



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Faculdade de Farmácia
Departamento de Medicamentos
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Fabiana Passamani

**Modelagem Molecular e Avaliação da Relação
Estrutura-Atividade Acoplados a Estudos Físico-
químico e Toxicológicos *In Silico* de Derivados
Heterocíclicos com Atividade Antiviral**

Rio de Janeiro

2009

Fabiana Passamani

**Modelagem Molecular e Avaliação da Relação
Estrutura-Atividade Acoplados a Estudos Físico-
químico e Toxicológicos *In Silico* de Derivados
Heterocíclicos com Atividade Antiviral**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como um dos requisitos parciais necessários à obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rangel Rodrigues (FF – UFRJ)

Co-orientador: Prof^a Dr^a Magaly Girão Albuquerque (IQ – UFRJ)

Rio de Janeiro

2009

Ficha Catalográfica

Passamani, Fabiana

Modelagem Molecular e Avaliação da Relação Estrutura-Atividade Acoplados a Estudos Farmacocinéticos e Toxicológicos *In Silico* de Derivados Heterocíclicos com Atividade Antiviral. 2009,103fs

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Rio de Janeiro, 2009.

Orientador: Carlos Rangel Rodrigues.

Co-orientador: Magaly Girão Albuquerque

1. Antivirais. 2. Modelagem Molecular. 3. Parâmetros Toxicológicos *In Silico*. 4. SAR. 5. ADMET 6. Regra de Lippinski – I. Rodrigues, Carlos Rangel (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Faculdade de Farmácia. III. Título.

Fabiana Passamani

Modelagem Molecular e Avaliação da Relação
Estrutura-Atividade Acoplados a Estudos
Físico-químico e Toxicológicos *In Silico* de
Derivados Heterocíclicos com Atividade
Antiviral

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como um dos requisitos parciais necessários à obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 28 de Agosto de 2009

Prof. Dr. Carlos Rangel Rodrigues – FF – UFRJ

Profa. Dra Magaly Girão Albuquerque – DQO - UFRJ

Prof. Dra. Luiza Rosaria Sousa Dias – FF – UFF

Prof. Dr. Carlos Maurício Rabello de Sant'Anna – ICE – UFRRJ

Prof. Dr. Lúcio Mendes Cabral – FF – UFRJ

*" Um anjo do céu
Que trouxe pra mim
É a mais bonita
A jóia perfeita
Que é pra eu cuidar
Que é pra eu amar
Gota cristalina
Tem toda inocência*

*Vem, Oh! meu bem
Não chore não,
Vou cantar pra você*

*Um anjo do céu
Que me escolheu
Serei o seu porto
Guardião da pureza
Que é pra eu cuidar
Que é pra eu amar
Gota cristalina
Tem toda inocência"*

À Sofia.

"CARPE DIEM - Viva a vida intensamente, colha cada momento e goze o
prazer de viver."

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar força e coragem para vencer os desafios diários. Obrigada pelas pessoas que colocou no meu caminho e que em cada momento foram importantes, fazendo com que eu tivesse mais vontade para conseguir meus objetivos.

Ao meu orientador, pela oportunidade e confiança. Num momento em que tudo parecia ser impossível, vc acreditou em mim e me ensinou que sonhos podem virar realidade basta realmente querer. Obrigada por tudo!

Aos amores de minha vida Gabriel e Sofia, pela pulsão de vida. Esse amor incondicional que sinto por vocês é a razão para eu acordar todos os dias. Gabriel, obrigada por me fazer tão feliz, pela compreensão, pelos puxões de orelha e pelo convívio. Sofia, vc me fez acreditar que a vida é ainda melhor.

Aos meus pais por todo amor e por terem sempre me apoiado e acreditado em mim em todos os momentos da minha vida, proporcionando condições para realizar os meus sonhos. Amo muito vocês.

Ao incentivo e carinho de meus irmãos, cunhadas e sobrinhos (Tatá, Bebel, Bruno, Clara, Ana Julia, Luiza). Beto, pelo exemplo de dedicação e companherismo. Tel, meu grande amigo, conselheiro e incentivador, meu grande referencial. Jacques pelo apoio nos momentos difíceis. Siça, minha irmã e amiga obrigada pela paciência, apoio e pelo auxílio nos cuidados com a Sofia. Amo vocês!

Aos meus grandes amigos incentivadores e apoiadores Cecília, Fabi, Cris, Lili, Lô, Bethania (minha sogrinha querida)

À Jaque, Meg e todos colaboradores da Carpe Diem, obrigada pelo apoio, paciência e compreensão nos momentos difíceis dessa jornada, principalmente nas minhas ausências.

À minha eterna orientadora Regina Keller por ter me introduzido na pesquisa.

À minha coorientadora pela atenção e paciência. Você é um exemplo de professor.

Ao Will e Ilídio pela amizade por compartilhar as dúvidas e aflições que ajudam nosso crescimento, vocês foram muito companheiros nessa jornada. Obrigada!

À Professora Carla Holandino e aos amigos do laboratório CHolandino, que me ensinaram os primeiros passos na cidade maravilhosa e me introduziram na UFRJ.

Ao professor Lucio Cabral e amigos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica pelas conversas, conselhos, churrascos e carinho dedicados.

Aos professores da Universidade Federal Fluminense Dr^a Alice M. R. Bernardino, Dr^a Helena C. Castro e Dr^a Izabel C. P. P. Frugulhetti pela colaboração.

Aos professores e colaboradores do programa de pós-graduação pelos ensinamentos e orientações.

Aos professores da banca por gentilmente aceitarem o convite e pelas contribuições.

RESUMO

O surgimento contínuo de cepas virais resistentes aos fármacos atualmente empregados reforça a necessidade do desenvolvimento de novas entidades químicas mais eficientes e menos tóxicas. Assim, focaremos nesse trabalho, estudos de relação estrutura-atividade (SAR), de parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos (ADMET) *in silico* e de biodisponibilidade oral (“Regra-dos-Cinco” de Lipinski) de novos derivados heterocíclicos candidatos a fármacos antivirais para o tratamento de doenças como Herpes Simples.

Na primeira parte deste trabalho, realizamos estudos de SAR de derivados 1-hidroxiacridona (**1a-j**), recentemente descritos na literatura como inibidores de HSV-1 da classe dos não-nucleosídeos. Com base nessas moléculas, aplicamos princípios tradicionais de Química Medicinal de modificação molecular, tais como restrição conformacional (abordagem do análogo rígido) e substituição isostérica, no planejamento e síntese de novos derivados 3*H*-benzo[*b*]pirazolo[3,4-*h*]-1,6-naftirídínicos das séries **2** (**2a-i**) frente ao HSV-1. O melhor perfil de inibição do HSV-1 foi observado para o derivado pirazolo-naftiridínico **2f** que contém um átomo de cloro em C10, mesmo substituinte do derivado acridona de melhor atividade (**1b**).

Todos os resultados obtidos com os estudos teóricos e atividade biológica reforçam o perfil antiviral promissor dos derivados naftiridínicos, no entanto, investigações experimentais mais aprofundadas são necessárias.

ABSTRACT

The viral infections are among the most common human diseases and the drug-resistant virus strains is a complex problem in the treatment, reinforced the design and synthesize of new chemical entities more efficient and less toxics. In this work we report the study of a new moieties inhibition of Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1)

In this work, we assess the structural features and electronic properties of a series of ten 1-hydroxyacridone derivatives (1a–j) recently described as a new class of non-nucleoside inhibitors of Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1). Based on these molecules, we applied rigid analogue and isostérica replacement approaches to design and synthesize nine new 3H-benzo[b]pyrazolo[3,4-h]-1,6-naphthyridine derivatives (2a–i) and determination the activity against HSV-1. The biological and computational results of these new molecules were compared with 1-hydroxyacridones. An inhibitory profile was observed in 10-Cl substituted 3H-benzo[b]pyrazolo[3,4-h]-1,6-naphthyridine derivative (2f), which presents the same substituent at the analogous position of 1-hydroxyacridone derivative (1b). The structure–activity relationship (SAR) studies pointed out the 10-position next to nitrogen atom as important for the anti-HSV-1 profile in the pyrazolo-naphthyridine derivatives tested. The most potent acridone and pirazolo naphthridine derivatives were also submitted to an *in silico* ADMET screening in order to determine their overall drug-score, which confirmed their potential antiviral profile.

All theoretical studies and biological activity results reinforced the promising profile antiviral but is important new further experimental investigation there derivates.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estágios de infecção do HSV. a) infecção da célula epitelial realizando uma replicação produtiva juntamente com a entrada do vírus nas inervações nervosas e transporte do nucleocapsídeo viral ao corpo neuronal, onde o DNA viral é liberado no núcleo e circularizado, mantendo o estado de latência. b) Reativação, com formação do capsídeo e transporte às terminações nervosas, no qual a partícula infecciosa de HSV é liberada às células epiteliais resultando numa infecção recorrente (Adaptado de KNIPE *et al.*, 2008).

Figura 2. Organização estrutural esquemática do HSV [Adaptado de COHEN & SCHAFFER, 2003].

Figura 3. Ciclo de replicação do HSV (Adaptado de COEN & SCHAFFER, 2003).

Figura 4 - Diferentes classes de compostos que apresentam atividade inibitória da replicação do HSV.

Figura 5. Mecanismo de ação do Aciclovir (DE CLERCQ, 2004).

Figura 6 - Estrutura dos análogos de nucleosídeos anti-HSV licenciados.

Figura 7. Fármaco anti-HSV não análogo de nucleosídeo.

Figura 8. Esquema dos derivados de acridona com atividade antiviral.

Figura 9. Ilustração do estreitamento no desenvolvimento de novos fármacos.

Figura 10. Distribuição de *Drug-likeness* de fármacos comerciais (em vermelho) *versus* substâncias químicas do catálogo Fluka (em azul).

Figura 11. (a) Resultado percentual do treinamento com substâncias químicas com efeitos tóxicos e (b) validação utilizando-se fármacos em comercialização, realizados no programa Osiris[®] Property Explorer.

Figura 12. Estrutura das séries avaliadas nesse estudo.

Figura 13. Representação das etapas de construção do MEP da molécula de Benzeno.

Figura 14. Cálculos de perfil toxicológico, propriedades físico-químicas, *drug-likeness* e *drug-score* pelo programa Osiris.

Figura 15. Escala do perfil Drug-Score de um potencial candidato a fármaco.

Figura 16. Fluxograma da Metodologia aplicada.

Figura 17. Estrutura da acridona e derivado sintético 1-hidroxiacridona desenvolvido por Lowden e Bastow com atividade anti-herpes.

Figura 18. (A) Coeficiente de distribuição dos orbitais HOMO e (B) coeficiente de distribuição dos orbitais LUMO dos derivados acridona.

Figura 19. Densidade de LUMO dos derivados acridona, gerada numa superfície de densidade eletrônica constante de 0,002 e/ua³.

Figura 20. Densidade de HOMO dos derivados acridona, gerada numa superfície de densidade eletrônica constante de $0,002 \text{ e}/\text{ua}^3$.

Figura 21. Mapa de potencial eletrostático (MEP) dos derivados 1-hidroxiacridona, sobre uma *isosurface* de $0,002 \text{ eV}/\text{ua}^3$ entre -25 a 30 Kcal/mol (A) Frente e (B) Verso.

Figura 22 - Substituição isostérica e utilização da metodologia do análogo rígido aplicados para o planejamento dos derivados 3*H*-benzo[*b*]pirazolo[3,4-*h*]-1,6-naftiridínicos.

Figura 23. Comparação da concentração citotóxica dos compostos naftiridínicos mais ativos e menos ativos com o aciclovir.

Figura 24. (A) Coeficiente de distribuição dos orbitais HOMO e (B) coeficiente de distribuição dos orbitais LUMO dos derivados naftiridínicos.

Figura 25. Densidade de LUMO dos derivados naftiridínicos, gerados numa superfície de densidade eletrônica constante de $0,002\text{e}/\text{ua}^3$.

Figura 26. Mapa de potencial eletrostático (MEP) dos derivados benzo[*b*]pirazolo[3,4-*h*]-1,6-naftiridínico, sobre uma superfície de $0,002 \text{ e}/\text{ua}^3$ entre -25 a 30 Kcal/mol .

Figura 27. Sobreposição do composto mais ativo(2f) e do composto inativo (2i) com o derivado acridona de maior atividade (1b).

Figura 28. Cálculo do *drug-score* e do risco toxicológico teórico dos compostos mais ativos e do aciclovir (ACV), usando o programa OSIRIS.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros e valores estabelecidos pela Regra de Linpiski.

Tabela 2 - Atividade Anti-HSV-1 (IC_{50} , μM), citotoxicidade (CC_{50} , μM) e cálculos da energia de HOMO (E_{HOMO} , eV) e de LUMO (E_{LUMO} , eV) e momento dipolo (μ , Debye) de 10 derivados 1-hidroxiacridona.

Tabela 3 - Atividade anti-HSV-1 (% de inibição do HSV-1 numa concentração de $50\mu M$) e cálculos da energia de HOMO (E_{HOMO} , eV) e LUMO (E_{LUMO} , eV) e momento dipolo (μ , Debye) dos derivados 3*H*-benzo[*b*]pirazolo[3,4-*h*]-1,6-naftiridinico.

Tabela 4 - Valores de cLogP, PM (peso Molecular), PSA (área de superfície polar), N° Rot (número de ligações rotáveis), HBA(acceptor de ligação de hidrogênio) e HBD (Doadores de ligação de hidrogênio) dos derivados de acridona e naftiridinicos mais ativos.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade
AM1	Modelo Austin 1 (<i>Austin Model 1</i>)
AMBER	Construção Assistida de Modelos com Refinamento de Energia (<i>Assisted Model Building and Energy Refinement</i>)
cLogP	Coefficiente de Partição calculado (teórico)
CNDO	Negligência Completa da Sobreposição Diferencial (<i>Complete Neglect of Differential Overlap</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
eV	elétron Volt
FDA	Agencia regulatória de alimentos e fármacos - <i>Food and Drug Administration</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HOMO	Orbital molecular ocupado de maior energia (<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>)
INDO	Negligência Intermediária da Sobreposição Diferencial (Intermediate Neglect of Differential Overlap)
LUMO	Orbital molecular desocupado de menor energia (Lowest Unoccupied Molecular Orbital)
MEP	Potencial Eletrostático Molecular (Molecular Electrostatic Potential)
MINDO/3	Negligência Intermediária Modificada da Sobreposição Diferencial, versão 3 (Modified Intermediate Neglect of Differential Overlap, version 3)
MM1	Campo de Força de Mecânica Molecular 1 (Molecular Mechanics 1)
MM2	Campo de Força de Mecânica Molecular 2 (Molecular Mechanics 2)
MNDO	Negligência Modificada da Sobreposição Diferencial (Neglect of Differential Overlap)
NDDO	Negligência da Sobreposição Diferencial Diatômica (Neglect of Diatomic Differential Overlap)
PM	Peso Molecular
PM3	Método Paramétrico 3 (Parametric Method 3)
PM5	Método Paramétrico 5 (Parametric Method 5)
PSA	Área de Superfície Polar (Polar Surface Area)
RNA	Ácido ribonucleico (Ribonucleic acid)

RTECS	Registro de Efeitos Tóxicos de Substâncias Químicas (Registry of Toxic Effects of Chemical Substances)
SAR	Relação estrutura-atividade (Structure-Activity Relationship)
STO-3G	Orbitais do Tipo Slater simulado por 3 Gaussianas (Slater-Type-Orbitals simulated by 3 Gaussians) - Base de dados
Ua	Unidade Atômica

SUMARIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	19
1.2 VÍRUS HERPES SIMPLES (HSV).....	20
1.2.1 Aspectos Gerais.....	20
1.2.2 Morfologia Viral.....	23
1.2.3 Ciclo Replicativo do HSV e Alvos Anti-HSV.....	23
1.3 FÁRMACOS ANTIVIRAIS USUAIS.....	29
1.3.1 Análogos de Nucleosídeos: Um Marco Como Antivirais.....	29
1.3.2 Inibidores Não Nucleosídeos: Diversidade Estrutural.....	32
1.3.3 Derivados Acridona.....	34
1.4 PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS.....	38
1.4.1 Panorama Geral.....	38
1.4.2 Métodos de Cálculo de Modelagem Molecular.....	41
1.4.2.1 Mecânica Molecular.....	41

1.4.2.2 Mecânica Quântica.....	43
1.4.2.2.1 Cálculos <i>ab initio</i>	44
1.4.2.2.2 Cálculos Semi-Empíricos.....	46
1.4.3 Análise Conformacional.....	48
1.4.4 Descritores Moleculares.....	49
1.4.5 Parâmetros Farmacocinéticos e Toxicológicos <i>In silico</i>.....	50
1.4.5.1 ADMET <i>in silico</i>	52
1.4.5.2 Outras abordagens farmacocinéticas (“Regra-dos-Cinco” de Lipinski)....	55
1.4.5.3 Regra de Lipinski – Abordagens para o Sistema Nervoso Central.....	57
2 JUSTIFICATIVA.....	58
3 OBJETIVOS.....	60
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	60
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	60
4 METODOLOGIA.....	62
4.1 CÁLCULOS DOS PARÂMETROS TEÓRICOS DE MODELAGEM MOLECULAR	62
4.1.1 Mapa de Potencial Eletrostático.....	62
4.1.2 Energias dos Orbitais Moleculares.....	64
4.1.3 Densidade dos Orbitais de Fronteira.....	64
4.1.4 Coeficiente de Distribuição Tridimensional dos orbitais de fronteira.	64
4.1.5 Momento de Dipolo.....	65

4.2 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DE PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS E DE TOXICIDADE.....	65
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
5.1 APLICAÇÕES DE MODELAGEM MOLECULAR NO ESTUDO DE SAR DE DERIVADOS ACRIDONA E NAFTIRIDÍNICOS.....	69
5.1.1 Análise dos Dados Obtidos por Modelagem Molecular para os Derivados 1-Hidroxiacridona Anti-HSV-1.....	69
5.1.2 Planejamento e análise dos dados obtidos de modelagem molecular dos derivados naftiridínicos.....	75
5.1.2.1 Estudo de SAR dos Derivados Benzo[<i>b</i>]pirazolo[3,4- <i>h</i>]-1,6-Naftiridínicos Anti-HSV-1.....	79
5.1.2.2 Análise dos Parâmetros Físico-Químicos e Toxicológicos <i>In Silico</i> dos Derivados Benzo[<i>b</i>]pirazolo[3,4- <i>h</i>]-1,6-naftiridínicos Anti-HSV-1.....	87
6 CONCLUSÕES.....	91
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	93
Anexo de artigos publicados durante o período do mestrado.....	104

INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

As infecções virais são de grande preocupação para a saúde pública visto que provocam diversas doenças em seres humanos, muitas vezes com elevado grau de morbidade e ou mortalidade. Como exemplo, podemos citar as encefalites herpéticas, causadas pelos vírus do Herpes Simples (BANFI, 2003; MELLADO *et al.*, 2003; GRUPTA *et al.*, 2007); as hepatites virais causadas pelos vírus da Hepatite (REIS *et al.*, 2008); o câncer cervical causado pelos vírus do Papiloma Humano (DAS *et al.*, 2008); a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (*acquired immunodeficiency syndrome*, AIDS), causada pelos vírus da Imunodeficiência Humana (SIMON *et al.*, 2006; LAMEIRA *et al.*, 2006; CASTRO *et al.*, 2006).

Essas infecções virais se tornam mais preocupantes quando observamos o surgimento de novas epidemias virais como, por exemplo, a dengue (ARAUJO *et al.*, 2008) e a gripe suína (COLLIN *et al.*, 2009). Nos últimos anos, doenças infecciosas virais corresponderam a 25,4% de todas as doenças infecciosas emergentes no planeta, incluindo aquelas provocadas por cepas resistentes aos fármacos em uso clínico, mostrando que a alta capacidade de mutação dos vírus é uma grande ameaça (JONES *et al.*, 2008). Estes dados reforçam a necessidade de estudos detalhados dos vírus patogênicos e de novas entidades químicas que possam combater o surgimento cada vez maior de cepas resistentes.

Nesse trabalho, focaremos o estudo de novos candidatos a fármacos visando o tratamento das infecções provocadas pelos vírus do Herpes Simples (*Herpes Simplex Vírus*, HSV).

1.2 VÍRUS HERPES SIMPLES (HSV)

1.2.1 Aspectos Gerais

Os vírus do Herpes Simples (*Herpes Simplex Virus*, HSV) estão entre aqueles que mais causam infecções na população mundial (COREY, 2002; HEWLET *et al.*, 2004; KHAN *et al.*, 2005). Estudos soropidemiológicos mostram que cerca de 60% a 95% da população mundial possui anticorpos séricos contra pelo menos uma das cepas de um dos vírus HSV (LUPI, 2000; YEUNG-YUE *et al.*, 2002).

Os vírus HSV pertencem à família *Herpesviridae* e à subfamília *Alphaherpesviridae* e compreendem duas espécies, o HSV do tipo-1 (HSV-1) e o HSV do tipo-2 (HSV-2), classificadas com base em diferenças imunológicas, epidemiológicas e clínicas.

As infecções por HSV podem produzir dois quadros distintos: o herpes genital, com predominância do HSV-2, e as formas extragenitais, principalmente a orolabial, com predominância do HSV-1 (RILEY, 1998; WHITLEY & ROIZMAN, 2001; GRIFFITHS *et al.*, 2004). No entanto, o HSV-2 também pode estar associado ao herpes extragenital, bem como o HSV-1, ao herpes genital (LUPI, 2000).

Os vírus HSV têm a propriedade de infectar alguns tipos de células de forma lítica (produtiva) e outras de forma latente (hibernante) (Figura 1).

A infecção produtiva ocorre por lise celular, com liberação de secreções ricas em virions que, em conjunto com a resposta inflamatória local, resultam nas lesões herpéticas características. O contato direto entre as mucosas (ou as soluções de continuidade na pele) e as secreções infectadas são as principais forma de transmissão dos vírus (LUPI, 2000).

As infecções latentes podem ocorrer após uma infecção produtiva, quando os vírus HSV migram das terminações dos neurônios, através do axônio, para o corpo das células nervosas, onde podem se alojarem nos gânglios trigêmeo, cervical ou lombo-sacral. A partícula viral pode permanecer nessas células em estado de latência por toda a vida do indivíduo, sem nunca ocasionar doença ou sintomas clínicos relacionados à infecção viral (fase assintomática), porém pode contribuir para a propagação da doença (QUINN *et al.*, 2000). Assim, a infectividade viral não ocorre somente na fase sintomática ou ativa da doença, mas também na fase assintomática ou latente (KRIEBS, 2008).

Dependendo do estado imunológico dos indivíduos infectados ou em resposta a certas situações, como estresse, aumento das concentrações citosólicas de AMPc e hipertermia (SCHLEISS, 2008), os vírus HSV podem ser reativados, provocando infecção viral recorrente (PEREIRA, 2002; LAZARINE *et al.*, 2006; KRIEBS, 2008). Neste caso, as partículas virais deslocam-se ao longo do axônio, até chegar às células do tecido mucocutâneo, promovendo nova infecção produtiva e conseqüentemente, lise celular (Figura 1).

Além de infectar as superfícies mucocutâneas, os vírus HSV podem produzir infecções mais graves quando, por exemplo, atingem o sistema nervoso central (SNC), levando a encefalite (QUINN *et al.*, 2000; BANFI, 2003; MELLADO *et al.*, 2003), ou quando infecta outras vísceras, tais como traquéia e pulmão (COPLORE, 2002). Pode provocar também ceratoconjuntivite, uma das principais causas de cegueira nos países em desenvolvimento (COREY & SPEAR, 1986), além de infecções herpéticas congênitas (LEVI *et al.*, 1982).

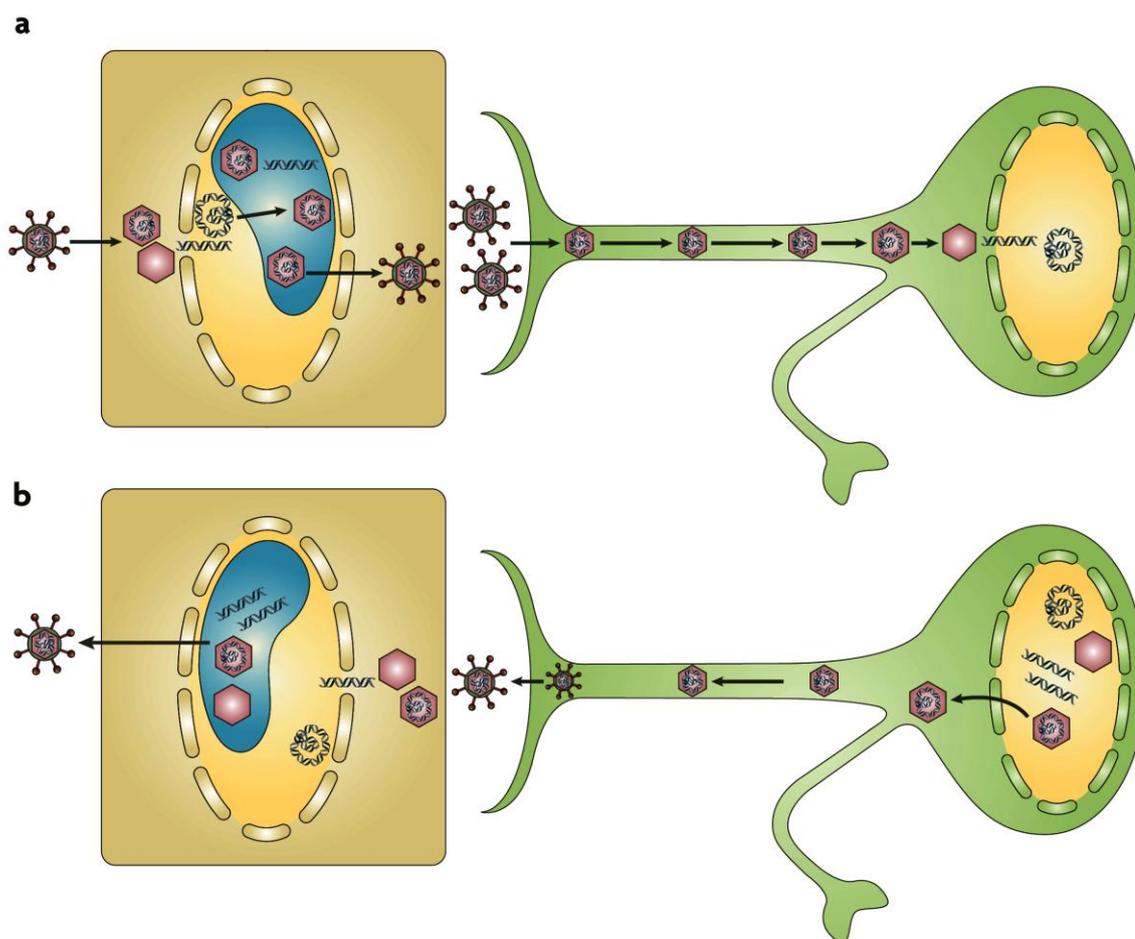


Figura 1. Estágios de infecção pelo HSV. a) Infecção primária (infecção e replicação produtiva na célula epitelial, entrada do vírus nas inervações nervosas e transporte do nucleocapsídeo viral ao corpo neuronal, onde o DNA viral é liberado no núcleo e circularizado, mantendo o estado de latência). b) Reativação viral, com formação do capsídeo e transporte às terminações nervosas, no qual a partícula infecciosa de HSV é liberada às células epiteliais resultando numa infecção recorrente (Adaptado de KNIPE *et al.*, 2008).

As infecções por HSV são freqüentemente benignas, contudo, em pacientes imunocomprometidos, como nos indivíduos infectados por HIV, existe maior risco de infecções graves (FONSECA, 1999), com aumento da taxa de mortalidade (FERREIRA & SOUSA, 2002).

1.2.2 Morfologia Viral

Estruturalmente, o HSV é formado por um genoma linear de ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*, **DNA**) em dupla hélice, envolvido por um capsídeo icosaédrico (uma estrutura proteica medindo cerca de 100 nm). O conjunto genoma e capsídeo, denominado nucleocapsídeo, é envolvido pelo tegumento, um material amorfo composto por proteínas que permitem o início da replicação viral. Por último, o tegumento é envolvido por um envelope, uma bicamada lipídica, na qual estão inseridas glicoproteínas que são essenciais para as etapas de reconhecimento e invasão celular (WHITLEY, 2001; SPEARS, 2004) (Figura 2).

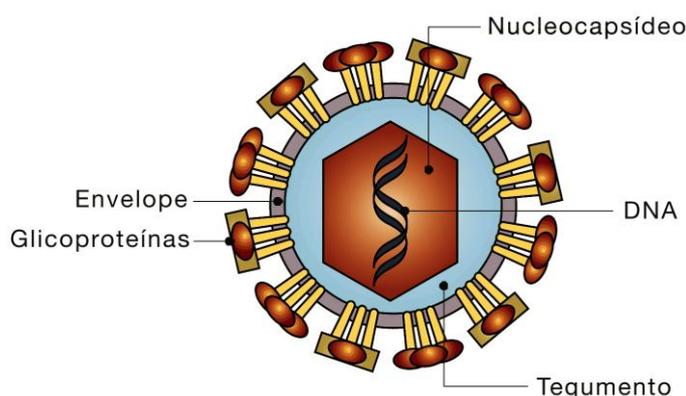


Figura 2. Organização estrutural esquemática do HSV [Modificado de COHEN & SCHAFFER, 2003].

1.2.3 Ciclo Replicativo do HSV e Alvos Anti-HSV

O processo de replicação do HSV ocorre durante a fase de infecção produtiva e envolve quatro etapas principais (Figura 3): **(a)** reconhecimento e entrada da partícula viral na célula hospedeira, **(b)** transcrição, **(c)** replicação, **(d)** montagem e liberação da partícula viral. O conhecimento aprofundado do ciclo replicativo tem permitido a identificação de alvos macromoleculares para o desenvolvimento de novos fármacos anti-HSV-1, como será discutido a seguir.

A entrada do HSV-1 nas células envolve uma série de interações entre as diferentes glicoproteínas do envelope viral e moléculas da membrana plasmática celular (MARROZIN *et al.*, 2004). As glicoproteínas **C (gC)** ou glicoproteína **B (gB)** virais se ligam a proteoglicanos celulares (*e.g.*, Heparano Sulfato, **HS**), adsorvendo a partícula viral à célula e, conseqüentemente, ativando uma interação específica da glicoproteína **D (gD)** viral com um dos receptores secundários da célula hospedeira, denominados de receptores de entrada ou de fusão celular (SPEAR & LONGNECKER, 2003; SPEAR, 2004).

Estes receptores de entrada ou de fusão celular podem ser:

i) Mediador de entrada dos vírus do Herpes (*herpesvirus entry mediator*, **HVEM**), presente em uma grande variedade de células, incluindo células T e B, células epiteliais e fibroblastos, porém não foi encontrado em células neuronais (MONTGOMERY *et al.*, 1996; SCIORTINO *et al.*, 2008);

ii) Nectina-1 e Nectina-2, presentes em células epiteliais, neuronais e fibroblastos são os principais mediadores da entrada do HSV-1 nas células hospedeiras (YOON & SPEAR, 2002; MAROZIN *et al.*, 2004);

iii) Moléculas de HS modificadas pela ação da enzima 3-O-sulfotransferase (**3-O-sulfated heparan sulfate**, **3-OS-HS**), expressas em células neuronais e endoteliais (TIWARE *et al.*, 2005; SHUKLA *et al.*, 1999).

A interação da gD viral com estes receptores (*i.e.*, HVEM, Nectina-1, Nectina-2 e 3-OS-HS) permite a fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula hospedeira (etapa **a**, Figura 3). A interrupção dessa etapa é uma abordagem importante para o desenvolvimento de novos fármacos, visto que não é necessário que o fármaco penetre nas células para agir (COEH & SCHAFFER, 2003), podendo

diminuir os efeitos adversos do mesmo. Estudos mostraram que a Heparina solúvel, uma glicosaminoglicana estreitamente relacionada com o receptor 3-OS-HS, pode se ligar a certas glicoproteínas do HSV e inibir o ataque viral à célula (PERTEL *et al.*, 1996).

Uma vez no citoplasma celular, o nucleocapsídeo migra em direção ao núcleo da célula hospedeira, onde se liga aos poros nucleares e injeta o DNA viral no nucleoplasma, essa etapa pode seguir dois mecanismos diferentes de acordo com o tipo de infecção.

No ciclo latente, o DNA viral inserido no núcleo se circulariza e se associa as histonas celulares. Esse estado se caracteriza pelo bloqueio de praticamente todos os genes virais de transcrição, exceto o gene de transcrição associado à latência (*latency-associated transcrip*, **LAT**) (SCHLEISS, 2008) mantendo o estado de latência do HSV.

Na infecção lítica, inicia-se a expressão dos genes virais no núcleo da célula hospedeira por processos de transcrição (etapa **b**, Figura 3) e replicação (etapa **c**, Figura 3), enquanto a estrutura do nucleocapsídeo viral se mantém no citoplasma celular (OJALA *et al.*, 2000; MARROZIN *et al.*, 2004). O nucleocapsídeo contém proteínas virais em seu tegumento responsáveis por “desligar” a célula hospedeira (*virus host shutoff*, **VHS**), através da degradação do RNA-m e a interrupção (“desligamento”) da síntese proteica na célula hospedeira (WHITLEY, 2001).

No núcleo, durante a etapa produtiva, o DNA viral linear é incorporado ao DNA celular e o processo de transcrição (fase **b**, Figura 3) gênica do HSV prossegue em três fases denominadas alfa (*immediately-early*), beta (*early*) e gama (*late*) (RAJCANI *et al.*, 2004), resultado da expressão de três grupos de genes virais (etapas **b**, **c** e **d**, Figura 3). Assim, o desenvolvimento de fármacos capazes de

interromper a expressão gênica viral também é uma estratégia promissora, pois limitaria a síntese de proteínas virais (COEH & SCHAFFER, 2003).

Na fase alfa (*immediately-early*), são sintetizadas proteínas que regulam positivamente as fases associadas à replicação viral. Esta fase tem início quando as proteínas virais do tegumento se ligam a fatores celulares, formando o complexo de pré-iniciação viral da síntese proteica (WHITLEY, 2001). Duas classes de moléculas com atividade anti-HSV, pirazoloquinolinas (*e.g.*, SCH-43478) e benzotiofenonas (*e.g.*, PD-146626) (Tabela 1), são descritas na literatura como inibidores da expressão de proteínas dessa fase. No entanto, em ambos os casos, as propriedades farmacocinéticas se mostraram insatisfatórias, exigindo novos estudos (COEH & SCHAFFER, 2003; BOULWARE *et al.*, 2001; ALBIN *et al.*, 1997).

Na fase beta (*early*) são sintetizadas enzimas análogas às enzimas celulares responsáveis pela replicação do DNA viral (*e.g.*, timidina quinase e polimerase de DNA) e também pelo metabolismo dos nucleotídeos. É na fase beta que agem os análogos de nucleosídeos inibidores da polimerase de DNA, como o aciclovir e derivados. O sucesso desses fármacos estimulou o desenvolvimento de novos compostos com o objetivo de identificar novos sítios de ação sobre a polimerase de DNA, como o PNU-183792, um composto da classe das dihidroquinolonas (Tabela 1) que apresentou alta especificidade à polimerases de DNA viral e praticamente inativos contra DNA polimerases humanas, mostrando-se pouco tóxicos (HARTLINE *et al.*, 2005; BRIDEAU, 2002; COEN & SCHAFFER, 2003).

Além de inibidores da DNA-polimerase, foram identificados novos compostos que atuam na fase beta, como os inibidores do complexo helicase-primase, essencial no processo de replicação viral (WU *et al.*, 2005). Como exemplo destes inibidores, podemos citar os derivados 2-amino-4-fenil-tiazola (*e.g.*, BILS-179-BS,

Tabela 1) (CRUTE *et al.*, 2002) e 5-aminosulfonil-tiazola(*e.g.*, BAY-57-1293, Tabela 1) (KLEYMANN *et al.*, 2002), que são eficazes contra HSV-1, HSV-2 e também contra cepas de HSV resistentes ao Aciclovir, além de apresentar perfis farmacocinético e toxicológicos mais favoráveis (COEN & SCHAFFER, 2003)

Por último, na fase gama (*late*) são sintetizadas proteínas estruturais virais que interagem entre si, para a montagem de uma nova partícula viral no núcleo celular. Em seguida, o nucleocapsídeo se funde à membrana nuclear interna, permanecendo encapsulado no espaço perinuclear e após fusão com a membrana nuclear externa, a nova partícula viral é exocitada. Alternativamente, nucleocapsídeos sem envelope podem permanecer no citoplasma e ser re-envelopados por vesículas do complexo de Golgi (etapa **d**, Figura 3) (SPEARS, 2004; COEN & SCHAFFER, 2003).

Diferentes classes de compostos inibem o processo de encapsulação e dissociação do DNA viral do genoma hospedeiro na fase *late* da replicação. Como exemplo, podemos citar derivados tioureia (*e.g.* WAY-150138, Tabela 1) que tem como alvo a proteína UL6, responsável pela entrada do DNA viral no capsídeo (NEWCOMB *et al.*, 2002) e derivados de acridona (AKANITAPICHAT, 2000, Tabela 1), classe que será discutida posteriormente. A eficácia clínica de inibidores da protease do HIV estimulou o estudo de proteínas envolvidas na fase *late* da replicação do herpesvírus, porém, sem sucesso na identificação de novas moléculas ativas contra este vírus específico (COEN & SCHAFFER, 2003).

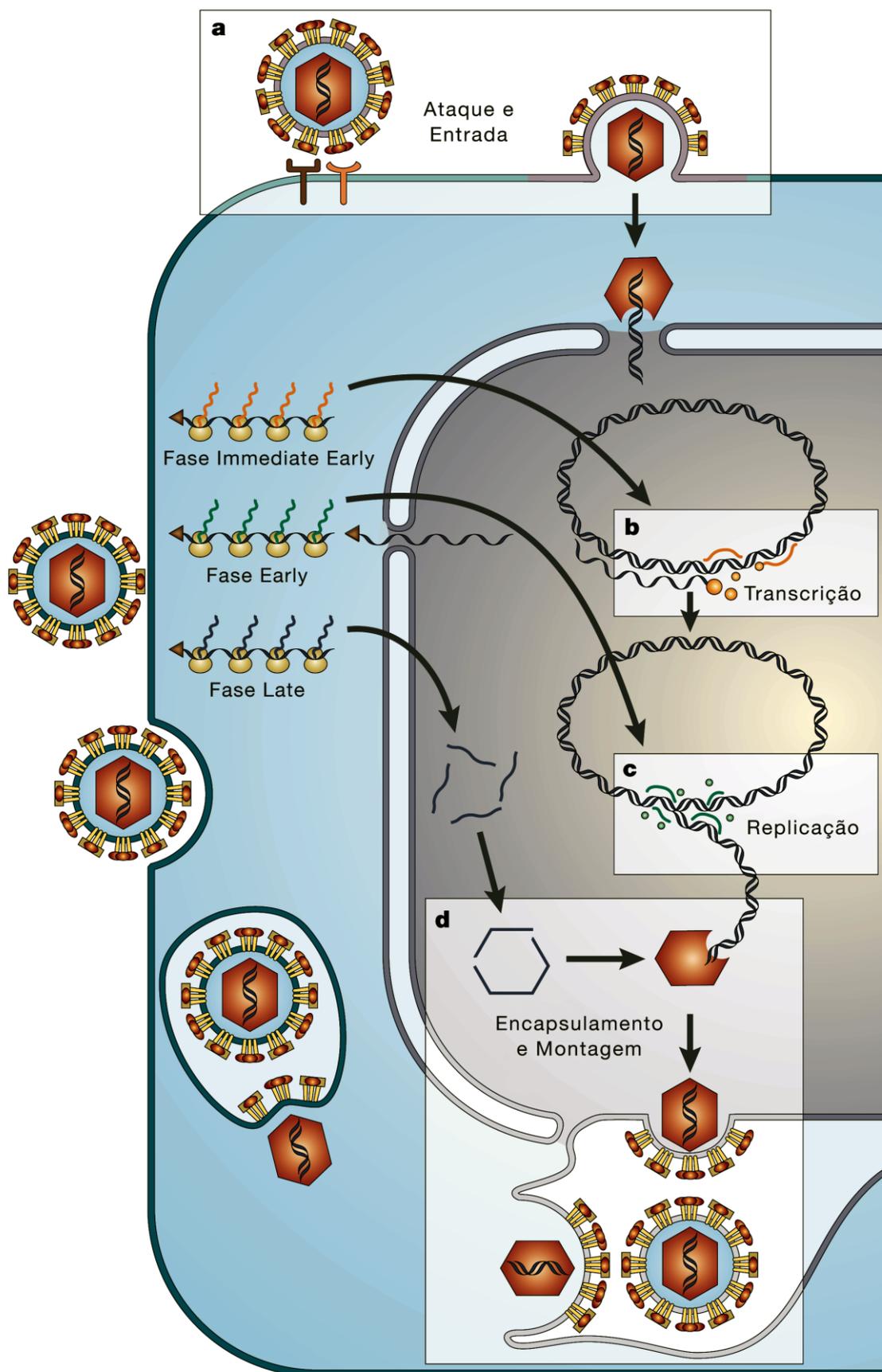


Figura 3. Ciclo replicativo do HSV (Modificado de COHEN & SCHAFFER, 2003).

 Exemplo de diferentes compostos com atividade anti-HSV

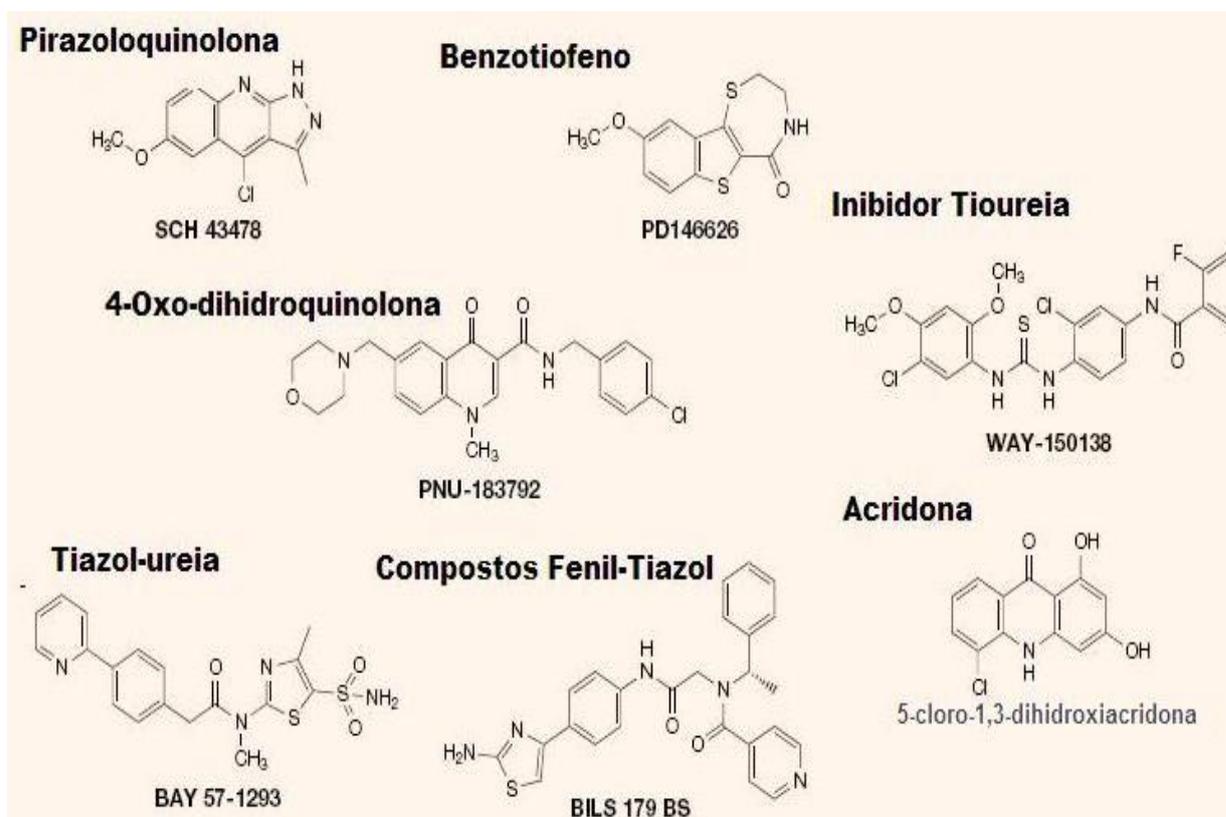


Figura 4. Exemplo de diferentes classes de compostos que apresentam atividade inibitória da replicação do HSV.

1.3 FARMACOS ANTIVIRAIS USUAIS

O estudo do ciclo replicativo dos vírus possibilitou a identificação de alguns alvos macromoleculares suscetíveis à intervenção terapêutica como discutido anteriormente. O arsenal de antivirais inclui 40 compostos oficialmente aprovados pelo FDA para uso clínico, sendo que a maioria destes compostos é utilizada como anti-HSV e anti-HIV (DE CHERCQ, 2004) e apresenta como principal alvo as enzimas virais essenciais para replicação.

1.3.1 Análogos de Nucleosídeos: Um marco como Antivirais

O desenvolvimento da terapêutica antiviral iniciou-se na década de 1960 com a utilização de dois fármacos análogos de nucleosídeos Idoxuridina e Vidarabina, para tratamento anti-HSV. No entanto devido a toxicidade sistêmica, estes compostos tiveram uso limitado (PEREIRA, 2002; COEN & SCHAFFER, 2003). Outros análogos de nucleosídeos foram introduzidos na prática clínica como fármacos antivirais, dentre os quais se destaca o Aciclovir, um análogo acíclico de nucleosídeo purínico (i.e., 2'-deoxiguanosina), comumente usado no tratamento de infecções por HSV (DE CLERQ, 2003).

Os análogos de nucleosídeos atuam por competição com nucleosídeos naturais (endógenos) pela incorporação ao DNA viral, etapa catalisada pela DNA-polimerase viral (BARRECA *et al.*, 2003). Ao serem incorporados à cadeia de DNA, torna-se impossível o alongamento da mesma, interrompendo o processo de replicação viral nas células (PEÇANHA *et al.*, 2002; KRAJEWSKI *et al.*, 2006). O Aciclovir (ACV), assim como outros análogos de nucleosídeos comporta-se como um pró-fármaco, pois a forma ativa é o trifosfato, conforme pode ser observado no mecanismo de ação esquematizado na figura 5. Inicialmente, o ACV sofre uma primeira fosforilação, mediada pela enzima viral timidina quinase (**thymidine kinase, TK**) (herpes - específica), permitindo uma concentração 40 a 100 vezes maior do fármaco nas células infectadas (YEUNG-YUE, 2002; LUPI 2000). Posteriormente, a forma monofosfato (ACV-MP) é fosforilada para a forma difosfato (ACV-DP) que por sua vez é fosforilada para a forma trifosfato (ACV-TP), sendo que essas duas fosforilações subsequentes são mediadas por quinases celulares. Finalmente o Aciclovir-trifosfato compete com o 2'-desoxinucleotídeo-5'-trifosfato (dNTPs) pela polimerase viral, sendo ele próprio incorporado à cadeia de DNA viral em formação,

ocupando o lugar do nucleotídeo. Entretanto, a ausência do grupo 3'-hidroxila na estrutura do ACV, impede a incorporação de novos nucleotídeos necessários ao alongamento da cadeia de DNA viral. Desta forma, o ACV-TP atua como um inibidor competitivo, finalizando a cadeia e, conseqüentemente, inativando a DNA-polimerase (LUPI, 2000; PEREIRA, 2002; COEN & SCHAFFER, 2003) (Figura 5). A etapa de ativação pela TK viral, no entanto, não é necessária para análogos de nucleotídeos (*i.e.*, análogos de nucleosídeos mono-, di- ou trifosfatados), como o cidofovir (Figura 6).

Durante tratamentos prolongados de infecções por HSV com análogos de nucleosídeos, como o ACV, frequentemente surgem cepas resistentes (STRANSKA *et al.*, 2005). Outros análogos de nucleosídeos/nucleotídeos em uso clínico, como o valaciclovir (pró-farmaco do aciclovir na forma de Ester de valina), Penciclovir, Fanciclovir (pró-farmaco do penciclovir na forma diacetato), Ganciclovir e Cidofovir (não análogo de nucleosídeo, e sim análogo de nucleotídeo) (Figura 6). Apresentam sucesso terapêutico no tratamento de infecções pelo HSV, principalmente nos casos de cepas de HSV resistentes ao Aciclovir. No entanto, estudos mostram o surgimento de novas cepas resistentes também a esses fármacos (DE CLERCQ *et al.*, 2001; YEUNG-YUE *et al.*, 2003; ADELSON *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2005; SIMPSON, 2006).

De um modo geral, a resistência viral está diretamente relacionada ao surgimento de mutações nos genes que codificam enzimas essenciais ao processo de replicação viral, associada a características próprias do vírus, como variabilidade genética, latência e reativação (DE CLERCQ *et al.*, 1998).

No caso dos vírus HSV, a resistência aos análogos de nucleosídeos está relacionada, geralmente a mutação nos genes que codificam as enzimas virais TK,

tornando-a incapaz de realizar a primeira etapa de fosforilação (FONSECA, 1999), e DNA polimerase, tornando-a incapaz de incorporar o fármaco na forma trifosfato à cadeia de DNA e crescimento (COEN & SCHAFFER, 2003).

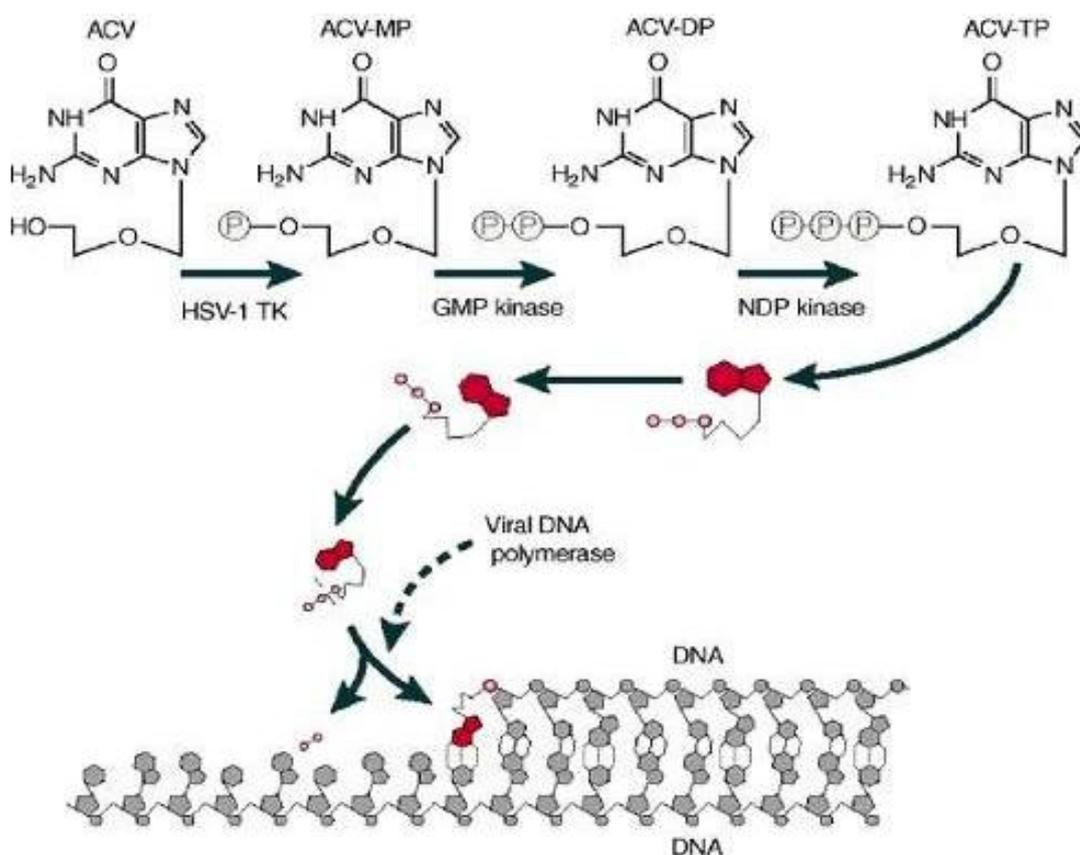


Figura 5. Mecanismo de ação do Aciclovir (De clerq, 2004).

Persistir no tratamento de infecções por cepas HSV fármaco-resistentes, além do desconforto da própria infecção e da manutenção da carga viral, ocasiona uma redução significativa do índice terapêutico do fármaco em questão, exigindo dose maior para produzir o efeito clínico, o que causa sérios efeitos colaterais (COEN & SCHAFFER, 2003).

Os efeitos colaterais destes fármacos, independentes da resistência, também devem ser considerados. No caso do ACV, por exemplo, estudos mostram que a administração sistêmica de ACV está correlacionada com a formação de cristais

deste fármaco nos rins, podendo provocar insuficiência renal (LYON *et al.*, 2002). Assim como o cidofovir, que também é nefrotóxico (BREDY & BERNSTEIN, 2004). Além disso, tanto o ACV quanto o Ganciclovir podem ocasionalmente apresentar neurotoxicidade (ERNST & FRANEY, 1998).

Análogos de nucleosídeos anti-HSV

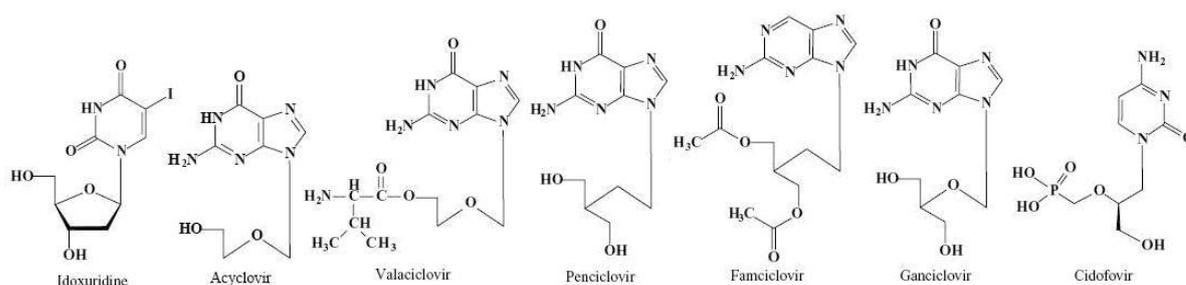


Figura 6. Estrutura dos análogos de nucleosídeos anti-HSV licenciados.

1.3.2 Inibidores Análogos de Pirofosfatos

Os análogos de pirofosfatos, na forma de ácido fosfonofórmico ou fosfonoacético, exercem atividade antiviral ligando-se O estudo de inibidores não análogos de nucleosídeos começou há aproximadamente 18 anos, com a descoberta da classe do hidróxi-etóxi-metil-feniltiotimina (HEPT) e do tetraidroimidazobenzodiazepinona (TIBO) como inibidores da transcriptase reversa do HIV (BRITO, 2008). Os inibidores não nucleosídeos da RT (NNRTIs) ligam-se ao sítio específico da enzima, alterando sua habilidade funcional (BARRECA *et al.*, 2003) e inibe a atividade enzimática (KRAJEWSKI *et al.*, 2006).

Um fármaco não análogo de nucleosídeo usado no tratamento anti-HSV é o Foscarnet (ácido fosfonoformico trissódico) (CHILUKURI & ROSEN, 2003) comumente usado em infecções mucocutâneas por HSV Aciclovir resistentes em pacientes imunocomprometidos. O Foscarnet tem duas ações, ele pode agir

diretamente inibindo a atividade da DNA-polimerase, como é o caso do herpesvírus, e também pode inibir a transcriptase reversa nos retrovírus (HODINKA). No entanto, possui uma nefrotoxicidade acentuada, também associada à formação de cristais. Entretanto, cepas resistentes ao Foscarnet também estão surgindo e exigindo que novos agentes antivirais para o tratamento de HSV sejam desenvolvidos (BRADY & BERNSTEIN, 2004; MORFIN & THOUVENOT, 2003; CHILUKURI & ROSEN, 2003) (Figura 7).

Não análogos de nucleosídeos anti-HSV

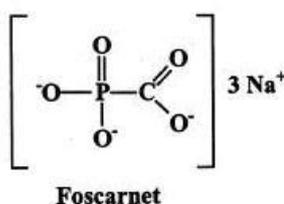


Figura 7 – Estrutura do Foscarnet.

A necessidade de desenvolver novos fármacos antivirais mais potentes às diferentes cepas resistentes, com baixos efeitos colaterais e custos reduzidos impulsiona muitos pesquisadores no estudo de compostos mais promissores, assim focamos nosso trabalho no estudo de derivados de acridona e naftiridínicos com atividade anti-HSV-1.

1.3.3 Derivados Acridona Candidatos a Fármacos

Derivados de acridona é uma classe de agente bioativos usada como antibacteriano e antiprotozoário (DELMAS *et al.*, 2004; PASQUALI, 2008). Recentemente estudos tem revelado sua propriedade antitumoral (BOUFFIER *et al.*, 2006; KANOPA, 2001) e antiviral. Acredita-se que a área planar do núcleo tricíclico da acridona (Figura 8) favoreça na habilidade da molécula de se ligar ou intercalar

aos pares de bases nucleotídicas da hélice de DNA ou RNA (FADEYI *et al.*, 2008; SOURDON *et al.*, 2001). Além disso, estudos sugerem essas moléculas como alvo na inibição de diferentes pontos dos processos metabólicos das células, como por exemplo, na inibição de sistemas enzimáticos como as topoisomerasas celulares (PINZARU e MORARI, 2004), e inibição na bomba transmembranar de proteína que fornecem multi-resistência a linhagens de células cancerosas (EVERS *et al.*, 2000).

Diferentes derivados de acridona, sintéticos ou naturais, têm mostrado resultados promissores na atividade antiviral através de mecanismos de ação diversos e atípicos. Como exemplo, podemos citar os derivados ácido carboxílico 4-acridona, que tem ação contra os vírus da hepatite C, inibindo as enzimas helicase e polimerase (STANKIEWICZ-DROGON *et al.*, 2008); e o composto 10-carboximetilacridona (10-CMA), com ação na inibição do vírus da influenza, e adenovírus atuando como um potente indutor de interferon com baixo peso molecular, que também apresenta outros mecanismos de ação inibitória na replicação viral (ZARUBAEV *et al.*, 2003).

Estudos de Taraporewala (TARAPOREWALA *et al.*, 1992) mostraram que 10-CMA também apresenta inibição da replicação do HIV em células mononucleares do sangue periférico. Mostrou também que o Dercetin (Pirido[4,3,2-*mn*]tiazolo[5,4-b]acridine), outro derivado natural de acridona, originada da fauna marinha, pode apresentar ação extracelular, evitando o ataque viral por inibir a ligação do HIV-1 aos linfócitos H-9, ou ação intracelular, pela intercalação aos ácidos nucleicos funcionando como um antiviral não nucleosídeo (TARAPOREWALA *et al.*, 1992). Derivados sintéticos de acridona, como bistriazoloacridona (Temacrazine) e 1-hidroxi-10-metil-9,10-dihidroacrid-9-one (RD6-5071) também mostram ação anti-HIV.

Temacrazine inibe processos relacionados à transcrição do HIV-1, mostrando um bloqueio na formação do RNA do vírus sem interferir na transcrição do gene celular ou nas proteínas regulatórias da expressão genica do HIV. Além disso, o temacrazine não afeta o ataque viral nem a atividade enzimática da transcriptase reversa do HIV-1 (TURPIN *et al.*, 1998). O RD6-5071 inibe a infecção crônica do HIV-1 em várias células de linhagem mielóide, estando diretamente relacionados à inibição de mecanismos presentes na via de ativação da replicação viral como Proteína-Kinase C celular (FUJIWARA *et al.*, 1999, GELUS *et al.*, 1999).

Muitas pesquisas no desenvolvimento de antivirais com derivados de acridona foram realizados frente ao vírus da herpes. O alcaloide citrusinina-I (1-hidroxi acridona) foi um dos primeiros derivados de acridona descritos frente aos vírus d herpes (HSV-1 e HSV-2), atuando como um potente inibidor da síntese de DNA viral (YAMAMOTO *et al.*, 1989).

Mais recentemente, Lowden e Baston (2003) relataram dois derivados 1,3-dihidroxiacridona (Figura 8) que apresentam potente atividade inibitória do processo, i.e., os derivados 5-metoxi-1,3-dihidroxiacridona ($ED_{50} = 2.2 \mu M$) e 5-cloro-1,3-dihidroxiacridona ($ED_{50} = 4 \pm 1 \mu M$).

Esses resultados se tornaram mais interessantes quando identificados diferentes mecanismos de ação para esses derivados. O derivado 5-cloro-1,3-dihidroxiacridona inibiu uma ou mais etapas do processo de desenvolvimento viral, levando à formação de capsídeos virais defeituosos, enquanto que o derivado 7-Cloro-1,3-dihidroxiacridona inibe a DNA topoisomerase II, usada no processo de replicação (BASTOW *et al.*, 1994 e VANCE E BASTOW, 1999; AKANITAPICHAT *et al.*, 2000; AKANITAPICHAT & BASTOW, 2002; LOWDEN & BASTOW, 2003).

 Derivados de Acridona com atividade anti-viral

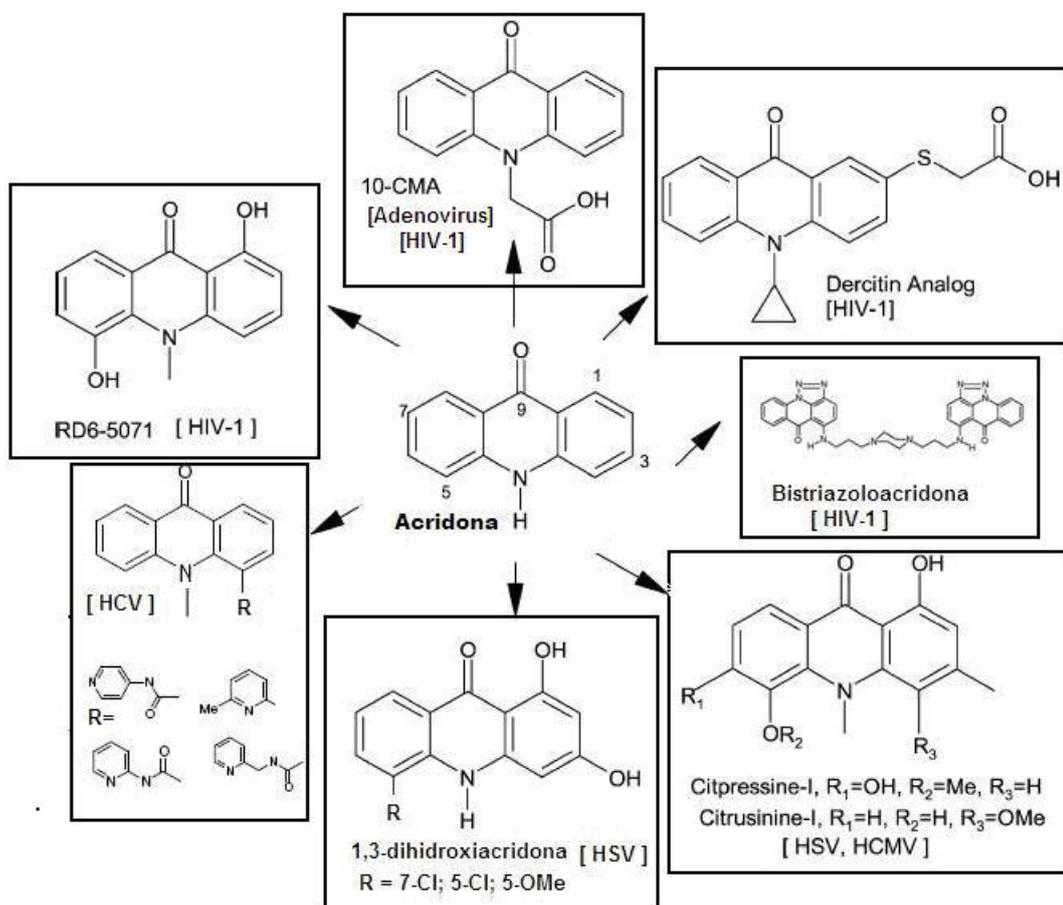


Figura 8- Esquema e estrutura dos derivados de acridona antiviral.

Esses estudos sugerem que derivados acridona são uma nova classe inibidora da replicação do HSV, reforçando que esses compostos podem ser protótipos antivirais promissores, exigindo estudos de novos derivados análogos da acridona.

1.4 PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS

1.4.1 Panorama geral

A sobrevivência e crescimento da indústria farmacêutica requerem investimentos significativos em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) de novas entidades químicas, que possam atuar como fármacos com maior eficácia e seletividade. Entretanto esse processo é custoso, demanda tempo além de ser altamente arriscado, visto que a probabilidade de sucesso é inferior a 20%. (YU YU & GITTINS, 2008). Estudos de DIMASI e colaboradores (DIMASI *et al.*, 2003) estimam gastos que excedem US\$ 800 milhões em um tempo de aproximadamente 10-15 anos (PhRMA, 2007; RAWLINS, 2004). De acordo com a *Pharmaceutical Research and Manufactures of America - PhRMA*- dentre 5.000-10.000 candidatos a fármacos, apenas um passa para fase de testes pré-clínicos e clínicos e é submetido a aprovação da agência regulatória de drogas e alimentos (*Food and Drugs Agency - FDA*) para comercialização.

Assim, para minimizar tempo e custos, inovações científicas e tecnológicas que combinam conhecimentos multidisciplinares de informática, biotecnologia, química e biologia (DREWS, 2003) surgem como ferramentas que auxiliam no planejamento de novos fármacos. O planejamento de fármacos auxiliado por computador (*Computer-Aided Drug Design - CADD*) é uma dessas evoluções tecnológicas promissoras (TANG *et al.*, 2006), visto que a modelagem molecular possibilita a construção, visualização, manipulação e estocagem de modelos moleculares tridimensionais, incluindo também análise conformacional, cálculos de propriedades estéricas, eletrônicas, físicas entre outras.

Como todo processo de desenvolvimento de um novo fármaco inicia com um grande número de candidatos, o CADD permite a elaboração precoce de moléculas com perfil adequado e direciona a pesquisa para moléculas mais ativas, minimizando o universo de compostos a serem analisados, com isso os gastos na pesquisa de novo fármaco podem reduzir em até 50% (GELDENHUYS *et al.*, 2006) (Figura 9).

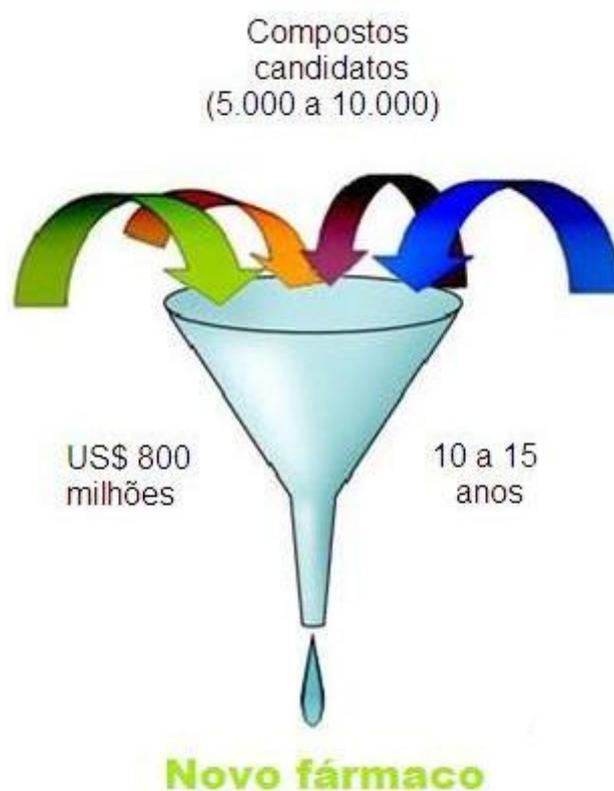


Figura 9. Esquema do processo de P&D de novos fármacos, ilustração do estreitamento de candidatos a um novo fármaco.

Muitas são as técnicas de CADD disponíveis para serem empregadas na descoberta de novas moléculas candidatas a fármacos e a escolha de uma delas depende das informações estruturais disponíveis da molécula alvo por exemplo, enzima, receptor, DNA/RNA, etc) e do ligante como substrato, inibidor, agonista, antagonista (MEEK *et al.*, 2006). De um modo geral, o planejamento de novos

candidatos a fármacos por CADD pode ser dividido em duas abordagens denominadas planejamento “direto” e “indireto”.

Com o método “direto” considera nos estudos a estrutura tridimensional do complexo ligante e macro-molécula-alvo, quer seja experimentalmente por difração de raios-X ou por ressonância magnética nuclear, quer seja obtida por modelagem por homologia (ou comparativa). Por esse método analisa-se o complexo ligante-macromolécula, identificando possíveis sítios de ligação e principais modos de interação. Isso permite sugerir modificações específicas no ligante, com o objetivo de aumentar o grau de afinidade e/ou especificidade com relação ao alvo (JORGENSEN *et al.*, 2004; CHAVATTE E FARCE, 2006).

O método “indireto”, por sua vez, não considera a estrutura tridimensional da molécula-alvo. Nesse caso, informações como atividade biológica, características estruturais e estereoeletrônicas de uma série de ligantes (compostos ativos e inativos) determinam propriedades específicas que podem influenciar na interação com a macromolécula-alvo (JORGENSEN *et al.*, 2004). Esses dados podem ser usados em estudos de Relação Estrutura-Atividade (**Structure Activity Relationship, SAR**), permitindo gerar um modelo que pode ser utilizado para a seleção de compostos de um banco de dados ou para orientar no processo de planejamento de novos fármacos (SOUZA, 2007; BARREIRO *et al.*, 1997; LEACH, 1996; COHEN, 1990).

Outra estratégia que pode reduzir o tempo gasto em Pesquisa e desenvolvimento de um novo fármaco é a realização de estudos farmacocinéticos e toxicológicos com estágios iniciais de P&D. A predição *in silico* de parâmetros **ADMET** (**A**bsorção, **D**istribuição, **M**etabolismo, **E**xcreção e **T**oxicidade) permite uma avaliação, a priori, do perfil farmacocinético e toxicológico esperado para candidatos

a protótipos de fármacos, consistindo num método alternativo para auxiliar na seleção do protótipo de melhor perfil farmacoterapêutico.

1.4.2 Métodos de cálculo de Modelagem Molecular

1.4.2.1 Mecânica Molecular

A mecânica molecular trata a molécula como uma coleção de esferas conectados por molas, onde as esferas representam os núcleos atômicos e as molas as ligações químicas (RODRIGUES, 2001). Os movimentos dos núcleos são estudados por forças harmônicas ou elásticas, usando os princípios da física clássica (Leis de Newton), enquanto que os elétrons não são explicitamente examinados, mas assume-se que estes têm uma distribuição ótima em torno dos núcleos (LEACH, 2001; FORESMAN, 1993).

Esses cálculos adotam um conjunto de forças descritas como funções de energia potencial de características estruturais (*i.e.*, comprimento de ligação, ângulo de ligação, ângulo diedro) e não ligantes (*i.e.*, eletrostáticas e van der Waals). A combinação dessas funções de potencial e o conjunto de parâmetros associado é denominado “campo de força” (do inglês, *force field*).

Assim, a energia potencial total (E_{total}) de um sistema molecular é descrita simplificada, pela equação de Westheimer (Equação 1) (ANDREI *et al.*, 2003; COHEN, 1996; SANT’ANNA, 2002), que representa a somatória dos termos de energia ligante ($E_{ligante}$) e não ligante ($E_{não-ligante}$).

$$E_{total} = (E_{ligantes}) + (E_{não-ligante}) = (E_s + E_a + E_t) + (E_{elet} + E_{vdw}) \quad (\text{Equação 1})$$

Na equação 1, E_s = energia de deformação (estiramento ou compressão) axial (comprimento de ligação); E_a = energia de deformação (abertura ou fechamento) angular (ângulo de ligação); E_t = energia de rotação de ligação (ângulo de torção); E_{elet} = energia eletrostática; E_{vdw} = energia de van der Waals (estérica).

Cada um desses termos representa a diferença de energia entre a molécula hipotética, sendo todos os parâmetros estruturais, em valores “ideais” ou “naturais” (ANDREI *et al.*, 2003; SANT’ANNA, 2002), onde qualquer desvio desses parâmetros dos valores “ideais” resulta em penalidades energéticas para a geometria molecular (SOUZA, 2007).

Os parâmetros associados ao conjunto de átomos que compõem uma molécula permanecem razoavelmente constantes entre estruturas diferentes, desde que os tipos de ligações e a hibridação dos átomos envolvidos (*i.e.* tipos de átomos) sejam os mesmos (COHEN, 1996), permitindo que as funções de energia potencial possam ser transferidas entre conjuntos de moléculas semelhantes.

Comparada a outros métodos de cálculo da estrutura molecular, a mecânica molecular é relativamente simples, rápida e pode ser aplicada a sistemas grandes como enzimas, no entanto, os resultados são limitados pela qualidade e abrangência dos parâmetros e pelas constantes usados na construção do modelo.

Os perfis de energia potencial obtidos com estes métodos têm significados limitados, visto que, normalmente apenas pontos extremos são usados no procedimento de parametrização (COHEN, 1996). Assim a confiabilidade desses cálculos depende das funções de energia potencial e da qualidade dos parâmetros utilizados, sendo, a escolha de um campo de força adequado para uma investigação, de grande importância (AFONSO, 2008).

Diferentes campos de forças estão disponíveis nos programas computacionais, tais como: uma serie de campos de força denominados “MM3” (*Molecular Mechanics 3*) e “MM4” (*Molecular Mechanics 4*) contendo diversos termos desenvolvidos por Allinger e colaboradores, empregados para reproduzir dados experimentais (e.g., calor de formação) de moléculas orgânicas em geral, campos de força mais simples, como **AMBER** (*Assisted Model Building and Energy Refinement*) e **CHARMM** (Chemistry at **H**arvard **M**acromolecular **M**echanics), empregados para simulação de moléculas mais complexas, como aminoácidos e proteínas, dentre outros (COHEN, 1990).

1.4.2.2 Mecânica Quântica

Métodos de mecânica quântica consideram, explicitamente, os núcleos e os elétrons dos átomos que compõem uma molécula e são fundamentados em soluções aproximadas para a equação de Schrödinger, onde o comportamento ondulatório dos elétrons é considerado no cálculo de energia do sistema.

Nesta abordagem, postula-se a existência de uma função de coordenadas nucleares e eletrônicas, denominada como função de onda Ψ , que é a solução da equação de Schrödinger. Para o arranjo de elétrons e núcleos, são obtidas energias da molécula e a função de onda associada. A função de onda contém todas as informações sobre a molécula e, a partir dela, podem ser calculadas todas as propriedades eletrônicas e estruturais da molécula (ANDREI *et al.*, 2003)

As funções de onda são descritas por orbitais como os gerados pelos átomos de hidrogênio, assim, a solução exata das equação de Schrödinger só pode ser resolvida para sistemas monoelétrônicos, como o átomo de hidrogênio

(FORESMAN, 1993). Todavia, soluções aproximadas são possíveis para as moléculas de interesse, acrescentando-se algumas aproximações, com variações adicionais, que otimizam os cálculos. De um modo geral, dois tipos de tratamentos quanto-mecânicos têm aplicação em modelagem molecular, são eles os métodos *ab initio* e os métodos semi-empíricos.

1.4.2.2.1 Métodos *ab initio*

O termo *ab initio* deriva do latim e significa “a partir do princípio”, ou seja, os métodos *ab initio* estão embasados nos princípios da física quântica, utilizando a equação de Schrödinger, na medida do possível, sem aproximações, para tratar todos os elétrons de um sistema químico. Os cálculos utilizam conjuntos de bases atômicas que requerem parâmetros de constantes físicas fundamentais como velocidade da luz, constante de Planck e massa das partículas elementares (AFONSO, 2008).

Na prática, aproximações são necessárias para restringir a complexidade da função de onda eletrônica e tornar seu cálculo possível (SANT'ANNA, 2002). Assim, funções de ondas muito precisas para os orbitais foram desenvolvidas inicialmente por Hartree e, depois, ajustadas a expressões analíticas, denominadas funções de onda atômica de Slater (também conhecidas como orbitais do tipo Slater, **STO**, *Slater type orbital*). No caso dos métodos *ab initio* mais modernos, são empregadas funções de probabilidade Gaussianas (e.g., 3-21G, 6-31G) que, apesar de não descreverem as funções de onda atômicas tão bem quanto às funções de Slater, permitem que os cálculos sejam executados mais rapidamente (RODRIGUES, 2002)

O primeiro tipo de cálculo de estrutura eletrônica *ab initio* foi o método de **Hartree-Fock (HF)**. Esse modelo emprega nos cálculos um conjunto de funções de base ("*basis set*"), que contém o número mínimo de funções necessário para acomodar todos os elétrons de um átomo nos orbitais. Por exemplo, uma única função do tipo *1s* para os átomos de hidrogênio e hélio, funções *1s*, *2s* e *2p* para os elementos do lítio ao neônio e assim por diante. Assim, uma base mínima de dados inclui todos os orbitais atômicos em uma camada (SOUZA, 2007).

A nomenclatura dos vários métodos define o modo de subdivisão das funções de base, por exemplo, no conjunto de base 3-21G, cada orbital atômico de camada interna é representado por uma única função descrita em termos de três Gaussianas, enquanto que as funções que representam os componentes internos e externos dos orbitais atômicos de valência são descritas como expansão de duas e de uma Gaussiana, respectivamente (LEACH, 2001).

No entanto, as bases ditas como mínimas apresentam diversas deficiências, um problema, em particular, ocorre com compostos contendo átomos do final do período, como oxigênio e flúor. Estes átomos são descritos utilizando-se o mesmo número de funções de base usado para os átomos do início do período, apesar deles possuírem mais elétrons. O simples aumento do número de funções não, necessariamente, soluciona o problema ou aprimora o modelo. A solução mais comum deste problema é a introdução de funções de polarização, que possuem um número quântico angular mais elevado, correspondendo aos orbitais *p* para o hidrogênio e *d* para os demais átomos (LEACH, 2001).

O uso de bases contendo funções de polarização é indicado pela letra que designa a função (e.g., *p*, *d*) ou por asterisco (*). Assim, 6-31G(*d*) ou 6-31G* refere-se à base de dados 6-31G com funções de polarização (i.e., *d*) para átomos

pesados (i.e., não hidrogênio); 6-31G(*d,p*) ou 6-31G** refere-se a base de dados 6-31G(*d*) com funções de polarização (i.e., *p*) para os átomos de hidrogênio e hélio. A base de dados 6-31G(*d,p*) é particularmente útil quando ocorrem interações por ligação hidrogênio (LEACH, 2001).

Estas bases de dados são suficientes para a maioria dos cálculos. Entretanto, para alguns cálculos de nível mais elevado, uma base de dados que efetivamente habilite o limite a ser alcançado deve ser considerada. Por outro lado, o custo computacional inerente a estas bases de dados deve ser avaliado, de modo a ter-se uma relação custo/benefício aplicável (KARELSON *et al.*, 1996).

Apesar dos métodos *ab initio* fornecerem uma predição quantitativa de alta qualidade para uma grande variedade de sistemas, eles são demorados e de alto custo computacional para serem aplicados a moléculas relativamente grandes. Para solucionar este problema, um recurso comumente usado é o de empregar um conjunto de bases mais simples nas etapas de otimização de geometria e, na geometria resultante, executar cálculo aplicando de ponto único (*Single Point*) um método mais completo. Isso permite determinar diversas propriedades de um sistema molecular, atreves de bases de cálculos mais sofisticados (FORESMAN, 1993).

1.4.2.2.2 Métodos Semi-Empíricos

Os métodos semi-empíricos são baseados no mesmo formalismo dos métodos *ab initio*, entretanto, empregam apenas bases mínimas, considerando somente os elétrons da camada de valência, e incorporam parâmetros nos cálculos dos elétrons da camada interna. Estes parâmetros podem ser empíricos (i.e.,

derivados de dados experimentais, como geometria de equilíbrio, calor de formação, momento dipolo e potencial de ionização) (HENRE, 2003) ou previamente calculados (a partir da equação de Schrödinger), tornando desnecessário o cálculo de alguns integrais presentes nos métodos *ab initio*, simplificando os cálculos computacionais (SANT'ANNA, 2002).

O primeiro método a utilizar essa aproximação é o **CNDO** (*Complete Neglect of Differential Overlap* ou Negligência Completa da Sobreposição Diferencial, onde os orbitais atômicos são considerados esfericamente simétricos na avaliação das integrais de repulsão eletrônica. O estágio seguinte é representado pelo método **INDO** (*Intermediate Neglect of Differential Overlap* ou Negligência Intermediária da Sobreposição Diferencial) que inclui integrais de repulsão do centro entre orbitais atômicos de um mesmo átomo. O método **NDDO** (*Neglect of Diatomic Differential Overlap* ou Negligência da Sobreposição Diferencial Diatômica) foi o primeiro a incluir a direcionalidade dos orbitais atômicos nos cálculos das integrais de repulsão.

Objetivando tornar os cálculos mais acessíveis, uma série de outros métodos semi-empíricos foram desenvolvidos, como o método **MINDO/3** (*Modified Intermediate Neglect of Differential Overlap, version 3* ou Negligência Intermediária Modificada da Sobreposição Diferencial, versão 3), que é uma modificação do **INDO**, usando parâmetros para aproximar as integrais de repulsão de um centro e constantes para avaliar integrais de ressonância, no entanto a repulsão entre pares de elétrons solitários é significativa, apresentando erros sistemáticos.

Além do método **MINDO** (*Modified Neglect of Differential Overlap* ou Negligência Modificada da Sobreposição Diferencial), desenvolvido a partir da aproximação NDDO, seguiram-se os métodos **AM1** (*Austin Model 1* ou Modelo

Austin 1) (DEWAR, 1985) e **PM3** (*Parametric Method 3* ou *Método Paramétrico 3*) (STEWART, 1989), que são os métodos semi-empíricos mais comumente utilizados.

Os dois métodos incorporam aproximações muito semelhantes, porém diferem nas suas parametrizações, com diferenças como: PM3 que usa duas funções Gaussianas para funções de repulsão do núcleo, ao invés de um número variável como usado pelo AM1 (SOUZA, 2007).

A grande vantagem dos métodos semi-empíricos é a velocidade de processamento, uma vez que os cálculos são simplificados, reduzindo os custos de memória e tempo computacional, além de fornecerem descrições qualitativas razoáveis dos sistemas moleculares (FORESMAN, 1993).

1.4.3 Análise Conformacional

A análise conformacional é uma busca das possíveis conformações que uma molécula pode assumir e seus respectivos estados de energia. Esta análise é realizada pela rotação das ligações simples, onde são alterados os ângulos de torção ou ângulos de diedro e calculados os correspondentes estados de energia para cada conformação (LEACH, 2001; THOMAS, 2003).

A análise conformacional é uma das primeiras etapas em estudos de modelagem molecular de um candidato a fármaco. As moléculas desenhadas e minimizadas na forma tridimensional não estão, necessariamente, na conformação mais estável, visto que, durante a geração das estruturas 3D, podem ocorrer distorções na molécula, como deformações de comprimentos de ligação, de ângulos de ligação e de ângulos de torção.

A técnica mais rigorosa de realizar uma análise conformacional é combinar sistematicamente todos os ângulos de torção relevantes de um molécula, chamada pesquisa de grade (*grid search*). No entanto, a aplicação desta metodologia é limitada ao número excessivo de de conformações que podem ser geradas, em função do número de ligações rotáveis existentes na molécula. O número de confôrmeros a ser analisado equivale a $(360^\circ/\theta)^n$, onde θ é o incremento (em graus) usado no processo de varredura de cada ângulo de torção e n é o número de ligações rotáveis avaliadas. Quanto menor for o incremento θ e quanto maior for o número de ligações rotáveis, maior será o número de conformações geradas, mas, na prática, apenas alguns confôrmeros são importantes.

1.4.4 Descritores Moleculares

A modelagem molecular permite a identificação e uma maior compreensão de propriedades físico-químicas, estruturais e estéreo-eletrônicas das moléculas, verdadeiras “impressões digitais”, que nos informam o grau de diversidade estrutural num conjunto de compostos.

Sabendo que moléculas bioativas formam complexos com as biomacromoléculas-alvo (e.g., enzimas e receptores) por um mecanismo de reconhecimento molecular, diretamente relacionado à estrutura química das moléculas envolvidas (COHEN *et al.*, 1990; BARREIRO *et al.*, 1997), obter esses parâmetros, também chamados de descritores moleculares, é de suma importância no estudo da relação estrutura química e atividade biológica.

Um descritor molecular pode ser considerado como sendo o resultado obtido de procedimento lógico e matemático, aplicado às informações químicas codificadas

pela representação de uma molécula (CONSONNI *et al.*, 2002). Por exemplo, cálculos de mecânica quântica podem evidenciar, detalhadamente, a natureza eletrônica das estruturas moleculares e, assim, os estudos teóricos podem fornecer resultados de grande valia, devido ao alto conteúdo de informações físico-químicas de moléculas farmacologicamente ativas ou inativas (THOMAS, 2003).

Como exemplos de alguns destes descritores, podemos citar:

a) Mapa de Potencial Eletrostático Molecular (*Molecular Electrostatic Potential, MEP*), que revela o volume e a forma moleculares e a localização dos potenciais eletrostáticos atrativos (negativos) e repulsivos (positivos) na superfície da molécula;

b) Momento de Dipolo Molecular, que reflete a polaridade global da molécula;

c) Orbitais Moleculares de Fronteira HOMO (orbital molecular ocupado de maior energia, *Highest Occupied Molecular Orbital*) e LUMO (orbital molecular desocupado de menor energia, *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) e seus respectivos valores de energia são importantes nas reações químicas e na formação de complexos de transferência de carga; os coeficientes indicam a contribuição atômica; e as densidades indicam regiões suscetíveis a ataques nucleofílicos e eletrofílicos.

1.4.5 Parâmetros Farmacocinéticos e Toxicológicos *in silico*

O planejamento racional de fármacos compreende estudos que visam o aumento da potência e da seletividade, a adequação dos perfis farmacocinético e toxicológico (diminuição da toxicidade) de uma substância protótipo. Durante o processo de P&D de um fármaco, um estudo ADMET (Absorção, Distribuição,

Metabolismo, Excreção e Toxicidade) eficiente é essencial para que a Indústria Farmacêutica tenha uma economia de tempo e dinheiro.

A otimização destas propriedades, por modificações moleculares de compostos promissores, é essencial na seleção de substâncias candidatas com maiores probabilidades de não serem descartados na fase clínica. Assim, atualmente, estudos ADMET vêm sendo aplicados em etapas anteriores do desenvolvimento de fármacos, economizando tempo e delineando melhor o estudo de novos compostos (DAVIS & RILEY, 2004).

A lipofilicidade de uma molécula é uma das propriedades mais importantes no processo farmacocinético, sendo considerada nos estudos de absorção intestinal, permeabilidade da membrana, ligação a proteínas e distribuição em diferentes tecidos. Esse descritor é definido, geralmente, pelo coeficiente de partição (P) de um composto entre 1-octanol e água, sendo expresso na forma logarítmica, i.e., LogP (RAEVSKY, 2004).

Para uma análise precisa do perfil ADMET (farmacocinético e toxicológico) de um candidato a fármaco, métodos de triagem (*screening*) *in vitro* são realizados, como ensaios de solubilidade, absorção, permeabilidade, metabólitos formados (YAMASHITA & HASHIDA, 2004). Sabendo-se que os efeitos adversos e a toxicidade dos compostos estão diretamente relacionados às respectivas estruturas químicas, essas são lançadas em modelos computacionais, que correlacionam as características estruturais e as propriedades físico-químicas com alguns efeitos em potencial como toxicidade, mutagenicidade entre outros, realizando um *screening* virtual.

Assim, a estimativa de propriedades ADMET por métodos computacionais (i.e., ADMET *in silico*) é uma área promissora (VOTANO *et al.*, 2004), podendo

auxiliar na redução do tempo e do custo do processo de P&D de novos fármacos (HOU *et al.*, 2007; SITARAMA *et al.*, 2006; VOTANO *et al.*, 2004).

1.4.5.1 ADMET *in silico*

A cada ano, é crescente o número de publicações de métodos computacionais que são capazes de estimar o perfil ADMET de um composto e a confiabilidade desses métodos depende do banco de dados estabelecido, que estão sendo gradativamente liberados pelas Indústrias Farmacêuticas (TETKO *et al.*, 2006).

Dentre os diversos programas que estimam parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos, o programa *OSIRIS® Property Explorer* (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo>) da *Actelion Pharmaceuticals* (<http://www1.actelion.com/>) é um programa de acesso gratuito pela Internet, que permite desenhar estruturas químicas em duas dimensões e estimar, com um bom grau de confiabilidade, algumas propriedades físico-químicas, biológicas e *drug-like* (KAPETANOVIC, 2008) relevantes no planejamento de novos fármacos. Este programa está fundamentado no uso de uma lista de fragmentos distintos, gerados a partir da quebra das ligações simples das moléculas, que estão associados a uma classificação de similaridade a fármacos (*drug-likeness*).

O potencial de *drug-likeness* de um composto está relacionado à semelhança com fármacos do mercado, sendo baseado em descritores topológicos, dados estruturais ou outras propriedades como cLogP (coeficiente de partição octanol/água calculado) e peso molecular (TETKO; 2007). Atualmente, são definidos como compostos "*drug-likeness*" aqueles compostos que possuem grupos funcionais e/ou

propriedades físico-químicas parecidas com a maioria dos fármacos conhecidos (WALTERS & MURCKO, 1999), ou então, com compostos que possuem propriedades ADMET suficientemente aceitáveis para resistir à Fase II dos ensaios clínicos (LIPINSKI, 2001).

No caso do programa OSIRIS®, a lista de fragmentos químicos foi obtida a partir de dois bancos de dados: um de fármacos comerciais (i.e., gerando fragmentos *drug-like*), contendo 3.300 compostos; e um de substâncias químicas (não fármacos) disponíveis no catálogo comercial Fluka (i.e., gerando fragmentos não *drug-like*), contendo 15.000 compostos. Fragmentos similares com uma mesma frequência foram agrupados removendo aqueles altamente redundantes. As análises demonstram que 80% dos fármacos comerciais têm um valor de *drug-likeness* positivo, enquanto que a maioria dos compostos do catálogo Fluka apresenta valor negativo (Figura 10).

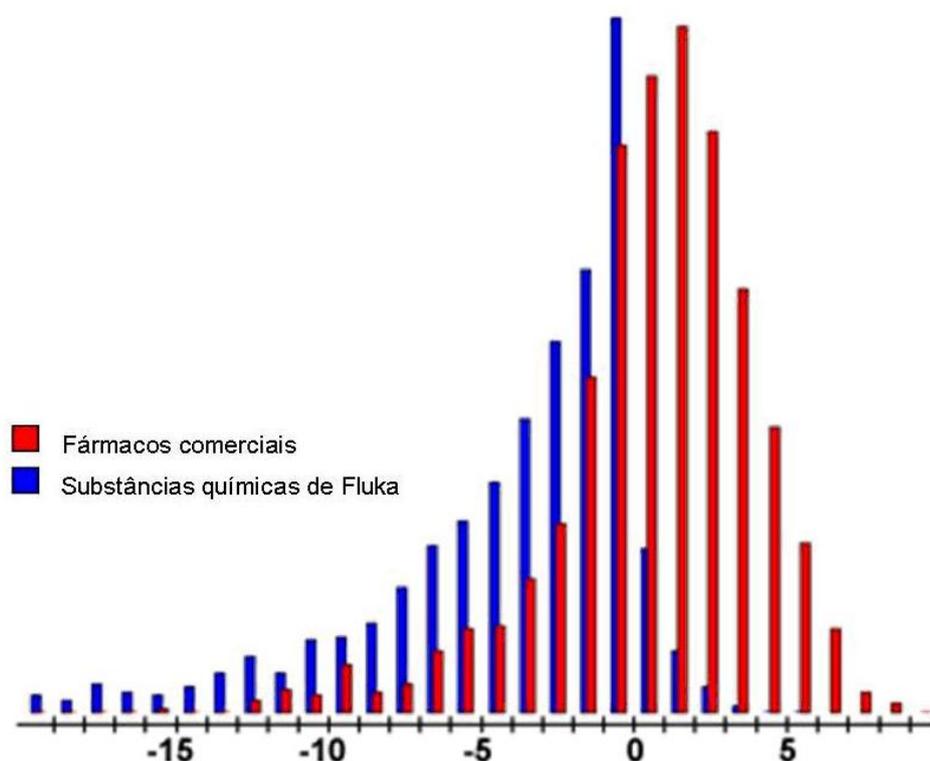


Figura 10 . Distribuição de *druglikeness* de fármacos comerciais (em vermelho) versus substâncias químicas do catálogo Fluka (em azul) (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo>).

A toxicidade de um fármaco é um fator de extrema importância, uma vez que um número significativo de fármacos é reprovado nos ensaios clínicos devido aos efeitos tóxicos. Os riscos de toxicidade, abordados no programa OSIRIS®, são baseados em bancos de dados de substâncias químicas que apresentam efeitos tóxicos comprovados (*Registry of Toxic Effects of Chemical Substances, RTECS*) e validados com um banco de dados contendo fármacos comercialmente disponíveis (AFONSO, 2008) (Figura 11). Os alertas de risco toxicológicos indicam que os compostos em avaliação possuem determinados fragmentos que podem ter efeitos irritantes, tumorigênicos, mutagênicos ou causam efeitos maléficos na reprodução.

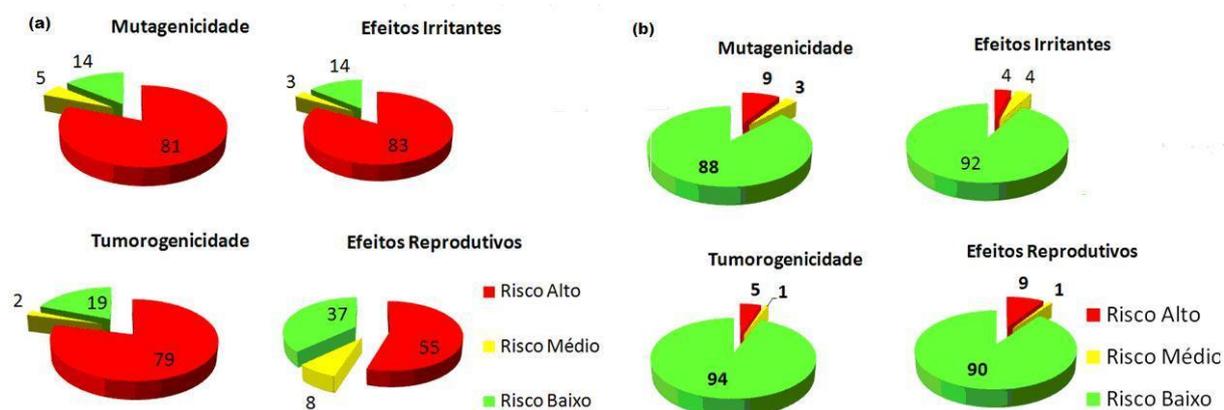


Figura 11. (a) Resultado percentual do treinamento com substâncias químicas com efeitos tóxicos e (b) validação utilizando-se fármacos em comercialização, realizados no programa Osiris® Property Explore (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo>).

Outra propriedade disponível no programa OSIRIS®, é o *drug-score*, que é utilizado para inferir o potencial de um composto de se tornar um fármaco. Este índice combina os valores de *drug-likeness*, cLogP, LogS (solubilidade em água), peso molecular e risco de toxicidade em um único valor.

1.4.5.2 Outras abordagens farmacocinéticas - Regra dos Cinco de Linpiski

A primeira barreira a se ultrapassar para uma boa biodisponibilidade de um fármaco de uso oral é a absorção intestinal humana (HIA), o que se torna um grande desafio no desenvolvimento de um novo composto, visto que essa etapa envolve uma série de fatores biológicos e físico-químicos, que se relacionam diretamente aos parâmetros farmacocinéticos, como distribuição, absorção, metabolismo, excreção (SUBRAMANIAN, 2008).

Para uma boa absorção, o fármaco deve se dissolver e solubilizar no trato gastrointestinal para que seja absorvido pela membrana intestinal. Assim, características como solubilidade são importantes, pois, uma baixa solubilidade é prejudicial para uma boa absorção, outra característica importante no estudo da HIA é a lipofilicidade (associada ao coeficiente de partição água/óleo) dos fármacos, que se relaciona diretamente a permeabilidade na membrana, ligação a proteínas e distribuição em diferentes tecidos. Substâncias lipofílicas promovem a passagem pela bicamada lipídica das membranas celulares, acessando ao seu sítio de ação (WATERBEEMD, 2003; HOU *et al.*, 2007).

Neste contexto, uma abordagem teórica dos parâmetros farmacocinéticos foi iniciada em 1997, quando Lipinski e colaboradores da indústria farmacêutica Pfizer desenvolveram a Regra dos Cinco (*Rule of Five*) identificando parâmetros dos compostos que levam a problemas de absorção e permeabilidade. O estudo é fundamentado nas propriedades de aproximadamente 2500 fármacos orais comercialmente ativos do banco de dados do **WDI** (*World Drug Index*- Índice Mundial de Fármacos) aprovados para a Fase II dos ensaios clínicos. Com a finalidade de prever a biodisponibilidade oral de fármacos, essa regra é baseada em características físico-químicas dos compostos analisados, tais como massa

molecular, lipofilicidade, sítios doadores e aceptores de ligação Hidrogênio (LIPINSKI, 2004). A Regra dos cinco estabelece que uma boa absorção e permeação sejam mais comuns quando:

- a. Número de grupos aceptores de ligação hidrogênio é menor ou igual a 10 (expresso pela soma de átomos de N e O);
- b. Número de grupos doadores de ligação hidrogênio é menor ou igual a 5 (expresso pela soma de OH e NH na molécula);
- c. Massa molecular é menor ou igual a 500 Da;
- d. cLog P é menor ou igual a 5.

Essas regras foram reforçadas por pesquisadores que identificaram outros parâmetros importantes para que um composto tenha uma biodisponibilidade oral ideal, como o número de ligações rotacionáveis, que deve ser menor ou igual que 10 (VEBER *et al.*, 2002), pois uma flexibilidade é importante para a passagem através das membranas. Além disso, a literatura também indica que compostos com áreas de superfície polar (PSA) menor ou igual a 140 Å² apresentam melhor biodisponibilidade oral (CLARK & PICKETT, 2000).

A PSA é definida como a soma das áreas de superfícies de van der Waals dos átomos polares e está diretamente relacionada à capacidade de formar ligações hidrogênio e à polaridade. A habilidade de formar ligação hidrogênio, por sua vez, está relacionada ao número de átomos de oxigênio e nitrogênio presentes na molécula. Também foi observado que uma reduzida PSA correlaciona melhor com o aumento da velocidade de permeação do que a lipofilicidade (cLogP) e que um aumento no número de ligações rotacionáveis possui um efeito deletério na

velocidade de permeação (KELLER *et al.*, 2006; PAJOUHESH & LENZ, 2005; LEACH, 2001).

1.4.5.3 Regra de Lipinski – abordagens para o sistema nervoso central

Fármacos que tem como alvo o sistema nervoso central (SNC) devem ser capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) para exercerem a sua atividade, portanto, propriedades que influenciam na permeação devem ser consideradas. Em geral, os fármacos que tem como alvo o SNC, são mais lipofílicos, menos polares, menos flexíveis, possuem menor peso molecular e menor volume molecular do que fármacos com outras indicações terapêuticas (ABREU, 2008).

Diante dessas propriedades, Lipinski elaborou um novo conjunto de regras aplicáveis para fármacos que devem ter uma penetração eficiente no SNC. Baseado em 1500 fármacos orais comercialmente ativos para SNC, observou que as propriedades físico-químicas, em geral, têm um limite menor do que no caso de outras classes de fármacos (PAJOUHESH E LENZ, 2005). De acordo com este estudo, os fármacos que conseguem atravessar a barreira hematoencefálica e apresentar atividade no SNC apresentam:

- a. Massa molecular menor ou igual a 400 Da;
- b. cLogP menor ou igual 5;
- c. Numero de grupos aceptores de ligação hidrogênio menor ou igual a 7;
- d. Numero de grupos doadores de ligação hidrogênio menor ou igual a 3;
- e. Área de superfície polar (PSA) menor que 90Å^2 ;
- f. Número de ligações rotáveis menor que 10.

2 JUSTIFICATIVA

O tratamento de infecções virais se baseia principalmente na utilização de fármacos sintéticos com rotas sintéticas difíceis de obter e com reagentes caros e geralmente muito tóxicos, que atuam, principalmente, na inibição das enzimas de replicação viral. No entanto a resistência viral à terapia disponível atualmente e os problemas de toxicidade desses medicamentos fomentam a necessidade da descoberta e desenvolvimento de novos fármacos mais eficientes e menos citotóxicos.

O desenvolvimento de novas entidades químicas para o tratamento antiviral despertou um grande interesse em nosso grupo de pesquisa, em especial, na busca de novos agentes antivirais heterocíclicos. Ao longo dos anos relatamos a síntese e atividade de vários derivados heterocíclicos bioativos pirazolo[3,4-*b*]piridina, como por exemplo, os derivados ácidos-1*H*-pirazolo-[3,4-*b*]piridina que apresentaram significativa atividade anti-HSV-1 além de atividade inibitória sobre a RT-HIV-1 (AZEVEDO, 2006; BERNARDINO *et al.*, 1996).

Atualmente, estudos descritos na literatura com base nos derivados naturais ou sintéticos do alcalóide acridona mostraram um ótimo perfil de atividade anti-HSV (GOODELL *et al.*, 2006; YAMAMOTO *et al.*, 1989; AKANITAPICHAT *et al.*, 2000; LOWDEN & BASTON, 2003).

Esses fatos despertaram um grande interesse pelo nosso grupo na síntese de derivados modificados da acridona, baseado nos dois sistemas heterocíclicos que apresentaram perfil anti-HSV, os derivados ácidos-1*H*-pirazolo [3,4-*b*] piridina-5-carboxílicos (**3a-i**) e derivados sintéticos do acridona (**1a-i**), consolidando assim a busca de um novo sistema heterocíclico antiviral (Esquema 1). O novo heterocíclico

denominado 3*H*-Benzo[*b*]pirazolo[3,4-*h*]-[1,6]-naftiridina, foi sintetizado pelos princípios tradicionais da química medicinal, como substituição isostérica, e abordagem de um análogo rígido cuja atividade foi avaliada frente aos HSV-1. Assim, métodos computacionais serão empregados visando realizar um estudo de investigação do impacto isostérico da substituição aromática, a influência da restrição de liberdade imposta na molécula e a relação estrutura atividade da nova série naftiridinica e seus derivados (**2a-i**). Isto permitirá investigar a importância estrutural e estereoeletrônica dos novos compostos naftiridinicos com atividade anti-HSV-1 que será comparada com os derivados acridona com perfil antiviral.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo principal deste trabalho é gerar informações relevantes sobre a Relação Estrutura Atividade (SAR) de duas séries distintas de compostos com atividade anti-HSV-1 (Figura 12). Esse estudo utiliza a aplicação de metodologias de modelagem molecular, acoplados a estudos físico-químicos e toxicológicos *in silico* a fim de contribuir para o desenvolvimento de antivirais mais potentes, seletivos, menos tóxicos e com ação sobre vírus resistentes aos fármacos em uso corrente no mercado.

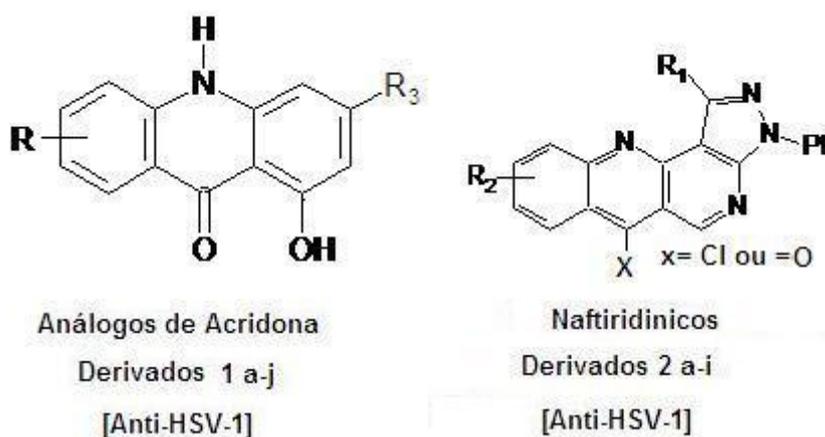


Figura 12. Estrutura dos análogos de acridona (1a-j) e derivados pirazolo-naftirídnicos (2a-i) com atividade anti-HSV-1.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Emprego de técnicas de modelagem molecular para a realização do estudo de SAR de todos os derivados, com o intuito de obter parâmetros estruturais e estereoeletrônicos, tais como, a determinação dos mapas de potencial eletrostático molecular, energia, coeficientes e densidade dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO, cálculos de cLogP, momento de dipolo e outros que possam estar relacionados com a atividade antiviral dos compostos analisados.

Avaliação do perfil físico-químico e toxicológico desses derivados, através da predição teórica que visa analisar a mutagenicidade, a tumorigenicidade, a irritabilidade, efeitos na reprodução e propriedades como a lipofilicidade, *drugscore* e o *drug-likeness*, que são importantes na seleção de novas substâncias bioativas candidatas a fármacos.

Análise dos requisitos descritos nas Regras de Lipinski, visando avaliar a possibilidade desses derivados serem bons candidatos a fármaco por via oral e para penetração no SNC.

4. METODOLOGIA

4.1 CÁLCULOS DOS PARÂMETROS TEÓRICOS DE MODELAGEM MOLECULAR

As estruturas tridimensionais de cada derivado foram construídas e otimizadas no programa SPARTAN'06®, versão 1.1.2 da Wavefunction Inc, em ambiente Windows®. Por modificações apropriadas do composto não substituído, a análise conformacional foi efetuada, através do método semi-empírico usando o Hamiltoniano AM1, com incremento de 30°.

Após a otimização geométrica, os confôrmeros de menor energia foram submetidos ao cálculo *ab initio* em ponto único (*Single-Point*), no qual se calculou os parâmetros eletrônicos de um arranjo único dos átomos, utilizando o método Hartree-Fock na base 6-31G*.

Considerando que a interação fármaco-receptor é dependente das propriedades estereo-eletrônicas, descritores quanto-mecânicos foram analisados em função da sua grande utilidade na área de planejamento de fármacos (KARELSON *et al.*, 1996). Assim usamos os seguintes descritores:

4.1.1 Mapa de Potencial Eletrostático

O mapa de potencial eletrostático molecular (MEP) é uma abordagem interessante, pois nos permite compreender de forma mais ampla, as contribuições eletrostáticas para o processo de interação ligante-receptor, que confere atividade a molécula. Sendo um dos descritores mais utilizados (HENRE, 2003), e revela o tamanho molecular total e a localização dos potenciais eletrostáticos na molécula. As superfícies tridimensionais dos MEPs são geradas após a interação de uma partícula carregada positivamente (geralmente de densidade de carga constante

($0,002e/au^3$) com a superfície molecular. A superfície de contato de van der Waals da molécula gera um balanço entre as interações de repulsão com os núcleos dos átomos carregados positivamente e de atração com os elétrons carregados negativamente (HENRE, 2003).

As regiões cujas superfícies têm potencial eletrostático negativo delineiam na molécula os locais passíveis de interagir com áreas positivas de outra molécula (receptor). Essas propriedades podem ser representadas por diferentes cores nas quais distinguem as regiões ricas das deficientes em elétrons numa molécula. Assim, o mapa de potencial eletrostático de cor vermelha indica alta densidade eletrônica (potencial negativo) e a cor azul indica baixa densidade eletrônica (potencial positivo), colorações laranja, amarelo e verde representam valores intermediários de potencial (HENRE, 2003).

Para a construção do MEP são necessárias três etapas: (A) a construção da superfície de densidade eletrônica da molécula, (B) a construção da superfície de potencial eletrostático e a (C) aplicação de cores a superfície obtida para designar valores de potencial (Figura 13).

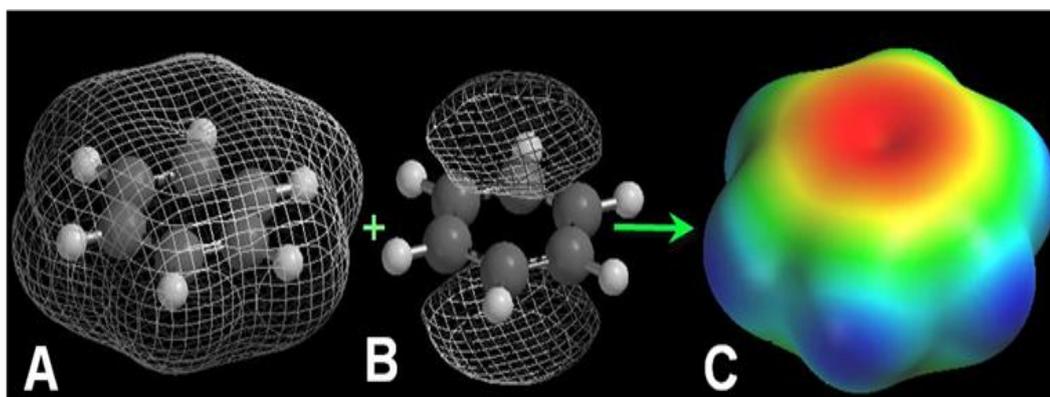


Figura 13. Representação das etapas de construção do MEP da molécula de benzeno.

4.1.2 Energias dos Orbitais Moleculares

A energia de HOMO está diretamente relacionada ao potencial de ionização do composto e caracteriza a capacidade da molécula em realizar ataques nucleofílicos. A energia de LUMO está diretamente relacionada à afinidade eletrônica, caracterizada pela susceptibilidade do composto em relação a ataques por nucleófilos (GRANT, 1996). O “GAP” de energia HOMO-LUMO, obtido a partir da diferença entre as energias desses orbitais, é um importante indicador de estabilidade molecular. Alto valor de “GAP” indica alta estabilidade da molécula, no sentido de baixa reatividade nas reações químicas, enquanto moléculas com baixo valor de “GAP” são geralmente reativas (ZHANG, 2007).

4.1.3 Densidade dos Orbitais de Fronteira

A densidade eletrônica dos orbitais de fronteira nos átomos fornece uma forma útil para a caracterização detalhada das interações doador-aceptor. A maioria das reações químicas ocorre no local de maior densidade eletrônica nos orbitais de fronteira, que são definidos de acordo com o tipo de reação: numa reação eletrofílica, a densidade de HOMO é essencial para a transferência de cargas enquanto a densidade de LUMO representa as áreas mais suscetíveis a ataques nucleofílicos (GRANT, 1996).

4.1.4 Distribuição do Coeficiente Tridimensional dos orbitais de fronteira

A análise do coeficiente de distribuição tridimensional dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO dos derivados têm o intuito de analisar a contribuição atômica de ambos os orbitais de fronteira, sendo que a cor vermelha e azul representa fases e

as formas representam as regiões na molécula onde o par de elétrons pode ser encontrado no orbital molecular considerado (COSTA *et al.*, 2003)

4.1.5 Momento de Dipolo

Considerando que a interação de fármaco e receptor ocorre em função das diferenças de cargas com valores opostos, diversos descritores têm sido propostos para quantificar os efeitos de polaridade, dentre os quais, o momento dipolo da molécula (que reflete apenas a polaridade global da mesma) é importante para várias propriedades físico-químicas.

Assim a energia, densidades e coeficiente de distribuição de HOMO e LUMO, o MEP, o momento dipolo e cLog P (obtido pelo modelo Crippen disponível no programa SPARTAN'06®), foram calculadas para todas as moléculas objetivando obter parâmetros para o estudo da Relação Estrutura-Atividade (SAR) das moléculas estudadas.

4.2 ANÁLISE *IN SILICO* DE PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS E DE TOXICIDADE

Os derivados mais potentes abordados neste trabalho foram submetidos à análise *in silico* dos parâmetros ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) usando o programa *Osiris Property Explorer* (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/drugScore.html>), com os quais foram determinados o potencial de *Druglikeness* e o *Drugscore*. A avaliação *in silico* da toxicidade de moléculas inclui efeitos mutagênico, tumorigênico, irritante e sobre a reprodução.

O processo que determina os cálculos se inicia a partir do desenho da estrutura química no programa Osiris[®] (Figura 14). Em seguida, calculam-se o perfil toxicológico, as propriedades físico-químicas, *Druglikeness* e *Drugscore*, sendo registrados no lado direito do painel, conforme demonstra a Figura 14. A medida que se desenha a estrutura a ser analisada no programa Osiris[®], o preditor de risco de toxicidade avalia os riscos tóxicos potenciais, uma vez que a estrutura em análise seja uma entidade química válida. Os alertas de riscos toxicológicos indicam que os compostos em avaliação possuem determinados fragmentos que podem ter efeitos irritantes, por exemplo, ou alto grau de tumorigenicidade (quando varia da coloração verde para a vermelha).

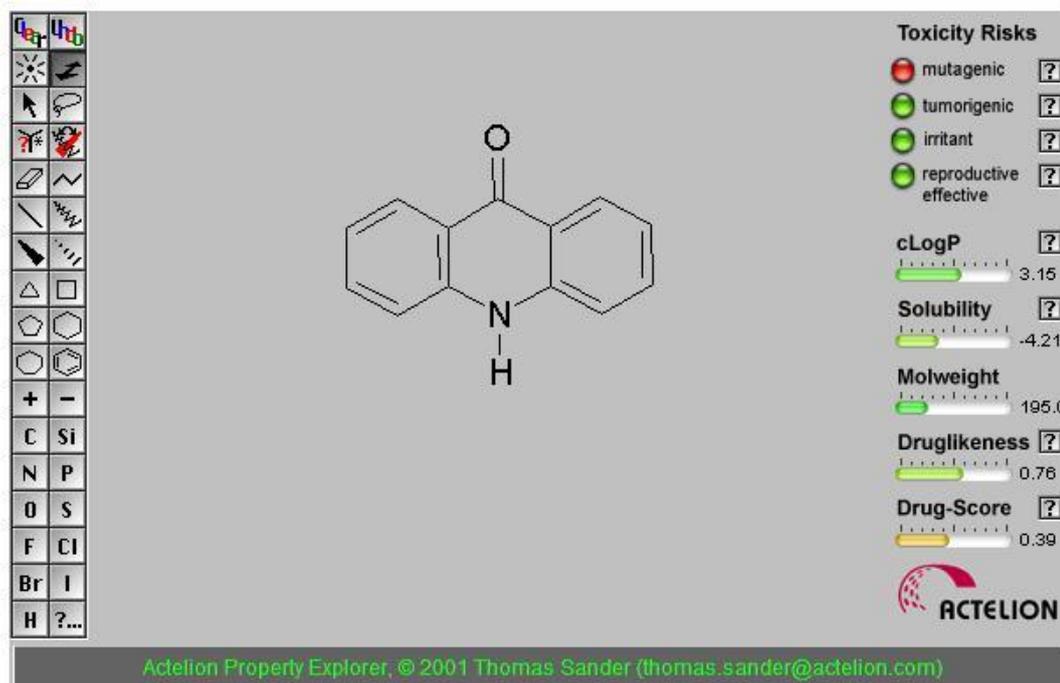


Figura 14 - Cálculos de perfil toxicológico, propriedades físico-químicas, drug-likeness e drug-score pelo programa Osiris.

O Drug-Score combina os valores obtidos de *Drug-Likeness*, cLogP (lipofilicidade), logS (solubilidade), massa molecular e riscos toxicológicos em um único valor de modo a avaliar se o composto tem potencial para se tornar um

fármaco, valores mais próximos de 1 (um) indicam um bom perfil *Drug-Score* (Figura 15).



Figura 15. Escala do perfil Drug-Score de um potencial candidato a fármaco.

Como os compostos planejados são para a administração via oral, eles devem ser capazes de ser absorvidos no trato gastrointestinal e conhecer se esses derivados apresentam propriedades favoráveis para atravessar a barreira hematoencefálica e atuar no sistema nervoso central (SNC) é importante para casos de encefalites virais. Desta forma, eles foram avaliados de acordo com a “Regra dos Cinco” para biodisponibilidade oral e a Regra de Lipinski modificada para penetração no SNC, que estabelece que pelo menos três dos requisitos apresentados na tabela 1 devem ser satisfeitos para que o composto apresente uma boa biodisponibilidade oral e/ou penetração no SNC.

Tabela 1 - Parâmetros e valores estabelecidos pela Regra de Linpiski.

Parâmetros	Regra dos cinco para biodisponibilidade oral	Regra dos cinco modificada para penetração do SNC
Massa Molecular (MM)	≤ 500 Daltons	≤ 400 Daltons
c log P	≤ 5.0	≤ 5.0
HBA	≤ 10	≤ 7
HBD	≤ 5	≤ 3
PSA	≤ 140 Å ²	≤ 90 Å ²
Ligações rotáveis	≤ 10	≤ 10

Estas propiedades foram obtidas utilizando os programas *Spartan'06* e *Molinspiration* (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>) e comparadas aos fármacos de referencia. Todos os parâmetros teóricos foram avaliados e correlacionados com as atividades biológicas, conforme o fluxograma abaixo.

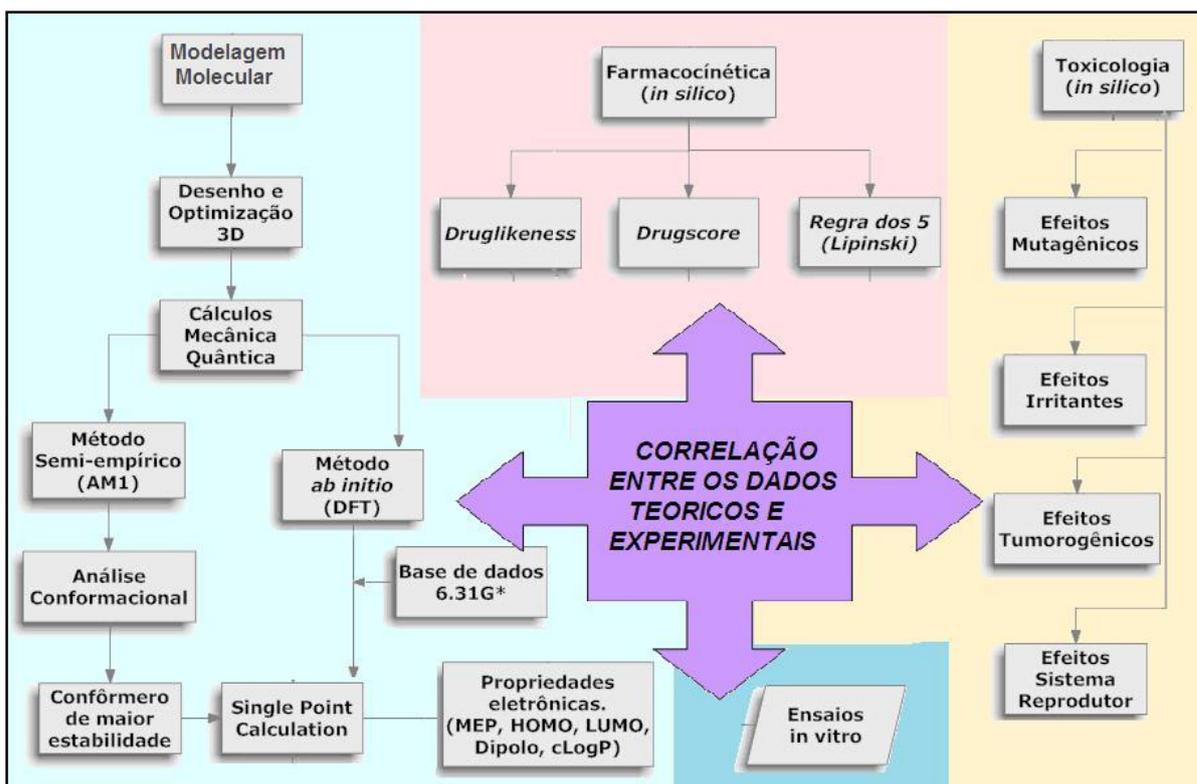


Figura 16. Fluxograma da Metodologia aplicada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 APLICAÇÕES DE MODELAGEM MOLECULAR NO ESTUDO DE SAR DE DERIVADOS ACRIDONA E NAFTIRIDINICOS

5.1.1 Análise dos dados obtidos dos estudos de modelagem molecular dos derivados 1-hidroxiacridona com perfil Anti-HSV-1

A primeira etapa deste trabalho foi um estudo global dos parâmetros teóricos de 10 derivados de 1-hidroxiacridona sintetizados a partir da molécula da acridona (Figura 17) e testado *in vitro* frente à replicação do vírus HSV-1 por Lowden and Bastow (2003), com o intuito de identificar nesses compostos as características estruturais e eletrônicas que pudessem ser correlacionados com a atividade anti-HSV-1 e, portanto, auxiliar no desenvolvimento de novos compostos antivirais.

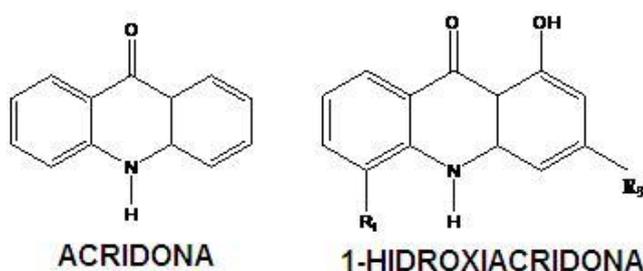


Figura 17. Estrutura da acridona e derivado sintético 1-hidroxiacridona desenvolvido por Lowden e Bastow com atividade anti-herpes.

Os derivados 1-hidroxiacridona, segundo Lowden e Bastow, mostraram diferentes perfis anti-HSV-1, sendo que os derivados com grupamento hidroxila no átomo de carbono C-3 (metoxila), são compostos mais ativos (derivados 1,3 dihidroxiacridona) do que aqueles que apresentam outros substituintes no átomo C-

3, tais como os grupos metoxil, metil e inserção de um outro anel aromático, presentes respectivamente nos derivados **1h**, **1i** e **1j**, que apresentaram valores mais altos de IC_{50} (menor concentração capaz de inibir 50% das células infectadas). Os derivados que apresentaram melhor perfil inibidor da replicação do HSV-1 foram os compostos 5-metoxil-1,3-dihidroxiacridona (**1a**, $IC_{50}=2,2 \mu\text{M}$) e o derivado 5-cloro-1,3-dihidroxiacridona (**1b**, $IC_{50}=4 \mu\text{M}$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Atividade Anti-HSV-1 (IC_{50} , μM), citotoxicidade (CC_{50} , μM) e cálculos da energia de HOMO (E_{HOMO} , eV) e de LUMO (E_{LUMO} , eV) e momento dipolo (μ , Debye) de 10 derivados 1-hidroxiacridona (1a-j).



No.	R	R ₃	IC_{50}^*	CC_{50}^*	E_{HOMO}	E_{LUMO}	Gap ^{***}	μ
1 a	5-OMe	OH	2,2	30	-7,75	2,24	9,99	6,69
1b	5-Cl	OH	4±1	60±3	-8,16	1,86	10,02	4,49
1c	5-Me	OH	8±1	32	-7,89	2,19	10,08	6,53
1d	6-Cl	OH	10±1	29±4	-8,22	1,88	10,1	5,84
1e	8-Cl	OH	10±2	70±4	-8,06	1,95	10,1	7,56
1f	7-Cl	OH	16±4	52±6	-8,06	1,86	9,92	7,62
1g	H	OH	45	68	-7,98	2,14	10,12	6,30
1h	5-Cl	OMe	>50	>100	-8,08	1,90	9,98	4,95
1i	5-Cl	Me	NA	13	-7,97	1,82	9,79	4,27
1j	**	**	NA	>100	-7,39	1,13	8,52	2,80

* realizados por Lowden & Bastow. NA = Não ativo. ** Estrutura apresentada. *** $GAP = E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}$

Calculamos inicialmente as energias de HOMO (E_{HOMO}), Energia de LUMO (E_{LUMO}), GAP e momento dipolo (μ) dos derivados, a fim de correlacioná-las com a atividade anti-HSV-1. No entanto, o estudo da Relação Estrutura Atividade (SAR)

mostrou que os valores de E_{HOMO} , E_{LUMO} e μ , não permitindo efetuar uma correlação direta com atividade (Tabela 2).

Foi realizada uma análise do coeficiente de distribuição tridimensional dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO dos derivados acridona, com o intuito de analisar a contribuição atômica de ambos os orbitais de fronteira, e os resultados revelaram uma similaridade global da distribuição de HOMO e de LUMO pelo sistema de anéis da acridona tanto nos derivados ativos quanto nos inativos, com exceção do composto **1j**, que apresentou uma maior distribuição de HOMO no anel aromático D (Figura 18).

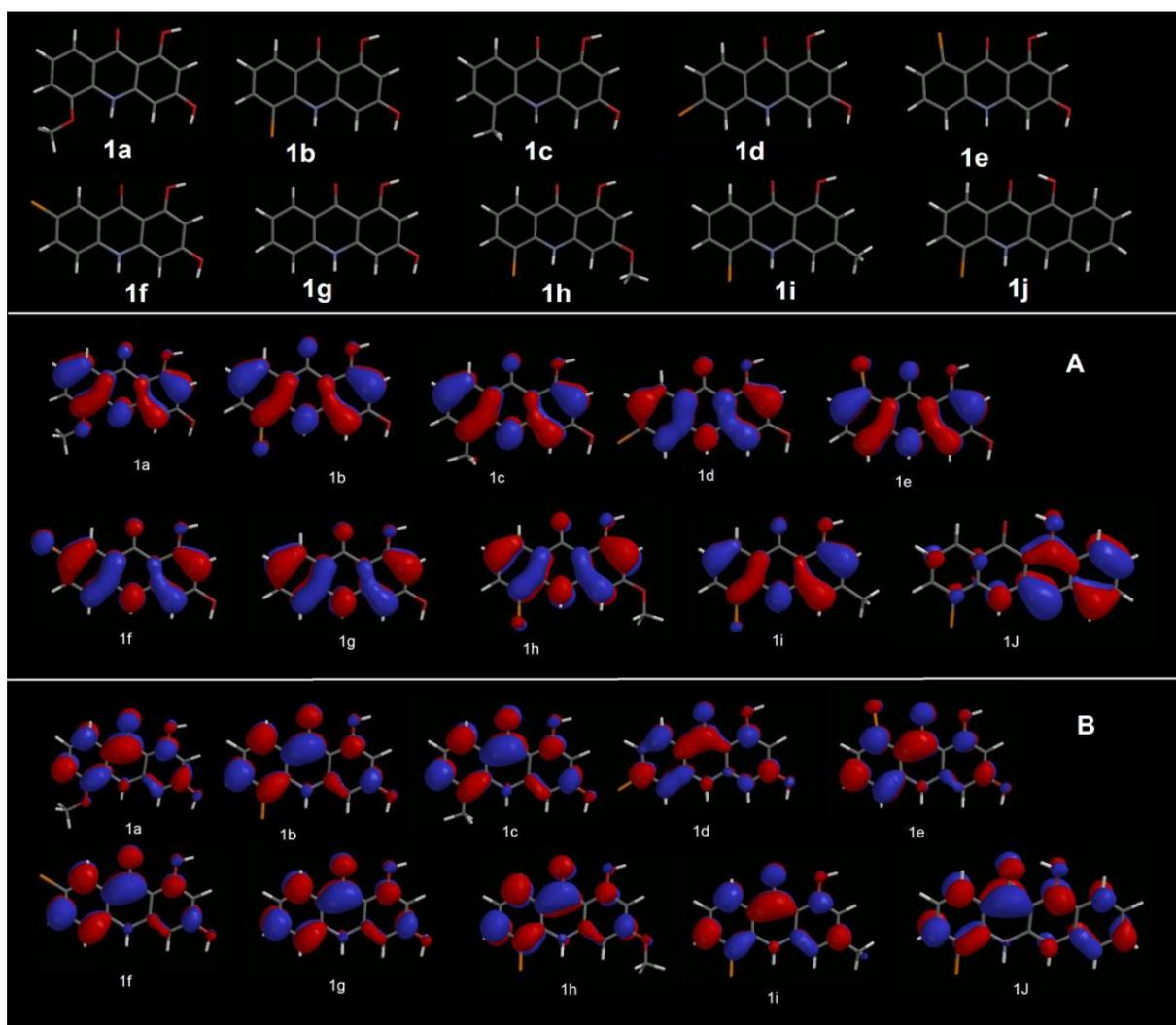


Figura 18. (A) Coeficiente de distribuição dos orbitais HOMO e (B) coeficiente de distribuição dos orbitais LUMO dos derivados acridona.

O mapa de densidade LUMO descreve áreas deficientes em elétrons que podem ser susceptíveis a interação com regiões de alta densidade eletrônica do alvo. A área deficiente em elétrons, ou seja, com baixos valores de densidade eletrônica ou baixo valor de LUMO (representado pela coloração azul) está concentrada na região central da molécula de forma semelhante em todos os derivados não mostrando diferenças significativas entre os derivados de acridona (Figura 19).

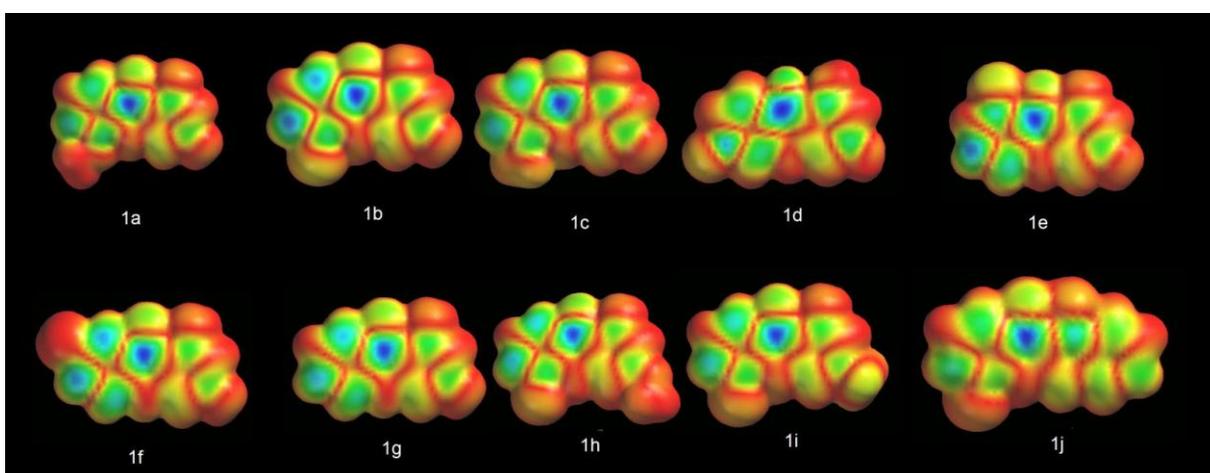


Figura 19. Densidade de LUMO dos derivados acridona, gerada numa superfície de densidade eletrônica constante de $0,002 \text{ e/ua}^3$.

A análise do mapa da densidade de HOMO, que codifica sobre uma superfície de van der Waals uma densidade eletrônica que pode variar de vermelho (baixo valor de HOMO) à azul (alto valor de HOMO), revela uma diminuição da densidade eletrônica no sistema de anéis (representado pela coloração azul) nos derivados com menor atividade (1h-j). Essa análise sugere uma susceptibilidade da região de anéis a uma interação com regiões de baixa densidade eletrônica no sítio receptor (Figura 20).

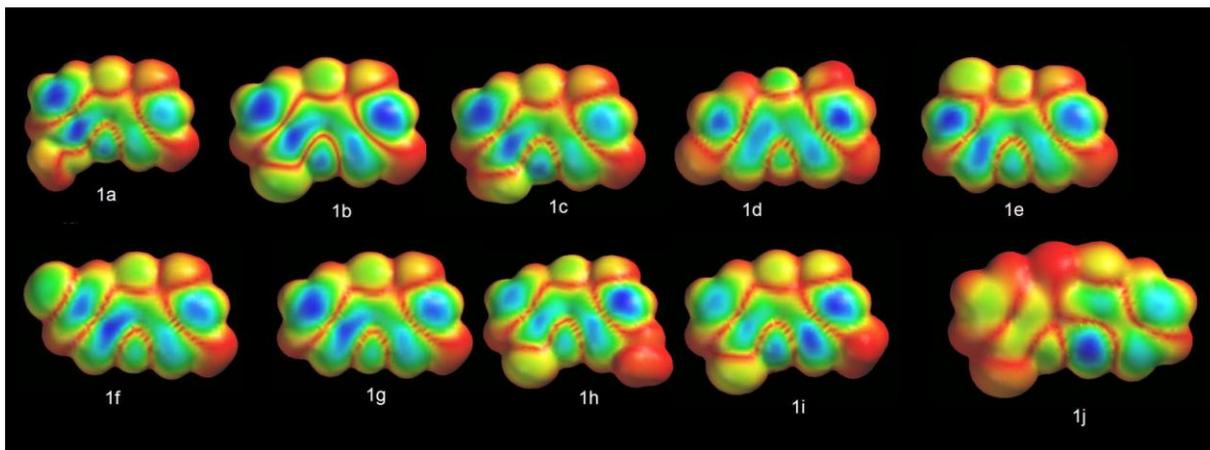


Figura 20. Densidade de HOMO dos derivados acridona, gerada numa superfície de densidade eletrônica constante de $0,002 \text{ e/ua}^3$.

Os mapas de potencial eletrostático molecular (MEP) dos derivados 1,3-dihidroxiacridona (Figura 20) mostram uma densidade eletrônica similar, em todos os derivados, concentrada principalmente nos grupos hidroxila (C-1) e carbonila (C-9). No entanto essa característica não mostra relação com atividade, pois também estão presentes em derivados não ativos como **1h-j**.

Quando o substituinte da posição R3 apresenta átomos eletronegativos, como os grupamentos hidroxila (**1a-g**) ou metoxila (**1h**), revela uma alta densidade eletrônica (potencial negativo- coloração vermelha) na mesma região. Quando comparamos ao substituinte metila (**1i**) ou anel aromático D em posição R3 (**1j**), não há atividade anti-HSV-1 e o MEP revela uma contribuição eletrônica baixa ou ausência desta. Este resultado sugere que a presença de substituintes ricos em elétrons na posição R3 pode ser um dos fatores responsáveis pela atividade anti-HSV-1 dos compostos, podendo realizar interações importantes com o sítio receptor (Figura 21). No entanto, os grupamentos hidroxila (**1a-g**) podem agir tanto como doadores como aceptores de ligações de hidrogênio, diferente do grupo metoxila (**1h**) que apresentou menor atividade antiviral $\text{IC}_{50} (>50 \mu\text{M})$.

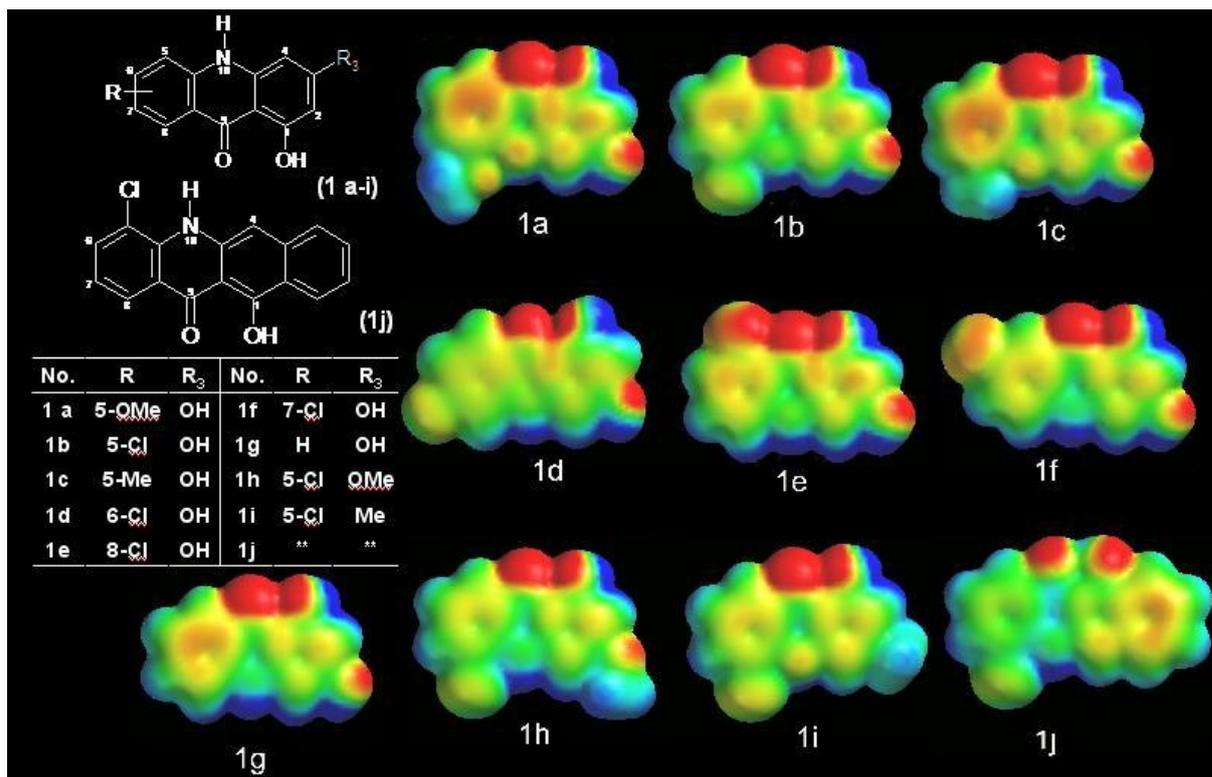


Figura 21. Mapa de potencial eletrostático (MEP) dos derivados 1-hidroxiacridona (1a-j), sobre uma *isosurface* de 0,002 eV/ua³ entre -25 a 30 Kcal/mol.

Numa análise mais detalhada, observa-se que com a presença do grupo 3-hidroxila e ausência de substituintes R no anel A (R =H, **1g**), ocorre uma diminuição drástica da atividade antiviral em comparação aos demais compostos ativos, mostrando que a presença de grupos funcionais (R substituinte - nas posições em C-5, C-6, C-7 e C-8) é importante para manter a atividade anti-HSV-1. A presença do cloro (elemento eletronegativo) como substituinte nas posições C-5 (**1b**), C-6 (**1d**), C-7 (**1f**) e C-8 (**1e**) é importante para a atividade. Entretanto, podemos supor que o aumento da densidade eletrônica, proporcionado pelo grupamento metoxila (R=OCH₃) em C-5 (**1a**) (IC₅₀ = 2,2μM) esteja relacionada com a atividade apresentada, aumentando de 2 a 4 vezes quando comparados aos derivados **1b**(IC₅₀ = 4 μM) e **1c**(IC₅₀ = 8 μM) (Tabela 2). Este aumento de densidade eletrônica pode ser observada pela intensa cor vermelha no sistema do anel A (Figura 21).

O potencial positivo (coloração azul, carga positiva) observados no MEP corresponde à presença dos átomos de hidrogênio nas posições C-4 e N-10. Esse potencial positivo está menos intenso nos compostos **1 h-j**, permitindo-nos inferir uma relação entre a redução no potencial positivo desses derivados a uma ausência ou diminuição da atividade antiviral.

A estrutura rígida do anel tricíclico da acridona mantém-se intacta em todos os derivados estudados por Lowden e Bastow (2003), isso permitiu avaliar com maior segurança o impacto de grupos funcionais substituídos na atividade desses derivados (LOWDEN e BASTOW, 2003). Essa informação é importante e pode se transferida para a proposta de novos análogos que contenham esses grupos funcionais em posições semelhantes.

Assim, baseado nesse estudo de SAR e das características estruturais observadas, realizamos o planejamento e o estudo da relação estrutura atividade de uma nova série de derivados, denominados 3H-benzo[b]pirazolo[3,4-*h*]-1,6-naftiridínicos, descritos abaixo.

5.1.2 Planejamento e análise dos dados obtidos de modelagem molecular dos derivados pirazolo-naftiridínicos anti-HSV-1

Uma nova série de derivados naftiridínicos, denominado 3H-Benzo[b]pirazolo[3,4-*h*]-[1,6]-naftiridina, foi sintetizada pelo grupo da professora Dr^a Alice Maria Rolim Bernardino do Laboratório de Síntese de Heterocíclicos (LASINHET) do Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense. O planejamento dos derivados naftiridínicos foi feita com base na literatura de dois sistemas heterocíclicos com atividade anti-HSV-1, os derivados sintéticos da

acridona (**1a-i**) (LOWDEN e BASTOW, 2003) como descritos anteriormente, e os derivados ácidos-1*H*-pirazolo-[3.4-*b*]-piridina-5-carboxílicos (**3a-i**) (AZEVEDO, 2002), também sintetizados pelo grupo da professora Dr^a Alice Maria Rolim Bernardino do Laboratório de Síntese de Heterocíclicos (LASINHET).

A literatura descreve a presença de sistema pirazolo-piridino em inúmeros compostos com diferentes perfis de atividade biológica (KUMAR *et al.*, 2005). Acredita-se que esses sistemas possuem uma relação estrutural com indóis, azaindóis e bases purínicas do DNA e RNA, e dessa forma justifica a sua importância biológica (AZEVEDO, 2006). Assim novos estudos são realizados visando o aperfeiçoamento da síntese de novos compostos que contenham esse sistema aromático.

Com base nos princípios tradicionais da química medicinal, combinando-se a substituição isostérica e a abordagem do análogo rígido, os derivados naftiridínicos (**2a-i**) foram planejados utilizando-se como análogos dois sistemas heterocíclicos: pirazolo-piridina (derivados **3**) e hidroxí-acridona (derivados **1**) (LOWDEN E BASTOW, 2003), ambos apresentando perfis diferenciados anti-HSV-1 (Figura 22).

A sub-unidade acridona (serie **1**) é um isómero clássico do 3*H*-benzo[*b*]pirazolo[3,4-*h*]-1,6-naftiridínico (serie **2**), e o fechamento do anel pirazolo-piridina (serie **3**) no grupamento carboxílico leva ao sistema aromático naftiridínico, correspondendo a abordagem do análogo rígido (Figura 22).

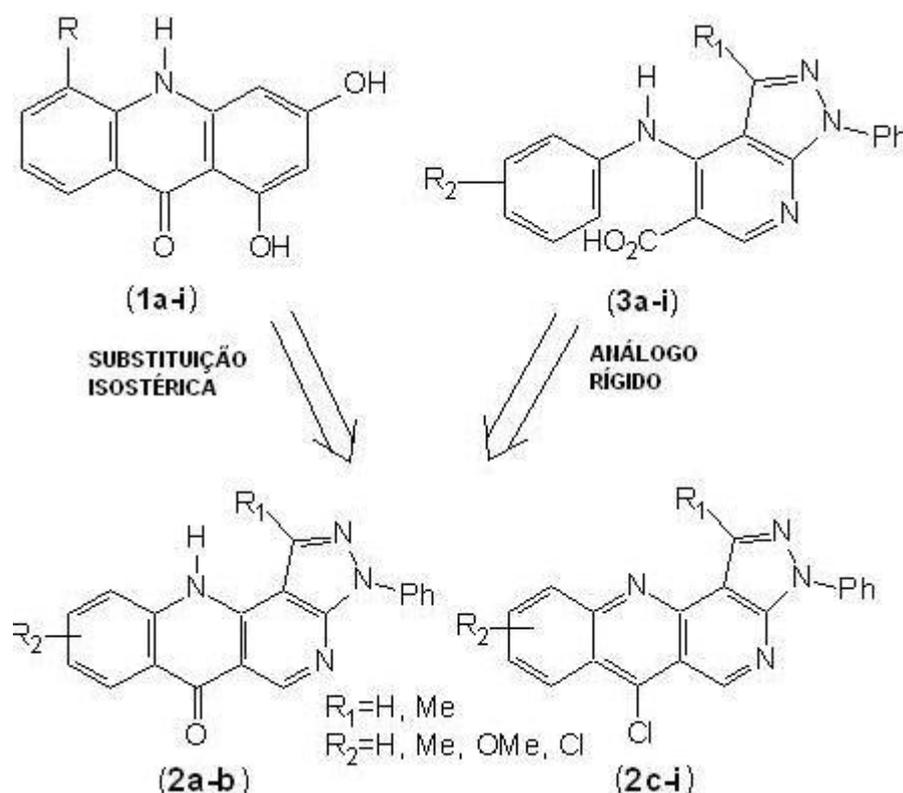


Figura 22. Substituição isostérica e utilização da metodologia do análogo rígido aplicados para o planejamento dos derivados 3*H*-benzo[*b*]pirazolo[3,4-*h*]-1,6-naftiridínicos.

Conforme se pode observar, determinadas características estruturais do núcleo acridona tais como os grupos N₁₀-H e carbonila em C-9 são mantidos nas mesmas posições nos derivados naftiridínicos **2a-b** que corresponde aos grupos N₁₁-H e carbonila em C-6, respectivamente. Entretanto, para os demais derivados (**2c-i**) foi mudada a característica de doador de ligação de hidrogênio do N₁₀-H da acridona paraceptor (N₁₁ da naftiridina) e foi efetuada a remoção do grupo carbonila em C-9 do anel acridona e a inserção de um átomo de cloro na posição 6 do anel naftiridina. O grupo hidroxila na posição C-1 do anel acridona não se manteve na naftiridona (**2a-b**) e nem na naftiridina (**2c-i**). Contudo, o átomo de N-4 das naftiridinas que ocupa uma posição próxima ao grupo hidroxila em C-1 das acridonas, manteve a mesma capacidade aceptora de ligação de hidrogênio. Segundo Lowden e Bastow (2003), os grupos carbonila C-9 e hidroxila em C-1

podem ser responsáveis pela toxicidade celular dos derivados da acridona, assim propor substituições nessas posições sugere a possibilidade de obter um fármaco mais seguro.

Além dessas modificações nos derivados naftiridinicos (**2a-i**), foi proposto a inclusão de substituintes em R1 e em R2 com o intuito de observar as características estruturais e propriedades eletrônicas que podem afetar a atividade antiviral nessa classe de substâncias. A posição R1 nos derivados da série **2** não está presente no sistema acridona. No entanto, avaliamos nos derivados não substituídos (**2 a-d**) e nos derivados com o substituinte metila (**2e-i**). Entretanto, a posição R2 corresponde diretamente aos substituintes nos átomos C-5, C-6, C-7, e C-8 do sistema acridona desenvolvidos por Lowden e Bastow (2003). Nos derivados pirazolo-naftiridinicos os substituintes estão restritos às posições em C-10 ou C-8 (derivados **2a-i**), correspondentes as posições C-5 e C-7 das acridonas, respectivamente, com os mesmos substituintes (hidrogênio, metila, metoxila ou cloro).

Após a síntese, os derivados benzo[*b*]pirazolo[3,4-*h*]-1,6-naftiridinico foram submetidos aos testes de atividade antiviral (HSV-1) e citotoxicidade pelo grupo da Dra Helena C. de Castro e Dra Izabel C.P.P. Frugulhetti do Laboratório de Biologia Celular e Molecular da UFF. Os estudos dos efeitos antivirais foram realizados *in vitro*, no qual avaliou a porcentagem de inibição do processo de replicação do HSV-1 em células VERO (rím de macaco verde da África), após tratamento com 50µM dos derivados. A citotoxicidade foi determinada através da metodologia de exclusão do corante azul de tripan em células VERO não infectadas. Com os derivados mais promissores foi determinado a concentração citotóxica (CC₅₀) comparando-os ao fármaco em referência aciclovir.

5.1.2.1 Estudo de SAR dos derivados benzo[*b*]pirazolo[3,4-*h*]-1,6-naftiridinico anti-HSV-1.

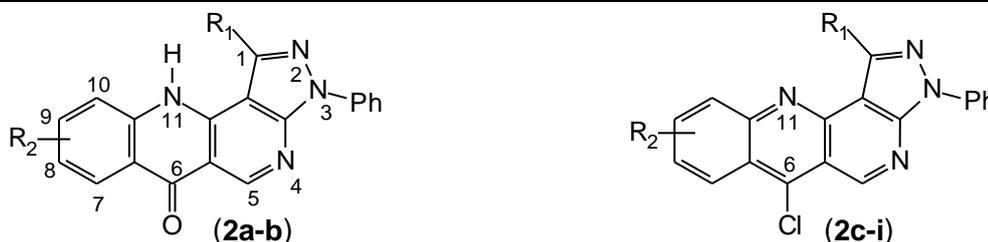
O estudo dos derivados benzo[*b*]pirazolo[3,4-*h*]-1,6-naftiridinico (**2a-i**), mostrou que eles possuem um bom perfil inibitório do HSV-1.

Dentre todos os derivados avaliados, o composto **2f** com o átomo de cloro no C-10 estruturalmente análogo ao derivado da acridona **1b**, exibiu a melhor atividade anti-HSV-1 (100%) e o derivado **2i** com o grupamento metil no C-8, não apresentou atividade inibitória. Ambos os derivados possuem como substituinte R1 o grupamento metil, no entanto, se analisarmos os demais derivados sem substituintes em R1 (**2 c-d**), observamos que a atividade inibitória da replicação viral é significativa (> 50%). Os demais derivados sem substituinte (**2 a-b**) e com o grupo carbonila na posição C6 também não aboliram completamente a atividade do HSV-1.

Esses dados revelam que a presença de substituintes na posição R1, aparentemente, não é determinante para a atividade antiviral desses derivados ao contrário dos substituintes na posição R2 que parece ser essencial para o perfil antiviral, conforme os derivados acridona estudados.

No entanto, a presença de substituintes no anel (R2 em C-8 e C-10) parece ser mais importante para atividade antiviral, considerando que **2f** e **2h** (substituinte em C-10) apresentaram maior atividade do que seus análogos **2g** e **2i** (substituinte em C-8) (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade anti-HSV-1 (% de inibição do HSV-1 numa concentração de 50 μ M) e cálculos da energia de HOMO (E_{HOMO} , eV) e LUMO (E_{LUMO} , eV) e momento dipolo (μ , Debye) dos derivados 3H-benzo[b]pirazolo[3,4-h]-1,6-naftiridinico.



No	R ₁	R ₂	HSV-1	E_{HOMO}	E_{LUMO}	GAP	μ
2 a	H	H	74	-8,15	1,52	9,67	5,60
2b	H	8-Me	92	-8,20	1,63	9,83	5,39
2c	H	8-Me	82	-7,83	0,06	7,89	5,26
2d	H	8-OMe	68	-7,69	0,01	7,70	5,45
2e	Me	H	70	-7,84	0,04	7,88	4,85
2f	Me	10-Cl	100	-7,91	-0,21	8,12	5,37
2g	Me	8-Cl	39	-7,93	-0,19	8,12	2,47
2h	Me	10-Me	66	-7,81	0,07	7,88	4,60
2i	Me	8-Me	NA	-7,75	0,08	7,83	5,44

NA = não ativo

Nos ensaios de citotoxicidade da série de derivados pirazolo-naftiridinicos (**2 c-i**), observou-se que as concentrações citotóxicas são mais altas (CC_{50} = 640-4258 μ M) do que o aciclovir (CC_{50} = 126 μ M), tanto para os derivados ativos quanto para os inativos (conforme Figura 23). Esses dados reforçam que a nova série de derivados naftiridinicos apresenta um perfil de baixa citotoxicidade, favorecendo o uso desses derivados como novos protótipos antivirais.

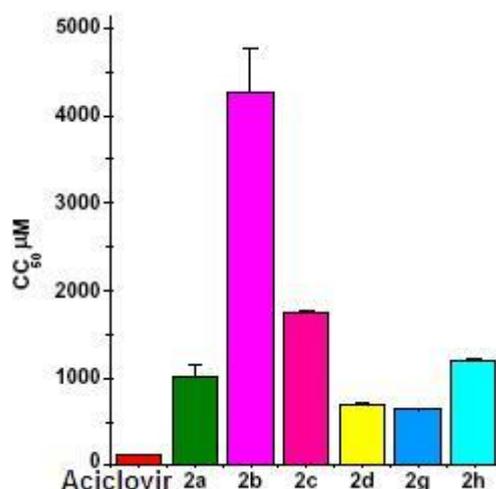


Figura 23. Comparação da concentração citotóxica dos compostos naftiridínicos mais ativos e menos ativos com o aciclovir.

A conformação mais estável de mínimo de energia para todos os derivados naftiridínicos revelou que o anel fenil na posição N-3 é co-planar ao sistema pirazolo-naftiridínico, provavelmente devido à atração eletrostática entre o átomo de hidrogênio na posição orto do anel N3-fenil e os átomos de nitrogênio N-2 e N-4 do sistema pirazolo-naftiridina.

Estudos computacionais dos derivados naftiridínicos foram realizados e as propriedades estruturais e eletrônicas foram avaliadas com o intuito de obter informações importantes sobre o perfil da atividade antiviral. Uma análise geral das propriedades eletrônicas foi calculada tais como energia de HOMO e LUMO, coeficientes de HOMO e LUMO e os valores do momento dipolo. No entanto essas propriedades não demonstraram uma correlação direta com a atividade anti-HSV-1, semelhante ao observado nas acridonas (Tabela 3 e Figura 24).

Os coeficientes de distribuição de HOMO mostraram um perfil semelhante entre os derivados **2a**, **2b**, **2e**, **2f** e **2g**, no qual a distribuição é maior no anel fenila e nos anéis C e D, mostrando a contribuição dos átomos de nitrogênio para a

formação do centro nucleofílico da molécula, enquanto nos demais derivados (**2c**, **2d**, **2h** e **2i**) a presença de substituintes metil e metoxi na posição em R2, contribuíram para uma distribuição de HOMO por todo o conjunto de anéis do derivado. Já o estudo dos coeficientes de distribuição de LUMO mostra que o centro eletrofílico se distribui igualmente entre os derivados sobre o sistema naftiridinico, exceto o derivado não substituído **2e** (Figura 24). Apesar dessas diferenças não foi possível correlacionar esses dados com possíveis pontos de interação com o receptor que justifique a atividade anti-HSV.

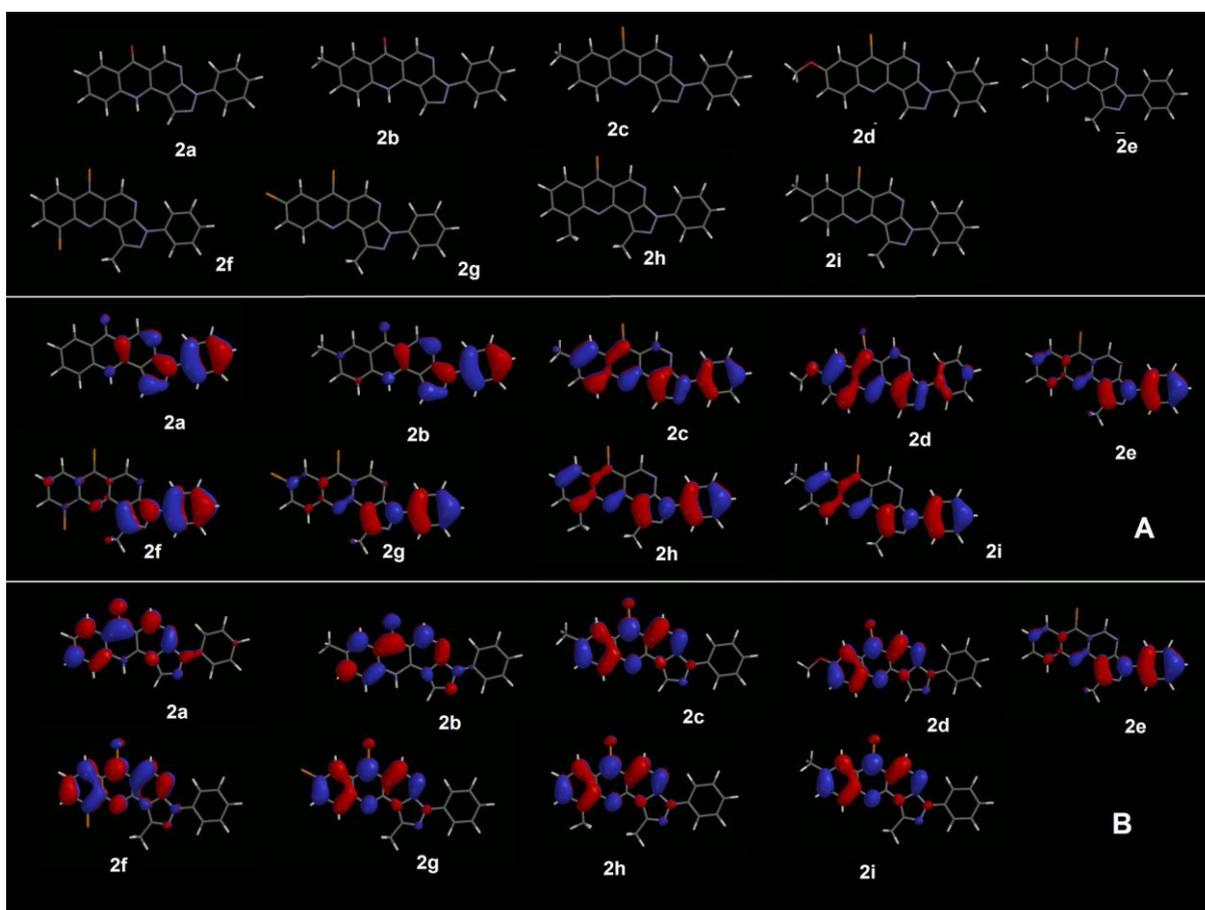


Figura 24. (A) Coeficiente de distribuição dos orbitais HOMO e (B) coeficiente de distribuição dos orbitais LUMO dos derivados naftiridinicos.

A densidade de LUMO para os derivados pirazolo-naftiridinicos (Figura 25) mostrou uma área deficiente em elétrons, representada pela coloração azul,

concentrada na região central do núcleo naftiridinico de forma similar aos derivados de acridona (Figura 19).

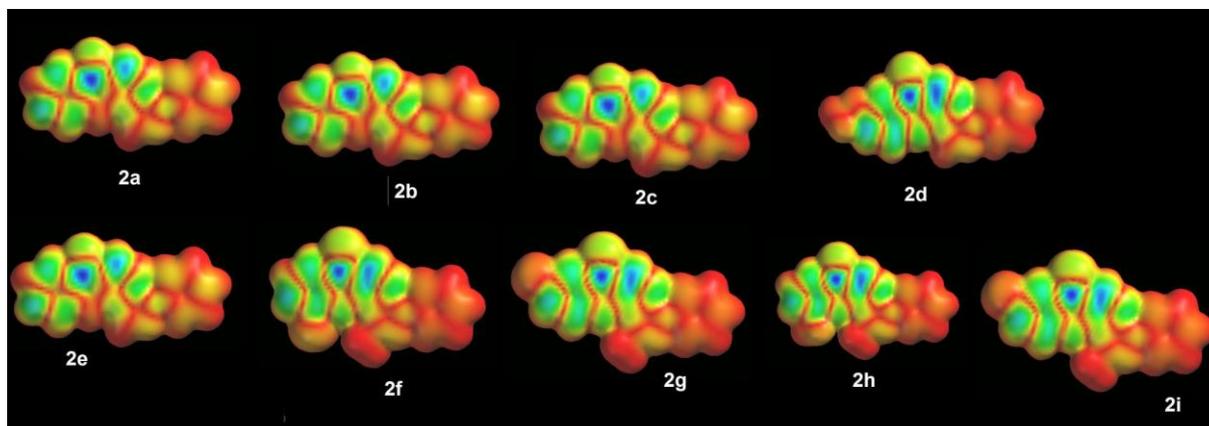


Figura 25. Densidade de LUMO dos derivados naftiridinicos, gerados numa superfície de densidade eletrônica constante de $0,002e/ua^3$.

A análise dos mapas de potencial eletrostático dos derivados **2a-i** mostrou mudanças significativas na sub-unidade naftiridina nos derivados que possuem o grupo carbonila em C-6 (**2a** e **2b**) quando comparado aos derivados com cloro em C-6 (**2 c-i**). Entretanto, deve-se ressaltar que existem compostos com atividades muito semelhantes tanto com grupo carbonila (**2b**, 92%) quanto com átomo de cloro (**2f**, 100%) nesta posição .

Assim, o potencial eletrostático na posição C6 dos derivados pirazolo-naftiridinas não é um fator determinante para a atividade antiviral, fato correspondente ao grupo carbonil em C-9 dos derivados da acridona. Conforme discutido anteriormente, esse potencial eletrostático está presente no MEP de compostos ativos (**1a-h**) e inativos (**1i-j**) dos derivados de acridona, mostrando não ter também, uma correlação direta com a atividade anti-HSV-1.

Contudo, desde que Lowden e Bastow propuseram a remoção e/ou substituição de grupamento carbonila em C-9 e/ou grupamento hidroxila em C-1 no

sistema acridona com o intuito de reduzir a citotoxicidade, o nosso grupo planejou uma nova série que não contém estes grupamentos simultaneamente, reduzindo a possibilidade de citotoxicidade dos compostos (Figura 26).

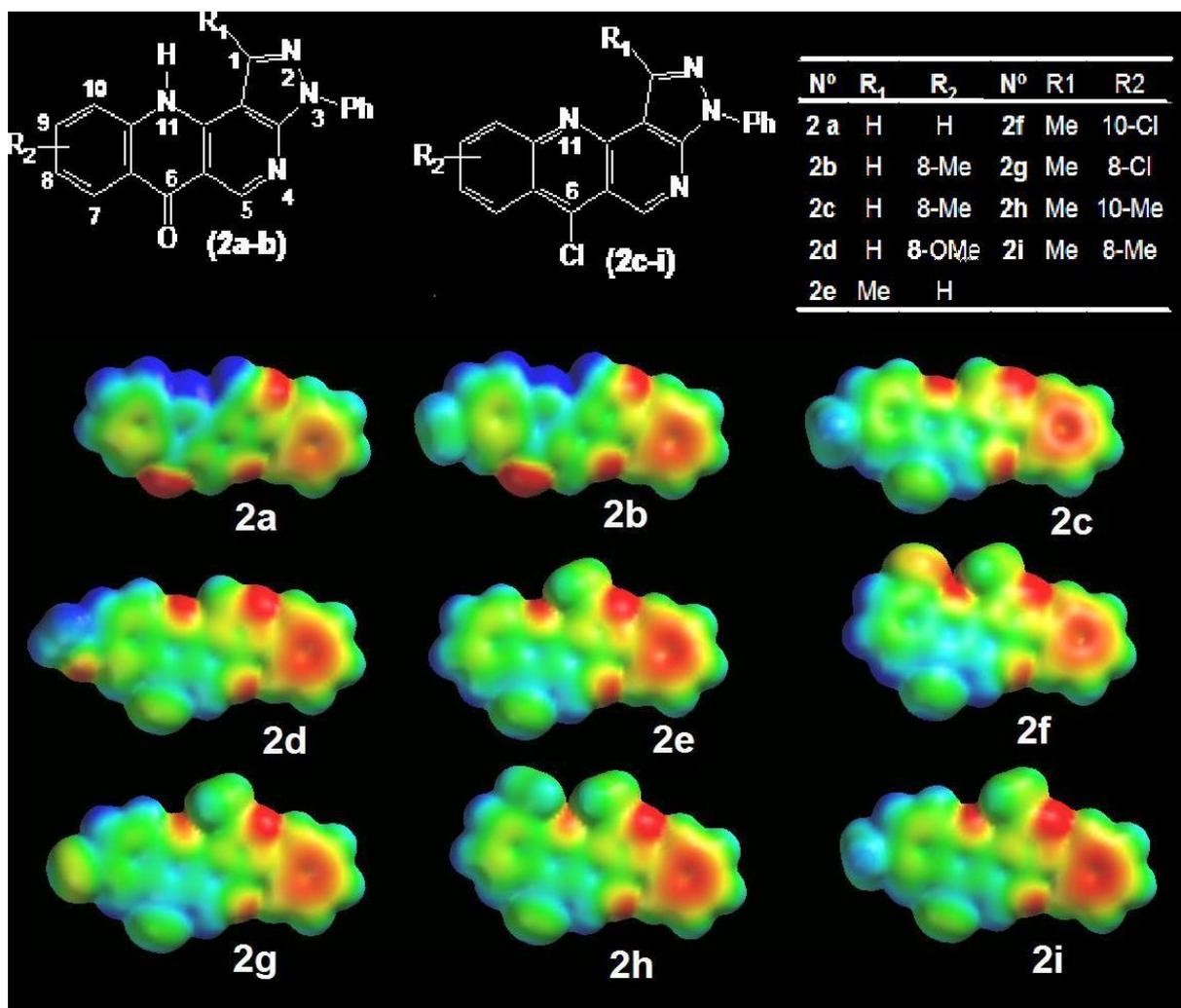


Figura 26. Mapa de potencial eletrostático (MEP) dos derivados benzo[*b*]pirazolo[3,4-*h*]-1,6-naftiridínico, sobre uma superfície de 0,002 e/ua³ entre -25 a 30 Kcal/mol.

Nos resultados teóricos do MEP de **2f** e **2g** observamos que a densidade eletrônica (coloração vermelha) diminuiu quando o átomo de cloro está no C-8 (**2g**) (Figura 26). Provavelmente a perda dessa região negativa pode ser deletéria para a ligação de **2g** ao receptor/alvo do vírus, ao contrário do observado para **2f** (substituinte cloro em C-10) conforme visto no ensaio biológico. Além disso,

comparando com os derivados **2h** (com substituinte metila em C-10) e **2e** (não substituído) os resultados de atividade anti-HSV-1 foram menores que nos derivados com substituintes mais eletronegativos em posição R2 (**2f**), corroborando com os dados obtidos para os derivados da acridona (**1 a-j**), em que grupos mais eletronegativos (como o Cloro) no C-5 aumentam a atividade anti-HSV-1.

As series 1 e 2 possuem similaridades estruturais. Os derivados da acridona (serie 1) e a porção naftiridinica dos derivados da serie 2, em especial os derivados 1b e 2f, em que o substituinte cloro em C-5 e C-10, respectivamente, se sobrepõem. Foi realizado o alinhamento estrutural do derivado acridona mais ativo (**1b**) com derivado naftiridinico mais ativo (**2f**) e do derivado inativo (**2i**), com o intuito de explorar as similaridades entre as estruturas, revelando que essas posições são de suma importância para a atividade anti-HSV-1.(Figura 27).

Assim, na comparação dos MEPs entre os derivados acridona (**1a-j**) e os derivados naftiridinicos (**2a-i**) demonstrou que o maior potencial eletrostático negativo está próximo a posição C-5 (R3=OH) nos análogos da acridona e ao N-2 dos derivados pirazolo- naftiridínicos. E apesar do volume proporcionado pelo grupamento metila em C-8 no derivado inativo (**2i**), esta característica estrutural ao parece ser relevante, uma vez que o derivado **2c** também apresenta essa substituição e demonstrou atividade anti-HSV-1 relevante (82%de inibição).

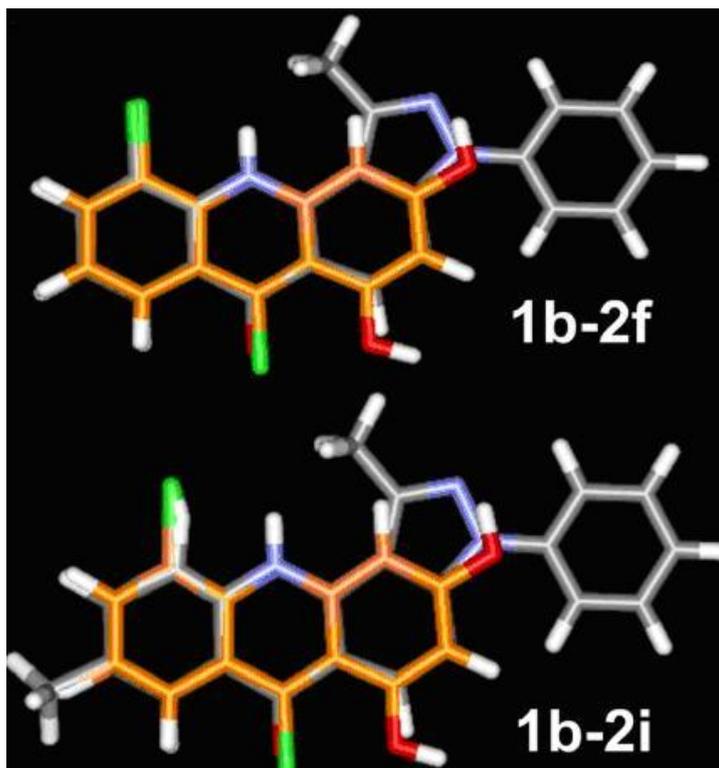


Figura 27. Sobreposição do derivado pirazolo-naftiridinico mais ativo (2f) e do derivado inativo (2i) com o derivado acridona de maior atividade (1b).

Apesar desses resultados, vale ressaltar que quando a base de dados experimentais é uma célula e não o ligante/receptor propriamente dito, o estudo de SAR se torna limitado, principalmente quando o alvo ou o mecanismo de ação é desconhecido, como ocorre nos casos descritos.

Estudos de Lowden e Bastow (2004) mostram que dois compostos regioisomeros apresentam mecanismos de ação diferentes, no qual o derivado **1h** interfere na clivagem e empacotamento do DNA do HSV-1, enquanto o derivado **1f** possui uma inibição viral mediada por uma via diferente, possivelmente pela inibição da DNA topoisomerase-II celular, peça chave na replicação viral. Esses dados explicam em parte, a ausência de correlação direta entre parâmetros estereo-eletrônicos com a atividade biológica (Tabela 2 e 3). Assim, o fato de ainda não serem elucidados o alvo terapêutico e o mecanismo de ação dos derivados pirazolo-

natiridínicos, limita a interpretação dos resultados obtidos pelo método computacional, permitindo estudos contínuos.

5.1.2.2 Análise dos Parâmetros Físico-Químico e Toxicológicos *In Silico* dos derivados 3-*H*-benzo[*b*]pirazolo[3,4-*h*]-1,6-naftiridínico anti-HSV-1.

Teoricamente a boa absorção oral de um fármaco pode ser relacionada com os parâmetros abordados na Regra dos Cinco, no qual os parâmetros devem ter Massa Molecular (MM) <500 g/mol, cLog P < que 5, número de ligações rotáveis <10, área de superfície polar (PSA) <140 Å², número de aceptores de ligação de Hidrogênio (HBA) <10 e número de doadores de ligação de hidrogênio (HBD) <5 . Assim, para avaliar a possibilidade dos derivados estudados se tornarem fármacos de administração oral, esses parâmetros foram calculados (Tabela 4).

Os valores obtidos indicaram que todos os compostos são suficientemente hidrofóbicos para penetrar as membranas biológicas e acessar o sítio de ação atendendo a regra dos cinco que define critério de cLogP menor que 5. A análise de sítios doadores e aceptores de ligação de hidrogênio, mostra que nos derivados acridona (**1a-j**) o número de doadores de ligação de hidrogênio é maior que nos pirazolo-naftiridínicos (2 a-i), devido à presença das hidroxilas, enquanto que os aceptores de ligação de hidrogênio estão relativamente semelhantes. Apesar dessa diferença, as duas séries atendem a regra dos cinco. Os valores de PSA e número de ligações rotáveis também satisfazem a regra para boa biodisponibilidade oral dos derivados das duas séries estudadas.

Tabela 4. Valores de cLogP, MM (Massa Molecular), PSA (área de superfície polar), Nº Rot (número de ligações rotáveis), HBA(acceptor de ligação de hidrogênio) e HBD (Doadores de ligação de hidrogênio) dos derivados de acridona e naftiridinicos mais ativos.

Der.	c Log P	MM (g/mol)	PSA (A²)	Nº Rot	HBA	HBD
1a	2,44	257,24	82,55	1	5	3
1b	3,16	261,66	73,31	0	4	3
1c	2,86	241,24	73,31	0	4	3
1d	3,16	261,66	73,31	0	4	3
1e	3,16	261,66	73,31	0	4	3
1f	3,16	261,66	73,31	0	4	3
1g	2,55	227,21	73,32	0	4	3
1h	3,35	275,69	62,32	1	4	2
1i	3,77	259,69	53,9	0	3	2
1j	4,64	295,72	53,09	0	3	2
2 a	2,59	312,33	63,58	1	5	1
2b	2,91	326,35	63,58	1	5	1
2c	4,06	344,82	43,08	1	4	0
2d	3,64	360,80	52,84	2	5	0
2e	4,16	344,80	43,61	1	4	0
2f	4,78	378,25	43,61	1	4	0
2g	4,78	379,25	43,61	1	4	0
2h	4,48	358,83	43,61	1	4	0
2i	4,48	358,83	43,61	1	4	0
ACV	1,42	225,20	119,06	4	8	4

Todos os compostos também atenderam aos requisitos da “regra dos 5” de Lipinski modificada para penetração no SNC inferindo uma boa capacidade de penetração no SNC, visto que fármacos que agem no SNC devem ter uma área de superfície polar (PSA) < 90 A².(Tabela 4) e número de ligações rotáveis <8, além de PM menor ou igual a 400, cLogP menor ou igual 5, HBA menor ou igual a 7 e HBD menor ou igual a 3.

Esses dados são de suma importância, visto que, o Sistema Nervoso Central (SNC) pode agir como reservatório de partículas virais que podem levar a encefalites e a progressiva destruição das funções cerebrais que chegam a ser fatais em determinados casos (TATTEVIN, 2009). Assim a liberação de agentes antivirais nesses locais é extremamente necessária. Estudos mostram que antivirais análogos de nucleosídeos como o aciclovir (ACV), AZT e didanosina (DDI), atualmente usados nas encefalites herpéticas e demência causada pela AIDS, exibem baixas penetrações no SNC (para ACV os valores são menores que 5%) apesar de apresentarem lipofilicidade favoráveis. Esse mecanismo não está totalmente elucidado, mas acredita-se que bombas de efluxo e de transporte ativo excluam essas moléculas, limitando a distribuição dessas drogas para o cérebro (HASEGAWA e KAWAGUCHI, 2002). Esses dados são interessantes visto que o ACV possui um PSA de 119 \AA^2 , valores não favoráveis para uma boa permeação pela barreira hematoencefálica, conforme Regra de Lipinski ($\text{PSA} < 90 \text{ \AA}^2$).

Calculando o *DrugScore* dos compostos mais ativos contra HSV, ou seja, os derivados 1-hidroxiacridona (**1a** e **1b**) e dos derivados pirazolo-naftiridinas (**2b**, **2c**, e **2f**), observa-se um valor de *drugscore* semelhante ao do fármaco de referência ACV. Curiosamente, os derivados **2b**, **2c**, e **2f** apresentaram um valor de *drugscore* semelhante ao aciclovir, enquanto os compostos derivados de acridona (**1a** e **1b**) apresentaram um potencial *drugscore* maior (Figura 28).

A análise da toxicidade *in Silico* foi realizada através da predição dos riscos toxicológicos – mutagênico, tumorigênico e risco de reprodução dos compostos. Apenas o composto **2b** apresentou algum tipo de risco, sendo esse de irritabilidade, o que explica o baixo potencial *drugscore* do mesmo. Os baixos efeitos na reprodutividade, irritabilidade, e tumorigenicidade dos demais compostos avaliados

(1a, 1b, 2c, e 2f) indicaram um perfil de baixo risco, similar ao aciclovir, que nos aspectos analisados se apresentou como seguro para uso terapêutico. É importante ressaltar que a toxicidade predita não é totalmente confiável, nem garante que esses compostos são completamente isentos de efeitos tóxicos. Contudo, ressalta o perfil promissor desses compostos para estudos experimentais mais aprofundados.

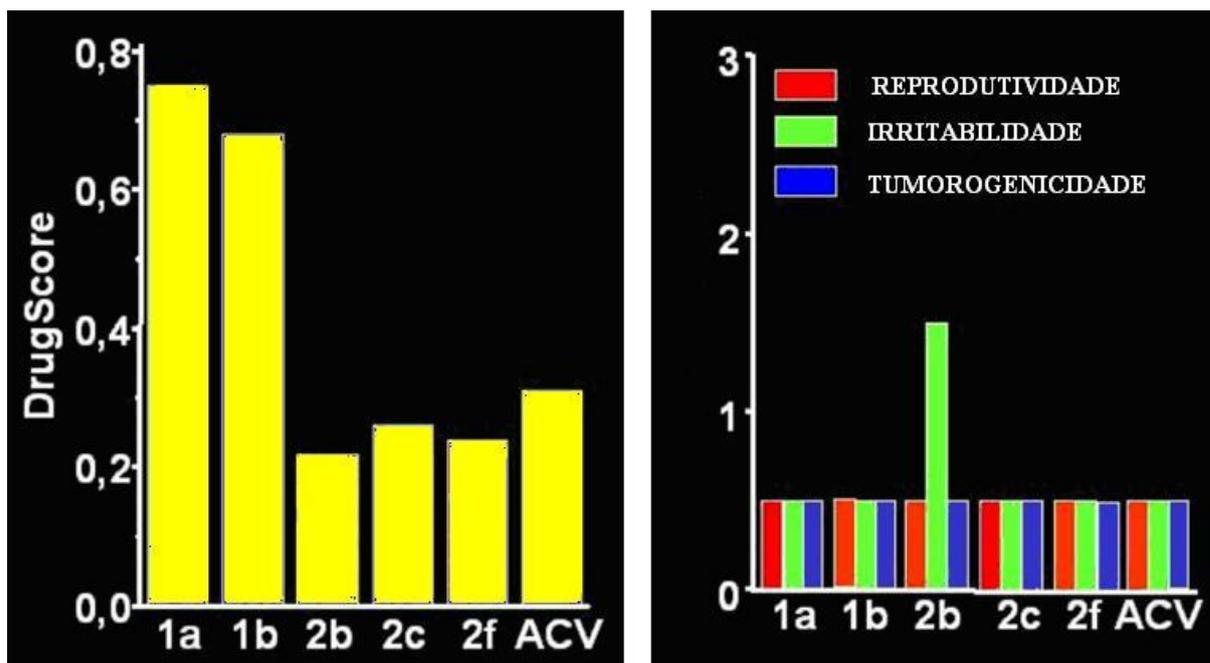


Figura 28. Cálculo do valor de drug score e do risco toxicológico teórico dos compostos mais ativos da serie 1 e 2 e do aciclovir (ACV), usando o programa OSÍRIS.

6 CONCLUSÃO

Estudos teóricos dos derivados acridona (1 a-j) com atividade anti-HSV, além do planejamento e síntese de novos derivados 3*H*-benzo[*b*]pirazolo[3,4-*h*]-1,6-naftirídnicos da série **2** (**2a-i**), os quais também apresentou um bom perfil antiviral, foram avaliados nesse estudo.

A análise dos parâmetros estereo-eletrônicos do mapa de potencial eletrostático dos derivados acridona (**1a-g**) e os derivados naftiridinicos (**2a-i**) demonstrou que o maior potencial eletrostático negativo está próximo a posição C-3 substituída pelo grupo hidroxila nos análogos da acridona e ao N-2 dos derivados pirazolo-naftiridina (grupos ricos em elétrons), Sugerindo que essa região tem grande importância para interações eletrostáticas com o sítio receptor, em ambas as séries.

O melhor perfil de inibição do HSV-1 da série 2 foi observado para o derivado **2f** que contém um átomo de cloro em C10, semelhante ao derivado acridona de melhor atividade (**1b**). Assim, no estudo da relação estrutura-atividade dos derivados a posição dos grupos funcionais tem impacto sobre a atividade observada. Assim, o substituinte cloro na posição do C-5 das acridonas, próximo ao átomo de nitrogênio do anel, é extremamente importante para a atividade inibitória do HSV-1 na série 1. Funcionalidade semelhante é observada nos derivados naftiridinicos (série 2), cujo derivado com maior atividade inibitória possui o átomo de cloro na posição C-10 também localizado próximo ao átomo de nitrogênio no anel central.

Embora o risco de toxicidade definidos pelo programa Osiris não sejam inteiramente confiáveis, a previsão teórica de baixo perfil de toxicidade desses compostos, reforça a atividade significativa de 2c e 2f. Este resultado teórico, reforçada pelo ensaio experimental de citotoxicidade, confirma que estes derivados possuem baixo perfil de toxicidade.

Os dados dos parâmetros físico-químicos e farmacocinéticos *in silico* dos derivados acridona e pirazolo-naftiridinicos mais ativos (**1 a**, **1b**, **2c e 2f**) mostraram semelhantes ou melhores que o aciclovir, fármaco atualmente em uso. Portanto, análises de outras propriedades moleculares poderiam ser úteis para a concepção de novos fármacos anti-HSV-1 usando alguns desses derivados como prototipo, tal como composto 2f.

Todos os resultados obtidos com os estudos teóricos e atividade biológica reforçam o perfil antiviral promissor dos derivados pirazolo-naftiridinicos, bem como, indicam a necessidade de novos estudos que permitam entender a especificidade de ação dos derivados, no entanto, investigações teóricas e experimentais mais aprofundadas são necessárias.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABREU, Paula Alvarez - **Receptor de NMDA: modelagem molecular por homologia e análise SAR de antagonistas de um potencial alvo terapêutico em doenças neurodegenerativas**, 2008. 86 f. Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia) - Universidade Federal Fluminense, Niteroi.

ADELSON M. E., FEOLA M., TRAMA J., TILTON J. C., MORDECHAIE., **Simultaneous detection of herpes simplex virus types 1 and 2 by real-time PCR and Pyrosequencing**. *Journal of Clinical Virology* 33: 25–34, 2005.

AFONSO, Ilídio Ferreira - **Modelagem Molecular e Avaliação da Relação Estrutura-Atividade Acoplados a Estudos Farmacocinéticos e Toxicológicos *in silico* de Derivados Heterocíclicos com Atividade Antimicrobiana**, 2008. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

AJAY; MURCKO, M.A. - **Computational Methods To Predict Binding Free Energy In Ligand-Receptor Complexes**. *J Med Chem* 26: 4953-67, 1995.

AKANITAPICHAT P., LOWDEN C.T., BASTOW K.F.-**1,3-Dihydroxyacridone derivatives as inhibitors of herpes virus replication**. *Antiviral Research* 45, 123–134, 2000.

AKANITAPICHAT P., BASTOW K.F., **The antiviral agent 5-chloro-1,3-dihydroxyacridone interferes with assembly and maturation of herpes simplex virus**. *Antiviral Research* 53: 113–126, 2002.

ALBIN R., CHASE R., RISANO C., LIEBERMAN M., FERRARI E., SKELTON A., BUONTEMPO P., COX S., DEMARTINO J., WRIGHT-MINOQUE J., JIRAU-LUCCA G., KELLY J., AFONSO A., KWONG A., ROZHON E., CONNELL J. **SCH 43478 and analogs: in vitro activity and in vivo efficacy of novel agents for herpesvirus type 2**. *Antiviral Research* 35: 139–146, 1997

ANDREI C. C. **Da química medicinal à química combinatória e Modelagem molecular: Um curso pratico**. 1ª Ed. Brasileira .- Barueri, SP: Manole, 2003

ARAÚJO J. M. G., SCHATZMAYR H.G.A., FILIPPIS A. M. B., SANTOS F. B., CARDOSO M. A., BRITTO C., COELHO J. M. C. O., NOGUEIRA R. M. R., - **A retrospective survey of dengue virus infection in fatal cases from an epidemic in Brazil**. *Journal of Virological Methods* 155: 34–38, 2008

AZEVEDO, A.R.; FRUGULHETTI, I.C.C.P.; KHAN, M.A.; KHAKWANI, S.; BERNARDINO, A.M.R. - **Synthesis and biological evaluation of 1H-pyrazolo[3,4-b]Pyridine-5-carboxylic acids against vaccinia virus**. *Heteroc Comm*; 8: 47-50, 2002.

BANFI A. P., **Encephalitis: Which are and how to treat?** *Rev Chil Infect* 20: S28 - S33, 2003

BARRECA M. L., CHIMIRRI A., CLERCQ E.D., LUCA L.D., MONFORTE A.M., MONFORTE P., RAO A., ZAPPALÀ M. **Anti-HIV agents:desing and Discovery of new potent RT inhibitors.** *Il Farmaco*, 58: 259-263; 2003

BARREIRO, E.J.; RODRIGUES, C.R.; ALBUQUERQUE, M.G.; SANT'ANNA, M.R.; ALENCASTRO, R.B. - **Modelagem Molecular: Uma Ferramenta Para O Planejamento Racional De Fármacos Em Química Medicinal.** *Quím Nova*, 20 (3), 300-10, 1997.

BERNARDINO A. M.R., PINHEIRO L. C. S., RODRIGUES C. R., LOUREIRO N. I., CASTRO H. C.,RANGEL A. C, SABATINI-LOPES J., BORGES J. C., CARVALHO J. M., ROMEIRO G. A., FERREIRA V. F, FRUGULHETTI I. C. P. P., VANNIER-SANTOS M. A. -**Design, synthesis, SAR, and biological evaluation of new 4-(phenylamino)thieno[2,3-b]pyridine derivatives;** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*,14: 5765-5770, 2006.

BERNARDINO, A.M.R.; CASTRO, H.C.; FRUGULHETTI, I.C.P.P.; LOUREIRO, N.I.V.; AZEVEDO, A.R.; PINHEIRO, L.C.S.; SOUZA, T.M.L.; GIONGO, V.; PASSAMANI, F.; MAGALHÃES, U.O.; ALBUQUERQUE, M.G.; CABRAL, L. M.; RODRIGUES, C.R. – **SAR of a series of anti-HSV-1 acridone derivatives, and a rational acridone-based design of a new anti-HSV-1 3H-benzo[b]pyrazolo[3,4-h]-1,6-naphthyridine series.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 313-321, 2008.

BERNARDINO, A.M.R.; FERREIRA, V.F.; FONTOURA, G.A.T.; FRUGULHETTI, I.C.P.P.; LEE, M.Y.; SOUZA, M.C.B.V; - **Synthesis of 4-anilino-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine derivatives and their in vitro antiviral activities.** *J Braz Chem Soc*; 7: 273-77, 1996.

BOUFFIER L., BALDEYROU B., HILDEBRAND M., LANSIAUX A., DAVID-CORDONNIER A., CARREZ D., CROISY A., RENAUDET O., **Amino- and glycoconjugates of pyrido[4,3,2-kl]acridine. Synthesis, antitumor activity, and DNA binding.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14:7520–7530, 2006.

BOULWARE S. L., BRONSTEIN J. C., NORDBY E. C., WEBER P. C.,**Identification and characterization of a benzothiophene inhibitor of herpes simplex virus type 1 replication which acts at the immediate early stage of infection.** *Antiviral Research* 51: 111–125, 2001

BRADY R. C. AND BERNSTEIN D. I.-**Treatment of herpes simplex virus infections.** *Antiviral Research* 61: 73–81,2004.

BRIDEAU R. J., KNECHTEL M. L., HUANG A., VAILLANCOURT V. A., VERA E.E., . A., OIEN N. L., HOPKINS T, WIEBER J. L., WILKINSON K. F., RUSH B. D. HWENDE F. J., WATHEN M. W.- **Broad-spectrum antiviral activity of PNU-183792, a 4-oxo-dihydroquinoline, against human and animal herpesviruses.** *Antiviral Res.* 54: 19–28, 2002.

BRITO, MONIQUE ARAÚJO DE - **QSAR-3D de Inibidores Não-Nucleosídeos da Transcriptase Reversa do HIV-1: Estudos Independente e Dependente da Enzima.** 2008, 231 fls. Dissertação (Doutorado em Química Orgânica); Rio de Janeiro, UFRJ, Instituto de Química.

CASTRO H. C., LOUREIRO N. I.V, PUJOL-LUZ M., SOUZA A. M. T., ALBUQUERQUE M. G., SANTOS D. O. , CABRAL L. M., FRUGULHETTI I. C. AND RODRIGUES C. R., **HIV-1 Reverse Transcriptase: A Therapeutical Target in the Spotlingt.** *Current Medicinal Chemistry*, 13: 313-324, 2006

CHAVATTE, P.; FARCE, A. **A computational view of COX-2 inhibition,** *Anti-Cancer Ag. Med. Chem.* 6(3):239-249, 2006.

CHILUKURI S., ROSEN T. **Management of acyclovir-resistant herpes simplex virus,** *Dermatol Clin* 21: 311 –320, 2003.

CLARK D. E. AND PICKETT S. P. - **Computational methods for the prediction of 'drug-likeness'** *DDT* 5 (2): 2000

CLARK, D.E.; MURRAY, C.W.; LI, J. - **Current Issues In De Novo Molecular Design.** *Reviews In Computational Chemistry* 11: 67-125, 1997.

COEN D. M. & SCHAFFER P. **A Antiherpesvirus Drugs: A Promising Spectrum of New Drugs and Drug Targets.** *Nature Reviews -Drug Discovery* 2: 278-288, 2003

COHEN, N.C.; BLANEY, J.M.; HUMBLET, C.; GUND, P.; BARRY, D.C. - **Molecular Modeling Software And Methods For Medicinal Chemistry.** *J Med Chem* 33 (3): 883-94, 1990.

CONSONNI, V.; TODESCHINI, R.; PAVAN, M.; **“Structure/Response Correlations and Similarity/Diversity Analysis by GETAWAY Descriptors. Theory of the Novel 3D Molecular Descriptors”**, *J. Chem Inf. Comput. Sci.*, 2002, 42(3), 682-692

CRAMER, R.; PATTERSON, D.E.; BUNCE, J.D. – **Comparative Molecular Field Analysis (Comfa). 1. Effects of Shape on Binding of Steroids to Carrier Proteins.** *J Am Chem Soc* 110: 5959-67, 1988.

CRUTE J. J., GRYGON C. A., HARGRAVE K. D., SIMONEAU B., FAUCHER A. M., BOLGER G., KIBLER P., LIUZZI M., CORDINGLEY M. G. **Herpes simplex virus helicase–primase inhibitors are active in animal models of human disease.** *Nature Med.* 8, 386–391 (2002)

DAS B. C., HUSSAIN S., NASARE V., BHARADWAJ M. - **Prospects and prejudices of human papilomavirus vaccines in India.** *Vaccine* 26, 2669—2679, 2008.

DAVIS, A.M.; RILEY, R.J.; **“Predictive ADMET studies, the challenges and the opportunities”**, *Curr. Op. in Chem. Biol.* 8(4): 378–386, 2004

DE CHERCQ E., **Antiviral drugs in current clinical use.** *Journal of Clinical Virology* 30: 115–133, 2004.

DE CLERCQ E., **Antiviral drugs: current state of the art.** *Journal of Clinical Virology* 22:73–89, 2001

DE CLERCQ E., **Recent highlights in the development of new antiviral drugs.** *Current Opinion in Microbiology*, 8: 552–560, 2005

DE CLERCQ E., **-The design of drugs for HIV and HCV.** *Nature Reviews -drug discovery* 6:1001 -1018, 2007

DELMAS F., AVELLANEDA A., DI GIORGIO C., ROBIN M., DE CLERCQ E., TIMON-DAVID P., GALY J.P. **Synthesis and antileishmanial activity of (1,3-benzothiazol-2-yl) amino-9-(10H)-acridinone derivatives.** *European Journal of Medicinal Chemistry* 39: 685–690, 2004

DEWAR, M. J. S.; ZOEBISCH, E. G.; HEALY, E. F.; STEWART, J. J. P. - **AM1: A new general purpose quantum mechanical molecular model.** *J. Am. Chem. Soc.*,13: 107, 3902-3909, 1985.

DIMASI D. J., HANSEN R. W., GRABOWSKI H. G., **The price of innovation: new estimates of drug development costs** *Journal of Health Economics* 22: 151–185, 2003

EURENIUS, K.P.; CHATFIELD, D.C.; BROOKS, B.R.; HODOSCEK, M. - **Enzyme Mechanisms With Hybrid Quantum And Molecular Mechanical Potentials. I. Theoretical Considerations.** *In J Quantum Chem* 60: 1189-200, 1996.

FADEYI O. O., ADAMSON S. T., MYLES E. L., OKORO C. O.,- **Novel fluorinated acridone derivatives. Part 1: Synthesis and evaluation as potential anticancer agents** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18 : 4172–4176, 2008.

FONSECA B. A. L, **Clínica e Tratamento das Infecções Pelos Vírus Herpes Símples tipo 1 e 2.** *Medicina Ribeirão Preto*, 32: 147-153, 1999

FORESMAN, J.B.; FRISCH, A.E. **Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods: A Guide to Using Gaussian.** Gaussian, Inc, USA. 1993.

GELDENHUYS W. J., GAASCH K. E., WATSON M., ALLEN D. D. AND VAN DER SCHYF C. J. - **Optimizing the use of open-source software applications in drug discovery.** www.drugdiscoverytoday.com - *DDT* .11 (3/4):126 – 132, 2006

GOODELL J. R., MADHOK A. A., HIASA H. AND FERGUSON D. M., **Synthesis and evaluation of acridine- and acridone-based anti-herpes agents with topoisomerase activity.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14: 5467–5480, 2006

GOODMAN & GILMAN'S. **The Pharmacological Basis of Therapeutics.**; Brunton, L.L.; Lazo, J.S.; Parker K.L.; Buxton, L.L.; Blumenthals, D.; 10th ed. McGraw-Hill: New York, 2006.

GRANT, G.H.; RICHARDS, W.G.; **Computational Chemistry**. *Oxford Science Publications*. 1996.

GUPTA R., WARREN T., WALD A. **Genital herpes**. *The Lancet*, 370: 2127–2137, 2007.

HANSCH, C.; SAMMES, P.G.; TAYLOR, J.B. **Comprehensive medicinal chemistry: the rational design. Mechanistic study and therapeutic application of chemical compounds**; Oxford, 1990.

HARTLINE C. B., HARDEN E. A., WILLIAMS-AZIZA S. L., KUSHNER N. L., BRIDEAU R. J., KERN E. R., **Inhibition of herpesvirus replication by a series of 4-oxo-dihydroquinolines with viral polymerase activity**. *Antiviral Research* 65: 97–105, 2005

HASEGAWA T. AND KAWAGUCHI T., **Delivery of Anti-Viral Nucleoside Analogues to the Central Nervous System**. *Curr. Med. Chem. – Anti-Infective Agents*, 1: 55-63 2002

HEHRE, W.J. - **A Guide to Molecular Mechanics and Quantum Chemical Calculations**. *Wavefunction, Inc.*; 2003.

HEWLETT G., HALLENBERGER S. AND RUBSAMEN-WAIGMANN H., **Antivirals against DNA viruses (hepatitis B and the herpes viruses)**. *Current Opinion in Pharmacology* 4: 453–464, 2004

HODINKA R. L., **What Clinicians Need to Know About Antiviral Drugs And Viral Resistance**. *Antimicrobial Resistance*. 11 (4): 945-967, 1997.

HOU, T.; WANG, J.; ZHANG, W.; XU, X, - **ADME Evaluation in Drug Discovery. 7. Prediction of Oral Absorption by Correlation and Classification**. *J. Chem. Inf. Model.*, 47, 208-218, 2007

JACOBS MR, BAJAKSOUZIAN S, WINDAU A, APPELBAUM PC, PATEL MV, GUPTA SV, BHAGWAT SS, DE SOUZA NJ, KHORAKIWALA HF- **In vitro activity of the new quinolone WCK 771 against staphylococci**. *Antimicrob Agents Chemother*. 48:3338-3342, 2004.

JORGENSEN, W.L. **The Many Roles of Computation in Drug Discovery**, *Science* 303(5665):1813-1818. 2004.

KADAN, R.U., ROY, N. – **Recent Trends in Drug Likeness Prediction: A Comprehensive Review of *In Silico* Methods**. *Indian Journal of Pharmaceutical Science*, 69, 5, 609-615, 2007.

KARELSON, V.; LOBANOV, V. - **Quantum-chemical Descriptors in QSAR/QSPR Studies**. *Chem. Rev.*, 1996, 96, 1027-1043.

KELLER, T.H.; PICHOTA, A.; YIN, Z. – **A Practical view of druggability**. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10, 357-361, 2006.

KHAN, M.T.H.; SYLT, I. – **Predictive QSAR Modeling for Successful Predictions of the ADMET Properties of Candidate Drug Molecules.** *Current Drug Discovery Technologies*, 4, 141-149, 2007.

KLEYMANN, G., FISCHER R., BETZ U A.K., HENDRIX M., ET AL. **New helicase-primase inhibitors as drug candidates for the treatment of herpes simplex disease.** *Nature Med.* 8, 391–398, 2002.

KNIFE D. M. AND CLIFFE A., **Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection.** *Nature reviews microbiology* 6: 211-221, 2008.

KRAJEWSKI K., ZHANG Y., PARRISH D., DESCHAMPS J., ROLLER P. P., PATHAK V. K., **New HIV-1 reverse transcriptase inhibitors based on a tricyclic benzothiophene scaffold: Synthesis, resolution, and inhibitors activity.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16: 3034-3038, 2006

KRIEBS J. M., **Understanding Herpes Simplex Virus: Transmission, Diagnosis, and Considerations in Pregnancy Management.** *Journal of Midwifery & Women's Health* 53: 202 – 208, 2008

KUMAR M., THOMPSON H., VARNELL E. D., KAUFMAN H. E. - **Synergistic interaction of aciclovir and a helicase-primase inhibitor, BAY 57-1293, against herpes simplex virus type 1.** *International Journal of Antimicrobial Agents* // doi:10.1016/j.ijantimicag.2008.11.009

LAMEIRA J., MEDEIROS I. G., REIS M., SANTOS A. S., ALVES C. N., **Structure-activity relationship study of flavone compounds with anti-HIV-1 integrase activity: A density functional theory study.** *Boorganic & Medicinal Chemistry*, 14: 7105-7112, 2006

LEACH, A. - **Molecular Modelling – Principles and Applications.** *Pearson Education Limited*, II ed., 2001.

LEVI C. G., PANNUTI C. S., GUARDIÃ M. J. CORRÊA S. M.R., SATO M., ANGELO M.J.O.,- **Forma disseminada de infecção neonatal pelo vírus do "herpes simplex" - falha terapêutica da adenina-arabinosídeo.** *Pediatria* 4: 245-250, 1982

LIPINSKI, C.A. - **Lead and drug-like compounds: the rule-of-five revolution.** *Drug Discovery Today: Technologies*, 2004, 1, 337-341.

LIPINSKI, C.A. LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J.; **Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings,** *Adv. Drug Deliv. Rev.*,23(1-3), 3-25. 1997.

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

LOWDEN C.T. E BASTOW K.F., Cell culture replication of herpes simplex virus and, or human cytomegalovirus is inhibited by 3,7-dialkoxylated, 1-hydroxyacridone derivatives. *Antiviral Research* 59: 143–154, 2003

LUPI O., **Herpes simples**. *An bras Dermatol*, 75 (3):261-275, 2000

MAROZIN S., PRANK U. AND SODEIK B. **Herpes simplex virus type 1 infection of polarized epithelial cells requires microtubules and access to receptors present at cell–cell contact sites**. *Journal of General Virology* 85, 775–786, 2004

MELLADO P. T., CASTILLO L. ANDRESEN M., CAMPOS M., PÉREZ C., BAUDRAND M. R., - **Decompressive craniectomy in a patient with an herpetic encephalitis and refractory intracranial Hypertension**. *Rev Méd Chile* 131: 1434-1438, 2003

MILLER, P.- **Role of pharmacoeconomic analysis in R&D decision making**. *Pharmacoeconomics*. 23: 1–12, 2005

MOFFAT, J., LEISENFELDER, S. & HARTIGAN, A. **VZV replication in retinal pigment epithelial cells causes an induction of cyclindependent kinase 2 and growth can be blocked by roscovitine, a cdk 2 inhibitor**. *27th International Herpesvirus Workshop*, Abstract 13.15, (Cairns, Australia, 2002).

MONTGOMERY, R.I., M.S. WARNER, B.J. LUM, P.G. SPEAR. **Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/ NGF receptor family**. *Cell*. 87(3):427-36, 1996.

MORFIN F., THOUVENOT D., **Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs**. *Journal of Clinical Virology* 26: 29_37, 2003.

MURRAY, ET AL. **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Ganabara koogan. 2002. Capítulo 61. Retrovirus. p.422-433 .

NEWCOMB, W. W. & BROWN, J. C. **Inhibition of herpes simplex virus replication by WAY-150138: assembly of capsids depleted of the portal and terminase proteins involved in DNA encapsidation**. *J. Virol.* 76, 10084–10088, 2002.

OIEN, N. L. *et al.* **Broad-spectrum antiherpesvirus activities of 4-hydroxyquinoline carboxamides, a novel class of herpesvirus polymerase inhibitors**. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 724–730, 2002.

OJALA P. M., SODEIK B., EBERSOLD M. W., KUTAY U., HELENIUS A. **Herpes Simplex Virus Type 1 Entry into Host Cells:Reconstitution of Capsid Binding and Uncoating at the Nuclear Pore Complex In Vitro**. *Molecular and Cellular Biology*, 20 (13): 4922–4931, 2000

PAJOUHESH, H; LENZ, G.R. **Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs**. *NeuroRx*. 2(4): 541-553. 2005

PEÇANHA E. P, ANTUNES O. A. C., TANURI A. **Pharmacological strategies for anti-HIV therapy.** *Quim. Nova*, 25:1108-1116, 2002.

PEREIRA, MARIANA BURNIER CARLOS. **Detecção do Herpes Virus Humano 1 E 2 e do Citomegalovirus nos Gânglios Trigeminais de Cadáveres, através da Técnica Imunoenzimática, utilizando Anticorpos Monoclonais.** 2002, 93fls. Dissertação (Mestrado em Medicina área de concentração Dermatologia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro- Rio de Janeiro.

PERTEL P. E AND SPEARP.G. **Modified Entry and Syncytium Formation by Herpes Simplex Virus Type 1 Mutants Selected for Resistance to Heparin Inhibition.** *Virology* 226: 22–33, 1996

Pharmaceutical Research and Manufacturers of America – **PhARMA 2007**, Washington, DC www.phrma.org, (retirado em outubro de 2008).

POH, K.L., ANG, B.W., BAI, F., **A comparative analysis of R&D project evaluation methods.** *R&D Management* 31, 63–75, 2001.

QUINN J. P., DALZIEL R. G., NASH A. A. - **Herpes virus latency in sensory ganglia & a comparison with endogenous neuronal gene expression.** *Progress in Neurobiology* 60 :167-179, 2000.

RAEVSKY, O.A.; **Physicochemical Descriptors in Property-Based Drug Design,** *Mini Rev. Med. Chem.*, 4(10) : 1041-1052, 2004.

RAJACANI J., VOJVODOVA A. & INGEBORG U. K., **Peculiarities of Herpes Simplex Virus (HSV) Transcription: An overview.** *Virus Genes* 28:3, 293–310, 2004

REIS, N.R.S.; MOTTA-CASTRO, A.R.C.; SILVA, A.M.C.; TELES, S.A.; YOSHIDA, C.F.T. & MARTINS, R.M.B. - **Prevalence of hepatitis C virus infection in quilombo remnant communities in Central Brazil.** *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 50(6): 359-360, 2008.

REYES, M. *ET AL.* **Acyclovir-resistant genital herpes among persons attending sexually transmitted disease and acquired immunodeficiency clinics.** *Arch. Intern. Med.* 163, 76–80 (2003).

RILEY I. E., **Herpes Simplex Vírus.** *Seminars in Perinatology*, 22 (4): 284-292, 1998.

RODRIGUES, C.R. – **Modelagem Molecular.** *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola.* No 3, 2001.

SACKS S. L., GRIFFITHS P.D., COREY L., COHEN C., CUNNINGHAM A., DUSHEIKO G.M., SELF S., SPRUANCE S., STANBERRY L.R. WHITLEY W. R. J.- **HSV shedding.** *Antiviral Research* 63: S1:S19–S26, 2004.

SANT'ANNA C.M.R. - **Glossário de Termos Usados no Planejamento de Fármacos.** *Quim. Nova* 25(3):505-512, 2002.

SCHANG L. M., BANTLY A. KNOCKAERT M., SHAHEEN F., MEIJER L., MALIM M. H., GRAY N. S. AND SCHAFFER P. A. - **Pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors inhibit replication of wild-type and drugresistant strains of herpes simplex virus type 1 by targeting cellular, not viral, proteins.** *J. Virol.* 76: 7874–7882, 2002.

SCHANG, L. M., PHILLIPS, J. & SCHAFFER, P. A.-**Requirement for cellular cyclin-dependent kinases in herpes simplex virus replication and transcription.** *J. Virol.* 72, 5626–5637, 1998

SCHLEISS M. R., **Persistent and Recurring Viral Infections: The Human Herpesviruses.** *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 39:7-23, 2009

SCIORTINO M. T., MÉDICI M. A., MARINO-MERLO F., ZACCARIA D., GIUFFRÈ-CUCULLETTO M., VENUTI A, GRELLI S., BRAMANTI P., MASTINO A. **Involvement of gD/HVEM interaction in NF-κB-dependent inhibition of apoptosis by HSV-1 gD.** *Biochemical Pharmacology* 76: 1522 – 1532, 2008.

SHUKLA D., LIU J. BLAIKLOCK P., SHWORAK N. W., XIAOMEI B., ESKO J. D., COHEN G. H., EISENBERG R. J., ROSENBERG R. D., SPEAR P. G., **A Novel Role for 3-O-Sulfated Heparan Sulfate in Herpes Simplex Virus 1 Entry .** *Cell*, 99: 13–22, 1999.

SIMMONS A., **Clinical Manifestations and Treatment Considerations of Herpes Simplex Virus Infection.** *The Journal of Infectious Diseases* 186: S71–S77, 2002

SITARAMA, B. GUNTURI, S.B.; NARAYANANA, R.; KHANDELWALB, A. **“In silico ADME modelling 2: Computational models to predict human serum albumin binding affinity using ant colony systems”**, *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, 14, 4118–4129.

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

SPEAR P. G., **Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry.** *Cellular Microbiology* 6 (5), 401–410, 2004.

SPEAR P.G., AND LONGNECKER R., **Herpesvirus Entry: an Update** *Journal of Virology* 77 (18): 10179–10185, 2003.

STANKIEWICZ-DROGON A., PALCHYKOVSKA L. G., KOSTINA V. G., ALEXEEVA I. V., SHVED A. D., BOGUSZEWSKA-CHACHULSKA A. M. **New acridone-4-carboxylic acid derivatives as potential inhibitors of Hepatitis C virus infection.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16 : 8846–8852, 2008

STEWART, J.J.P. **Optimization of parameters for semiempirical methods II. Applications**, *J. Comp. Chem.*, 10(2), 221-264, 1989.

STEWART, J.J.P.; **Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method**, *J. Comp. Chem.*, 10(2), 209-220, 1989.

STRÁNSKÁ R., SCHUURMAN R., NIENHUIS E., GOEDEGEBUURE I. W., POLMAN M., WEEL J. F., WERTHEIM-VAN DILLEN P. M., BERKHOUT R. J. M., VAN LOONV. M.,- **Survey of acyclovir-resistant herpes simplex virus in the Netherlands: prevalence and characterization**. *Journal of Clinical Virology* 32: 7–18, 2005.

TANG Y.,ZHU W., CHEN K., JIANG H. **New technologies in computer-aided drug design: Toward target identification and new chemical entity discovery**. *Drug Discovery Today: Technologies | Medicinal chemistry* 3 (3): 307-313, 2006

TARAPOREWALA I.B. -**Thiazolo[5,4-*b*]acridines and thiazolo[4,5-*b*]acridines: probable pharmacophores of antiviral and anti-tumor marine alkaloids**. *Tetrahedronletters* 32 (1): 39-42, 1992.

TATTEVIN P. **Infectious meningoencephalitis in non-immunocompromised adult: State of the art**. *La Revue de médecine interne* 30: 125–134, 2009.

TETKO, I.V.; BRUNEAU, P.; MEWES, H.; ROHRER, D.C.; PODA, G.I. – **Can We Estimate the Accuracy of ADMET Predictions?** *Drug Discovery Today*, 11, 700-707, 2006.

THOMAS, G. **Fundamentals of Medicinal Chemistry**. Chichester: John Wiley & Sons, 2003

THOMAS, J.R.; HERGENROTHER, P.J. – **Targeting RNA with small molecules**. *Chemical Reviews*, 108, 4, 1171-1244, 2008

THOMSEN, D. R. *et al.* **Amino acid changes within conserved region III of the herpes simplex virus and human cytomegalovirus DNA polymerases confer resistance to 4-oxo-dihydroquinolines, a novel class of herpesvirus antivirals**. *J. Virol.* 77: 1868–1876, 2003.

TURPIN J.A., R.W. BUCKHEIT JR., D. DERSE, M. HOLLINGSHEAD, K. WILLIAMSON, C. PALAMONE, M.C. OSTERLING, S.A. HILL, L. GRAHAM, C.A. SCHAEFFER, M. BU, M. HUANG, W.M. CHOLODY, C.J. MICHEJDA, W.G. RICE, **Inhibition of acute-, latent-, and chronic-phase human immunodeficiency virus type1 (HIV-1) replication by a bistriazoloacridone analog that selectively inhibits HIV-1 transcription**. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42 : 487– 494. 1998.

VAN DE WATERBEEMD, H.; GIFFORD, E.; **ADMET in silico modeling: towards prediction paradise?**, *Nature Rev. Durg Discov.*,2(3): 192-204. 2003

VAN ZEIJL, M., FAIRHURST, J., JONES, T. R., VERNON, S. K., MORIN, J., LAROCQUE, J., FELD, B., O'HARA, B., BLOOM, J. D., JOHANN, S. V. - **Novel**

class of thiourea compounds that inhibit herpes simplex virus type 1 DNA cleavage and encapsidation: resistance maps to the UL6 gene. *J. Virol.*74: 9054–9061, 2000.

VANCE J. R., BASTOW K. F., **Inhibition of DNA Topoisomerase II Catalytic Activity by the Antiviral Agents 7-Chloro-1,3- dihydroxyacridone and 1,3,7-Trihydroxyacridone.** *Biochemical Pharmacology*, 58: 703–708, 1999.

VEBER, D.F.; JOHNSON, R.S.; CHENG, H-Y; SMITH, B.R.; WARD, K.W.; KOPPLE, K.D. - **Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates.** *J. Med. Chem.*, 45, 2615-2623, 2002.

WALTERS, W.P.; MURCKO, M.A. **Prediction of 'drug-likeness,** *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 4(3): 255–271, 2002.

WANG, J.; KRUDY, G.; HOU, T.; ZHANG, W.; HOLLAND, G.; XU, X. – **Development of Reliable Aqueous Solubility Models and Their Application in Druglike Analysis.** *J. Chem. Inf. Model.*, 47, 1395-1404, 2007.

WHITLEY R. J. & ROIZMAN B. **Herpes simplex virus infections.** *The Lancet* 357: 1513–1518, 2001

WU J. J., PANG K. R., HUANG D. B., TYRING S. K., **Advances in Antiviral Therapy.** *Dermatol Clin* 23: 313 – 322, 2005.

YEUNG-YUE K. B., BRENTJENS M. H., LEE P. C., TYRING S. K., **Herpes simplex viruses 1 and 2.** *Dermatol Clin* 20: 249–266, 2002

YOON M. & SPEAR P. G., **Disruption of Adherens Junctions Liberates Nectin-1 To Serve as Receptor for Herpes Simplex Virus and Pseudorabies Virus Entry.** *Journal of Virology*, 76 (14): 7203–7208, 2002

YU YU J.&, GITTINS J., **Models and software for improving the profitability of pharmaceutical research,** *European Journal of Operational Research* 189: 459–475, 2008

ZARUBAEV V.V., SLITA A. V., KRIVITSKAYA V.Z., SIROTKIN A. K., KOVALENKO A.L., CHATTERJEE N. K., **Direct antiviral effect of cycloferon (10-carboxymethyl-9-acridanone) against adenovirus type 6 in vitro.** *Antiviral Research* 58: 131–137, 2003.

ZHANG, G.; MUSGRAVE, C.B.; **Comparison of DFT Methods for Molecular Orbital Eigenvalue Calculations,** *J. Phys. Chem. A*, 2007, 111, 1554-1561.

Anexo de artigos publicados durante o período do mestrado

1 - BERNARDINO, A.M.R.; CASTRO, H.C.; FRUGULHETTI, I.C.P.P.; LOUREIRO, N.I.V.; AZEVEDO, A.R.; PINHEIRO, L.C.S.; SOUZA, T.M.L.; GIONGO, V.; **PASSAMANI, F.**; MAGALHÃES, U.O.; ALBUQUERQUE, M.G.; CABRAL, L. M.; RODRIGUES, C.R. – SAR of a series of anti-HSV-1 acridone derivatives, and a rational acridone-based design of a new anti-HSV-1 3*H*-benzo[*b*]pyrazolo[3,4-*h*]-1,6-naphthyridine series. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 313-321, 2008.

2 - SILVA, F. C., SOUZA, M. C. B. V., FRUGULHETTI, I. I. P., CASTRO, H.C., SOUZA, S. L. O., SOUZA, T. M. L., RODRIGUES, D. Q., SOUZA, A. M. T., ABREU, P.A., **PASSAMANI, F.**, RODRIGUES, C. R. Synthesis, HIV-RT inhibitory activity and SAR of 1-benzyl-1*H*-1,2,3- triazole derivatives of carbohydrates. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 44: 373e383, 2009.