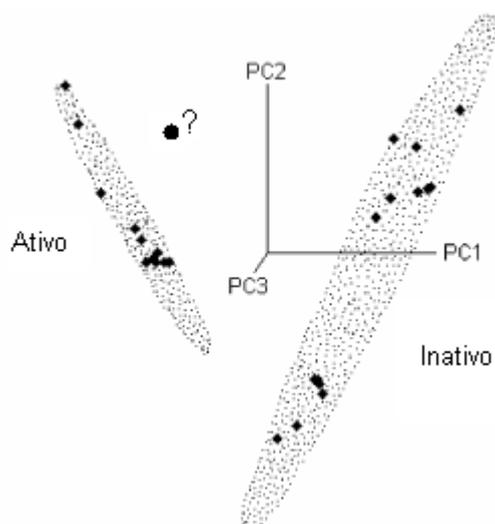


Figura 1.13 - Representação gráfica do SIMCA onde se observa a separação em dois grupos (ativos e inativos). O composto representado por uma bolinha será classificado segundo a distância que estará dos diferentes grupos

Fonte: Ferreira, 2002

1.11.6- Análise de regressão

Análise de regressão é uma metodologia estatística que utiliza a relação entre duas ou mais variáveis quantitativas (ou qualitativas) de forma que uma variável pode ser predita a partir da outra ou outras.

O modelo linear (Figura 1.14, pag 24) é uma combinação linear de variáveis independentes (X) capaz de “explicar”, da melhor forma possível, o fenômeno observado (Y) para um grupo de substâncias segundo a equação:

$$Y = aX + b$$

Equação 1.10

Onde:

Y= fenômeno observado, variável dependente

X= variável independente

b= constante de ajuste

A regressão múltipla linear (RML do inglês *regression multiple linear*) e mínimos quadrados parciais (PLS do inglês *partial least squares*) são funções matemáticas utilizadas para construir modelos lineares. A RML é mais usada quando se tem menos descritores que o número de moléculas e o PLS é utilizado quando o número de variáveis excede o número de amostras e muitas vezes,

quando os métodos de RML não são adequados. Historicamente, o método de RML tem sido mais utilizado devido à sua simplicidade e à facilidade de interpretação dos resultados (Ferreira et al, 2002).

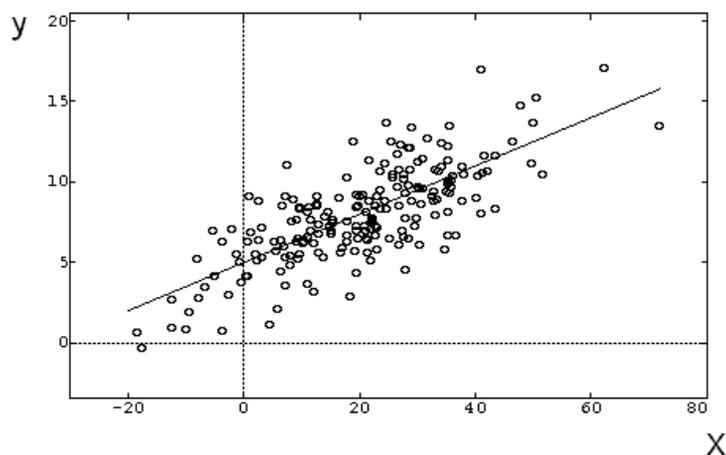


Figura 1.14 - Representação gráfica de análise por correlação onde no eixo X temos a variável independente e no eixo Y a variável dependente

Fonte: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Linear_regression.png

A idéia geral do método de PLS é extrair as “variáveis latentes”, ou seja, aquelas que contribuem mais para o modelo, por exemplo, a PCA. O procedimento de cálculo da PLS exclui as variáveis que não têm significado para o modelo.

A PLS oferece vantagens sobre a RML. Essa última não é sensível à colinearidade entre duas variáveis sendo que na aplicação desta técnica, se há um grupo de variáveis altamente correlacionadas, os coeficientes de regressão podem se tornar instáveis e sem significado. Na PLS, a razão entre o número de descritores e o número de compostos não é limitada como na RML, que requer mais compostos que descritores. A RML está fundamentada no fato de que todas as variáveis são importantes para o problema, ou seja, a dimensionalidade é fixada *a priori* e não exclui nenhuma variável (Ferreira et al., 2002; Patrick, 2005).

1.11.7- Relação quantitativa estrutura-atividade (QSAR- *Quantitative Structure Activity Relation*)

Em combinação com outras ferramentas da quimioinformática, os estudos de QSAR podem proporcionar uma ajuda no entendimento do mecanismo de ação de fármacos, podendo ser utilizado para a triagem de compostos bioativos em banco de dados (Golbraikh et al., 2000).

A pesquisa em QSAR tem como principal objetivo a construção de modelos matemáticos que relacionam a estrutura química e a atividade biológica de uma série de compostos análogos. Em geral, esses compostos diferem entre si pela presença de um ou mais grupos substituintes em posições definidas da estrutura química comum à série (Ferreira et al., 2002). Este modelo deve ser capaz tanto de explicar o fenômeno observado quanto de proporcionar previsões dentro e, se possível, fora dos limites observados (Gáudio e Zandonade, 2001).

Nos estudos de QSAR a atividade biológica (variável dependente) é correlacionada com descritores físico-químicos (variável independente), utilizando funções matemáticas. Existem cinco aspectos importantes nos estudos de QSAR:

1. o sistema biológico de interesse;
2. os compostos bioativos;
3. a resposta biológica apresentada pelo composto quando exposto ao alvo biológico;
4. os descritores físico-químicos (variável independente) ;
5. os modelos matemáticos, ou de simulação, obtidos.

A estratégia para o desenvolvimento de uma QSAR é composta de 5 etapas: seleção de compostos, seleção dos compostos do grupo de treino e do grupo de teste, seleção e cálculo dos parâmetros físico-químicos, desenvolvimento da equação de QSAR, validação e predição dos valores de atividade para os compostos não testados.

Os compostos que serão usados na análise deverão ser estruturalmente similares e possuir o mesmo mecanismo de ação para a atividade biológica desejada. Além disso, os dados biológicos devem ter variância adequada.

Nos estudos de QSAR utilizam-se dois grupos de compostos chamados de grupo de treino e grupo de testes. O primeiro grupo é utilizado para obter o modelo, por meio de técnicas estatísticas de correlação. O segundo grupo é utilizado para validar o modelo de QSAR obtido. Os compostos do grupo de testes devem ser similares aos compostos do grupo de treino. Substâncias que são muito diferentes podem não ter a sua atividade biológica predita de forma adequada (Muegge ; Oloff, 2006). O grupo de teste deve ter no mínimo 30% de compostos em relação ao grupo de treino e ambos os grupos devem conter compostos representativos das estruturas e atividades analisadas.

Os estudos de QSAR, normalmente, seguem as seguintes etapas: Inicialmente as moléculas dos dois grupos são desenhadas e as cargas moleculares são calculadas utilizando programas de modelagem molecular. Deve ser observada a protonação do ligante e as suas formas tautoméricas. Os descritores físico-químicos, usados para representar as propriedades estruturais das moléculas, são calculados. Os mais usualmente utilizados são os hidrofóbicos, estereoquímicos e eletrônicos. Os programas utilizados para estes cálculos podem ser comerciais (por exemplo, Tsar) ou públicos (por exemplo, Dragon). A seleção correta dos descritores a serem empregados irá depender de um entendimento do problema a ser resolvido.

A seleção dos descritores deve seguir alguns critérios (Ferreira et al., 2002):

- devem estar correlacionados com a atividade biológica considerada;
- devem ser informativos (variância na distribuição de valor);
- não devem ser correlacionados;
- devem ter algum significado químico.

Na etapa de desenvolvimento da QSAR o principal objetivo é calcular a melhor expressão matemática, correlacionando a atividade com os parâmetros físico-químicos. São utilizadas técnicas estatísticas multivariadas e os modelos obtidos podem ser lineares ou não. Para se obter modelos lineares são utilizadas RML e PLS descritos anteriormente.

QSAR CLÁSSICO

Um artigo considerado por muitos como um dos marcos no desenvolvimento de QSAR (Gáudio; Zandonade, 2001) foi o de Unger; Hansh publicado em 1973, onde foram estabelecidas as regras gerais para a elaboração e validação dos modelos matemáticos que correlacionam estrutura química com a atividade biológica. Foram estabelecidas 5 regras gerais para a proposição de modelos matemáticos de QSAR:

1. deve-se testar grande número de variáveis independentes: variáveis de natureza lipofílica, eletrônica, estereoquímica, de polarizabilidade, geradas a partir de cálculos de mecânica quântica e outras. As variáveis selecionadas não devem ser correlacionadas (Gáudio; Zandonade, 2001). A decisão sobre o valor limite da

correlação entre duas variáveis é do pesquisador. Em QSAR costuma-se evitar combinações em que o coeficiente de correlação (r) é maior ou igual a 0,6 (Ferreira et al., 2002);

1. o modelo deve ser validado utilizando-se técnicas estatísticas tais como o teste de F;
2. quando houver dúvida na escolha entre modelos equivalentes deve-se escolher o mais simples;
3. para cada variável incluída no modelo deverá ter no mínimo de cinco a seis compostos;
4. o modelo QSAR deve ser consistente com o mecanismo de ação proposto.

A avaliação dos modelos lineares pode ser dividida em três partes: a avaliação do grau de ajuste da reta, a avaliação do grau de significância estatística e a avaliação do grau de previsibilidade.

A avaliação do grau de ajuste da reta é medida em termos de sua capacidade de reproduzir valores da atividade biológica observados. Esta parte da avaliação é feita por meio dos cálculos de coeficientes de correlação (r) do desvio padrão (s) e pela análise de resíduos ($\text{atividade}_{\text{observada}} - \text{atividade}_{\text{prevista}}$). O que se espera é que r seja o mais próximo possível de 1 e que o valor de s seja o mais próximo possível de zero e que os resíduos tenham distribuição normal em torno de zero.

Compostos que apresentam grandes resíduos num modelo de regressão são denominados *outliers* (Collegari, 2003). A análise do motivo do não ajuste do *outlier* ao modelo é importante pois, ele poderá fornecer informações relevantes para a atividade da série de compostos (Gáudio e Zandonade, 2001).

A avaliação do grau de previsibilidade é feita através da validação cruzada. Muitos métodos de QSAR utilizam procedimentos de validação cruzada *leave-one-out* (LOO) ou *leave-some-out* (LSO). O resultado deste procedimento é o coeficiente de correlação cruzada, Q^2 (r_{cv}^2), o qual é comumente considerado como critério de robustez e habilidade de predição do modelo. Um modelo com elevado grau de previsibilidade, apresentará Q^2 próximo a 1 e o desvio próximo de zero (Golbraikh et al., 2000).

Na validação e predição dos valores, a atividade para compostos não testados (grupo de teste e de validação externa) é calculada e as correlações obtidas devem ser analisadas.

As correlações causais, aquelas em que uma mudança na variável independente (**y**) leva uma mudança na variável dependente (**x**), permitem obter um resultado realista. No entanto, pode haver correlações que ocorrem por acaso. O grupo de teste auxilia na detecção destes tipos de problema (Testa, 2000).

Os valores de r^2 e Q^2 podem variar de 0 a 1, onde 1 indica um modelo perfeito e 0 um modelo que não tem relevância. Uma grande discrepância entre r^2 e Q^2 poderá indicar um *overfitting* (ajuste acima) do modelo de QSAR (Collegari, 2003).

O esquema geral da proposição de modelos de QSAR proposto por Gaudio; Zandonade (2001) está apresentado na Figura 1.16.

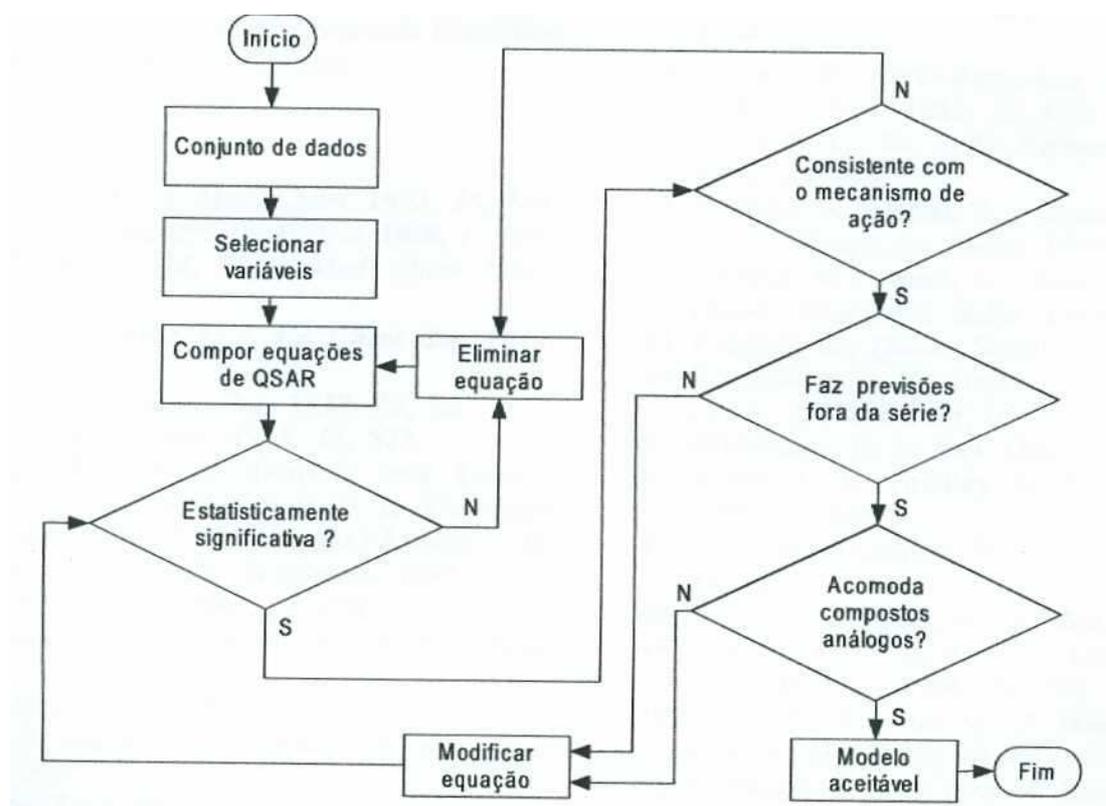


Figura 1.15- Esquema geral de proposição de modelos de QSAR

Fonte: Gaudio ; Zandonade, 2001

QSAR-3D

Os estudos de QSAR-3D levam em consideração os aspectos estereoquímicos da molécula. Vários programas utilizados para realização de análise QSAR - 3D são conhecidos, como por exemplo, CoMFA (do inglês, *Comparative Molecular Field Analysis*), CoMSIA (do inglês, *Comparative Molecular Similarity Index Analysis*), SOMFA (do inglês *Self-Organizing Molecular Field Analysis*) e o Grid.

O CoMFA (Cramer et al., 1988) é um dos métodos mais utilizados. O desenvolvimento desta estratégia é composta por seis etapas: seleção de compostos; seleção dos compostos do grupo treino e do grupo de teste; alinhamento das moléculas, cálculo das energias de interação eletrostática coulômbica e estereoquímica de Lennard-Jones entre uma sonda e a molécula (usadas como descritores); desenvolvimento da equação de QSAR-3D; validação e predição dos valores de atividade para compostos não testados e a construção dos mapas estereoquímico e/ou eletrostático.

A seleção de compostos, do grupo de treino e de teste, é feita da mesma forma que nas análises de QSAR-2D. As moléculas são desenhadas e a carga é calculada (deve ser observado a protonação do ligante e as possíveis formas tautoméricas), logo depois a molécula é alinhada. O alinhamento das moléculas poderá ser realizado de diferentes maneiras: com o modelo farmacofórico postulado pelo resultado de cristalografia ou pelo resultado da ancoragem molecular. Neste alinhamento baseado na estrutura (SBA do inglês *Structure Based Alignment*) um grupo de ligantes na conformação mais estável, é superposto. É utilizado, usualmente, com as moléculas que possuem estruturas mais rígidas e quando a estrutura 3D do receptor não é conhecida ou não é usada, diretamente para o alinhamento. Em alguns casos, especialmente ligantes mais flexíveis, esta aproximação pode levar a resultados duvidosos, pois a escolha da conformação pode ser muito diferente da conformação biologicamente ativa. Um outro tipo de alinhamento é o baseado na proteína (PBA do inglês *Protein Based Alignment*) que envolve um grupo de moléculas ancoradas no sítio ativo do alvo (Golbraikh et al., 2000).

A molécula é colocada em uma caixa de pontos, em cada ponto é posicionada uma sonda e, então, é calculada a energia estereoquímica e

eletrostática entre a sonda e molécula (Figura 1.16, pag. 30). O campo de força comumente usado nos estudos de CoMFA é muito simples e inclui dois termos: (a) potencial de Leonard-Jones 6-12 para interações de van der Waals; (b) termo coulômbico para interações eletrostáticas. As energias estereoquímicas são calculadas utilizando a função 6-12 (van der waals 6-12) conhecida como potencial de Lennard Jones (Equação 1.5, pág 12). As energias eletrostáticas são calculadas utilizando interações coulômbicas (E_c) segundo a equação:

$$E_c = \sum q_i q_j / DR_{ij}$$

Equação 1.11

onde q_i, q_j são as cargas dos átomos i e j ; DR_{ij} é a distância entre os átomos i e j (Cramer et al ,1988).

Considerando o grande número de estudos de CoMFA desenvolvidos com sucesso, estes dois termos têm sido suficientes em muitos casos (Kroemer et al., 1996).

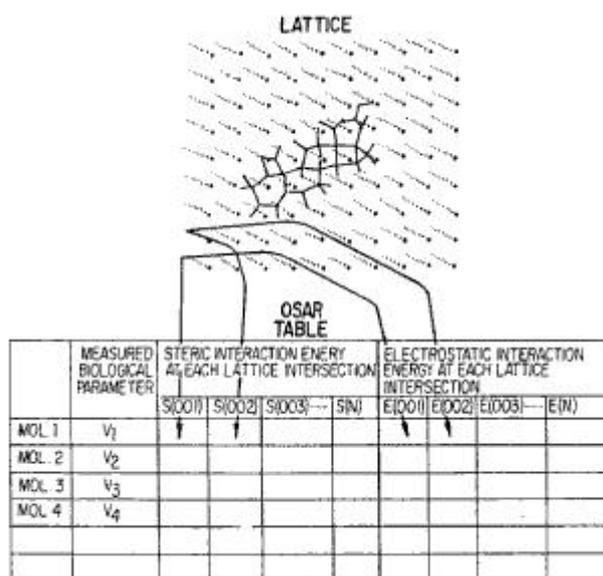


Figura 1.16 - Análise de QSAR-3D utilizando metodologia CoMFA: interação entre a sonda e a molécula são determinadas uma rede cada ponto no espaço torna-se um descritor eletrostático e/ou estereoquímico

Fonte: <http://www.google.com.br/patents?hl=pt-BR&lr=&vid=USPAT5307287&id=9z4kAAAAEBAJ&oi=fnd&dq=comfa>

A técnica de regressão utilizada para a predição da atividade biológica é a PLS e os procedimentos de validação cruzada são LOO ou LSO. A avaliação do grau de ajuste, do grau de significância estatística e do grau de previsibilidade são

realizadas como é feito no QSAR-2D. Os mapas estereoquímico e eletrostático são obtidos.

1.12 - Fármacos que interagem com o ADN

O ácido desoxirribonucléico (ADN ou DNA do inglês *Desoxyribonucleic Acid*) é talvez a mais importante das moléculas bioquímicas, como postulado por Francis H. C. Crick no conhecido “dogma central da biologia molecular”. A descoberta da sua estrutura (Figura 1.17) e as consequências bioquímicas destas deram o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina, em 1962, para seus descobridores Francis H. C. Crick, James D. Watson e Maurice Wilkins (Nelson; Cox, 2004). O ADN se encontra no núcleo das células eucarióticas ou disperso no citoplasma de células procarióticas e suas moléculas são constituídas de quatro bases nitrogenadas: adenina (A), citosina (C), timina (T) e guanina (G), que estão ligadas aos resíduos de desoxirribose. As bases nitrogenadas estão dispostas na forma de fita, com os açúcares ligados por ligações fosfodiéster. Esta fita interage com outra fita complementar através de ligações de hidrogênio entre adenosina e timidina (duas interações), citosina e guanosina (três interações), formando a fita dupla do ADN com diâmetro constante. A dupla hélice apresenta uma fenda maior e uma fenda menor, sítios importantes para a interação de fármacos específicos (Nelson e Cox, 2004).

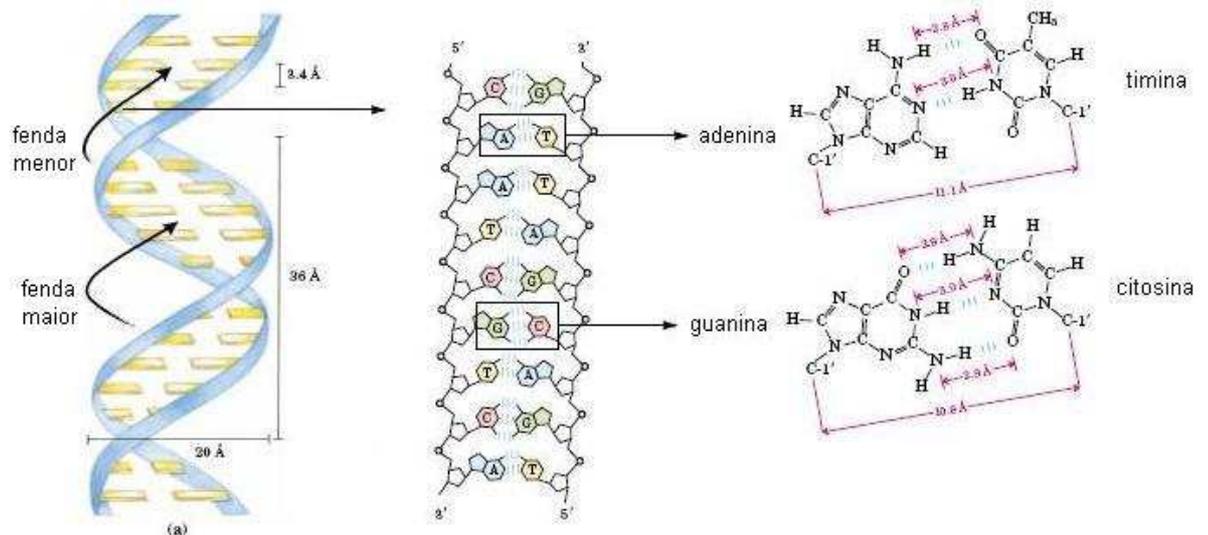


Figura 1.17 - Estrutura secundária do ADN segundo o modelo de Watson-Crick: Visualização esquemática de ligações de hidrogênio, doadores e receptores nas extremidades das bases A:T e C:G

Fonte: Nelson e Cox, 2004

Os agentes intercalantes são compostos capazes de se colocar entre as duas fitas de ADN e mudar a forma da dupla hélice, interferindo em processos de replicação e transcrição. Substâncias que atuam por este mecanismo, normalmente, são planas, aromáticas ou heteroaromáticas. Alguns compostos (Figura 1.18) se intercalam com a fenda maior, como por exemplo, a daunomicina e a proflavina, e outros com a fenda menor como, por exemplo, a pentamidina.

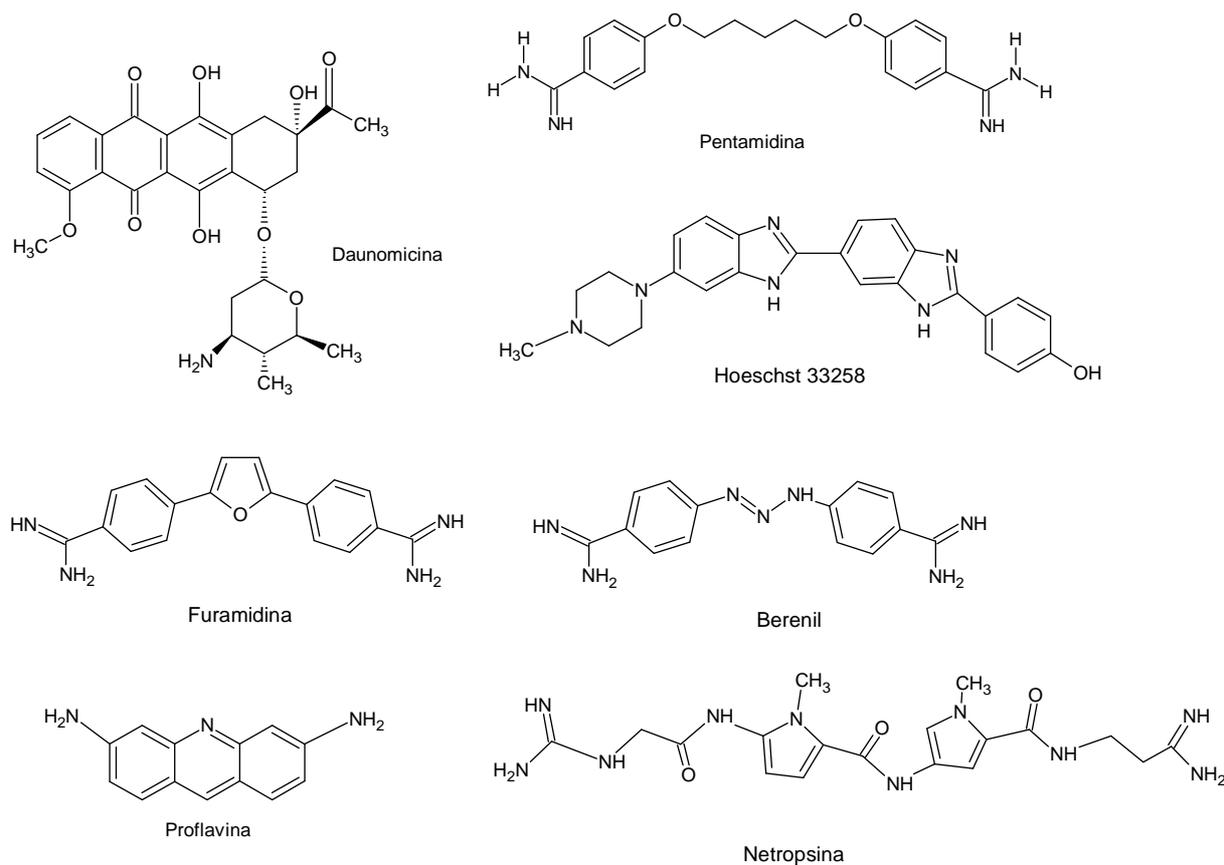


Figura 1.18 - Exemplos de compostos intercalantes que se ligam a fita dupla do ADN

Alguns compostos bis-catiônicos, conhecidos como diamidinas, apresentam conformações ditas isoélicas, com a complementaridade adequada para interações (“*isohelicity concept*”) com a fenda menor do ADN. Inclui-se nessa classe de ligantes (*minor groove binders*, MGBs) moléculas pequenas, que mostram seletividade por regiões A:T como, por exemplo, o berenil, a furamidina e o composto conhecido como Hoechst 33258 (Figura 1.18).

Um dos primeiros compostos a ser identificado como real ligante à fenda menor foi a netropsina (Figura 1.18, pag 32), que mostrou elevada especificidade

na interação com o ADN. A determinação experimental da estrutura cristalina da netropsina complexada (arquivo PDB 1Z8V) com a dupla hélice do dodecanucleotídeo d(CGCGAATTCGCG), confirmou a interação entre essa substância e as bases A:T. O dodecanucleotídeo é amplamente adotado como um modelo geral para estudo de compostos que se ligam à fenda menor. As moléculas que apresentam interações específicas com a fenda menor do ADN têm despertado interesses, como potenciais agentes terapêuticos em uma variedade de doenças humanas.

Dentre os vários tipos de moléculas que interagem com o ADN, destacam-se os derivados amidínicos ($R-C(=NH)NH_2.HCl$) e seu isómeros os derivados S-isotioureído, ($R-S-C(=NH)NH_2.HCl$) que interagem fortemente com o ADN por interações eletrostáticas e que têm sido estudados pelo nosso grupo (Silva, 2005). Muitos compostos bisamidínicos sintetizados são simétricos e carregados positivamente em pH fisiológico. Eles se ligam de forma não covalente ao B-ADN, com preferência pelas bases A:T (Neidle, 2001), assumindo uma conformação isoélica à conformação do ADN. Esta estrutura complementar aumenta a superfície de contato e alinha os grupos que favorecem à interação com o ADN (Nguyen et al., 2004). As monoamidinas não têm demonstrado ligação significativa ao B-ADN e são biologicamente inativas (Boykin, 2002).

Os análogos da pentamidina com substituição na posição *meta* não podem adotar curvatura molecular complementar à fenda menor e se ligam de forma, significativamente, mais fraca à sequência A:T do B-ADN quando comparada à furamidina (Figura 1.18, pag. 32). Os compostos com substituição em *meta* também perdem a especificidade e se ligam em sequências ricas em bases G:C com baixa afinidade. Nos análogos da pentamidina cujo grupo amidínico é substituído ocorre impedimento estereoquímico, que impossibilita um contato ótimo na fenda (Rocha, 1988).

Os compostos bisbenzamidínicos têm demonstrado amplo espectro de atividade antimicrobiana e antiprotozoária. A pentamidina vem sendo usada clinicamente, no tratamento da pneumonia causada por *Pneumocystis carinii* (PCP), no primeiro estágio de tripanossomíase africana bem como, casos de leishmaniose antimônio resistente, apesar de causar efeitos adversos, tais como, leucopenia, hipotensão, toxicidade renal e hepática. A toxicidade da pentamidina

tem limitado o seu uso na prática clínica e existe uma contínua procura por análogos mais efetivos (Neidle, 2001; Boykin, 2002).

Hildebrandt e colaboradores (1998) observaram que os compostos diarilfuranos dicatiônicos inibem uma endo/exo nuclease isolada de *P. carinii* e que a interação destes compostos com o ADN, em regiões ricas em bases A:T, diminuem a interação do ADN com endonucleases específicas. Foi também observado uma correlação entre IC₅₀ da inibição das endonucleases e a atividade anti *P. carinii* em ratos assim como uma correlação bastante significativa entre variação na temperatura de desnaturação (ΔT_m) e a inibição desta enzima (Hildebrandt et al., 1998). Neidle (2001) observou que existe uma seletividade dos compostos diarilfuranos dicatiônicos pelo ADN do patógeno, em relação ao ADN dos mamíferos

A temperatura de desnaturação (T_m) é definida como a temperatura na qual metade das cadeias de ADN esta no estado de dupla hélice e a outra metade esta completamente separada. Nessa temperatura ocorre a separação das fitas do ADN ou desnaturação do ADN, através da quebra das ligações de hidrogênio. A temperatura de desnaturação depende do comprimento da molécula e do tipo de ADN, e da seqüência de pares de bases AT e pares CG. Quando comparamos o mesmo tamanho da fita de ADN analisada e a mesma seqüência de bases, quanto maior for a estabilidade das interações ADN-ligante, maior é o valor de T_m . Uma das maneiras de se medir a desnaturação da molécula de DNA é através da medida da absorbância da luz ultravioleta (UV) a $\lambda = 260\text{nm}$. Quando as fitas da dupla-hélice do DNA estão completamente separadas, a absorbância é 37% maior do que aquela obtida para o DNA em sua forma nativa. Isto pode ser verificado experimentalmente, aumentando-se a temperatura de uma solução de DNA e medindo simultaneamente a absorbância a $\lambda = 260\text{nm}$ (Ferreira, 2007).

A força da interação ADN-ligante pode ser determinada pela medida da variação na temperatura de desnaturação (ΔT_m) do ADN. A mudança na temperatura de desnaturação está relacionada à afinidade destes compostos com a dupla hélice do ADN (Oliveira et al., 2003). A ligação de compostos dicatiônicos ao ADN resulta em um aumento de ΔT_m do ácido nucléico.

Estudos com outros compostos amidínicos onde o *linker* é um grupo bisbenzamidazólico mostraram que estes compostos atuam por prevenir a

primeira etapa de ação da topoisomerase (reconhecimento do sítio e clivagem) com uma especificidade para enzimas parasitárias sobre as enzimas dos mamíferos (topoisomerase I e II de timo de bezerro) (Hildebrandt et al., 1998; Tidwell et al., 1993).

Como mencionado anteriormente, vários fatores são importantes na interação dos compostos dicatiônicos com a fenda menor do B-ADN. Podemos citar as forças eletrostáticas, as interações de van der Waals assim como a curvatura da molécula (Hopkins et al., 1998).

A distribuição do potencial eletrostático ao longo da sequência do B-ADN é dependente da sequência: as regiões ricas em bases A:T têm potencial eletrostático negativo e no fundo da fenda, em regiões ricas em bases citosina-guanina (C:G), potencial positivo. Quase todos os ligantes da fenda menor têm carga catiônica complementar ao potencial das regiões A:T e a superfície da fenda é mais hidrofóbica (Neidle, 2001) no entanto estudos estruturais com uma série de complexos do d-B-ADN – bisbenzimidazóis mostraram que o aumento de número de grupos carregados não aumenta, significativamente, a habilidade de ligação destes compostos com a fenda menor do ADN; ao passo que o aumento do número de contatos com a superfície da fenda menor aumenta a afinidade (Neidle, 2001).

O papel da água no reconhecimento da sequência no d-B-ADN não tem sido extensivamente explorado embora, provavelmente, o deslocamento da água pelo ligante na fenda menor contribua por mudanças entrópicas (Neidle, 2001).

A curvatura de moléculas pequenas é um fator determinante na interação. As moléculas dicatiônicas com o raio da curvatura entre 10 a 100 Å possuem características topológicas apropriadas para a interação (Kumar et al., 1996; Cory et al., 1992). Montanari e colaboradores (1996) mostraram que para uma série de 37 análogos da pentamidina, a conformação isoélica ao d-B-ADN é um fator importante para a descrição da relação estrutura-atividade biológica frente à *Leishmania mexicana amazonensis*.

1.13- Compostos amidínicos

As amidinas são análogos nitrogenados dos ácidos carboxílicos e têm despertado grande interesse devido à sua atividade biológica frente a diversos organismos (Patai; Rappoport, 1991). Elas podem ser classificadas (Figura 1.19)

segundo a posição e o número de substituintes em amidinas não substituídas, monossubstituídas, simétricas dissustituídas, não simétricas dissustituídas e trissubstituídas (Santos et al., 2006).

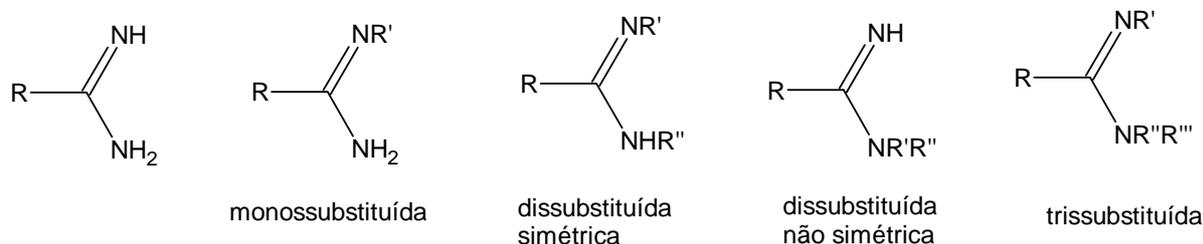


Figura 1.19 - Classificação de amidinas segundo número de substituintes

Fonte: Santos; Bernardino; Souza, 2006

Nas amidinas mono e dissustituídas podem ocorrer tautomerismo (Figura 1.20) do tipo prototrópico (Santos et al., 2006) e em pH fisiológico elas se encontram na sua forma protonada:

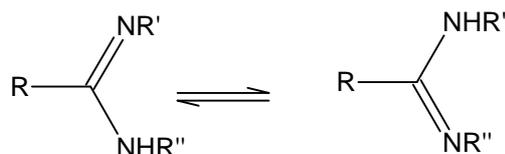


Figura 1.20 - Estruturas tautoméricas de amidinas

Vários métodos de síntese de amidinas a partir de nitrilas vêm sendo descritos. Podemos citar os métodos de Pinner (Boyd, 1991), de Garipati (Garipati, 1990), de Tiermman (Judkins et al., 1996) e via imidato em meio básico (Moss et al., 1995).

1.14 Atividade biológica de tioureído-derivados

Os derivados S-alkilisotioureídos ($R-S-C(=NH)NH_2 \cdot HCl$) são compostos isómeros das amidinas sendo que em meio fisiológico, também se encontram protonados. Os compostos S-alkilisotiouréias e seus respectivos sais são materiais de partida para a síntese de guanidinas (Cruz et al., 2008) e de sistemas heterocíclicos (Denk ; Ye, 2005).

Bandelin; Tuschhoff (1952) sintetizaram e investigaram a ação germicida de uma série homóloga de S-alkilisotiouréias e seus derivados 1,3 dialquil-substituídas (Figura 1.21). A atividade máxima contra *Staphylococcus aureus* e

Eberthella typhi ocorreu quando o grupo S-alquil era dodecil ou tetradecil e quando os átomos de nitrogênio foram substituídos por grupos metila ou etila.

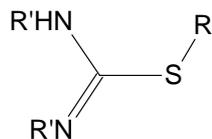
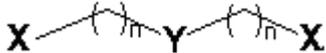


Figura 1.21 - Estrutura de S-alquilisotiouréias testadas por Bandelin; Tuschhoff (1952)

Brooks e colaboradores (1950) mostraram que uma série homóloga de isotiouréias substituídas apresentou atividade *in vitro* contra *Mycobacterium tuberculosis*. Os compostos que apresentaram maior potência foram os N-fenil e N,N'-difenil-S-etilisotiouréias.

Trabalhos recentes em nosso grupo de pesquisa (Silva, 2005; Nogueira, 2006) têm demonstrado que a atividade antifúngica de compostos do tipo S-isotioureído bis-catiônicos não substituídos, aumenta com o aumento da lipofilia e a inserção de grupos metílicos na porção tioureído da cadeia (Tabela 1.1, pag 38), o que pode acarretar aumento na lipofilia e/ou no volume molecular.

Tabela 1.1 - Concentração inibitória de derivados tipo precursores dendriméricos funcionalizados com grupo tioureído frente à *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida Krusei*

ESTRUTURA GERAL			Concentração inibitória mínima (mmol/L)		
			<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>
					
1	3	Y=S; X = SC=NH(NH ₂)	> 93,83 x10 ⁻¹	> 93,83 x10 ⁻¹	1,163x10 ⁻²
2	2	Y = NH; X= SC=NH(NH ₂)	5,647 x10 ⁻¹	> 1,13	> 1,129
3	2	Y = NMe; X=SC=NH(NH ₂)	1,0622	> 1,062	> 1,062
4	3	Y = SO ₂ ; X =SC=NH(NH ₂)	4,188 x10 ⁻¹	> 8,37 x10 ⁻¹	> 8,37 x10 ⁻¹
5	3	Y = SO; X = SC=NH(NH ₂)	4,426 x10 ⁻¹	4,42 x10 ⁻¹	4,43 x10 ⁻¹
6	3	Y = NCH ₃ ; X = S-C=NH(NHCH ₃)	> 8,577 x10 ⁻¹	> 8,577 x10 ⁻¹	1,07 x10 ⁻¹
7	3	Y = S; X = S-C=NH(NHCH ₃)	1,063 x10 ⁻¹	1,06 x10 ⁻¹	1,06 x10 ⁻¹
8	2	Y = SO ₂ ; X = S-C=NH(NHCH ₃)	>8,377 x10 ⁻¹	>8,377 x10 ⁻¹	1,05 x10 ⁻¹
9	2	Y = SO; X = S-C=NH(NHCH ₃)	>8,851 x10 ⁻¹	44,2	4,42 x10 ⁻¹
10	3	Y = O; X = S-C=NH(NHCH ₃)	3,5 x10 ⁻³	7,003 x10 ⁻³	> 8,98 x10 ⁻¹
11	2	Y = O; X = SC=NHNH ₂	8,8 x10 ⁻³	8,771 x10 ⁻³	>1,124
		Anfotericina B	5,4 x10 ⁻³	5,411 x10 ⁻³	5,411 x10 ⁻³

Fonte: Adaptado de Silva, 2005; Nogueira, 2006

Silva (2005) demonstrou por meio da técnica de biossensor modificado com ADN e por voltametria de pulso diferencial (VDP) que estes compostos possuem interação com o dodecâmero do B-ADN.

É digno de nota que os compostos S-isotioureídos são de fácil síntese (Figura 1.22), levando a altos rendimentos (Silva, 2005; Denk; Ye, 2005; Nogueira, 2006; Bahekar et al.,2007).

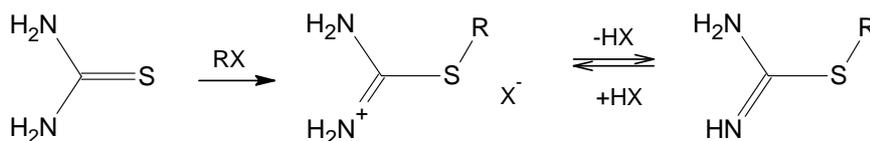


Figura 1.22 - Equação geral da síntese de S-alquilsotiouréias

2- IMPORTÂNCIA E JUSTICATIVA

Com os avanços da medicina, o número de pacientes em internação hospitalar prolongada cresceu muito. Tais internações propiciam uma maior exposição do paciente a patógenos multirresistentes, comumente presentes nos centros hospitalares (McGowan & Tenover, 2004; Harbarth & Samore, 2005). Adicionalmente, nos últimos anos houve um crescimento da população de pacientes imunologicamente vulneráveis a fungos e bactérias levando a um aumento da frequência de infecções causadas por patógenos oportunistas gerando um grande crescimento das doenças infecciosas emergentes (DIEs) (Fauci, 2004; Jones et al, 2008) e das infecções fúngicas invasivas (IFIs) (Ruping et al., 2008). São freqüentes os casos de candidíase invasiva, de cryptococose pulmonar invasiva, de pneumonia por *Pneumocystis carinii* (Marques, 1995)

Entre as espécies mais invasivas do gênero *Candida*, que são responsáveis por quadros graves de candidíases, incluem *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (Colombo & Guimarães, 2003). *Cryptococcus neoformans* é o segundo mais comum fungo oportunista em pacientes HIV positivos (Scorzoni et al., 2007).

Outro agente patogênico que tem se tornado um grande problema de saúde pública é o *Pneumocystis carinii*, fungo causador de pneumonia, uma infecção oportunista que acomete 80% dos indivíduos HIV positivos (Lombardy et al., 1996; Edwards et al., 1992), sendo a causa mais comum de morbidade e mortalidade entre esses indivíduos (Lombardy et al., 1996).

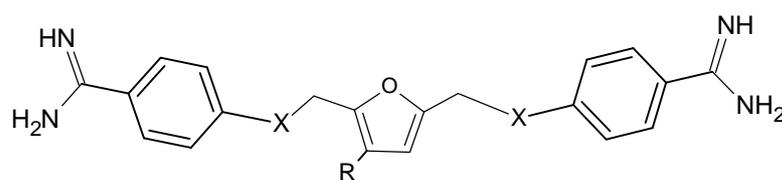
Uma outra grave questão é o uso incorreto e indiscriminado de antibióticos e antifúngicos de amplo espectro de ação que tem levado ao surgimento de populações de microrganismos resistentes a estes agentes quimioterápicos (Sundriyal et al., 2006). Outros fatores que têm contribuído para o crescimento das infecções fúngicas são, por exemplo, o aumento da sobrevivência de pacientes com doenças imunossupressoras e o emprego de medicamentos imunossupressores.

Os fármacos antifúngicos disponíveis produzem recorrência, além de apresentarem significativa toxicidade (Espinell-Ingroff, 2001; Perfect et al, 2003; Fenner et al., 2006). A pentamidina (Figura 1.19, pag 32) e seus análogos têm-se mostrado ativos contra *Plasmodium falciparum*, *Cryptosporidium parvum*,

Toxoplasma gondii, *Giardia lamblia*, *Leishmania mexicana* e *Leishmania amazonensis* (Lombardy et al., 1996; Edwards et al., 1992), *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani*, várias espécies de *Candida*, incluindo cepas de *C. albicans* e *Cryptococcus neoformans* resistentes a fluconazol (Hall et al., 1998). Os análogos rígidos e semi-rígidos da pentamidina (Figura 1.18, pag 32) apresentam uma potência maior, uma toxidez menor e se ligam mais fortemente ao ADN, quando comparados com ela. Quando comparada a pentamidina, a furamidina (Figura 1.19, pag 32) apresenta um maior valor de ΔT_m , e é significativamente mais potente e menos tóxica que a pentamidina (Trent et al., 1996) em testes biológicos frente à pneumonia causa da por *Pneumocistis carinii* (PCP).

Assim, o crescimento das doenças infecciosas emergentes (DIEs) e das infecções fúngicas invasivas (IFIs), o aumento progressivo da resistência dos microrganismos a antibióticos e antifúngicos, a toxicidade destes medicamentos, aliado ao grande número de doenças causadas por microrganismos e ao impacto socioeconômico causado por tais doenças, justificam a constante busca de novas entidades químicas (NCEs do inglês *New chemical entities*) que possam ser compostos-líderes para o desenvolvimento de novos agentes antitumorais e antifúngicos, como os propostos neste trabalho. Além disso, torna-se um desafio o planejamento de compostos com atividade antimicrobiana com menores efeitos adversos, com alto rendimento e de fácil síntese.

Utilizando os resultados da modelagem molecular, QSAR e informações da literatura discutidas previamente (Montanari et al., 1996), foi proposta a síntese dos seguintes compostos furânicos 2,5-bis-benzamidínicos (Figura 2.1):



- FB1** X= O R= H
FB2 X= NH R= H
FB3 X= O R= Me
FB4 X= O R= (CH₃)₂CH

Figura 2.1 - Estrutura dos compostos propostos planejados de forma racional por estudos de QSAR

O objetivo inicial deste trabalho era realizar os estudos de modelagem molecular, QSAR, SAR, sintetizar e estudar a atividade antifúngica de furamidinas amidinicas propostas. Contudo houve uma grande dificuldade de obtenção grupo amidina, pois as metodologias conhecidas são de condições vigorosas e no nosso caso, ou haveria a clivagem do anel furânico, ou não aconteceria a reação esperada para formação dos amidino-derivados. Em revisão bibliográfica descobriu-se que o grupo funcional S-isotioureído ($R-S-C(=NH)NH_2 \cdot HCl$) possui atividade antimicrobiana, está carregado positivamente em pH fisiológico e é considerado isostérico ao grupo amidina ($R-C(=NH)NH_2 \cdot HCl$), também protonada nesse meio. Desta forma foi proposta a síntese e o estudo da atividade antifúngica de novos derivados S-isotioureídos substituídos (Figura 2.2).

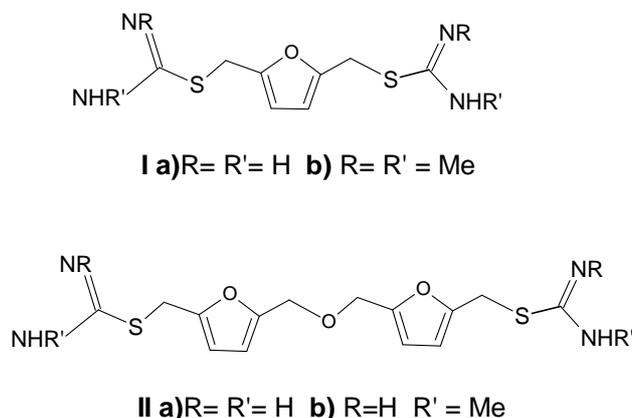


Figura 2.2 - Estruturas de novos compostos tipo S-isotioureído potencialmente antifúngicos.

Os compostos S-isotiureídos são utilizados geralmente como intermediários sintéticos para obtenção de grupos tióis (ou mercaptanas) a partir da reação de haletos de alquila com excesso de tiouréia ($NH_2C(=S)NH_2$) em etanol aquecido a refluxo (Denke & Ye, 2005; Bahekar et al., 2007).

Os compostos S-isotiureidos funcionalizados, estudados dentro do LASELORG-NEQUIM (Tabela 1.1, pag. 38), têm se mostrado de fácil síntese levando a bons rendimentos. No entanto estes compostos ainda são pouco estudados quanto à atividade farmacológica. É importante lembrar que estes compostos apresentaram interação com o ADN comprovada por *ITC* (*Isothermal Titration Calorimetry*) e por biossensor de ADN e que se mostraram com potencial aplicação como agentes antitumorais e antifúngicos.

3- OBJETIVOS

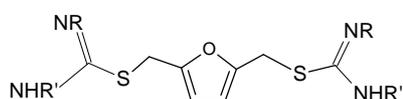
3.1- OBJETIVOS GERAIS

Objetiva-se com este trabalho:

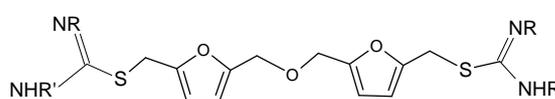
- Realizar estudos de ancoragem molecular (*docking*), QSAR e SAR de furanobenzoamidinas frente à *Pneumocystis carinii*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*.
- Realizar a síntese de compostos amidínicos e isotioureídos com potencial atividade antifúngica.

3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a interação de derivados tipo furamidino bis-benzamidínicos utilizando ancoragem molecular manual com B-ADN
- Estudar relação estrutura-atividade biológica de derivados bis-benzamidínicos frente à *Pneumocystis carinii*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* utilizando técnicas quimiométricas, QSAR-2D e 3D.
- Propor novos compostos que possuam atividade biológica frente aos fungos *Pneumocystis carinii*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*.
- Sintetizar os compostos isotioureídos substituídos **Ia e Ib** e **Ila e I Ib**.



I a)R= R'= H **b)** R= R' = Me



II a)R= R'= H **b)** R=H R' = Me

- Identificar os compostos sintetizados utilizando técnicas espectrométricas usuais (espectrometria na região do Infravermelho, espectrometria de massas por ionização *electrospray* e ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C).
- Estudo da atividade antifúngica dos isotioureídos funcionalizados frente à *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*.
- Testes de atividade antitumoral dos compostos obtidos.

4. PROCEDIMENTO

4.1- Modelagem molecular

4.1.1- Ancoragem molecular utilizando Metodologia-1 e energias envolvidas no complexo ADN-ligante

Para uma análise preliminar da rotina a ser seguida foi construído um banco de dados (Banco de dados-1) com 15 compostos benzamidínicos substituídos (Boykin et al., 1998), mostrado na Tabela 4.1 escolhidas segundo os seguintes critérios: possuir valores quantitativos de ΔT_m ou atividade biológica frente *P. carinii* descritos na literatura e se ligarem à fenda menor do d-B-ADN em regiões ricas em adenina-timina (A-T).

Tabela 4.1 - Compostos bisbenzamidínicos e respectivos valores de ΔT_m (°C), $\log \Delta T_m$ e % de cistos de *P. carinii*/g de pulmão de rato (Boykin et al., 1998; Hall et al., 1998)

continua

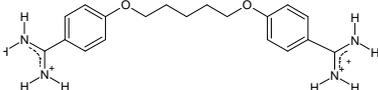
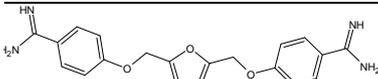
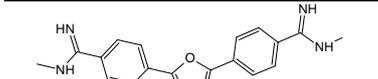
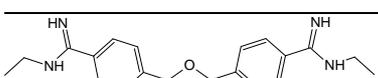
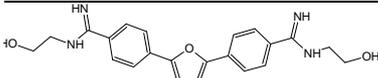
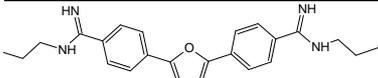
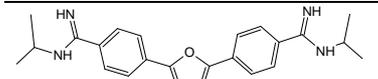
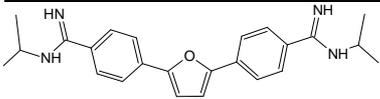
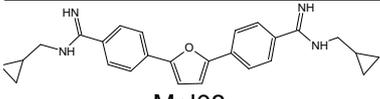
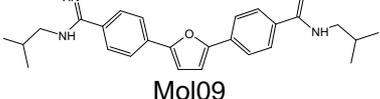
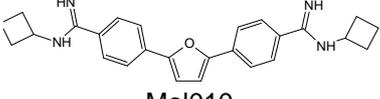
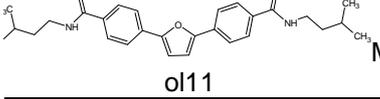
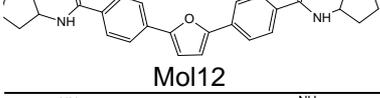
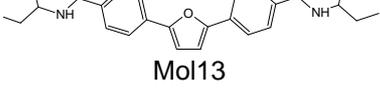
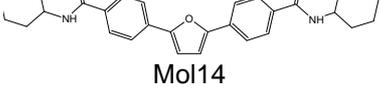
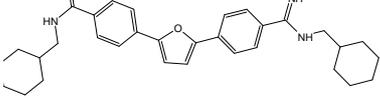
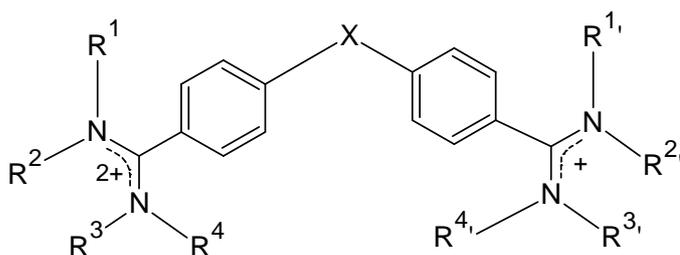
Molécula	T_m (°C)	$\log \Delta T_m$	cistos de <i>P. carinii</i> /g de pulmão de rato (dose mol/Kg/dia)
salina	-	-	100
 Pentamidina	4,8	0,681	0,61 ± 0,27 (13,3)
 Mol01	11,7	1,068	5,65 ± 2,76 (2,7)
 Mol02	-	-	0,16 ± 0,13 (10,60)
 Mol03	-	-	0,05 ± 0,13 (10,4)
 Mol04	11,0	1,041	0,60 ± 0,28 (10,4)
 Mol05	13,0	1,114	0,08 ± 0,04 (10,6)
 Mol06	14,4	1,158	0,20 ± 0,18 (10,8)

Tabela 4.1 - Compostos bisbenzamidínicos e respectivos valores de ΔT_m (°C), $\log \Delta T_m$ e % de cistos de *P. carinii*/g de pulmão de rato (Boykin et al., 1998)

Molécula	ΔT_m (°C)	$\log \Delta T_m$	% cistos de <i>P. carinii</i> /g de pulmão de rato
 Mol07	12,4	1,093	0,03 ± 0,01 (10,8)
 Mol08	13,3	1,124	0,24 ± 0,14 (10,8)
 Mol09	10,0	1,000	2,20 ± 1,35 (10,0)
 Mol010	14,8	1,170	0,05 ± 0,01 (9,9)
 Mol011	11,2	1,049	2,38 ± 0,89 (9,7)
 Mol012	15,8	1,199	0,03 ± 0,02 (9,4)
 Mol013	10,0	1,000	24,43 ± 14,7 (4,8)
 Mol014	15,4	1,188	0,02 ± 0,01 (9,1)
 Mol015	10,6	1,025	43,9 ± 14,23 (8,7)

As moléculas foram construídas na sua forma protonada utilizando o programa SYBYL versão 6.7 (SYBYL 6.7, 2000) na estação de trabalho Silicon Graphics, com o grupo R ocupando as posições 2' e 3' e suas combinações (Figura 4.1, pag. 45). As cargas parciais dos átomos dos compostos foram calculadas utilizando o programa MOPAC v. 7.0 por métodos semi-empíricos de cálculo usando o Hamiltoniano MNDO-ESP (MOPAC v. 7.0, IN 47405; Rocha, 1998; Oliveira et al., 2003).



Conformação **a** - Corresponde a conformação onde as substituições no nitrogênio do grupo amidínico estão nas posições R2 e R2'

Conformação **b** - Corresponde a conformação onde as substituições no nitrogênio do grupo amidínico estão nas posições R3 e R3'

Conformação **c** - Corresponde a conformação onde as substituições no nitrogênio do grupo amidínico estão nas posições R2 e R3'

Conformação **d** - Corresponde a conformação onde as substituições no nitrogênio do grupo amidínico estão nas posições R3 e R2'

Figura 4.1- Posições dos substituintes no grupo amidínico

Utilizando o programa MacroModel 5.5 (MacroModel v. 5.5) e a estrutura obtida por cristalografia de raios X do complexo do d-B-ADN-pentamidina (dodecâmero do B-ADN-pentamidina) obtida do *Protein Data Bank* (arquivo PDB 227D), os complexos ADN-ligantes foram construídos.

A pentamidina presente no complexo foi substituída pelas bisbenzamidinas. Para esta substituição, as benzamidinas foram superpostas à pentamidina e após a superposição, a pentamidina foi retirada. Em seguida, as moléculas foram ajustadas manualmente dentro da fenda na região rica em pares de bases A:T, utilizando uma monitoração de contatos para prevenir os contatos de van der Waals indesejáveis baseados em um critério de distância. Isto foi feito porque as benzamidinas do banco de dados-1 possuem substituições nos nitrogênios amidínicos, o que não ocorre na pentamidina, e algumas vezes estes grupos possuíam contatos indesejáveis com as paredes da fenda menor do ADN.

Os complexos d-B-ADN-ligante obtidos foram então minimizados usando o procedimento MM-DM-MM (mecânica molecular –dinâmica molecular –mecânica molecular) no programa MacroModel 5.5 como descrito por Oliveira et al., 2003. Na minimização utilizando mecânica molecular (Anexo 1-Procedimento 1, pag 131) foram feitos 2500 ciclos utilizando o campo de força AMBER (Weiner et al., 1984), tratamento eletrostático dependente da distância dielétrica eletrostática e constante dielétrica molecular simulando a presença de água. A minimização foi feita utilizando o método de gradiente conjugado. As distâncias de *cut off* do

cálculo foram utilizadas as condições padrões do programa (20 Å para carga eletrônica e 8 Å para VDW).

O complexo de menor energia foi submetido à dinâmica molecular com o d-B-ADN e o ligante flexível (Anexo 1-Procedimento2, pag 131). A temperatura utilizada foi de 300 K, o tempo total da dinâmica foi de 20 picosegundos com passos de 1,5 femtosegundos. O complexo de menor energia foi minimizado utilizando mecânica molecular (Anexo 1-Procedimento 3, pag 131) utilizando as mesmas condições de análise descritas anteriormente para a minimização utilizando mecânica molecular.

Após a minimização, foram calculadas as energias dos complexos (E_{compl}), dos ligantes ($E_{\text{lig}_{\text{compl}}}$) e do d-B-ADN ($E_{\text{ADN}_{\text{compl}}}$) na conformação presente no complexo (Anexo 1-Procedimento 4).

Para se obter a conformação de menor energia dos ligantes isolados ($E_{\text{lig}_{\text{menor energia}}}$) e do d-B-ADN ($E_{\text{ADN}_{\text{menor energia}}}$) foi realizada novos procedimentos de dinâmica molecular (Anexo 1- procedimento 5, pag 132). A temperatura utilizada foi de 300 K. O tempo total da dinâmica foi de 20 picosegundos com passos de 1,5 femtosegundos.

As energias de interação (E_{int}), energia de perturbação do ligante ($E_{\text{lig}_{\text{pert}}}$), energia de perturbação do d-B-ADN ($E_{\text{ADN}_{\text{pert}}}$), a energia de perturbação total ($E_{\text{Total}_{\text{pert}}}$) e de ligação (E_{lig}) foram calculadas segundo as equações abaixo (Montanari et al., 1996, Rocha, 1998; Oliveira et al., 2003):

$$E_{\text{int}} = E_{\text{compl}} - (E_{\text{ADN}_{\text{compl}}} + E_{\text{lig}_{\text{compl}}})$$

$$E_{\text{lig}_{\text{pert}}} = E_{\text{lig}_{\text{compl}}} - E_{\text{lig}_{\text{menor energia}}}$$

$$E_{\text{total}_{\text{pert}}} = E_{\text{ADN}_{\text{pert}}} + E_{\text{lig}_{\text{pert}}}$$

$$E_{\text{lig}} = E_{\text{int}} + E_{\text{total}_{\text{pert}}}$$

Onde

E_{compl} = energia total do complexo

$E_{\text{lig}_{\text{compl}}}$ = energias de ligação do ligante no complexo

$E_{\text{lig}_{\text{pert}}}$ = energias de perturbação do ligante

$E_{\text{lig}_{\text{menor energia}}}$ = energias do ligante na conformação de menor energia

$E_{\text{total}_{\text{pert}}}$ = energias de perturbação do complexo

$E_{\text{ADN}_{\text{pert}}}$ = energias de perturbação do ADN

$E_{\text{lig}_{\text{pert}}}$ = energias de perturbação do ligante

E_{lig} = energias de ligação

E_{int} = energias de interação

O procedimento seguido pode ser esquematizado na Figura 4.2.

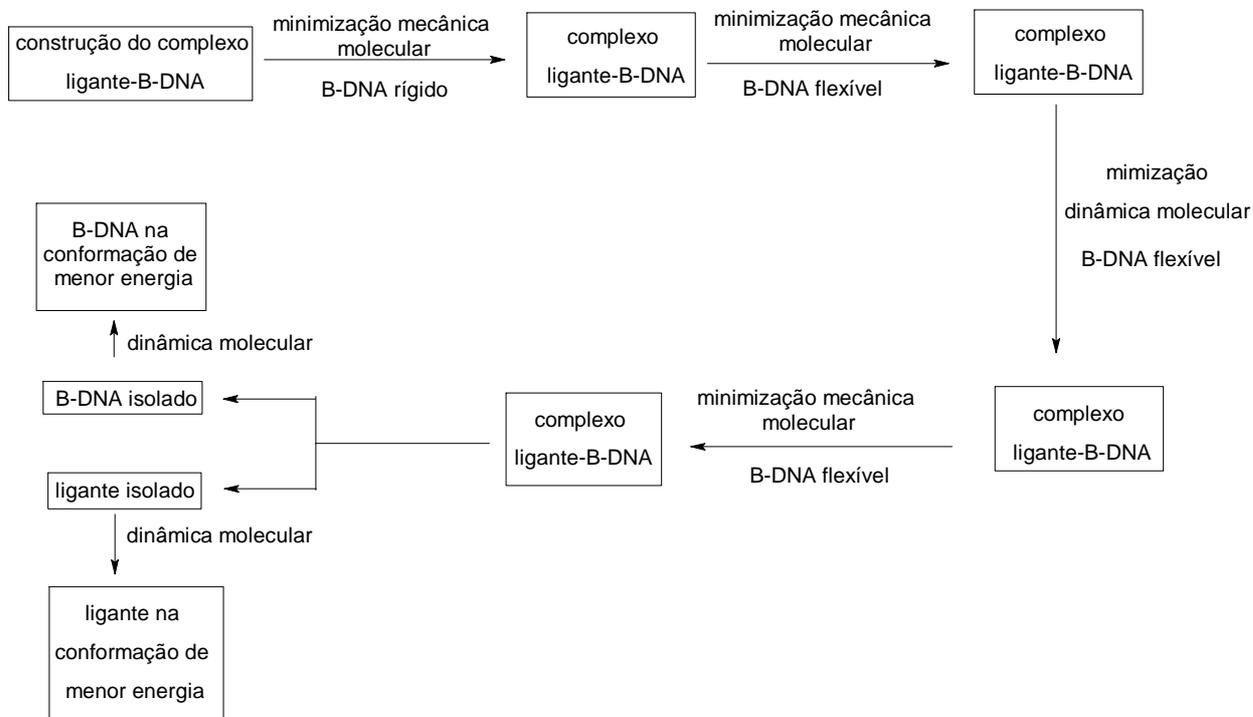


Figura 4.2- Procedimento geral da ancoragem molecular manual flexível utilizada.

Com o objetivo de avaliar se o método conseguia reproduzir a conformação obtida por cristalografia de raios X, as conformações das moléculas (Tabela 4.1, pág. 42) **Mol06** (arquivo PDB 298D), **Mol07** (arquivo PDB 289D), **Mol14** (arquivo PDB 1EEL), **Mol15** (arquivo PDB 1FMS) obtidas por ancoragem molecular manual foram comparadas com aquelas da estrutura obtidas por cristalografia de raios X, através do cálculo de RMS (*Root Mean Square*) utilizando o programa INSIGHT II versão 97 (*Molecular Simulations Incorporated, 1997*).

A escolha da conformação (conformações **a**, **b**, **c** ou **d**, Figura 4.1, pag 45) do ligante a ser utilizada nos estudos de QSAR clássico e 3D baseou-se nos seguintes critérios:

- valores de RMS baixos para as moléculas **Mol06**, **Mol07**, **Mol14** e **Mol15** nas conformações obtidas do procedimento MM- DM- MM quando

comparadas com as estruturas na conformação aquela observada pela cristalografia de raios X;

- valores de energia de ligação calculados mais altos;
- análise da posição adotada pelos substituintes nas estruturas obtidas por cristalografia de raios X dos arquivos PDB.

Diante dos resultados obtidos na análise preliminar, a conformação escolhida para realização dos estudos de ancoragem molecular foi aquela em que os grupos substituintes ocuparam a posição 3,3' (conformação **b**, Figura 4.1, pág. 45), porque ela é a conformação observada nas estruturas do PDB e a energia de ligação e interação são maiores (número absoluto) para os complexos com moléculas nesta conformação.

4.1.2 - Ancoragem molecular utilizando Metodologia-2 e energias envolvidas no complexo ADN-ligante

O procedimento MM-DM-MM foi repetido com algumas alterações na rotina de trabalho na dinâmica molecular. A dinâmica foi feita em três etapas (Anexo 1- Procedimento 5, pag 132) com a temperatura constante de 300 K. Na primeira etapa, o tempo total de dinâmica foi de 100 picosegundos com passos de 1,5 femtosegundos. Na segunda etapa o tempo total de dinâmica foi de 300 picosegundos com passos de 1,5 femtosegundos. Na terceira etapa o tempo total de dinâmica foi de 500 picosegundos com passos de 1,5 femtosegundos e foi observado que ao utilizar esta rotina ocorria uma deformação no d-B-ADN; assim, optou-se por trabalhar com o octâmero do B-ADN (o-B-ADN) para evitar esta deformação. O procedimento foi repetido e diante do resultado adequado obtido, a rotina foi mantida e utilizada em um banco de dados maior (Banco de dados-2, Tabela 4.2, pag 49). Os critérios utilizados para escolha dos compostos para este novo banco foram:

- ligar a fenda menor do B-DNA e ser compostos bisbenzamidínicos;
- possuir valores quantitativos de ΔT_m (°C) ou atividade biológica frente *Pneumocystis carinii*, *Cryptococcus neoformans* e/ou *Candida albicans* descritos na literatura.

Com as moléculas **FB1**, **FB2**, **FB3** e **FB4** (Figura 2.1, pag 40), foram também realizados estudos de ancoragem molecular com o-B-ADN utilizando o procedimento MM-DM-MM. Estas moléculas foram planejadas utilizando os resultados da modelagem molecular e QSAR realizados previamente por nosso

grupo (Rocha, 1998; Oliveira et al, 2003; Montanari et al., 1996) e cuja síntese foi proposta inicialmente.

Tabela 4.2 - Compostos bisbenzamidínicos e atividade biológica frente aos *Pneumocystis carinii* (Boykin et al., 1998; Hall et al., 1998), *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* (Del Poeta et al., 1998a; Del Poeta et al., 1998b; Lombardy et al., 1996; Francesconi et al., 1999)

continua

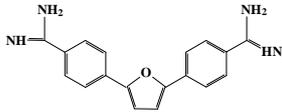
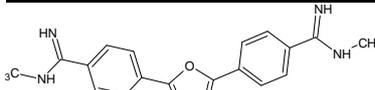
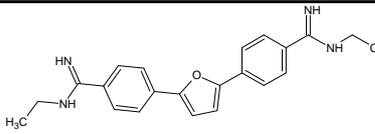
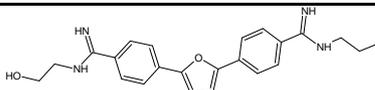
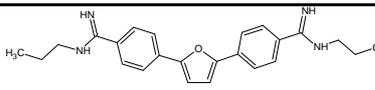
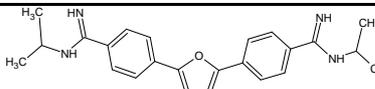
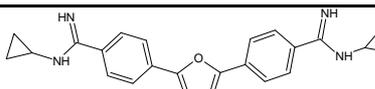
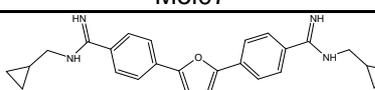
Molécula	% cistos de <i>P. carinii</i> /g de pulmão de rato ($\mu\text{mol/Kg/dia}$)	Log MIC ⁻¹ <i>C. neoformans</i> (mol/L)	Log MIC ⁻¹ <i>C. albicans</i> (mol/L)	ΔT_m (°C)	Log ΔT_m
Solução salina	100%	-	-	-	-
 Mol01	5,65 ± 2,76 (2,7)	7,39	7,68	7,68	1,068
 Mol02	0,16 ± 0,13 (10,6)	-	-	-	-
 Mol03	0,05 ± 0,02 (10,4)	-	-	-	-
 Mol04	0,60 ± 0,28 (10,4)	-	-	11	1,042
 Mol05	0,08 ± 0,04 (10,6)	8,40	7,49	13	1,114
 Mol06	0,20 ± 0,18 (10,8)	7,79	7,52	14,4	1,158
 Mol07	0,03 ± 0,01 (10,8)	8,09	7,82	12,4	1,093
 Mol08	0,024 ± 0,14 (10,8)	8,73	7,82	13,3	1,124

Tabela 4.2- Compostos bisbenzamidínicos e atividade biológica frente aos *Pneumocystis carinii* (Boykin et al., 1998; Hall et al., 1998;), *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* (Del Poeta et al., 1998a; Del Poeta et al., 1998b; Lombardy et al., 1996; Francesconi et al., 1999)

continua

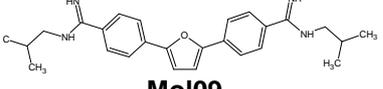
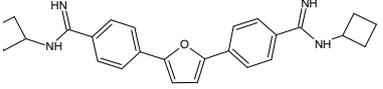
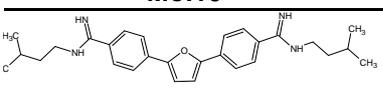
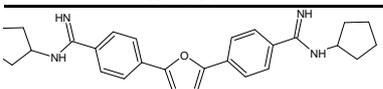
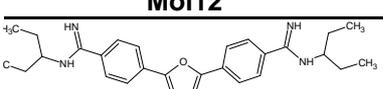
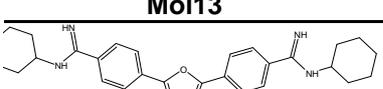
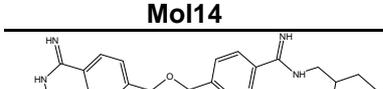
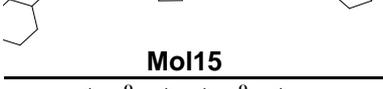
Molécula	% cistos de <i>P. carinii</i> /g de pulmão de rato ($\mu\text{mol/Kg/dia}$)	Log MIC ⁻¹ <i>C. neoformans</i> (mol/L)	Log MIC ⁻¹ <i>C. albicans</i> (mol/L)	ΔTm (°C)	Log ΔTm
 Mol09	2,20 ± 1,35 (10,0)	8,13	7,25	10	1
 Mol10	0,05 ± 0,01 (9,9)	8,73	7,53	14,8	1,17
 Mol11	2,38 ± 0,89 (9,7)	7,85	7,25	11,2	1,049
 Mol12	0,03 ± 0,02 (9,4)	8,75	7,85	15,8	1,199
 Mol13	24,43 ± 14,7 (4,8)	7,55	6,65	-	-
 Mol14	0,02 ± 0,01 (9,1)	8,48	7,57	15,4	1,187
 Mol15	43,9 ± 14,23 (8,7)	-	-	10,6	1,025
 Mol18	0,61 ± 0,27 (13,3)	-	-	4,8	0,681
 Mol20	-	-	-	11,3	1,053

Tabela 4.2 - Compostos bisbenzamidínicos e atividade biológica frente aos *Pneumocystis carinii* (Boykin et al., 1998; Hall et al., 1998;), *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* (Del Poeta et al., 1998a; Del Poeta et al., 1998b; Lombardy et al., 1996; Francesconi et al., 1999)

continua

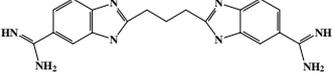
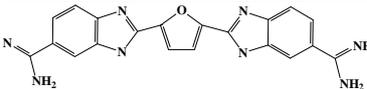
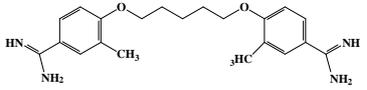
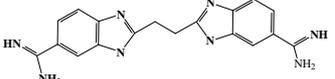
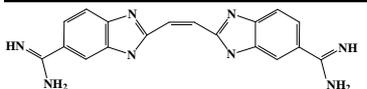
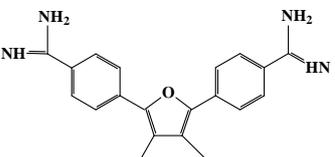
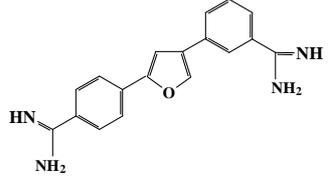
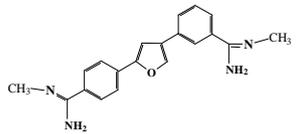
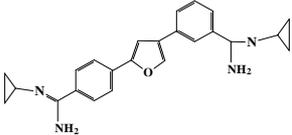
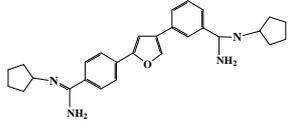
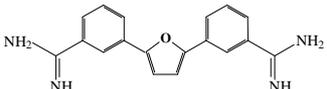
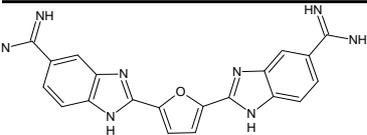
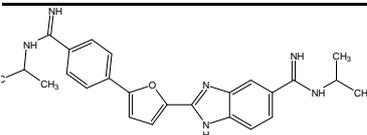
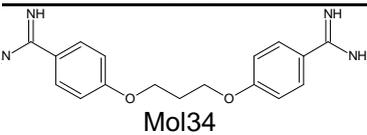
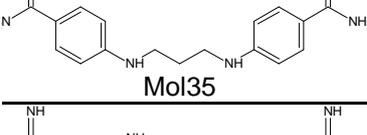
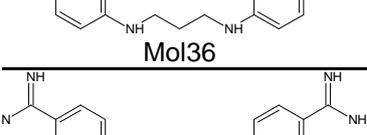
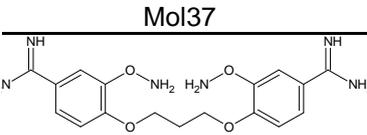
Molécula	% cistos de <i>P. carinii</i> /g de pulmão de rato (μmol/Kg/dia)	Log MIC ⁻¹ <i>C. neoformans</i> (mol/L)	Log MIC ⁻¹ <i>C. albicans</i> (mol/L)	ΔT _m (°C)	Log ΔT _m
 Mol21	31,82 ± 5,19 (27,1)	-	-	10,0	1
 Mol22	1,8 ± 0,57	-	-	14,4	1,158
 Mol23	0,6 ±	-	-	16,3	1,212
 Mol24	0,99 ± 0,36 (28,8)	-	-	15,9	1,201
 Mol25	2,68 ± 0,47 (29,0)	-	-	22,8	1,358
 Mol26	-	8,03	7,73	-	-
 Mol27	0,30 ± 0,24	-	-	9,1	0,959
 Mol28	0,4	-	-	10,9	1,136

Tabela 4.2 - Compostos bisbenzamidínicos e atividade biológica frente aos *Pneumocystis carinii* (Boykin et al., 1998; Hall et al., 1998;), *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* (Del Poeta et al., 1998a; Del Poeta et al., 1998b; Lombardy et al., 1996; Francesconi et al., 1999)

Molécula	% cistos de <i>P. carinii</i> /g de pulmão de rato ($\mu\text{mol/Kg/dia}$)	Log MIC ⁻¹ <i>C. neoformans</i> (mol/L)	Log MIC ⁻¹ <i>C. albicans</i> (mol/L)	conclusão	
				ΔT_m (°C)	Log ΔT_m
 <p>Mol29</p>	0,01	-	-	13,6	1,136
 <p>Mol30</p>	0,16	-	-	-	-
 <p>Mol31</p>	-	7,74	6,73	-	-
 <p>Mol32</p>	-	8,05	8,05	-	-
 <p>Mol33</p>	-	7,56	6,66	-	-
 <p>Mol34</p>	-	7,40	6,49	-	-
 <p>Mol35</p>	-	8,30	9,21	-	-
 <p>Mol36</p>	-	7,13	7,44	-	-
 <p>Mol37</p>	-	8,02	7,12	-	-
 <p>Mol38</p>	-	6,89	6,59	-	-

As energias E_{int} , E_{pert} e E_{lig} foram calculadas utilizando o procedimento descrito na seção 4.1.1 (página 46). Foram feitas análises de RML utilizando o programa Bilin (Kubinyi, 2009) para observar se havia alguma correlação entre os valores energia de ligação calculados e atividade ($\log MIC^{-1}$) frente aos fungos *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*.

4.1.3- Avaliação das bases nitrogenadas envolvidas na interação o-B-ADN-ligante e análise das ligações de hidrogênio presentes no complexo ADN-ligante

Utilizando o programa MacroModel, as ligações de hidrogênio existentes entre o ligante e a fenda menor do o-B-ADN foram avaliadas utilizando os seguintes parâmetros: limite de corte de ligação de hidrogênio de 3,0 Å, ângulo doador de 120 Å, ângulo acceptor de 90 Å. As bases envolvidas na interação com o-B-ADN com as moléculas **Mol06**, **Mol07**, **Mol14** e **Mol15** (Tab 4.2, pag 49) foram comparados com as estruturas cristalográficas do arquivo PDB.

Os números de átomos doadores e receptores de ligação de hidrogênio no ligante foram avaliados também no programa Tsar versão 3.21 (Tsar 3.21, 2000).

4.2- Estudos de reconhecimento de padrões e QSAR

Utilizando o programa Tsar versão 3.21, as moléculas na conformação obtida nos estudos de ancoragem molecular manual foram alinhadas utilizando alinhamento baseado na massa e na carga atômica (massa peso = 1, carga peso = 10).

4.2.1- Estudos de reconhecimento de padrão frente a *Pneumocystis carinii*

Para as moléculas **Mol01** a **Mol15** (Tabela 4.2, pág. 49) alinhadas (Seção 4.2) que apresentavam atividade biológica frente ao fungo *P. carinii* descritas na literatura, testadas na concentração de aproximadamente 10,0 $\mu\text{mol/kg/dia}$, 50 parâmetros físico-químicos (estereoquímicos, eletrônicos, topológicos, lipofílicos e de similaridade) foram calculados e normalizados, segundo procedimento média/desvio utilizando o programa Tsar versão 3.21.

Ainda utilizando mesmo programa, fez-se a PCA com o objetivo de separar os compostos em famílias de acordo com suas potências (potentes e pouco potentes). Foram utilizados 50 descritores padronizados segundo procedimento média/desvio e as quatro primeiras componentes principais foram correlacionadas

e, através destas correlações foram buscados padrões de similaridade e de reconhecimento entre os diferentes compostos.

4.2.2- Estudos de reconhecimento de padrões frente a *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*

Para as moléculas das bisbenzamidinas (Tabela 4.2, pág. 49) alinhadas (Seção 4.2, pag 53) que apresentavam a sua atividade biológica frente à *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* descritas na literatura e para as moléculas planejadas foram calculados e normalizados segundo procedimento média/desvio utilizando o programa Tsar versão 3.21, 50 parâmetros físico-químicos (estereoquímicos, eletrônicos, topológicos, lipofílicos e de similaridade).

Na análise de PCA, também foram utilizados 50 descritores padronizados segundo procedimento média/desvio e as quatro primeiras componentes principais foram correlacionadas. A análise dos gráficos dos autovetores das componentes principais também foi realizada. A separação de grupos obtidos na análise de PCA foi confirmada utilizando HCA, programa Tsar versão 3.21.

4.2.3- Estudos de QSAR-2D frente a *Candida albicans*

Análise de RML foi realizada usando o programa BILIN, tendo como grupo de treino os compostos, **Mol01, Mol05, Mol06, Mol07, Mol08, Mol13, Mol14, Mol26, Mol31** (Tabela 4.2, pag 49) e como grupo de teste os compostos **Mol09, Mol10 e Mol11** (Tabela 4.2, pag 49), escolhidos de forma aleatória. O método de validação cruzada escolhido foi o método LOO. Utilizando esta análise foram calculados os valores de $\log \text{MIC}^{-1}$ dos compostos do grupo de treino. O gráfico de $\log \text{MIC}^{-1}$ real *versus* $\log \text{MIC}^{-1}$ predito foi construído utilizando o programa Origin 6.0 (Microcal, 1991).

A atividade biológica dos compostos do grupo de teste e a porcentagem de erro desta análise foram calculadas. O gráfico de erro *versus* valores preditos foi traçado e os valores de $\log \text{MIC}^{-1}$ para os compostos planejados foram calculados.

4.2.4- Estudos de QSAR-2D frente a *Cryptococcus neoformans*

Inicialmente foi feita uma análise estatística dos dados utilizando o programa Tsar versão 3.21. Utilizando-se a mesma metodologia descrita anteriormente, foi feita RML utilizando o programa BILIN tendo como grupo de treino os compostos **Mol06, Mol08, Mol09, Mol10, Mol11, Mol13, Mol14, Mol26**

e **Mol31** (Tabela 4.2, pag 49) e como grupo de teste os compostos **Mol01**, **Mol05** e **Mol07** (Tabela 4.2, pag 49) escolhidos de forma aleatória. Foi utilizado como variável dependente os valores de $\log \text{MIC}^{-1}$ frente ao fungo *Cryptococcus neoformans* e como variáveis independentes utilizando os parâmetros calculados anteriormente. O método de validação cruzada escolhido foi o método LOO. Utilizando esta análise, os valores de $\log \text{MIC}^{-1}$ dos compostos do grupo de treino foram calculados e o gráfico de $\log \text{MIC}^{-1}$ real versus $\log \text{MIC}^{-1}$ predito foi construído.

4.2.5- Estudos de QSAR-3D

Utilizando o *software* SYBYL, foi construído um banco de dados utilizando as moléculas das bisbenzamidinas (Tabela 4.2, pag 48) que apresentavam atividade biológica frente aos fungos *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* descritas na literatura (Del Poeta et al., 1998). As moléculas do banco de dados (Tabela 4.2, pag 49) e as planejadas anteriormente (Figura 2.1, pag 40) foram alinhadas por distribuição massa/carga, utilizando o método ponto a ponto considerando os átomos do provável grupo farmacofórico da pentamidina representados pelos átomos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 1', 2', 3', 4', 5', 6', 7', 8' e 9').

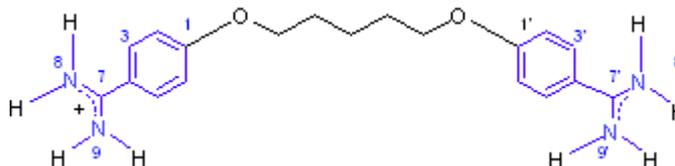


Figura 4.3- Átomos da pentamidina utilizados no alinhamento pelo método ponto a ponto

Na análise de QSAR-3D foi utilizado o método CoMFA disponível no SYBYL (Cramer et al., 1988; SYBYL 6.7, 2000; Muegge; Oloff, 2006). Foram utilizados diferentes tipos de sondas, espaçamentos dos pontos e raios de corte. Baseado no conhecimento da interação destes compostos com a fenda menor do d-B-ADN, foram escolhidas sondas que fossem capazes de mimetizar a interação do ligante com o alvo biológico: a sonda O2 (oxigênio sp^2) acceptor de ligação de hidrogênio, a sonda O3 (oxigênio sp^3) acceptor de ligação de hidrogênio, a sonda Nar (nitrogênio sp^2 pertencente a anel aromático), a sonda CH_3^{+1} (sonda *default* do programa), a sonda N3 (nitrogênio sp^3) acceptor de ligação de hidrogênio e sonda H^+ doadora de ligação de hidrogênio.

O tamanho da caixa utilizado foi de 31 Å, 15 Å e 13 Å em relação os eixos X, Y e Z respectivamente. Para reduzir o número de variáveis calculadas para cada modelo foram utilizados raios de corte para os campos eletrostático e estereoquímico; e para melhorar a eficiência e diminuir o ruído, foi empregado um filtro de coluna para excluir colunas com variância menor que 2 Kcal/mol.

O modelo foi obtido através de análises de PLS utilizando como variáveis dependentes valores de log MIC⁻¹ frente aos fungos *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* e o método validação cruzada utilizado foi o LOO.

4.2.5.1- Estudos de QSAR-3D frente a *Candida albicans*

Foi utilizado como grupo de treino os compostos **Mol01, Mol05, Mol06, Mol07, Mol08, Mol13, Mol14, Mol26** e **Mol31** (Tabela 4.2, pag 49) como grupo de teste os compostos **Mol09, Mol10** e **Mol11** (Tabela 4.2, pag 49) escolhidos de forma aleatória. As melhores condições de análises obtidas se encontram resumidas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3- Condições de análise utilizados no procedimento de CoMFA frente a *Candida albicans*

Análise	Peso	sonda	Carga	Intervalo dos pontos (Å)	Raios de corte (Kcal/mol)	
					Estereoquímico	Eletrostático
1	-	O2	0	1,5:1,5:1,5	8	16
2	0,6	O2	0	1,5:1,5:1,5	8	16
3	-	O3	0	1,0:1,0:1,0	8	16
4	0,3	O3	0	1,0:1,0:1,0	8	16
6	-	CH3	+1	1,5:1,5:1,5	8	16
7	0,3	CH3	+1	1,5:1,5:1,5	8	16
8	-	N3	0	1,0:1,0:1,0	8	16
9	0,3	N3	0	1,0:1,0:1,0	8	16

Utilizando estas análises os valores de log MIC⁻¹ frente à *Candida albicans* foram calculados para os compostos do grupo de treino, grupo de teste, os compostos planejados e os compostos do grupo de validação externa. As atividades biológicas calculadas foram comparadas com os valores descritos na literatura (Del Poeta et al., 1998a, Del Poeta et al., 1998b; Lombardy et al., 1996; Francesconi et al., 1999) e os mapas de contorno das análises foram construídos.

4.2.5.2- Estudos de QSAR-3D frente a *Cryptococcus neoformans*

Foi utilizado como grupo de treino os compostos **Mol01, Mol05, Mol06, Mol07, Mol08, Mol13, Mol14, Mol26** (Tabela 4.2, pag 49) e como grupo de teste

os compostos **Mol09, Mol10 e Mol11** (Tabela 4.2, pag 49) escolhidos de forma aleatória. As melhores condições de análises obtidas se encontram resumidas na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Condições de análise utilizados no procedimento de **CoMFA** frente a *Cryptococcus neofarmans*

Análise	Peso	Sonda	Carga	Intervalos dos pontos (Å)	Raios de corte (Kcal/mol-)	
					Estereoquímico	Eletrostático
1	-	CH3	+1	1:1:1	8	16
2	0,3	CH3	+1	1:1:1	8	16
3	-	CH3	+1	1:1:1	0	16
4	0,3	CH3	+1	1:1:1	0	16
5	-	O2	0	1:1:1	30	30
6	0,3	O2	0	1:1:1	30	30
7	0,6	O2	0	1:1:1	30	30
8	0,6	O2	0	1:1:1	8	16
10	0,3	O2	0	1:1:1	8	16
11	0,3	N2	0	2:2:2	8	16
13	-	H	+1	1:1:1	0	16
14	0,3	H	+1	1:1:1	0	16
15	0,6	H	+1	1:1:1	0	16

Utilizando estas análises os valores de $\log \text{MIC}^{-1}$ frente à *Cryptococcus neofarmans* foram calculados para os compostos do grupo de treino, grupo de teste, os compostos planejados e os compostos do grupo de validação externa. As atividades biológicas dos compostos foram comparadas com os valores descritos na literatura (Del Poeta et al., 1998a; Del Poeta et al., 1998b, Lombardy et al., 1996; Francesconi et al., 1999).

4.3- Síntese

4.3.1- Secagem de solventes e reagentes

Os solventes e reagentes foram purificados de maneira usual (Perrin et al., 1980).

4.3.2- Tratamento da resina Dowex 50WX2

A resina Dowex 50WX2 (18,70 g, capacidade de troca 4,8 meq/g sob a forma de Na⁺), foi tratada com ácido clorídrico 1mol/L (60 mL) e depois lavada com água até pH 7 (El Hajj et al., 1987; Weast, 1984).

4.3.3- Aparelhos utilizados

Aparelho de ponto de fusão

As faixas de fusão foram determinadas em aparelho MQAPF-301 aparelho digital de ponto de fusão da marca Micro-química.

Espectrômetro na região do infravermelho

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em aparelho Schimadzu/IR-408 e no aparelho no aparelho Thermoscientific Nicolet 380 FT-IR por ATR (Departamento de Química-ICEEx, UFMG).

Espectrômetro de RMN de ¹H e RMN de ¹³C

Os espectros de RMN de ¹H e RMN de ¹³C foram obtidos no espectrômetro BRUKER AVANCE DPX 400 e no BRUKER AVANCE DPX 200 (Departamento de Química-ICEEx, UFMG), utilizando como padrão de referência interna o tetrametilsilano.

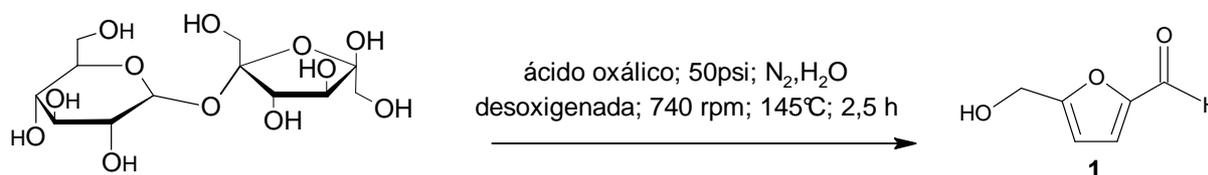
Espectrômetro de Massas

Os espectros de massas por ionização por *eletrospray* (ESI-MS) foram registrados no espectrômetro LQC Fleet Thermo Scientific no programa Xcalibur TM 2.0.7 (Departamento de Química-ICEEx, UFMG).

4.3.4 - Preparação do 5-(hidroximetil)- 2-carbaldeidofurano (composto 1)

4.3.4.1 - Método 1

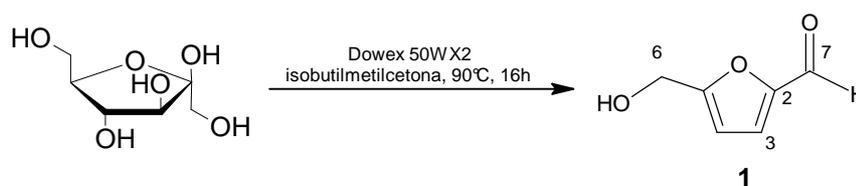
Timko et al., 1977



Em um balão de 100 mL tritubulado, foram colocados 10,0 g (29,0 mmol) de sacarose, solubilizado em 60 mL de água desoxigenada e adicionados 70 mg (0,6 mmol) de ácido oxálico. A solução foi colocada em autoclave (Parr 2,0 L de capacidade). A autoclave foi selada e pressurizada a 50 psi em atmosfera de nitrogênio e mantida sob agitação (740 rpm). A temperatura foi mantida a 145 °C por 15 min. Após este período, foi resfriada para 125 °C e mantida a esta temperatura por 2,5 h. A autoclave foi então resfriada. A mistura reacional foi neutralizada com hidróxido de sódio 10 %, saturada com cloreto de sódio e extraída com acetato de etila. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e depois evaporada sob pressão reduzida levando a obtenção de um óleo amarelo. Rendimento: 0,90 g (25%). Para a purificação, o óleo obtido foi solubilizado em 5,0 mL de clorofórmio e adicionado 2,0 g de alumina neutra e mantido sob agitação por 2 horas a temperatura ambiente. A mistura foi submetida à coluna cromatografia usando como eluente clorofórmio e como fase estacionária alumina neutra (3,0 g).

4.3.4.2 - Método 2

El Hajj et al., 1987.



Em balão bitubulado de 500 mL equipado com um condensador de refluxo foram adicionadas a 5,0 g (30 mmol) de frutose solubilizada na menor quantidade

possível de água (aproximadamente 5 mL), 18,70 g da resina Dowex 50WX2 preparada previamente e 250 mL de isobutilmetilcetona. A mistura foi aquecida e mantida em refluxo (90 °C) durante 16 h. A cada 2 h de reação, a reação era resfriada e a camada superior (fase orgânica) era recolhida, recolocando 250 mL de isobutilmetilcetona, a mistura reacional era aquecida novamente e mantida sob refluxo. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e depois destilada sob pressão reduzida levando a obtenção de um óleo amarelo. Rendimento bruto: 3,1 g (91%).

Para a purificação do composto obtido, uma solução de 3,1 g do óleo obtido em 5 mL clorofórmio foi adicionada a 26,0 g de alumina neutra e mantida sob agitação por 2 horas a temperatura ambiente. A mistura foi submetida à coluna cromatografia usando como eluente clorofórmio e como fase estacionária alumina neutra (80 g).

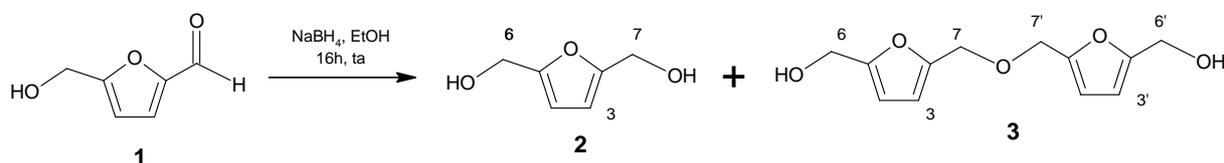
IV (cm⁻¹, v): 3336 deformação axial de OH; 1658 deformação axial de C-O carbonila de aldeído; 1520 deformação axial C=C.

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 9,629 (s, 1 H, H7), δ 7,226 (d, *j*_{H3-H4} 3,6; 1 H; H3), δ 6,578 (d, 1 H, H4), δ 4,640 (s, 2 H, H6).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ 177,736 (C7); δ 157,229 (C2); 152,778 (C5); δ 121,951 (C3); δ 111,885 (C4), δ 64,608 (C6).

4.3.5 - Preparação do 2,5-di-(hidroximetil)-furano (composto 2) e 1,5-di [(5'-hidroximetil-2'-furano)il]3-oxapropano (composto 3)

Timko et al., 1977



Em um balão tritubulado de 250 mL acoplado a condensador para refluxo e agitação magnética, colocaram-se 2,25 g (18,0 mmol) de 1 e 100 mL de etanol seco. Adicionaram-se 560,0 mg (15,0 mmol) de NaBH₄ agitou-se à temperatura ambiente por 24 h. À mistura reacional foi adicionado ácido clorídrico concentrado

e em seguida foi neutralizada com solução de bicarbonato de sódio. A solução etanólica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada, o solvente foi evaporado. O produto foi recristalizado em clorofórmio. Após 24 h, o produto foi filtrado e obtido 525 mg (53 %) de 2,5 bis(hidroximetil)-furano (**2**). O filtrado foi mantido em geladeira e após 72 h filtrou-se 893 mg (47 %) de 2, 2' [oxibis(metileno)]-bis-2,5(hidroximetil)-furano (**3**).

2,5-di-(hidroximetil)-furano - (composto 2)

Ponto de fusão: 59-61°C

IV (cm⁻¹, ν): 3327 deformação axial OH, 2942-2800 deformação axial simétrico e assimétrico de CH; 1558 deformação axial de C=C

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 6,25 (s, 2 H, H3 e H4); δ 4,45 (s, 4 H, H6 e H7)

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ 153,58 (C2 e C5); δ 109,01 (C3 e C4); δ 55,77 (C6 e C7).

1,5-di [(5'-hidroximetil-2'-furano)il]3-oxapropano - (composto 3)

ESI/MS (m/z; % relativa de abundância): 261,23 [(M + Na)⁺, 100%]; 243,24 [(M + Na - H₂O)⁺, 98%]; 233,15 [(M + Na - CH₂)⁺, 22%]; 150,14 (M + Na - C₆H₇O₂)⁺, 78%].

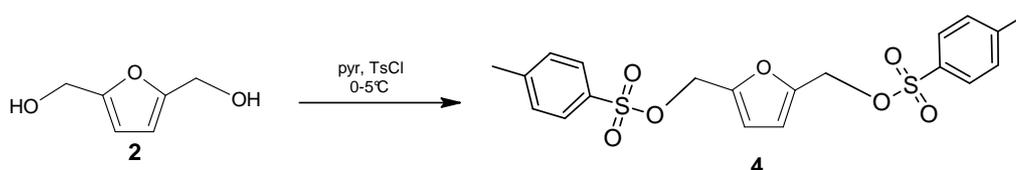
IV (cm⁻¹, ν): 3330 deformação axial de O-H; 2900-2800 deformação axial assimétrico e simétrico de CH₂; 1639 deformação axial de C=C do anel furânico; 1200 deformação axial assimetria de C-O-C; 1062 deformação axial simétrica C-O-C.

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 6,380 (d, J_{H3-H4} 3,0, 2 H, H4), δ 6,438 (d, 2 H, H3), δ 4,556 (s, 8 H, H1 e H6)

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ 154,18 (C5); δ 150,556 (C2); δ 111,359 (C4); δ 109,021 (C3); δ 63,073 (C6); δ 55,749 (C7).

4.3.6- Tentativa de preparação de 2,5-di-(4-metilbenzenossulfonato)-furano (composto 4)

Photis; Paquete, 1988

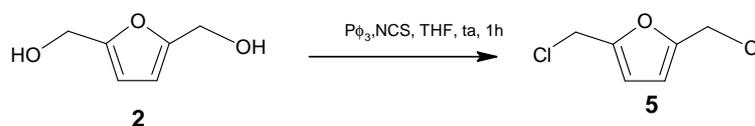


Uma solução de 192 mg do composto **2** (1,5 mmol) em 2 mL de piridina anidra foi colocada em um balão equipado com agitação magnética. A solução foi resfriada em banho de gelo (0- 5° C) e 572 mg (0,6 mmol) de cloreto de tosilato foram adicionados lentamente. A reação foi aquecida à temperatura ambiente e agitada por 24 horas. Após este período foram adicionados 50,0 mL de água gelada à mistura reacional que foi extraída com éter etílico (4 X 20 mL). A solução etérea foi lavada com ácido sulfúrico 1 mol/L, posteriormente com solução saturada de NaHCO₃ e finalmente com água. A solução etérea foi secada com Na₂SO₄, filtrada e o solvente destilado a pressão reduzida.

4.3.7 - Preparação do 2,5-diclorometil-furano (composto 5)

4.3.7.1- Método 1

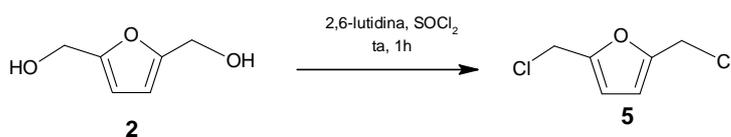
Bose et al., 1973



Em balão de fundo redondo acoplado a condensador de refluxo e agitação magnética foram adicionados 268,0 mg (2 mmol) de N-clorossuccinimida solubilizada em 12,0 mL de tetrahidrofurano (THF). A esta solução foi adicionada, gota a gota sob agitação magnética, uma solução de 524 mg (2 mmol) trifenílfosfina em THF (1 mL). Foi observada a formação de um precipitado branco. A esta suspensão foi adicionada uma solução de **2** (116,0 mg, 1 mmol) em THF (5,0 mL). A mistura reacional foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 1 h. Após este período, o solvente foi evaporado e ao resíduo obtido foram adicionados 10,0 mL de água e depois 20,0 mL de éter etílico. A camada orgânica foi lavada com água, secada com sulfato de sódio anidro e concentrada a pressão reduzida. Análise de RMN de ¹H mostrou se tratar de 2,5 bis(clorometil)furano (**5**) impuro.

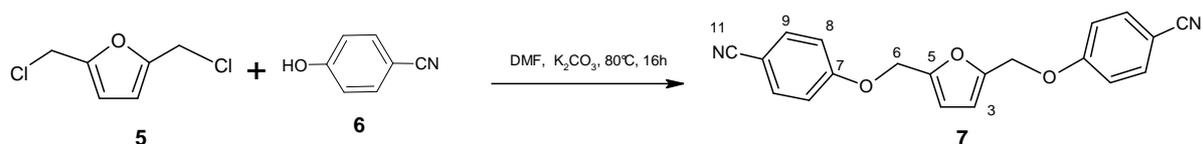
RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 6,316 (s, 2H, H3 e H4), δ 4,535 (s, 4H, H6, H6')

4.3.7.2- Método 2



Em um balão de 25 mL contendo uma solução de cloreto de tionila (1,64 mL; 20 mmol) em acetato de etila (5,0 mL), a 0-5°C, foi adicionado gota a gota sob agitação magnética uma solução de **2** (1,0 g; 90 mmol) em 2,6-lutidina (2,42 mL; 20 mmol). Houve a formação de um sólido. A mistura reacional foi lentamente aquecida a temperatura ambiente e agitada durante uma hora. Foram adicionados 10,0 mL de água e 10 mL de hexano. A camada orgânica foi separada e o produto clorado foi usado, imediatamente, juntamente com o solvente.

4.3.8- Preparação do 4,4'-[furan-2,5-diilbis(metanodiiloxo)]dibenzonitrila (**composto 7**) Xue et al.; 1997



Em um balão de 25 mL, acoplado a condensador de refluxo e com agitação magnética, colocaram-se 165 mg da mistura contendo o composto **5**, 238 mg (2 mmol) de 4-cianofenol, 440 mg (3,2 mmol) de carbonato de potássio e 4,0 mL dimetilformamida. A mistura foi aquecida a 80 °C sob agitação, sendo que a mesma inicialmente estava amarelada foi escurecendo até ficar marrom escura. Após 16 h foi resfriada à temperatura ambiente. Uma solução diluída de ácido cítrico foi adicionada, seguida de acetato de etila. A camada orgânica foi lavada com água, ácido cítrico, solução saturada de cloreto de sódio, solução diluída de bicarbonato de sódio e salmoura novamente. Foi secada com sulfato de magnésio e concentrada. Com o produto bruto foi feita cromatografia coluna de sílica utilizando 28 g de sílica e como eluente a mistura hexano: diclorometano em polaridade crescentes. Análises espectrométricas indicaram tratar-se do composto 4,4'-[furan-2,5-diilbis(metanodiiloxo)]dibenzonitrila (**7**). Rendimento: 250 mg (76 %).

PF. 150-153°C

ESI/MS (*m/z*; % relativa de abundância): 330,98 [(M + H)⁺, 65%]; 212,06 [(M - C₇H₄NO)⁺; 100%]

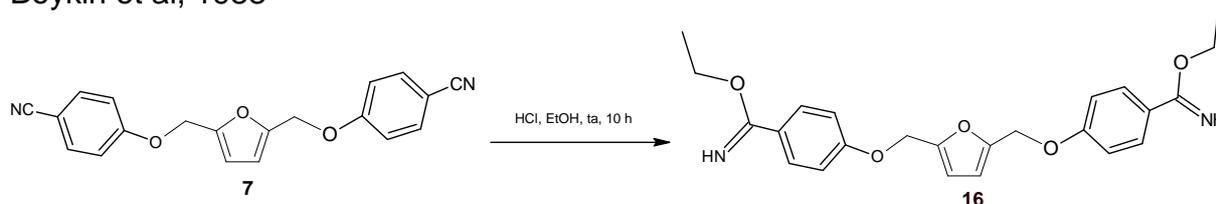
IV (cm⁻¹, ν): 2222 estiramento CN, 1604 estiramento C-C de anel aromático, 1246 estiramento C-O-C de éter, 852 deformação de C-H de anel aromático *para* substituído.

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 7,599 (d, 4H, *j* = 8,6 Hz, H₉); δ 7,032 (d, 4H, *j* = 8,6 Hz, H₈), δ 6,488 (s, 2H, H₃ e H₄); δ 5,059 (s, 4H, H₆).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ 161,307 (C₇); δ 149,924 (C₂); δ 133,962 (C₉); δ 118,938 (C₁₁); δ 115,418 (C₈); δ 111,563 (C₃ e C₄); δ 104,568 (C₁₀); δ 62,350 (C₆).

4.3.9 - Tentativa de síntese do (4-carboximidato de etila-1-feniloximetil)-2,5-di(metanodiiloxi)-furano (composto 16)

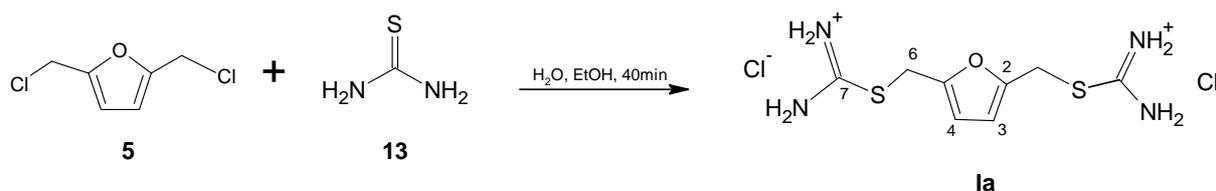
Boykin et al, 1988



Em balão de fundo redondo, composto **7** foi solubilizado em etanol anidro e resfriado em banho de gelo (0-5°C). Cloreto de hidrogênio gerado *in situ* foi passado através da solução durante 10h. A mistura foi agitada por 3 dias a temperatura ambiente. Posteriormente foi neutralizada com NaHCO₃ e concentrada em evaporador rotatório. Foi realizada uma CCDS (eluente MeOH) que indicou mistura de difícil purificação.

4.3.10- Síntese do 2,5-di[5-tioureido-metil] furano- (composto Ia)

Silva, 2005; Denk & Ye, 2005



Ao composto **5** (preparado a partir de 130,0 mg do **2**, segundo metodologia descrita na Seção 4.3.7.2, pag 62) solubilizado em 10 mL de hexano foram adicionados, lentamente, uma solução de 155,0 mg (2 mmol) de tiouréia solubilizada em 2,0 mL de uma solução etanol: água (1:1). Deixou-se a mistura sob agitação à temperatura ambiente durante 40 min. A mistura reacional foi extraída com clorofórmio (3 x 50,0 mL) para retirar tiouréia. Filtrou-se a fase hidroalcolica em coluna rápida de alumina neutra. Lavando a coluna com etanol. O filtrado foi destilado à pressão reduzida a uma temperatura de 45° C, obtendo-se um óleo castanho extremamente viscoso (**1a**). Rendimento: 121mg (39%).

ESI/MS (*m/z* % relativa de abundância): 244,64 [(M + H)⁺, 100%]; 168,87 [(M-CH₄N₂S)⁺; 51%]; 125,00 [(M - C₂H₇N₄S)⁺; 16%].

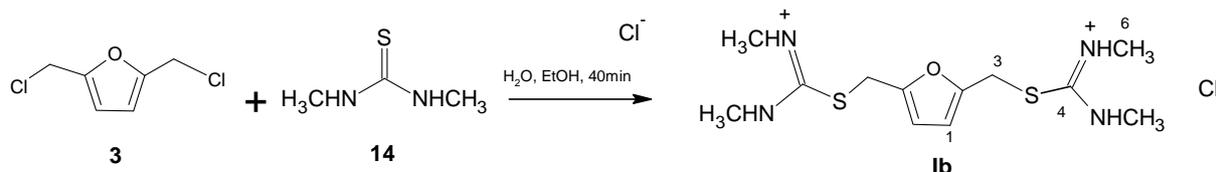
IV (cm⁻¹, ν): 3300-3000 deformação axial de NH₂; 2977 deformação axial de CH₂, 1649 deformação axial de C-C de anel aromático; 1606 deformação axial de C=N

RMN de ¹H (200 MHz, D₂O): δ 6,33 (s, 2H, H3, H4); δ 4,35 (s, 4H, H6).

RMN de ¹³C (50 MHz, D₂O): δ 170,058 (C7); δ 148,547 (C2,C5); δ 110,662 (C3,C4) δ 27,87 (C6).

4.3.11 - Síntese do 2,5-dimetanodiil-bis(*N, N'*-dimetilcarbamidotioato)- furano (composto **1b**)

Silva, 2005; Denk & Ye, 2005



Seguindo-se o procedimento geral para preparação de tioureidos, ao composto **5** (preparado a partir de 130,0 mg do **2**, segundo metodologia descrita na Seção 4.3.7.2, pag 62) foi adicionado, lentamente, 2,0 mL de uma solução hidroalcolica (1:1) contendo 230,0 mg (2,2 mmol) de 1,3-dimetil-tiouréia. Procedeu-se a reação, a extração e a purificação como descrito no item **4.3.10**. Foram obtidos 182,0 mg (52 %) de um óleo viscoso (**1b**).

ESI/MS (*m/z*; % relativa de abundância): 301,08 [(M + H)⁺, 100%]; 197,00 [(M-C₃H₈N₂S)⁺; 63%].

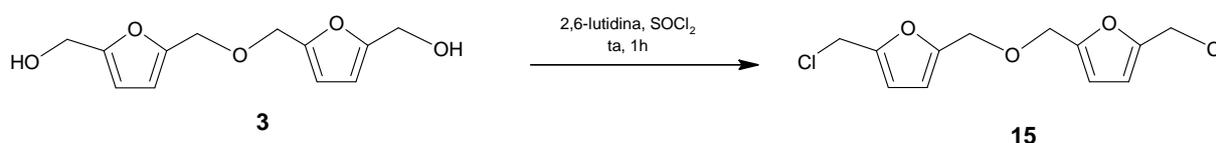
IV (cm⁻¹, ν): 3200-3000 deformação axial de NH;

RMN de ¹H (200 MHz, D₂O): δ 6,337 (s, 2H, H3 e H4); δ 4,360 (s, 4H, H6); δ 2,971 (s, 6H, H8); δ 2,903 (s, 6H, H9).

RMN de ¹³C (50 MHz, D₂O): δ 166,416 (C7) ; δ 148,486 (C2 e C5); δ 110,987 (C4); δ 30,880 (C8); δ 29,915 (C6).

4.3.12 - Preparação do 1,5-bis-[5'-(clorometil)2'-furano]il]-3-oxa-propano (composto 15)

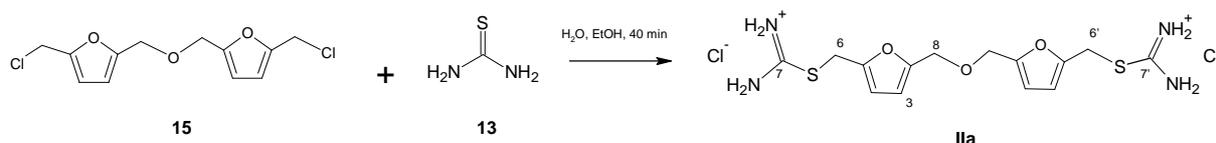
Chemical abstracts, 1963



Em um balão de 100 mL, dotado de agitação magnética, colocou-se 0,50 g (2,10 mmol) de **3** em 1,20 mL (0,01 mol) de lutidina. Adicionou-se, lentamente, 0,80 mL (0,01 mol) de cloreto de tionila (recém destilado) diluído em 2,50 mL de acetato de etila. Após 1 h de agitação obteve-se uma mistura alaranjada. A esta mistura foram adicionados 10,0 mL de água e 10,0 mL de hexano. Separou-se se a fase orgânica contendo o produto clorado (**15**) que foi usado imediatamente na reação com a tioureia.

4.3.13- Síntese do 1,5-bis-[5'-carbamidotioato-2'-furano]il]-3-oxa-propano (IIa)

Silva, 2005; Denk & Ye, 2005



Em balão de 25 mL, solubilizou-se 0,65 g (8,60 mmol) de tiouréia em 2,0 mL de água e adicionaram-se 4,0 mL de etanol. Sobre esta solução adicionou-se a fase orgânica, contendo o produto clorado **15**, obtido na etapa anterior (**Item 4.3.12**). Deixou-se sob agitação à temperatura ambiente durante 30 min. Acompanhou-se a reação por CCD tendo como eluente acetato de etila. Agitou-se por 30 min e separaram-se as fases obtidas na mistura reacional. Procedeu-se a extração e a purificação do produto (**IIa**) como descrito no item **4.3.10**. Rendimento: 510 mg (61%).

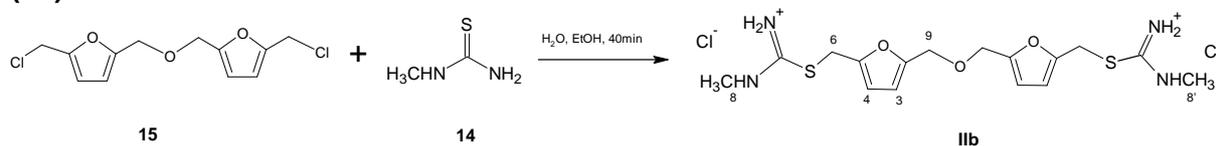
ESI/MS (m/z ; % relativa de abundância): 355 $[(M + H)^+$, 88%]; 279 $[(M - C_4H_4N_2S)^+$, 100%]; 169 $[(M - C_7H_9N_2O_2S)^+$, 22%]

IV (cm^{-1} , ν): 3250 deformação axial assimétrico NH_2 ; 3172 deformação axial simétrico de NH , 1643 deformação NH_2 ;

RMN de 1H (200 MHz, D_2O): δ 6,426 (s, 4H, H3 e H4); δ 4,508 (s, 4H, H8); δ 4,441 (s, 4H, H6)

RMN de ^{13}C (50 MHz, D_2O): δ 170,126 (C7); 151,466 (C2); δ 148,327 (C5); δ 117,706 (C3); δ 110,609 (C4); δ 63,175 (C8); δ 28,049 (C6).

4.3.14- Síntese do 1,5-bis-[5'-N-metil-carbamidotioato-2'-furano]il]-3-oxa-propano (IIb)



Ao composto **15**, recém preparado (**item 4.3.12**), solubilizado em 10 mL de hexano, adicionaram-se 783 mg (8,7 mmol) de 1-metil-2-tioureia, solubilizado em 3,0 mL de água e 4,0 mL de etanol. Deixou-se sob agitação à temperatura ambiente durante 30 min. A fase aquosa foi extraída com clorofórmio (3 x 50,0 mL) para retirar tioureia. Procedeu-se a extração e a purificação do produto (**IIb**) como descrito no item **4.3.13**. Rendimento: 750 mg (94%).

ESI/MS (m/z ; % relativa de abundância): m/z 383 $[(M + H)^+$, 100%]; 293,08 $[(M - C_2H_6N_2S)^+$, 80%]; 183 $[(M - C_8H_{12}N_2O_2S)^+$, 33 %].

IV (cm^{-1} , ν): 1603 deformação axial $S-C=N$

RMN de 1H (δ , 200 MHz, D_2O): δ 6,327 (s; H3 e H4); δ 4,337 (s, H6); δ 4,26 (s, H9); δ 2,877 (s, H8).

RMN de ^{13}C (δ , 50 MHz, D_2O): δ 166,268 (C7); δ 151,301 (C2); δ 148,823 (C5); δ 111,651 (C3); δ 110,613 (C4); δ 63,047 (C9); δ 30,130 (C8); δ 29,452 (C6).

4.4- Ensaios de atividade biológica *in vitro*

4.4.1 Atividade antifúngica

4.4.1.1- Considerações Gerais

Os ensaios biológicos foram realizados pelo Dr. Luciano José Nogueira e a pela doutoranda Sheila Rodrigues Oliveira no laboratório da professora Dra. Maria Aparecida de Resende no Instituto de Ciências Biológicas –ICB/UFMG.

Todos os micro-organismos utilizados no ensaio são pertencentes à Coleção de Micro-organismos do Laboratório de Micologia/Departamento de Microbiologia da UFMG. As leveduras utilizadas nos ensaios antifúngicos, listadas abaixo, são da *American Type Culture Collection* (ATCC):

Candida albicans – ATCC 18804; *Candida glabrata* – ATCC 2001;
Candida krusei – ATCC 200298; *Candida parapsilosis* – ATCC
22019;

Candida tropicalis – ATCC 22019; *Aspergillus fumigatus* – ATCC 16913;

Estas leveduras foram subcultivadas em ágar saboraud dextrosado (SDB) e incubadas a 35°C por 24h.

As diferentes cepas do micro-organismo *Paracoccidioides brasiliensis* (MG05, PB01, PB18, PB1017) foram isolados clinicamente (IC). Esta espécie foi subcultivada em SDB e incubada a 35 °C por 15 dias.

O padrão positivo utilizado foi a anfotericina B (Sigma, teor declarado 80% determinado por HPLC).

Na manutenção das culturas fúngicas e no preparo dos inóculos para determinação das MICs foram utilizados meios de cultura:

- Caldo de Ágar Sabouraud Dextrose (ASD – Oxoid, Basingstoke, UK), utilizado para os ensaios com a maioria dos inóculos;
- O meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), desenvolvido no *Roswell Park Memorial Institute*, tamponado para pH 7,0 com ácido-2-(N-morfolino)-propanossulfônico (MOPS), 0,165 molL⁻¹ (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), utilizado na execução da determinação da MIC para todas espécies;

As amostras de *Paracoccidioides brasiliensis* foram mantidas em meio sólido Fava-Netto e incubadas a 37 °C para se obter a fase de levedura.

Foram realizados repiques semanais com o objetivo de manter as amostras viáveis.

4.4.1.2- Aparelhos Utilizados

Capela de segurança biológica classe II (veco), estufa de crescimento (Fanem, modelo Orion 502), leitora de microplaca.

4.4.1.3- Preparação do Inóculo

As preparações dos inóculos e também condições da determinação da MIC foram realizadas seguindo documento M27 (CLSI, 2003) para fungos leveduriformes e M38 (CLSI, 2008) para fungos filamentosos todos de acordo com as normas internacionais estabelecidas pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) As espécies foram subcultivadas em meio específico ASD/BDA, sendo mantidas em tempos específicos e temperaturas específicas (NCCLS – *National Committee for Clinical Laboratory Standards*).

Com o auxílio de uma alça de platina transferiu-se a levedura a ser utilizada para tubo falcon estéril contendo 5 mL de solução salina estéril. A suspensão de leveduras foi ajustada, a um comprimento de ondas de 520 nm, a valor de absorbância entre 0,8 a 1,0. O inóculo de cada levedura foi preparado transferindo-se 300 µL da suspensão salina da levedura correspondente, para um falcon estéril grande com 14,7 mL de RPMI 1640, obtendo-se uma suspensão de 1×10^3 a 1×10^4 ufc/mL (DUARTE, 2001).

4.4.1.4- Preparo das amostras

Os compostos sintetizados testados foram dissolvidos em água destilada estéril obtendo soluções estoque (concentração de 1000 µg/mL). Transferiu-se, usando um pipetador de 1000 µL, o meio RPMI 1640 para 4 tubos falcon: para o primeiro tubo foram transferidos 976 µL de RPMI, para o segundo, terceiro e quarto tubos foram transferidos 1 mL de meio RPMI 1640. Fez-se uma diluição seriada de todos os compostos testados, transferindo-se para o primeiro falcon 1024 µL da solução estoque do composto correspondente resultando na primeira solução com concentração de 500 µg/mL. Desta primeira diluição, foi transferido 1,0 mL da primeira solução para o segundo falcon que já continha 1,0 mL de

RPMI, resultando a segunda solução e assim sucessivamente até a décima diluição (Figura 4.4).

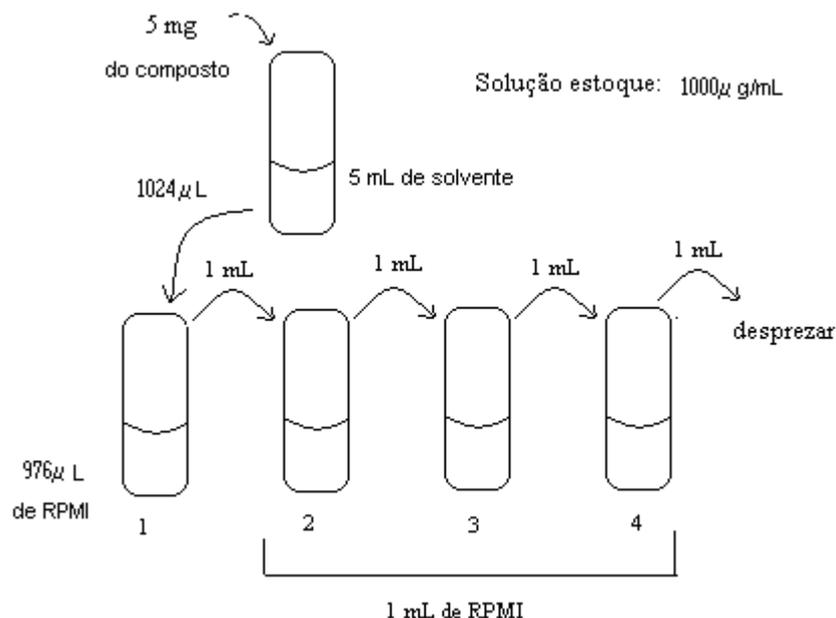


Figura 4.4- Esquema ilustrativo da diluição seriada dos compostos testados

Foi dissolvido 1 mg de anfotericina B (AMB) em 4,0 mL de água estéril obtendo uma solução estoque na concentração de 250 µg/mL. Como descrito anteriormente, foram transferidos para 10 tubos Falcon estéreis 2,0 mL do meio RPMI, com o auxílio de um pipetador automático. Fez-se uma diluição seriada das substâncias a serem testadas transferindo 2,0 mL da solução estoque para o tubo 1. Desta primeira diluição foram transferidos 2,0 mL para o segundo tubo resultando na segunda diluição e assim sucessivamente até a décima diluição.

4.4.1.5- Determinação da concentração inibitória mínima (do inglês *Minimum inhibitory concentration* - MIC)

Em placas estéreis de 96 poços (Figura 4.5) foram adicionados 200,0 µL de RPMI 1640 em cada orifício da primeira e da sétima coluna (colunas A), para o controle de esterilidade. Na sexta e na décima segunda (colunas B) adicionaram-se 100 µL de RPMI 1640 e 100,0 µL de inóculo da levedura correspondente ao ensaio, para o controle de crescimento do fungo testado. No momento da leitura, o crescimento de microrganismos no controle positivo (poços número 6 e 12), mostra a viabilidade da cultura usada e seu crescimento é comparado visualmente, ao crescimento verificado nos poços referentes às diferentes concentrações testadas (poços número 2 até 5, para substância 1 ou poço

número 8 até 11, para substância 2). Nos poços número 1 e 7, pela ausência de inóculo, não pode haver crescimento de micro-organismos. Esse controle é muito importante, pois ele indica se o meio de cultura está isento de microrganismos.

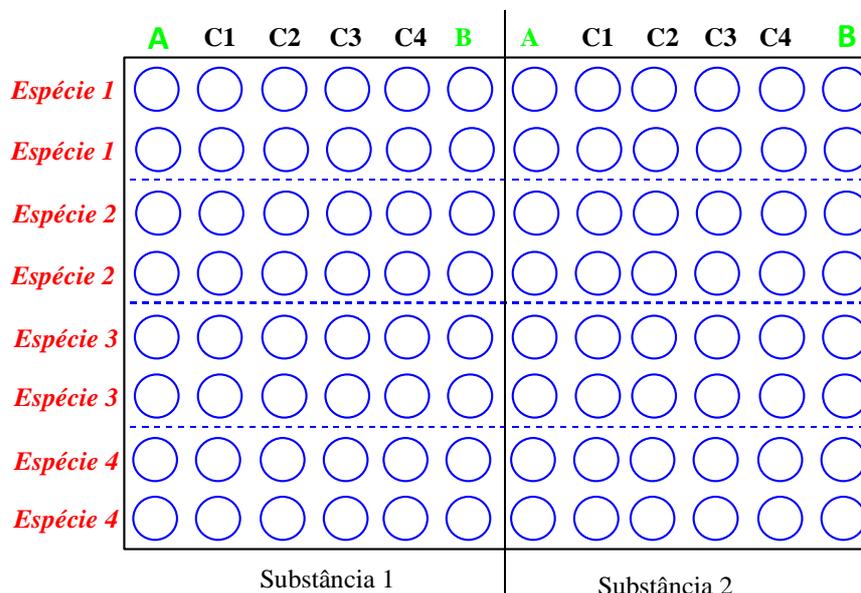


Figura 4.5- Distribuição das concentrações de duas substâncias e quatro espécies de fungos testadas em placa de 96 poços

Foram feitas duplicatas das concentrações para os compostos sintetizados e Anfotericina B, antifúngico utilizado como controle positivo. Nas colunas correspondentes às quatro concentrações testadas de cada composto, foram distribuídos em cada orifício 100,0 µL do inóculo correspondente com uma pipeta de microdiluição de 12 canais.

Em seguida, foram adicionados, em cada orifício, 100,0 µL do composto na coluna correspondente à sua concentração, resultando, com diluição do composto num total de 200 µL, em uma concentração final de que varia de 250 a 32 µg/mL. A placa foi selada com um papel filme, incubada a 35 °C pelo tempo estabelecido para cada espécie e a leitura realizada visualmente. As MIC's foram consideradas como a menor concentração do composto testado ou antifúngico que inibiu 80-100% o crescimento do micro-organismo, em relação ao controle de crescimento após a incubação e foram expressas em µg/mL e mmol/L.

4.4.2- Estudo da Atividade Antitumoral e Atividade Citotóxica

4.4.2.1- Considerações Gerais

Os testes foram realizados no Laboratório de Substâncias Antitumorais do Departamento de Farmacologia no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (ICB-UFMG), pela estudante de mestrado Ana Cândida Araújo e Silva sob coordenação da Professora Miriam Teresa Paz Lopes.

4.4.2.2- Aparelhos Utilizados

Estufa de CO₂ (Sanyo); capela de segurança biológica classe II (Veco); Leitor de microplaca Biorad modelo 2550; Microscópio óptico (Olympus CK 2); Aparelho ultra-som Thornton T14; Purificador de água Milli-Q Plus (Millipore); Balança analítica Micronal AB 204.

4.4.2.3. Origem das Linhagens e Meio de Cultura Celular

A linhagem celular de melanoma humano (MeWo) foi cedidas pelo Dr. Ricardo R. Bretani do Instituto Ludwig de pesquisa sobre o câncer, de São Paulo. A linhagem carcinoma de pulmão humano (A549) foi cedida pela professora Mônica Cristina de Oliveira da Faculdade de Farmácia da UFMG. As demais linhagens: epitélio de rim de hamster (BHK21) e glioma de rato (C6) são pertencentes à Coleção do Laboratório de Substâncias Antitumorais do Departamento de Bioquímica da UFMG. A linhagem celular 4T1(M) de carcinoma mamário murino é pertencente ATCC: 4T1(M) ATCC-CRL-2539.

Para em cada 1,0 L de meio de cultura tem-se: 10,4 g de RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) em água deionizada; 1,2 g de bicarbonato de sódio (Grupo Química Indústria Ltda.); 10 µmol/L de HEPES pH 7,4 (INLAB); 0,1 g de Ampicilina (Wyeth); 0,1 g de Estreptomicina (Sigma-Aldrich); 0,05 g de Gentamicina (Farmácia HC – FMUSP); 0,0025 g de Anfotericina B (Bristol – Myers Squibb). O meio foi filtrado através de membranas de 0,2 µm de porosidade (*Micro Filtration Systems*) garantindo sua esterilização. O Soro Fetal Bovino (SFB) (Cultilab) foi inativado a 56 °C por 30 minutos e esterilizado por filtração através de membranas de 0,2 µm de porosidade (*Micro Filtration Systems*).

4.4.2.4. Procedimentos Gerais

As células foram cultivadas, rotineiramente, em meio RPMI 1640 a 5 % v/v de soro fetal bovino (SFB) e incubadas em atmosfera úmida com 2,5 % de CO₂ à temperatura de 37 °C, no escuro. Antes de atingirem confluência as células foram subcultivadas da seguinte maneira: as células foram lavadas com PBS-EDTA, adicionou-se uma solução de tripsina 0,2 %, após o descolamento das células da superfície da garrafa, foi feita a inativação da tripsina pela adição de meio RPMI 1640 a 5 % v/v de SFB. As células em suspensão foram distribuídas para novas garrafas ou placas nas densidades desejadas ou ainda estocadas em nitrogênio líquido (na presença de 10 % de DMSO e 30 % de SFB).

Suspensões celulares foram distribuídas em microplacas de 96 cavidades contendo $1,0 \times 10^3$ células/poço. As culturas foram incubadas em atmosfera úmida a 5 % de CO₂, a 37 °C. Após 48 h foram adicionados os compostos, dissolvidos em DMSO, nas concentrações de 10^{-7} à 10^{-4} mol/mL. O brometo de 3-(4, 5'-dimetiltiazol-2'-il-2,5-difeniltetrazol (MTT) foi adicionado 4 h antes das leituras (0,05 mg/cavidade), sendo estas realizadas cinco dias após a adição dos compostos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 600 nm. Antes da adição do MTT, o meio RPMI 1640 a 5 % de v/v de soro fetal bovino (SFB) foi trocado para se evitar qualquer interação entre os compostos analisados e o MTT. Os cristais de formazana formados, devido à metabolização do MTT, são insolúveis em meio aquoso, e por isso foram solubilizados em 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), antes das leituras.

Para controle positivo dos ensaios, não se utilizou nenhum antineoplásico. Em cada microplaca de 96 poços, o branco, utilizado para zerar o espectrofotômetro, foi apenas com meio RPMI 1640 a 5 % v/v de SFB e MTT. O crescimento celular foi acompanhado pelo controle negativo, composto apenas de células em meio RPMI 1640 a 5 % v/v de SFB. As médias aritméticas das densidades ópticas (absorbância) obtidas para os controles foram consideradas como 100 % de viabilidade celular, sendo assim, as porcentagens de células viáveis foram calculadas pela fórmula: $B/A \times 100$, onde A = média aritmética da densidade óptica do controle negativo e B = densidade óptica na presença de amostra. A porcentagem de inibição da viabilidade celular foi determinada subtraindo-se de 100 % o valor.

RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1- Estudos de *ancoragem molecular*

O processo de *ancoragem molecular* de um ligante ao seu sítio de interação tenta mimetizar a interação do ligante ao seu receptor. Envolve o uso de algoritmos e função de *scoring* (Evans & Neidle, 2006). Vários programas de *ancoragem molecular* e funções de *scoring* têm sido publicados nos últimos anos (Warrem et al., 2006). A metodologia utilizada neste trabalho foi *ancoragem molecular* manual seguindo a rotina MM-DM-MM (Oliveira et al., 2003).

5.1.1- *Ancoragem molecular* utilizando Metodologia-1: análise de rotina a ser seguida

O cálculo das cargas atômicas é fundamental nos estudos de avaliação de interações moleculares, análises conformacionais e SAR/QSAR sendo que vários métodos de cálculo de carga vêm sendo utilizados e é necessária uma escolha adequada do método de modo que o potencial seja obtido com elevada exatidão e com um custo computacional aceitável. Um dos métodos que tem produzido bons resultados é o método que deriva cargas através de um potencial eletrostático. Este método tem reproduzido adequadamente o potencial molecular o que é importante em simulações de interação eletrostática entre moléculas (Guadagnini & Bruns, 1996). Deste modo, neste trabalho foi utilizado o método semi-impírico de cálculo hamiltoniano MNDO-ESP utilizando o programa MOPAC. Neste procedimento, as cargas são derivadas através de um ajuste ao Potencial Eletrostático Molecular (ESP). O cálculo depende da distribuição eletrônica (densidade de carga) sobre os átomos de uma molécula e descreve a energia de interação do sistema molecular com uma carga pontual positiva. Uma vez que o potencial eletrostático tenha sido calculado, cargas centradas nos átomos são ajustadas para reproduzir esse potencial eletrostático (Rocha et al., 1998). Este método tem produzido melhores resultados para moléculas carregadas positivamente.

O próximo passo foi a construção do complexo d-B-ADN-ligante. A variabilidade conformacional dos ligantes dentro da fenda menor é muito pequena, pois a largura da fenda impede a interconversão conformacional dentro da mesma. Os compostos benzamidínicos substituídos apresentam 16 possíveis orientações porque ao formar o complexo d-B-ADN-ligante, não há o eixo de simetria C₂ presente no ADN e no ligante

isolados. Isto ocorre porque o ligante não se liga exatamente no meio da fenda menor. Contudo, foi demonstrado por Rocha (1998) que quando o grupo alifático ocupava as posições 2,2', 3 3', 2, 3' e 3, 2' (Figura 4.1, pag 45) elas eram mais favorecidas em relação às outras conformações. Desta forma, foram construídos 4 tipos de complexos d-B-ADN-ligante onde os grupos alifáticos ocupavam as posições 3,3', 3,2' 3, 3' 2.

As moléculas foram inicialmente minimizadas utilizando mecânica molecular, campo de força Amber, para se obter um melhor ajuste d-B-ADN-ligante e posteriormente minimizadas seguindo a rotina MM-DM-MM. Este campo de força foi o utilizado neste trabalho porque ele consegue prever satisfatoriamente as geometrias dos ligantes e dos ácidos nucléicos (Hobza et al., 1997). As energias E_{int} , E_{pert} e E_{lig} foram calculadas (Rocha, 1998; Oliveira et al., 2003). Os resultados se encontram na Tabela 5.1 (pag 76-78)

A energia de interação (E_{int}) é a energia associada com a interação entre o ligante e o seu receptor e é a que estabiliza o sistema. O cálculo da energia de perturbação total (E_{pert}) é uma tentativa de avaliar a energia associada à modificação conformacional que ligante e d-B-ADN sofrem ao maximizar a interação. É uma energia positiva que desestabiliza o sistema. A energia de ligação E_{lig} é uma energia associada à formação do complexo ligante-receptor e a soma da contribuição da energia de interação e da energia de perturbação. Estas energias não possuem um significado físico, mas são úteis na comparação de energia entre conformações de uma mesma molécula ou em relação a uma molécula padrão.

Os valores listados foram colocados em gráfico de barras (Figuras 5.1; 5.2 e 5.3, pag 79 e 80) para uma melhor análise. As estruturas dos complexos d-B-ADN-ligante foram analisadas e observou-se que, em todos eles, o grupo bisfenilamidínico estava na fenda menor entre as duas fitas e eles apresentavam uma conformação isoélica ao ADN o que está de acordo com dados teóricos e experimentais descritos na literatura (Trent et al., 1996; Francesconi et al., 1999; Boykin, 2002; Miao et al., 2005).

Tabela 5.1- Energia do complexo d-B-ADN-ligante (E_{comp}), energia do d-B-ADN no complexo ($E_{\text{ADN}_{\text{comp}}}$), energia do ligante no complexo ($E_{\text{lig}_{\text{comp}}}$) e na sua conformação de menor energia, energias de interação (E_{int}), de perturbação (E_{pert}), de ligação (E_{lig})

continua

Moléculas	E_{comp} kcal.mol ⁻¹	$E_{\text{ADN}_{\text{comp}}}$ kcal.mol ⁻¹	$E_{\text{lig}_{\text{comp}}}$ kcal.mol ⁻¹	E_{lig} kcal.mol ⁻¹	E_{int} kcal.mol ⁻¹	$E_{\text{lig}_{\text{pert}}}$ kcal.mol ⁻¹	$E_{\text{ADN}_{\text{pert}}}$ kcal.mol ⁻¹	$E_{\text{total}_{\text{pert}}}$ kcal.mol ⁻¹	E_{lig} kcal.mol ⁻¹
Mol01	-216,390	-177,490	31,990	31,360	-70,890	0,630	3,280	3,910	-66,980
Mol02a	-211,440	-173,640	37,280	32,780	-75,080	4,500	7,130	11,630	-63,450
Mol02b	-210,410	-172,950	33,600	32,780	-71,060	0,820	7,820	8,640	-62,420
Mol02c	-208,640	-170,890	37,240	32,780	-74,990	4,460	9,880	14,340	-60,650
Mol02d	-209,230	-177,900	40,800	32,780	-72,130	8,020	2,870	10,890	-61,240
Mol03a	-212,080	-171,380	36,690	32,320	-77,390	4,370	9,390	13,760	-63,630
Mol03b	-211,910	-169,420	33,390	32,320	-75,880	1,070	11,350	12,420	-63,460
Mol03c	-209,970	-172,370	36,970	32,320	-74,570	4,650	8,400	13,050	-61,520
Mol03d	-206,190	-174,680	42,640	32,320	-74,150	10,320	6,090	16,410	-57,740
Mol04a	-209,100	-169,680	35,690	31,440	-75,110	4,250	11,090	15,340	-59,770
Mol04b	-217,670	-172,320	33,620	31,440	-78,970	2,180	8,450	10,630	-68,340
Mol04c	-218,830	-171,990	33,370	31,440	-80,210	1,930	8,780	10,710	-69,500
Mol04d	-208,800	-176,920	40,680	31,440	-72,560	9,240	3,850	13,090	-59,470
Mol05a	-213,010	-170,830	35,240	32,480	-77,420	2,760	9,940	12,700	-64,720
Mol05b	-214,400	-174,140	33,210	32,480	-73,470	0,730	6,630	7,360	-66,110
Mol05c	-209,530	-168,660	35,880	32,480	-76,750	3,400	12,110	15,510	-61,240
Mol05d	-205,020	-175,310	44,760	32,480	-74,470	12,280	5,460	17,740	-56,730
Mol06a	-211,190	-173,810	34,040	32,450	-71,420	1,590	6,960	8,550	-62,870

Tabela 5.1- Energia do complexo d-B-ADN-ligante (E_{comp}), energia do d-B-ADN no complexo ($E_{\text{ADN}_{\text{comp}}}$), energia do ligante no complexo ($E_{\text{lig}_{\text{comp}}}$) e na sua conformação de menor energia, energias de interação (E_{int}), de perturbação (E_{pert}), de ligação (E_{lig})

continua

Moléculas	E_{comp} kcal.mol ⁻¹	$E_{\text{ADN}_{\text{comp}}}$ kcal.mol ⁻¹	$E_{\text{lig}_{\text{comp}}}$ kcal.mol ⁻¹	E_{lig} kcal.mol ⁻¹	E_{int} kcal.mol ⁻¹	$E_{\text{lig}_{\text{pert}}}$ kcal.mol ⁻¹	$E_{\text{ADN}_{\text{pert}}}$ kcal.mol ⁻¹	$E_{\text{total}_{\text{pert}}}$ kcal.mol ⁻¹	E_{lig} kcal.mol ⁻¹
Mol06b	-212,910	-174,940	33,260	32,450	-71,230	0,810	5,830	6,640	-64,590
Mol06c	-210,530	-171,510	36,110	32,450	-75,130	3,660	9,260	12,920	-62,210
Mol06d	-205,960	-175,940	42,970	32,450	-72,990	10,520	4,830	15,350	-57,640
Mol07a	-208,820	-173,370	40,770	38,680	-76,220	2,090	7,400	9,490	-66,730
Mol07b	-206,440	173,520	39,420	38,680	-419,380	0,740	354,290	355,030	-64,350
Mol07c	-207,660	-171,230	43,090	38,680	-79,520	4,410	9,540	13,950	-65,570
Mol07d	-206,440	-175,440	43,320	38,680	-74,320	4,640	5,330	9,970	-64,350
Mol08a	-198,250	-170,300	47,580	45,580	-75,530	2,000	10,470	12,470	-63,060
Mol08b	-199,940	-170,400	49,380	45,580	-78,920	3,800	10,370	14,170	-64,750
Mol08c	-199,930	-170,400	49,080	45,580	-78,610	3,500	10,370	13,870	-64,740
Mol08d	-205,550	-177,200	46,760	45,580	-75,110	1,180	3,570	4,750	-70,360
Mol09a	-209,940	-166,970	39,080	33,310	-82,050	5,770	13,800	19,570	-62,480
Mol09b	-216,600	-173,820	34,710	33,310	-77,490	1,400	6,950	8,350	-69,140
Mol09c	-215,780	-173,690	34,710	33,310	-76,800	1,400	7,080	8,480	-68,320
Mol09d	-206,940	-177,220	45,400	33,310	-75,120	12,090	3,550	15,640	-59,480
Mol10a	-174,140	-167,500	71,760	69,970	-78,400	1,790	13,270	15,060	-63,340
Mol10b	-175,930	-173,990	72,240	69,970	-74,180	2,270	6,780	9,050	-65,130
Mol10c	-177,990	-172,720	70,840	69,970	-76,110	0,870	8,050	8,920	-67,190
Mol10d	-170,490	-176,380	80,740	69,970	-74,850	10,770	4,390	15,160	-59,690
Mol11a	-207,620	-168,120	39,620	36,120	-79,120	3,500	12,650	16,150	-62,970

Tabela 5.1- Energia do complexo d-B-ADN-ligante (E_{comp}), energia do d-B-ADN no complexo ($E_{\text{ADN}_{\text{comp}}}$), energia do ligante no complexo ($E_{\text{lig}_{\text{comp}}}$) e na sua conformação de menor energia, energias de interação (E_{int}), de perturbação (E_{pert}), de ligação (E_{lig}) conclusão

Moléculas	E_{comp} kcal.mol ⁻¹	$E_{\text{ADN}_{\text{comp}}}$ kcal.mol ⁻¹	$E_{\text{lig}_{\text{comp}}}$ kcal.mol ⁻¹	E_{lig} kcal.mol ⁻¹	E_{int} kcal.mol ⁻¹	$E_{\text{lig}_{\text{pert}}}$ kcal.mol ⁻¹	$E_{\text{ADN}_{\text{pert}}}$ kcal.mol ⁻¹	$E_{\text{total}_{\text{pert}}}$ kcal.mol ⁻¹	E_{lig} kcal.mol ⁻¹
Mol11b	-212,520	-176,580	40,390	36,120	-76,330	4,270	4,190	8,460	-67,870
Mol11c	-211,960	-172,390	38,530	36,120	-78,100	2,410	8,380	10,790	-67,310
Mol11d	-197,420	-176,310	51,550	36,120	-72,660	15,430	4,460	19,890	-52,770
Mol12a	-195,880	-171,700	54,070	50,090	-78,250	3,980	9,070	13,050	-65,200
Mol12b	-198,010	-173,170	51,560	50,090	-76,400	1,470	7,600	9,070	-67,330
Mol12c	-200,030	-169,210	52,060	50,090	-82,880	1,970	11,560	13,530	-69,350
Mol12d	-200,760	-175,850	52,710	50,090	-77,620	2,620	4,920	7,540	-70,080
Mol13a	-197,420	-161,490	44,010	37,020	-79,940	6,990	19,280	26,270	-53,670
Mol13b	-209,790	-176,390	38,040	37,020	-71,440	1,020	4,380	5,400	-66,040
Mol13c	-209,310	-171,040	69,560	37,020	-107,830	32,540	9,730	42,270	-65,560
Mol13d	-205,810	-176,040	46,170	37,020	-75,940	9,150	4,730	13,880	-62,060
Mol14a	-200,270	-168,410	44,540	32,440	-76,400	12,100	12,360	24,460	-51,940
Mol14b	-213,370	-172,800	34,000	32,440	-74,570	1,560	7,970	9,530	-65,040
Mol14c	-206,650	-169,950	38,700	32,440	-75,400	6,260	10,820	17,080	-58,320
Mol14d	-195,410	-176,640	58,690	32,440	-77,460	26,250	4,130	30,380	-47,080
Mol15a	-207,810	-166,960	41,460	36,110	-82,310	5,350	13,810	19,160	-63,150
Mol15b	-209,420	-167,120	40,340	36,110	-82,640	4,230	13,650	17,880	-64,760
Mol15c	-160,700	-173,920	93,100	36,110	-79,880	56,990	6,850	63,840	-16,040
Mol15d	-200,670	-177,050	52,920	36,110	-76,540	16,810	3,720	20,530	-56,010

Nota: A energia do ADN na conformação de menor energia foi de $-180,77$ kcal mol⁻¹

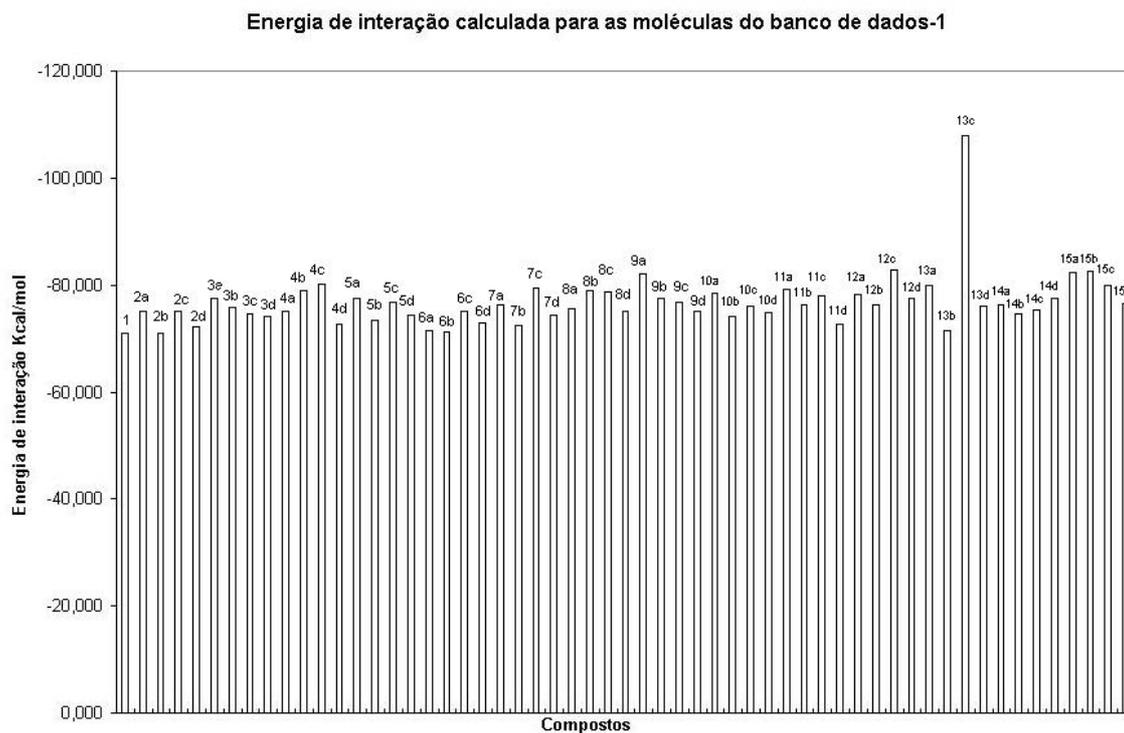


Figura 5.1- Energia de interação calculada utilizando compostos do Banco de dados-1

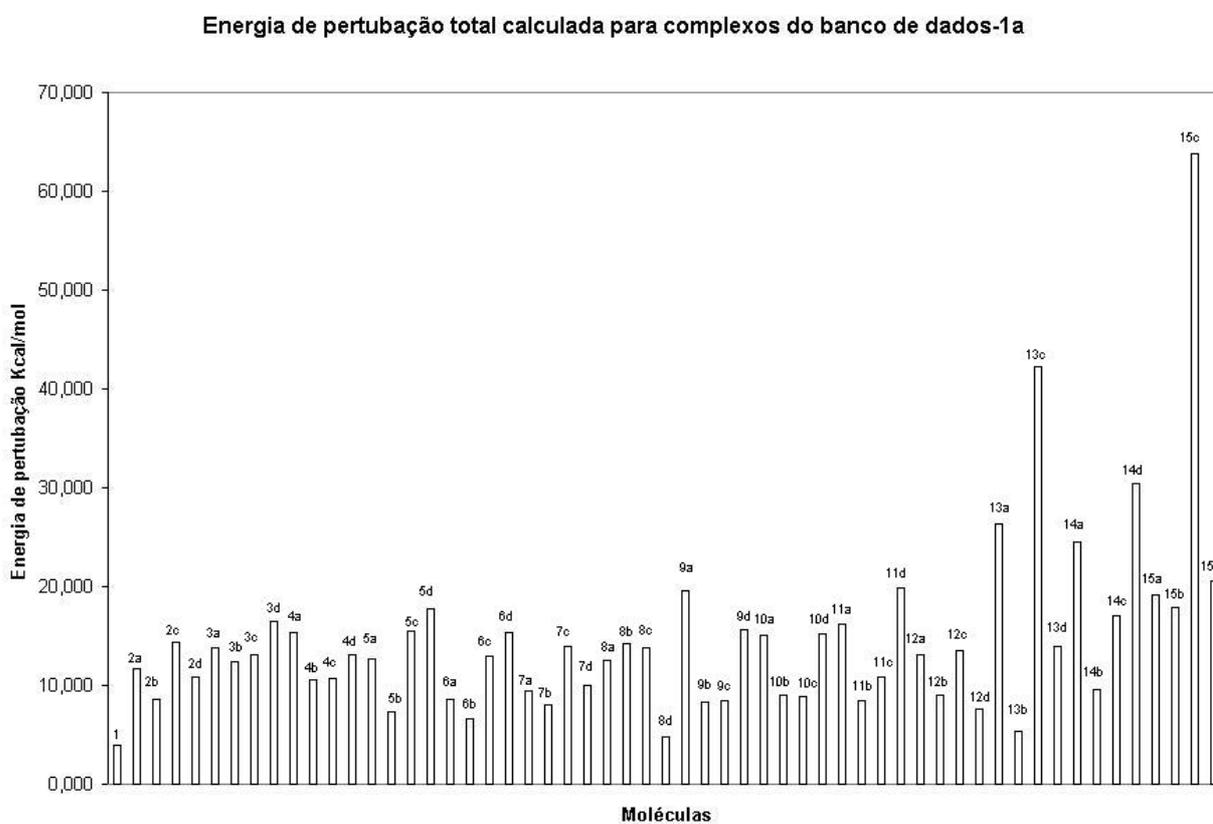


Figura 5.2- Energia de perturbação total calculada utilizando compostos do Banco de dados-1

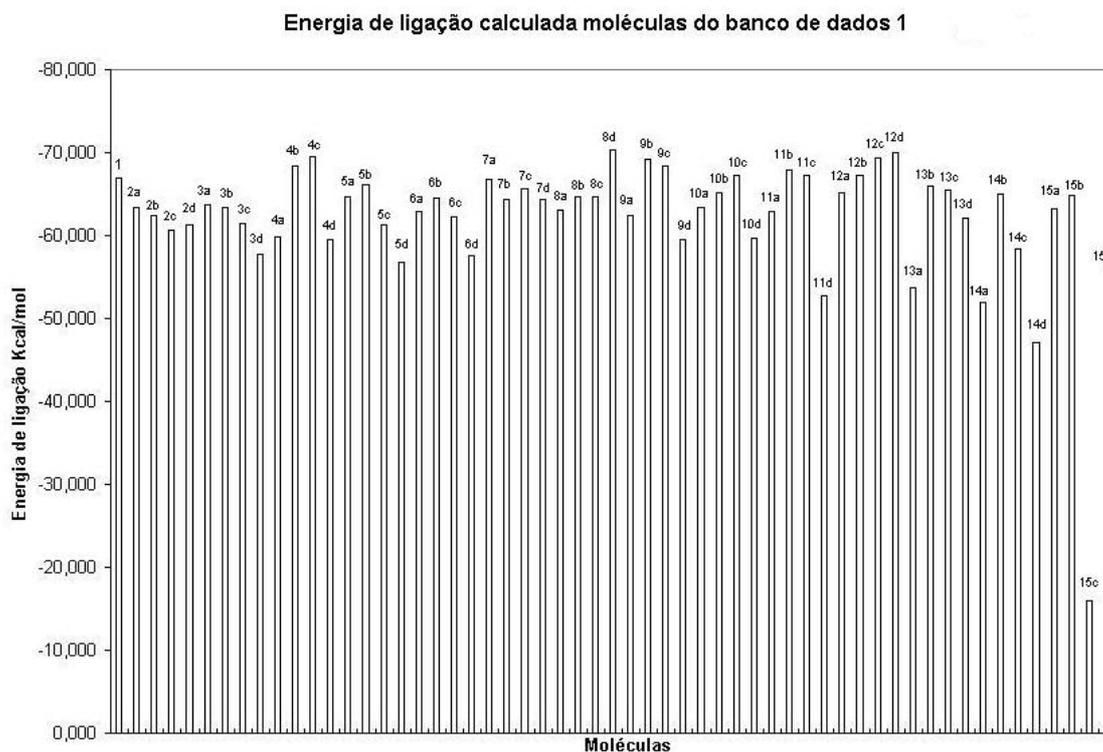


Figura 5.3- Energia de ligação total calculada utilizando compostos do Banco de dados-1

As energias de ligação, interação e perturbação calculadas para as conformações **a**, **b**, **c** e **d** (Figura 4.1, pag 45) das moléculas foram comparadas. Baseando-se na análise visual da posição adotada pelos substituintes nas estruturas de raios X e na energia de ligação e interação calculada para as moléculas com grupo R maior, a conformação de escolha para as análises posteriores foi a conformação **b**. Oliveira e colaboradores (2003) mostraram que o $\log \Delta T_m$ dos complexos d-B-ADN-compostos bisbenzamidínicos possuía correlação significativa com valores energia de ligação calculados utilizando a ancoragem molecular manual. Entretanto, utilizando-se os valores energia de ligação calculados neste trabalho e $\log \Delta T_m$ dos compostos bisbenzamidínicos não foi observada nenhuma correlação estatisticamente significativa. Também não se observou correlação estatisticamente significativa entre a energia de ligação calculada e a atividade biológica ($\log \text{MIC}^{-1}$) frente à *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*.

Diante dos resultados obtidos na análise preliminar, a conformação escolhida para a utilização nos estudos de ancoragem molecular foi aquela em que os grupos substituintes ocuparam a posição 3,3' (conformação **b**, Figura 4.1, pag 45), pois ela é a

conformação observada nas estruturas cristalográfica dos complexos (arquivos PDB) e a energia de ligação e interação são maiores (número absoluto) para os complexos com moléculas nesta conformação.

5.1.2- Ancoragem molecular utilizando metodologia-2

Foi feita uma segunda análise utilizando um banco de dados com 30 moléculas. O procedimento MM-DM-MM utilizado anteriormente foi alterado com o objetivo de se ter mais passos na minimização (Anexo 1-procedimento 6). Ao utilizar esta nova metodologia ocorreu uma deformação no complexo d-B-ADN-ligante como pode ser verificado na Figura 5.4 e, para contornar este problema, foi utilizado o octâmero do B-ADN (o-B-ADN).

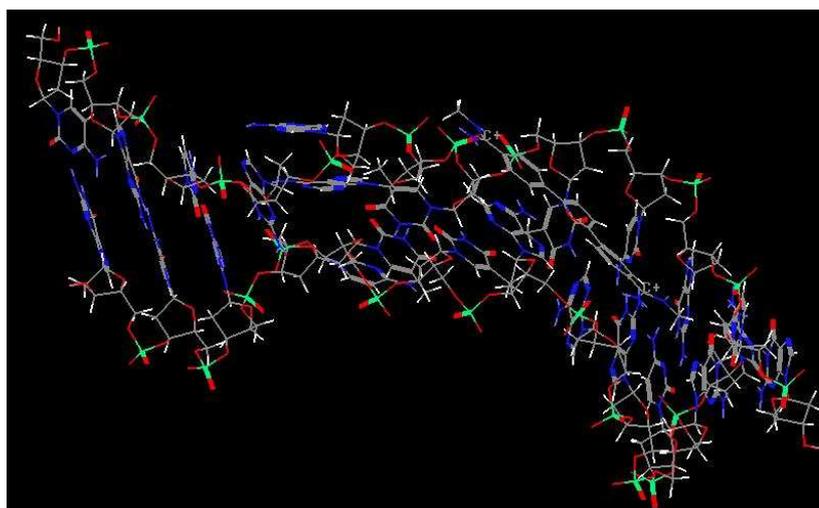


Figura 5.4 - Complexo d-B-ADN-ligante após procedimento MM-DM-MM

Os resultados obtidos na ancoragem molecular manual utilizando o procedimento-2 e as energias E_{int} , E_{pert} e de E_{lig} calculados encontram-se na Tabela 5.2 (pag 82) e os gráficos correspondentes nas Figuras 5.5 (pag 84), 5.6 (pag 84), e 5.7 (pag 85).

Tabela 5.2 - Energia do complexo o-B-ADN-ligante, energia do o-B-ADN no complexo, e energia do ligante no complexo e na sua conformação de menor energia e valores de ΔT_m , Energias de interação (E_{int}), de perturbação (E_{pert}) e de ligação (E_{lig}) dos complexos o-B-ADN-ligante

continua

Moléculas	Energia do complexo kJ.mol ⁻¹	Energia do ADN na conformação do complexo (kJ.mol ⁻¹)	Energia do ligante na conformação do complexo (kJ.mol ⁻¹)	Energia do ligante na conformação de menor energia (kJ.mol ⁻¹)	E_{int} kJ.mol	E_{pert} ligante kJ.mol ⁻¹	E_{pert} ADN kJ.mol ⁻¹	E_{pert} total kJ.mol ⁻¹	Elig kJ.mol ⁻¹
Mol01	-458,67	-51,07	158,60	132,16	-566,20	26,44	394,59	421,03	-145,17
Mol02	-468,33	-48,32	169,89	138,85	-589,90	31,04	397,34	428,38	-161,52
Mol03	-484,65	-50,79	176,56	137,29	-610,42	39,27	394,87	434,14	-176,28
Mol04	-499,25	-166,85	311,07	130,83	-643,47	180,24	278,81	459,05	-184,42
Mol05	-532,68	-171,49	333,45	137,32	-694,64	196,13	274,17	470,30	-224,34
Mol06	-500,34	-22,64	179,17	143,28	-656,87	35,89	423,02	458,91	-197,96
Mol07	-549,42	-172,19	370,61	175,72	-747,84	194,89	273,47	468,36	-279,48
Mol08	-374,59	-18,87	230,55	177,78	-586,26	52,77	426,79	479,55	-106,71
Mol09	-437,41	-51,66	181,03	141,02	-566,78	40,01	394,00	434,01	-132,77
Mol10	-298,32	-51,40	342,28	293,39	-589,20	48,89	394,26	443,15	-146,05
Mol11	-407,99	-103,09	218,37	156,89	-523,27	61,48	342,57	404,05	-119,22
Mol12	-372,81	-112,53	269,36	209,90	-529,64	59,46	333,13	392,59	-137,05
Mol13	-403,35	-56,28	207,97	148,78	-555,05	59,19	389,38	448,58	-106,47
Mol14	-421,35	-81,43	198,40	141,62	-538,32	56,78	364,23	421,01	-117,31
Mol15	-417,19	-74,93	224,67	143,97	-566,93	80,70	370,73	451,43	-115,50
Mol18	-673,33	-209,24	84,82	48,35	-548,92	36,47	236,43	272,90	-276,02
Mol20	-466,01	-18,57	43,72	13,16	-491,16	30,56	427,09	457,65	-33,51
Mol21	-677,22	-195,74	97,63	25,24	-579,11	72,39	249,92	322,31	-256,80
Mol22	-351,00	-66,09	269,36	230,56	-554,27	38,80	379,57	418,37	-135,90
Mol23	-381,00	-83,58	275,23	251,83	-572,65	23,40	362,08	385,48	-187,17
Mol24	-515,00	-28,17	111,95	60,79	-598,77	51,16	417,49	468,64	-130,13
Mol25	-334,00	-26,79	257,11	231,68	-564,32	25,43	418,87	444,30	-120,02

Tabela 5.2- Energia do complexo o-B-ADN-ligante, energia do o-B-ADN no complexo, e energia do ligante no complexo e na sua conformação de menor energia e Valores de ΔT_m , Energias de interação (E_{int}), de perturbação (E_{pert}) e de ligação (E_{lig}) dos complexos o-B-ADN-ligante

conclusão

Moléculas	Energia do complexo kJ.mol^{-1}	Energia do ADN na conformação do complexo (kJ.mol^{-1})	Energia do ligante na conformação do complexo (kJ.mol^{-1})	Energia do ligante na conformação de menor energia (kJ.mol^{-1})	E_{int} kJ.mol^{-1}	E_{pert} ligante kJ.mol^{-1}	E_{pert} ADN kJ.mol^{-1}	E_{pert} total kJ.mol^{-1}	E_{lig} kJ.mol^{-1}
Mol26	-449,00	-36,62	187,93	151,45	-600,31	36,48	409,04	445,52	-154,79
Mol27	-427,00	-49,29	178,12	139,15	-555,83	38,97	396,37	435,34	-120,49
Mol28	-425,00	-32,72	144,15	103,49	-536,43	40,66	412,94	453,60	-82,83
Mol29	-240,53	-65,19	370,60	323,57	-545,94	47,03	380,47	427,50	-118,44
Mol30	-439,70	-15,15	159,65	127,46	-584,19	32,19	430,51	462,69	-121,50
Mol31	-539,98	-22,72	78,74	37,21	-596,00	41,53	422,94	464,47	-131,53
Mol32	-376,01	-153,52	214,99	218,91	-437,48	-3,92	292,14	288,22	-149,26
Mol33	-497,92	-227,55	303,39	303,96	-573,76	-0,57	218,11	217,54	-356,22
Mol34	-717,48	-188,94	35,32	46,58	-563,86	-11,26	256,72	245,46	-318,40
Mol35	-723,24	-241,49	15,27	362,49	-497,02	-347,22	204,17	-143,05	-640,07
Mol36	-743,08	-166,15	24,45	14,86	-601,38	9,59	279,51	289,10	-312,28
Mol37	-652,45	-182,79	94,64	80,2	-564,30	14,44	262,87	277,31	-286,99
Mol38	-647,07	-180,42	104,012	81,75	-570,66	22,26	265,24	287,50	-283,16
FB1	-438,28	-90,38	142,88	89,43	-490,78	53,45	355,28	408,73	-82,05
FB2	-438,48	-86,01	119,72	86,29	-472,19	33,43	359,65	393,08	-79,11
FB3	-471,07	-64,08	162,18	96,79	-569,17	65,39	381,58	446,97	-122,20
FB4	-451,19	-27,85	132,31	99,36	-555,65	32,95	417,81	450,76	-104,89

Nota: A energia do ADN na conformação de menor energia foi de $-445,66 \text{ kJ.mol}^{-1}$.

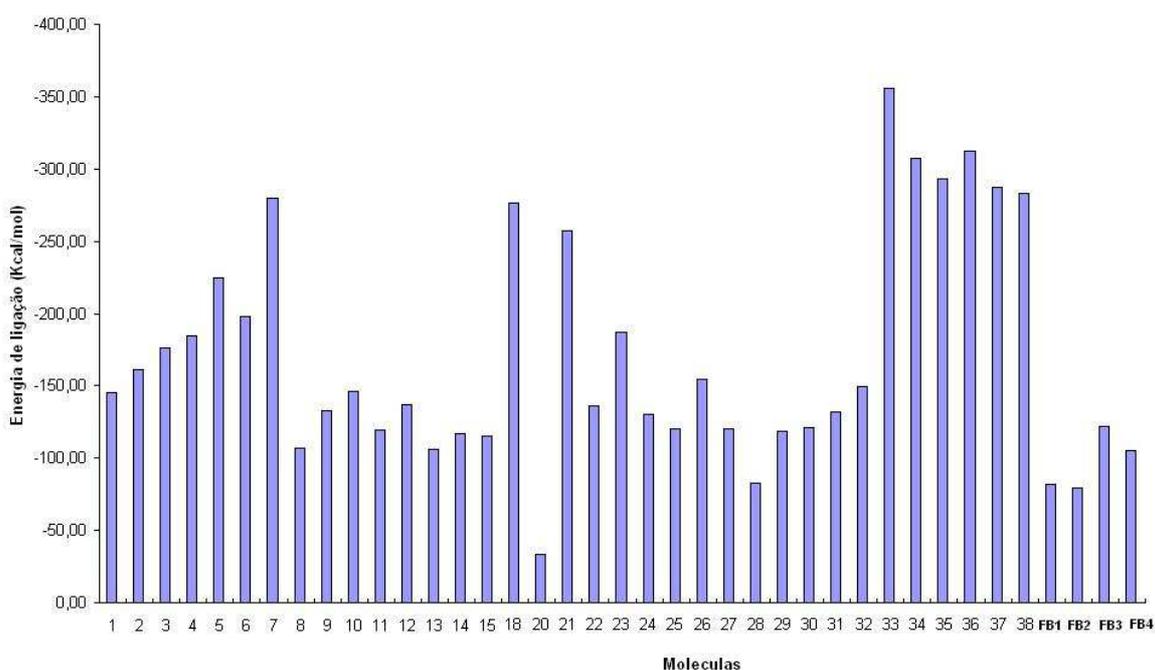


Figura 5.5- Energia de ligação calculada utilizando compostos do Banco de dados-2

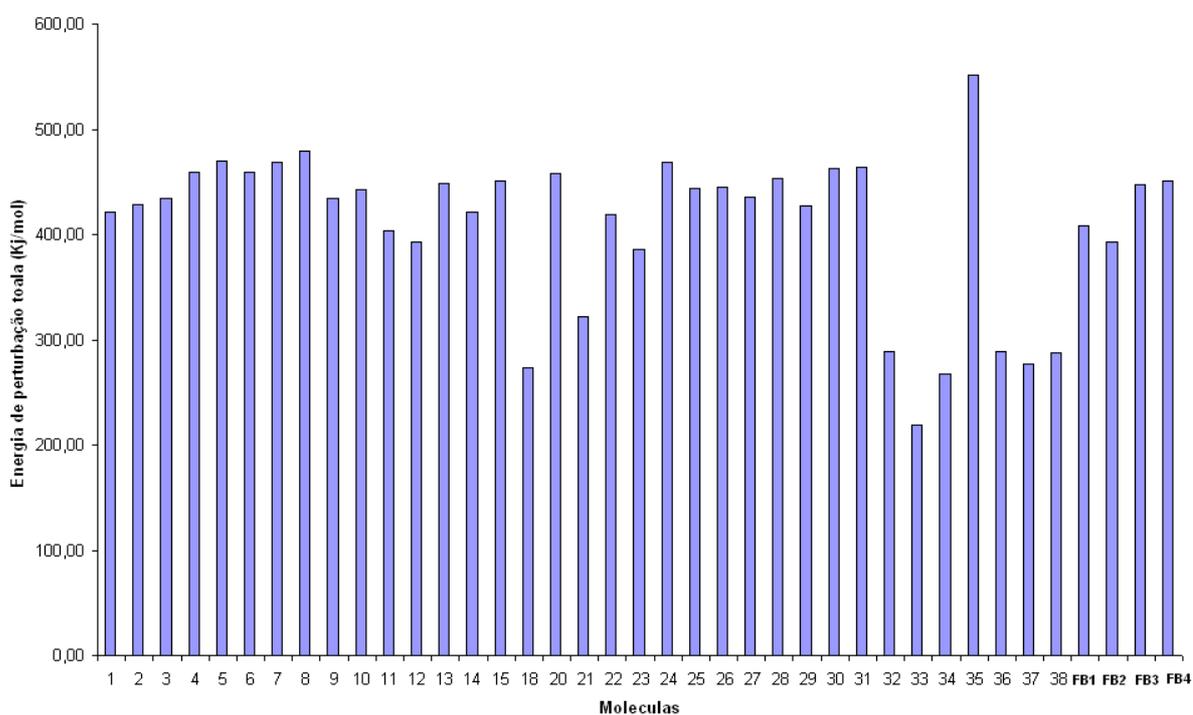


Figura 5.6- Energia de perturbação total calculada utilizando compostos do Banco de dados-2

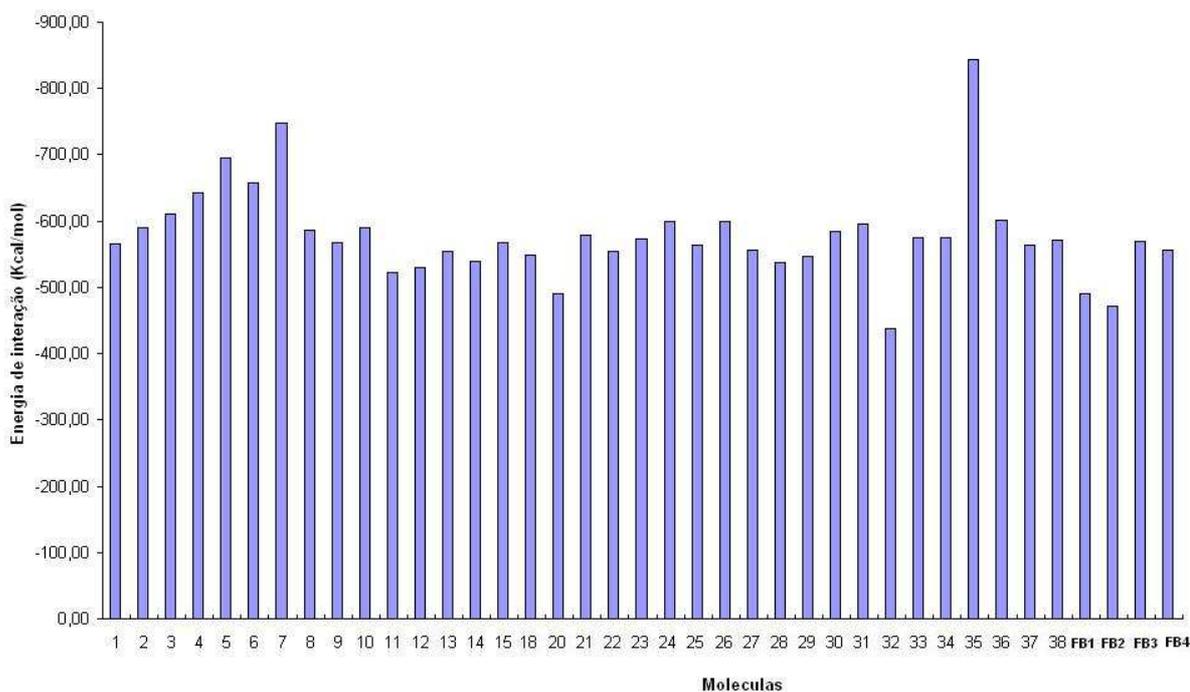


Figura 5.7- Energia de interação calculada de utilizando compostos do Banco de dados-2

Na figura 5.5 podemos observar que quando comparamos as furanobenzamidinas substituídas (**Mol01** a **Mol15** e **Mol26** a **Mol31**; Tabela 4.2 (pag 49), os compostos com grupos menos volumosos (**Mol01** a **Mol07**; Tabela 4.2, pag 49) ligados ao grupo benzamidino apresentam menor energia de ligação (exceção **Mol01**-Tabela 4.2, pag 49). A variação na energia de perturbação calculada das moléculas é pequena (Figura 5.6, pag 84) sendo que a pentamidina (**Mol18**; Tabela 4.2, pag 49) apresentou a menor energia de perturbação.

Buscando encontrar relações entre as energias calculadas e estabilidade do complexo ADN-ligante foram feitas correlações (parabólica, linear, bilinear) dos valores de $\log \Delta T_m$ com os valores de E_{int} e E_{pert} obtidas utilizando o programa BILIN. Não se observou nenhuma relação estatisticamente significativa entre a energia de interação calculada e os valores de ΔT_m . Estes dados indicam que a E_{int} calculada não pode ser usada na determinação de estabilidade do complexo d-B-ADN-ligante. No entanto o método conseguiu reproduzir a tendência geral de afinidade pelo d-B-ADN (demonstrado pelos valores de $\log \Delta T_m$).

Um dos métodos de avaliação do procedimento de ancoragem molecular é a capacidade de reprodutibilidade das estruturas cristalinas das substâncias conhecidas no complexo. Um dos métodos que pode ser utilizado para comparar estruturas das substâncias é o RMS, *Rot Mean Square* (Knegtel; Wagener 1999). Os valores de RMS obtidos na superposição para os compostos **Mol03** (bis-isopropilfuramidina), **Mol04** (bis-ciclopropilfuramidina), **Mol07** (bis-ciclobutilfuramidina) e **Mol11** (bis-ciclohexilfuramidina) nas conformações obtidas na ancoragem molecular em relação às estruturas de raios X do arquivo PDB são respectivamente 0,287; 0,320; 0,447 e 0,460. Assim podemos concluir que as estruturas dos ligantes obtidas na ancoragem molecular manual estão muito próximas da conformação dos ligantes na estrutura de raios X, uma vez que os valores de RMS são pequenos. O método mostrou-se bastante adequado para se obterem estruturas semelhantes às aquelas obtidas na cristalografia de raios X.

5.2- ESTUDOS DE RECONHECIMENTO DE PADRÕES E QSAR

O objetivo do estudo de reconhecimento de padrões é determinar de forma qualitativa quais são os fatores físico-químicos determinantes na atividade biológica de um composto ou para as propriedades estudadas. No estudo de QSAR buscamos determinar de forma quantitativa quais os parâmetros importantes para determinada atividade em estudo.

5.2.1- Estudos de reconhecimento de padrões frente a *Pneumocystis carinii*

A análise de PCA utilizando 50 parâmetros físico-químicos (estereoquímicos, eletrônicos, topológicos, lipofílicos e de similaridade) calculados e normalizados, segundo procedimento média/desvio utilizando o programa Tsar versão 3.21 para as moléculas **Mol01** a **Mol15** (Tabela 4.2, pág. 49) alinhadas. Foram utilizadas as 4 primeiras componentes principais. A fração da variância explicada foi de 95,7% para componente principal 1 (PC1), 3,77% para componente principal dois (PC2), 0,4% para componente principal três (PC3). Não se observou uma separação entre as moléculas (Tabela 4.2, pag 49) mais e menos potentes em nenhum dos gráficos (PC1XPC2, PC2XPC3 e PC1XPC3). Este resultado foi confirmado utilizando a HCA. O resultado desta análise pode ser visualizado pelo dendrograma obtido da HCA (Figura 5.8, pág 87).

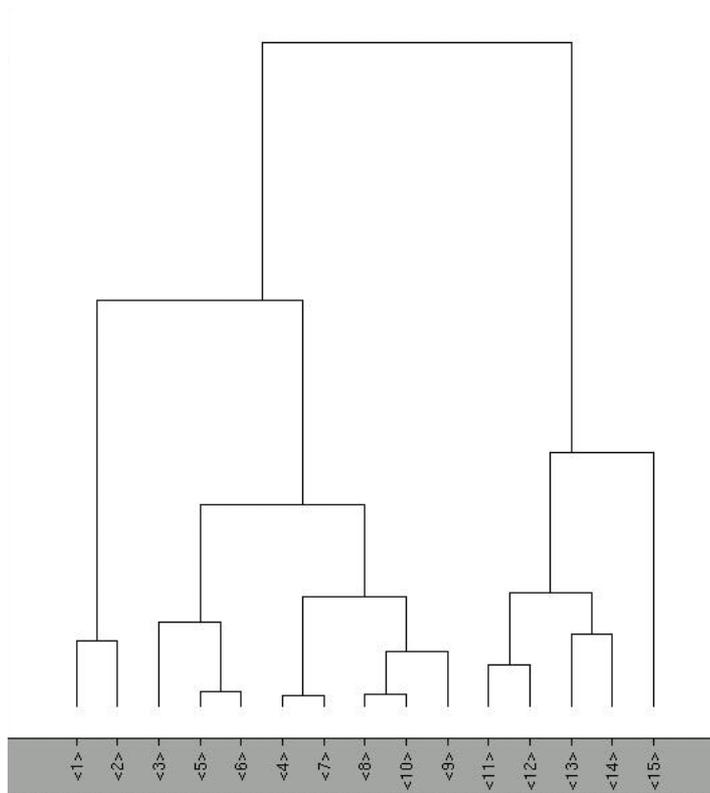


Figura 5.8- Análise hierárquica das moléculas do banco de dados-2 utilizando distancia euclidiana

5.2.2- Estudos de reconhecimento de padrões frente à *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*

Os resultados da análise estatística dos dados biológicos frente a *C. albicans* e *C. neoformans* podem ser observados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Análise estatística de dados da atividade biológica frente a *C. albicans* e *C. neoformans* do grupo de treino (Tabela 4.2., pag 49)

	<i>C. albicans</i>	<i>C. neoformans</i>
Varição do valor máximo e mínimo de log MIC ⁻¹ (mol/L)	1,22	1,36
Valor máximo de log MIC ⁻¹ (mol/L)	7,82	8,75
Valor mínimo de log MIC ⁻¹ (mol/L)	6,60	7,39
Média	7,31	8,07
Mediana	7,49	8,03
Variância	0,16	0,16
Desvio padrão	0,42	0,42

Estes resultados nos indicam que a variância do banco de dados e o desvio padrão são pequenos. O ideal é que no banco de dados houvesse uma variação maior e um desvio padrão maior para que cobrisse um maior espaço amostral.

Ao fazer análise de reconhecimento de padrões utilizando PCA e HCA não se observou nenhum padrão nas separações levando em consideração a atividade biológica frente a *C. albicans* e *C. neofarmans*.

5.2.3- Estudos de QSAR-2D frente ao fungo *Candida albicans*

A análise de correlação expressa numericamente o grau de associação entre a variável X e Y. Na análise de RML utilizando como variável dependente $\log \text{MIC}^{-1}$ (mol/L) frente a *C. albicans*, obteve-se a equação 5.1:

$$\log \text{MIC}^{-1} = -0,414 (\pm 0,250) \text{ lipolo Componente Z} + 7,260 (\pm 0,021)$$
$$R^2=0,69 \quad Q^2=0,51 \quad n= 9 \quad F= 15,29 \quad s= 0,257 \quad \textbf{Equação 5.1}$$

O parâmetro lipolo é a medida da distribuição lipofílica na molécula. Ele está relacionado com os grupos presentes na molécula em relação aos eixos X, Y e Z. (Montanari et al., 2000). A equação acima indica que a atividade frente a *C. albicans* esta correlacionada a distribuição lipofílica da molécula. Quanto menor o valor desta distribuição maior será a atividade. Os valores de r^2 e Q^2 foram baixos indicando que o parâmetro (lipolo-componente Z) não consegue explicar a atividade de forma adequada, apesar de ser o parâmetro isolado que descreve melhor a atividade biológica observada.

Utilizando a equação 5.1 os valores de $\log \text{MIC}^{-1}$ dos compostos do grupo de treino foram calculados e o gráfico de $\log \text{MIC}^{-1}$ (mol/L) real versus $\log \text{MIC}^{-1}$ (mol/L) predito do grupo de treino foi traçado, utilizando o intervalo de confiança de 95 %

Tabela 5.4 - Valores reais e calculados de $\log \text{MIC}^{-1}$ frente a *C. albicans* e lipolo componente-Z dos compostos bisbenzamidínicos do grupo de treino

Molécula	lipolo componente Z	$\text{Log MIC}^{-1}_{\text{real}}$ (mol/L)	$-\log \text{MIC}^{-1}_{\text{calculado}}$ (mol/L)	Resíduo	% Erro
Mol01	-0,13	7,68	7,31	0,37	4,82
Mol05	0,02	7,49	7,25	0,24	3,20
Mol06	-0,01	7,19	7,26	-0,07	0,97
Mol07	0,22	7,19	7,17	0,02	0,28
Mol08	-1,72	7,82	7,97	-0,15	1,92
Mol13	0,47	6,65	7,06	-0,42	6,32
Mol14	-0,22	7,57	7,35	0,22	2,91
Mol26	-1,36	7,73	7,82	-0,09	1,16
Mol31	1,02	6,73	6,84	-0,11	1,63

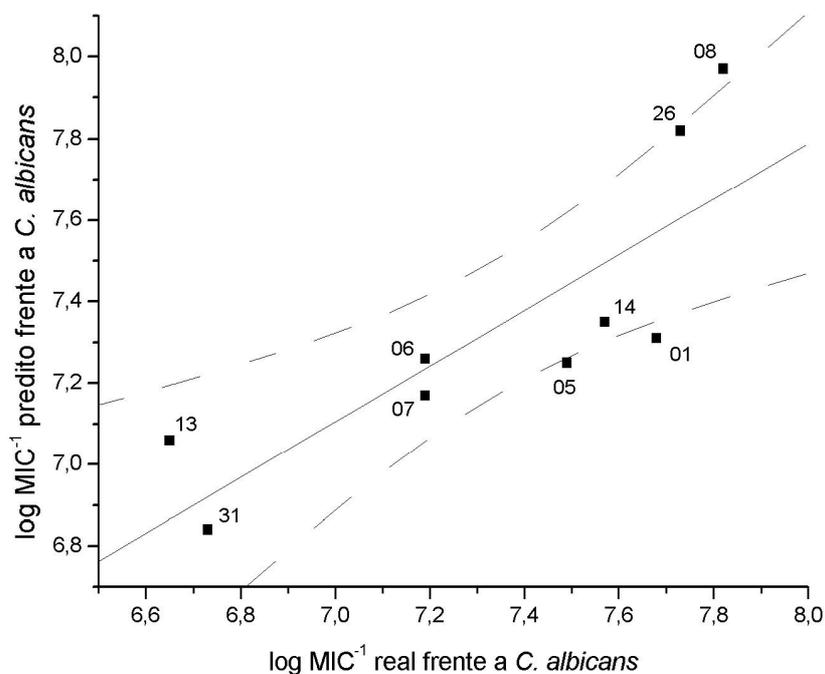


Figura 5.9 - Gráfico de $\log \text{MIC}^{-1}$ (mol/L) real versus $\log \text{MIC}^{-1}$ (mol/L) predito frente a *C. albicans* do grupo de treino.

$$\log \text{MIC}^{-1} \text{ real} = 1,004 (\pm 0,61) \log \text{MIC}^{-1} \text{ predito}$$

$$R^2=0,68 \quad Q^2 =0,51 \quad S= 0,256 \quad n= 9 \quad F=15,371$$

Equação 5.2

Podemos observar, Figura 5.9, pág 89, que os compostos **Mol01**, **Mol05** e **Mol08** (Tabela 4.2, pag 49) estão fora do intervalo de confiança de 95%. O gráfico de

resíduos versus atividade predita foi traçado (Figura 5.10) para avaliar a validade da análise.

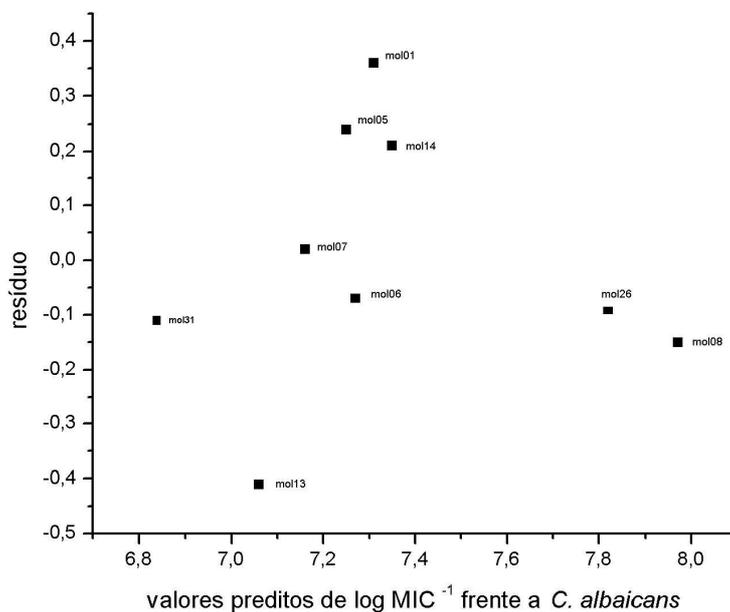


Figura 5.10 Teste gráfico da validade da análise de RML de valores preditos de log MIC⁻¹ frente a *C. albicans* versus valores de resíduos

Podemos ver que o composto **Mol13** apresenta uma dispersão maior indicando que ele é um *outlier* (Collegari, 2003).

A equação 5.2 nos indica que a equação 5.1, com suas limitações uma vez que R^2 é igual a 0,62 e Q_2 a 0,51, pode ser utilizada para prever a CIM frente a *C. albicans* dos compostos bisbenzamidínicos similares ao do grupo de treino. Desta forma a atividade biológica frente à *C. albicans* dos compostos planejados e das moléculas do grupo de validação externa (Tabela 4.2, pag 49) foi calculada utilizando a Equação 5.2.

Tabela 5.5 - Resultados da análise da atividade biológica frente a *C. albicans* utilizando RML para moléculas do Banco de dados-2

Grupo	Molécula	Lipolo	Log MIC ⁻¹ _{real} (mol/L)	og MIC ⁻¹ _{calculado} (mol/L)	Desvio	% Erro
Teste	Mol09	0,36	7,22	7,11	0,11	1,51
Teste	Mol10	-0,49	7,82	7,46	0,36	4,57
Teste	Mol11	0,36	7,5	7,11	0,39	5,19
Teste	Mol12	1,02	6,6	6,84	-0,24	3,60
Validação externa	Mol32	0,37	8,05	7,11	0,94	11,72
Validação externa	Mol33	-1,57	6,66	7,91	-1,25	18,77
Validação externa	Mol34	-1,18	6,5	7,75	-1,25	19,21
Validação externa	Mol35	-0,07	9,22	7,29	1,93	20,94
Validação externa	Mol36	0,53	7,47	7,04	0,43	5,75
Validação externa	Mol37	-0,48	7,12	7,46	-0,34	4,76
Validação externa	Mol38	0,69	6,59	6,97	-0,38	5,83
Planejado	FB1	0,19	-	7,18	-	-
Planejado	FB2	-1,78	-	8,00	-	-
Planejado	FB3	-0,25	-	7,36	-	-
Planejado	FB4	-0,23	-	7,36	-	-

Utilizando-se a equação 5.1, a atividade biológica dos compostos planejados frente a *Candida albicans* foi calculada. Estes provavelmente terão potências similares ao grupo de treino, com a exceção da molécula **FB2** (Tabela 4.2, pág 49) que terá uma potência maior que os compostos do grupo de treino e do grupo de teste.

As moléculas do grupo de validação externa não tiveram sua atividade explicada de forma adequada (% de erro $\geq 5\%$). Isto pode ser explicado pelo fato de que essas moléculas são muito diferentes das moléculas do grupo de treino e assim seria necessário aumentar o número de moléculas com estruturas diferentes de modo a ampliar o alcance do modelo obtido.

5.2.4- Estudos de QSAR-2D frente ao fungo *Cryptococcus neoformans*

Na análise de RML utilizando no programa BILIN obteve-se a equação 5.3:

$$\text{Log MIC}^{-1} = -0,37 (\pm 0,19) \text{ lipolo componente Z} - 1,33 (\pm 0,81) \text{ índice topológico Balaban} + 9,46 (\pm 0,90)$$

$$r^2 = 0,85 \quad Q^2 = 0,60 \quad n=9 \quad s = 0,195 \quad F=17,197$$

Equação 5.3

Os valores de $\log \text{MIC}^{-1}$ dos compostos do grupo de treino e do grupo de teste calculados utilizando a equação 5.2 se encontram nas Tabelas 5.6 e 5.7 (pag 94) respectivamente.

Tabela 5.6 Valores reais e calculados de $\log \text{MIC}^{-1}$ (mol/L) frente ao *C. neoformans* dos compostos bisbenzamidínicos do grupo de treino

Molécula	Lipolo componente -Z	Balaban	$\text{Log MIC}^{-1}_{\text{real}}$ (mol/L)	$\text{Log MIC}^{-1}_{\text{calculado}}$ (mol/L)	Desvio	%erro
Mol06	0,02	1,28	7,79	7,79	0	0
Mol07	0,23	0,946	8,09	8,14	-0,04	0,49
Mol08	-1,72	0,92	8,73	8,89	-0,16	1,83
Mol10	-0,49	0,94	8,73	8,41	0,32	3,67
Mol11	0,36	1,24	7,85	7,70	0,15	1,91
Mol13	0,47	1,28	7,55	7,61	-0,06	0,79
Mol14	-0,23	0,91	8,48	8,34	0,12	1,42
Mol26	-1,36	1,40	8,03	8,12	0,09	1,12
Mol31	-0,37	0,85	7,74	7,97	-0,23	2,97

Para o grupo treino, o gráfico de valores de $\log \text{MIC}^{-1}(\text{mol/L})_{\text{real}}$ versus $\log \text{MIC}^{-1}(\text{mol/L})_{\text{calculado}}$ foi traçado, utilizando intervalo de confiança de 95%.

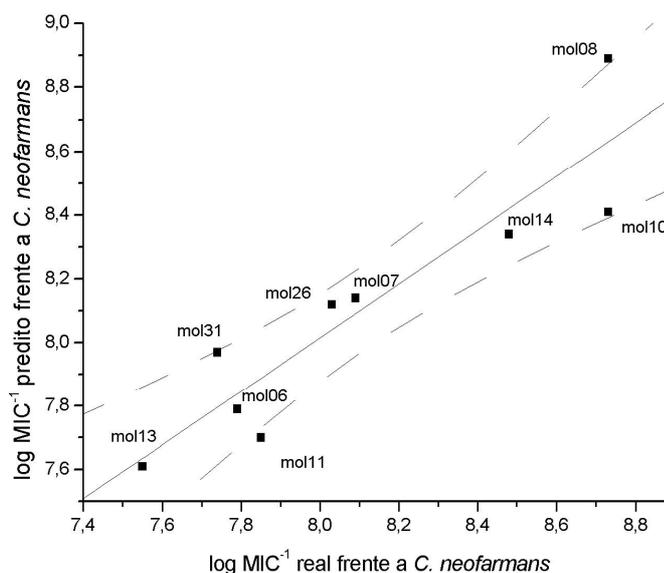


Figura 5.11- Gráfico de valores de $\log \text{MIC}^{-1}$ (mol/L)_{real} versus $\log \text{MIC}^{-1}$ (mol/L)_{predito}

$$\log \text{MIC}^{-1} (\text{mol/L})_{\text{real}} = 1,0 (\pm 0,37) \log \text{MIC}^{-1} (\text{mol/L})_{\text{calculado}} - 0,008 (\pm 0,90)$$

$$R^2 = 0,85 \quad Q^2 = 0,60 \quad s = 0,195 \quad n = 9$$

Equação 5.4

A equação 5.4 nos indica que a equação 5.3, pode ser utilizada para prever a CIM frente a *C. neofarmans* de compostos bisbenzamidínicos similares ao do grupo de treino, uma vez que os parâmetros estatísticos ($R^2 = 0,85$; $Q^2 = 0,60$) estão adequados. Desta forma a equação 5.3 foi utilizada para prever o valor de $\log \text{MIC}^{-1}$ (mol/L) do grupo de teste e o grupo de validação externa.

Tabela 5.7 - Valores reais e calculados de $\log \text{MIC}^{-1}$ (mol/L) frente a *C. neofarmans* e valores de lipolo Z dos compostos bisbenzamidínicos do grupo de teste e do grupo de validação lateral.

Grupo	Molécula	lipolo-Z	Balaban	$\text{Log MIC}^{-1}_{\text{real}}$ (mol/L)	$\text{Log MIC}^{-1}_{\text{calculado}}$ (mol/L)	Desvio	% Erro
Teste	Mol01	-0,130	1,289	7,39	7,36	-0,03	0,41
Teste	Mol05	0,025	1,258	8,4	7,35	-1,05	14,27
Teste	Mol12	0,725	0,968	8,75	7,56	-1,19	15,79
Teste	Mol09	0,234	0,946	8,81	7,78	-1,03	13,27
validação lateral	Mol32	0,375	1,124	8,06	7,44	-0,62	8,39
validação lateral	Mol33	-1,567	1,113	8,48	8,19	-0,29	3,56
validação lateral	Mol34	-1,181	1,389	7,96	7,59	-0,37	4,81
validação lateral	Mol35	-0,065	1,289	7,72	7,34	-0,38	5,25
validação lateral	Mol36	0,527	1,492	7,43	6,78	-0,65	9,55
validação lateral	Mol37	-0,480	1,363	7,85	7,37	-0,48	6,48
validação lateral	Mol38	0,689	1,527	7,34	6,66	-0,68	10,14
Planejada	FB1	0,193	1,654	-	6,65	-	
Planejada	FB2	-1,781	1,1654	-	8,18	-	
Planejada	FB3	-0,257	1,290	-	7,41	-	
Planejada	FB4	-0,238	1,219	-	7,51	-	

A equação 5.3 nos indica que quanto menor o parâmetro lipolo-componente Z e o parâmetro topológico de Balaban maior será a potência frente ao fungo *C. neofarmans*. O índice topológico de Balaban (J) reflete fortemente a ramificação molecular e muito pouco o tamanho molecular e é baseado na soma das distâncias de um átomo a outro, sendo seu valor dependente da conformação tridimensional (Montanari et al., 2000; Charton, 1983). Assim, segundo a Equação 5.2 quanto menos ramificada e menor ramificação (menor lipolo –componente Z) for, maior será a potência da molécula. Segundo a equação, os compostos planejados terão potência de baixa a média frente ao fungo *C. neofarmans*.

5.2.5- Estudos de QSAR-3D frente ao fungo *Candida albicans*

Baseado no conhecimento da interação destes compostos com a fenda menor do ADN, foram escolhidas sondas que fossem capazes de mimetizar a interação das moléculas com o alvo biológico: (1) sonda O2 (oxigênio sp^2) acceptor de ligação de hidrogênio, sonda O3 (oxigênio sp^3) acceptor de ligação de hidrogênio, sonda Nar (nitrogênio sp^2 pertencente a anel aromático), sonda CH_3^{+1} sonda *default* do programa utilizada para estudar os efeitos estereoquímicos e eletrostáticos de modo em geral, sonda N3 (nitrogênio sp^3) acceptor de ligação de hidrogênio e sonda H^+ doadora de

ligação de hidrogênio. As condições utilizadas nas **Análises 2, 4, 6 e 9** (Tabela 4.3, pag 56) levaram aos melhores resultados estatísticos (Tabela 5.8).

Tabela 5.8- Resultados da análise CoMFA frente ao fungo *Candida albicans*

Análise	Número ótimo de componentes	R ²	Q ²	s	F	Contribuição	
						estérico	eletrostático
2	1	0,836	0,704	0,185	35,69	0,948	0,052
4	1	0,820	0,600	0,194	31,80	0,955	0,045
6	1	0,824	0,603	0,192	32,82	0,966	0,034
9	1	0,827	0,608	0,190	33,55	0,950	0,045

Foram calculados os valores de log MIC⁻¹ (mol/L) para os compostos do grupo de treino e do grupo de teste utilizando os resultados obtidos das análises que apresentaram melhores resultados estatísticos e os valores obtidos estão descritos na Tabela 5.10.

A atividade biológica foi calculada para o grupo de teste, para o grupo de moléculas utilizadas na validação externa e as moléculas planejadas, os resultados se encontram na Tabela. 5.11.

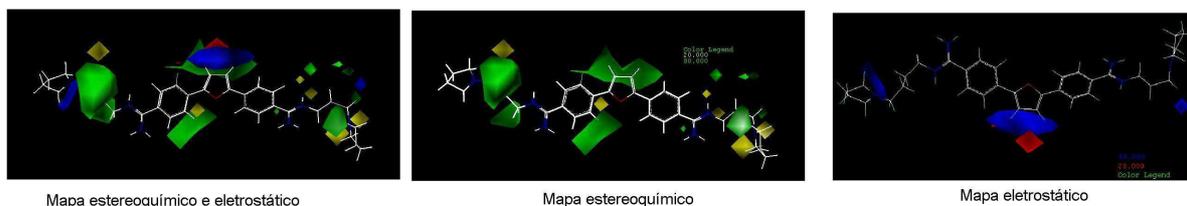
Tabela 5.9 - Valores calculados de $\log \text{MIC}^{-1}$ para os compostos do grupo de treino frente a *Candida albicans* utilizando diferentes análises

Grupo treino	$\log \text{MIC}^{-1}$ real (mol/L)	Análise 2			Análise 4			Análise 6			Análise 9		
		$\log \text{MIC}^{-1}$ calculado (mol/L)	desvio	%erro	$\log \text{MIC}^{-1}$ calculado (mol/L)	desvio	%erro	$\log \text{MIC}^{-1}$ calculado (mol/L)	desvio	%erro	$\log \text{MIC}^{-1}$ calculado (mol/L)	desvio	%erro
Mol31	6,73	6,83	0,1	1,49	6,77	0,04	0,67	6,85	0,12	1,75	6,85	0,12	1,83
Mol06	7,19	7,23	0,04	0,56	7,28	0,09	1,23	7,24	0,05	0,69	7,22	0,03	0,35
Mol07	7,19	7,46	0,27	3,76	7,53	0,34	4,79	7,47	0,28	3,75	7,48	0,29	3,99
Mol05	7,49	7,29	-0,2	2,67	7,31	0,18	2,46	7,27	-0,22	-3,03	7,29	0,20	2,68
Mol14	7,57	7,31	-0,26	3,43	7,35	0,22	2,94	7,33	-0,24	-3,27	7,34	0,23	3,06
Mol01	7,68	7,64	-0,04	0,52	7,58	0,10	1,34	7,64	-0,04	-0,52	7,65	0,03	0,43
Mol08	7,82	7,65	-0,17	2,17	7,73	0,09	1,20	7,77	-0,05	-0,64	7,65	0,17	2,19
Mol26	7,73	7,92	0,19	2,46	7,82	0,09	1,17	7,91	0,18	2,28	7,90	0,17	2,22
Mol13	6,65	6,72	0,07	1,05	6,69	0,04	0,54	6,69	0,04	0,60	6,68	0,03	0,46

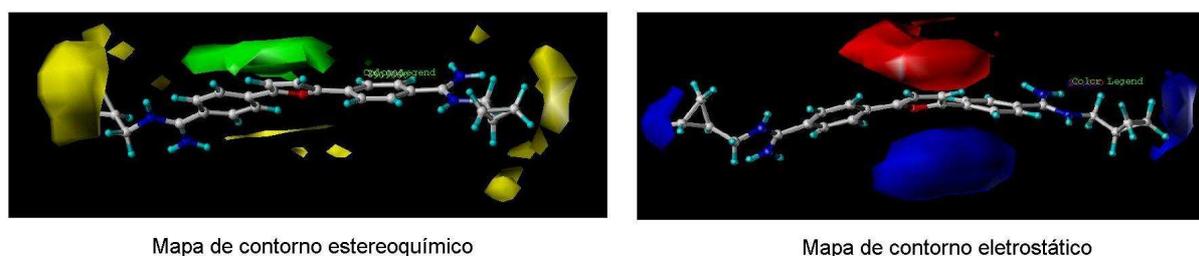
Tabela 5.10- Valores reais e calculados de log MIC⁻¹ frente a *Candida albicans* dos compostos bisbenzamidínicos do grupo de teste utilizando as diferentes análises

Grupo	Molécula	ANÁLISE 2				ANÁLISE 4			ANÁLISE 6			ANÁLISE 9		
		log MIC ⁻¹ real (mol/L)	log MIC ⁻¹ calculado (mol/L)	resíduo	% erro	log MIC ⁻¹ calculado (mol/L)	resíduo	% erro	log MIC ⁻¹ calculado (mol/L)	resíduo	% erro	log MIC ⁻¹ calculado (mol/L)	resíduo	% erro
TESTE	Mol09	7,25	7,17	0,08	1,10	7,07	0,18	2,48	6,91	0,34	4,69	7,15	0,10	1,38
TESTE	Mol10	7,53	7,41	0,12	1,59	7,47	0,06	0,80	7,46	0,07	0,93	7,44	-0,02	0,27
TESTE	Mol11	7,25	7,36	-0,11	1,52	7,17	0,08	1,10	7,43	-0,18	-2,48	7,37	-0,12	1,66
VALIDAÇÃO EXTERNA	Mol32	8,05	7,42	-0,63	7,83	7,56	0,49	6,05	7,60	0,45	5,60	7,43	-0,62	-7,70
VALIDAÇÃO EXTERNA	Mol33	6,66	7,41	0,75	11,26	7,28	0,62	9,36	7,42	0,76	11,41	7,43	0,77	11,56
VALIDAÇÃO EXTERNA	Mol34	6,49	7,87	1,38	21,26	7,92	1,43	21,99	7,97	1,48	22,76	7,86	1,37	21,11
VALIDAÇÃO EXTERNA	Mol35	9,21	7,55	-1,66	18,02	7,83	1,38	14,99	7,85	1,36	14,78	7,80	-1,41	15,31
VALIDAÇÃO EXTERNA	Mol36	7,44	7,66	0,22	2,96	7,79	0,35	4,71	7,72	0,28	3,81	7,72	0,28	3,76
VALIDAÇÃO EXTERNA	Mol37	7,12	7,49	0,37	5,20	7,15	0,03	0,41	7,33	0,21	2,92	7,51	0,39	5,48
VALIDAÇÃO EXTERNA	Mol38	6,59	7,56	0,97	14,72	7,63	1,04	15,80	7,55	0,96	14,58	7,67	1,08	16,39
PLANEJADOS	FB1	-	7,45	-	-	7,53	-	-	7,39	-	-	7,66	-	-
PLANEJADOS	FB2	-	7,62	-	-	7,60	-	-	7,27	-	-	7,70	-	-
PLANEJADOS	FB3	-	7,39	-	-	7,43	-	-	7,13	-	-	7,49	-	-
PLANEJADOS	FB4	-	7,48	-	-	7,47	-	-	7,81	-	-	7,84	-	-

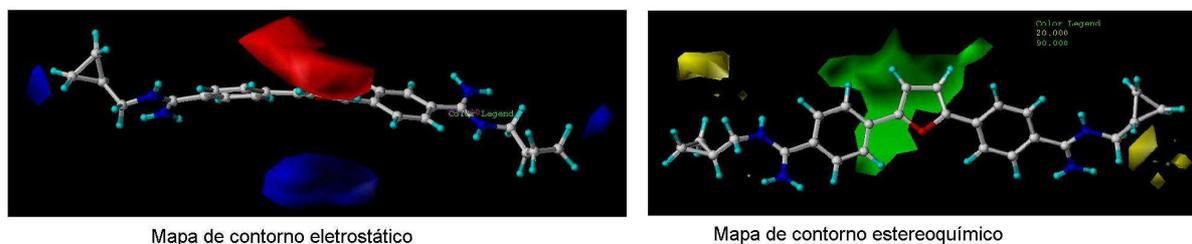
Os mapas de contorno (Figura 5.12) das diferentes análises feitas foram construídos. As áreas vermelhas são regiões onde grupos com um potencial eletrostático negativo levam ao aumento da potência e as áreas azuis são regiões onde grupos com potencial eletrostático positivo levam a um aumento da potência. As áreas verdes são regiões onde grupos volumosos são favoráveis (maior potência) e as áreas amarelas onde grupos volumosos são indesejáveis, pois diminuem a potência.



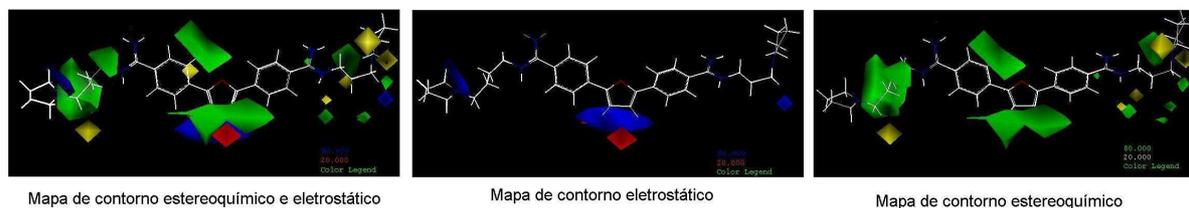
a- Mapa de contorno da análise 4



b- Mapas de contorno da análise 2



c- Mapa de contorno da análise 6



d- Mapa de contorno da análise 9

Figura 5.12- Mapas de contorno obtidos nas análises de QSAR-3D (CoMFA) frente a *Candida albicans* **a-** Mapa de contorno da análise 4 **b-** Mapas de contorno da análise 2 **c-** Mapa de contorno da análise 6 **d-** Mapa de contorno da análise 9

Em todas as análises podemos observar que a contribuição do efeito estereoquímico foi muito maior que a contribuição do efeito eletrostático. A análise dos mapas de contorno estereoquímico permite avaliar que a presença de grupos volumosos na extremidade da molécula e no anel furânico (posição 3 e 4) levam a uma maior potência.

A análise dos mapas de contorno eletrostático nos indica que a presença de menor densidade eletrônica (carga positiva) no anel furânico e nos substituintes do grupo amidina levam a uma maior potência.

5.2.6- Estudos de QSAR-3D frente ao fungo *Cryptococcus neoformans*

As condições utilizadas nas **Análises 4, 7 e 8** (Tabela 4.3, pag 56) levaram aos melhores resultados estatísticos (Tabela 5.12). Com as condições destas análises foram calculados os valores de $\log \text{MIC}^{-1}$ para os compostos do grupo de treino, para o grupo de teste e para o grupo de moléculas utilizadas na validação externa.

Tabela 5.11- Resultados das análises CoMFA frente a *Cryptococcus neoformans*

Nome da análise	Contribuição		R ²	Q ²	N° ótimo de componentes	n	F	s
	Estéreo-químico	Eletrostático						
Análise 4	0,948	0,052	0,958	0,623	1	10	79,09	0,105
Análise 7	0,950	0,050	0,990	0,710	2	10	336,7	0,052
Análise 8	0,979	0,021	0,998	0,808	2	10	278,3	0,057

Utilizando as análises **4, 7 e 8**, foram calculados os valores de $\log \text{MIC}^{-1}$ para os compostos do grupo de treino que estão descritos na Tabela 5.13, pag 100.

A atividade biológica e a porcentagem de erro foram calculadas para o grupo teste, o grupo de validação externa e as moléculas planejadas inicialmente, se encontram na Tabela 5.14, pag 101.

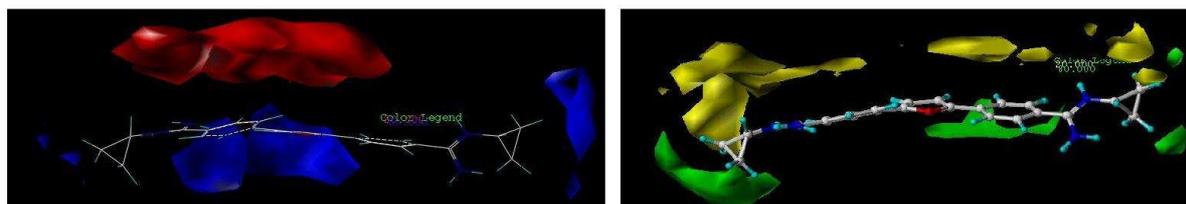
Os mapas de contorno (Figura 5.13, pag 102) das análises de QSAR-3D foram construídos.

Tabela 5.12- Valores calculados de $\log \text{MIC}^{-1}$ (mol/L) para os compostos do grupo de treino frente a *Cryptococcus neoformans*

Grupo de treino	Análise 4				Análise7			Análise8		
	$\log \text{MIC}^{-1}$ real (mol/L)	$\log \text{MIC}^{-1}$ calculado (mol/L)	resíduo	% erro	$\log \text{MIC}^{-1}$ calculado (mol/L)	resíduo	% erro	$\log \text{MIC}^{-1}$ calculado (mol/L)	resíduo	% erro
Mol13	7,55	7,56	0,01	0,09	7,56	0,01	0,19	7,60	0,05	-0,61
Mol06	7,79	7,85	0,06	0,80	7,81	0,02	0,26	7,87	0,08	-1,01
Mol11	7,85	7,82	0,03	0,35	7,83	0,02	0,23	7,84	0,01	0,17
Mol26	8,03	8,11	0,08	0,96	8,10	0,07	0,89	8,18	0,15	-1,85
Mol05	8,4	8,37	0,03	0,35	8,36	0,04	0,53	8,37	0,03	0,30
Mol14	8,48	8,49	0,01	0,14	8,53	0,05	0,53	8,46	0,02	0,25
Mol08	8,73				8,73	0,00	0,06	8,62	0,11	1,23
Mol10	8,73	8,69	0,04	0,51	8,67	0,06	0,70	8,72	0,01	0,10
Mol07	8,81	8,86	0,05	0,52	8,84	0,03	0,34	8,88	0,07	-0,83

Tabela 5.13- Valores reais e calculados de $\log \text{MIC}^{-1}$ (mol/L) frente a *Cryptococcus neoformans* dos compostos bisbenzamidínicos do grupo de teste, validação externa e moléculas planejadas.

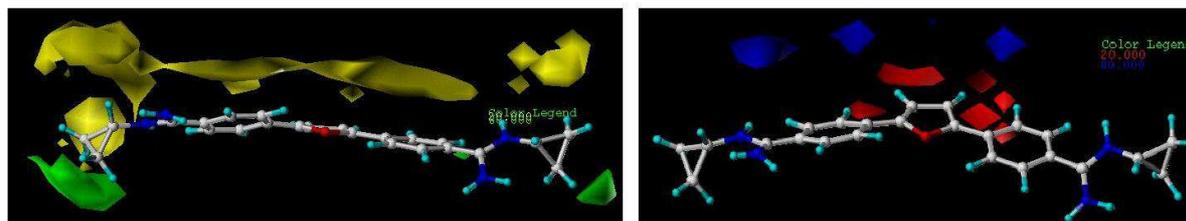
Grupo		$\log \text{MIC}^{-1}$ real (mol/L)	Análise 4			Análise 7			Análise 8		
			$\log \text{MIC}^{-1}$ calculado (mol/L)	resíduo	% erro	$\log \text{MIC}^{-1}$ calculado (mol/L)	resíduo	% erro	$\log \text{MIC}^{-1}$ calculado (mol/L)	resíduo	% erro
Teste	Mol01	7,39	8,02	0,63	7,88	7,94	0,55	6,98	7,92	0,53	6,67
Teste	Mol09	8,13	7,66	0,47	6,11	7,60	0,53	7,03	7,56	0,57	7,61
Teste	Mol31	7,74	8,20	0,46	5,63	8,22	0,48	5,81	8,24	0,50	6,04
Validação externa	Mol32	8,05	7,56	0,49	6,52	7,66	0,39	5,08	7,61	0,44	5,75
Validação externa	Mol33	7,56	8,26	0,70	8,45	8,20	0,64	7,84	8,18	0,62	7,62
Validação externa	Mol39	7,4	8,276	0,87	10,53	8,24	0,84	10,17	8,18	0,78	9,56
Validação externa	Mol35	8,3	7,78	0,52	6,62	7,80	0,50	6,40	7,77	0,53	6,79
Validação externa	Mol36	7,13	8,17	1,04	12,73	8,12	0,99	12,17	8,07	0,94	11,64
Validação externa	Mol37	8,02	8,14	0,12	1,45	8,06	0,04	0,54	8,07	0,05	0,60
Validação externa	Mol38	6,89	7,84	0,95	12,08	7,85	0,96	12,21	7,82	0,93	11,91
Moléculas planejadas	FB1	-	7,847			7,829			7,788		
Moléculas planejadas	FB2	-	8,172			8,083			8,067		
Moléculas planejadas	FB3	-	8,021			8,018			7,946		
Moléculas planejadas	FB4	-	7,62			7,745			7,718		



Mapa de contorno eletrostático

Mapa de contorno estereoquímico

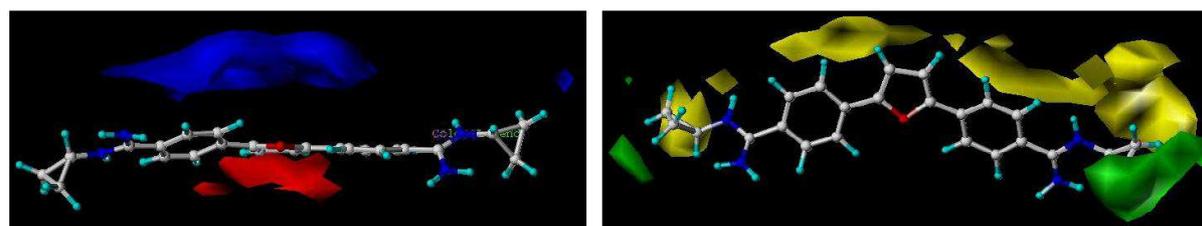
a- Mapas de contorno obtidos na **Análise 4**



Mapa de contorno estereoquímico

Mapa de contorno eletrostático

b- Mapas de contorno obtidos na **Análise 7**



Mapa de contorno eletrostático

Mapa de contorno estereoquímico

c- Mapas de contorno obtidos na **Análise 8**

Figura 5.13- Mapas de contorno obtidos nas análises de QSAR-3D (CoMFA) frente a *Cryptococcus neoformans* **a-** Mapa de contorno da **análise 4**. **b-** Mapas de contorno da **análise 7**. **c-** Mapa de contorno da **análise 8**

As análises de QSAR-3D frente ao *C. neoformans* tiveram um resultado bastante similar ao obtido frente a *C. albicans*. Aqui também, a contribuição do efeito estereoquímico foi muito maior que a contribuição do efeito eletrostático e a presença de grupos volumosos na extremidade da molécula e no anel furânico (posição 3 e 4) levam a uma maior potência. A análise dos mapas de contorno eletrostático nos indica que a presença de menor densidade eletrônica (carga positiva) no anel furânico e nos substituintes do grupo amidina levam a uma maior potência.

As análises foram muito similares entre si, indicando que o tipo de sonda não teve uma interferência significativa na análise.

5.3- Resultados obtidos das preparações efetuadas

Para a síntese dos compostos **FB1** a **FB4** foram propostas as rotas sintéticas descritas, nas Figuras 5.14 e 5.15 (pag 105).

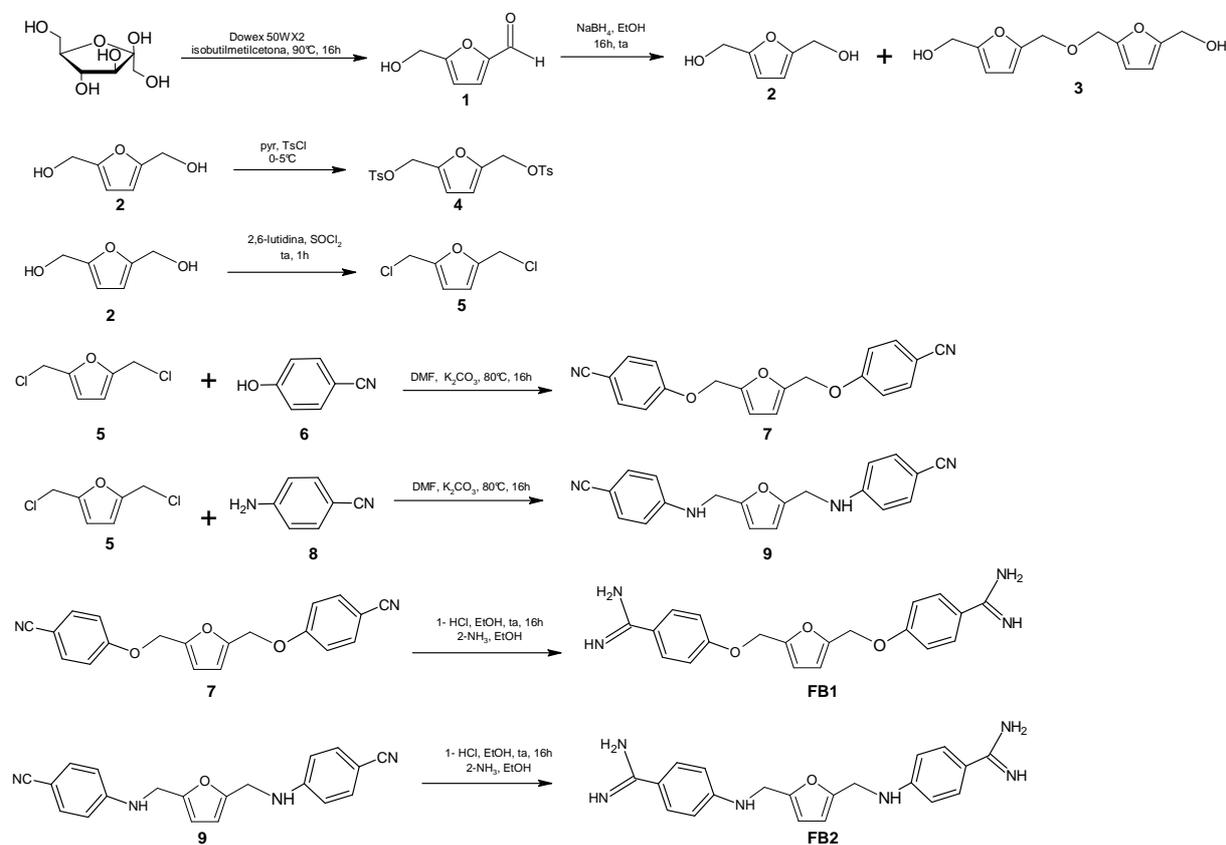


Figura 5.14- Rota de síntese proposta para compostos furanobenzamidínicos **FB1** e **FB2**

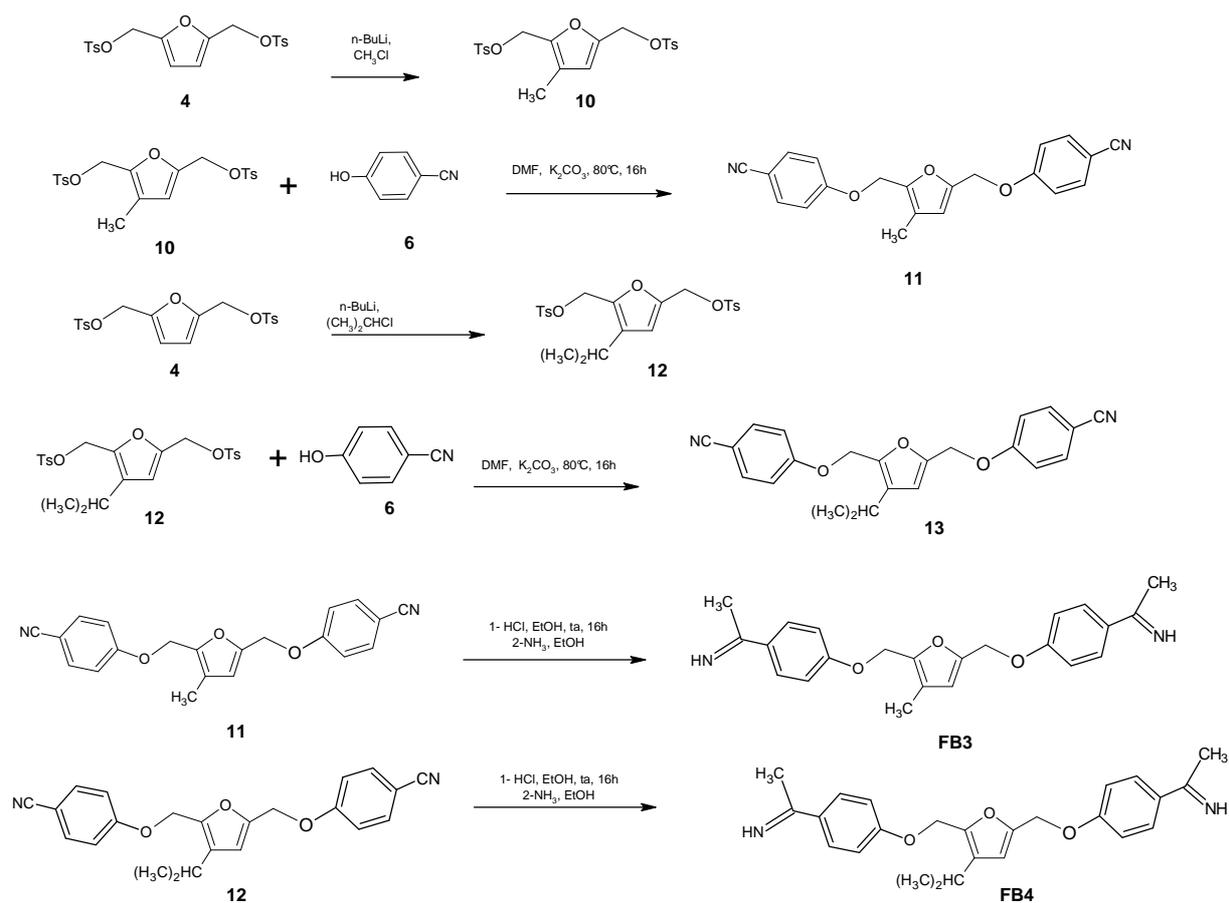


Figura 5.15- Rota de síntese proposta para compostos furanobenzamidinicos **FB3** e **FB4**

Para a síntese dos compostos isotioureidos **Ia**, **Ib**, **Ila** e **Ilb** foram propostas as rotas sintéticas descritas na Figura 5.16 (pag 106).

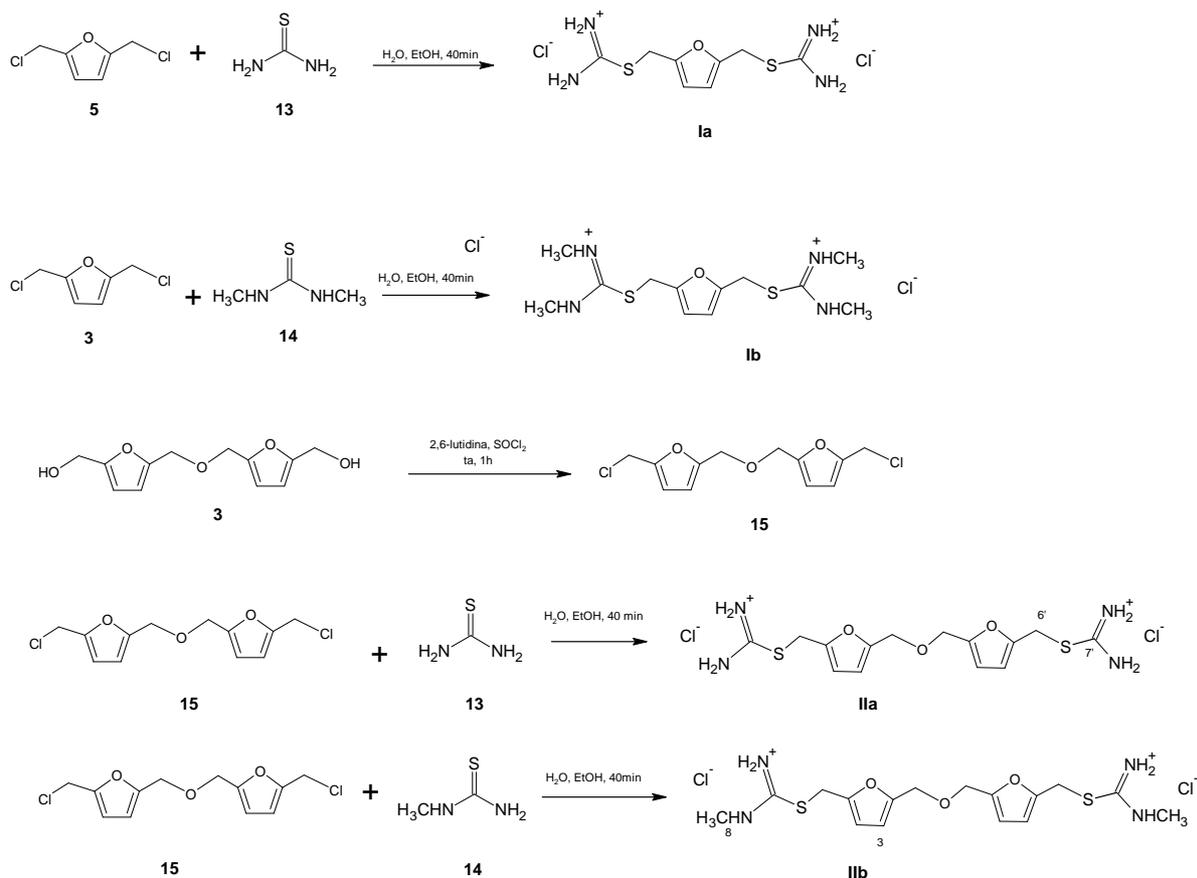


Figura 5.16- Rota de síntese proposta para compostos isothiureidos **la**, **lb** **Ila** e **I Ib**

Para a obtenção do 5-(hidroximetil)-2-carbaldeído-furano, HMF (**1**), foram propostos dois métodos:

- 1- À partir da desidratação da frutose (El Hajj et al., 1987) (Figura 5.17).
- 2- À partir da desidratação da sacarose (Timko et al, 1977) (Figura 5.18).

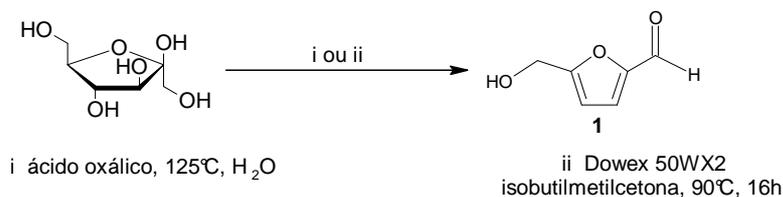


Figura 5.17 - Obtenção do 5-(hidroximetil)-2-carbaldeído-furano a partir da desidratação da frutose

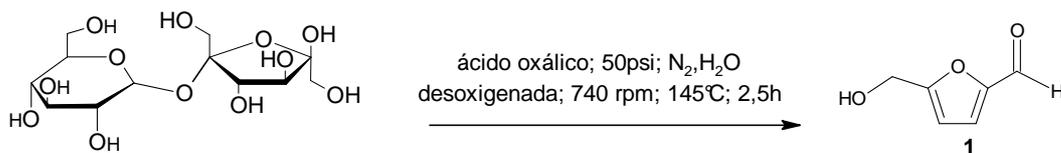


Figura 5.18 - Obtenção do 5-(hidroximetil)-2-carbaldeído-furano a partir da desidratação da sacarose

Estes são métodos clássicos para a obtenção do HMF (**1**), sendo necessário o uso de catalisadores ácidos próticos (ácido oxálico ou ácido clorídrico) utilizando como solvente a água; ou resinas fortemente ácidas utilizando como solvente o DMSO ou uma mistura de isobutilmetilcetona-água (El Hajj et al., 1987).

Nas reações onde se utilizam as resinas fortemente ácidas como catalisadoras, a temperatura de reação utilizada em geral é 90°C, temperatura em que se observa uma boa relação entre a formação do HMF e a sua degradação (El Hajj et al., 1987).

Utilizando como catalisador o ácido oxálico foi realizada a síntese de **1** utilizando dois métodos. O primeiro, utilizando como material de partida a frutose, levou a baixo rendimento (20%), mas é um método de fácil execução. O segundo método foi utilizado a sacarose como material de partida e catálise ácida (Figura 5.18, pag 106) sob alta pressão. Este procedimento levou a baixos rendimentos (25 %) além de ser um método de difícil execução.

Utilizando o método semi-contínuo usando como catalisador a resina DOWEX 50WX2 foi obtido o composto **1** com melhor rendimento bruto (91%). Foi obtido um óleo de cor marrom que posteriormente foi purificado utilizando cromatografia em coluna utilizando como fase estacionária alumina neutra (El Hajj et al., 1987). Nesta reação também se observa a formação do ácido levulínico, produto secundário obtido por hidratação de **1**. O ácido levulínico, por sua vez, catalisa a degradação de **1** e impede a cristalização deste último (El Hajj et al., 1987).

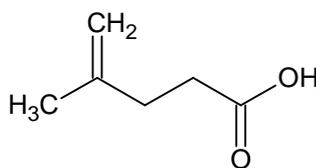


Figura 5.19 - Ácido levulínico

A formação de **1** foi confirmada no espectro na região do infravermelho (Figura A1, pág 133) pelo aparecimento de banda a 3336 cm⁻¹ referente a deformação axial de OH; 1658 cm⁻¹ referente a deformação axial de carbonila de aldeído; 1520 cm⁻¹ referente a deformação axial C=C. No espectro de RMN ¹H (Figura A2, pag 133) a obtenção de **1** foi confirmada pelo aparecimento de

simpleto a δ 9,629 referente a H7, dupletos a δ 7,226 e a δ 6,578 referentes, respectivamente, a H3 e H4; sinal a δ 4,6 referente a H6. No espectro de RMN de ^{13}C (Figura A3, pag 134) foi confirmado a obtenção de **1** pelo aparecimento do sinal a δ 177,736 referente ao carbono carbonílico C7, sinais a δ 157,229; δ 152,778; δ 121,951 e δ 111,885 referentes aos carbonos aromáticos C2, C5, C3 e C4 respectivamente; sinal a δ 64,608 referente ao carbono metilênico C6. As atribuições feitas para o espectro de RMN de ^{13}C foram confirmadas com o auxílio do subespectro de DEPT 135 (Figura A4, pag 134).

A redução de **1**, realizada utilizando-se método convencional (Timko et al., 1977) com boro-hidreto de sódio, levou à formação dos compostos **2** (53%) e **3** (47%). O composto **2** foi obtido após recristalização utilizando clorofórmio e filtração após 24h. O composto **3** foi obtido após recristalização utilizando clorofórmio e filtração após 72h.

A formação de **2** foi confirmada pelo desaparecimento de banda a 1658 cm^{-1} no espectro na região do infravermelho (Figura A5, pag 135), referente ao estiramento da carbonila do aldeído. No espectro de RMN de ^1H (Figura A6, pag 135) pelo desaparecimento de simpleto a δ 9,629 referente ao hidrogênio ligado ao carbono carbonílico do grupo aldeído. No espectro de RMN de ^{13}C (Figura A7, pag 136), foi confirmado pelo desaparecimento do sinal a δ 177,736 referente ao carbono carbonílico C7, e a δ 157,229 referente ao carbono C2. As atribuições feitas para o espectro de RMN de ^{13}C foram confirmadas com o auxílio do subespectro de DEPT 135 (Figura A8, pag 136).

A formação de **3** foi confirmada no espectro de massa (Figura A9, pag 137) pela presença do pico correspondente ao íon *quasi*-molecular $[\text{M} + \text{Na}]^+$ a m/z 261,33 indicando que a fórmula molecular do composto formado é $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_5$. No espectro na região do infravermelho (Figura A10, pag 137) foi confirmado pelo desaparecimento de banda a 1658 cm^{-1} referente ao estiramento da carbonila do aldeído do precursor **1** e aparecimento de bandas a 1200 cm^{-1} e 1062 cm^{-1} referentes a deformação axial assimétrica e simétrica do grupo C-O-C de grupo éter. Estas bandas não estão presentes no espectro na região do infravermelho do composto **2** (Figura A5, pag 135). No espectro de RMN de ^1H (Figura A11, pag 138) foi confirmado pelo desaparecimento de simpleto a δ 9,627 referente ao hidrogênio aldeídico H7. No espectro de RMN de ^{13}C (Figura A12, pag 138), foi

confirmado pelo desaparecimento do sinal a δ 177,736 referente ao carbono carbonílico C7 do precursor **1** e a presença dos carbonos do composto éter difurânico. As atribuições feitas para o espectro de RMN de ^{13}C foram confirmadas com o auxílio do subespectro de DEPT 135 (Figura A13, pag 139).

Seguindo a rota proposta (Figura 5.15, pag 105) foram feitas várias tentativas, em diferentes condições para se obter os compostos tosilados e/ou mesilados, mas os resultados foram insatisfatórios, pois, foram obtidas misturas complexas de difícil separação. Assim, foi proposta a obtenção do produto clorado.

Na tentativa de obtenção do 2,5-diclorometilfurano (**5**) a partir do 2,5 didroximetilfurfuraldeído (**2**) foi utilizado a N-clorossuccinimida com trifenilfosfina, segundo Bose e colaboradores (1973), uma clássica reação de mecanismo conhecido (March, 1985). Não foi possível a purificação do produto diclorado que é bastante instável. Assim, se procedeu a reação de acoplamento com o *p*-cianofenol para a obtenção do composto **6**. Como esta rota levou a baixos rendimentos, optou-se por obter o composto 2,5 diclorometilfurano utilizando o cloreto de tionila na presença de lutidina. O composto clorado obtido não foi purificado, no entanto foi caracterizado por RMN de ^1H (Figura A14, pag 139) pelos sinais δ 6,316 referente aos hidrogênios H3 e H4 e sinal a δ 5,535 referente aos hidrogênios H6 e H7.

A formação de **7** foi confirmada no espectro de massas (Figura A15, pag 140) pela presença do pico correspondente ao íon *quasi*-molecular $[\text{M} + \text{H}]^+$ a m/z 330,98 indicando que a fórmula molecular do composto formado é $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$. No espectro na região do infravermelho (Figura A16, pag 140) foi confirmada pela presença da banda a 2200 cm^{-1} referente ao estiramento de $\text{C}\equiv\text{N}$, banda a 1604 cm^{-1} referente à deformação assimétrica no anel benzênico, bandas a 1246 cm^{-1} e 1173 cm^{-1} referentes a deformação axial assimétrica e simétrica do grupo C-O-C. No espectro de RMN de ^1H (Figura A17, pag 141), foi confirmada pela presença de duplete a δ 7,599 referente ao hidrogênio H9; duplete a δ 7,032 referente a H8; simpleto a δ 6,488 referente aos hidrogênio H3 e H4; simpleto a δ 5,059 referente aos hidrogênios H6. No espectro de RMN de ^{13}C (Figura A18, pag 141) foi confirmada pela presença dos sinais a δ 167,307 (C7); δ 149,924 (C5); δ 133,962 (C9); δ 118,938 (C11); δ 115,418 (C8); δ 111,563 (C3 e C4); δ 104,568 (C10); δ

62,350 (C6). As atribuições feitas no espectro de RMN de ^{13}C foram confirmadas pelo subespectro DEPT 135 (Figura A19, 142).

Para a transformação do grupo nitrila de **7** na amidina (FB1) correspondente inicialmente utilizou-se a reação de Pinner (Boykin et al, 1988). Neste método obtemos um imino ester (imidato) a partir da reação da nitrila e etanol anidro em meio ácido (ácido clorídrico anidro) que posteriormente, reagindo com amônia, leva a formação da amidina correspondente (March, 1985).

No entanto, foi obtida uma mistura de difícil purificação. A presença de nitrilas aromáticas com grupo eletrodador na posição *para* e o anel furânico faz com que este composto, menos reativo, não leve a um método efetivo de síntese. Foi tentado o método *via amidoxima* descrito por Judkins e colaboradores (1996), no entanto não ocorreu reação.

A reação de acoplamento do composto **5** com o composto **8** não ocorreu nas condições de reação utilizadas. Isto pode ter ocorrido devido ao grupo ciano, grupo retirador de elétrons, na posição *para* em relação ao grupo amino fazendo com que o par de elétrons livres do grupo NH_2 se torne menos reativo.

Assim pela dificuldade na obtenção dos derivados amidínicos optou-se pela síntese dos compostos isotioureídos. Os compostos S-alquilisotiureídos podem ser obtidos através da reação de tiouréias com álcoois em meio ácido (Kofod, 1963). Outro método que pode ser utilizado é a reação de tioureias com haletos de alquila. Sendo que os iodetos de alquila levam a maiores rendimentos (Denk & Ye, 2005). Derivados alquilados terciários não reagem por este caminho, sendo que as principais reações que ocorrem são a solvólise e a eliminação (Denk & Ye, 2005).

Neste trabalho a obtenção dos derivados isotiureidos foi realizada através da reação dos derivados furânicos clorados e a isotiureia (e seus derivados) via reação SN_2 , realizada à temperatura ambiente utilizando como solvente etanol: água. Os derivados S-isotiureídos obtidos foram purificados em coluna filtrante de alumina neutra (solvente etanol). A formação dos compostos foi confirmada pelas análises dos espectros obtidos.

A obtenção do composto **1a** foi confirmada pelas análises dos dados espectrométricos. O espectro de massas (ESI-MS) modo positivo (Figura A20, 143) apresentou pico do *quasi*- molecular $[\text{M} + \text{H}]^+$ a m/z 244,64 indicando se

tratar de um composto com a fórmula molecular $C_8H_{12}N_4OS_2$. O pico a m/z 168,87 corresponde a perda do grupo isotioureído (Figura 5.19).

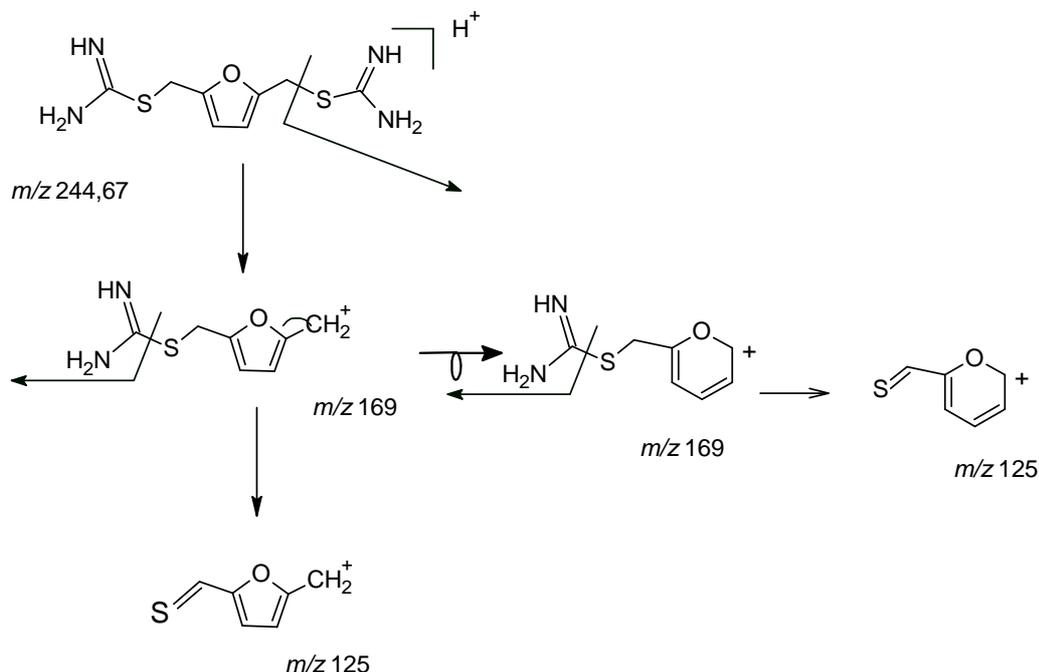


Figura 5.20- Esquema de fragmentação de **1a** por ESI-MS (Modo positivo)

No espectro na região do infravermelho (Figura A21, pag 143) foi observado banda a $3300-3000\text{ cm}^{-1}$ característica de deformação axial simétrica e assimétrica de NH_2 , banda a 2977 cm^{-1} referente a deformação axial de CH_2 , banda a 1649 deformação axial de C-C de anel aromático; 1606 deformação axial do grupo C=N. No espectro de RMN de 1H (Figura A22, pag 144) observamos simpleto a δ 6,333 referente aos hidrogênios H3 e H4 do anel furânico e simpleto a δ 4,350 referente aos hidrogênios metilênicos H6 e H6'. O grupo isotioureído foi identificado no espectro de RMN de ^{13}C (Figura A23, pag 144), pela presença de carbono quaternário a δ 170,058 atribuído ao carbono C7 e C7'. O anel furânico foi identificado por sinal a δ 148,547 atribuído aos carbonos C2 e C5 e sinal a δ 110,662 atribuído aos carbonos C3 e C4. A presença dos carbonos metilênicos C6 e C6' foi determinada por sinal a δ 28,870. As atribuições feitas no espectro de RMN ^{13}C foram realizadas com o auxílio do subespectro DEPT 135 (Figura A24, pag 145).

A obtenção do composto **1b** foi confirmada no espectro de ESI-MS, modo positivo (Figura A25, pag 146), por sinal correspondente ao pico do íon *quasi-*

molecular $[M + H]^+$ a m/z 301,08 indicando se tratar de um composto com a fórmula molecular $C_{12}H_{20}N_4OS_2$.

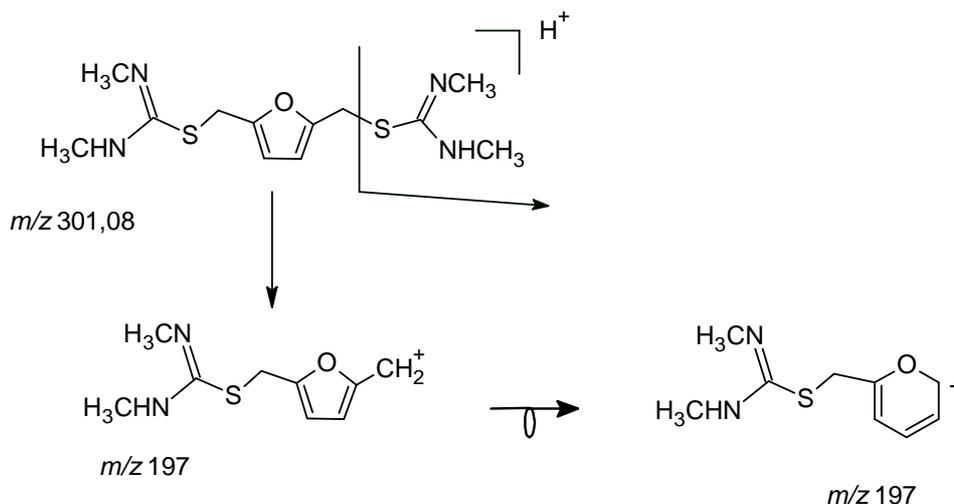


Figura 5.21 - Esquema de fragmentação de **Ib** por ESI-MS (Modo positivo)

No espectro na região do infravermelho (Figura A26, pag 146) observamos banda a $3200-3000\text{ cm}^{-1}$ referente à deformação axial do grupo NH_2 .

No espectro de RMN de 1H (Figura A27, pag 147) observamos simpleto a δ 6,337 referente aos hidrogênios H3 e H4 do anel furânico, simpleto a δ 4,360 referente aos hidrogênios metilênicos H6 e H1, simpleto a δ 2,971 (H8 e H8') e simpleto a δ 2,903 (H9 e H9').

O grupo isotioureído foi identificado no espectro de RMN de ^{13}C (Figura A28, pág 147), pela presença de carbono quaternário a δ 166,416 atribuído aos carbonos C7 e C7', por sinal a δ 30,880 referente aos carbonos metilênicos C8, C8' e por sinal a δ 29,015 referente aos carbonos C6 e C6'. O anel furânico foi identificado por sinal a δ 148,486 atribuído aos carbonos C2 e C5, respectivamente, e sinal a δ 110,897 atribuído aos carbonos C3 e C4. As atribuições feitas no espectro de RMN de ^{13}C foram realizadas com o auxílio do subespectro DEPT 135 (Figura A29, pag 148).

A formação do composto **Ila** foi confirmada pelas análises dos espectros. O ESI-MS (Figura A30, 149) mostrou pico do íon *quasi*-molecular $[M + H]^+$, a m/z 355 indicando que a fórmula molecular deste composto é $C_{14}H_{18}N_4O_3S_2$. O pico a 279,08 corresponde a perda do grupo isotioureído (CH_4N_2S) a partir do pico do íon *quasi*-molecular (Figura 5.21).

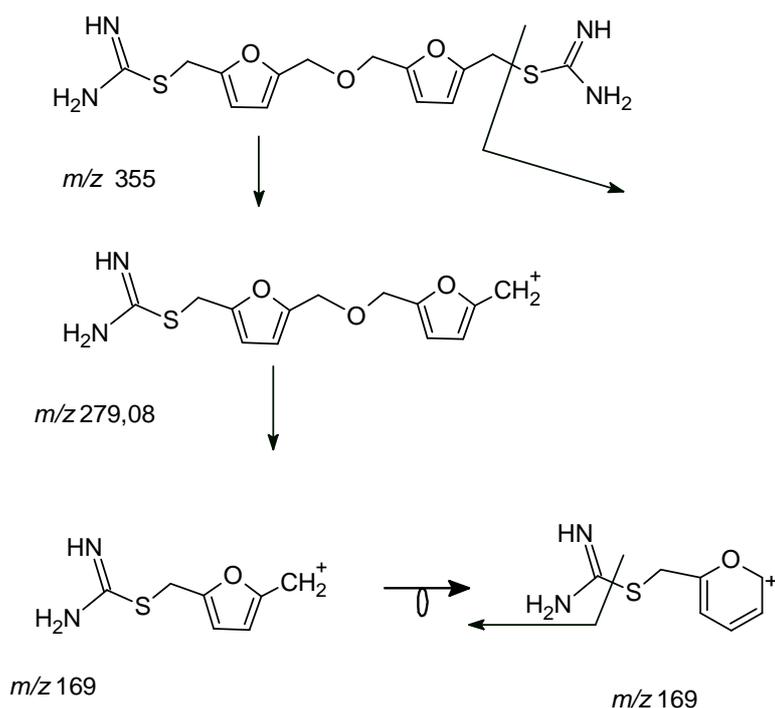


Figura 5.22- Esquema de fragmentação de Ila por ESI/MS (Modo positivo)

No espectro na região do infravermelho (Figura A31, pag 149) a presença do grupo isotioureído foi confirmada pela de banda em 3250 cm^{-1} referente a deformação axial do grupo NH_2 ; banda a 3172 cm^{-1} referente a deformação axial simétrico do grupo NH e banda a 1643 cm^{-1} referente a deformação do grupo NH_2 .

No espectro de RMN de ^1H (Figura A32, pág 150) a presença do anel furânico foi confirmada pela presença de simpleto largo a δ 6,426 atribuído aos hidrogênios H3, H3', H4 e H4'; simpleto a δ 4,568 foi atribuído aos hidrogênios H8 e H8' e simpleto a δ 4,441 atribuído aos hidrogênios H6 e H6'. A análise do espectro de RMN ^{13}C (Figura A33, pag 150) a presença do grupo isotioureído foi confirmada pela por sinal a δ 170,126 referente aos carbonos quaternários C7 e C7'. A presença do anel furânico foi confirmada pela presença de sinal a δ 151,466 referentes aos carbonos quaternários C2, C2', sinal a δ 148,327 referentes aos carbonos quaternários C5 e C5', sinal a δ 111,706 atribuído aos carbonos C3 e C3' e sinal a δ 110,609 atribuídos aos carbonos C4 e C4'. O sinal a δ 63,175 foi atribuídos aos carbonos C8 e C8' e sinal a δ 28,049 foi atribuído aos

carbonos C6 e C6'. As atribuições feitas para o espectro de RMN de ^{13}C foram realizadas com o auxílio do subespectro DEPT 135 (Figura A34, pag 151).

A formação do composto **IIb** foi confirmada pela análise dos espectros. O cromatograma ESI-MS (Figura A35, pag 152) mostrou pico do íon *quasi*-molecular ($\text{M} + \text{H}^+$) a m/z 383 indicando que a fórmula molecular deste composto é $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}_2$. O pico m/z 293 corresponde à perda do grupo isotioureído metilado ($\text{C}_3\text{H}_9\text{N}_2\text{S}$). O pico a 183,08 corresponde à perda do grupo $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ a partir do pico do íon molecular (Figura 5.22, pag 114).

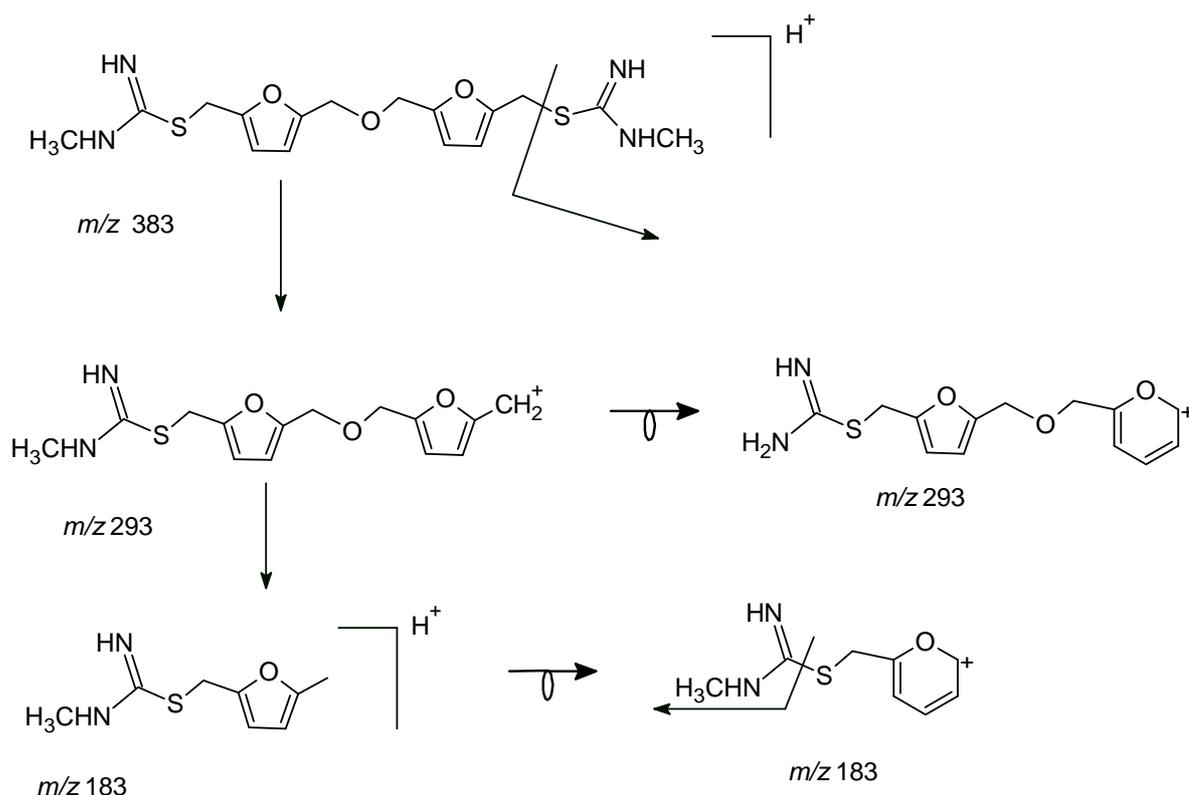


Figura 5.23- Esquema de fragmentação de **IIb** por ESI/MS (Modo positivo)

A presença do grupo isotioureído metilado foi caracterizada no espectro na região do infravermelho (Figura A36, pag 152) pelas bandas a 2925 cm^{-1} referente a deformação axial assimétrica do grupo $\text{C}=\text{N}-\text{H}$, banda a 1603 cm^{-1} referente a deformação axial do grupo $\text{S}-\text{C}=\text{N}$.

No espectro de RMN de ^1H (Figura A37, pag 153) o grupo isotioureído alquilado foi caracterizado pela presença dos sinais a δ 2,89 (H8 e H8'). O anel furânico foi caracterizado pela presença do simpleto a δ 6,33 atribuído aos hidrogênios H3, H3', H4 e H4'. Os sinais a δ 4,34 (simpleto, referente a 4

hidrogênios equivalentes) atribuído aos hidrogênios H6 e H6', simpleto a δ 4,43 (s) atribuído aos hidrogênios e H1 e H1'. A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura A38, pag 153) auxiliado pelo subspectro DEPT 135 (Figura A39 pag 154) permitiu a identificação do grupo isotioureído monoalquilado pela presença dos sinais a δ 166,268 atribuído aos carbonos quaternários C7 e C7', a sinal δ 30,130 atribuído aos carbonos metílicos C8 e C8'. O sinal a δ 111,651 foi atribuído aos carbonos C3 e C3' do anel furânico e sinal a δ 110,34 foi atribuído aos carbonos C4 e C4'. O sinal a δ 151,301 foi atribuído aos carbonos C2 e C2' do anel furânico e sinal a δ 148,823 foi atribuído aos carbonos C5 e C5'. O sinal a δ 29,45 foi atribuído aos carbonos C6 e C6' e sinal a δ 63,047 foi atribuído aos carbonos C9 e C9'.

5.4 Atividade biológica *in vitro*

5.4.1- Testes antifúngicos

Os principais métodos microbiológicos para a detecção de atividade antimicrobiana consistem nos ensaios de difusão, bioautográficos e de diluição. Estes métodos apresentam sensibilidades distintas (Duarte, 2001).

Para avaliação da atividade antifúngica os compostos foram testados em uma concentração final que variou de 250 a 32 $\mu\text{g/mL}$. Compostos que não produziam nenhuma inibição no crescimento até a concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ foram considerados inativos. Os resultados estão relatados na Tabela 5.14 (pag. 116).

Tabela 5.14- Atividade antifúngica *in vitro* dos compostos sintetizados

Espécies	Concentração inibitória mínima - mmol/L						
	2	3	7	Ib	Ila	Ilb	Anfoterina B
<i>C.albicans</i>	$1,00 \times 10^{-2}$	$26,9 \times 10^{-2}$	6,00	$> 68,6 \times 10^{-2}$	$> 60,0 \times 10^{-2}$	$> 56,3 \times 10^{-2}$	$5,38 \times 10^{-3}$
<i>C.glabrata</i>	$1,00 \times 10^{-2}$	N.E.	2,96	$> 68,6 \times 10^{-2}$	$> 60,0 \times 10^{-2}$	$> 56,3 \times 10^{-2}$	$5,38 \times 10^{-3}$
<i>C.krusei</i>	$1,00 \times 10^{-2}$	$53,8 \times 10^{-2}$	12,00	$> 68,6 \times 10^{-2}$	$> 60,0 \times 10^{-2}$	$> 56,3 \times 10^{-2}$	$5,38 \times 10^{-3}$
<i>C.parapsilosis</i>	$1,00 \times 10^{-2}$	$53,8 \times 10^{-2}$	NE	$> 68,6 \times 10^{-2}$	$> 60,0 \times 10^{-2}$	$> 56,3 \times 10^{-2}$	NE
<i>C.tropicalis</i>	$1,00 \times 10^{-2}$	$26,9 \times 10^{-2}$	NE	$> 68,6 \times 10^{-2}$	$> 60,0 \times 10^{-2}$	$> 56,3 \times 10^{-2}$	NE
<i>P.brasiliensis 01</i>	50×10^{-2}	$26,9 \times 10^{-2}$	NE	$> 68,6 \times 10^{-2}$	$> 60,0 \times 10^{-2}$	$> 56,3 \times 10^{-2}$	NE
<i>P.brasiliensis MG05</i>	50×10^{-2}	$26,9 \times 10^{-2}$	NE	$> 68,6 \times 10^{-2}$	$> 60,0 \times 10^{-2}$	$> 56,3 \times 10^{-2}$	NE
<i>P.brasiliensis 18</i>	50×10^{-2}	$26,9 \times 10^{-2}$	NE	$> 68,6 \times 10^{-2}$	$> 60,0 \times 10^{-2}$	$> 56,3 \times 10^{-2}$	NE
<i>P.brasiliensis 1017</i>	50×10^{-2}	$26,9 \times 10^{-2}$	NE	$> 68,6 \times 10^{-2}$	$> 60,0 \times 10^{-2}$	$> 56,3 \times 10^{-2}$	NE

nota: NE não efetuado

Todos os compostos testados apresentaram atividade antifúngica contra todos os microorganismos testados. O composto **2** foi o que apresentou maior potência frente aos fungos do gênero *Candida* testados. O composto **3** foi o que apresentou maior potência frente aos fungos do gênero *Paracoccidioides*. Os resultados dos compostos **Ib**, **Ila** e **Ilb** estão de acordo com o esperado uma vez que compostos isotioureidos já haviam sido descritos como tendo atividade antimicrobiana (Brooks et al., 1950; Bandelin & Tuschhoff, 1952). Cabe ressaltar que trabalhos recentes em nosso grupo de pesquisa (Silva, 2005; Nogueira, 2006) já haviam demonstrado a atividade antifúngica de derivados isotioureidos.

5.4.2- Avaliação de Toxicidade e de Atividade Antitumoral dos compostos isotioureidos

Para avaliação da toxicidade e atividade antitumoral utilizou-se o método colorimétrico com o sal de tetrazólio MTT. Este ensaio é um método sensível e confiável que mede a viabilidade, proliferação e atividade celular. É baseado na capacidade da desidrogenase mitocondrial de células viáveis em converter o MTT

amarelo, solúvel em água em formazam (Figura 5.23), composto azul escuro e insolúvel em água (Rathi et al, 2010).

No entanto no ensaio de MTT não há diferenciação entre o efeito citostático e o citotóxico. Para isto seria necessário que outros testes que medissem a capacidade de proliferação das células remanescentes e/ ou integridade e funcionalidade das mesmas (Bellamy, 1992) fossem realizados.

A absorvância dos produtos formazanas, medida espectrofotometricamente, é diretamente correlacionada com o número de células ativas metabolicamente. Sendo assim, valores de absorvância altos indicam uma elevada produção de formazana (roxo ou laranja), o que significa, em outras palavras, uma alta atividade enzimática e, portanto, presença de um grande número de células viáveis (Garcia, 2000)

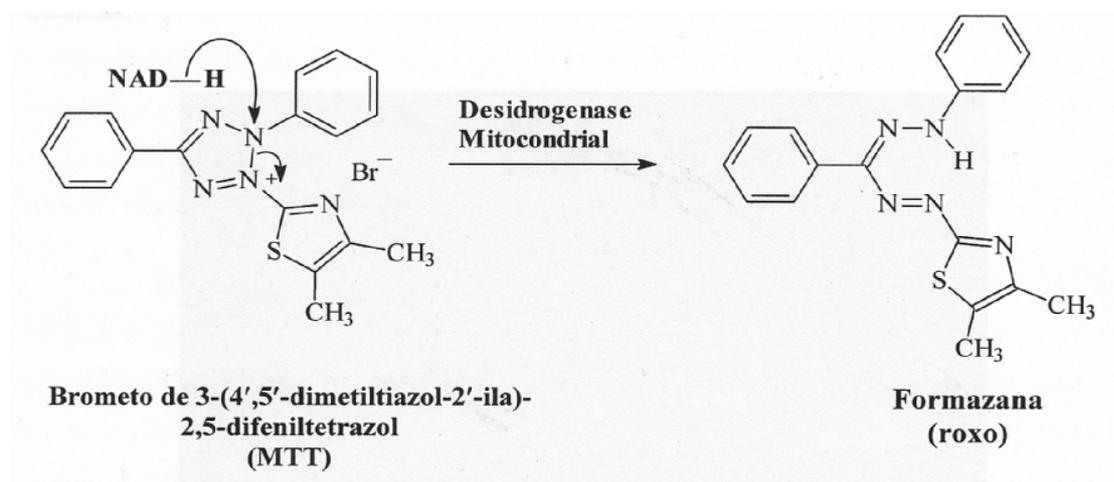


Figura 5.24- Redução do MTT pela desidrogenase mitocondrial

Fonte: Garcia, 2000

Os resultados obtidos para os compostos submetidos a ensaios para avaliação da atividade citotóxica (ou antitumoral) contra algumas linhagens de células sadias de epitélio de rim de hamster (BHK21) e de células cancerígenas, carcinoma mamário humano 4T1(M), adenocarcinoma de pulmão A549, melanoma humano (MeWo) e glioma de rato (C6), estão descritos na Tabela 5.15 (pag 118)

Tabela 5.15- Atividade citotóxica *in vitro* (IC₅₀ mmol/L) dos compostos **Ib**, **Ila** e **Ilb** frente as linhagens de células BHK21, 4T1, A549, MeWo e C6

Linhagem	Ib	Ila	Ilb
BHK21	$> 1 \times 10^{-2}$	1×10^{-2}	1×10^{-2}
4T1(M)	80×10^{-2}	N.E.	10,2
A549	N.E.	86,0	N.E.
MeWo	62,0	5,16	N.E.
C6	50,0	98,0	43,6

NOTA: 1- BHK21 epitélio de rim de hamster; 4T1(M) carcinoma mamário murino; A549 carcinoma de pulmão humano; MeWo melanoma humano; C6 glioma de rato
2- NE não efetuado

Os compostos tioureidos testados são pouco tóxicos para células sádias (IC₅₀ $> 1 \times 10^{-2}$ mmol/L para BHK21) e apresentaram atividade contra todas as linhagens de células cancerígenas testadas. Os compostos **Ib** e **Ilb** apresentaram atividade similar frente a célula de carcinoma mamário humano 4T1(M). O composto **Ila** foi o que apresentou maior potência frente as células tumorais de melanoma (MeWo) e frente ao glioma de rato C6 os três compostos testados apresentaram atividade antitumoral similar.

Não há dados na literatura consultada sobre a atividade antitumoral dos derivados isotioureidos.

CONCLUSÃO

As energias de interação e perturbação calculadas de derivados tipo furamidino bis-benzamidínicos utilizando ancoragem molecular manual com B-ADN, não possuem correlação estatística com o $\log \Delta T_m$ dos complexos dos ligantes furano-bisbenzamidínicos com os fragmentos do B-ADN, refletindo apenas uma tendência geral de afinidade pelo fragmento do B-ADN. As energias calculadas também não possuem correlação com a atividade biológica frente aos fungos *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*.

Os estudos de reconhecimento de padrão não foram capazes de indicar quais os parâmetros importantes para a atividade dos compostos frente ao fungo *Pneumocystis carinii*. Para melhorar estas análises seria necessário aumentar o número de moléculas analisadas testadas nas mesmas condições.

Um dos problemas da análise de QSAR é a escolha da conformação a ser utilizada. Normalmente, a conformação do ligante escolhida é aquela observada na estrutura de raios X no complexo ligante-alvo biológico, no entanto, muitas vezes não se dispôs da estrutura de todos os ligantes no complexo. A ancoragem molecular (*docking*) manual mostrou ser uma técnica adequada para se obter a conformação semelhante aquela observada pela cristalografia de raios X, uma vez que as estruturas das moléculas testadas, **Mol03** (bis-isopropilfuramidina), **Mol04** (bis-ciclopropilfuramidina), **Mol07** (bis-ciclobutilfuramidina) e **Mol11** (bis-ciclohexilfuramidina), obtidas nos estudos de ancoragem molecular manual estão muito próximas da conformação observada nas conformações obtidas por cristalografia de raios X.

Dentro dos limites do experimento, as análises de QSAR-2D e QSAR-3D permitiram inferir que os parâmetros estereoquímicos e lipofílicos são importantes para a atividade biológica dos compostos benzamidínicos frente à *C. albicans* e *C. neoformans*. As análises de QSAR-2D indicaram que a atividade dos compostos benzamidínicos frente a *C. albicans* está correlacionada à distribuição lipofílica da molécula. No entanto este parâmetro isolado não explica de forma adequada a atividade biológica observada para estes compostos. O parâmetro lipofílico está relacionado com as características farmacocinéticas necessárias a absorção. A equação obtida da análise de QSAR-2D frente ao fungo *C. neoformans* indica que a distribuição lipofílica na molécula e a ramificação presente são importantes para

a atividade biológica dos compostos benzamidínicos testados. Quanto menor o valor do lipolo- componente Z e quanto menos ramificada for a molécula e menor for esta ramificação mais potente será a molécula.

As análises de QSAR-3D mostraram que o fator estereoquímico também é um fator importante para a atividade dos compostos benzamidínicos frente a *C. albicans* e *C. neoformans*. A presença de grupos muito volumosos no grupo amidínico diminui a potência dos compostos bis-benzamidínicos. Isto já era esperado, uma vez que estudos prévios de modelagem molecular e relação estrutura-atividade utilizando compostos amidínicos indicam a importância da estrutura isoélica à fenda menor do B-DNA destes compostos para a interação.

Não foi possível a síntese das benzamidinas propostas nas condições utilizadas, no entanto foram sintetizadas 4 novos derivados S-isotioureidos **Ia**, **Ib**, **Ila** e **Ilb** (com rendimento global de 52%, 32%, 57% e 35 %) utilizando rotas sintéticas simples e de fácil execução.

Os S-tioureidos são isómeros dos compostos amidínicos e segundo estudos prévios realizados pelo grupo, estes compostos se ligam à fenda menor do DNA de forma semelhante aos compostos amidínicos.

Os compostos **2** (2,5-di-hidroximetilfurano), **3** (1,5-di[5'-hidroximetil-2'-furano]il), **7** (2,5-bis[(4-cianofeniloxi)metil]furano)], **Ia** (2,5-di[5-tioureido-metil] furano) **Ib** (2,5-dimetanodiil-bis-(N,N'-dimetilcarbamidotioato)furano), **Ila** (1,5-bis[(5'-carbamidotioato-2'furano)il-3-oxapropano) e **Ilb** (1,5-bis[(5'-N-metil-carbamidotioato-2'furano)il-3-oxapropano) sintetizados apresentaram atividade antifúngica frente a todos os microorganismos testados. O composto **2** foi o que apresentou maior potência frente aos fungos do gênero *Candida* testados. O composto **3** foi o que apresentou maior potência frente aos fungos do gênero *Paracoccidioides*. É interessante observar que os compostos mais potentes frente aos fungos do gênero *Candida* testados são aqueles capazes de realizar ligações de hidrogênio mais eficientes e possuem menor cadeia. Isto pode ser observado quando comparamos os compostos **2**, **3** e **7**.

Os testes de atividade antitumoral mostraram que os compostos **Ib**, **Ila** e **Ilb** são pouco tóxicos para as células normais de epitélio de rim de hamster. Os compostos **Ib** apresentou maior potência frente a célula de carcinoma mamário murino 4T1(M). O composto **Ila** foi o que apresentou maior potência frente as

células tumorais de melanoma (MeWo) e frente ao glioma de rato C6 o composto **IIb** apresentou maior potência antitumoral .

Os derivados S-isotioureidos se mostraram uma classe de compostos bastante promissora para futuros estudos buscando novas substâncias com atividade antifúngica e antitumoral, pois além de possuírem rota sintética simples e de fácil execução e com bons rendimentos. Estes compostos apresentaram atividade biológica bastante relevante. Assim como perspectivas futuras deste trabalho temos:

- Realizar estudos de *docking* flexível utilizando metodologias mais rápidas e de fácil execução com diferentes estruturas do d-B-ADN e maior número de moléculas ativas com maior variação estrutural.
- Realizar estudos de QSAR utilizando os derivados isotioureidos para analisar se a capacidade de realizar ligações de hidrogênio, a lipofilia e a o tamanho da cadeia realmente influenciam a atividade antimicrobiana e antitumoral. Isto possibilitará propor novas substâncias mais potentes com maior especificidade.
- Determinar coeficiente de partição (experimental e por cálculo) dos compostos sintetizados.
- Sintetizar novos derivados isotioureidos com grupos aromáticos e heteroaromáticos como grupos espaçadores.
- Realizar estudos para determinar qual o mecanismo de ação da atividade antitumoral e antimicrobiana apresentada pelos derivados isotioureidos.
- Realizar testes *in vivo* para os compostos com atividade promissora.

BAGINSKI, M.; POLUCCI, P.; ANTONINI, I.; MARTELLI, S. Binding free energy of selected anticancer compounds to DNA – theoretical calculations. **Journal of Molecular Modeling**, v. 8, p. 24-32, 2002.

BOYD, G. V. Recent advances in the synthesis of amidines. In. PATAI, S. & RAPPOPORT, Z. (Edit) The chemistry of amidines and imidates, v. 2, John Wiley & Sons, 1991.

BAHEKAR, R. H.; JAIN, M. R.; GUPTA, A. A.; GOEL, A.; JADAV, P. A.; PATEL, D. N.; PRAJAPATI, V. M.; PATEL, P. R. Synthesis and antidiabetic activity of 3, 6, 7-trisubstituted-2-(1-*H*-imidazol-2-ylsulfanyl)quinoxalines and quinoxalin-2-yl isothiureas. **Archiv der Pharmazie - Chemistry in Life Sciences**, v. 340, p. 359-366, 2007.

BANDELIN, F.J.; TUSCHHOFF, J. V. Isothiureas as germicides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 74, n. 17, p. 4271-4273, 1952.

BARILLARI, C.; TAYLOR, J.; VINER, R.; ESSEX, J. W. Classification of Water Molecules in Protein Binding Sites. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n.9, p. 2577–2587, 2007.

BARREIRO, E. J.; ALBUQUERQUE, M. G. ; SANT'ANNA, C. M. R. ; RODRIGUES, C. R. ; ALENCASTRO, R. B. Modelagem molecular, ferramenta para o planejamento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 20, p. 300-310, 1997.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. A questão da inovação em fármacos no Brasil: proposta de criação do programa nacional de fármacos (PRONFAR). **Química Nova**, v. 28, s56-s63, 2005.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, n.6, p. 1401-1406, 2006.

BELLAMY, W. Prediction of response to drug therapy of cancer. A review of in vitro assays. **Drugs**, v. 44, p. 690-708, 1992.

Biosym Technologies. Insight II Version 2.3.0 User Guide, Part 1. Biosym, San Diego, USA, 1995.

BOONER, T. G.; BOURNE, E. J.; RUSZKIEWICZ, M. The iodine-catalysed conversion of sucrose into 5-hydroxymethylfurfuraldehyde. **Journal of Chemical Society**, p. 787-791, 1960.

BOSE, A. K.; LAL, B. A facile replacement of hydroxyl by halogen with inversion. **Tetrahedron Letters**, v. 14, n. 40, p. 3937-3940, 1973.

BOYKIN, D. W., KUMAR, A., XIAO, G. E., WILSON, W. D., BENDER, B. C., McCURDY, D. R., HALL, J. E., TIDWELL, R. R. 2,5 bis[4-(*N*-alkylamidino)phenyl]furans as anti-*Pneumocystis carinii* agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p.124-129, 1998.

BOYKIN, D. W. Antimicrobial activity of the DNA minor groove binders furamide and analogs. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.13, n. 6, p. 763-771, 2002.

BRACKEN, C.; YOUNG, M. M.; DUNKER, K. Disorder and flexibility in protein structure and function. **Pacif symposium on biocomputing**, p. 64-66, 2001.

BROOKS, J. D.; CHARLTON, P. T.; MACEY, P. E.; PEAK, D. A.; SHORT, W. F. Antituberculous compounds. Part V. 2-sulphanilamido-5-alkyl-1:3:4-oxadiazoles and -thiadiazoles and related isothiosemicarbazones and isothiourreas. **Journal of Chemical Society**, p. 452-459, 1950.

CAMPBELL, N. H.; EVANS, D. A.; LEE, M. P. H.; PARKINSON, G. N.; NEIDLE, S. Targeting the DNA minor groove with fused ring dicationic compounds: comparison of in silico screening and a high resolution crystal structure. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.16, p. 15-19, 2006.

CHARTON, M. (Ed). Steric Effects in Drug Design: Topics in Current Chemistry. Springer-Verlag, 1983.161p.

CHEMICAL ABSTRACTS, v. 58, 9027f, 1963.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS). Método de Referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica; norma aprovada – segunda edição. NCCLS document M27 – A2. 2003.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi approved standard. Second edition. NCCLS Document M38 – A2. 2008

COLLEGARI, L. M. Bioestatística: princípios e aplicações. Porto alegre: Artmed, 2003.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T.; Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599- 607, 2003.

CORY, M.; TIDWELL, R. R; FAIRLEY, T. A. Structure and DNA binding activity of analogues of 1,5-bis(4-amidinophenoxy)pentane (pentamidine). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, p. 431-438, 1992.

COSTA FILHO, P. A; POPPI, R. J. Algoritmo genético em química. **Química Nova**, v. 22, n. 3, p. 405-411,1999.

CRAMER, R. D.; PATTERSON, D. E.; BUNCE, J. D.; Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA). 1. Effect of Shape on Binding of Steroids to Carrier Proteins. **Journal of the American Chemical Society**, n. 110, p. 5959- 5967, 1988.

CRUZ, A.; PADILHA-MARTINEZ, I. I.; GARCIA-BAEZ, E. V.; JUAREZ, M. J. S-methyl(-N-aryl and N-alkyl)isothiourreas derived from 2-aminobenzothiazole. **ARKIVOC**, p. 200-209, 2008.

DEL POETA, M.; SCHELL, W. A.; DYKSTRA, C. C.; JONES, S. K.; TIDWELL, R. R.; KUMAR, A.; BOYKIN, D. W.; PERFECT, J. R. *In vitro* antifungal activities of seriates it of dication-substituted carbazoles, furans and benzimidazoles. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 10, p. 2503-2510, 1998a.

DEL POETA, M; SCHELL, W. A.; DYKSTRA C. C.; JONES, S. K., TIDWELL, R. R.; CZARNY, A.; BAJIC, M.; KUMAR, A.; BOYKIN, D. W.; PERFECT, J. R. Structure-*In vitro*

activity relationships of pentamidine analogues and dication-substituted bis-benzimidazoles as new antifungal agents. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 42, p. 2495- 2502, 1998b.

DENK, M. K.; YE, X. Alkylation of etylenethiourea with alcohols: a convenient synthesis of S-alkyl-isothioureas without toxic alkylating agents. **Tetrahedron Letters**, v. 46, p. 7597-7599, 2005.

DOMAN, T. N.; McGOVERN, S. L.; WITHERBEE, B. J.; KASTEN, T. P.; KURUMBAL, R.; STALLINGS, W. C.; CONNOLLY, D. T.; SHOICHET, B. K. Molecular docking and high throughput screening for novel inhibitors of protein tyrosine phosphatase-1B. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 2213-2221, 2002.

DUARTE, M. G. R. *Plantas Invasoras Mediciniais: Triagem de espécies dos gêneros Cuphea, Desmodium, Polygonum e Sida para atividade antimicrobiana e estudo fitoquímico biomonitorado de Polygonum spectabile* Mart. Belo Horizonte: UFMG, 2001. 195p. Dissertação.

DYKSTRA, C.; McCLERNON, D. R.; ELWELL, L. P.; TIDWELL, R. R. Selective inhibition of topoisomerase from *Pneumocystis carinii* compared with that of topoisomerase from mammalian cells. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 38, n 9, p. 1890-1898, 1994.

EDWARDS, K. J.; JENKINS, T. C.; NEIDLE, S. Crystal structure of a pentamidine-oligonucleotide complex: implications for DNA-binding properties. **Biochemistry**, v. 31, p. 7104-7109, 1992.

EL HAJJ, T. O.; MASROUA, A.; MARTIN, J. C.; DESCOTES, G. Synthèse le l'hydroxyméthyl-5-furanne carboxaldéhyde-2 et de ses dérivés par traitement acide de sucres sur résines échangeuses d'ions. **Bulletin de la société chimique de France**, v. 5, p. 855-860, 1987.

ESPINEL-INGROFF, A. Development of colorimetric microtiter plate assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 954-957, 2001.

EVANS, D. A.; NEIDLE, S. Virtual screening to DNA minor groove binders. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 4232-4238, 2006.

FAUCI, A.S. Emerging infectious diseases: a clear and present danger to humanity. **Journal of the American Medical Association**, v. 292, p. 1887-1888, 2004.

FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. Plantas medicinais utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, p. 370-394, 2006.

FERREIRA, M.M. C.; MONTANARI, C. A.; GÁUDIO, A. C.; Seleção de variáveis em QSAR. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 439- 448, 2002.

FERREIRA, M. C. G. M. Estudo da transição entrópica do DNA Induzida por intercalantes utilizando a técnica de pinçamento óptico e espectroscopia de autocorrelação de intensidades. Dissertação de Mestrado Universidade Federal de Minas Gerais, Setembro de 2007.

FRANCESCONI, I.; WILSON, W. D.; TANIOUS, F. A.; HALL, J. E.; BENDER, B. C.; TIDWELL, R. R.; McCURDY ; BOYKIN, D. W. 2, 4 Diphenyl furan diamines as novel anti-*Pneumocystis carinii* pneumonia agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 2260-2265, 1999.

FRADERA, X.; MESTRES, J. Guided Docking Approaches to Structure-Based Design and Screening Current. **Topics in Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 7, p. 687-700, 2004.

GARCIA, E. F. Triagem para atividade antitumoral de extratos de espécies vegetais das famílias Annonaceae, Combretaceae, Apocynaceae e isolamento biomonitorado de acetogeninas tetra-hidrofurânicas de *Annona coriacea* Mart., Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de farmácia, 2000.

GARIGIPATI, R. S. An efficient conversion of nitriles to amidines. **Tetrahedron Letters**, v. 31, n. 14, p. 1969-1972, 1990.

GASTEIGER, J. The central role of chemoinformatics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 82, p. 200 – 209, 2006.

GAUDIO, A. C.; ZANDONADE, E. Proposição, validação e análise dos modelos que correlacionam estrutura química e atividade biológica. **Química Nova**, v. 24, n. 5, p. 658-671, 2001.

GHOSE, A. K.; HERBERTZ, T.; SALVINO, J. M.; MALLAMO, J. P. Knowledge based chemoinformatic approaches to drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 23/24, p. 1514-1519, 2006.

GOLBRAIKH, A.; BERNARD, P.; CHRETIEN, J. R. Validation of protein-based alignment in 3D quantitative structure–activity relationships with CoMFA models. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, p. 123-136, 2000.

GUADAGNINI, P. H. & BRUNS, R. E. Cargas atômicas em moléculas. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 148-155, 1996.

HALL, J. E.; KERRIGAN, J. E.; RAMACHANDRAN, K.; BENDER, B. C.; STANKO, J. P.; JONES, S. K.; PATRICK, D. A.; TIDWELL, R. R. Anti-*Pneumocystis* activities of aromatic diamidoxime pro-drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 666-674, 1998.

HALPERIN, I.; MA, B.; WOLFSON, H; NUSSINOV, R. Principles of docking: an overview of search algorithms and a guide to scoring functions. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, v. 47, p.409– 443, 2002.

HARBARTH, S.; SAMORE, M.H. Antimicrobial resistance determinants and future control. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 791- 793, 2005.

HILDEBRANDT, E.; BOYKIN, D. W.; KUMAR, A.; TIDWELL, R. R.; DYKSTRA, C. C. Identification and characterization of an endo/exonuclease in *Pneumocystis carinii* that is inhibited by dicationic diarylfurans with efficacy against *Pneumocystis* pneumonia. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 112-121, 1998.

HOBZA, P. KABELÁČ, M.; SPONER, J.; MEJZLIK, P.; VONDRASEK, J. Performance of empirical potentials (AMBER, CFF95, CVFF, CHARMM, OPLS, POLTEV), semi empirical quantum chemical methods (AM1, MNDO/M, PM3) and *ab initio* Hartree-Fock

method for interaction of DNA bases: comparison with nonempirical beyond Hartree-Fock results. **Journal of Computacional Chemistry**, v. 18, n. 9, p. 1136-1150, 1997.

HOPKINS, K. T.; WILSON, W. D.; BENDER, B. C.; MCMUDY, D.R.; HALL, J. E. TIDWELL, R. R.; KUMAR, A.; BAJIC, M. BOYKIN, D. W. Extended Aromatic Furan Amidino Derivatives as Anti-*Pneumocystis carinii* Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 3872-3878, 1998.

<http://benedick.rutgers.edu/software-manuals/discovermanual.pdf> acessado em agosto 2011.

<http://ndbserver.rutgers.edu/index.html>, acessado em maio 2005.

http://www.bioinformaticszen.com/wp-content/uploads/2007/07/first_pca_components.png acessado em julho 2005.

<http://www.ciencia.net/VerArticulo/Momento-de-Inercia?idArticulo=5137> acessado 18/12/2006

<http://xin.cz3.nus.edu.sg/group/ttd/ttd.asp> acessado em julho de 2005.

<http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/csd/> acessado em maio de 2005.

<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/medchem/ix.html#m1> acessado em Janeiro 2010.

http://www.cs.york.ac.uk/rts/docs/GECCO_2006/docs/p255.pdf - Genetic Programming for Human Oral Bioavailability of Drugs , acessado em janeiro 2010.

<http://www.drugbank.ca>, acessado em maio 2011.

<http://www.ebi.ac.uk/swissprot/> , acessado em maio 2005.

http://en.wikipedia.org/wiki/File:Linear_regression.png, acessado em maio de 2005.

<http://www.google.com.br/patents?hl=pt-BR&lr=&vid=USPAT5307287&id=9z4kAAAEBAJ&oi=fnd&dq=comfa> acessado em janeiro 2010.

<http://www.pharmgkb.org/>, acessado em junho de 2005.

https://www.projectrhea.org/rhea/index.php/Lecture_16_-_Parzen_Window_Method_and_K-nearest_Neighbor_Density_Estimate_Old_Kiwi acessado em Janeiro de 2010.

<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>, acessado em maio de 2005.

<http://www.ualg.pt/5cigpa/comunicacoes/RCFJanusa2003b.doc> acessado em dezembro de 2009.

JENKINS, T.; LANE, A. N.; NEEDLE, S.; BROWN, D. G. NMR and molecular modeling studies of interaction of berenil and pentamidine with d(CGCAAATTTGCG)₂. **European Journal of Biochemistry**, v. 213, n. 3, p. 1175-1184, 1993.

- JENSEN, F.; Introduction to computational chemistry, John Wiley & Sons, England, 1999.
- JONES, K.E.; PATEL, N.G.; LEVY, M.A. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, p. 990-994, 2008.
- JONSDOTTIR, S. O.; JORGENSEN, F. S.; BRUNAK, S. Prediction methods and databases within chemoinformatics emphasis on drugs and drug candidates. **Bioinformatics**, v. 21, p. 2145-2160, 2005.
- JOSÉ, A. M. Estudo de ancoragem automática de amidinas e flavonóides com serino-proteases: variabilidade conformacional do receptor e validação experimental. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007
- JUDKINS, B. D.; ALLEN, D. G.; COOK, T. A.; EVANS, B.; SARDHARWALA, T. E. A versatile synthesis of amidinas from nitriles via amidoximes. **Synthetic Communications**, v. 26, n 23, p. 4351-4367, 1996.
- KELLENBERGER, E.; RODRIGO, PASCAL MULLER, J. P.; ROGNAN, D. Comparative Evaluation of Eight Docking Tools for Docking and Virtual Screening Accuracy. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 57, p. 225–242, 2004.
- 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**, v. 3; p. 935-949, 2004.
- KLEBE, G. Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 13/14, p. 580-594, 2006.
- KNEGTEL, R. M.A, WAGENER M. Efficacy and selectivity in flexible database docking. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 37, n 3, p. 334-345, 1999.
- KOFOD, H. Organic Syntheses, coll vol. 4, p. 491, 1963.
- KONTOYIANNI, M.; MCCLELLAN, L. M.; SOKOL, G. S. Evaluation of Docking Performance: Comparative Data on Docking Algorithms. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 558-565, 2004.
- KOSHLAND, D. E. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 44, p. 98-104, 1958.
- KOSLAND, D. E. The key lock theory and the induced fit theory. **Angewandte Chemie International**, v. 33, p. 2375-2378, 1994.
- KROEMER, R.T.; HECHT, P.; LIEDL, K.R.; Different electrostatic descriptors in comparative molecular field analysis: A comparison of molecular electrostatic and coulomb potentials. **Journal of Computational Chemistry**, v. 17, n. 11, p.1296-1308, 1996.
- KUBINYI, H.; The Regression Analysis: Program BILIN, 2005; disponível em <http://www.kubinyi.de/bilin-program.html>, acessado em junho de 2009.

KUMAR, A.; BOYKIN, D.; WILSON, W. D.; JONES, S. K.; BENDER, B. K.; DYKSTRA, C. C., TIDWELL, R. R. Anti-*Pneumocystis carinii* pneumonia activity of dicationic 2,4-diarilprimidines. **European Medicinal Chemistry**, v. 31, p. 767-773, 1996.

LEACH, A. R. Molecular modelling principles and applications. New York: Pearson Education, 2001.

LEVINGSTON, D.; Data Analysis for Chemistry: Applications to QSAR and Chemical Product Design, Oxford University Press, New York 1995.

LIMA, L. Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1456-1468, 2007.

LOMBARDINO, J. G.; LOWE III, J. A. The role of the medicinal chemist in drug discovery-then and now. **Nature Reviews**, v. 3, p.853-862, 2004.

LOMBARDY, R. L.; TANIOUS, F.A.; RAMACHANDREW, R.; TIDWELL, R. R.; WILSON, W. W. Synthesis and DNA interactions of benzimidazole dications which have activity against opportunistic infections. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 34, p. 1452-1462, 1996.

MacroModel v. 5.5, Department of chemistry, Columbia University, New York, NY, 10027.

MARCH, J. Advanced organic chemistry. 3^oed, New York: John Wiley & Sons, 1985

MARQUES, M. B.; Doenças infecciosas emergentes no reino da complexidade: implicações para as políticas científicas e tecnológicas. **Caderno de Saúde Pública**, v. 11, p. 361-371, 1995.

McGOWAN, J.E.; TENOVER, F.C. Confronting bacterial resistance in healthcare settings: a crucial role for microbiologists. **Nature Review Microbiology**, v. 2, p. 251-253, 2004.

MIAO Y.; LEE, P. H.; PARKINSON, G. N.; BATISTA-PARRA, A.; ISMAIL, M. A.; NEIDLE, S.; BOYKIN, D. W.; WILSON, W. D. Out-of-shape DNA minor groove binders: induced fit interactions of heterocyclic dications with the DNA minor groove. **Biochemistry**, v. 44, p. 14701-14708, 2005.

Microcal software, Inc- Microcal Origin versão 6.0. 1991-1999.

MONTANARI, C. A; CASS, Q. B.; TIRITAN, M. E.; SOUZA, A. L. S. S.; A QSERR study on enantioselective separation of enantiomeric sulphoxides. **Analytica Chimica Acta**, v. 419, n. 1, p. 93-100, 2000.

MONTANARI, C. A.; TRENT, J. O.; JENKINS, T. C. Molecular recognition of B-DNA Minor groove binders: the rigid analogue approach to synthesize antileishmaniasis compounds. A molecular modeling study. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 2, p. 175-180, 1998.

MONTANARI, C. A; TUTE, M. S.; BEEZER, A. E.; MITCHELL, J. C. Determination of receptor-bound drug conformations by QSAR using flexible fitting to derive a molecular similarity index. **Journal of Computer Aided Molecular Design**, v. 10, p. 67-73, 1996.

MOPAC v. 7.0. University of Indiana, Bloomington, IN 47405.

MOSS, R. A.; MA, W.; MERRER, D. C.; XUE, S. Conversion of obstinate nitriles to amidines by Garipati's reaction. **Tetrahedron Letters**, v. 36, n. 48, p. 8761-8764, 1995.

MUEGGE, I., OLOFF, S.; Advances in virtual screening. **Drug discovery today: technologies**, v. 3, p. 405-411, 2006.

NAMBA, A. M.; SILVA, V. B.; SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: teoria e aplicação em planejamento de fármacos. **Eclética Química**, v. 33, n. 4, p. 13-24, 2008.

NEIDLE, S. DNA minor groove recognition by small molecules. **Natural Product Reports**, v. 18, p. 291-309, 2001.

NELSON, D. L., COX, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry. Hardcover, 4th Edition, 2004.

NGUYEN, B.; HAMELBERG, D.; BAILLY, C.; PIERRE COLSON, P.; STANEK, J.; BRUN, R.; NEIDLE, S.; WILSON, W. D. Characterization of a Novel DNA Minor-Groove Complex. **Biophys of Journal**, n. 86, v.2, p. 1028-1041, 2004.

NOGRADY, T.; WEAVER, D. F. Medicinal chemistry: a molecular and biochemical approach. New York: Oxford University Press, 3^o ed, 2005, 649p.

NOGUEIRA, L. J. Síntese, avaliação da atividade antifúngica e determinação do log P de precursores dendriméricos. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, 2006.

NOGUEIRA, L. J., MONTANARI, C. A., DONNICI, C. L. Histórico da evolução da química medicinal e a importância da lipofilia: de Hipócrates e Galeno a Paracelsus e as contribuições de Overton e de Hansch. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, 2009. INSS 1984-6835

OLIVEIRA, A.M.; CUSTÓDIO, F. B.; DONICCI, C. L.; MONTANARI, C. A. QSAR and modeling studies on B-DNA recognition of minor groove binders. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, p. 141-145, 2003.

O'NEIL, M. J. (ed). The MERCK index. 14 ed. MERCK & Co, 2006.

PATAI, S.; RAPPOPORT, Z. (Edit) The chemistry of amidines and imidates, vol 2, John Wiley & Sons, 1991.

PATRICK, G. H. An introduction to Medicinal Chemistry. 3^o ed. New York: Oxford University press, 2005.

PERFECT, J. R.; MARR, K. A.; WALSH, T. J.; GREENBERG, R. N.; DUPONT, B.; TORRE-CISNEROS, J.; JUST-NUBLING, G.; SCHLAMM, H. T.; LUTSAR, I.; ESPINEL-INGROFF, A.; JOHNSON, E. Voriconazole treatment for less-common, emerging, or refractory fungal infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, p. 1122-1131, 2003.

PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W.L.F.; PERRIN, D.R. Purification of Laboratory Chemicals, 2^o ed., Pergamon Press Ltd., 1980.

PHOTIS, J. M.; PAQUETE, L. A. Organic synthesis, v. 6, 1988, 482-488.

RAHA K.; PETERS, M. B.; WANG, B.; YU, N.; WOLLACOTT, A. M.; WESTWEHOFF, L. M.; MEWRS JR, K. M. The role of quantum mechanics in structure-based drug design. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 17/18, p. 725-731, 2007.

RATHI, S. G. SUTHAR, M., PATEL, P.; BHASKAR, V. H.; RAJGOR, N. B. *In vitro* cytotoxicity screening of *Glycyrrhiza glabra* L. (Fabaceae). A natural anticancer Drug. **Journal Young Pharmacy**, n. 14, p. 239-243, 2010.

ROCHA, R. K. Estudo da energia de ligação de novos derivados do berenil com o DNA por modelagem molecular usando o campo de força AMBER. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Exatas, 1998.

RUPING, M.J.G.T.; VEHRESCHILD, J.J.; CORNELLY, O. A.; Patients at high risk of invasive fungal infections when and how to treat. **Drugs**, v. 68, p. 1941-1962, 2008.

SANT'ANNA, C. M. R. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações da IUPAC). **Química Nova**, Vol. 25, No. 3, p. 505-512, 2002.

SANTOS, M. S.; BERNARDINO, A. M. R.; SOUZA, M. C. Principais métodos de síntese de amidinas. **Química Nova**, Vol. 29, No. 6, p. 1301-1306, 2006.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A. M. F.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; GIANINNI, M. J. S.; The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 391-397, 2007.

SILVA, L. L. Estudo da síntese e da interação de precursores dendriméricos com DNA e avaliação da atividade antifúngica. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, 2005.

SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. et al. (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC. 2004.

SUNDRIYAL, S.; SHARMA, R.K.; JAIN, R. Current advances in antifungal targets and drug development. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 11, p. 1321-1335, 2006.

SYBYL 6.7 ed, SYBYL molecular modeling software, Tripos Associates Ltd.: St Louis, 2000

TESTA, B. Structure? Activity? Relationships? Challenges and context. **Pharmaceutics News**, v. 7, n. 1, p. 13-22, 2000.

THOMA, J. A.; KOSHLAND, D. E. Competitive inhibition by substrate during enzyme action evidence for the induced fit theory. **Journal of the American Chemical Society**, v. 82, p. 3329-3333, 1960.

TIMKO, J. M.; MOORE, S.; WALBA, D. M.; HIBERTY, P. C.; CRAM, D. J. Host-guest complexation. 2. Structural units that control association constants between polyethers and tert-butylammonium salts. **Journal the American Chemical Society**. v. 99, n. 13, p. 4207-4219, 1977.

TRENT, J.O.; CLARK, G. R.; KUMAR, A.; WILSON, W. D.; BOYKIN, D. W.; HALL, J. E.; TIDWELL, R. R.; BLAGBURN, B. L.; NEIDLE, S. Targeting the minor groove of DNA: crystal structures of two complexes between furan derivatives of berenil and DNA

dodecamer B(CGCGAATTCGCG)2. **Journal Medicinal Chemistry**, v. 39, p. 4554-4562, 1996.

Tsar 3.21, Reference Guide, Oxford Molecular Limited, Accelrys, 2000.

UNGER, S. H.; HANSCH, C.; On model building in structure-activity relationships. A reexamination of adrenergic blocking activity of β -halo- β -arylalkylamines. **Journal Medicinal Chemistry**. V. 16, p. 745-749, 1973.

VERLI, H.; BARREIRO, E. J. Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 95-102, 2005.

WANG, H.; LAUGTON, C. A. Molecular modeling methods for prediction of sequence selectivity in DNA recognition. **Methods**, v. 42, p. 196-203, 2007.

WALTER, M. E. Planejamento Racional de Imidas Cíclicas e Sulfonamidas com Atividade Antinociceptiva. Tese de doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

WARREN, G. L.; ANDREWS, C. W.; CAPELLI, A.M.; CLARKE, B.; LaLONDE, J.; LAMBERT, M. H.; LINDVALL, M.; NEVINS, N.; SEMUS, S. F.; SENGER, S.; TEDESCO, G.; WALL, I. D.; WOOLVEN, J. M.; PEISHOFF, E.; HEAD, M. A critical assessment of docking programs and scoring functions. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 5912-5931, 2006.

WATERBEEMD, H. van de; Advanced Computer Assisted Techniques in Drugs Discovery: Methods and principles in medicinal chemistry, vol. 3, Weinheim, VCH 1995.

WEINER, S. J.; KOLMAN, P. A.; CARE, D. A.; SINGH, V. C.; GHIO, C.; ALAGON, G.; PROFETA, S.; WEINER, P. Hydrogen bonding and biological specificity analysed by protein engineering. **Journal of the American Chemical Society**, v. 106, p. 765-784, 1984.

WEAST, R. C. Handbook of chemistry and physics. 65th ed. CRC press, 1984.

WILSON, W. D.; TANIOUS, F. A.; MATHIS, A.; TEVIS, D.; HALL, J. E.; BOYKIN, D. W.; Antiparasitic compounds that target DNA. **Biochimie**, n. 90, p. 999-1014, 2008.

WISHART, D. S. Bioinformatics in drug development and assessment. **Drug Metabolism Reviews**, v. 2, p. 279-308, 2005.

XU, J.; HAGLER, A. Chemoinformatics and drug discovery. **Molecules**, v. 7, p. 566-600, 2002.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. (org), Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. Itajaí, 1^o edição. Editora Univali, 303p, 2007.

ZHOU T.; HUANG, D.; CAFLISCH, A. Is quantum mechanics necessary for predicting binding free energy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 4280-4288, 2008.

Procedimento 1 Mecânica molecular, DNA flexível, utilizando programa MacroModel 5.5

```
/usr2/user2/vera/novo.mdb/teste-2.dat
/usr2/user2/vera/novo.mdb/teste-2.out
MMOD      0  1
CHGF      0  0  0  0  0.0000  0.0000  0.0000  0.0000
FFLD      3  0  0  0  4.0000  0.0000  0.0000  0.0000
READ
MINI      0  1  500  0  0.0000  0.0000  0.0000  0.0000
MINI      1  0  2000  0  0.0000  0.0000  0.0000  0.0000
EXNB      0  0  0  0  0.0000  0.0000  0.0000  0.0000
MINI      1  0  2000  0  0.0000  0.0000  0.0000  0.0000
```

Procedimento 2- Dinâmica molecular, DNA flexível utilizando programa MacroModel 5.5

```
/usr2/user2/vera/novo.mdb/ teste-3.dat
/usr2/user2/vera/novo.mdb/ teste-3.out
MMOD      0  1
CHGF      0  0  0  0  0.0000  0.0000  0.0000  0.0000
FFLD      3  2  0  0  4.0000  0.0000  0.0000  0.0000
READ
MDIT      0  0  0  0  300.0000  0.0000  0.0000  0.0000
MDAV      1
MDSA     100  0  0  0  0.0000  0.0000  0.0000  0.0000
MDYN      0  2  0  0  1.5000  20.0000  300.0000  0.0000
WRIT
```

Procedimento 3- Mecânica molecular , utilizando DNA flexível utilizando programa MacroModel 5.5

```
/usr2/user2/vera/novo.mdb/teste-4.dat
/usr2/user2/vera/novo.mdb/teste-4.out
MMOD      0  1
CHGF      0  0  0  0  0.0000  0.0000  0.0000  0.0000
FFLD      3  2  0  0  4.0000  0.0000  0.0000  0.0000
READ
ELST     - 1  0  0  0  0.0000  0.0000  0.0000  0.0000
MINI      1  0  2000  0  0.0000  0.0000  0.0000  0.0000
```

Procedimento 4- Cálculo da energias do DNA e molécula isolada, utilizando programa MacroModel 5.5

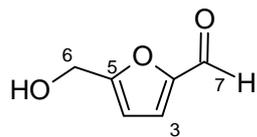
```
/usr2/user2/vera/novo.mdb/teste-6.dat
/usr2/user2/vera/novo.mdb/teste-6.out
MMOD      0  1
CHGF      0  0  0  0  0.0000  0.0000  0.0000  0.0000
FFLD      3  2  0  0  4.0000  0.0000  0.0000  0.0000
```

```
READ
ELST  -1  0  0  0  0.0000  0.0000  0.0000  0.0000
ELST  -1  0  0  0  0.0000  0.0000  0.0000  0.0000
```

Método II

Procedimento 6- Dinâmica molecular, DNA2 flexível utilizando programa MacroModel 5.5

```
/usr2/user2/vera/dodecamero.mdb/mol15-03.dat
/usr2/user2/vera/dodecamero.mdb/mol15-03.out
MMOD  0  1
CHGF  0  0  0  0  0.0000  0.0000  0.0000  0.0000
FFLD  3  2  0  0  4.0000  0.0000  0.0000  0.0000
READ
MDIT  0  0  0  0  300.0000  0.0000  0.0000  0.0000
MDFT  0  0  0  0  300.0000  0.0000  0.0000  0.0000
MDYN  0  0  0  0  1.5000  100.0000  0.0000  0.0000
MDIT  0  0  0  0  300.0000  0.0000  0.0000  0.0000
MDFT  0  0  0  0  300.0000  0.0000  0.0000  0.0000
MDYN  0  0  0  0  1.5000  300.0000  0.0000  0.0000
MDIT  0  0  0  0  300.0000  0.0000  0.0000  0.0000
MDFT  0  0  0  0  300.0000  0.0000  0.0000  0.0000
MDSA  100  0  0  0  0.0000  0.0000  0.0000  0.0000
MDYN  0  1  0  0  1.5000  500.0000  0.0000  0.0000
WRIT
BGIN
READ
MINI  0  1  500  0  0.0000  0.0000  0.0000  0.0000
MINI  1  0  2000  0  0.0000  0.0000  0.0000  0.0000
MINI  1  0  2000  0  0.0000  0.0000  0.0000  0.0000
MINI  1  0  2000  0  0.0000  0.0000  0.0000  0.0000
END
```



Composto 1
5-hidroximetil-2-carbaldeido-furano
Faixa de fusão 32-34°C
Massa molecular 126,11 g/mol
Fórmula molecular C₆H₆O₃

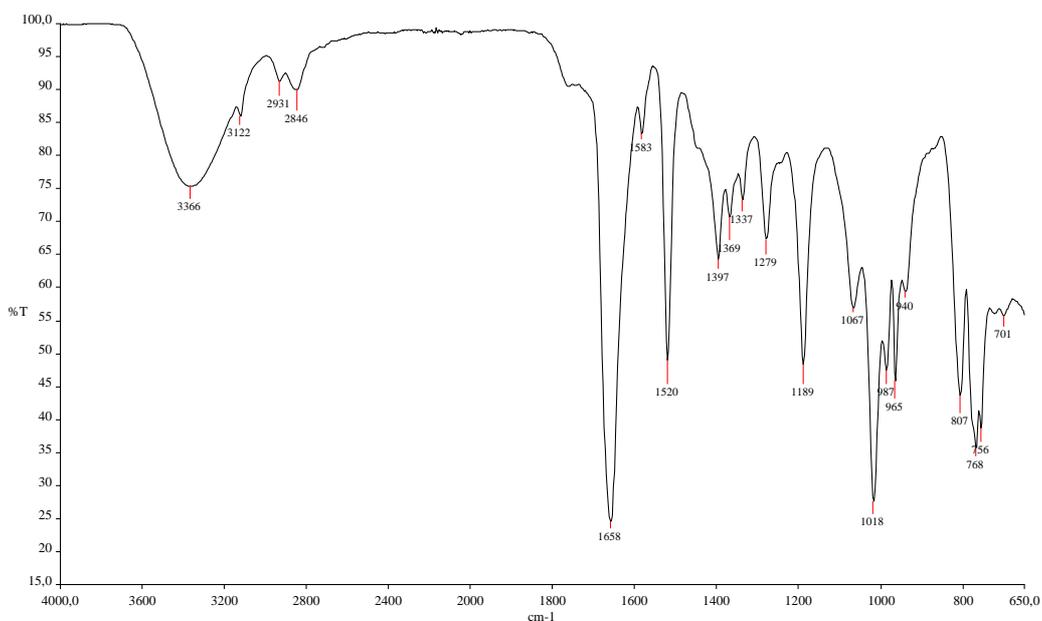


Figura A1 - Espectro na região do infravermelho (ν_{\max} , cm^{-1} , KBr) de **1**

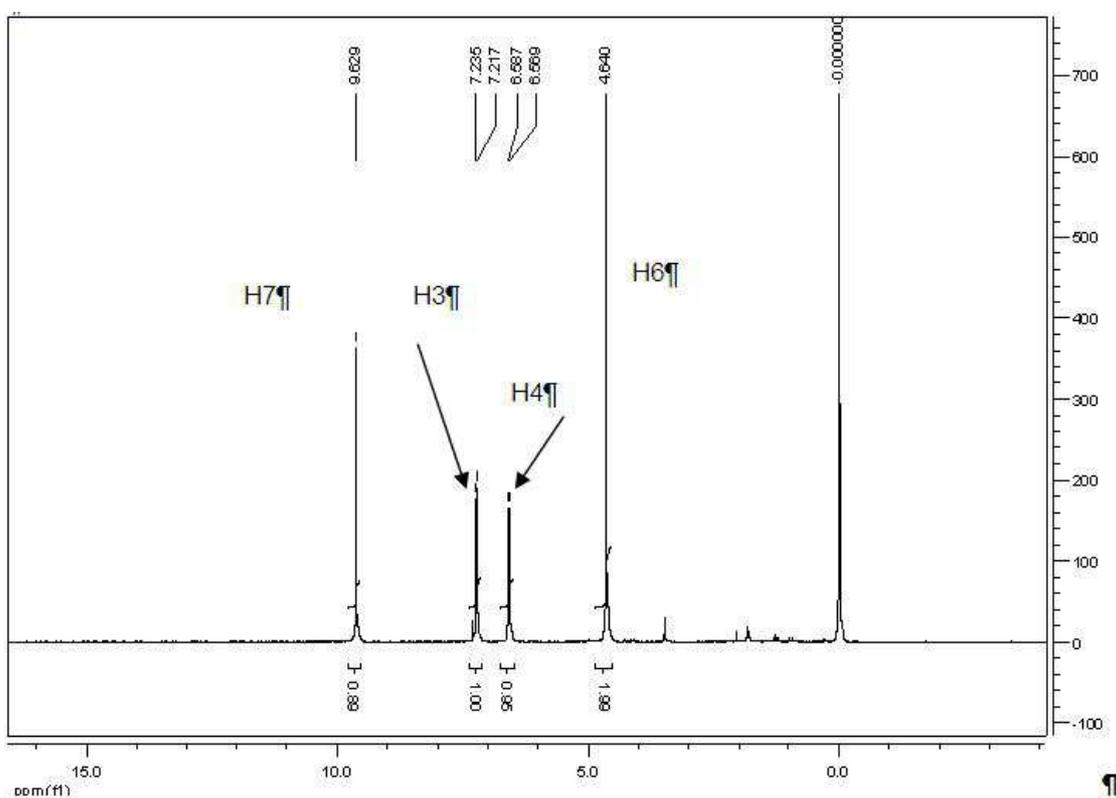


Figura A2- Espectro de RMN de ^1H (δ , 200 MHz, D₂O) de **1**

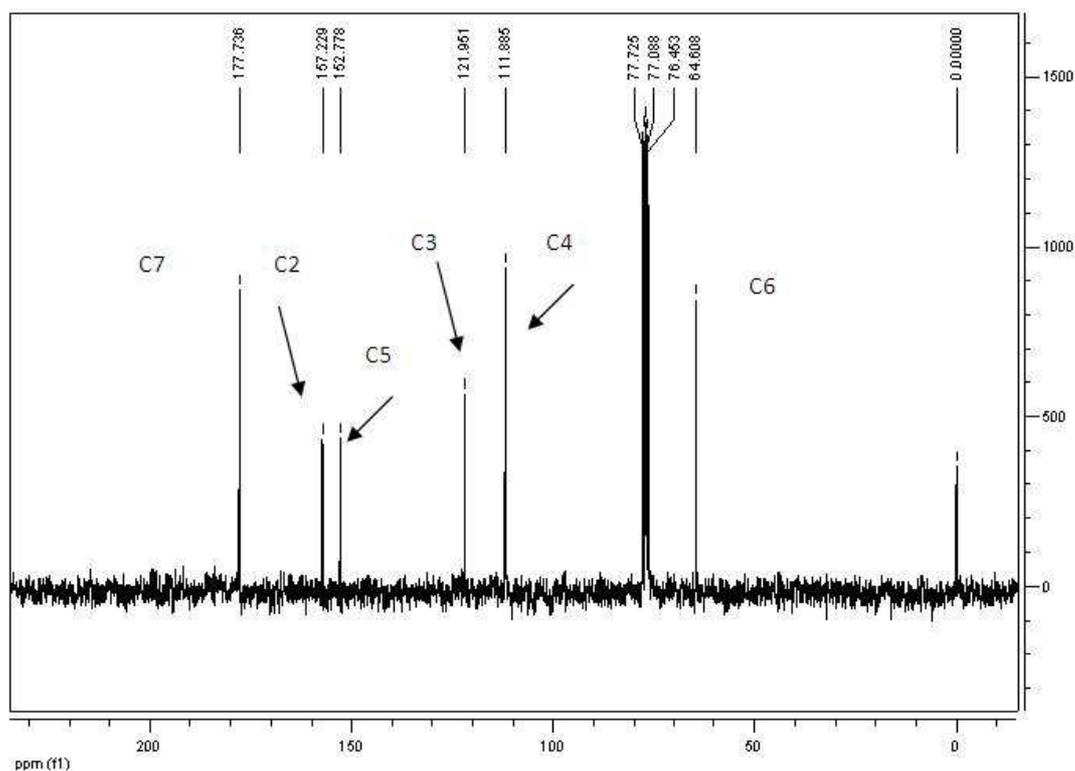


Figura A3- Espectro de RMN ^{13}C (δ , 50 MHz, D_2O) de 1

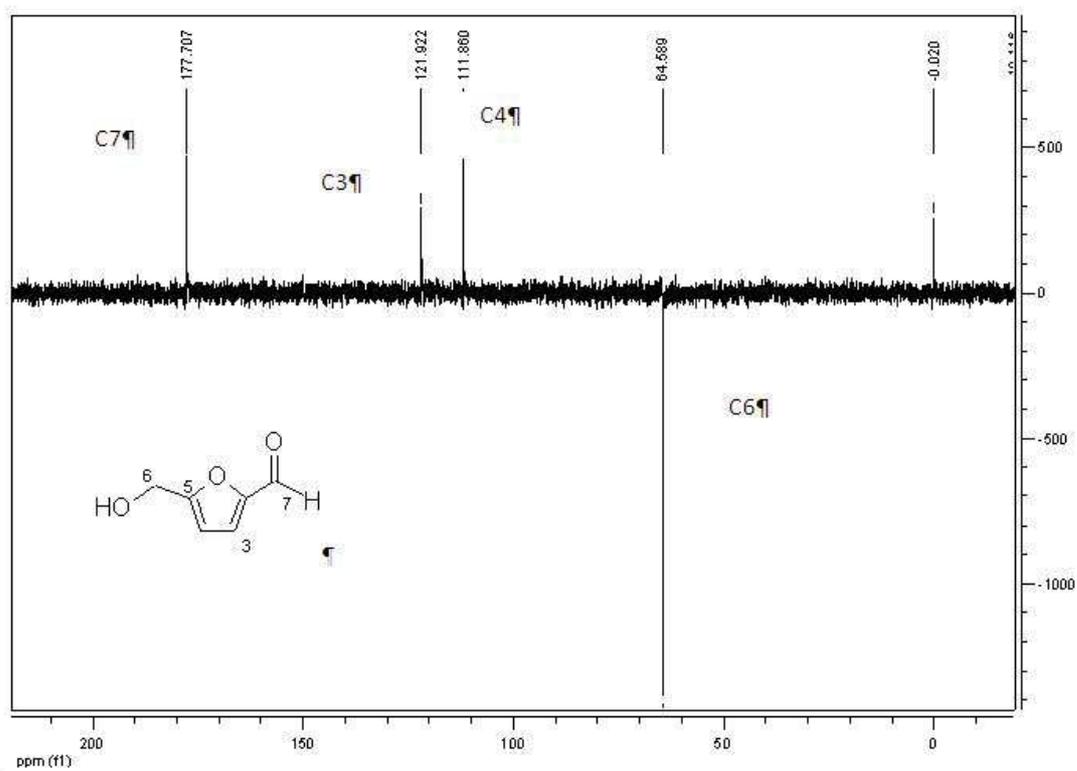
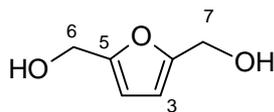


Figura A4- Subespectro de DEPT 135 (δ , 50 MHz, D_2O) de 1



Composto 2
2,5-di-(hidroximetil)furano
PF 59-61°C
Massa molecular 128,0 g/mol
Fórmula molecular C₆H₈O₃

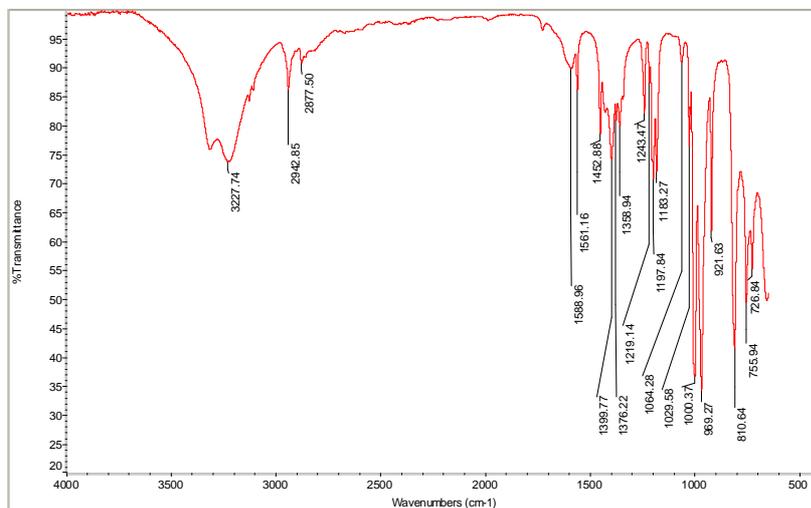


Figura A5- Espectro na região do infravermelho (ν_{\max} , cm^{-1} , ATR) de **2**

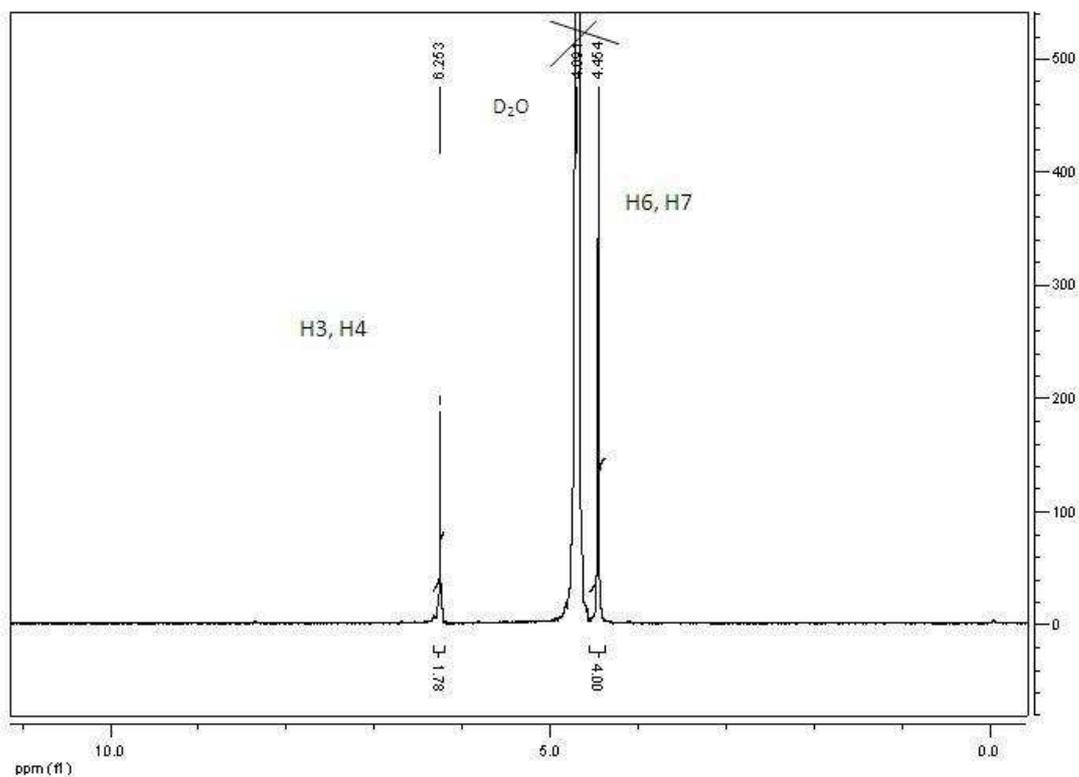


Figura A6- Espectro de RMN ¹H (δ , 200 MHz, D₂O) de **2**

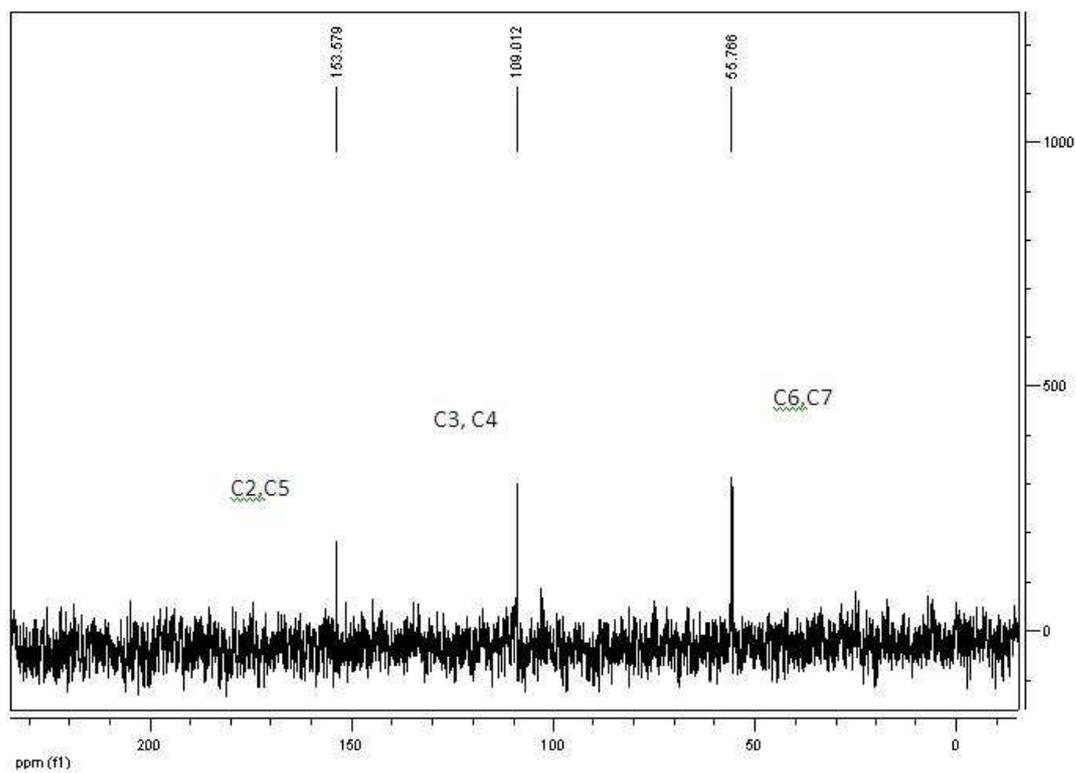


Figura A7- Espectro de RMN ^{13}C (δ , 50 MHz, D_2O) de **2**

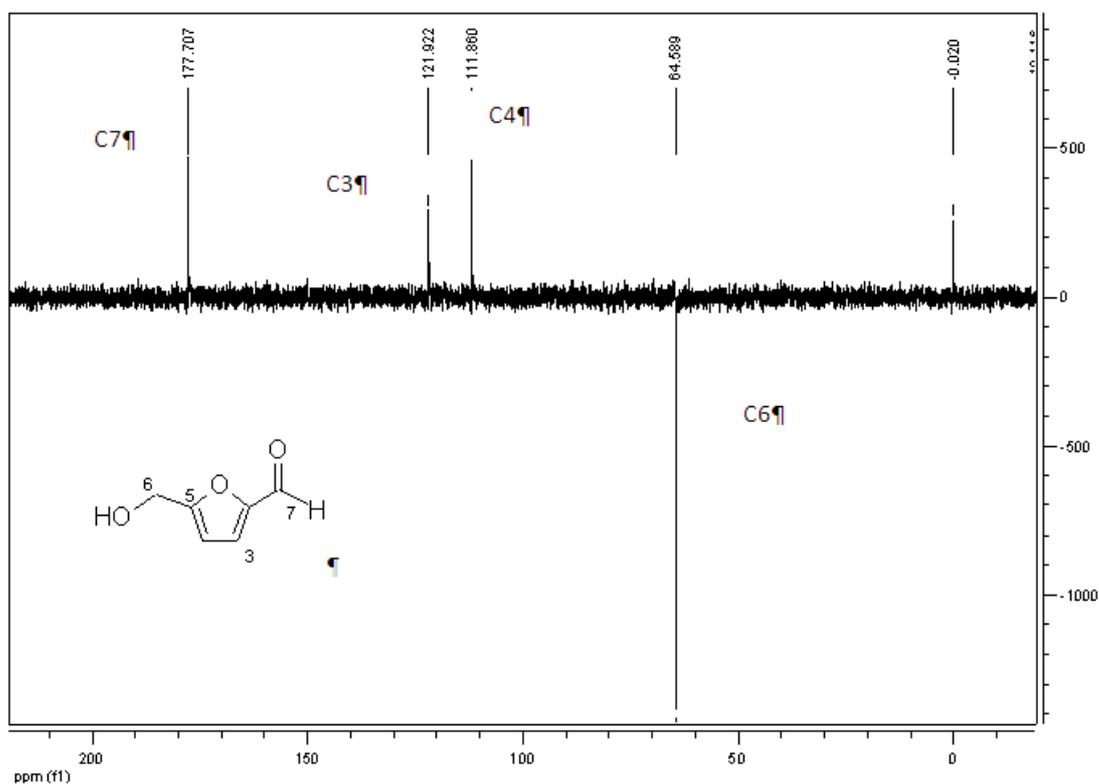
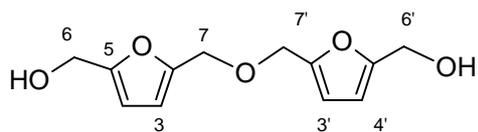


Figura A8- Subespectro de DEPT 135 (δ , 50 MHz, D_2O) de **2**



Composto 3
1,5-di[(5'-hidroximetil-2'-furano)il]3-oxapropano
PF 57-59°C
Massa molecular 238,0 g/mol
Fórmula molecular C₁₂H₁₄O₅

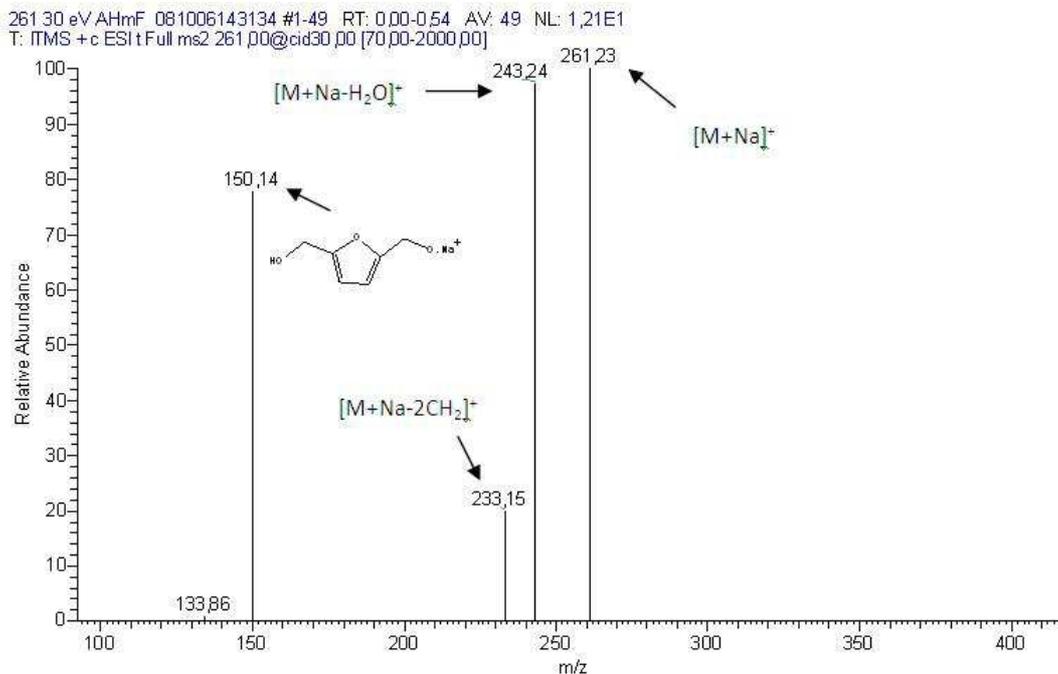


Figura A9- Espectro de ESI-MS (modo positivo) de 3

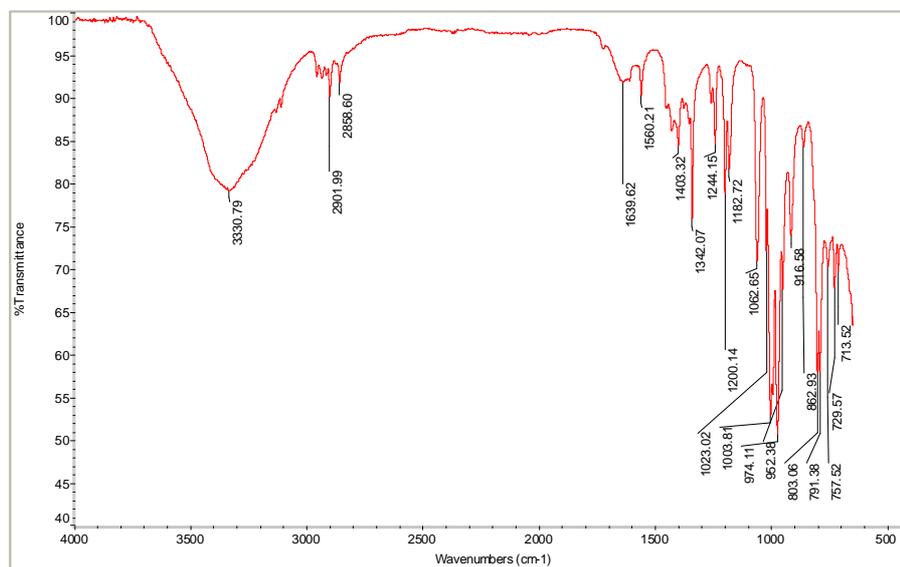


Figura A10- Espectro na região do infravermelho (ν_{\max} , cm⁻¹, ATR) de 3

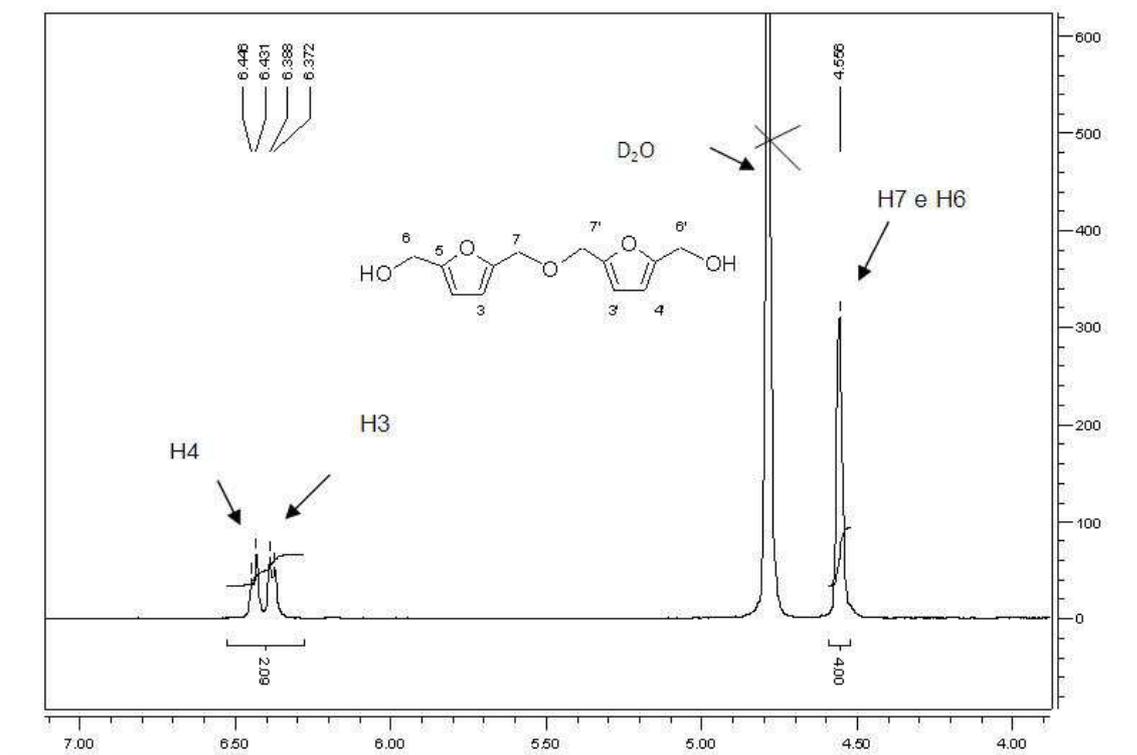


Figura A11- Espectro de RMN ¹H (δ, 200 MHz, D₂O) de 3

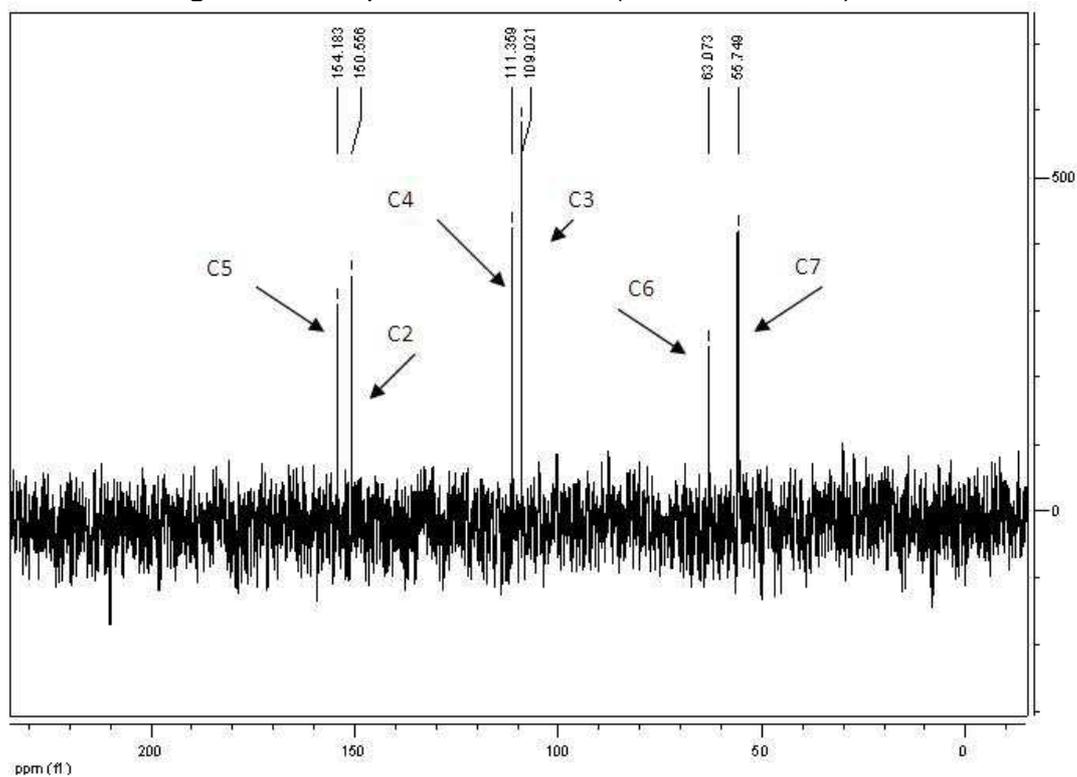


Figura A12- Espectro de RMN ¹³C (δ, 50 MHz, D₂O) de 3

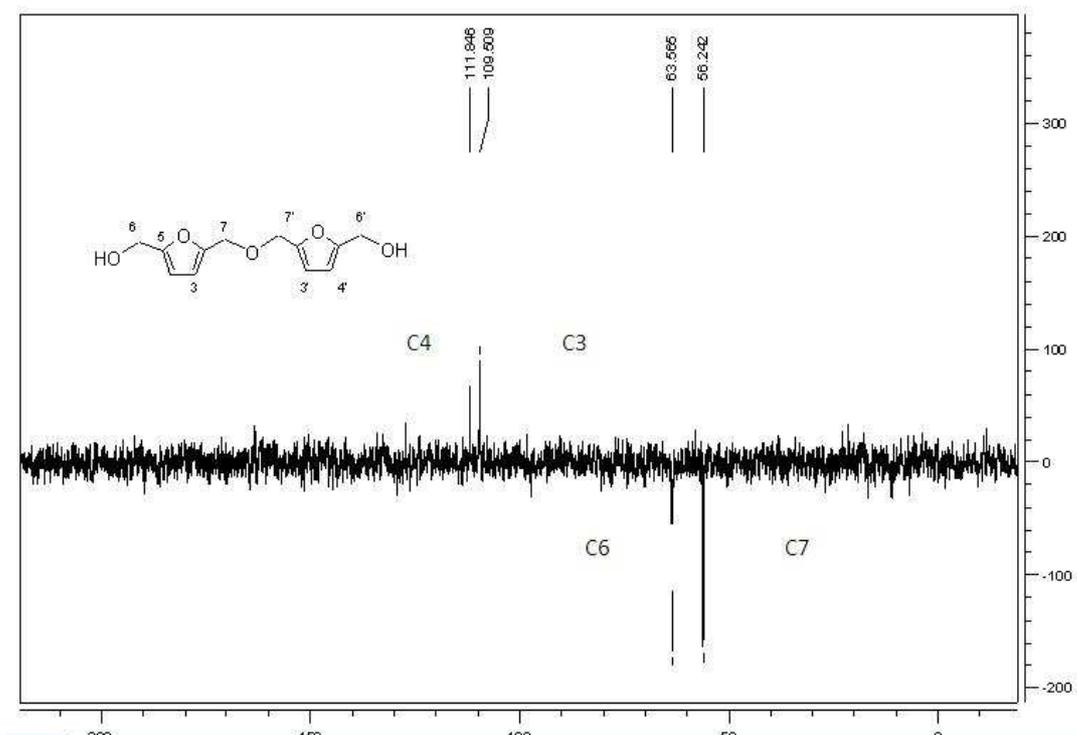
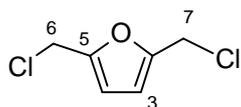


Figura A13- Subespectro de DEPT 135 (δ , 50 MHz, D₂O) de **3**



Composto 5
2,5-di-clorometil-furano
 Massa molecular 165,02 g/mol
 Fórmula molecular C₆H₆Cl₂O

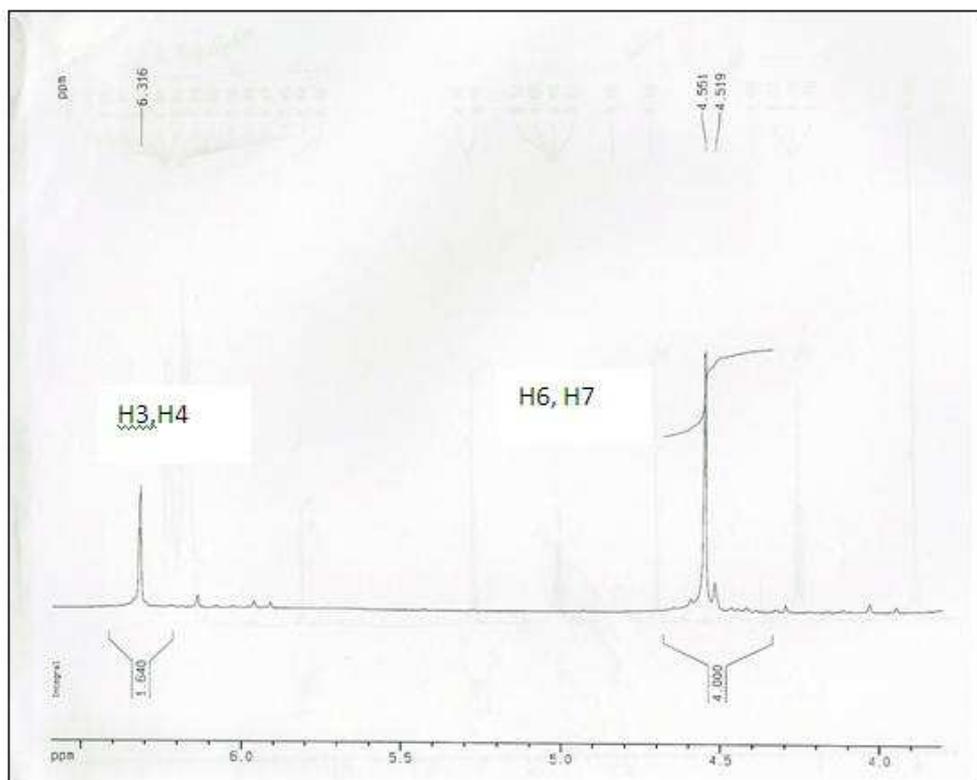
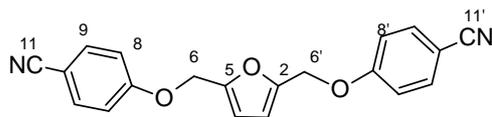


Figura A14- Espectro de RMN ¹H (δ , 200 MHz, CDCl₃) de **5**



Composto 7
2,5-bis[(4-cianofeniloxi)metil]furano
PF 150-153°C
Massa molecular 330,3 g/mol
Fórmula Molecular C₂₀H₁₄N₂O₃

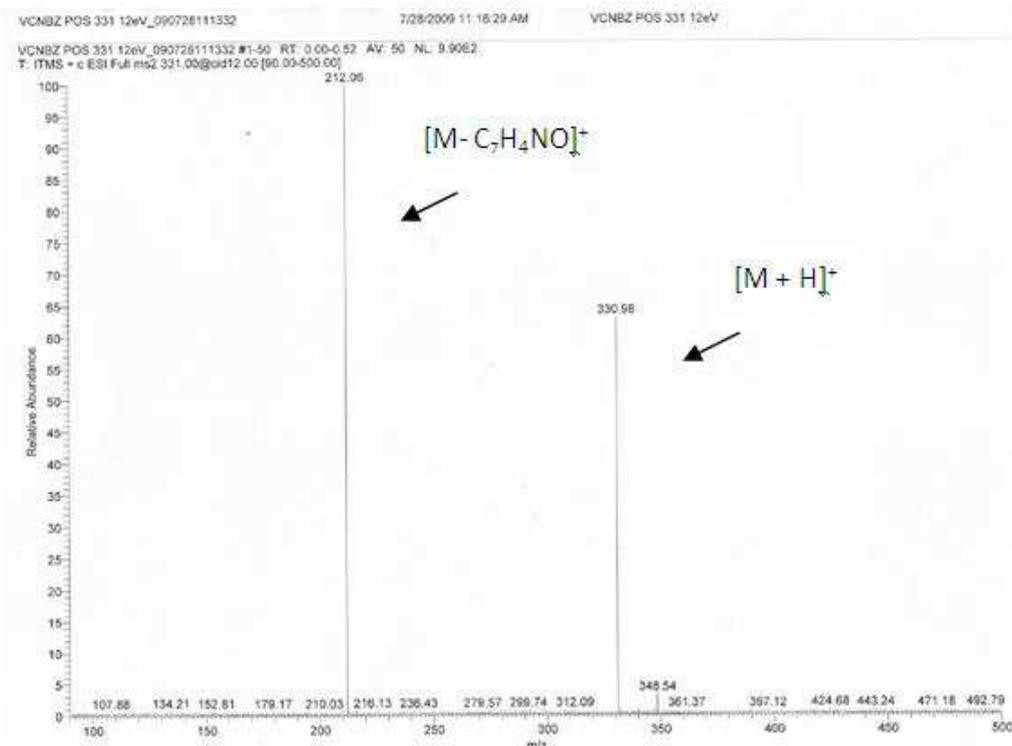


Figura A15- Espectro de ESI-MS (modo positivo) de 7

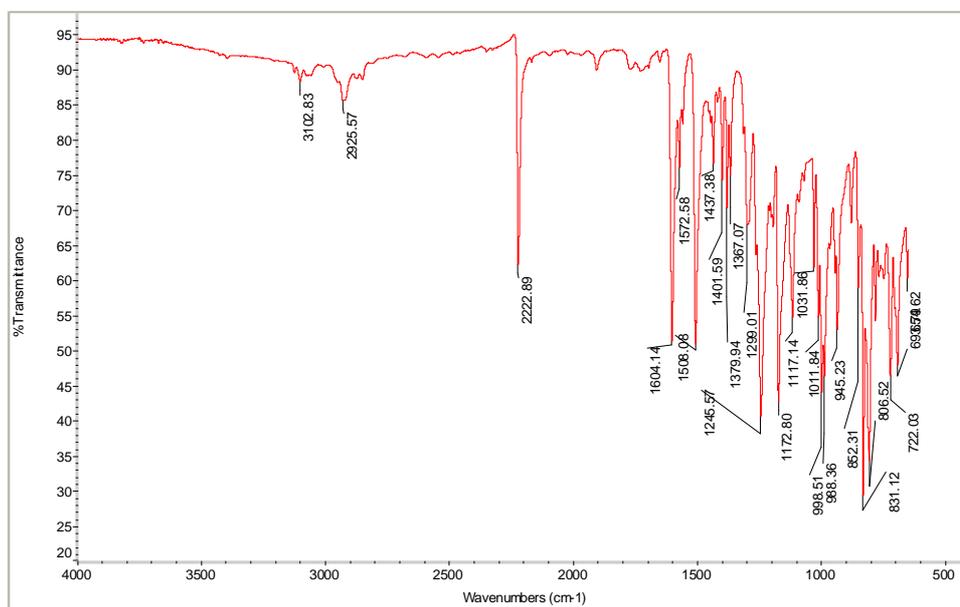


Figura A16 - Espectro na região do infravermelho (ν_{max} , cm^{-1} , ATR) de 7

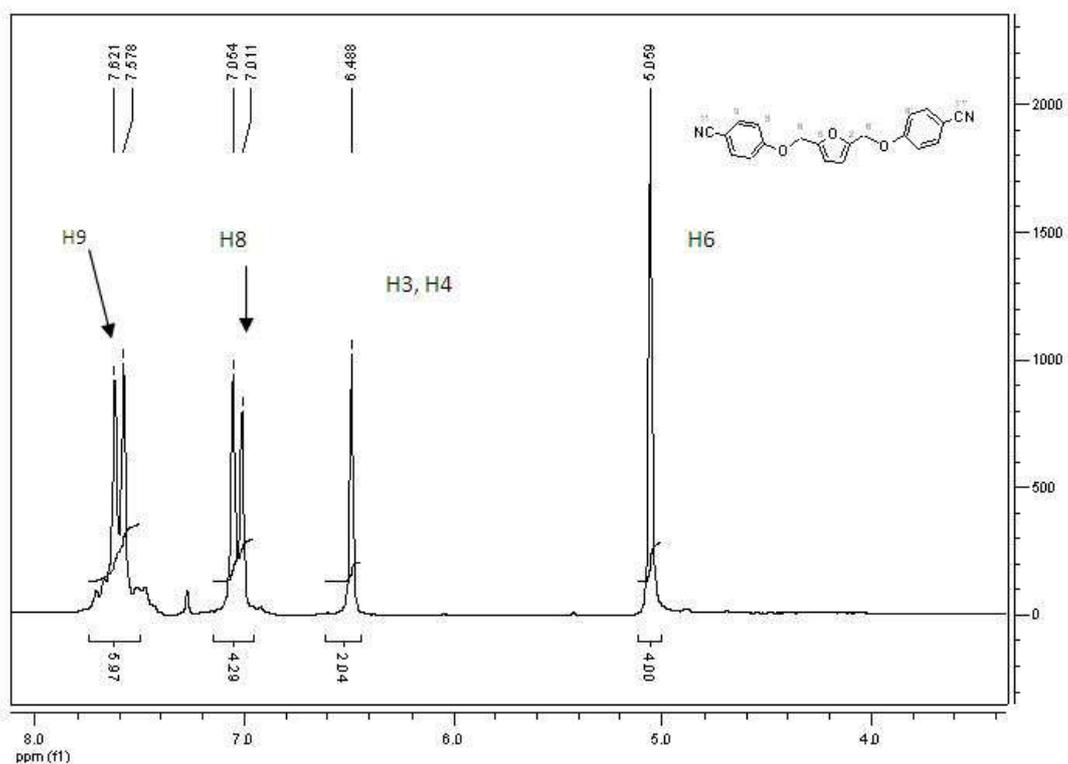


Figura A17- Espectro de RMN ^1H (δ , 200 MHz, CDCl_3) de 7

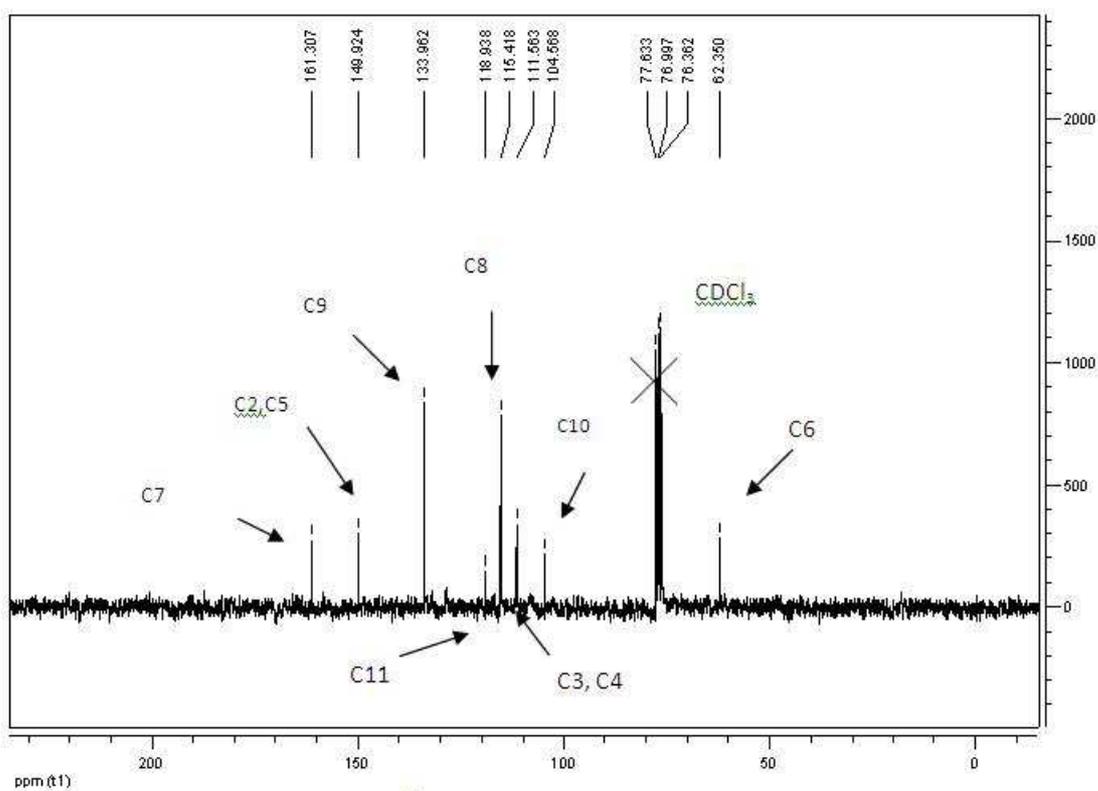
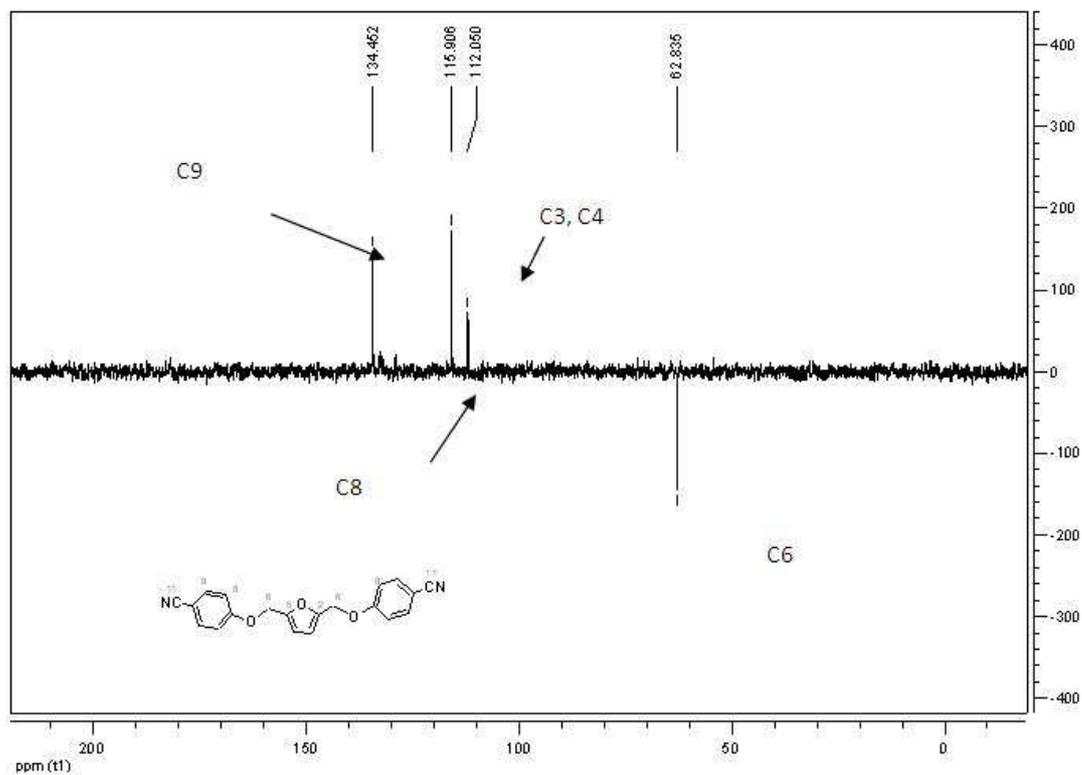
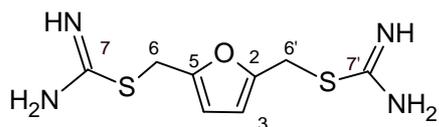


Figura A18- Espectro de RMN ^{13}C (δ , 50 MHz, CDCl_3) de 7





Composto Ia

Composto Ia

2,5-di[5-tioureido-metil]furano

Massa molecular 244,3 g/mol

Fórmula Molecular $C_8H_{12}N_4OS_2$

V4 TU POS VERA 100126171944 #1 RT: 0,00 AV: 1 NL: 7,34E2
T: ITMS + c ESI Full ms [50,00-1000,00]

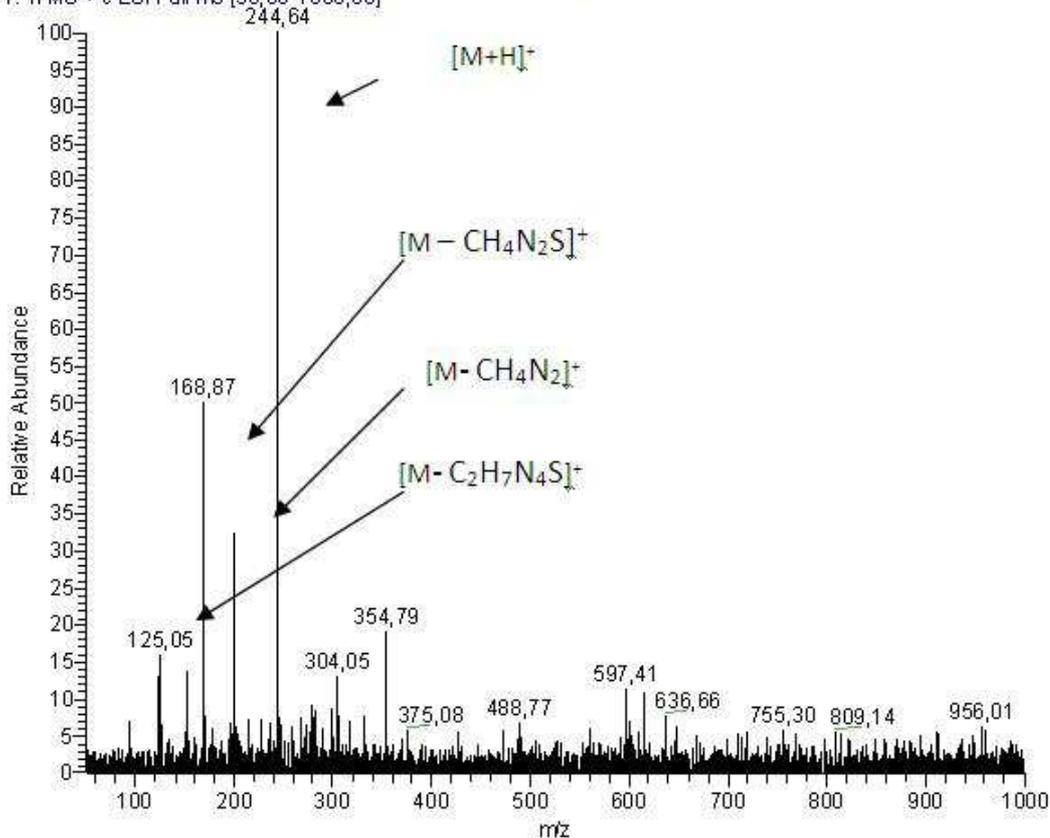
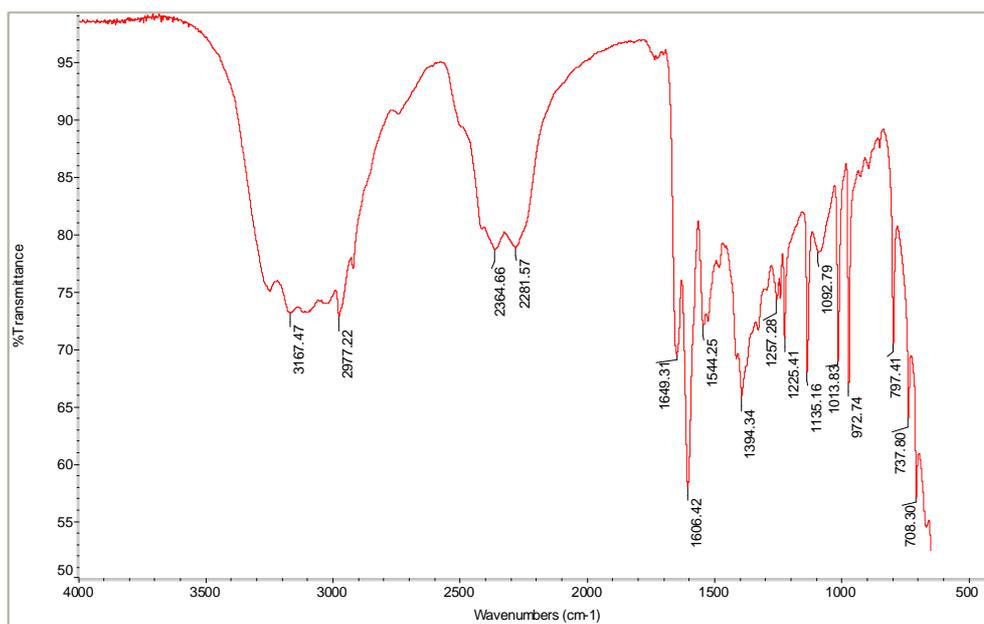


Figura A20- Espectro de ESI-MS (modo positivo) de Ia

Figura A21 -Espectro na região do infravermelho (ν_{max} , cm^{-1} , ATR) de Ia

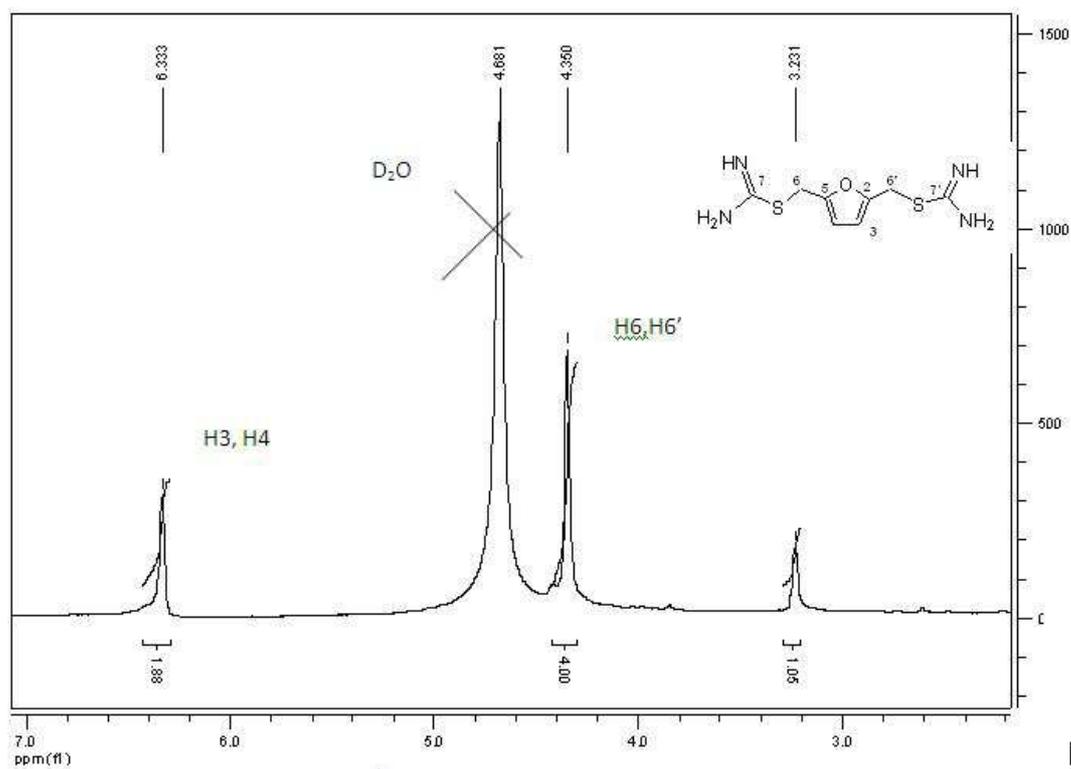


Figura A22- Espectro de RMN ^1H (δ , 200 MHz, D_2O) de **1a**

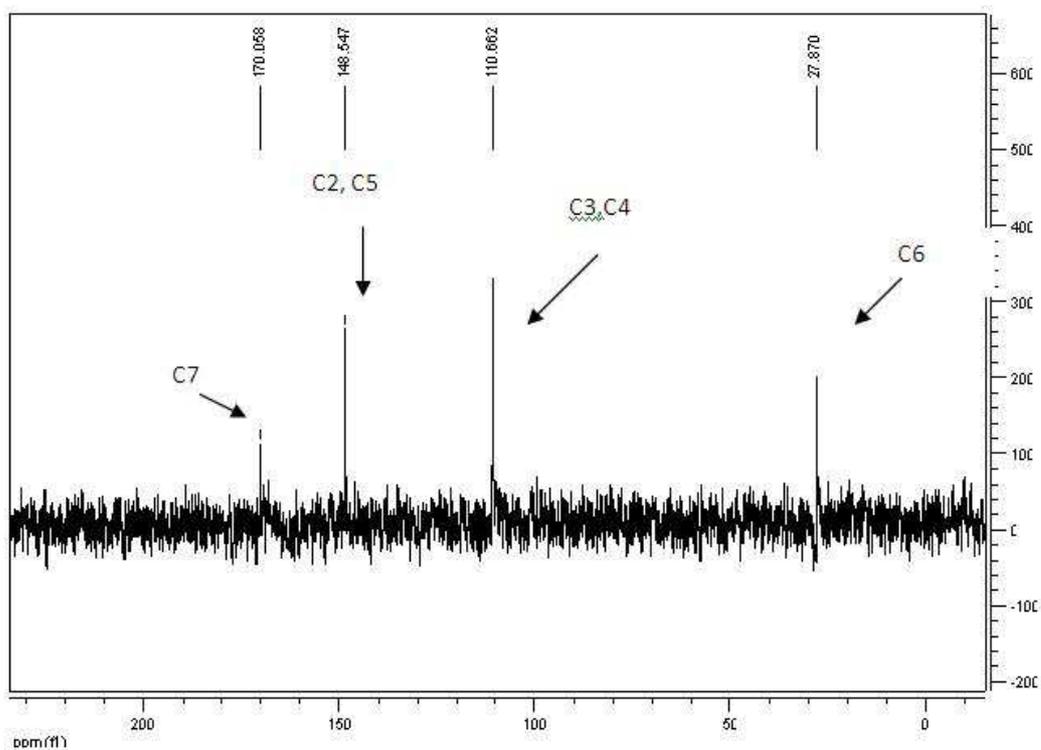


Figura A23- Espectro de RMN ^{13}C (δ , 50 MHz, D_2O) de **1a**

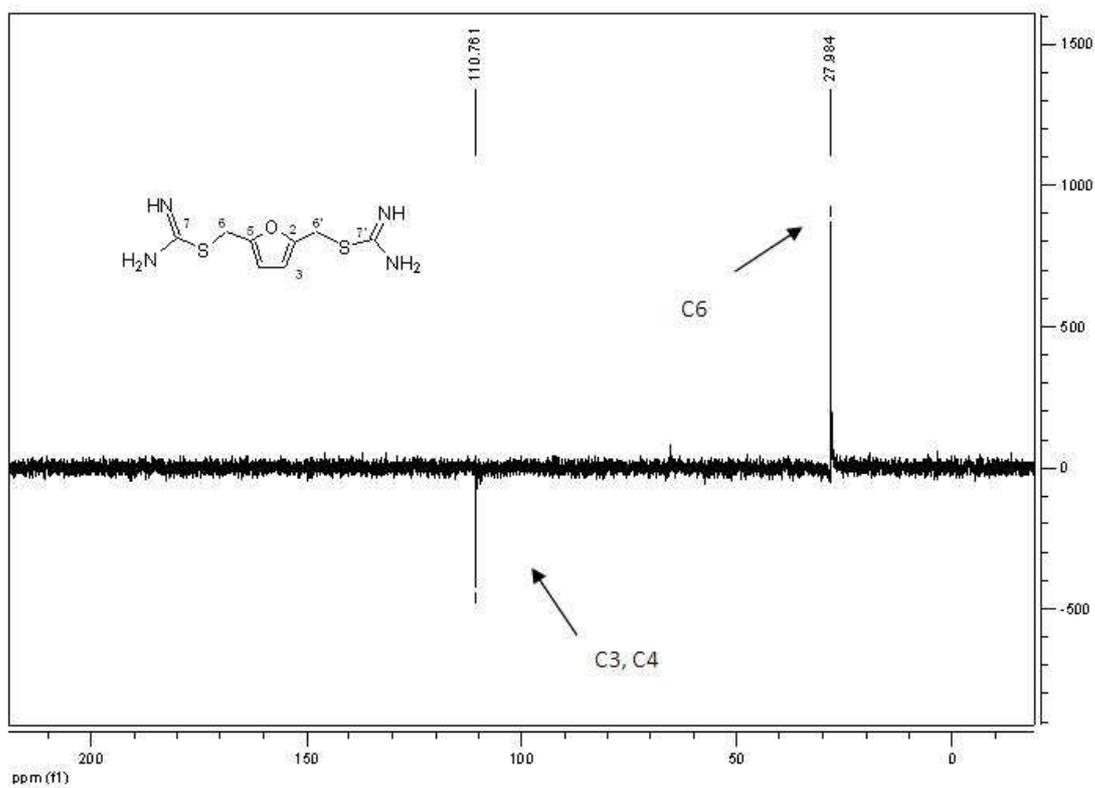
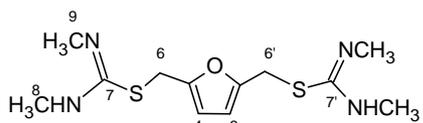


Figura A24- Subespectro de DEPT 135 (δ , 50 MHz, D₂O) de **1a**



Composto Ib
2,5-dimetanodii-bis(N,N'-dimetilcarbamidotoato)furano
Massa molecular 300,4 g/mol
Fórmula Molecular C₁₂H₂₀N₄OS₂

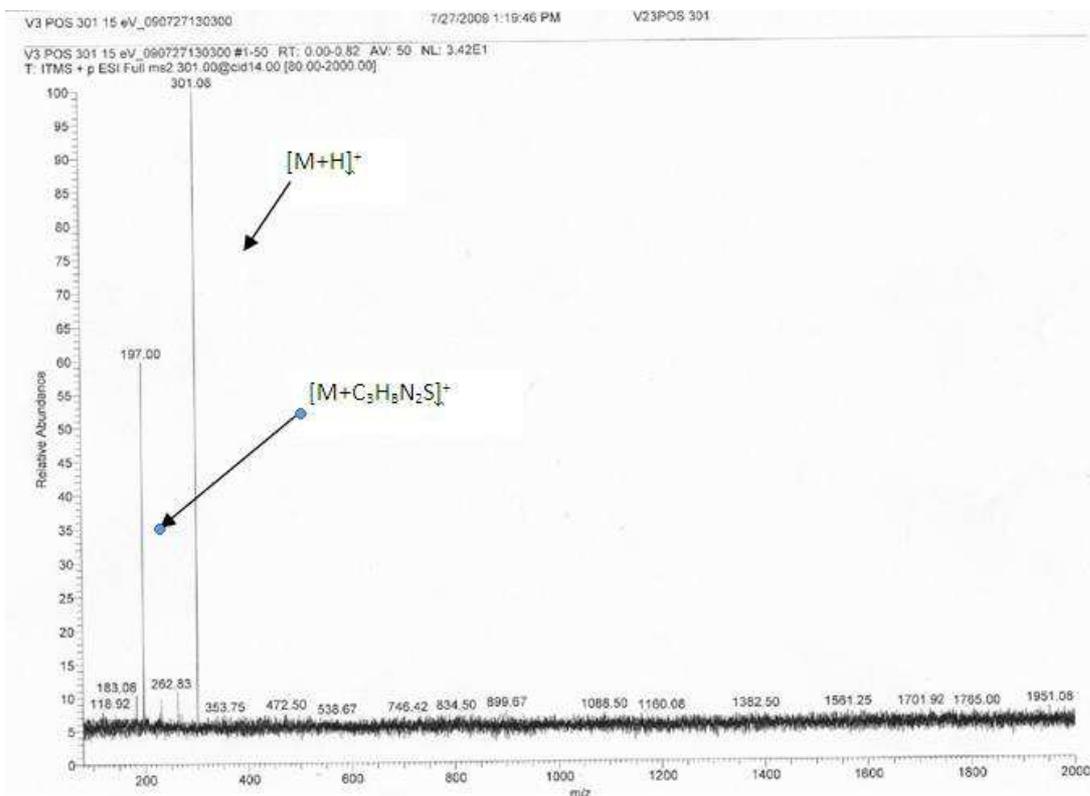


Figura A25 - Espectro de ESI-MS (modo positivo) de **Ib**

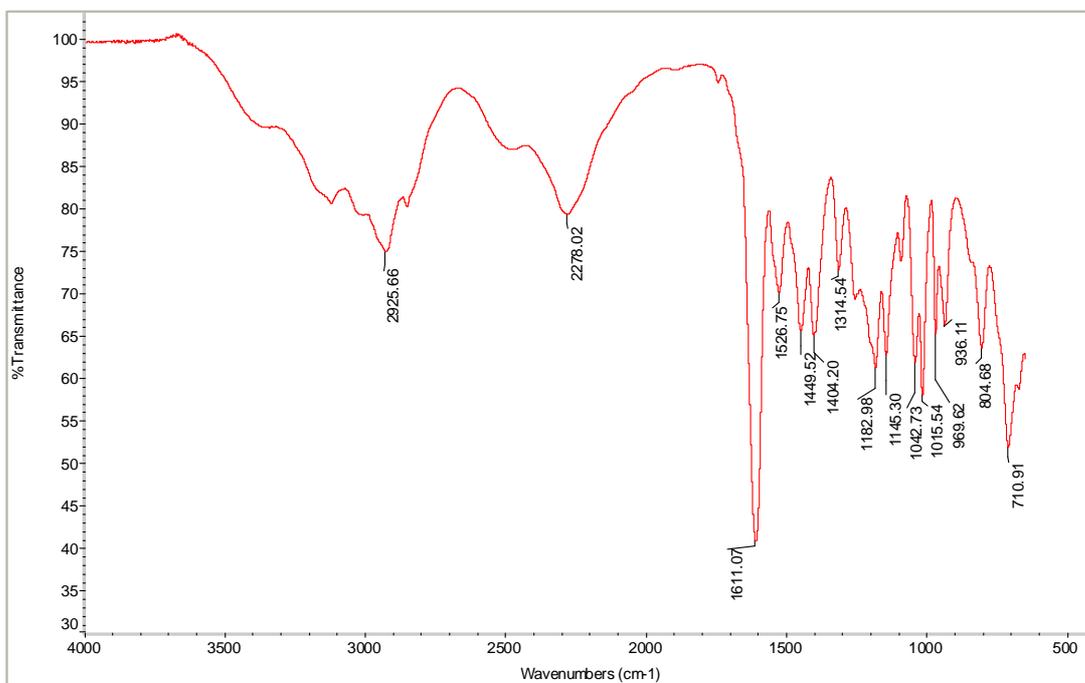


Figura A26 - Espectro na região do infravermelho (ν_{\max} , cm⁻¹, ATR) de **Ib**

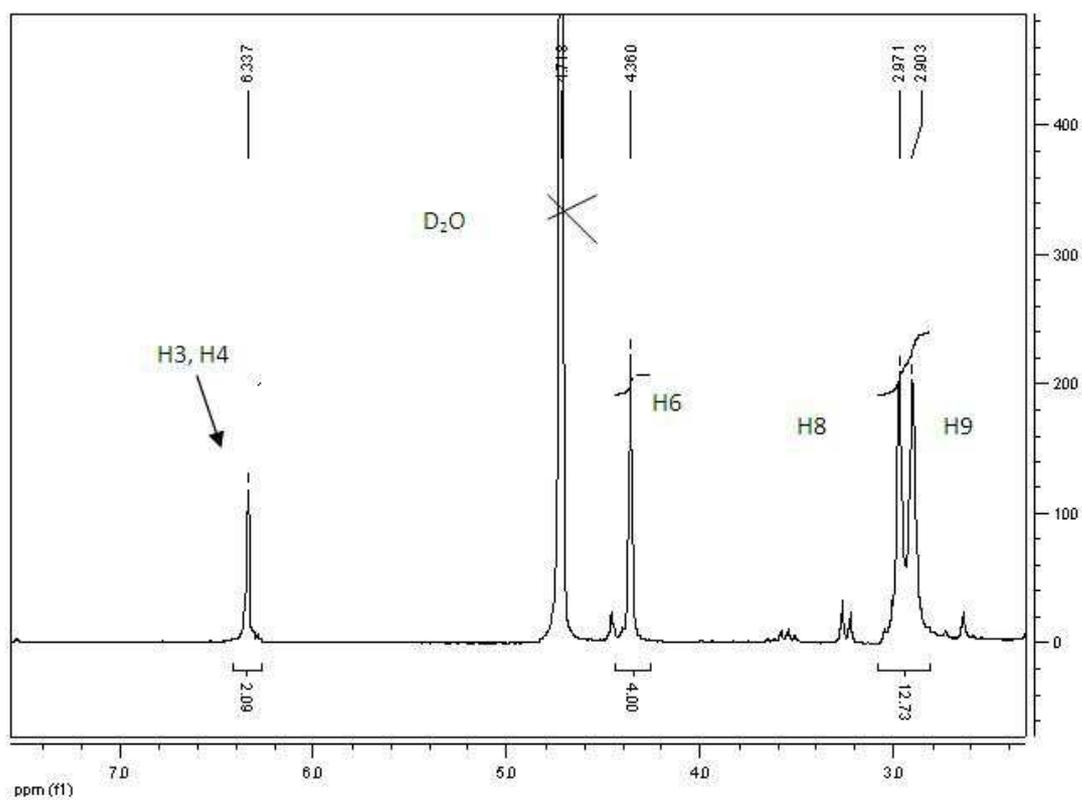


Figura A27 - Espectro de RMN ^1H (δ , 200 MHz, D_2O) de **Ib**

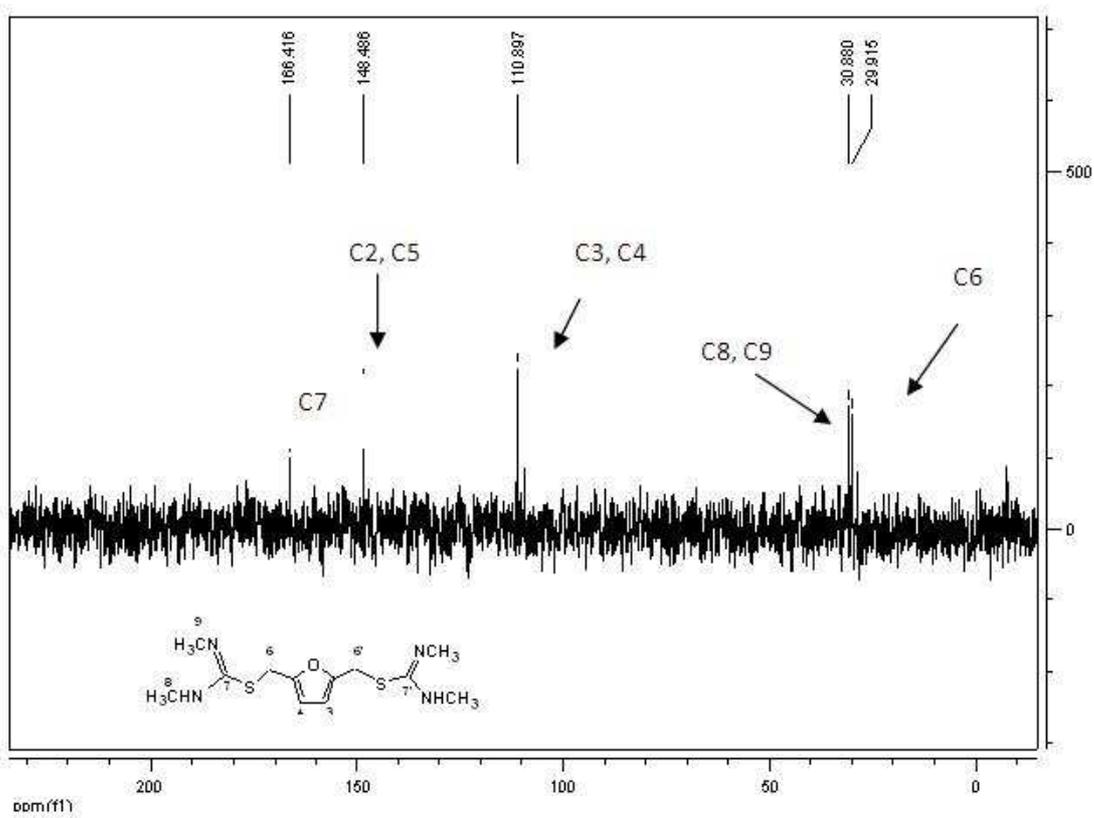


Figura A28- Espectro de RMN ^{13}C (δ , 50 MHz, D_2O) de **Ib**

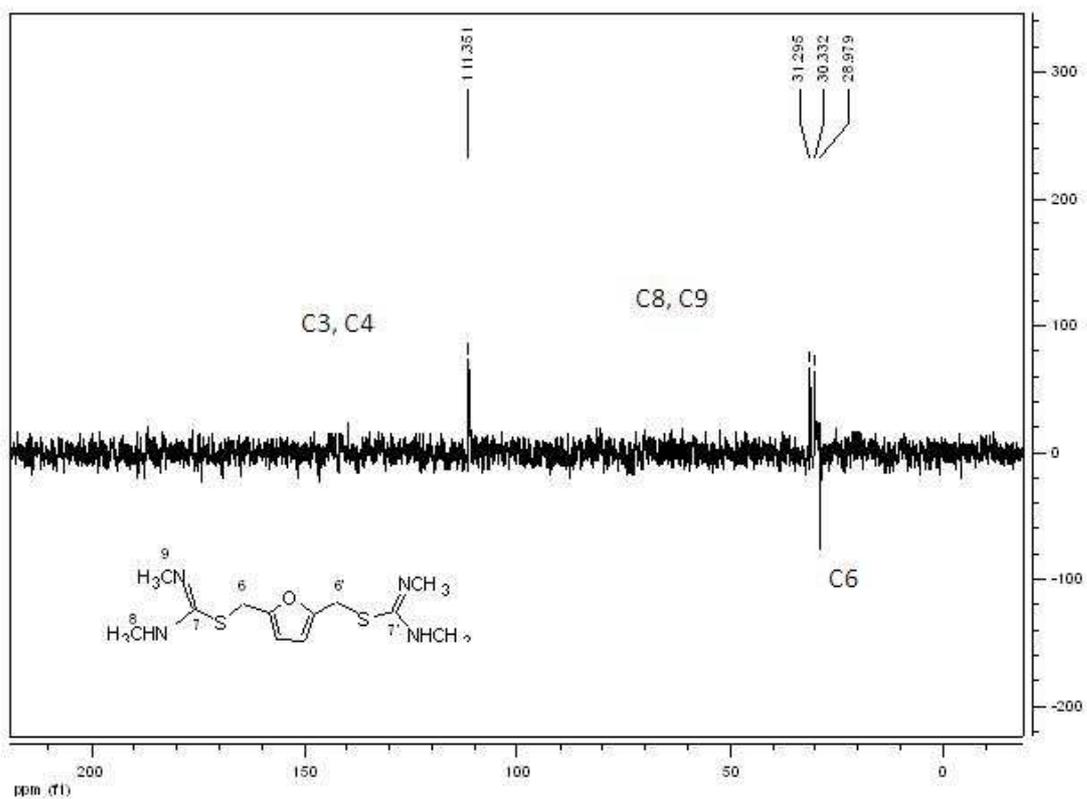
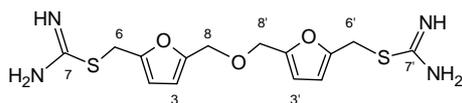


Figura A298- Subespectro de DEPT 135 de **Ib** (δ , 50 MHz, D_2O)



Composto IIa

Composto IIa

1,5-bis-[(5'-carbamidotioato-2'furano)-il]-3-oxapropano

Massa molecular 354,4 g/mol

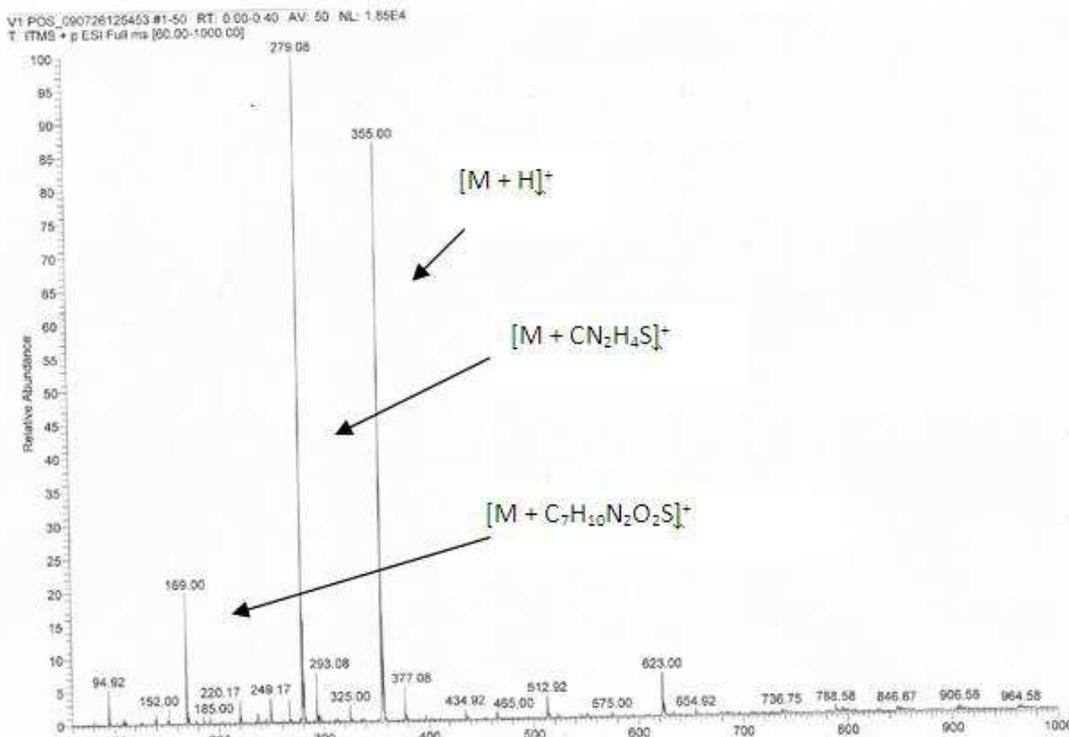
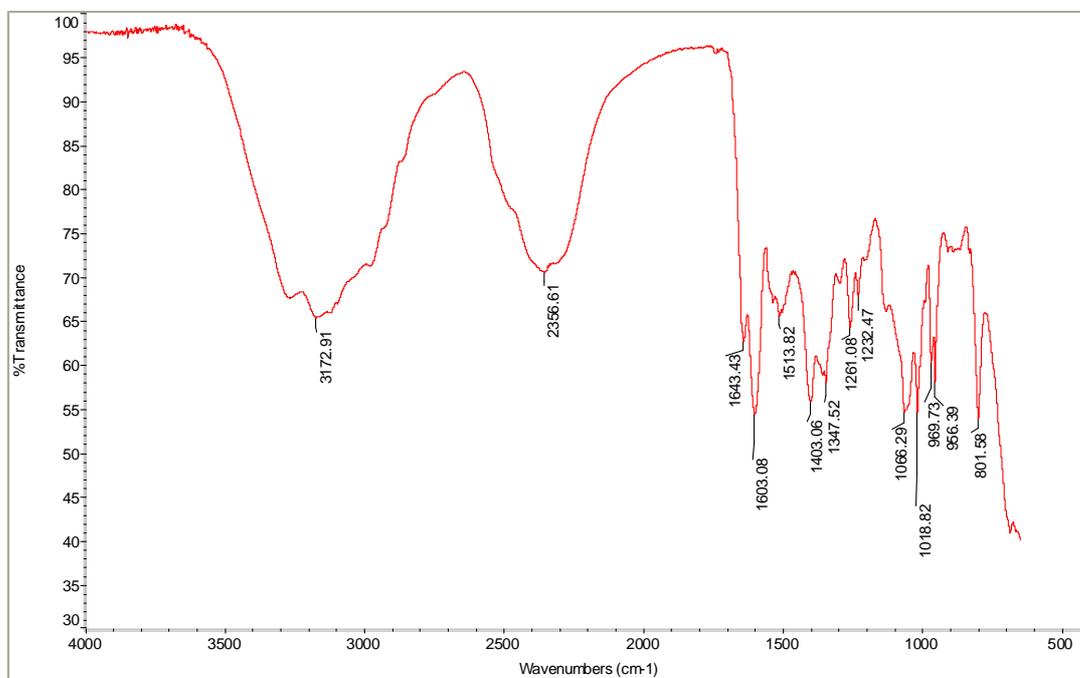
Fórmula Molecular $C_{14}H_{18}N_4O_3S_2$ 

Figura A30- Espectro de MS- ESI (modo positivo) de IIa

Figura A31- Espectro na região do infravermelho (ν_{max} , cm^{-1} , ATR) de IIa

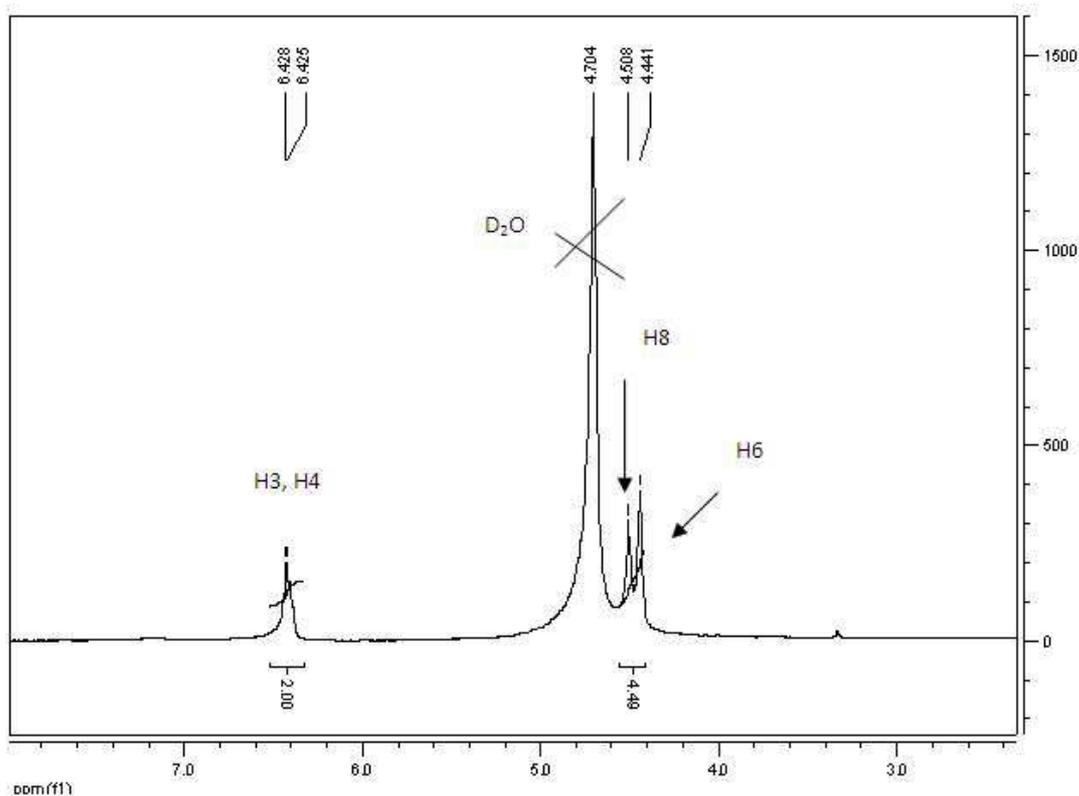


Figura A32- Espectro de RMN ¹H (δ, 200 MHz, D₂O) de IIa

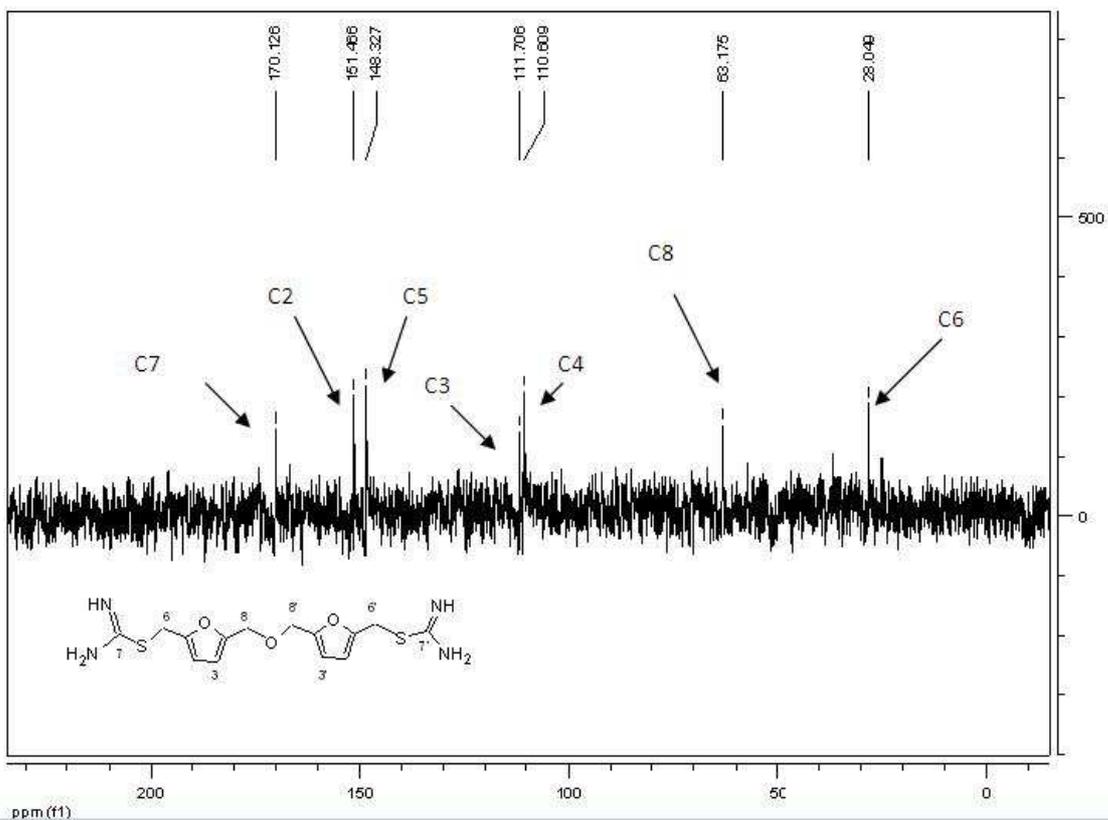


Figura A33- Espectro de RMN ¹³C (δ, 50 MHz, D₂O) de IIa

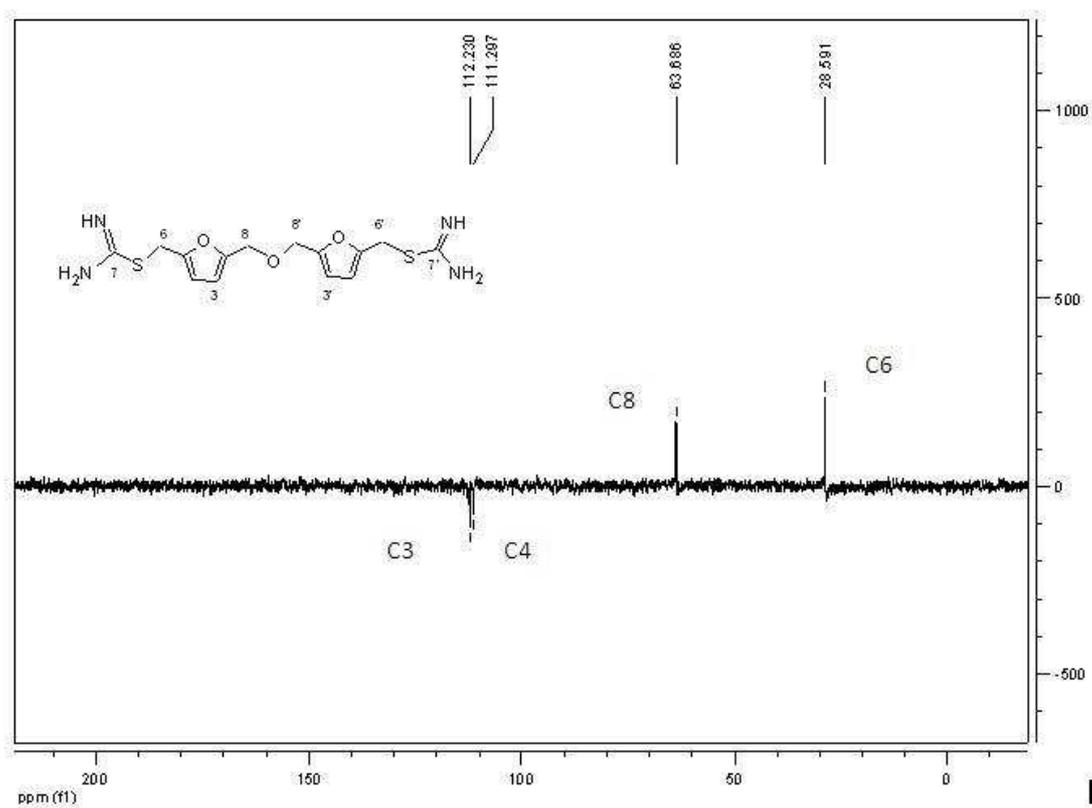
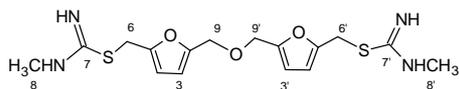


Figura A34- Subespectro de DEPT 135 (δ , 50 MHz, D₂O) de IIa



Composto IIb
1,5-bis[5'-N-metil-carbamidotoato-2'-furano]il]-3-oxapropano
 Massa molecular 382,5 g/mol
 Fórmula Molecular $C_{16}H_{22}N_4O_3S_2$

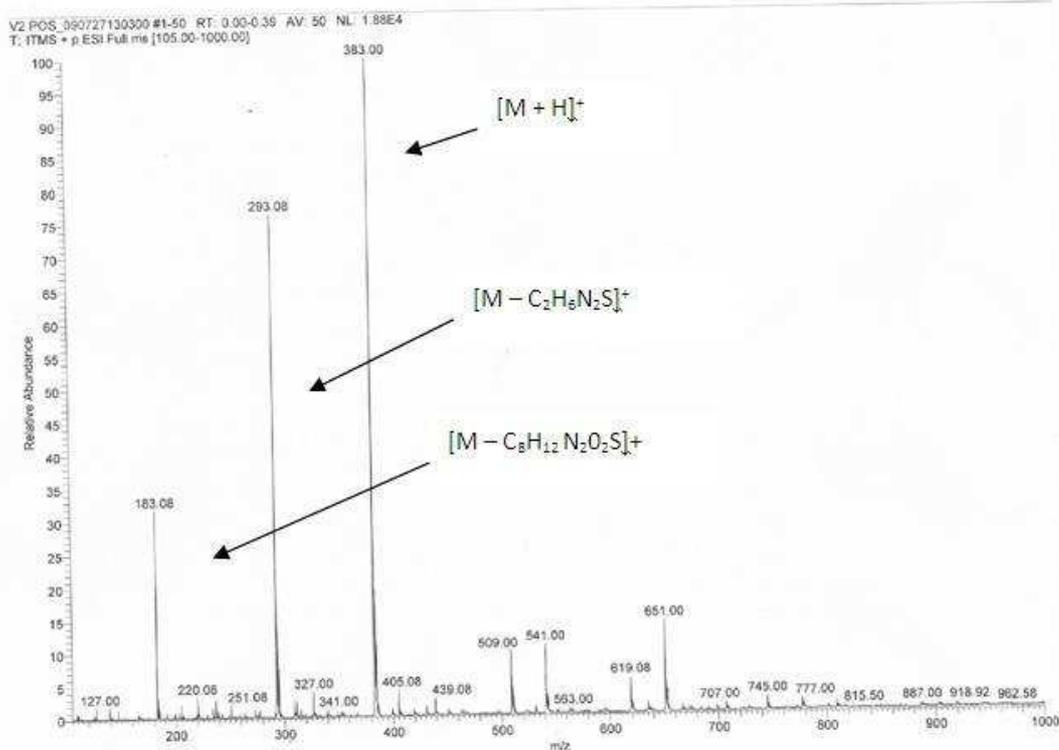


Figura A35- Espectro de MS- ESI (modo positivo) de **IIb**

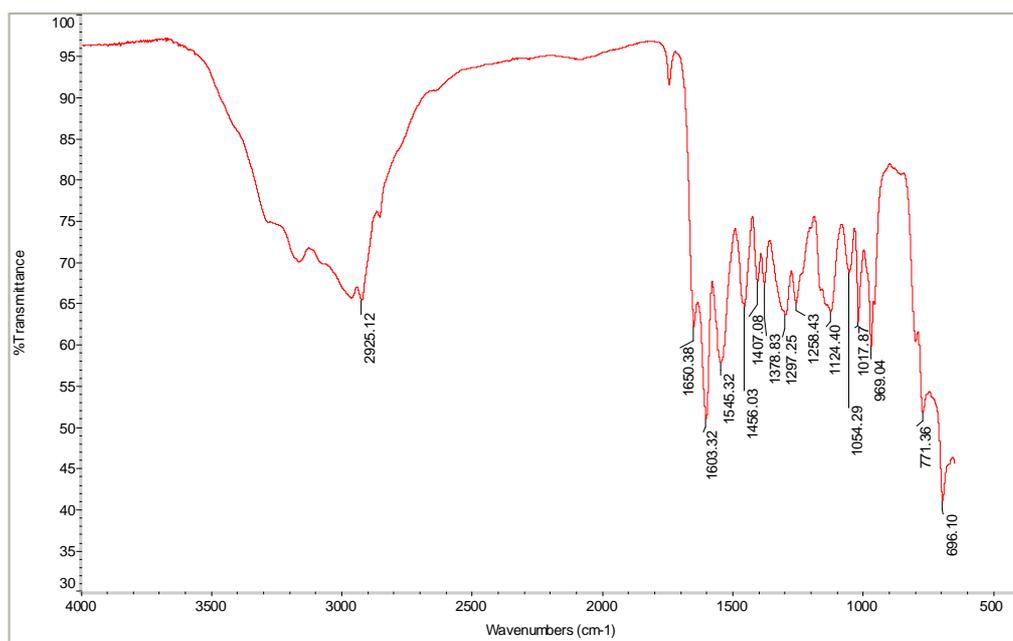


Figura A36- Espectro na região do infravermelho (ν_{max} , cm^{-1} , KBr) de **IIb**

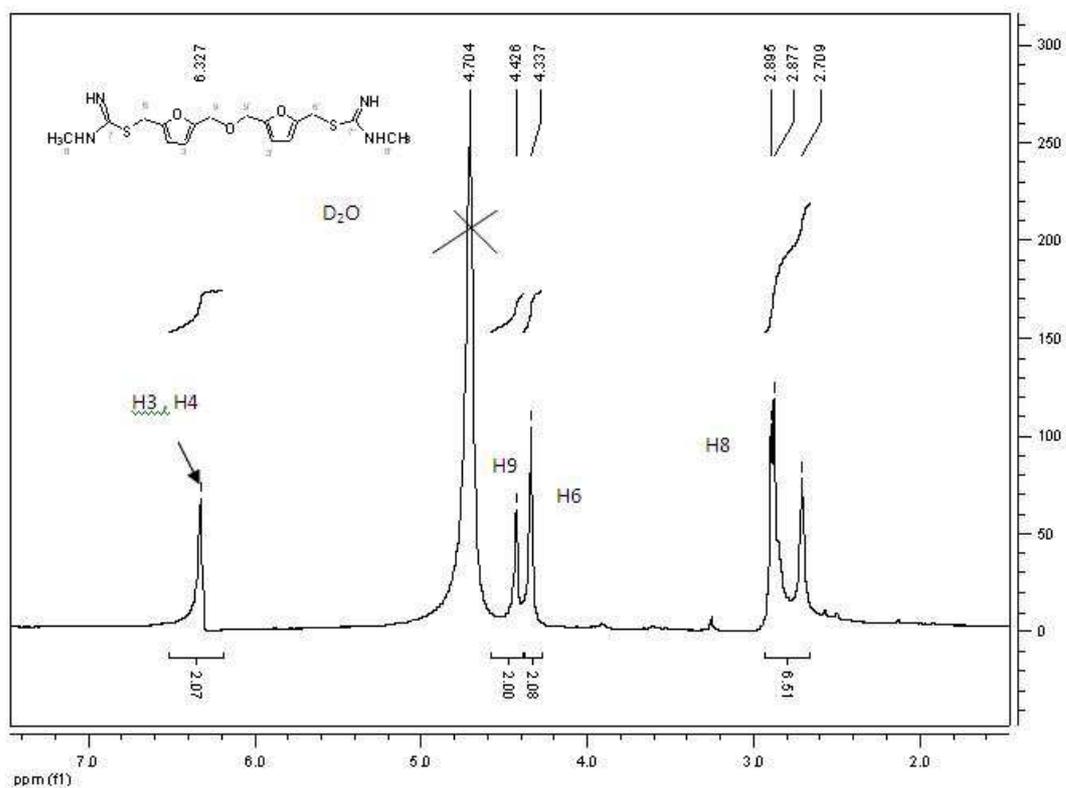


Figura A37- Espectro de RMN ^1H (δ , 200 MHz, D_2O) de IIb

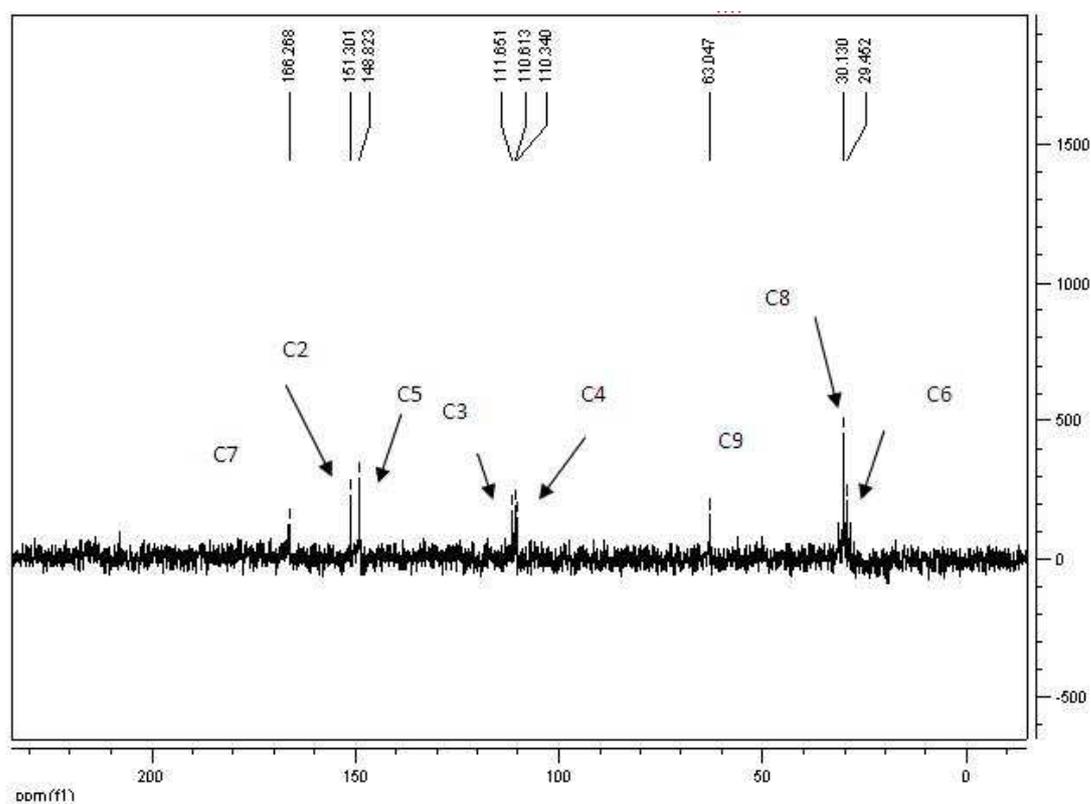


Figura A38- Espectro de RMN ^{13}C (δ , 50 MHz, D_2O) de IIb

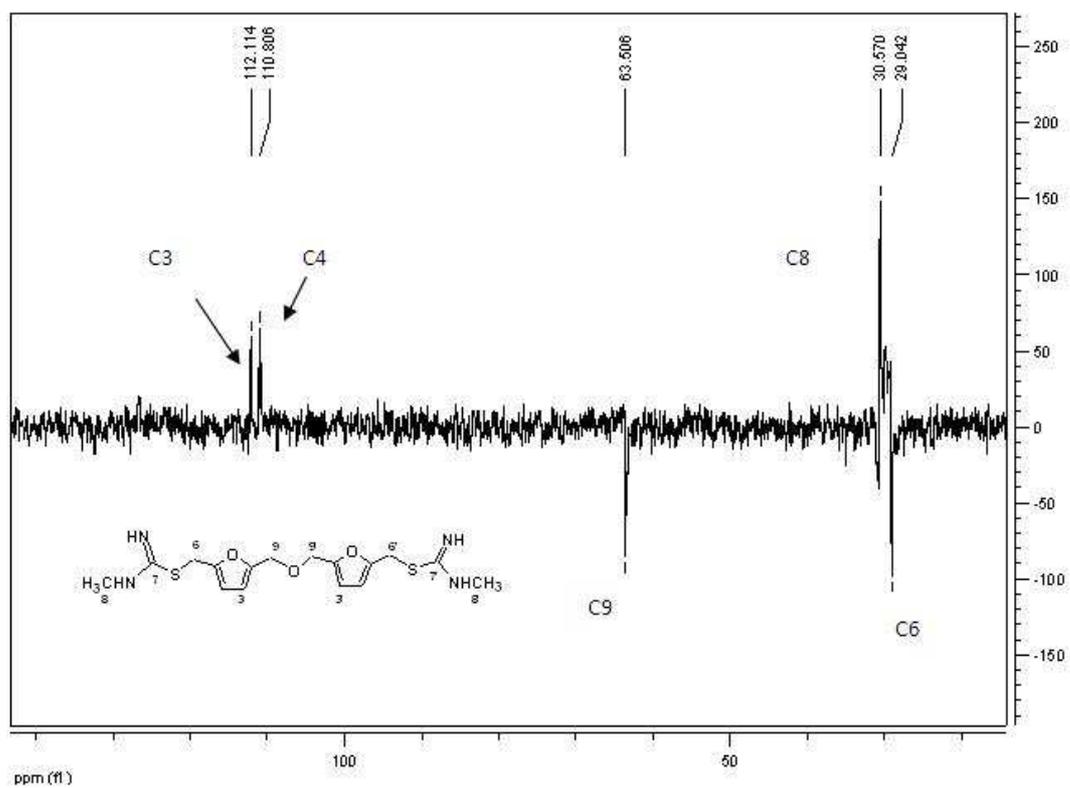


Figura A39- Subespectro de DEPT 135 (δ , 50 MHz, D₂O) de **IIb**

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

ALMEIDA, V. L.; DONNICI, C. L.; LOPES, J. C. D.; OLIVEIRA, S. R.; MONTANARI, C. A.. Estudos de relações estrutura-atividade quantitativas (QSAR) de bis-benzamidinas com atividade antifúngica. *Química Nova* (Impresso), v. 33, p. 1492-1495, 2010

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; DONNICI, C. L. ; MONTANARI, C. A. ; LOPES, M. T. P.;. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-específicos e não-ciclo-específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova* (Impresso), São Paulo, v. 28, n. 5, p. 1-12, 2005

Resumos Publicados em Anais de Congressos

ALMEIDA, V. L.; DONNICI, C. L.; MONTANARI, C. A. . Estudos da atividade de amidinas frente a *Pneumocystis carinii* por PCA. In: 27º REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA E 26 CONGRESSO LATINOAMERICANO DE QUÍMICA, 2004, Salvador. Livros de Resumos da 27º Reunião da Sociedade Brasileira de Química e 26º Congresso Latinoamericano de Química. SP : SBQ, 2004. v. 1. p. 51-51

ALMEIDA, V. L.; DONNICI, C. L.; MONTANARI, C. A.. Estudo por modelagem molecular da formação de complexo DNA e bis-benzamidinas. In: RA da SBQ, 2001, Poços de Caldas. Livro de Resumos. SP : SBQ, 2001. p. MD-32.

ALMEIDA, V. L. ; MONTANARI, C. A. ; DONNICI, C. L. . Rational drug design by QSAR of novel benzamidines with potential activity against *Pneumocystis carinii* (PCP) . In: 1st Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, 2001, Caxambu-MG. Homepage, 2001.

Processos técnicas

DONNICI, C. L. ; MONTANARI, C. A. ; OLIVEIRA, S. R. ; NOGUEIRA, L.; SILVA, L. L. da ; LOPES, M. T. P.; RESENDE, M. A. de ; ALMEIDA, V. L. . Preparação de Novos Precursores Dendriméricos Aza- e Tio- substituídos bis-funcionalizados com Atividade Antimicrobiana e Antitumoral e processo de preparação. 2010.