

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**JULIANA DA FONSECA REZENDE E MELLO**

**ESTUDOS DE RELAÇÃO ESTRUTURA ATIVIDADE E *DOCKING* MOLECULAR  
DE DERIVADOS BENZOXAZINONAS COM HSV-1 PROTEASE VISANDO O  
PLANEJAMENTO DE NOVOS ANTIVIRAIS**

Dissertação de Mestrado

Orientadores: Prof. Dr. Carlos Rangel Rodrigues  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Monique Araújo de Brito

Rio de Janeiro  
2012

**JULIANA DA FONSECA REZENDE E MELLO**

**ESTUDOS DE RELAÇÃO ESTRUTURA ATIVIDADE E *DOCKING* MOLECULAR  
DE DERIVADOS BENZOXAZINONAS COM HSV-1 PROTEASE VISANDO O  
PLANEJAMENTO DE NOVOS ANTIVIRAIS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadores: Prof. Dr. Carlos Rangel Rodrigues  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Monique Araújo de Brito

Rio de Janeiro

2012

## Ficha Catalográfica

Mello, Juliana da Fonseca Rezende

Estudos de relação estrutura atividade e *docking* molecular de derivados benzoxazinonas com HSV-1 protease visando o planejamento de novos antivirais. / Juliana da Fonseca Rezende e Mello. -- Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Farmácia, 2012.

110p.

Orientadores: Prof. Dr. Carlos Rangel Rodrigues  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Monique Araújo de Brito

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro / Faculdade de Farmácia / Rio de Janeiro, 2012

1. Herpesvirus. 2 Protease de HSV-1. 3. Docking molecular. 4. Relação Estrutura Atividade. 5. Druglikeness. 6. Drugscore. 7. Modelagem Comparativa. 8. Benzoxazinonas. 9. Estudos prospectivos - Dissertação. I. Rodrigues, Carlos Rangel. II. Brito, Monique Araújo. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia IV Título

**JULIANA DA FONSECA REZENDE E MELLO**

**ESTUDOS DE RELAÇÃO ESTRUTURA ATIVIDADE E *DOCKING* MOLECULAR  
DE DERIVADOS BENZOAZINONAS COM HSV-1 PROTEASE VISANDO O  
PLANEJAMENTO DE NOVOS ANTIVIRAIS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2012.

---

Prof. Dr. Carlos Rangel Rodrigues - Orientador  
Faculdade de Farmácia – UFRJ (Presidente)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Monique Araújo de Brito - Orientadora  
Faculdade de Farmácia – UFF

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivana Correa Ramos Leal  
Faculdade de Farmácia – UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nuria Cirauqui Diaz  
Faculdade de Farmácia – UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Mendonça Teles de Souza  
Faculdade de Farmácia – UFRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Alvarez Abreu  
Faculdade de Farmácia – UFRJ Campus Macaé (suplente)

---

Prof. Dr. Rodrigo Octavio Mendonça Teles de Souza  
Instituto de Química – UFRJ (suplente)

Rio de Janeiro

2012

*À Deus e aos meus pais pela  
compreensão e força nesta trajetória.  
Dedico-lhes esta conquista como gratidão.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pela força, amor, compreensão e paciência durante todos os momentos. Obrigada, sem vocês eu não teria chegado até aqui.

À minha família pelo amor, apoio e confiança dedicados.

Ao Carlos Eduardo, pelo amor, apoio, incentivo e amizade que permitiram que eu alcançasse esta conquista. Obrigada por tudo.

À Prof. Monique Araújo de Brito, minha orientadora, pelos meus conhecimentos adquiridos ainda na graduação e no mestrado. Pelo incentivo, atenção e por ter aberto as portas para que eu conhecesse o professor Carlos Rangel Rodrigues, meu orientador.

Ao professor Carlos Rangel Rodrigues pela oportunidade de me tornar membro de seu laboratório, apoio e atenção dedicada. Obrigada por tornar meu mestrado possível e por todo conhecimento adquirido nesta trajetória.

Aos membros do laboratório ModMolQSAR pelo compartilhamento de conhecimento, apoio, amizade e momentos felizes. Especialmente à Bianca Aloise pela ajuda no início do mestrado e por ser uma ótima ouvinte nos momentos de desabafo.

Às professoras Alessandra Mendonça Teles de Souza e Ana Carolina Rennó Soderó, vocês participaram diretamente da minha trajetória e certamente contribuíram imensamente para a expansão dos meus conhecimentos. Muito obrigada pela atenção, dedicação e paciência.

Aos meus amigos que me apoiaram, me deram força e torceram por mim.

Aos professores e colaboradores do programa de pós-graduação pelo aprendizado e orientações.

Aos professores da banca por aceitarem o convite e contribuírem para a conclusão deste trabalho.

Ao CNPq, CAPES e FAPERJ pelo apoio financeiro que foi fundamental para a realização deste trabalho.

## RESUMO

O herpes simplex é uma das infecções mais comuns da humanidade. A doença é causada pelo vírus herpes simplex (HSV), que é classificado em tipo 1 e tipo 2: o HSV-1 é principalmente associado a infecções faciais e HSV-2, está ligado principalmente às infecções genitais. Estudos demonstraram que diversos vírus codificam uma ou mais proteases, enzimas necessárias para a produção de novos virions infecciosos. Esse trabalho analisou as interações entre a HSV-1 protease e dezoito derivados da benzoxazinona empregando técnicas de modelagem comparativa e *docking* molecular. Em seguida, foram realizados estudos de *Druglikeness* e *Drugscore* dos derivados mais ativos visando o planejamento de novos compostos candidatos para a terapia anti HSV-1. Dois compostos da série de benzoxazinonas, **26** e **29**, apresentaram interações com resíduos importantes para a atividade catalítica da protease de HSV-1. Estes compostos foram utilizados no estudo de *Druglikeness* e *Drugscore* e a molécula **29**, apesar de ser a segunda mais ativa, apresentou os melhores resultados de *Druglikeness* e *Drugscore*. Esses compostos deram origem à quatro novas moléculas (**32-35**) candidatas a fármacos para a terapia anti HSV-1, na qual uma (**34**), apresentou resultados de *docking* molecular promissores, que indicaram interações com os resíduos Ser129, Thr132 e Arg157, importantes para a atividade da protease. Estas interações indicam que a substituição de um átomo de cloro por um átomo de bromo na posição R<sub>4</sub> do novo composto poderia melhorar a atividade da benzoxazinona **26**, revelando um novo protótipo candidato a fármaco na terapia anti HSV-1.

Palavras-chave: Protease; Herpesvirus; Modelagem Comparativa; *Docking* Molecular; Benzoxazinonas.



## ABSTRACT

Herpes simplex is one of the most common infections of humanity. The disease is caused by the herpes simplex virus (HSV), which is classified in type 1 and type 2, among others. Type 1 is mainly associated with facial infections and type 2, with genital infections. Studies have shown that several viruses codify one or more proteases, enzymes that are required for new infectious virions production. This work shows the analysis of the interactions between the HSV-1 protease and benzoxazinone derivatives through comparative modeling and molecular docking studies. After that, there were performed druglikeness and drugscore studies of the most potent derivatives in order to design new compounds candidates to the anti-HSV-1 therapy. Two compounds of the benzoxazinone series, **26** and **29**, showed interactions with important residues for catalytic activity of HSV-1 protease. These compounds were analysed on the Druglikeness and Drugscore studies which showed the compound **29** with the best results, despite exhibiting the second better activity. These compounds afforded four new molecules candidates to the anti HSV-1 therapy, in which one (**34**) showed promising molecular docking result, with interactions between the ligand and the residues Ser129, Thr132 and Arg157, important for the protease activity. The interactions described indicate that the replacement of an atom of chloro for an atom of bromo in the R<sub>4</sub> position of the new compound could increase the activity of the benzoxazinone **26**, revealing a new prototype candidate for the anti HSV-1 therapy.

Keywords: Protease; Herpesvirus; Comparative modeling; Molecular Docking; Benzoxazinones.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: ESTRUTURA DO VIRUS HSV (ADAPTADO DE WATANABE, 2010).....	2
FIGURA 2: ESTRUTURA DO CAPSÍDEO DO VIRUS HSV. TRIPLEXES EM VERDE, VP5 EM HÉXONS EM ROXO CLARO E PENTONS EM AZUL; COMPLEXO ESPECÍFICO DO VÉRTICE DO CAPSÍDEO EM MAGENTA. ADAPTADO DE BAINES, 2011.....	3
FIGURA 3: ESTRUTURA QUÍMICA DOS FÁRMACOS (1-8) UTILIZADOS ATUALMENTE NA TERAPIA CONTRA O HSV-1.....	4
FIGURA 4: ESTRUTURA QUÍMICA DO AMENAMEVIR (9). .....	5
FIGURA 5: ESTRUTURA QUÍMICA DO BILC 821 (10), UM PEPTÍDEOMIMÉTICO INIBIDOR DE PROTEASE DE CITOMEGALOVÍRUS (CMV).....	8
FIGURA 6: ESTRUTURA QUÍMICA DA BENZOAZINONA 2-SUBSTITUÍDA (11). .....	8
FIGURA 7: MECANISMO CATALÍTICO GERAL ACEITO PARA SERINO-PROTEASES (ADAPTADO DE HEDSTROM, 2002) .....	9
FIGURA 8: ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA PROTEASE DE HSV-2 (PDB ID= 1AT3). RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS CONSIDERADOS IMPORTANTES PARA A INIBIÇÃO DA ENZIMA ESTÃO DESTACADOS EM ROSA, E A TRÍADE CATALÍTICA, EM AZUL. ....	10
FIGURA 9: A) MODELO CHAVE-FECHADURA PROPOSTO POR EMIL FISCHER EM 1894. B) MODELO ENCAIXE INDUZIDO PROPOSTO POR DANIEL KOSHLAND EM 1958 (VIEIRA, 2006) (VERLI & BARREIRO, 2005).....	13
FIGURA 10: ESQUEMA PARA OBTENÇÃO DE MODELO TRIDIMENSIONAL ATRAVÉS DA MODELAGEM COMPARATIVA. ....	16
FIGURA 11: À ESQUERDA, MODELO TRIDIMENSIONAL OBTIDO ATRAVÉS DO SERVIDOR SWISS-MODEL PARA A PROTEASE DE HSV-1. HÉLICES A EM AZUL, FOLHAS B EM ROSA E REGIÕES EM ALÇA EM LARANJA. À DIREITA, GRÁFICO DE RAMACHANDRAN DO MODELO DA PROTEASE DE HSV-1. REGIÕES MAIS FAVORÁVEIS (A,B,L -VERMELHO), REGIÕES ADICIONAIS PERMITIDAS (A,B,L,P - AMARELO ESCURO), REGIÕES GENEROSAMENTE PERMITIDAS (~A, ~B, ~L, ~P - AMARELO CLARO), REGIÕES NÃO PERMITIDAS (BRANCO). REGIÕES DE HÉLICE A (A, ~A OU A), REGIÕES DE FOLHA B (B, ~B, OU B), REGIÕES DE HÉLICE A DE MÃO ESQUERDA (L, ~L OU L), REGIÕES PARA GLICINA (P OU ~P). ....	30
FIGURA 12: GRÁFICO COMPARATIVO ENTRE AS PONTUAÇÕES OBTIDAS POR VERIFY 3D DA PROTEASE DE HSV-2 (AZUL) E DO MODELO DA PROTEASE DE HSV-1 GERADO ATRAVÉS DO SERVIDOR SWISS-PROT (VERMELHO).....	31
FIGURA 13: ALINHAMENTO DA ESTRUTURA TERCIÁRIA DA PROTEASE DE HSV-2 OBTIDA PELO PDB (CÓDIGO 1AT3), AZUL, E DA ESTRUTURA TERCIÁRIA DA PROTEASE DE HSV-1 GERADO ATRAVÉS DO SERVIDOR SWISS-MODEL, LARANJA.....	31
FIGURA 14: ALINHAMENTO DA PROTEASE DE HSV-1 COM A PROTEASE DE HSV-2 (MODELO) EDITADO ATRAVÉS DO PROGRAMA ALINE (BOND & SCHUTTELKOPF, 2009). RESÍDUOS	

<p>COLORIDOS ATRAVÉS DE ESCALA DE SIMILARIDADE DO VERMELHO (RESÍDUOS DE ALTA SIMILARIDADE) ATÉ O AZUL CLARO (RESÍDUOS DE BAIXA SIMILARIDADE). EM DESTAQUE COM CONTOURO EM PRETO, RESÍDUOS SEM INFORMAÇÃO ESTRUTURAL.....</p>	32
<p>FIGURA 15: À ESQUERDA, MODELO TRIDIMENSIONAL OBTIDO ATRAVÉS DO PROGRAMA MODELLER PARA A PROTEASE DE HSV-1. HÉLICES A EM VERMELHO, FOLHAS B EM AMARELO E REGIÕES EM ALÇA EM VERDE. À DIREITA, GRÁFICO DE RAMACHANDRAN DO MODELO DA PROTEASE DE HSV-1. REGIÕES MAIS FAVORÁVEIS (A,B,L -VERMELHO), REGIÕES ADICIONAIS PERMITIDAS (A,B,L,P - AMARELO ESCURO), REGIÕES GENEROSAMENTE PERMITIDAS (~A, ~B, ~L, ~P - AMARELO CLARO), REGIÕES NÃO PERMITIDAS (BRANCO). REGIÕES DE HÉLICE A (A, ~A OU A), REGIÕES DE FOLHA B (B, ~B, OU B), REGIÕES DE HÉLICE A DE MÃO ESQUERDA (L, ~L OU L), REGIÕES PARA GLICINA (P OU ~P).....</p>	33
<p>FIGURA 16: GRÁFICO COMPARATIVO DAS PONTUAÇÕES OBTIDAS ATRAVÉS DO VERIFY 3D DO MODELO GERADO ATRAVÉS DO PROGRAMA MODELLER (VERDE) E DO MODELO DA PROTEASE DE HSV-2, 1AT3 (AZUL). .....</p>	34
<p>FIGURA 17: MODELO DA PROTEASE DE HSV-1 OBTIDO ATRAVÉS DO PROGRAMA MODELLER (AMARELO) ALINHADO COM A PROTEASE DE HSV-2 (AZUL). DESTAQUE EM AZUL E VERDE ESCUROS PARA A TRÍADE CATALÍTICA, COMPOSTA PELOS RESÍDUOS HIS61, SER129 E HIS148. ....</p>	35
<p>FIGURA 18: ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS DAS PROTEASES DE HSV-1 E DE HSV-2 OBTIDAS ATRAVÉS DO SERVIDOR PDBSUM. ....</p>	36
<p>FIGURA 19: GRÁFICO DE RAMACHANDRAN DO MODELO DA PROTEASE DE HSV-1 ENCONTRADO NA LITERATURA GERADO ATRAVÉS DO SERVIDOR MODBASE. REGIÕES MAIS FAVORÁVEIS (A,B,L -VERMELHO), REGIÕES ADICIONAIS PERMITIDAS (A,B,L,P - AMARELO ESCURO), REGIÕES GENEROSAMENTE PERMITIDAS (~A, ~B, ~L, ~P - AMARELO CLARO), REGIÕES NÃO PERMITIDAS (BRANCO). REGIÕES DE HÉLICE A (A, ~A OU A), REGIÕES DE FOLHA B (B, ~B, OU B), REGIÕES DE HÉLICE A DE MÃO ESQUERDA (L, ~L OU L), REGIÕES PARA GLICINA (P OU ~P). ....</p>	38
<p>FIGURA 20: GRÁFICO COMPARATIVO DAS PONTUAÇÕES OBTIDAS ATRAVÉS DO VERIFY 3D DO MODELO DA LITERATURA GERADO ATRAVÉS DO PROGRAMA MODBASE (AZUL CLARO) E DO MODELO DA PROTEASE DE HSV-2, 1AT3 (AZUL). ....</p>	39
<p>FIGURA 21: GRÁFICO DE RAMACHANDRAN DO MODELO DA PROTEASE DE HSV-1 ENCONTRADO NA LITERATURA GERADO ATRAVÉS DO SERVIDOR SWISS MODEL REPOSITORY (SMR). REGIÕES MAIS FAVORÁVEIS (A,B,L -VERMELHO), REGIÕES ADICIONAIS PERMITIDAS (A,B,L,P - AMARELO ESCURO), REGIÕES GENEROSAMENTE PERMITIDAS (~A, ~B, ~L, ~P - AMARELO CLARO), REGIÕES NÃO PERMITIDAS (BRANCO). REGIÕES DE HÉLICE A (A, ~A OU A), REGIÕES DE FOLHA B (B, ~B, OU B), REGIÕES DE HÉLICE A DE MÃO ESQUERDA (L, ~L OU L), REGIÕES PARA GLICINA (P OU ~P). ....</p>	40
<p>FIGURA 22: SÉRIE DE BENZOAZINONAS DIVIDIDAS EM AMINO-BENZOAZINONAS (ESQUERDA) E OXI-BENZOAZINONAS (DIREITA). ....</p>	42

FIGURA 23: ESTRUTURA QUÍMICA DO FOSFATO DE DI-ISOPROPILA ( <b>30</b> ) OBTIDO ATRAVÉS DA ESTRUTURA 1AT3 DO PDB. ....	45
FIGURA 24: LIGANTE PEPTÍDEOMIMÉTICO 0FP ( <b>31</b> ) OBTIDO ATRAVÉS DA ESTRUTURA 1NJU DO PDB.....	46
FIGURA 25: LIGANTE PEPTÍDEOMIMÉTICO ( <b>31</b> ). AS LIGAÇÕES QUÍMICAS DESTACADAS EM VERMELHO FORAM MANTIDAS RÍGIDAS DURANTE O RE- <i>DOCKING</i> . ....	47
FIGURA 26: HISTOGRAMA OBTIDO ATRAVÉS DO ARQUIVO DE SAÍDA DO PROGRAMA AUTODOCK. AGLOMERADO MAIS POPULOSO CORRESPONDE AO DE MENOR ENERGIA. ...	48
FIGURA 27: SOBREPOSIÇÃO DO CONFÔRMERO ENCONTRADO NO CRISTAL (AZUL), CÓDIGO PDB 1NJU, COM CONFÔRMERO 23 (AMARELO) DO AGLOMERADO 1 (ACIMA); TABELA MODIFICADA DO ALGOMERADO 1, OBTIDA ATRAVÉS DO ARQUIVO DE SAÍDA DO PROGRAMA AUTODOCK4.2 (ABAIXO). DESTAQUE EM VERMELHO PARA A CONFORMAÇÃO 23 DO AGLOMERADO 1. ....	50
FIGURA 28: RE- <i>DOCKING</i> DO PEPTIDEOMIMÉTICO COM A PROTEASE DE CMV. (A) CONFORMAÇÃO INICIAL DO DOCKING MOLECULAR, (B) CONFÔRMERO 1 DO AGLOMERADO 1 E (C) CONFÔRMERO 23 DO AGLOMERADO 1. EM VERDE, LIGAÇÕES HIDROGÊNIO. ....	51
FIGURA 29: BENZOXAZINONAS COM LIGAÇÕES RÍGIDAS EM VERMELHO PARA ESTUDO DE DOCKING MOLECULAR. ....	53
FIGURA 30: <i>DOCKING</i> MOLECULAR DO COMPOSTO <b>26</b> (AMARELO), O MAIS ATIVO DA SÉRIE DE BENZOXAZINONAS, E RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS PROXIMAIS (AZUL CLARO) COM DESTAQUE PARA A TRÍADE CATALÍTICA (AZUL ESCURO). AS LIGAÇÕES HIDROGÊNIO ESTÃO ILUSTRADAS POR LINHAS PONTILHADAS EM VERDE.....	55
FIGURA 31: COMPOSTO <b>26</b> (AMARELO) NA SUPERFÍCIE DA PROTEASE (VERDE), APÓS O <i>DOCKING</i> MOLECULAR. EM LARANJA, RESÍDUOS COM CARACTERÍSTICA HIDROFÓBICA DA CAVIDADE. ....	56
FIGURA 32: ANÁLISE DAS INTERAÇÕES ENTRE O COMPOSTO <b>26</b> E A PROTEASE DE HSV-1 ATRAVÉS DO SERVIDOR POSE VIEW. AS POSSÍVEIS LIGAÇÕES HIDROGÊNIO SÃO INDICADAS POR LINHAS PONTILHADAS PRETAS.....	57
FIGURA 33: <i>DOCKING</i> MOLECULAR DO COMPOSTO <b>29</b> (VERDE) DA SÉRIE DE BENZOXAZINONAS E LIGAÇÕES HIDROGÊNIO (VERDE) COM RESÍDUOS DA PROTEASE DE HSV-1 (AZUL CLARO). ....	58
FIGURA 34: <i>DOCKING</i> MOLECULAR DO COMPOSTO <b>15</b> (ROSA) DA SÉRIE DE BENZOXAZINONAS E LIGAÇÕES HIDROGÊNIO (VERDE) COM RESÍDUOS DA PROTEASE DE HSV-1 (AZUL CLARO). ....	59
FIGURA 35: <i>DOCKING</i> MOLECULAR DO COMPOSTO <b>24</b> (AZUL ESCURO) DA SÉRIE DE BENZOXAZINONAS E LIGAÇÕES HIDROGÊNIO (VERDE) COM RESÍDUOS DA PROTEASE DE HSV-1 (AZUL CLARO). ....	60
FIGURA 36: REPRESENTAÇÃO DO COMPLEXO OBTIDO POR DOCKING MOLECULAR DO COMPOSTO <b>28</b> (ROXO) DA SÉRIE DE BENZOXAZINONAS. EM DESTAQUE, AS LIGAÇÕES	

HIDROGÊNIO (EM VERDE) DO COMPOSTO <b>28</b> COM RESÍDUOS DA PROTEASE DE HSV-1 (AZUL CLARO).....	61
FIGURA 37: REPRESENTAÇÃO DO COMPLEXO OBTIDO POR <i>DOCKING</i> MOLECULAR DO COMPOSTO <b>25</b> (MARROM) DA SÉRIE DE BENZOXAZINONAS. EM DESTAQUE, AS LIGAÇÕES HIDROGÊNIO (EM VERDE) DO COMPOSTO <b>25</b> COM RESÍDUOS DA PROTEASE DE HSV-1 (AZUL CLARO).....	62
FIGURA 38: REPRESENTAÇÃO DO COMPLEXO OBTIDO POR <i>DOCKING</i> MOLECULAR DO COMPOSTO <b>16</b> (VERDE) DA SÉRIE DE BENZOXAZINONAS. EM DESTAQUE, AS LIGAÇÕES HIDROGÊNIO (EM VERDE) DO COMPOSTO <b>16</b> COM RESÍDUOS DA PROTEASE DE HSV-1 (AZUL CLARO).....	63
FIGURA 39: <i>DOCKING</i> MOLECULAR DAS MOLÉCULAS <b>23</b> (ROXO), <b>27</b> (AMARELO), <b>21</b> (AZUL ESCURO) DA SÉRIE DE BENZOXAZINONAS E LIGAÇÕES HIDROGÊNIO (VERDE) COM RESÍDUOS DA PROTEASE DE HSV-1 (AZUL CLARO). À DIREITA, POSICIONAMENTO DOS COMPOSTOS <b>23</b> , <b>27</b> E <b>21</b> NA SUPERFÍCIE DA PROTEASE DE HSV-1.....	65
FIGURA 40: COMPOSTO <b>13</b> (VERDE) NA SUPERFÍCIE DA PROTEASE DE HSV-1 APÓS <i>DOCKING</i> MOLECULAR (ACIMA). <i>DOCKING</i> MOLECULAR DA MOLÉCULA <b>13</b> DA SÉRIE DE BENZOXAZINONAS E LIGAÇÕES HIDROGÊNIO (VERDE) COM RESÍDUOS DA PROTEASE DE HSV-1 (AZUL CLARO) (ABAIXO). .....	66
FIGURA 41: REPRESENTAÇÃO DO COMPLEXO OBTIDO POR <i>DOCKING</i> MOLECULAR DO COMPOSTO <b>18</b> (ROSA) DA SÉRIE DE BENZOXAZINONAS. EM DESTAQUE, AS LIGAÇÕES HIDROGÊNIO (EM VERDE) DO COMPOSTO <b>18</b> COM RESÍDUOS DA PROTEASE DE HSV-1 (AZUL CLARO).....	67
FIGURA 42: REPRESENTAÇÃO DO COMPLEXO OBTIDO POR <i>DOCKING</i> MOLECULAR DO COMPOSTO <b>17</b> (CINZA) DA SÉRIE DE BENZOXAZINONAS. EM DESTAQUE, AS LIGAÇÕES HIDROGÊNIO (EM VERDE) DO COMPOSTO <b>17</b> COM RESÍDUOS DA PROTEASE DE HSV-1 (AZUL CLARO).....	68
FIGURA 43: COMPARAÇÃO ENTRE OS CONFÔRMEROS DOS COMPOSTOS <b>17</b> (CINZA) E <b>26</b> (AMARELO) E SUAS LIGAÇÕES HIDROGÊNIO (VERDE). .....	70
FIGURA 44: REPRESENTAÇÃO DO COMPLEXO OBTIDO POR <i>DOCKING</i> MOLECULAR DO COMPOSTO <b>14</b> (VERDE) DA SÉRIE DE BENZOXAZINONAS. EM DESTAQUE, AS LIGAÇÕES HIDROGÊNIO (EM VERDE) DO COMPOSTO <b>14</b> COM RESÍDUOS DA PROTEASE DE HSV-1 (AZUL CLARO).....	71
FIGURA 45: REPRESENTAÇÃO DO COMPLEXO OBTIDO POR <i>DOCKING</i> MOLECULAR DO COMPOSTO <b>19</b> (ROSA) DA SÉRIE DE BENZOXAZINONAS. EM DESTAQUE, AS LIGAÇÕES HIDROGÊNIO (EM VERDE) DO COMPOSTO <b>19</b> COM RESÍDUOS DA PROTEASE DE HSV-1 (AZUL CLARO).....	72
FIGURA 46: REPRESENTAÇÃO DO COMPLEXO OBTIDO POR <i>DOCKING</i> MOLECULAR DO COMPOSTO <b>22</b> (ROSA) DA SÉRIE DE BENZOXAZINONAS. EM DESTAQUE, AS LIGAÇÕES HIDROGÊNIO (EM VERDE) DO COMPOSTO <b>22</b> COM RESÍDUOS DA PROTEASE DE HSV-1 (AZUL CLARO).....	73

- FIGURA 47: PEPTIDEOMIMÉTICO 0FP (**31**) COMPLEXADO À PROTEASE DE CITOMEGALOVÍRUS E LIGAÇÕES HIDROGÊNIO (ROSA). DESTAQUE PARA A LIGAÇÃO ENTRE O OXIGÊNIO DA CARBONILA AMÍDICA DO LIGANTE E O ÁTOMO DE NITROGÊNIO DO RESÍDUO ARG 137. FIGURA OBTIDA ATRAVÉS DO PROGRAMA LIGAND EXPLORER. .... 74
- FIGURA 48: SUPERFÍCIE DA PROTEASE (ROXO) COM DESTAQUE PARA O COMPOSTO **12** PRESENTE NA CAVIDADE. *DOCKING* MOLECULAR DO COMPOSTO **12** (AZUL) DA SÉRIE DE BENZOXAZINONAS COM RESÍDUOS DA PROTEASE DE HSV-1 (AZUL CLARO) (ABAIXO). ... 75
- FIGURA 49: (A) GRÁFICO DOS VALORES OBTIDOS PARA *DRUGLIKENESS* DAS BENZOXAZINONAS (VINHO) E PRINCIPAIS FÁRMACOS DISPONÍVEIS PARA TERAPIA DO HSV-1 (VERMELHO). (B) GRÁFICO DOS VALORES DE *DRUGSCORE* OBTIDOS PARA BENZOXAZINONAS (AZUL ESCURO) E PRINCIPAIS FÁRMACOS DISPONÍVEIS PARA TERAPIA DO HSV-1 (AZUL CLARO). .... 77
- FIGURA 50: PLANEJAMENTO DE NOVOS ANÁLOGOS PARA A TERAPIA DE HSV-1. GRUPAMENTOS DA MOLÉCULA **26** (PONTILHADO VERDE) E DA MOLÉCULA **29** (PONTILHADO AZUL) UTILIZADOS NA HIBRIDAÇÃO MOLECULAR. MODIFICAÇÃO DO ANEL FENILA PELO ANEL IMIDAZÓL (PONTILHADO VERMELHO) GERANDO O COMPOSTO **33**; MODIFICAÇÃO DO ÁTOMO CLORO PELO ÁTOMO BROMO (PONTILHADO AMARELO) GERANDO A ESTRUTURA **34**; MODIFICAÇÃO DO ANEL CLORO-FENILA PELO GRUPO PIRIDINA (PONTILHADO ROSA) GERANDO A ESTRUTURA **35**. .... 79
- FIGURA 51: (A) *DOCKING* MOLECULAR DO COMPOSTO PROPOSTO **32**(VERDE) E (B) *DOCKING* MOLECULAR DO COMPOSTO **33** PROPOSTO (AMARELO) COM RESÍDUOS DA PROTEASE DE HSV-1 (AZUL CLARO). .... 82
- FIGURA 52: *DOCKING* MOLECULAR DO COMPOSTO **34** PROPOSTO (ROXO) COM RESÍDUOS DA PROTEASE DE HSV-1 (AZUL CLARO). À DIREITA, SOBREPOSIÇÃO DO COMPOSTO **34** PROPOSTO (AZUL ESCURO) COM O COMPOSTO **26** DO GRUPO DE BENZOXAZINONAS NA SUPERFÍCIE DA PROTEASE DE HSV-1..... 83
- FIGURA 53: *DOCKING* MOLECULAR DO COMPOSTO **35** PROPOSTO (VERDE) COM RESÍDUOS DA PROTEASE DE HSV-1 (AZUL CLARO). .... 84
- FIGURA 54: GRÁFICO DO ESTUDO DE *DRUGLIKENESS* DAS MOLÉCULAS PROPOSTAS 32 (VERDE), 33 (AMARELO), 34 (ROXO), 35 (VERDE). .... 85
- FIGURA 55: GRÁFICO DO ESTUDO DE *DRUGSCORE* DAS MOLÉCULAS PROPOSTAS 32 (VERDE), 33 (AMARELO), 34 (ROXO), 35 (VERDE). .... 85

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: VALORES DE IC <sub>50</sub> PARA DERIVADOS DA 2-AMINO-BENZOXAZINONA (11-19).....	25
TABELA 2: VALORES DE IC <sub>50</sub> PARA DERIVADOS DA 2-OXI-BENZOXAZINONA (20-28).....	26
TABELA 3: COMPARATIVO DAS VALIDAÇÕES DOS MODELOS OBTIDOS ATRAVÉS DA LITERATURA (ROXO) E MODELOS OBTIDOS ATRAVÉS DO PROGRAMA MODELLER E SERVIDOR SMR (LARANJA). DESTAQUE PARA O RESULTADO OBTIDO ATRAVÉS DO PROGRAMA MODELLER, CONSIDERADO O MELHOR MODELO EM RELAÇÃO AOS OUTROS 3. ....	41
TABELA 4: LIGANTES ORDENADOS PELOS VALORES DE ATIVIDADE (IC <sub>50</sub> ). VERDE, MAIS ATIVOS; AMARELO, ATIVIDADE MÉDIA; LARANJA, ATIVIDADE BAIXA; VERMELHO, ATIVIDADE MUITO BAIXA. ....	42
TABELA 5: PARÂMETROS DE ALGORITMO GENÉTICO UTILIZADOS NO ESTUDO DE DOCKING MOLECULAR NO PROGRAMA AUTODOCK. ....	48
TABELA 6: RESULTADOS DO PROGRAMA AUTODOCK4.2 PARA O <i>RE-DOCKING</i> . ....	49
TABELA 7: RESULTADOS OBTIDOS NO <i>DOCKING</i> MOLECULAR DAS MOLÉCULAS PROPOSTAS PARA TERAPIA DO HSV-1 EM RELAÇÃO AOS RESULTADOS OBTIDOS PARA AS BENZOXAZINONAS 25 E 28.....	80
TABELA 8: PARÂMETROS AGRUPADOS DO ARQUIVO DE SAÍDA DO PROGRAMA AUTODOCK4.2 NO CÁLCULO DO COMPOSTO 11 DO GRUPO DE BENZOXAZINONAS.....	95
TABELA 9: PARÂMETROS AGRUPADOS DO ARQUIVO DE SAÍDA DO PROGRAMA AUTODOCK4.2 NO CÁLCULO DO COMPOSTO 12 DO GRUPO DE BENZOXAZINONAS.....	95
TABELA 10: PARÂMETROS AGRUPADOS DO ARQUIVO DE SAÍDA DO PROGRAMA AUTODOCK4.2 NO CÁLCULO DO COMPOSTO 13 DO GRUPO DE BENZOXAZINONAS.....	95
TABELA 11: PARÂMETROS AGRUPADOS DO ARQUIVO DE SAÍDA DO PROGRAMA AUTODOCK4.2 NO CÁLCULO DO COMPOSTO 14 DO GRUPO DE BENZOXAZINONAS.....	96
TABELA 12: PARÂMETROS AGRUPADOS DO ARQUIVO DE SAÍDA DO PROGRAMA AUTODOCK4.2 NO CÁLCULO DO COMPOSTO 15 DO GRUPO DE BENZOXAZINONAS.....	96
TABELA 13: PARÂMETROS AGRUPADOS DO ARQUIVO DE SAÍDA DO PROGRAMA AUTODOCK4.2 NO CÁLCULO DO COMPOSTO 16 DO GRUPO DE BENZOXAZINONAS.....	96
TABELA 14: PARÂMETROS AGRUPADOS DO ARQUIVO DE SAÍDA DO PROGRAMA AUTODOCK4.2 NO CÁLCULO DO COMPOSTO 17 DO GRUPO DE BENZOXAZINONAS.....	97
TABELA 15: PARÂMETROS AGRUPADOS DO ARQUIVO DE SAÍDA DO PROGRAMA AUTODOCK4.2 NO CÁLCULO DO COMPOSTO 18 DO GRUPO DE BENZOXAZINONAS.....	97
TABELA 16: PARÂMETROS AGRUPADOS DO ARQUIVO DE SAÍDA DO PROGRAMA AUTODOCK4.2 NO CÁLCULO DO COMPOSTO 19 DO GRUPO DE BENZOXAZINONAS.....	97
TABELA 17: PARÂMETROS AGRUPADOS DO ARQUIVO DE SAÍDA DO PROGRAMA AUTODOCK4.2 NO CÁLCULO DO COMPOSTO 20 DO GRUPO DE BENZOXAZINONAS.....	98
TABELA 18: PARÂMETROS AGRUPADOS DO ARQUIVO DE SAÍDA DO PROGRAMA AUTODOCK4.2 NO CÁLCULO DO COMPOSTO 21 DO GRUPO DE BENZOXAZINONAS.....	98

TABELA 19: PARÂMETROS AGRUPADOS DO ARQUIVO DE SAÍDA DO PROGRAMA AUTODOCK4.2 NO CÁLCULO DO COMPOSTO 22 DO GRUPO DE BENZOXAZINONAS.....	98
TABELA 20: PARÂMETROS AGRUPADOS DO ARQUIVO DE SAÍDA DO PROGRAMA AUTODOCK4.2 NO CÁLCULO DO COMPOSTO 23 DO GRUPO DE BENZOXAZINONAS.....	99
TABELA 21: PARÂMETROS AGRUPADOS DO ARQUIVO DE SAÍDA DO PROGRAMA AUTODOCK4.2 NO CÁLCULO DO COMPOSTO 24 DO GRUPO DE BENZOXAZINONAS.....	99
TABELA 22: PARÂMETROS AGRUPADOS DO ARQUIVO DE SAÍDA DO PROGRAMA AUTODOCK4.2 NO CÁLCULO DO COMPOSTO 25 DO GRUPO DE BENZOXAZINONAS.....	99
TABELA 23: PARÂMETROS AGRUPADOS DO ARQUIVO DE SAÍDA DO PROGRAMA AUTODOCK4.2 NO CÁLCULO DO COMPOSTO 26 DO GRUPO DE BENZOXAZINONAS.....	100
TABELA 24: PARÂMETROS AGRUPADOS DO ARQUIVO DE SAÍDA DO PROGRAMA AUTODOCK4.2 NO CÁLCULO DO COMPOSTO 27 DO GRUPO DE BENZOXAZINONAS.....	100
TABELA 25: PARÂMETROS AGRUPADOS DO ARQUIVO DE SAÍDA DO PROGRAMA AUTODOCK4.2 NO CÁLCULO DO COMPOSTO 28 DO GRUPO DE BENZOXAZINONAS.....	100



## LISTA DE ABREVIATURAS

*dpf	<i>docking parameter file</i>
*gpf	<i>grid parameter file</i>
1D	Unidimensional
3D	Tridimensional
ADT	AutoDockTools
AM1	Austin Model 1
AMBER	<i>Assisted Model Building and Energy Refinement</i>
CADD	<i>Compute-Aided Drug Design</i>
CASTp	<i>Computed Atlas of Surface and Topography of proteins</i>
CHARMM	<i>Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics</i>
cLogP	Lipofilicidade calculada
CMV	Citomegalovirus
DFT	<i>Density Functional Theory</i> (Teoria do Funcional da Densidade)
DNA	<i>Deoxiribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
GA	<i>Genetic Algorithm</i> (Algoritmo Genético)
HIV	<i>Human Immunodeficiency virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
HSSP	<i>Homology-derived Secondary Structure of Proteins database</i>
HSV-1	<i>Herpes Simplex Virus</i>
IC <sub>50</sub>	Concentração que inibe 50% da viabilidade viral
ICP35	<i>Infected cell protein</i>
LGA	<i>Lamarckian Genetic Algorithm</i> (Algoritmo Genético Lamarckiano)
LogS	Solubilidade Intrínseca
MMFF	<i>Molecular Mechanics Force Field</i> (Campo de Força de Mecânica Molecular)
OPLS	<i>Optimized Potentials for Liquid Simulations</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PM3	Parametric Model 3
PM6	Parametric Model 6
PMP	<i>Protein Model Portal</i>
RM1	Recife Model 1
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
SA	<i>Simulated Annealing</i> (Anelamento Simulado)
SAR	<i>Structure Activity Relationship</i> (Relação Estrutura e Atividade)
SMR	<i>SWISS-MODEL Repository</i>
VP	<i>Viral protein</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 HERPES .....	1
1.2 ESTRUTURA DO HSV.....	2
1.3 FÁRMACOS UTILIZADOS NA TERAPIA CONTRA O HSV .....	3
1.4 PROTEASE VIRAL.....	5
1.5 INIBIDORES DE SERINO PROTEASE DE VÍRUS HERPES .....	7
1.6 PLANEJAMENTO RACIONAL DE NOVOS FÁRMACOS .....	10
1.6.1 Modelagem Molecular.....	12
1.6.1.1 Mecânica Molecular .....	14
1.6.1.2 Mecânica Quântica .....	14
1.6.2 Modelagem Comparativa.....	15
1.6.3 Docking Molecular .....	17
1.6.3.1 Algoritmo Genético .....	18
1.6.4 Estudo de <i>Druglikeness</i> e <i>Drugscore</i> .....	19
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>21</b>
<b>3 OBJETIVO .....</b>	<b>22</b>
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
<b>4 METODOLOGIA .....</b>	<b>23</b>
4.1 MODELAGEM COMPARATIVA DA HSV-1 PROTEASE.....	23
4.1.1 Obtenção da estrutura tridimensional.....	23
4.1.2 Validação dos modelos.....	23
4.2 RELAÇÃO ESTRUTURA ATIVIDADE .....	24
4.3 CONSTRUÇÃO DOS COMPOSTOS .....	26
4.4 DOCKING MOLECULAR.....	27
4.4.1 Docking molecular .....	27
4.4.2 Preparação dos arquivos do <i>AutoDock</i> .....	27
4.5 ESTUDO DE <i>DRUGLIKENESS</i> E <i>DRUGSCORE</i> .....	28
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>29</b>
5.1 MODELAGEM POR HOMOLOGIA .....	29
5.1.1 SWISS-MODEL.....	29

5.1.2 MODELLER .....	32
5.2 ESTUDO DA RELAÇÃO ESTRUTURA E ATIVIDADE (SAR) .....	41
5.3 DOCKING MOLECULAR .....	45
5.3.1 Validação do docking molecular .....	45
5.3.2 <i>Docking</i> Molecular das Benzoxazinonas .....	52
5.3.3 Método de análise do <i>docking</i> molecular .....	54
5.3.4 <i>Docking</i> molecular do composto 26 .....	54
5.3.5 <i>Docking</i> molecular das demais benzoxazinonas .....	58
5.4 AVALIAÇÃO DE <i>DRUGLIKENESS</i> E <i>DRUGSCORE</i> .....	76
5.5 PROPOSTA DE NOVAS MOLÉCULAS PARA A TERAPIA ANTI-HSV-1 ....	78
5.5.1 <i>Docking</i> Molecular Novos Compostos .....	78
5.5.2 Estudo de <i>Druglikeness</i> e <i>Drugscore</i> dos Novos Compostos .....	84
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>87</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>88</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>95</b>
<b>APÊNDICE B .....</b>	<b>101</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 HERPES

A família herpesvírus representa uma das maiores famílias virais conhecidas, com cerca de 100 vírus já identificados afetando quase todas as espécies animais. Esses vírus são divididos em três subfamílias: alfa herpesvírus (inclui herpes vírus simples 1 e 2 e vírus varicella-zoster), beta herpesvírus (que inclui citomegalovírus e herpesvírus 6) e gama herpesvírus, que inclui o vírus Epstein-Barr (QIU *et al.*, 1996; MARNETT *et al.*, 2004; CONRADY *et al.*, 2010).

Os vírus herpes simplex estão entre os que mais causam infecções na população mundial (HEWLETT *et al.*, 2004). Os vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e tipo 2 (HSV-2) levam a infecções para as quais não há cura e persistem durante toda a vida do hospedeiro, muitas vezes na forma latente, devido à adaptação sutil e bem sucedida (CHIDA & MAO, 2009; LASKOWSKI, 2009).

Estudos sorológicos mostram que a transmissão durante a infância é generalizada, visto que cerca de 39% dos indivíduos entre 14-19 anos já estão infectados pelo vírus e a taxa de prevalência aumenta para 65,3% na idade adulta média (CHIDA & MAO, 2009). Estudos evidenciaram que de 60-95% da população mundial possui anticorpos séricos contra pelo menos uma das cepas de um dos HSV (LUPI, 2000).

As manifestações clínicas dos vírus da herpes variam de infecções assintomáticas a manifestações mucocutâneas orolabiais, ocular, herpes genital, eczema herpético bem como complicações neurológicas centrais como herpes neonatal, encefalite herpética e até mesmo uma disseminação fatal cuja ocorrência é comum em pacientes imunocomprometidos (CHIDA & MAO, 2009; WATANABE, 2010; FLORE ROZENBERG, 2011).

O HSV-1 é a causa primária de lesões faciais e orais em seres humanos. A infecção geralmente inicia no epitélio da pele ou mucosa e em seguida se difunde para gânglios sensoriais (LUCERO *et al.*, 2006). Uma característica importante do HSV-1 é a capacidade de causar infecções crônica e latente em neurônios, que podem ser reativados e levar à lesões recorrentes na área mucocutânea inicialmente lesionada (GUDMUNDSSON & JOHNS, 2007). A reativação pode ocorrer através de estímulo como irradiação UV, estresse mental ou físico, menstruação e causas sintomáticas ou assintomáticas de infecção recorrente (WATANABE, 2010). A transmissão do vírus ocorre na maior parte da população geralmente pela saliva e com menor frequência, pela transmissão genital (CHIDA & MAO, 2009).

Nas últimas décadas, estudos têm descrito diversas evidências da relação entre a infecção por HSV-1 e mal de Alzheimer (HONJO *et al.*, 2009; KUHLMANN *et al.*, 2010; MORI, 2010).

## 1.2 ESTRUTURA DO HSV

A estrutura do vírus HSV é formada por um capsídeo envolto por uma camada amorfa denominada tegumento, que contém estruturas virais e proteínas reguladoras. Externamente, possui um envelope rico em glicoproteínas (Figura 1) (WATANABE, 2010).

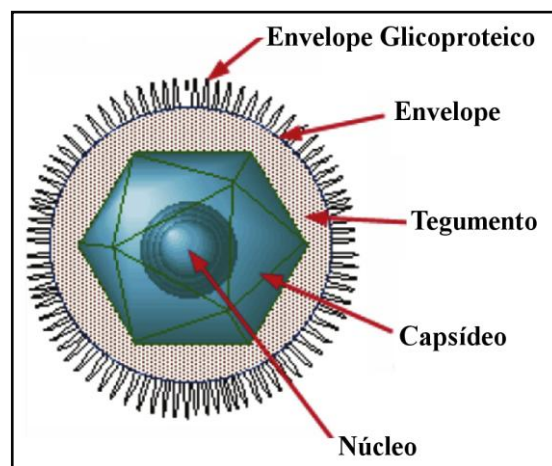


Figura 1: Estrutura do vírus HSV (Adaptado de WATANABE, 2010).

O capsídeo viral é uma estrutura icosaédrica formada por 11 pentons contendo 5 cópias da principal proteína de capsídeo do vírus, denominada VP5, e 150 hexons, cada um contendo seis cópias da proteína VP5. Cada uma das 20 faces do icosaédro consiste de hexons, enquanto cada penton representa um dos 12 vértices pentaméricos requeridos para formar a estrutura icosaédrica (Figura 2) (BAINES, 2011).

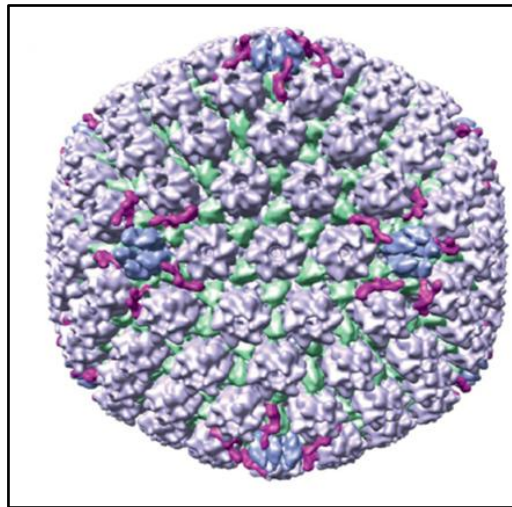


Figura 2: Estrutura do capsídeo do vírus HSV. Triplexes em verde, VP5 em héxons em roxo claro e pentons em azul; Complexo Específico do Vértice do Capsídeo em magenta. Adaptado de BAINES, 2011.

Durante a infecção primária, o HSV-1 penetra nas células neurais do hospedeiro através da ligação ao sulfato de heparana, uma proteoglicana presente na superfície celular. Sem esta proteoglicana a capacidade de adesão do vírus e a infecção da célula hospedeira ficam prejudicadas. O HSV-1 também possui na sua composição as glicoproteínas C e B que são vitais para a adesão do vírus à célula hospedeira (CONRADY *et al.*, 2010).

### 1.3 FÁRMACOS UTILIZADOS NA TERAPIA CONTRA O HSV

Embora muitas proteínas virais sejam potenciais alvos terapêuticos, os fármacos atualmente disponíveis para tratamento de infecções pelo vírus herpes são análogos de nucleosídeos e têm como alvo principal a enzima DNA polimerase para a replicação viral, como Aciclovir (1), Brivudina (2), Fanciclovir (3), Ganciclovir (4), Penciclovir (5), Valganciclovir (6), Valaciclovir (7) e Trifluridina (8) (EIZURU, 2003; BEHRENS-BAUMANN, 2010; DE CLERCQ, 2010) (Figura 3).

Apesar da segurança e eficácia desses fármacos, muitos apresentam biodisponibilidade oral limitada. Além disso, cepas de vírus herpes resistentes a esses fármacos vêm aumentando a cada ano pela mutação viral no sítio catalítico, principalmente em pacientes imunocomprometidos (ARDUINO & PORTER, 2006).

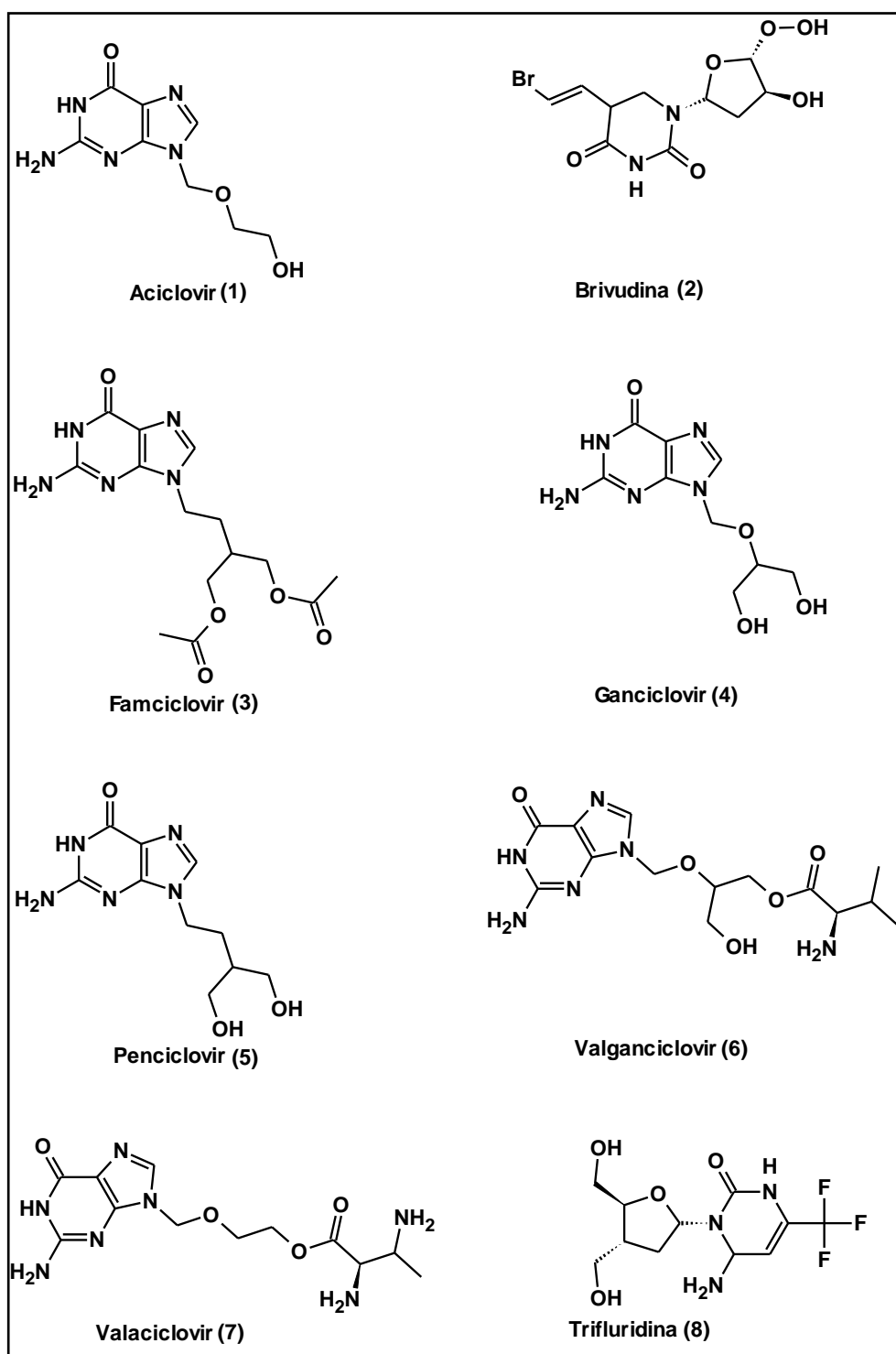


Figura 3: Estrutura química dos fármacos (1-8) utilizados atualmente na terapia contra o HSV-1.

Para contornar esses problemas, é necessária a busca de novos candidatos a fármacos e com diferentes alvos moleculares (MAMIDYALA & FIRESTINE, 2006). Em 2010, Chono e colaboradores realizaram estudos com amenamevir (9), um inibidor do complexo helicase-primase, contra o vírus da Varicela Zoster, HSV-1 e HSV-2 (CHONO *et al.*, 2010).

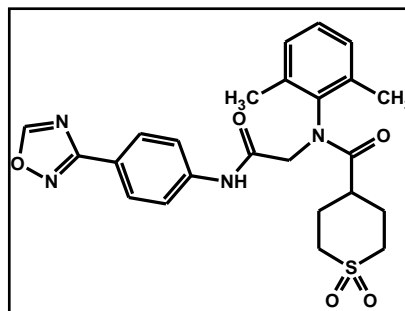


Figura 4: Estrutura química do amenamevir (9).

Outros estudos demonstraram os aminotiazóis com atividade inibitória de helicase-primase, sendo caracterizada como uma nova classe de compostos contra o HSV e com potencial para entrar em estudos clínicos. Também foram descritos estudos com fitoterápicos como no caso do extrato de própolis contra o HSV-2 cujos resultados sugerem a atuação do extrato pela interferência na estruturação do envelope do virion ou pelo mascaramento de substâncias virais essenciais para a adsorção ou entrada nas células hospedeiras (NOLKEMPER *et al.*, 2010). Apesar da evolução na busca de novos agentes antivirais nas duas últimas décadas, as opções terapêuticas são limitadas pela eficácia e toxicidade (SIKALLIS *et al.*, 2009).

#### 1.4 PROTEASE VIRAL

Proteases são enzimas que catalisam a clivagem de ligações peptídicas em proteínas e constituem uma grande família dividida em endopeptidases e exopeptidases, de acordo com o local da clivagem da cadeia peptídica. Essas enzimas são alvos terapêuticos em cerca de 5-10% dos fármacos que estão no mercado atual. Representando atualmente 2% de todas as proteínas em um organismo, as proteases desempenham um papel importante na biorregulação, remodelamento de matriz, digestão e resposta imune (LIM & CRAIK, 2009). Essas enzimas são classificadas de acordo com os resíduos presentes na tríade catalítica, como serino, cisteino, aspartato, metaloproteases (LIM & CRAIK, 2009; MARTINS *et al.*, 2009).

Nos últimos 20 anos, foi descrito que diversos vírus codificam uma ou mais proteases (KRAUSSLICH & WIMMER, 1988; BABE & CRAIK, 1997). Estas enzimas catalisam o processamento de poliproteínas virais ou o processo de maturação do pré-capsídeo. Assim, sua atividade catalítica é de extrema necessidade para a produção de novos virions infecciosos.



A relevância clínica dos inibidores de protease foi demonstrada com a aplicação bem sucedida de inibidores de protease de HIV (TONG, 2002).

A estrutura cristalográfica de serino proteases de diversas subfamílias de vírus do herpes tem sido reportadas (TONG *et al.*, 1996; HOOG *et al.*, 1997; REILING *et al.*, 2000). Consistente com a sequência de aminoácidos única, a estrutura cristalográfica da protease de herpesvírus apresenta um novo enovelamento da cadeia principal, estabelecendo as proteases do vírus do herpes como uma nova classe de serino proteases. Além disto, essas proteases não apresentam homologia com outras proteínas, sendo bons alvos terapêuticos para o desenvolvimento de novos agentes antivirais (TONG, 2002).

As proteases do vírus do herpes participam do processo de estruturação do capsídeo viral. Esta estruturação ocorre junto à etapa de processamento do DNA onde o mesmo é sintetizado no interior do núcleo em forma de concatêmero e posteriormente é fragmentado em unidades menores. Os dois processos parecem estar relacionados e, portanto, foi sugerido que a presença de um capsídeo viral funcional é requerida para que ocorra o processamento de DNA (GAO *et al.*, 1994).

No vírus do herpes, as proteases virais são sintetizadas como parte de uma poliproteína que é composta por um domínio da protease e um domínio da proteína estrutural. A protease reconhece principalmente dois tipos de sequência: o sítio de maturação (M) próximo à região C-terminal do domínio da proteína estrutural e o sítio de liberação (R), do inglês *release*, localizado entre os domínios da protease e da proteína estrutural (BUISSON *et al.*, 2006). A autoproteólise do sítio R libera a protease e a proteína estrutural ICP35 também chamada de VP22a ou p40 (GAO *et al.*, 1994). A proteína estrutural ICP35 é crítica para a construção do capsídeo viral intermediário (SCHMIDT & DARKE, 1997).

A montagem do capsídeo do vírus do herpes é um processo complexo, em parte devido ao produto final da montagem, pró-capsídeo, ser uma estrutura dupla sem envoltório, contendo pelo menos 11 tipos diferentes de proteínas especificamente projetadas para se associar de forma precisa para formação da estrutura final (BAINES, 2011).

Estudos *in vitro* mostraram que os capsídeos maduros são formados por meio de pró-capsídeo parcial e intermediário de pró-capsídeo (NEWCOMB *et al.*, 1999). Os pró-capsídeos parciais são cunhas angulares constituídas de cavidades distintas e camadas nucleares compostas de VP5, a principal proteína de capsídeo do herpes vírus, além das proteínas formadoras de triplexes, VP19C e VP23 e pré-VP22a, respectivamente (NEWCOMB *et al.*, 1999). Pró-capsídeos parciais ampliam, por adição de VP5, triplexes, e

pré-VP22a, eventualmente fechando-se para formar o pró-capsídeo esférico. O pró-capsídeo então se angulariza para criar o capsídeo maduro icosaédrico (NEWCOMB *et al.*, 1999).

Durante a montagem do pró-capsídeo, a proteína estrutural VP22a atua interagindo com a proteína VP5 levando-a até o núcleo para construção do pró-capsídeo e mantendo-a no local adequado para que seja, posteriormente, estabilizada pelos contatos com outras proteínas VP5 ou proteínas formadoras de triplexes. Esta interação ocorre com os 25 aminoácidos finais da proteína VP22 e o domínio N-terminal da proteína VP5. Sem a proteína VP22, a proteína VP5 não consegue entrar no núcleo, sendo então excluída da formação do capsídeo. Para evitar que a proteína VP22 não entre no núcleo, é garantido que cada molécula de VP5 tenha uma proteína VP22 para se associar, permitindo um controle preciso do número de proteínas em cada capsídeo. Estudos mostraram que na ausência da proteína estrutural VP22a, não há formação de pró-capsídeo pela proteína VP5 (NEWCOMB *et al.*, 2001; BAINES, 2011).

HSV modificados geneticamente indicaram que a clivagem da protease é essencial para a replicação viral (GAO *et al.*, 1994). Durante a clivagem, essas proteases rompem a estrutura formada pela proteína estrutural após a montagem do capsídeo a fim de fornecer espaço para o DNA viral (BUISSON *et al.*, 2006).

As proteases de vírus da herpes existem no equilíbrio monômero-dímero, mas apenas o dímero ativa o sítio catalítico (SCHMIDT & DARKE, 1997). Evidências sugerem que um monômero realiza a clivagem no outro monômero (HOOG *et al.*, 1997).

Devido ao fato das proteases virais participarem das etapas de construção do capsídeo, essencial para a replicação viral, essas enzimas podem ser consideradas potenciais alvos terapêuticos (BAINES, 2011). Existem diversos mecanismos utilizados pelos vírus para impedir a incorporação de um capsídeo anômalo, o que sugere a importância desta etapa e a vulnerabilidade à compostos que prejudiquem o controle da montagem do capsídeo (BAINES, 2011). Desta forma, fica clara a importância da protease de HSV-1 como um novo alvo terapêutico no tratamento da infecção causada pelo vírus da herpes.

## 1.5 INIBIDORES DE SERINO PROTEASE DE VÍRUS HERPES

Diversos inibidores de serino protease de vírus herpes têm sido relatados nos últimos anos e podem ser classificados como inibidores do sítio ativo ou modificadores de cisteína (WAXMAN & DARKE, 2000; ZENG *et al.*, 2008; YAN *et al.*, 2011).

Os inibidores do sítio ativo possuem em comum uma carbonila ativada e incluem peptidomiméticos (**10**) (Figura 5), lactâmicos, oxazinonas e benzotiopiranonas (TONG, 2002).

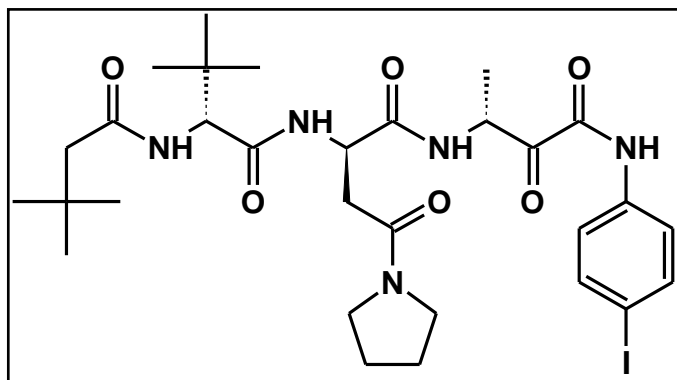


Figura 5: Estrutura química do BILC 821 (**10**), um peptidomimético inibidor de protease de Citomegalovírus (CMV).

As benzoxazinonas (**11**) (Figura 6) foram identificadas em 1960 como metabólitos secundários das gramíneas que funcionam como pesticidas naturais e contém propriedades alelopáticas. Estes compostos fazem parte do sistema de defesa das plantas contra insetos, bactérias e fungos (ARROYO *et al.*, 2010) e são conhecidas como inibidores padrão de serino proteases (HEDSTROM *et al.*, 1984; JARVEST *et al.*, 1996).

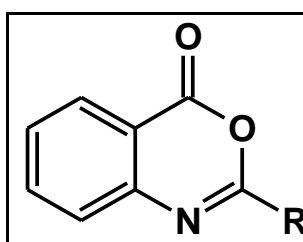


Figura 6: Estrutura química da benzoxazinona 2-substituída (**11**).

O mecanismo de inibição envolve a formação de um complexo acil-enzima a partir do ataque nucleofílico da serina do sítio ativo (Ser129) ao grupo carbonila dos inibidores dessa classe (Figura 7) (BODE *et al.*, 1989; POWERS *et al.*, 2002). Dessa forma, já foram demonstradas atividades em elastase de neutrófilos de humanos (HSIEH *et al.*, 2005; SHREDER *et al.*, 2009) serino-protease C1r do sistema complemento (HAYS *et al.*, 1998), fator tecidual VIIa (JAKOBSEN *et al.*, 2000) e inibidores da trombina (HSIEH *et al.*, 2005).

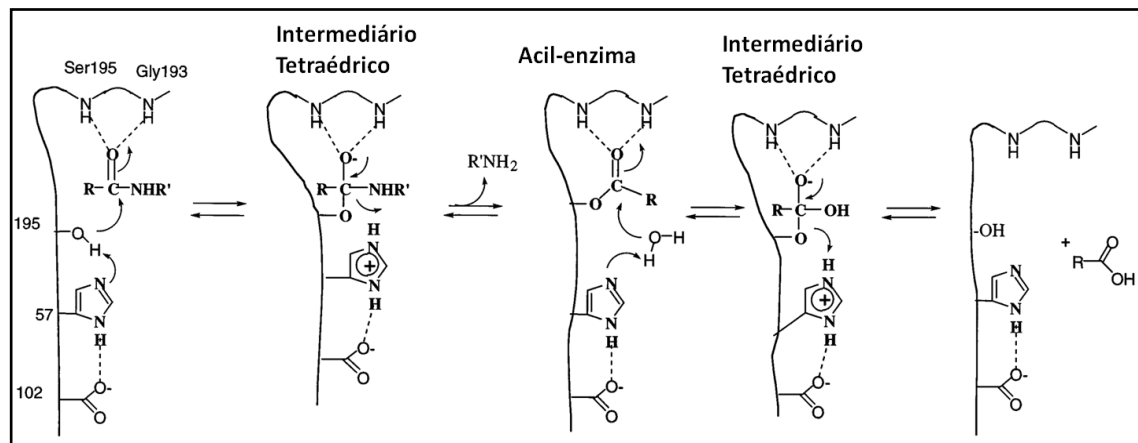


Figura 7: Mecanismo catalítico geral aceito para serino-proteases (Adaptado de HEDSTROM, 2002)

O mecanismo proposto de inibição da protease de HSV-1 pelas benzoxazinonas, sugere a formação de uma ligação do tipo covalente com o resíduo Ser129 (JARVEST *et al.*, 1996). Outras evidências da literatura sugerem que interações realizadas com os resíduos His61 e His148, também aminoácidos da tríade catalítica, são possíveis causas da inibição da protease de HSV-1 (WAXMAN & DARKE, 2000). O posicionamento do resíduo His61 na estrutura da protease possibilita a realização de uma ligação hidrogênio com a Ser129 estabilizando o intermediário formado quando ocorre o ataque nucleofílico da Ser129 à carbonila durante a clivagem da protease (HEMMATEENEJAD & ELYASI, 2009). Sugere-se que o resíduo His148 desempenhe uma função semelhante à His61.

Outros resíduos também destacados na literatura são as argininas 156 e 157 (HEMMATEENEJAD & ELYASI, 2009). Experimentos de mutações na protease de CMV com cada um destes resíduos pelo resíduo de alanina indicaram que o resíduo Arg157 é mais importante que o resíduo Arg156 para a atividade da protease, uma vez que a mutação do resíduo Arg157 causou quase total perda da atividade catalítica da protease de HSV-1, enquanto a mutação da Arg 156, provocou apenas uma inibição parcial. Estes dois resíduos de arginina são conservados em toda família Herpesviridae, e ficam localizados próximos à Ser129, estabilizando o intermediário tetraédrico formado quando ocorre autoclivagem da protease (HOOG *et al.*, 1997) (Figura 8).

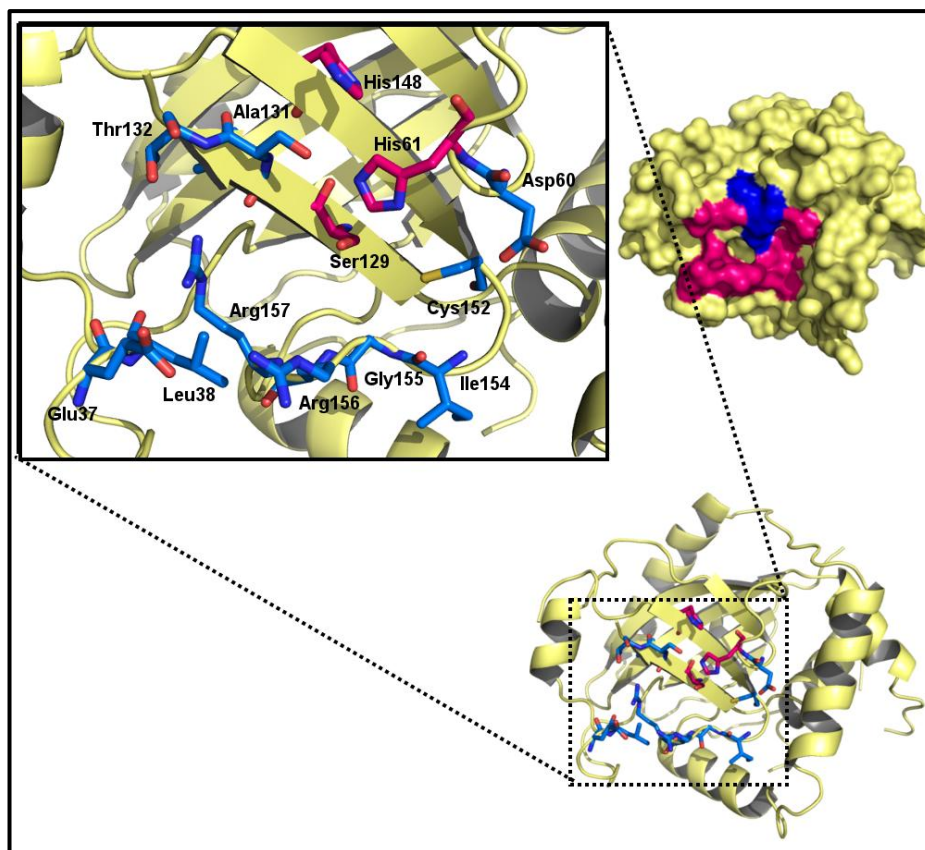


Figura 8: Estrutura tridimensional da protease de HSV-2 (PDB ID= 1AT3). Resíduos de aminoácidos considerados importantes para a inibição da enzima estão destacados em rosa, e a tríade catalítica, em azul.

## 1.6 PLANEJAMENTO RACIONAL DE NOVOS FÁRMACOS

A média de tempo para um medicamento ser desenvolvido é de 12 anos, e o custo para trazer um novo fármaco para o mercado está entre 500 milhões e 2 bilhões de dólares (WILLIAMS & HONG, 2011). Por isso, nos últimos anos, o desenvolvimento de fármacos tem se tornado racional e com focos bem definidos.

A química combinatória, no passado, fornecia a síntese de várias estruturas afins com potencial farmacológico. Atualmente, ferramentas biotecnológicas associadas aos métodos de química medicinal vêm recebendo destaque no desenvolvimento de novas moléculas com atividade biológica (GUIDO *et al.*, 2010). Uma das formas de desenvolvimento de fármacos utiliza informações estruturais de moléculas que são correlacionadas com um parâmetro bem caracterizado, como a atividade biológica. O desenvolvimento racional também considera um alvo biológico de um ou mais fármacos (LAL & ARNSDORF, 2010).

Novos compostos bioativos (sintéticos ou naturais) podem ser identificados através de triagens realizadas por ensaios de atividade biológica rápidos (*highthroughput*) associados com ferramentas computacionais que permitem identificar propriedades físico-químicas importantes e, ou predição de parâmetros ADMET (WERMUTH, 2003; GUIDO *et al.*, 2010).

Geralmente, nas fases iniciais do planejamento são identificados compostos com baixo perfil de afinidade que são otimizados para gerar protótipos. Estes compostos são utilizados no planejamento de novos candidatos à fármacos (GUIDO *et al.*, 2010) pela otimização da estrutura química por técnicas como, por exemplo, o bioisosterismo, em que são feitas substituições de grupos funcionais por outros grupos que respeitam as regras estabelecidas no isosterismo, como por exemplo, no bioisosterismo clássico a substituição de um anel fenila por um anel piridina. Neste caso, esta troca de grupos funcionais deve ser realizada de forma a se obter um novo composto com propriedades biológicas semelhantes ou mais ativos (LEMKE & WILLIAMS, 2008). Além do bioisosterismo, outras técnicas como a simplificação molecular e a hibridação molecular, também podem ser utilizadas no desenvolvimento de uma nova entidade química candidato à novo fármaco. A definição da estratégia adotada para se chegar a um composto protótipo depende essencialmente no nível de conhecimento do alvo terapêutico (BARREIRO 2009).

Dada a enorme diversidade química disponível no desenho de novos fármacos, a investigação experimental de todas as diferentes combinações de cadeias laterais, substituintes e estruturas, dependendo do tamanho da molécula, necessitaria de uma grande quantidade de recursos e mão-de-obra. A nível experimental, o conhecimento da estrutura molecular de uma substância também não é uma tarefa simples. Alguns métodos, como a difração de raios-X e a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) são utilizados a fim de se obter informações sobre as distâncias e ângulos de ligação, além de ângulos de torção (BARREIRO *et al.*, 1997). Entretanto, métodos computacionais baseados na estrutura permitem a exploração do espaço químico com as vantagens de serem mais rápidos e de baixo custo. Estas ferramentas são utilizadas principalmente em triagens virtuais e em *de novo design*, predições *in silico* ADMET e métodos avançados para determinar as interações de complexos proteínas-ligante.

Avanços na capacidade computacional e na tecnologia têm impulsionado triagens *in silico* e técnicas de modelagem como frente de descoberta de fármacos e pesquisa de desenvolvimento (MA *et al.*, 2011). Desta forma, a modelagem da estrutura molecular por métodos computacionais surgiu como uma alternativa, após o desenvolvimento de programas capazes de calcular a estrutura com um compromisso adequado entre velocidade e precisão

somados aos recursos da computação gráfica e à crescente diminuição dos custos de máquinas de alto desempenho capazes de operar estes programas e recursos (BARREIRO *et al.*, 1997).

### 1.6.1 Modelagem Molecular

A aplicação de métodos computacionais tem se tornado uma prática rotineira e indispensável não só no estudo, planejamento e descoberta de compostos bioativos mas também na elucidação de processos químicos e biológicos através da estrutura tridimensional de micro e macromoléculas (MONTANARI, 2000; SANT'ANNA, 2009).

A modelagem molecular consiste em um conjunto de ferramentas para construção, edição, visualização, análise e armazenamento de sistemas moleculares complexos que podem ser fundamentais no planejamento racional de compostos bioativos. Desta forma, a modelagem molecular pode ainda ajudar na sugestão de novas estruturas com uma determinada atividade biológica desejada (COHEN *et al.*, 1990) (BARREIRO *et al.*, 1997; SANT'ANNA, 2009).

Duas estratégias podem ser utilizadas na modelagem molecular: o desenho direto, onde as propriedades tridimensionais do receptor analisado são diretamente consideradas e o desenho indireto, que é baseada na análise comparativa das propriedades estruturais de moléculas ativas e inativas previamente conhecidas que são interpretadas em termos de complementaridade com um modelo hipotético de um receptor (COHEN *et al.*, 1990). Através do método direto, é possível seguir com estudos de *docking* ou dinâmica molecular quando a estrutura tridimensional do receptor já está elucidada em um ou mais banco de dados. Caso a estrutura tridimensional não esteja resolvida na literatura, uma etapa a mais é necessária para a obtenção da mesma. Para tal, pode-se utilizar a técnica de modelagem comparativa, onde uma nova estrutura tridimensional é gerada com base em uma ou mais estruturas já conhecidas.

Para que as interações ou as reações que ocorrem durante a ação dos bioligantes sejam efetivas, deve haver complementaridade estrutural entre o ligante e a macromolécula. Este conceito de complementaridade foi introduzido por Emil Fischer em 1894, através do modelo chave-fechadura, que descreve a formação do complexo ligante-receptor como um encaixe rígido (Figura 1). Mais tarde, em 1958, o conceito de encaixe induzido foi proposto por Daniel Koshland e colaboradores, que sugere a ocorrência de uma mudança conformacional em uma determinada subunidade enzimática induzida pelo substrato. Esta mudança

conformacional é posteriormente transmitida às subunidades vizinhas, induzindo na enzima a conformação responsável pelo processo catalítico (Figura 9) (KOSHLAND, 1963; VERLI & BARREIRO, 2005; SANT'ANNA, 2009).

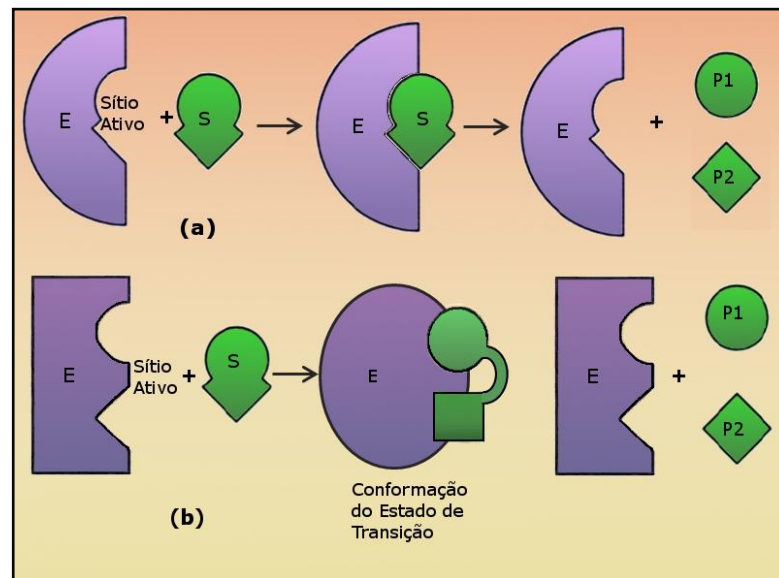


Figura 9: a) Modelo chave-fechadura proposto por Emil Fischer em 1894. b) Modelo encaixe induzido proposto por Daniel Koshland em 1958 (VIEIRA, 2006) (VERLI & BARREIRO, 2005)

A complementaridade entre o ligante e a macromolécula permite o estabelecimento de interações específicas, como interações eletrostáticas, como dipolo-dipolo e íon-íon, ligações hidrogênio e forças de dispersão, que contribuem para a energia de interação entre o ligante e a biomacromolécula. É justamente neste ponto que a modelagem pode dar sua contribuição para o desenvolvimento de ligantes, pois através dela é possível obter uma descrição detalhada da estrutura, das interações intermoleculares e, se for o caso, das reações químicas entre o ligante e a biomacromolécula (SANT'ANNA, 2009). Programas computacionais permitem a avaliação das interações entre ligante e macromolécula, mimetizando o ancoramento do ligante em um determinado sítio receptor (COHEN *et al.*, 1990).

Existem diversas opções de cálculo para serem aplicados em uma determinada estratégia de modelagem molecular. Estes métodos diferem basicamente quanto à natureza do conjunto de funções de energia e parâmetros numéricos associados. Os campos podem ser totalmente empíricos como os utilizados em mecânica molecular, ou, no outro extremo, puramente teóricos, passando pelos métodos semi-empíricos (BARREIRO *et al.*, 1997)



### 1.6.1.1 Mecânica Molecular

A mecânica molecular é uma estratégia eficiente para otimizar estruturas moleculares, que apresenta como vantagem a rapidez na obtenção de resultados (SANT'ANNA, 2009). A metodologia da mecânica molecular utiliza a aproximação de Born-Oppenheimer, onde os movimentos dos núcleos e dos elétrons podem ser tratados separadamente. Neste contexto, a mecânica molecular é caracterizada por considerar apenas os movimentos nucleares e tratar os elétrons indiretamente, supondo-se que a densidade eletrônica pode ajustar-se instantaneamente a qualquer alteração na configuração geométrica dos núcleos. Logo, assume-se que os núcleos possuem movimentos livres e que todas as interações nucleares são aditivas (COELHO *et al.*, 1999).

Os métodos de mecânica molecular consideram a estrutura molecular como um conjunto de “bolas e molas” com funções de energia potencial, que quando somadas, formam o campo de força molecular (Eq. 1). Cada termo energético da equação possui posições preferenciais de equilíbrio (distâncias de ligação, ângulos de ligação, ângulos diedro, distância de interações de van der Waals, etc.) e constantes de força que são conhecidas experimentalmente ou são estimadas e utilizadas para atribuir penalidades para cada desvio individual (COHEN *et al.*, 1990).

$$E_{\text{total}} = E_{\text{estiramento}} + E_{\text{tensionamento}} + E_{\text{diedro}} + E_{\text{van der Waals}} + E_{\text{eletrostática}} + E_{\text{ligações de hidrogênio}} \quad \text{Equação 1}$$

### 1.6.1.2 Mecânica Quântica

A metodologia da mecânica quântica difere da mecânica molecular uma vez que considera a população eletrônica em seus cálculos. Estes cálculos remontam a equação de Schrödinger, descrita por Erwin Schrödinger (1887-1961), que considera a natureza ondulatória dos elétrons no cálculo de energia total do sistema (Eq. 2). (LEACH, 2001; HEHRE, 2003; MARQUES & BOTTI, 2006; CORREA, 2010).

$$\left[ -\frac{\hbar}{2m} \nabla^2 - k \frac{e^2}{|\vec{r}|} \right] \psi(\vec{r}) = E \psi(\vec{r}) \quad \text{Equação 2}$$

Tendo em vista que a equação de Schrödinger apresenta-se sem solução exata para diversas situações, físicos e químicos buscaram aproximações para resolver o problema de muitos corpos como, por exemplo, através da aproximação de Born-Oppenheimer discutida anteriormente (TOSTES, 1998; LEACH, 2001; HEHRE, 2003; MARQUES & BOTTI, 2006; CORREA, 2010)

Dois métodos principais possuem aplicação em química computacional para fornecer parâmetros quânticos: *ab initio* e semi-empírico. O método *ab initio*, como por exemplo o método Hartree-Fock fornece informações mais precisas e rigorosas sobre o comportamento eletrônico, porém, apresenta como desvantagem o elevado tempo computacional para os cálculos em relação aos métodos semi-empíricos. Esta diferença é decorrente da utilização de parâmetros experimentais pelos métodos semi-empíricos, simplificando os cálculos e possibilitando a redução do gasto computacional (COHEN *et al.*, 1990; MORGON & COUTINHO, 2007; ARROIO *et al.*, 2010; CORREA, 2010). Como exemplo de métodos semi-empíricos, podemos citar os métodos AM1, PM3, RM1 e PM6.

Outro método utilizado em mecânica quântica é a Teoria do Funcional da Densidade (DFT, do inglês *Density Functional Theory*) que considera densidade eletrônica como variável necessária para o cálculo das propriedades eletrônicas ao invés de funções de onda. Este método apresenta-se como uma boa alternativa de cálculo quântico, pois apresenta precisão química aceitável e boa correlação com resultados experimentais (MARQUES & BOTTI, 2006; MORGON & COUTINHO, 2007; CORREA, 2010).

### 1.6.2 Modelagem Comparativa

O planejamento racional ne fármacos baseados na estrutura permite a descoberta e síntese de compostos complementares ao seu sítio de ligação. Para este tipo de abordagem é essencial coletar informações estruturais da proteína escolhida como alvo. Em casos em que a elucidação estrutural do alvo não é possível ou ainda não foi determinada, modelos virtuais podem ser elaborados através da comparação de sua estrutura primária à uma ou mais estruturas já resolvidas disponíveis em um banco de dados, como por exemplo o PDB (*Protein Data Bank*) (LASKOWSKI *et al.*, 1997). A modelagem comparativa de uma proteína baseia-se no conceito de evolução molecular. Isto, é parte-se do princípio de que a

semelhança entre as estruturas primárias desta proteína implica em homologia de estruturas tridimensionais (LASKOWSKI, 2001).

Estes métodos utilizam um algoritmo de reconhecimento de moldes adequados em um banco de dados de estruturas tridimensionais de proteínas, que depende do reconhecimento da similaridade das estruturas. A partir de um ou mais moldes é possível gerar os resíduos de aminoácidos da proteína em estudo resultando em um modelo primário da estrutura que pode ser otimizado. A qualidade do modelo está relacionada com a quantidade de resíduos idênticos entre o molde e modelo gerado (SANT'ANNA, 2009).

Para construção de um modelo através da modelagem comparativa são seguidos, basicamente, quatro passos sucessivos (Figura 10): i) identificação e seleção de proteínas-molde; ii) alinhamento das sequências e resíduos; iii) construção das coordenadas do modelo; iv) validação.

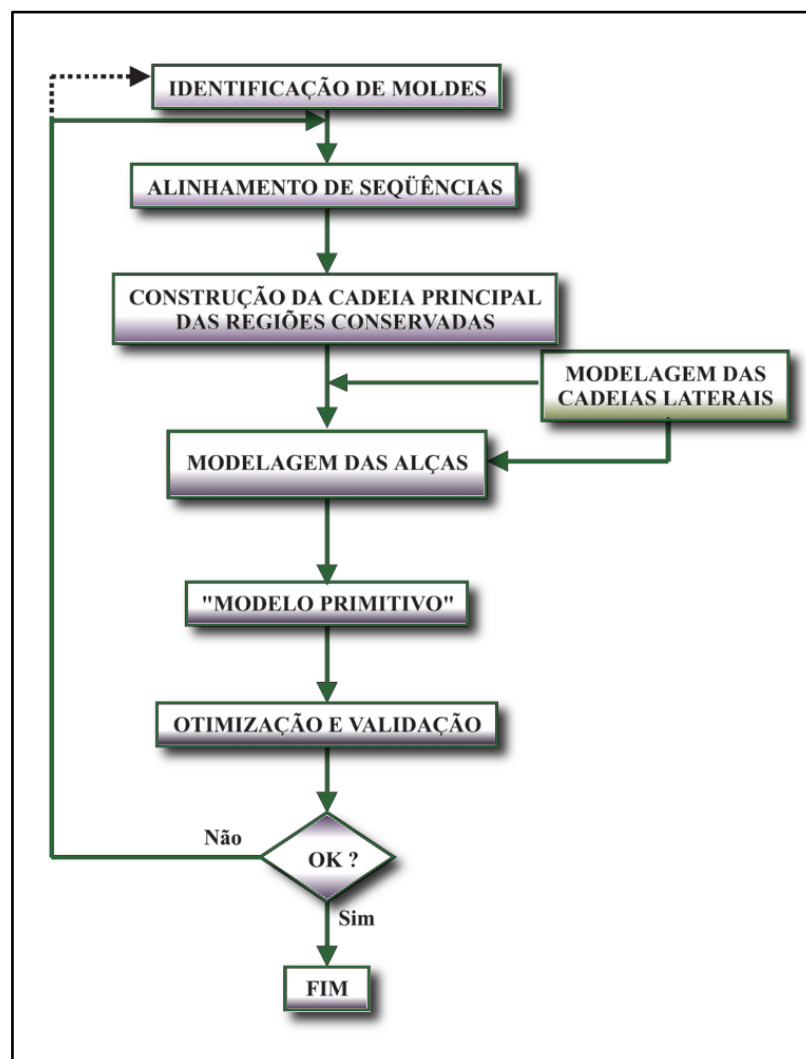


Figura 10: Esquema para obtenção de modelo tridimensional através da modelagem comparativa.

### 1.6.3 *Docking* Molecular

Diversos substratos e inibidores, candidatos a novos fármacos, são tipicamente descobertos pela triagem *in vitro*. Apesar disso, este processo pode ser considerado muito dispendioso quanto ao tempo e custo associados. Se uma estrutura tridimensional do alvo em estudo encontra-se disponível, a simulação através de *docking* molecular pode ser uma ferramenta muito útil no estudo e descoberta de novos fármacos (PIERRI *et al.*, 2010). Por *docking* molecular podem-se estudar complexos intermoleculares formados, por exemplo, entre enzimas, receptores e DNA. Essa ferramenta é amplamente utilizada no estudo das interações entre inibidores e suas respectivas enzimas (LEACH, 2001).

O *docking* molecular consiste em um método de modelagem molecular que tem por objetivo encontrar a orientação e conformação mais provável de um ligante ancorado em um determinado alvo, permitindo a predição da estrutura espacial do complexo receptor-ligante e sua respectiva energia livre de formação (KITCHEN *et al.*, 2004; PYRKOV *et al.*, 2010). Resultados são obtidos basicamente através de uma análise de uma amostragem conformacional em que diversas conformações ancoradas são exploradas para tentar prever uma potencialmente correta (PIERRI *et al.*, 2010).

O *docking* molecular pode ser considerado uma das metodologias mais utilizadas no desenho de fármacos assistido por computador (CADD, do inglês *Computed-Aided Drug Design*) e tem sido predominantemente aplicado na identificação de protótipos e predição do modo de ligação (BARREIRO *et al.*, 1997; LILL & DANIELSON, 2011).

Atualmente, os programas de *docking* molecular realizam o procedimento de amostragem baseado em algoritmo genético, simulação por Monte Carlo, Anelamento Simulado, distância geométrica ou outros métodos diversos. A amostragem conformacional é guiada por uma função de pontuação, ou função de energia, que é utilizada para avaliar a aptidão entre a proteína e o ligante. Através dessas funções é possível selecionar as melhores conformações ancoradas, onde a hipótese geral é de que baixos valores de energia representam melhores complexos do ligante-proteína em relação a maiores valores de energia (PIERRI *et al.*, 2010).

A flexibilidade do ligante pode ser levada em consideração quando são realizados estudos de *docking* molecular. O tratamento da flexibilidade do ligante pode ser feito de acordo com três métodos: método sistemático, método randômico ou estocástico e métodos de simulação (KITCHEN *et al.*, 2004).

Os métodos sistemáticos utilizam algoritmos que tentam explorar todos os graus de liberdade existentes em uma determinada molécula. Em seguida, os ligantes são construídos no sítio ativo como, por exemplo, no caso de fragmentos de ligantes ancorados ao sítio ativo que posteriormente são ligados covalentemente. Métodos randômicos ou estocásticos utilizam algoritmos que trabalham através de mudanças randômicas em um único ligante ou a uma população de ligantes. Os algoritmos genéticos e a busca por Monte Carlo são métodos considerados randômicos que estão disponíveis em certos programas como o GOLD, que utiliza o algoritmo genético como método de busca e o AutoDock, que além do algoritmo genético, possui métodos que utilizam implementações alternativas da busca por Monte Carlo. Já os métodos de simulação por dinâmica molecular são métodos mais refinados, que utilizam um tempo computacional maior, que visam buscar uma solução para a equação do movimento de Newton. Neste tipo de *docking*, é possível realizar simulações onde não só o ligante é flexível, mas também o receptor (TAYLOR *et al.*, 2002; KITCHEN *et al.*, 2004).

A escolha dos melhores confôrmeros, obtidos através de uma determinada função de pontuação, deve ser eficiente o suficiente para diferenciar o confôrmero relativo ao modo de ligação experimental dos outros modos obtidos através dos algoritmos. Os métodos utilizados para obter a pontuação adequada variam desde campos de força de mecânica molecular, como AMBER, CHARMM e OPLS, até as funções de pontuações empíricas de energia livre (TAYLOR *et al.*, 2002).

O sucesso na predição da estrutura tridimensional do complexo receptor-ligante por *docking* e dinâmica molecular possui duas grandes aplicações práticas. A primeira é a identificação molecular de possíveis sítios preferenciais de ligação e a posterior indicação de modificações específicas no ligante, de tal modo a se obter um maior grau de afinidade e/ou especificidade com relação ao receptor. A segunda é a utilização da geometria obtida como ponto de partida para a aplicação de métodos computacionais mais sofisticados, visando quantificar a energia livre de ligação do complexo receptor-ligante (TERAMOTO & FUKUNISHI, 2007).

#### 1.6.3.1 Algoritmo Genético

O algoritmo genético é um método de amostragem utilizado em simulações de *docking* molecular, baseado na teoria evolutiva da seleção natural proposta por Darwin. De acordo com esta teoria, os indivíduos mais aptos têm mais chances de sobreviver, excluindo os

indivíduos menos aptos. Durante o processo de busca das soluções são utilizados operadores genéticos como mutação, *crossover* e migração. Os graus de liberdade da molécula são codificados em genes ou sequências binárias e o conjunto de genes, ou cromossomo, é avaliado em relação à aptidão através da atribuição de uma determinada função de pontuação. Através do operador de mutação, ocorrem mudanças randômicas nos valores dos genes; através do *crossover* são realizadas trocas de um conjunto de genes de um cromossomo pai por outro; a migração promove a mudança de um gene de uma sub-população para outra (TAYLOR *et al.*, 2002; GONÇALVES, 2008).

Um dos métodos de amostragem que pode ser utilizado em simulações de *docking* é o Algoritmo Genético Lamarckiano, que é um método modificado do Algoritmo Genético baseado na teoria de Darwin. Esse tipo de algoritmo considera a teoria da evolução proposta por Lamarck, onde características adquiridas ao longo da vida podem ser passadas aos seus descendentes. A diferença deste tipo de algoritmo para o algoritmo genético consiste na minimização de energia aplicada ao ligante que irá compor a próxima geração de indivíduos modificados (TURNER *et al.*, 2000; GONÇALVES, 2008).

Programas que utilizam os algoritmos genéticos como método de amostragem, utilizam ainda outros parâmetros como, por exemplo, tamanho da população, número de gerações, número de avaliações e elitismo. O elitismo consiste no número dos melhores indivíduos que são reaproveitados da geração anterior para a próxima geração, ou seja, número dos melhores indivíduos que automaticamente sobrevivem (ÖSTERBERG, 2000). Todos estes parâmetros podem ser modificados durante um estudo de *docking* molecular, de acordo com o ligante e receptor que estão sendo utilizados, a fim de obter resultados de maior confiabilidade.

#### 1.6.4 Estudo de *Druglikeness* e *Drugscore*

A expressão *Drug-like* tem sido utilizada por diversos autores de formas ligeiramente diferentes. A maioria conceitua *drug-like* como “moléculas que contém grupos funcionais e/ou tem propriedades físico-químicas consistentes com a maioria dos fármacos já conhecidos”(LASKOWSKI *et al.*, 1997).

A concepção de *Druglikeness* ajuda a otimizar propriedades farmacocinéticas e farmacêuticas, como por exemplo solubilidade, estabilidade química, biodisponibilidade e perfil de distribuição. Para químicos medicinais envolvidos no desenvolvimento de novos

fármacos, a avaliação do *Druglikeness*, baseada em qualquer tipo de propriedade contável ou computável, consiste em uma ajuda prática (LASKOWSKI *et al.*, 2005).

Existem vários métodos que permitem a avaliação do *Druglikeness* de um composto baseadas em descritores topológicos, impressões digitais características de uma determinada estrutura ou outras propriedades como clogP, ou peso molecular. Uma das técnicas mais utilizadas é a oferecida pelo servidor Osiris da Actelion Pharmaceuticals Ltd (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/druglikeness.html>). que baseia-se em uma lista de 5300 fragmentos de subestruturas de fármacos comercializados e entidades químicas comercializadas com valores de *Druglikeness* associados. O valor de *Druglikeness* é calculado através da soma dos valores de pontuação de cada fragmento molecular e comparado aos valores dos fragmentos da lista. De acordo com esta base de dados, deve se tentar obter moléculas com valores positivos de *Druglikeness*, o que não significa necessariamente que pode ser feita a associação de quanto maior este valor melhor a molécula para candidato a fármaco. Esta premissa pode não ser verdadeira uma vez que não são levadas em consideração valores de lipofilicidade neste cálculo .

A partir do valor obtido para o *Druglikeness* ainda é possível determinar outra propriedade também útil no estudo de possíveis fármacos, o *Drugscore*. Este parâmetro é calculado pela combinação dos valores obtidos para o *Druglikeness*, cLogP, LogS, peso molecular e risco de toxicidade, também preditos pelo mesmo programa, com o objetivo de inferir o potencial de um composto se tornar um fármaco. Neste caso, quanto maior o valor obtido para *Drugscore*, maior o potencial do composto (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/drugscore.html>).

## **2 JUSTIFICATIVA**

A maioria dos fármacos utilizados no tratamento de infecções virais atua na inibição de diferentes enzimas essenciais para a replicação viral. Contudo, a resistência viral aos fármacos em uso clínico, associado aos efeitos colaterais dos mesmos levam à necessidade do desenvolvimento de novos fármacos mais eficientes, seletivos e menos tóxicos. Na pesquisa por novos alvos terapêuticos, as proteases virais têm surgido como novo alvo mais seletivo, devido as suas características tridimensionais específicas. Desta forma, é necessária a busca por novos compostos antivirais que tenham ação sobre o vírus HSV-1.



### 3 OBJETIVO

Inserido no contexto da Química Medicinal, que tem como uma das principais ferramentas, o planejamento racional de novos compostos bioativos, busca-se com esse trabalho analisar *in silico* as interações entre a protease de HSV-1 e os inibidores derivados de benzoxazinona (**12-29**), sintetizados e avaliados previamente quanto à atividade biológica, empregando simulação computacional.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Propor um modelo teórico para a protease de HSV-1 por modelagem comparativa
- Realizar experimentos de *docking* molecular entre a HSV-1 protease e os inibidores derivados de benzoxazinonas para classificação e ranqueamento dos ligantes segundo sua energia de interação com a enzima;
- Identificar o modo de ligação mais provável e as interações dos ligantes com a enzima;
- Realizar estudo de *Drugscore* e *Druglikeness* dos compostos mais ativos e comparar os dados obtidos aos de fármacos já utilizados na terapia contra o HSV;
- Propor modificações estruturais que levem à novos candidatos a inibidores da protease do HSV;
- Realizar experimentos de *docking* molecular entre os compostos propostos a inibidores e a protease de HSV-1.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 MODELAGEM COMPARATIVA DA HSV-1 PROTEASE

#### 4.1.1 Obtenção da estrutura tridimensional

Uma vez que as proteases dos vírus HSV-1 e HSV-2, de acordo com o banco de dados Uniprot, apresentam 73,72% de identidade, a protease de HSV-2 foi selecionada como molde para iniciar os estudos de modelagem comparativa. As coordenadas da estrutura primária das proteases de HSV-1 e HSV-2 foram obtidas através do banco de dados UniProt sob os códigos Q69087 e Q69527 respectivamente.

A estrutura cristalográfica da protease de HSV-2 foi obtida do banco de dados de proteínas (PDB) sob o código 1AT3 (HOOG *et al.*, 1997). Posteriormente, para concluir a predição da estrutura terciária da protease de HSV-1 foram utilizadas duas metodologias diferentes: alinhamento das sequências seguido da predição da estrutura terciária da protease de HSV-1 pela ferramenta do SWISS-MODEL de alinhamento automático (PEITSCH, 1995; ARNOLD *et al.*, 2006; KIEFER *et al.*, 2009); alinhamento das sequências através do servidor T-Coffee (NOTREDAME *et al.*, 2000) seguido da predição da estrutura terciária da protease de HSV-1 pelo programa MODELLER (SALI & BLUNDELL, 1993; SALI & OVERINGTON, 1994; FISER *et al.*, 2000; MARTI-RENOM *et al.*, 2000; SANCHEZ & SALI, 2000; MARTI-RENOM *et al.*, 2001; MELO *et al.*, 2002; ESWAR *et al.*, 2003; FISER & SALI, 2003; PIEPER *et al.*, 2004).

#### 4.1.2 Validação dos modelos

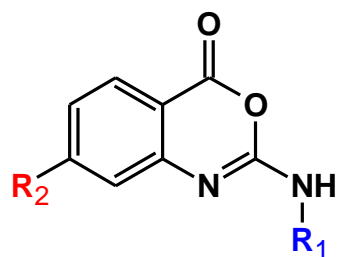
Os modelos construídos pelos programas SWISS-MODEL e MODELLER foram validados pelas opções Procheck e Verify 3D do servidor *Structural Analysis and Verification Server* (SAVES)(<http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES/>).

O Procheck faz uma análise verificando a qualidade estereoquímica de uma determinada estrutura protéica analisando geometricamente cada resíduo e a estrutura geométrica completa (LASKOWSKI *et al.*, 1993; LASKOWSKI *et al.*, 1996; DORELEIJERS *et al.*, 1998; DORELEIJERS *et al.*, 1999).

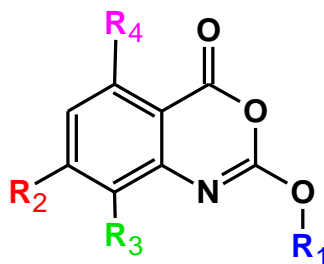
No Verify 3D, a análise do modelo é feita através da determinação da compatibilidade do modelo tridimensional em relação à própria sequência de aminoácidos do modelo avaliado (1D) atribuindo uma classe estrutural baseada na sua localização e ambiente (alfa, beta, alça, polar, não-polar, etc.) e comparando os resultados à estruturas satisfatórias. Uma coleção de estruturas é utilizada como referência para obter uma pontuação para cada um dos 20 aminoácidos na sua classe estrutural. A janela de pontuação para cada aminoácido (de -10 até +10) é adicionada e plotada individualmente para cada resíduo e esta pontuação para ser considerada ideal deve ser maior que 0,2 (BOWIE *et al.*, 1991; LUTHY *et al.*, 1992).

#### 4.2 RELAÇÃO ESTRUTURA ATIVIDADE

As séries de benzoxazinonas, 2-amino-benzoxazinona (**12-20**) e 2-oxi-benzoxazinona (**21-29**) (Tabela 1 e Tabela 2) sintetizadas previamente (JARVEST *et al.*, 1996), foram comparadas quanto aos valores de IC<sub>50</sub> baseando-se na presença do grupo amino- ou grupo oxi-. Também foram feitas análises em relação aos substituintes das posições R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub> e a correlação da presença ou ausência dos grupos presentes nestas posições e a atividade.

Tabela 1: Valores de IC<sub>50</sub> para derivados da 2-amino-benzoxazinona (**12-20**).

Composto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	IC <sub>50</sub> (μM)
<b>12</b>	Bu	H	300
<b>13</b>	iPr	H	25
<b>14</b>	iPr	NH <sub>2</sub>	55
<b>15</b>	iPr	Cbz-Ala-NH	5
<b>16</b>	iPr	Cbz-Asn-NH	15
<b>17</b>	iPr	iBuCOONH	50
<b>18</b>	MeO <sub>2</sub> CCMeH	H	25
<b>19</b>	(R)-PhCMeH	H	60
<b>20</b>	3-F-Ph	H	>300

Tabela 2: Valores de IC<sub>50</sub> para derivados da 2-oxi-benzoxazinona (**21-29**).

Composto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	IC <sub>50</sub> (μM)
<b>21</b>	Et	H	H	H	25
<b>22</b>	Et	H	H	F	75
<b>23</b>	Et	NH <sub>2</sub>	H	Me	15
<b>24</b>	Et	Cbz-Ala-NH	H	Cl	7
<b>25</b>	Et	Cbz-Asn-NH	H	Et	20
<b>26</b>	Et	iBuCOONH	Cl	Cl	1,5
<b>27</b>	Alil	H	H	H	15
<b>28</b>	Ph	H	H	H	10
<b>29</b>	4-OCH <sub>3</sub> -Ph	H	H	H	2,5

#### 4.3 CONSTRUÇÃO DOS COMPOSTOS

As estruturas tridimensionais dos derivados de benzoxazinona (**12-29**, Tabelas 1 e 2) foram construídos no programa SPARTAN'10 (Wavefunction, Inc, CA) e geometricamente minimizados com o campo de força MMFF (HALGREN, 1996). Em seguida foram submetidas à análise conformacional utilizando o método MMFF visando obter estruturas energeticamente mais estáveis. Para obtenção das cargas eletrônicas, o melhor conformero de cada inibidor foi otimizado utilizando o método semi-empírico RM1. Mais uma etapa para obtenção das cargas eletrônicas foi realizada através de cálculos quânticos utilizando-se a Teoria do Funcional da Densidade (DFT/B3LYP/6-31G\*) no programa SPARTAN'10. Em seguida, para obtenção das cargas atômicas, os arquivos obtidos foram salvos no formato \*.mol2, selecionando a opção de carga eletrostática para os conformeros, que serão utilizados como ponto de partida para o *docking* no sítio ativo da protease de HSV-1.

## 4.4 DOCKING MOLECULAR

### 4.4.1 Docking molecular

O estudo de *docking* molecular foi realizado utilizando o programa AutoDock4.2, e a interface gráfica AutoDockTools (ADT). O AutoDock é um conjunto de ferramentas que permitem a predição da interação entre ligante-macromolécula. Para identificar as possíveis combinações ligante-macromolécula, o programa possui 3 opções de algoritmos: SA (*Simulated Annealing*), GA (*Genetic Algorithm*) e LGA (*Lamarckian Genetic Algorithm*). Nesse trabalho, o algoritmo de busca utilizado foi o Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA) (MORRIS *et al.*, 2004), que apresenta os melhores resultados na busca do mínimo global (TURNER *et al.*, 2000).

### 4.4.2 Preparação dos arquivos do *AutoDock*

Os arquivos do receptor, no formato \*.PDB, e do ligante, no formato \*.mol2, foram editados no programa AutoDockTools. O receptor foi considerado uma macromolécula rígida, enquanto o ligante foi considerado parcialmente flexível, onde a cadeia principal de caráter peptídico foi imobilizada em alguns compostos. Os arquivos finais gerados no formato \*.pdbqt para o receptor e o ligante correspondem ao arquivo de leitura do programa AutoDock.

Inicialmente foram calculados mapas de grade empregando-se o programa AutoGrid4. Esses mapas são calculados considerando cada tipo de átomo do ligante e um mapa para interações eletrostáticas. Para tal procedimento foi criado um arquivo de parâmetros de entrada (formato \*.gpf, *grid parameter file*) em que foi delineada uma caixa de grade de dimensões 36x40x60 pontos e espaçamento 0,375Å envolvendo inteiramente o sítio catalítico da enzima e centralizada no ligante.

Os parâmetros de entrada para o programa AutoDock foram ajustados através do programa AutoDock Tools e gerados no formato \*.dpf, *docking parameter file*. Para a busca conformacional foi empregado o algoritmo genético de busca Lamarckiano e funções de energia livre empíricas.

A leitura dos arquivos do *docking* molecular foi realizada através do programa AutoDock4 e os resultados obtidos foram analisados através dos programas AutoDockTools e PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, Schrödinger, LLC).

#### 4.5 ESTUDO DE *DRUGLIKENESS* E *DRUGSCORE*

Os parâmetros avaliados nestes estudo foram *Druglikeness* e *DrusScore* das benzoxazinonas mais ativas e de alguns fármacos utilizados na terapia do HSV, utilizando o programa Osiris da Actelion Pharmaceuticals Ltd. No Osiris o *Druglikeness*, é calculado com base em uma lista de 5300 fragmentos distintos que apresentam seus respectivos valores de *Druglikeness*. De acordo com esta base de dados, deve se tentar obter moléculas com valores positivos de *Druglikeness*, o que não significa necessariamente que pode ser feita a associação de quanto maior este valor melhor a molécula para candidato a fármaco. Esta premissa pode não ser verdadeira uma vez que não são levadas em consideração valores de lipofilicidade neste cálculo.

O *Drugscore* é calculado pela combinação dos valores obtidos para cLogP, LogS, peso molecular e risco de toxicidade, também preditos pelo mesmo programa.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 MODELAGEM POR HOMOLOGIA

#### 5.1.1 SWISS-MODEL

A HSV-1 Protease não possui estrutura cristalográfica experimentalmente resolvida e, portanto, foi realizada a construção da estrutura terciária por modelagem por homologia. Foi utilizada como estrutura de referência, a protease de HSV-2 cujo código PDB é 1AT3. Para gerar o modelo, as estruturas primárias das proteases de HSV-1 e HSV-2 foram obtidas no banco de dados UniProt, cujos códigos de acesso são Q69087 e Q69527 respectivamente. As estruturas primárias das proteases de HSV-1 e HSV-2 possuem 635 e 638 aminoácidos respectivamente que, alinhados na ferramenta de alinhamento do UniProt, apresentaram 472 posições idênticas, 58 posições similares e 73,72% de identidade. Estudos anteriores mostraram que as estruturas terciárias das proteases da família Herpesviridae são conservadas (LIU & ROIZMAN, 1991; BUISSON *et al.*, 2002; BUISSON *et al.*, 2006). O alinhamento e o modelo foram gerados através do servidor SWISS-MODEL no modo automático (PEITSCH, 1995; ARNOLD *et al.*, 2006; KIEFER *et al.*, 2009).

O gráfico de Ramachandran, fornecido pelo Procheck, apresentou 83,7% dos resíduos de aminoácidos em regiões favoráveis. Os resíduos Arg226, Asp225 e Leu111 estão localizados em regiões não permitidas, entretanto, não fazem parte da tríade catalítica (Figura 11).



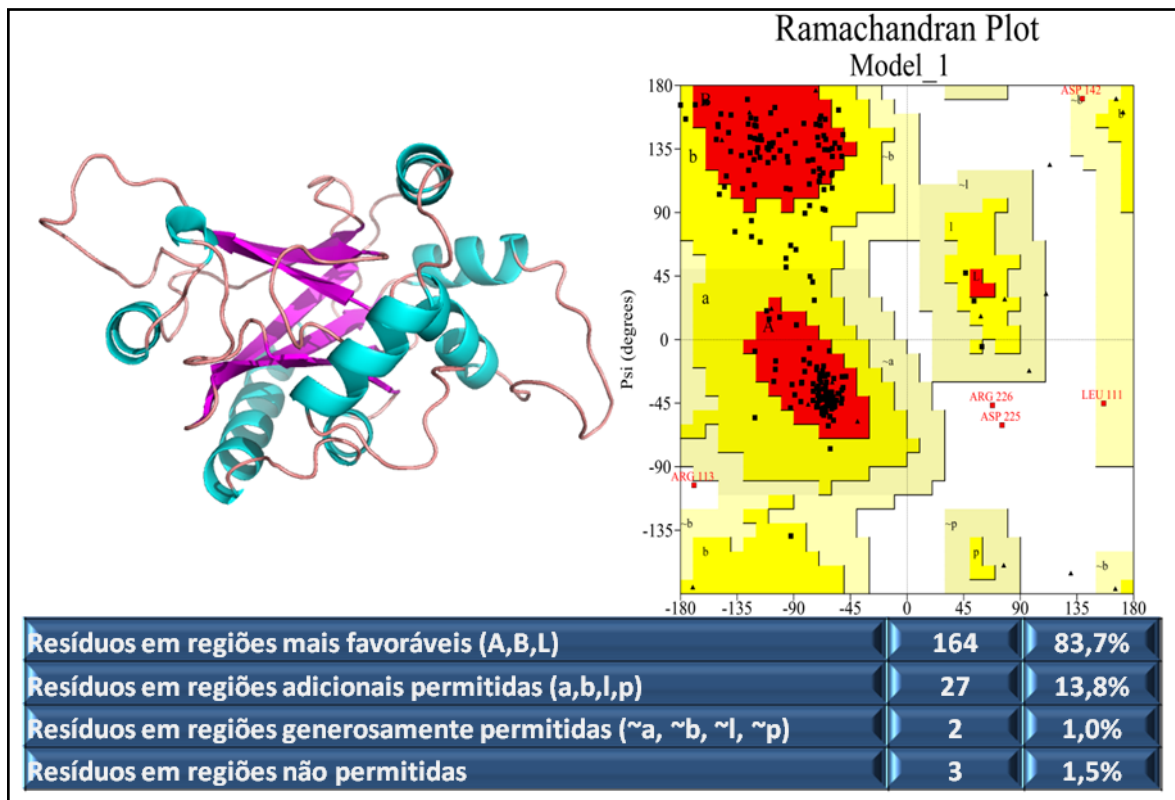


Figura 11: À esquerda, modelo tridimensional obtido através do servidor SWISS-MODEL para a protease de HSV-1. Hélices  $\alpha$  em azul, folhas  $\beta$  em rosa e regiões em alça em laranja. À direita, Gráfico de Ramachandran do modelo da protease de HSV-1. Regiões mais favoráveis (A,B,L -vermelho), Regiões adicionais permitidas (a,b,l,p - amarelo escuro), Regiões generosamente permitidas (~a, ~b, ~l, ~p - amarelo claro), Regiões não permitidas (branco). Regiões de hélice  $\alpha$  (a, ~a ou A), Regiões de folha  $\beta$  (b, ~b, ou B), Regiões de hélice  $\alpha$  de mão esquerda (l, ~l ou L), Regiões para Glicina (p ou ~p).

De acordo com o programa Verify 3D, 81,03% dos resíduos de aminoácidos apresentaram média de pontuação 3D-1D maior que 0,2, sugerindo que o modelo obtido através do servidor SWISS-MODEL foi gerado corretamente (Figura 12). Este gráfico evidencia a presença de lacunas de aminoácidos no modelo da protease de HSV-1. A análise dos aminoácidos ausentes mostrou que nenhum aminoácido da tríade catalítica e do sítio de ligação estava localizado nas lacunas, o que ratifica a validade do modelo da protease de HSV-1.

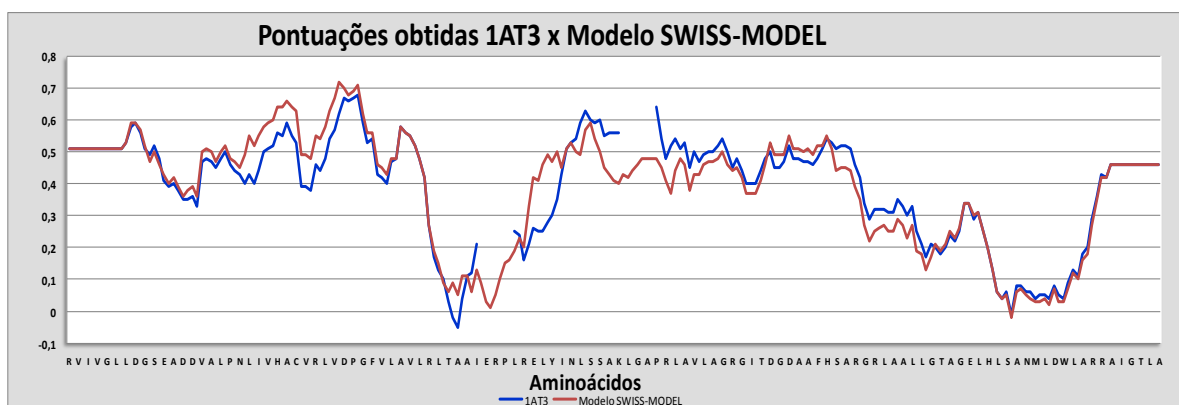


Figura 12: Gráfico comparativo entre as pontuações obtidas por Verify 3D da protease de HSV-2 (azul) e do modelo da protease de HSV-1 gerado através do servidor SWISS-PROT (vermelho).

Para verificar o desvio existente entre o modelo gerado e a protease de HSV-2, foi feito um alinhamento no programa Sybyl onde foi calculado o RMSD (*Root Mean Square Deviation*) entre as duas estruturas. O valor encontrado de RMSD foi de 0,308 Å e foi avaliada a posição da tríade catalítica em ambos os modelos, onde foi possível observar que a tríade catalítica composta por His61, Ser129, His148, apresenta a mesma orientação nas duas estruturas terciárias (Figura 13).

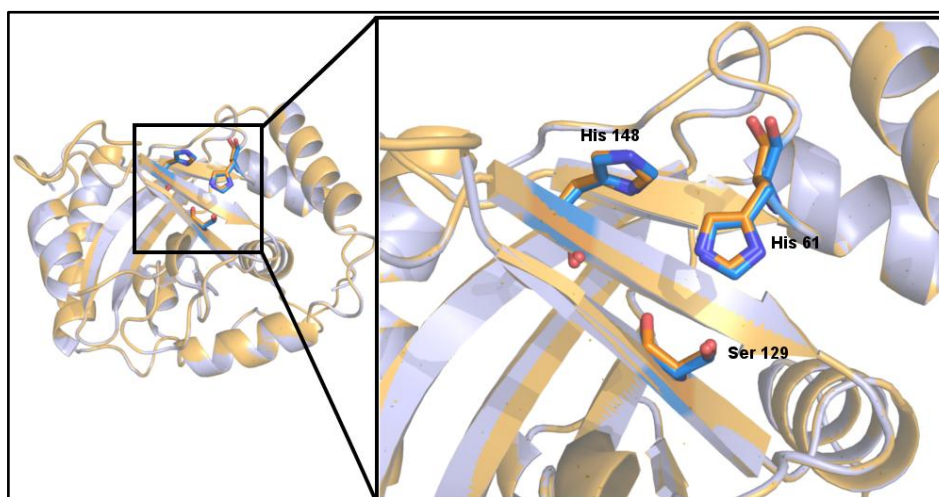


Figura 13: Alinhamento da estrutura terciária da protease de HSV-2 obtida pelo PDB (código 1AT3), azul, e da estrutura terciária da protease de HSV-1 gerado através do servidor SWISS-MODEL, laranja.

### 5.1.2 MODELLER

Para gerar o modelo da protease de HSV-1 pelo programa MODELLER foi necessário realizar uma etapa de alinhamento da estrutura primária da protease de HSV-1 com a protease de HSV-2. Este alinhamento foi realizado pelo servidor T-Coffee (NOTREDAME *et al.*, 2000) e apresentou o valor de pontuação 98 de 100.

O alinhamento foi editado através do programa ALINE de acordo com a Figura 14 (BOND & SCHUTTELKOPF, 2009).



Figura 14: Alinhamento da Protease de HSV-1 com a Protease de HSV-2 (modelo) editado através do programa ALINE (BOND & SCHUTTELKOPF, 2009). Resíduos coloridos através de escala de similaridade do vermelho (resíduos de alta similaridade) até o azul claro (resíduos de baixa similaridade). Em destaque com contorno em preto, resíduos sem informação estrutural.

O alinhamento obtido foi utilizado na construção dos modelos tridimensionais da protease de HSV-1 pelo programa MODELLER9v10. O arquivo de entrada do programa foi configurado para a obtenção de 30 modelos, dos quais, foi selecionado o de menor energia. Este modelo foi submetido ao mesmo procedimento de validação descrito no item 5.1.1 para o modelo obtido pelo servidor SWISS-MODEL.

O gráfico de Ramachandran obtido através do servidor PROCHECK apresentou 90,8% dos resíduos de aminoácidos em regiões favoráveis e nenhum dos resíduos de aminoácidos em regiões não favoráveis (Figura 15).

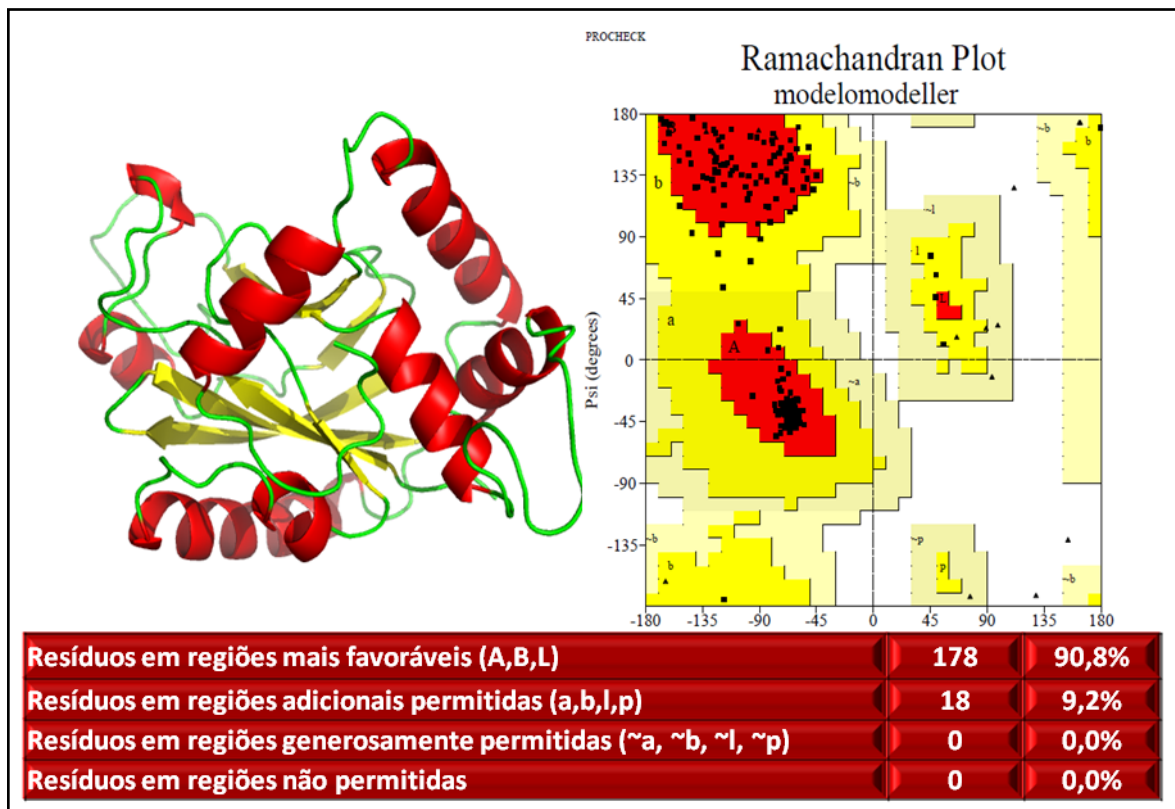


Figura 15: À esquerda, modelo tridimensional obtido através do programa MODELLER para a protease de HSV-1. Hélices  $\alpha$  em vermelho, folhas  $\beta$  em amarelo e regiões em alça em verde. À direita, Gráfico de Ramachandran do modelo da protease de HSV-1. Regiões mais favoráveis (A,B,L -vermelho), Regiões adicionais permitidas (a,b,l,p - amarelo escuro), Regiões generosamente permitidas (~a, ~b, ~l, ~p - amarelo claro), Regiões não permitidas (branco). Regiões de hélice  $\alpha$  (a, ~a ou A), Regiões de folha  $\beta$  (b, ~b, ou B), Regiões de hélice  $\alpha$  de mão esquerda (l, ~l ou L), Regiões para Glicina (p ou ~p).

A validação utilizando o programa Verify3D mostrou um valor de pontuação média 3D-1D maior que 0,2 de 87,93%. Para avaliar o perfil da curva obtido pelas pontuações dos aminoácidos do modelo obtido pelo programa MODELLER9v10 em relação à curva obtida pelas pontuações dos aminoácidos do molde (HSV-2) foi gerado um gráfico comparativo (Figura 16).

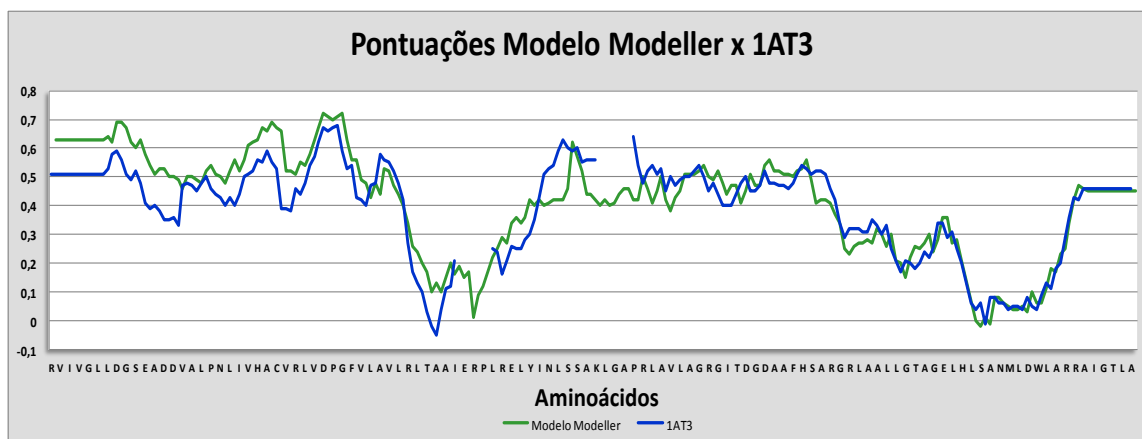


Figura 16: Gráfico comparativo das pontuações obtidas através do Verify 3D do modelo gerado através do programa MODELLER (verde) e do modelo da protease de HSV-2, 1AT3 (Azul).

Comparando os resultados obtidos para o modelo gerado através do servidor SWISS-MODEL e o modelo gerado através do programa MODELLER9v10, é possível observar através dos métodos de validação que o modelo gerado pelo programa MODELLER9v10 apresentou melhores resultados tanto no gráfico de Ramachandran quanto na pontuação de aminoácidos por Verify 3D. Sendo assim, os resultados de validação são indicativos de que o programa MODELLER foi capaz de prever o modelo da protease de HSV-1 com maior precisão que o servidor SWISS-MODEL no modo automático. Assim, o modelo da protease de HSV-1 gerado pelo programa MODELLER foi selecionado para os estudos subsequentes de *docking* molecular.

Para verificar o desvio existente entre o modelo gerado e a protease de HSV-2, foi feito um alinhamento no programa Sybyl onde foi calculado o RMSD (*Root Mean Square Deviation*) entre as duas estruturas. O valor encontrado de RMSD foi de 0,308 Å e foi avaliada a posição da tríade catalítica em ambos os modelos, onde foi possível observar que a tríade catalítica composta por His61, Ser129, His148, apresenta a mesma orientação nas duas estruturas terciárias (Figura 17).

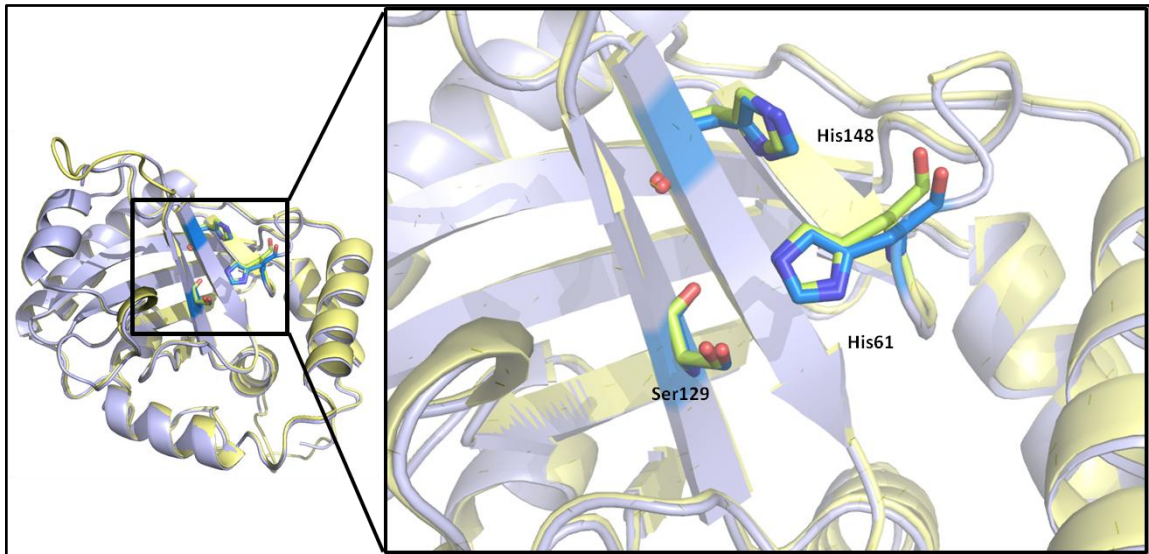


Figura 17: Modelo da Protease de HSV-1 obtido através do programa MODELLER (amarelo) alinhado com a protease de HSV-2 (azul). Destaque em azul e verde escuros para a tríade catalítica, composta pelos resíduos His61, Ser129 e His148.

No intuito de avaliar a estrutura secundária obtida para o modelo da protease de HSV-1 foi feita uma comparação com a protease de HSV-2, utilizada como molde na modelagem comparativa. As estruturas secundárias das proteases foram geradas através do servidor PDBsum (LASKOWSKI *et al.*, 1997; LASKOWSKI, 2001; LASKOWSKI *et al.*, 2005; LASKOWSKI, 2009). De acordo com o resultado obtido, a estrutura secundária da protease de HSV-1 possui 7 hélices  $\alpha$  e 7 folhas  $\beta$ , também vistas na estrutura secundária da protease de HSV-2 (Figura 18)



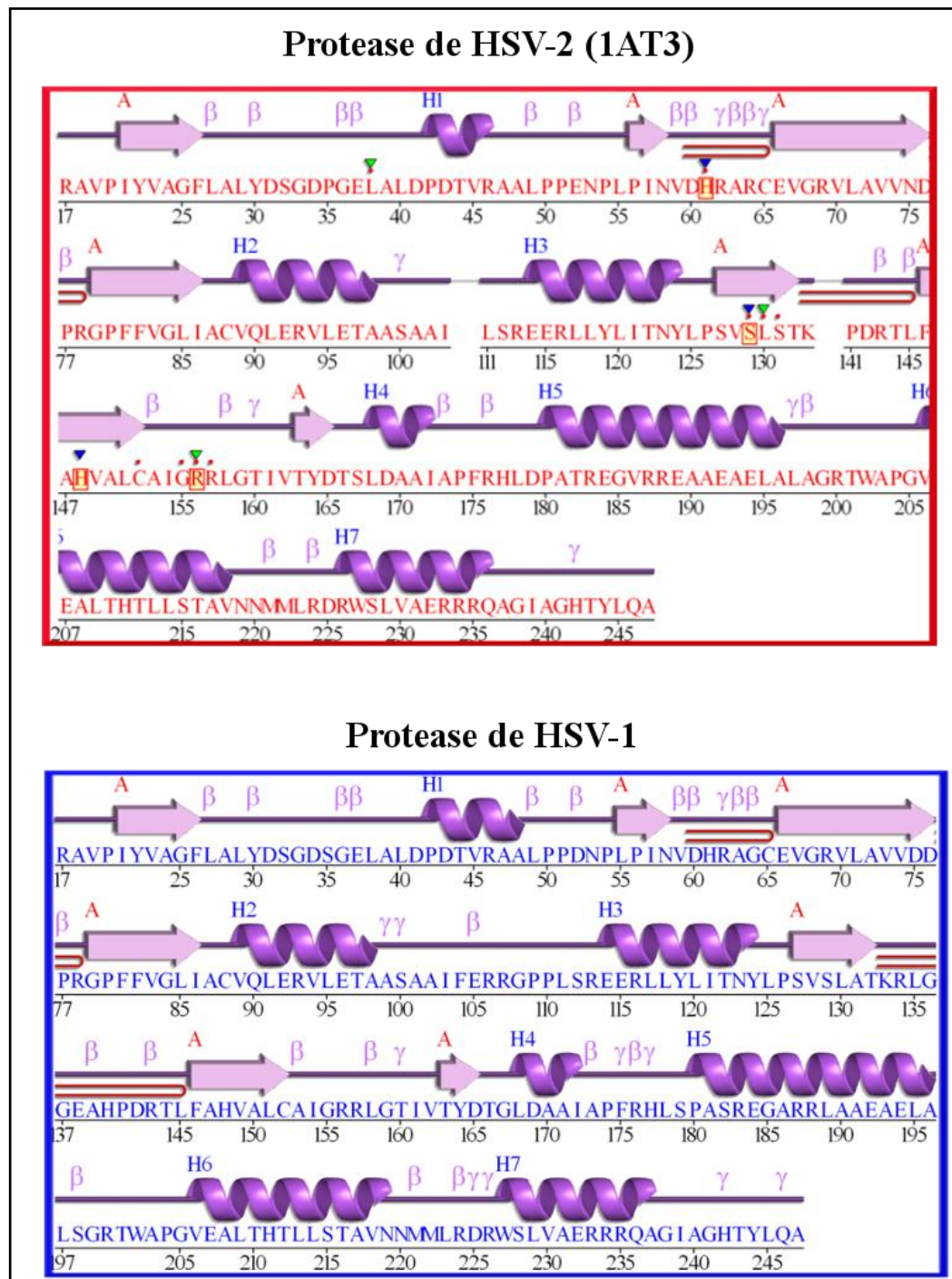


Figura 18: Estruturas secundárias das proteases de HSV-1 e de HSV-2 obtidas através do servidor PDBsum.

Outro modelo da protease de HSV-1 foi descrito na literatura e categorizado como predito no banco de dados UniProt. De acordo com este banco de dados, esta categoria é característica de dados de entrada sem evidência protéica, de transcrição ou homologia. Os bancos de dados que apresentam as estruturas terciárias disponíveis são: HSSP (*Homology-derived Secondary Structure of Proteins database*), PMP (*Protein Model Portal*), SMR

(SWISS-MODEL *Repository*) e ModBase. Dentre estes, dois foram selecionados e comparados com a estrutura terciária obtida através do programa MODELLER: SMR e ModBase. Como o arquivo da estrutura terciária do modelo gerado através do ModBase não se encontra disponível, um arquivo em formato \*.PDB foi construído através das coordenadas disponíveis no ModBase. As duas estruturas terciárias obtidas através do ModBase e SMR foram validadas utilizando o programa Procheck e Verify 3D.

O resultado do gráfico de Ramachandran obtido para o modelo da literatura gerado através do ModBase (Figura 19) mostrou que 89,8% dos resíduos de aminoácidos encontram-se em regiões permitidas e nenhum em regiões não permitidas. A análise pelo Verify 3D (Figura 20) mostrou que 81,03% dos resíduos tem valor de pontuação média 3D-1D maior que 0,2.



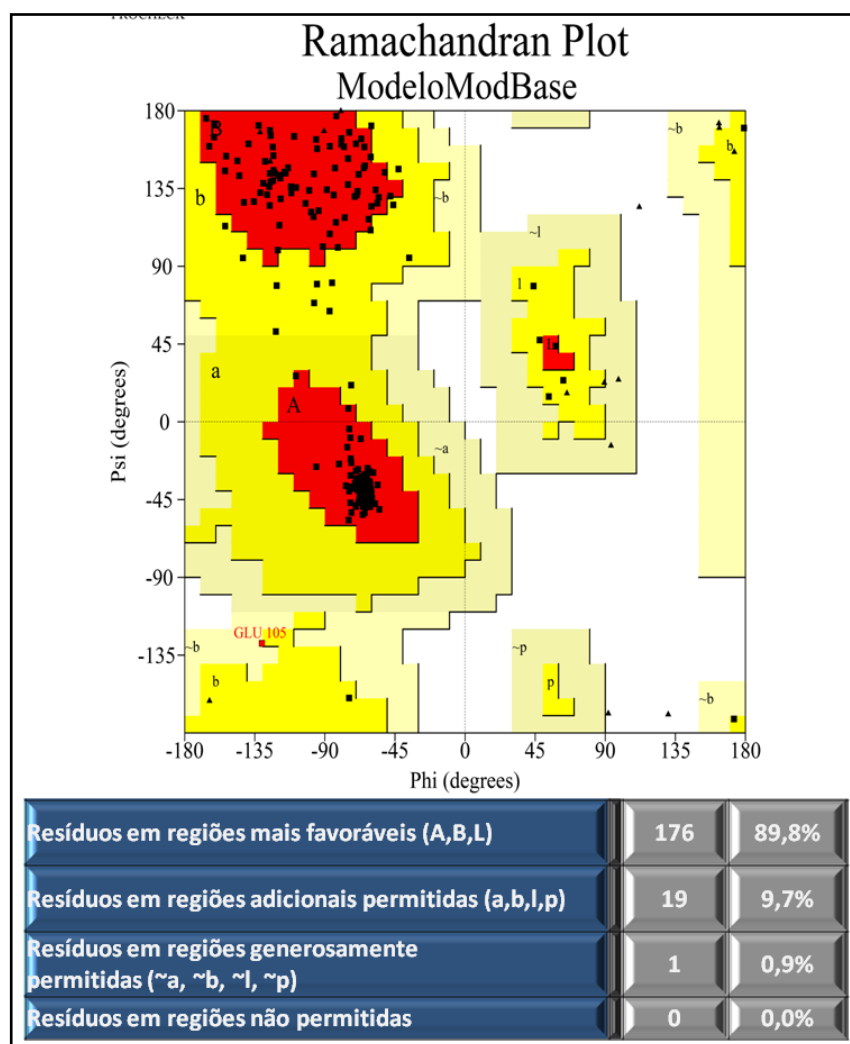


Figura 19: Gráfico de Ramachandran do modelo da protease de HSV-1 encontrado na literatura gerado através do servidor ModBase. Regiões mais favoráveis (A,B,L -vermelho), Regiões adicionais permitidas (a,b,l,p - amarelo escuro), Regiões generosamente permitidas (~a, ~b, ~l, ~p - amarelo claro), Regiões não permitidas (branco). Regiões de hélice  $\alpha$  (a, ~a ou A), Regiões de folha  $\beta$  (b, ~b, ou B), Regiões de hélice  $\alpha$  de mão esquerda (l, ~l ou L), Regiões para Glicina (p ou ~p).

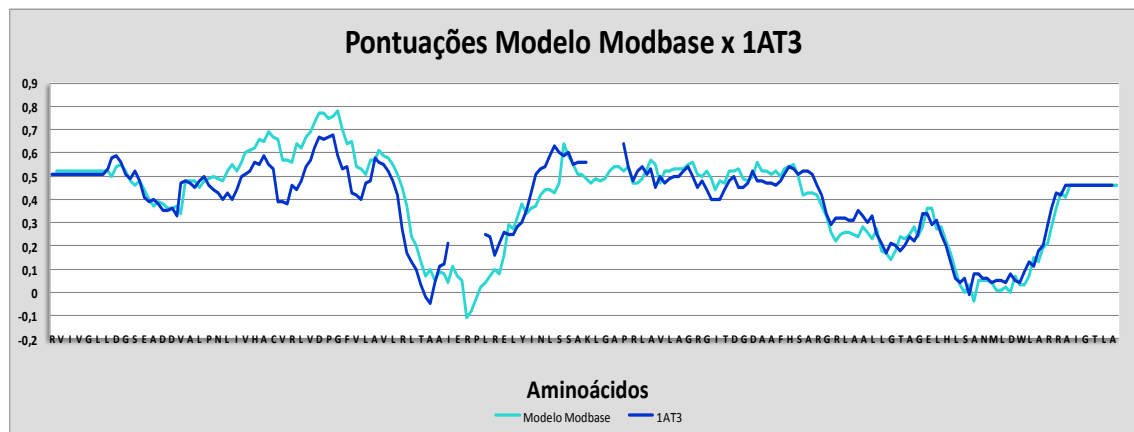


Figura 20: Gráfico comparativo das pontuações obtidas através do Verify 3D do modelo da literatura gerado através do programa Modbase (azul claro) e do modelo da protease de HSV-2, 1AT3 (Azul).

Para o modelo gerado através do SMR o gráfico de Ramachandran (Figura 21) mostrou um valor de 83,7% de resíduos de aminoácidos em regiões permitidas e 1,5% em regiões não permitidas. A opção Verify 3D mostrou que 81,03% dos resíduos tem valor de pontuação média 3D-1D maior que 0,2.

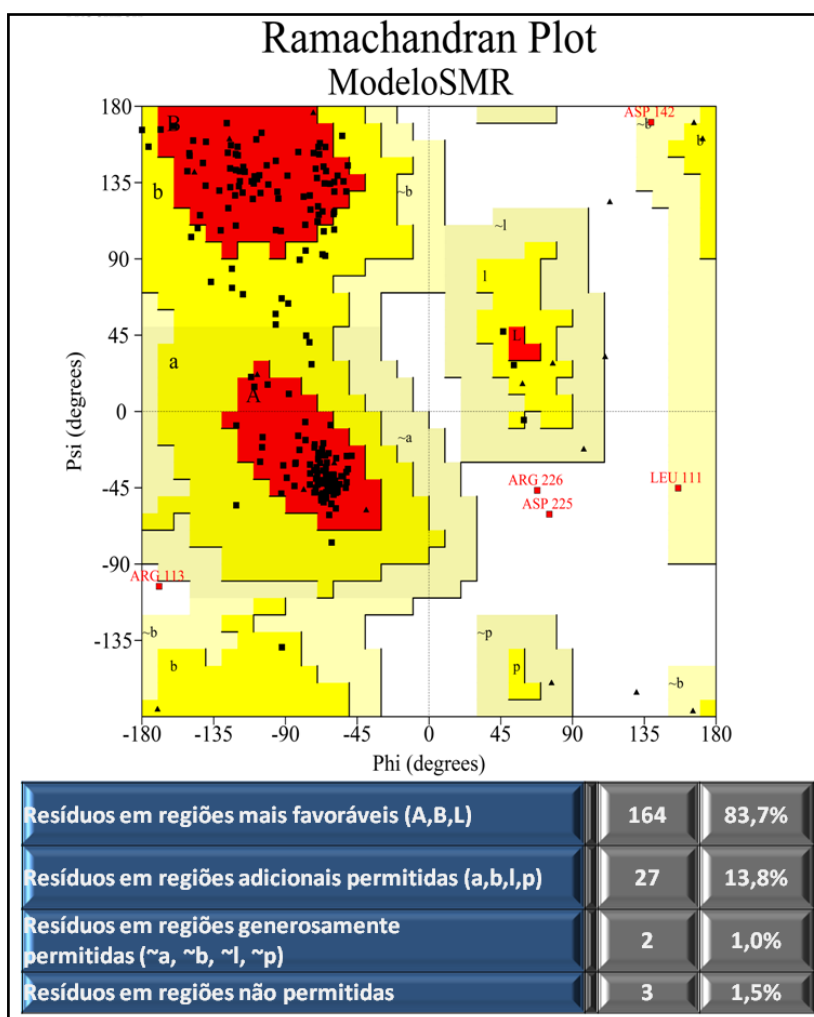


Figura 21: Gráfico de Ramachandran do modelo da protease de HSV-1 encontrado na literatura gerado através do servidor SWISS MODEL Repository (SMR). Regiões mais favoráveis (A,B,L -vermelho), Regiões adicionais permitidas (a,b,l,p - amarelo escuro), Regiões generosamente permitidas (~a, ~b, ~l, ~p - amarelo claro), Regiões não permitidas (branco). Regiões de hélice  $\alpha$  (a, ~a ou A), Regiões de folha  $\beta$  (b, ~b, ou B), Regiões de hélice  $\alpha$  de mão esquerda (l, ~l ou L), Regiões para Glicina (p ou ~p).

Ao comparar os resultados de validação obtidos por modelos da literatura e o modelo obtido pelo programa MODELLER (Tabela 3), mais uma vez é possível justificar a escolha do modelo gerado pelo MODELLER para os estudos de *docking* molecular, sugerindo que este modelo é mais preciso que os outros 2 obtidos da literatura e ainda, em relação ao modelo obtido através deste trabalho também pelo servidor SMR.

Tabela 3: Comparativo das validações dos modelos obtidos através da literatura e modelos obtidos através do programa MODELLER e servidor SMR. Destaque para o resultado obtido através do programa MODELLER, considerado o melhor modelo em relação aos outros 3.

<b>Modelos</b>	<b>Ramachandran</b>	<b>Verify 3D</b>
SMR literatura	83,70%	81,03%
ModBase	89,80%	81,03%
MODELLER	90,80%	87,93%
SMR	83,70%	81,03%

## 5.2 ESTUDO DA RELAÇÃO ESTRUTURA E ATIVIDADE (SAR)

Através das estruturas químicas e valores de atividade da série de benzoxazinonas (**12-29**), foi feito um estudo de Relação Estrutura Atividade (SAR) desses compostos. De acordo com a Tabela 4 é possível observar que os 5 primeiros ligantes possuem atividades similares, com valores de  $IC_{50}$  próximos variando em no máximo 3,0  $\mu$ M. O primeiro parâmetro avaliado foi quanto a presença do grupo amino e grupo oxi presentes nos dois grupos de benzoxazinonas, conforme a Figura 22.

Tabela 4: Benzoxazinonas (**12-29**) em ordem decrescente de atividade ( $IC_{50}$   $\mu$ M)

Composto	Atividade ( $\mu$ M)
26	1,5
29	2,5
15	5,0
24	7,0
28	10,0
16	15,0
23	15,0
27	15,0
25	20,0
13	25,0
18	25,0
21	25,0
17	50,0
14	55,0
19	60,0
22	75,0
12	300,0
20	>300,0

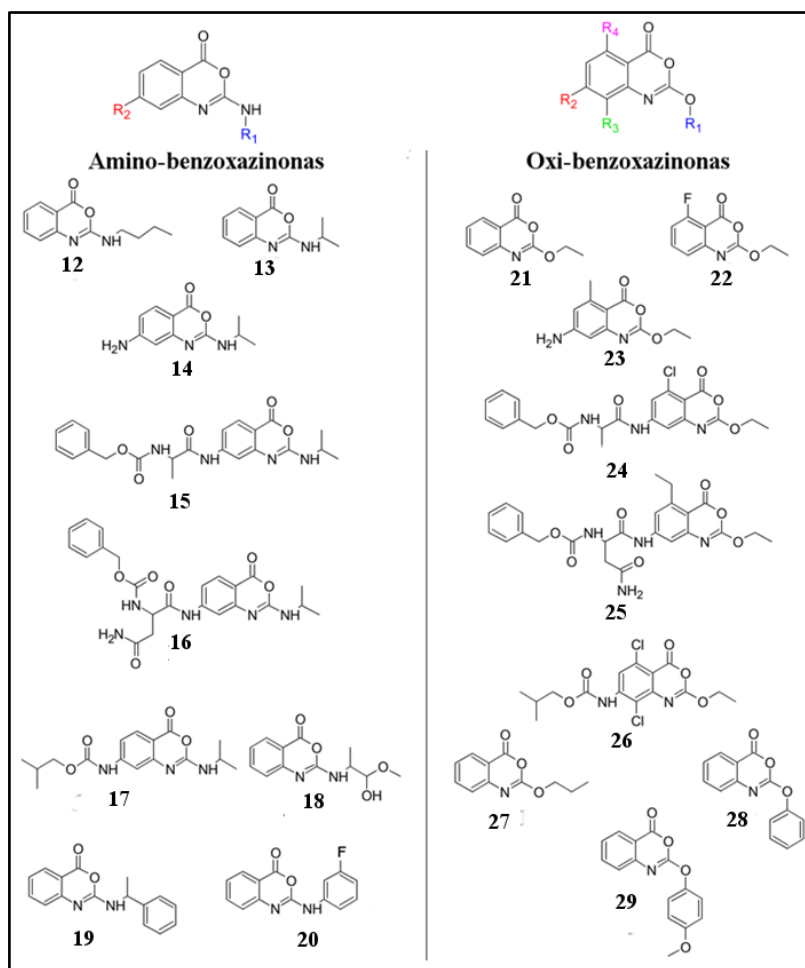


Figura 22: Série de benzoxazinonas divididas em amino-benzoxazinonas (esquerda) e oxi-benzoxazinonas (direita).

A partir da Tabela 4 é possível observar que as oxi-benzoxazinonas (**21-29**), com exceção da **22**, possuem melhor atividade antiviral que as amino-benzoxazinonas (**12-20**). De uma forma geral, a maior atividade dos derivados oxi-benzoxazinona pode estar relacionada à eletronegatividade do átomo de oxigênio em relação ao átomo de nitrogênio assim como os tipos de interação ocorridos nesta região. O grupamento amino pode atuar como doador e acceptor de ligação hidrogênio enquanto o oxigênio participa desse tipo de interação apenas como acceptor, fator que pode influenciar na formação de ligações hidrogênio e na distância entre as mesmas, caso estes grupos estejam posicionados de forma favorável para interagir com o alvo. Durante a interação de um ligante com seu alvo, existe uma penalidade maior quando um doador de ligação hidrogênio não é satisfeito com uma ligação do que quando um acceptor não é satisfeito, ficando desta forma, o doador no estado dessolvatado (BISSANTZ *et al.*, 2010). Este fato pode estar correlacionado à menor atividade dos derivados amino-benzoxazinona.

Além da influência dos grupos amino e oxi, os substituintes presentes nas posições R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub>, parecem estar relacionados à atividade antiviral.

A presença de uma cadeia alifática e lipofílica na posição R<sub>1</sub> indicou uma contribuição negativa para a atividade tanto no grupo das amino quanto das oxi-benzoxazinonas. O composto **12**, o segundo menos ativo da série apresenta uma cadeia alifática de quatro carbonos. Outros compostos poucos volumosos com cadeias laterais lipofílicas como, **13**, **14**, **21**, **22** e **23**, mostraram atividades maiores que o composto **12**, possivelmente devido à redução do tamanho da cadeia e/ou a não linearidade na mesma. Esta relação com a linearidade pode indicar uma limitação do sítio ativo relacionado ao tamanho da cadeia lateral dos ligantes. O composto **20**, o menos ativo da série com IC<sub>50</sub> >300 µM, apresenta o grupo 3-flúor-fenila na posição R<sub>1</sub>. Comparando-se este derivado com outro que também possui o grupo fenila na posição R<sub>1</sub>, como o derivado **19** (IC<sub>50</sub> 60 µM) é possível observar o aumento da atividade na ausência do substituinte fluor no anel fenila. Para o derivado **20**, o menos ativo da série, ocorre a desativação do anel aromático pela presença do átomo de flúor na posição meta, um substituinte que promove a atração de elétrons por efeito indutivo. Comparando-se o composto **20** aos compostos **28** (IC<sub>50</sub> 10 µM) e **29** (IC<sub>50</sub> 2,5 µM) do grupo das oxi-benzoxazinonas é possível observar novamente o aumento da atividade não só devido aos derivados **28** e **29** pertencerem ao grupo das oxi-benzoxazinonas, mas também à ausência do substituinte fluor. Estas evidências sugerem a importância da alta densidade eletrônica

nesta anel devido à ocorrência de interações eletrostáticas nesta região, como por exemplo interações do tipo empilhamento  $\pi$ - $\pi$  ou cátion- $\pi$ .

Comparando-se os substituintes R<sub>2</sub> dos compostos **24** e **25**, substituídos por um resíduo de alanina e asparagina, respectivamente, é possível observar a influência da presença destes grupos na atividade, igualmente observada para os compostos **15** e **16**. A presença do resíduo de asparagina teve uma contribuição negativa para a atividade dos compostos **16** e **25** em relação aos compostos **15** e **24**, que apresentam o resíduo de alanina. É importante observar que a presença do resíduo arginina reduziu a atividade tanto no grupo das aminos quanto das oxi-benzoxazinonas. Já o resíduo alanina parece contribuir de forma positiva para a atividade, uma vez que, os compostos **15** e **24** estão inclusos no grupos dos ligantes mais ativos.

Outro grupo que parece influenciar os valores de atividade é o carbamato de iso-butila quando posicionado como substituinte em R<sub>2</sub>. O composto **26**, o mais ativo da série, apresenta uma carbonila semelhante àquela presente no anel das benzoxazinonas. Esta carbonila também está presente no composto **17** (IC<sub>50</sub>=60 $\mu$ M). Desta forma, a presença deste grupamento parece ser importante apenas para o grupo das oxi-benzoxazinonas, uma vez que o composto **26** faz parte deste grupo e o composto **17** do grupo das amino-benzoxazinonas.

Já foi descrito na literatura o mecanismo de ação das benzoxazinonas baseado no mecanismo padrão de inibição de serino-proteases, que ocorre pela formação de um complexo acil-enzima após o ataque nucleofílico do par de elétron do oxigênio do resíduo de serina à carbonila do ligante (JARVEST *et al.*, 1996). Apesar da estrutura da benzoxazinona já possuir uma carbonila vulnerável a este tipo de reação, outras carbonilas do mesmo tipo estão suscetíveis a este ataque nas cadeias laterais como no caso da carbonila do composto **26**. Dependendo do posicionamento deste composto na cavidade do sítio ativo, pode ocorrer a exposição da carbonila favorecendo a formação do complexo acil-enzima. Outro fator que pode influenciar é a carga eletrostática de cada carbonila. Comparando-se a carga da carbonila do anel benzoxazinona (0.6871) com a carbonila presente na cadeia lateral (0.8021) observou-se que a carbonila da cadeia lateral possui uma carga positiva maior, o que a torna mais suscetível ao ataque nucleofílico que a carbonila do anel benzoxazinona.

A presença de um grupo polarizável e lipofílico, na posição R<sub>3</sub> do anel aromático também parece aumentar a atividade, como o cloro no derivado **26** (Tabela 4).

A análise da posição do grupo R<sub>4</sub> do anel aromático demonstrou que a polarizabilidade dos grupos presentes nesta posição também influencia a atividade dos compostos. A polarizabilidade pode influenciar as interações do tipo dipolo-induzido tanto com o receptor

como com o solvente, dependendo na orientação deste grupo. Os derivados **24** e **26**, que apresentam na posição R<sub>4</sub> um átomo de cloro, estão entre os mais ativos, com valores de atividade de 7,0 µM e 1,5 µM respectivamente, sendo o último o mais ativo da série de benzoxazinonas. Os derivados com substituintes que possuem átomos menos polarizáveis que o cloro, como átomo de flúor ou carbono, são menos ativos como visto para os compostos **22**, **23** e **25** (Figura 22 e Tabela 4).

### 5.3 DOCKING MOLECULAR

#### 5.3.1 Validação do docking molecular

Para dar início aos estudos de *docking* molecular, foi feito o *re-docking*, utilizando o programa AutoDock 4.2 (MORRIS *et al.*, 2009) para validação da metodologia. O modelo cristalográfico selecionado para a validação foi a protease de HSV-2 complexada ao fosfato de di-isopropila (**30**) (Figura 23). Este composto é pequeno e possibilitaria a realização da técnica com baixo tempo computacional.

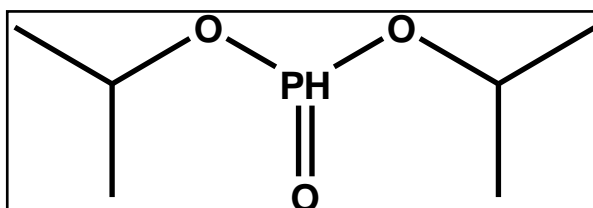


Figura 23: Estrutura química do fosfato de di-isopropila (**30**) obtido através da estrutura 1AT3 do PDB.

A estrutura cristalográfica obtida no banco de dados PDB foi editada no programa SPDB Viewer para separar a proteína do ligante e em seguida as duas moléculas foram analisadas no programa AutoDock Tools. Os parâmetros avaliados na etapa de *re-docking* foram: elitismo, taxa de *crossover*, taxa de mutação, tamanho da população, número de avaliações, número de gerações, número de torções livres, tamanho e posicionamento da caixa de grade. Os primeiros resultados utilizando os parâmetros padronizados no programa, com mapa de grade nas dimensões 60x60x60 pontos centralizada no oxigênio do grupo hidroxila da Ser129 da tríade catalítica, demonstraram o ligante numa posição diferente daquela apresentada obtida por difração de Raios X. Após diversas tentativas modificando as dimensões do mapa de grade e o local de centralização, não foi possível validar a metodologia.



Uma alternativa foi utilizar o programa AutoDock Vina. Os resultados obtidos foram semelhantes aos obtidos pelo programa AutoDock 4.2. Tendo em vista os fatos relatados, a possibilidade de utilizar a protease de HSV-2 como *re-docking* foi desconsiderada. Uma provável justificativa para o posicionamento incorreto do ligante fosfato de di-isopropila, é a presença do átomo fósforo na estrutura do ligante, o que poderia estar causando erro de leitura dos átomos pelo programa AutoDock 4.2.

Uma vez que a possibilidade de uso da protease de HSV-2 como modelo para re-docking foi excluída, foi necessário selecionar outra estrutura para realizar a validação. Após uma nova busca no bando de dados PDB, foi selecionada a protease de citomegalovírus (CMV), sob o código PDB 1NJU (KHAYAT *et al.*, 2003). A protease de CMV apresentou-se como candidata, uma vez que a estrutura apresenta identidade de 30% com a protease de HSV-1 e ainda, encontra-se associada ao peptideomimético 0FP (N-(6-aminohexanoil)-3-metil-L-valil-3-metil-L-valil-N~1~-[ (2S,3S)-3-hidroxi-4-oxo-4-[[ (1R)-1-fenilpropil]amino]butan-2-il]-N~4~,N~4~-dimetil-L-aspartamida) (**31**) (Figura 24) que apresenta características semelhantes às das benzoxazinonas. A estrutura foi editada da mesma forma descrita para a estrutura 1AT3 do PDB.

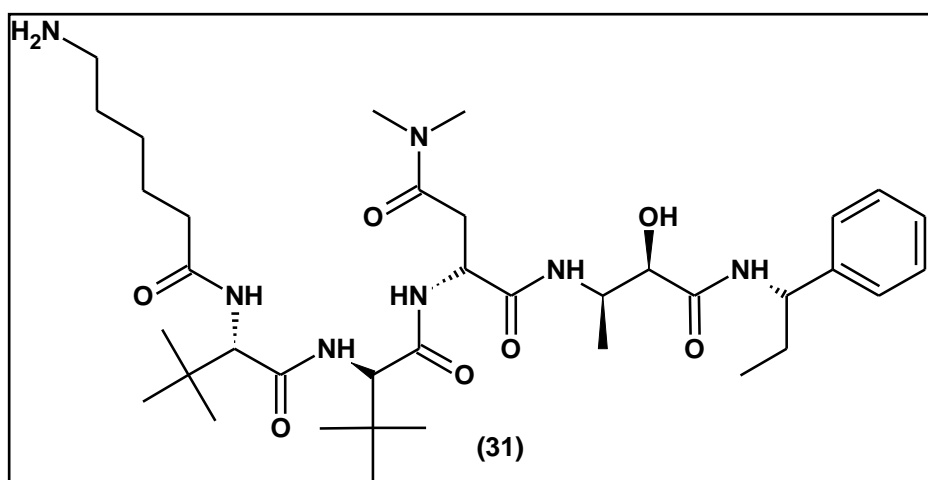


Figura 24: Ligante peptideomimético 0FP (**31**) obtido através da estrutura 1NJU do PDB.

Os parâmetros avaliados foram: elitismo, taxa de *crossover*, taxa de mutação, tamanho da população, número de avaliações, número de gerações, número de torções livres, tamanho e posicionamento do mapa de grade.

Para selecionar a melhor combinação de parâmetros foi considerada a localização da conformação de menor RMSD no *cluster* mais populoso e de menor energia de ligação. Para obter um bom resultado, foi necessário manter a parte peptídica da cadeia principal do ligante

rígida, deixando apenas as cadeias laterais livres (Figura 25). Na literatura, a utilização da cadeia principal rígida já foi descrita em alguns trabalhos de *docking* de peptídeos (OSTERBERG *et al.*, 2002; MADURGA *et al.*, 2005; SODERO, 2011). Também há evidências de que inibidores peptídicos adotam a conformação estendida, também chamada de canônica, para formar uma folha beta antiparalela com o sítio ativo polipeptídico (HEDSTROM, 2002).

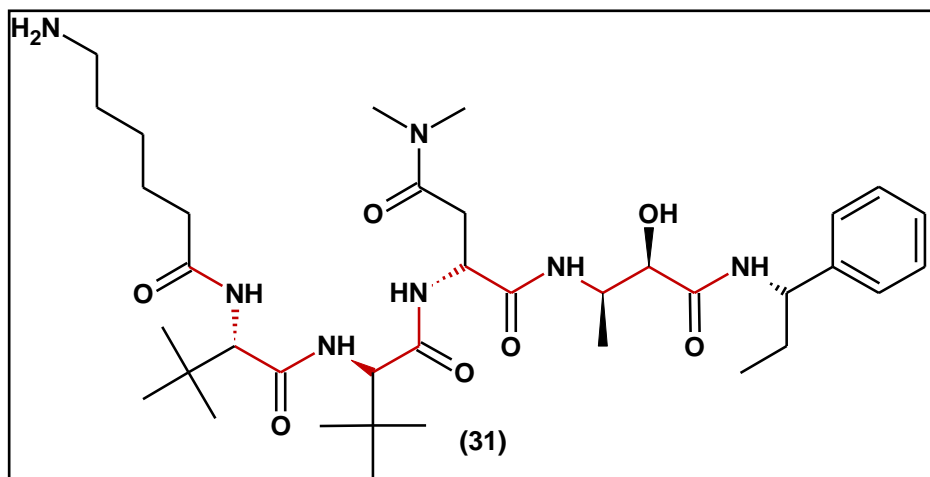


Figura 25: Ligante peptídeomimético (31). As ligações químicas destacadas em vermelho foram mantidas rígidas durante o *re-docking*.

Um dos parâmetros do algoritmo que necessitou de ajuste foi o elitismo, que corresponde à taxa que regula a quantidade de indivíduos que sobrevivem a uma determinada avaliação para a próxima geração. Foi utilizado o valor de 10% da população inicial (150), ou seja, 15. A taxa de *crossover* também foi modificada de 0,8, valor padrão do programa, chegando ao valor ideal de 0,6. Esta taxa indica a quantidade de cruzamentos realizados entre as estruturas químicas obtidas através do algoritmo. Com a redução deste valor há uma redução da quantidade de cruzamentos entre estruturas diferentes e, conseqüentemente, com estruturas desfavoráveis. Por este motivo, é possível que a redução da taxa de *crossover* tenha melhorado os resultados obtidos.

Os melhores resultados para a validação foram obtidos utilizando-se os parâmetros do algoritmo genético da Tabela 5, que foram utilizados para estudos de *docking* molecular com os derivados de benzoxazinonas.

Tabela 5: Parâmetros de algoritmo genético utilizados no estudo de *docking* molecular no programa AutoDock.

Parâmetros algoritmo genético	Valores
População inicial	150
Número de avaliações	25000000
Número de gerações	27000
Elitismo	15
Taxa de mutação	0,02
Taxa de crossover	0,6
Número de operações	100

A escolha dos melhores parâmetros foi realizada através da avaliação dos arquivos de saída do programa AutoDock (\*.dlg) utilizando-se os seguintes critérios: resultados com histogramas com menor número de aglomerados (*clusters*) possíveis; resultados de histogramas em que o aglomerado mais populoso corresponde ao de menor energia; aglomerados com RMSD menor ou igual a 2. O melhor histograma obtido, considerando esses critérios, encontra-se ilustrado na Figura 26, cujos parâmetros utilizados foram os da Tabela 5.

Número de distintos aglomerados conformacionais encontrados = 17, em 100 execuções, utilizando um rmsd de tolerância de 2,0 Å

HISTOGRAMA DE AGLOMERADOS

Rank	Menor Energia de Ligação	Execução	Energia Média de Ligação	Num. no Agl.	Histograma
1	-4,07	46	-3,78	25	#####
2	-3,96	24	2,67	8	#####
3	-3,75	65	-3,15	22	#####
4	-3,02	57	-2,48	3	###
5	-2,4	14	-2,01	2	##
6	-2,21	9	-1,66	3	###
7	-2,18	97	-0,96	10	#####
8	-1,87	58	-1,6	3	###
9	-1,79	20	-1,7	2	##
10	-1,73	55	-1,73	1	#
11	-1,66	67	-1,53	12	#####
12	-1,22	19	-1,22	1	#
13	-1,15	42	-1,15	1	#
14	-1,08	7	-1,08	1	#
15	-0,89	92	-0,51	4	####
16	-0,8	100	-0,8	1	#
17	-0,55	98	-0,55	1	#

Figura 26: Histograma obtido através do arquivo de saída do programa AutoDock. Aglomerado mais populoso corresponde ao de menor energia.

Conforme mostrado na Figura 26, o aglomerado mais populoso corresponde ao de menor energia e o valor de RMSD encontrado variou de 1,21 a 1,57 Å, onde todos os resultados encontram-se dentro da faixa estabelecida, menor ou igual a 2 (Tabela 6).

Tabela 6: Resultados do programa AutoDock4.2 para o *re-docking*.

<b>Parâmetros analisados no AutoDock</b>	<b>Valores</b>
Número de aglomerados	17
Número de conformações no aglomerado mais populoso	25
Maior RMSD no aglomerado mais populoso	1,57
Menor RMSD no aglomerado mais populoso	1,21
Menor energia de ligação do aglomerado mais populoso	-4,07
Posição do aglomerado mais populoso	1

Para avaliar visualmente o melhor resultado obtido da validação, foi feita a sobreposição da conformação obtida por difração de raios-X com a conformação de menor RMSD (1,21 Å) presente no aglomerado 1, encontrada na execução 53 (Figura 27). A sobreposição indica que as conformações são semelhantes, exceto pela cadeia da lisina desaminada. Como apenas o átomo de oxigênio desta lisina realiza uma importante ligação hidrogênio com o receptor (KHAYAT *et al.*, 2003), e ambos estão alinhados tanto no cristal quanto no confôrmero **23** do aglomerado 1, esse resíduo parece não possuir nenhum papel funcional no ancoramento do ligante no sítio ativo do receptor e, portanto, a alteração na conformação não deve influenciar o resultado do *docking*.

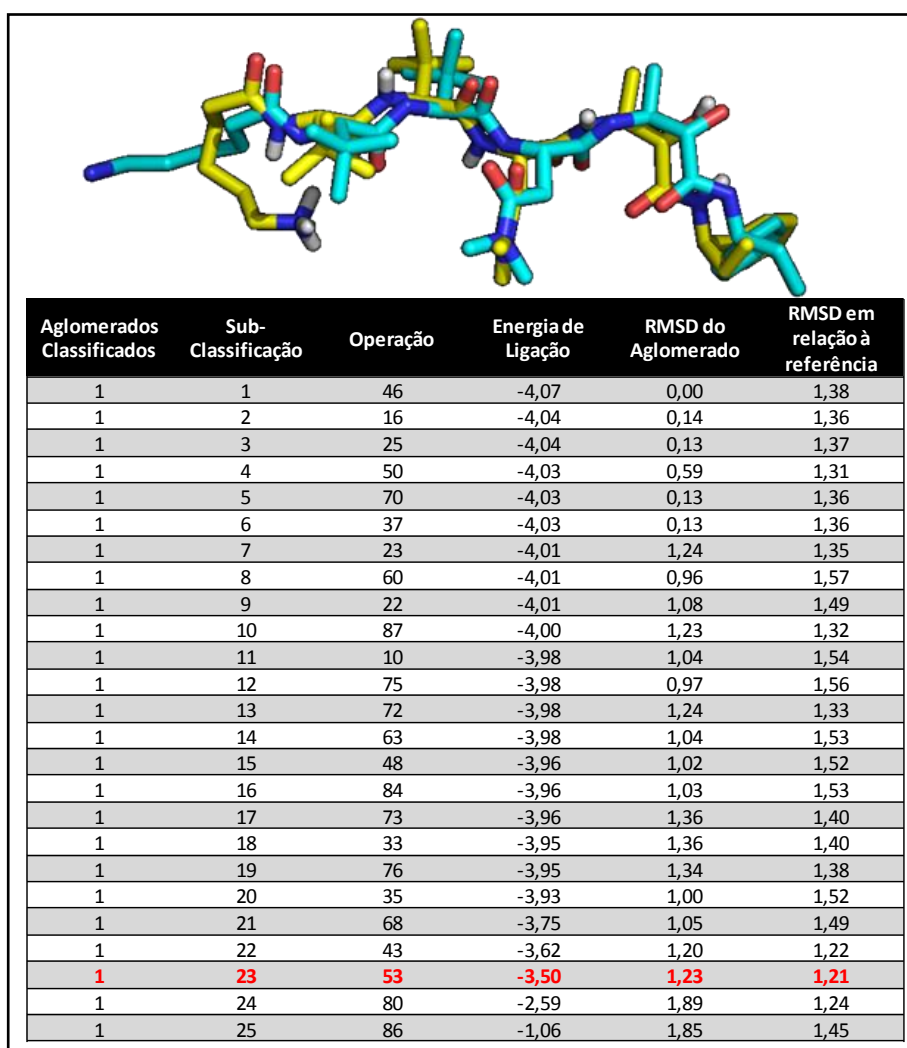


Figura 27: Sobreposição do confômero encontrado no cristal (azul), código PDB 1NJU, com confômero 23 (amarelo) do aglomerado 1 (acima); Tabela modificada do aglomerado 1, obtida através do arquivo de saída do programa AutoDock4.2 (abaixo). Destaque em vermelho para a conformação 23 do aglomerado 1.

Também foi analisada a capacidade da metodologia validada de encontrar as ligações hidrogênio no programa AutoDock4.2. Foi feita uma comparação entre as ligações hidrogênio entre a protease de citomegalovírus e o ligante peptideomimético, descritas pelo programa Ligand Explorer, disponível no banco de dados PDB e as ligações identificadas pelo programa AutoDock após o *re-docking*. De acordo com o resultado, foi possível observar a predição pelo programa AutoDock de quatro das dez ligações hidrogênio exibidas pelo programa Ligand Explorer entre o confômero inicial do peptideomimético e a protease de CMV.

Comparando-se o confômero de menor RMSD obtido após o *re-docking*, com o confômero inicial do cálculo de *docking* molecular (também analisado anteriormente no

Ligand Explorer), ambos no programa AutoDock, o programa identificou 4 das 7 ligações hidrogênio presentes antes do cálculo. Esta quantidade equivale a aproximadamente 57% das ligações hidrogênio identificadas pelo programa AutoDock4.2 no confôrmere inicial (Figura 28).

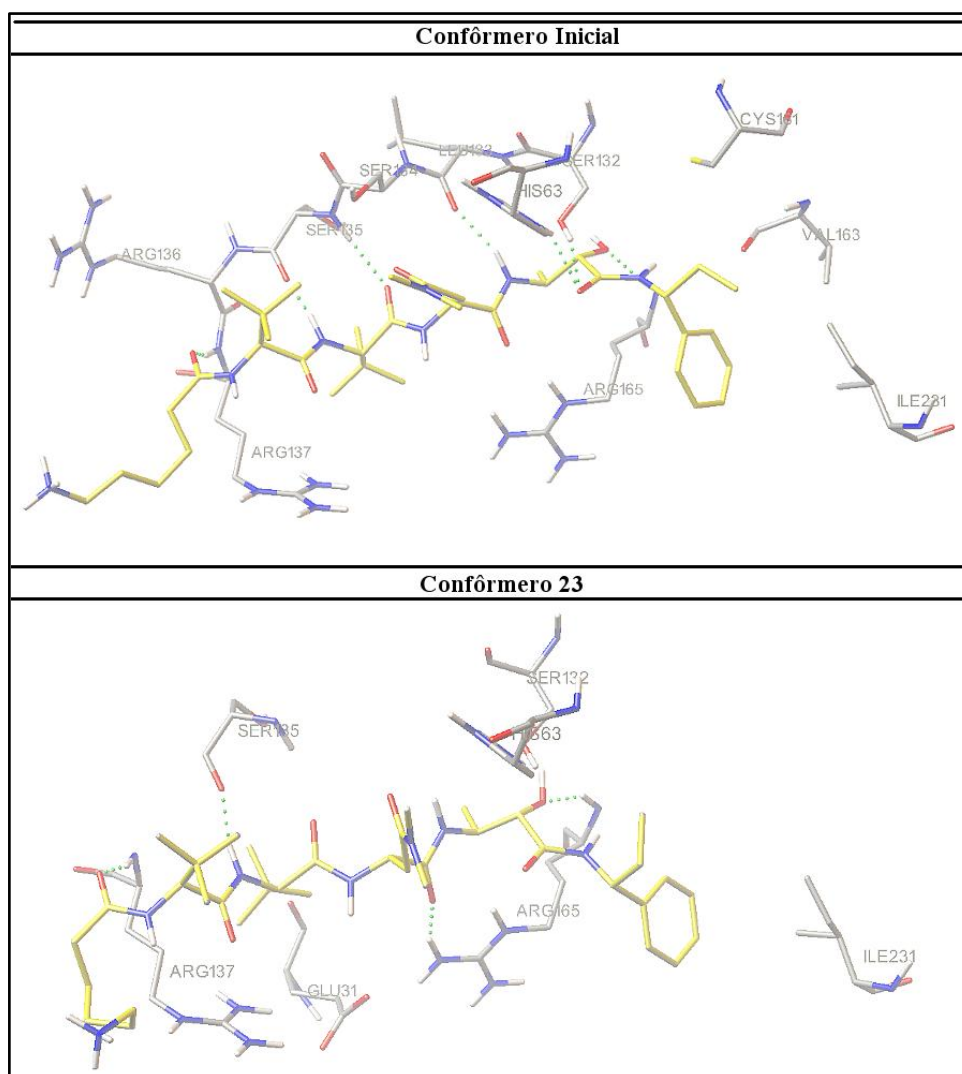


Figura 28: Re-docking do peptidomimético com a protease de CMV. (A) Conformação inicial do docking molecular, (B) Confôrmere 1 do aglomerado 1 e (C) Confôrmere 23 do aglomerado 1. Em verde, ligações hidrogênio.

Tendo em vista os resultados obtidos na validação, os parâmetros demonstrados na Tabela 3 foram selecionados para dar sequência aos estudos de *docking* molecular com as benzoxazinonas. Também foi validado o método de escolha dos aglomerados nos *dockings* subsequentes, em que o melhor aglomerado é o mais populoso e de menor energia.

### 5.3.2 *Docking* Molecular das Benzoxazinonas

As conformações de menor energia dos compostos com cargas eletrostáticas atribuídas, previamente construídos e minimizados através do programa Spartan'10, foram selecionadas para os estudos de *docking* molecular. Os compostos **15**, **16**, **24** e **25** não seguiram este parâmetro, uma vez que as conformações de menor energia não correspondiam à conformações estendidas. De acordo com a literatura, os resultados de *docking* molecular são influenciados pela conformação adotada como inicial para os cálculos, de forma que, quanto mais estendida, menor a energia correspondente às interações intramoleculares (HUEY *et al.*, 2007).

As cadeias principais da porção peptídica do ligante foram imobilizadas conforme descrito na validação da metodologia, mantendo as cadeias laterais e as demais cadeias principais livres para diferentes incrementos conformacionais utilizando o programa AutoDockTools.

Como nem todas as benzoxazinonas possuíam cadeias principais peptídicas, o tratamento das torções da cadeia principal foi feito da seguinte forma: a cadeia principal que na validação permaneceu completamente rígida por ser completamente peptídica, foi imobilizada nas benzoxazinonas apenas em regiões peptídicas deixando a parte da cadeia principal não peptídica, flexível (Figura 29). Sendo assim, os ligantes teriam graus de liberdade maiores, aumentando o número de chances de encontrar conformações corretas.

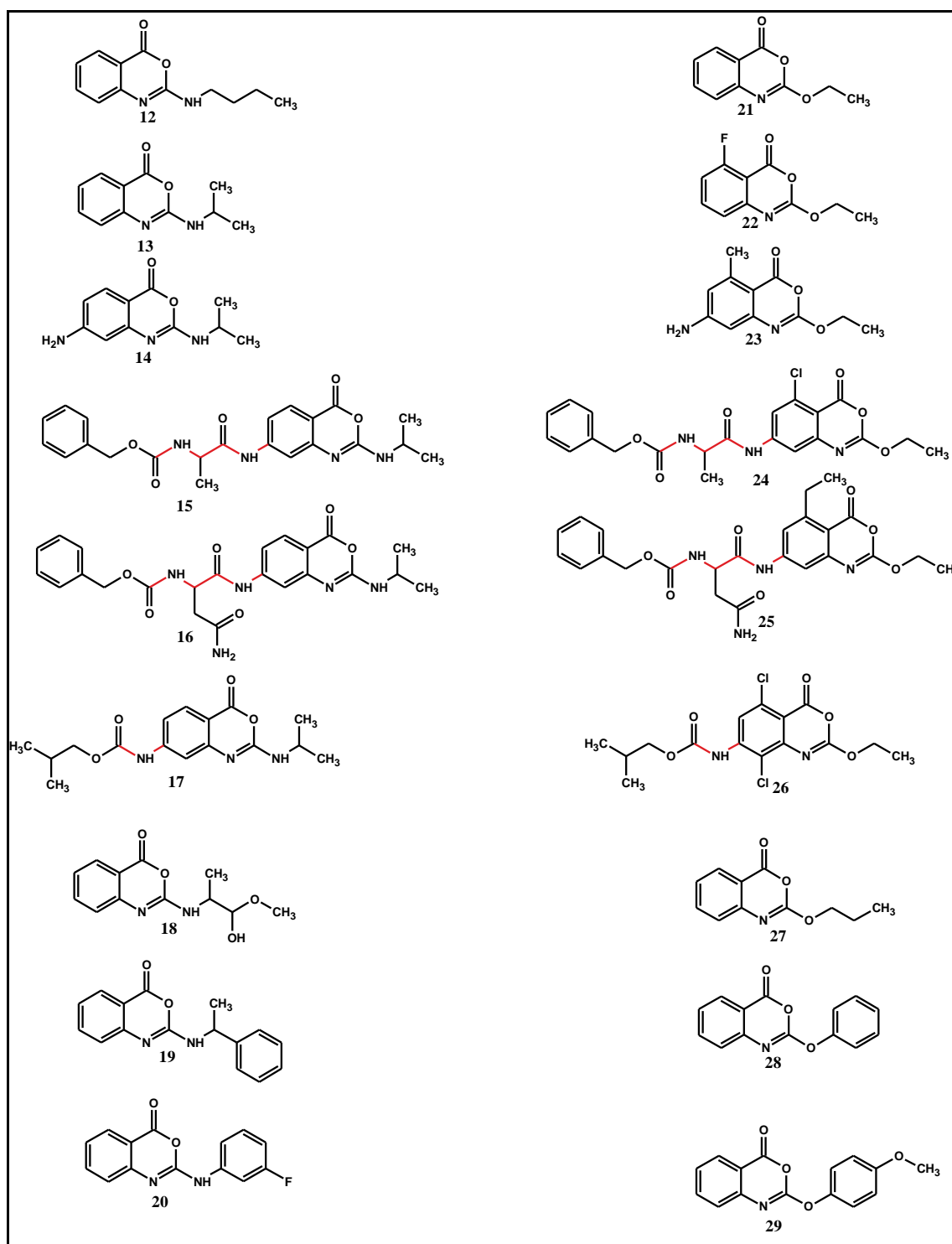


Figura 29: Benzoxazinonas com ligações rígidas em vermelho para estudo de docking molecular.

O modelo utilizado no estudo foi o da protease de HSV-1 gerado através do programa MODELLER, cuja validação está descrita no item 5.1.2.

O mapa de grade de cada ligante benzoxazinona foi gerado no programa AutoGrid4 seguido de *docking* molecular, cujo cálculo foi realizado individualmente para cada



benzoxazinona, através do programa AutoDock4.2. Os resultados encontrados para cada composto das benzoxazinonas encontram-se descritos no APENDICE B. A escolha dos aglomerados foi realizada analisando os resultados do *docking* molecular individualmente, o que evidenciou a presença de confôrmeros coerentes com o mecanismo de ação da enzima em aglomerados menos energéticos, na maioria das análises (compostos **12**, **13**, **14**, **15**, **17**, **18**, **19**, **21**, **22**, **23**, **24**, **25**, **26** e **27**). Os compostos **16** e **29** apresentaram confôrmeros coerentes em aglomerados mais populosos que não eram menos energéticos. Para o composto **28**, que não seguiu nenhuma destas tendências, o confôrmero foi selecionado pela análise de todos os aglomerados resultantes do cálculo, considerando os tipos de interação realizada, comparando com dados da literatura. As interações que foram consideradas mais relevantes já foram discutidas no item 1.5.

### 5.3.3 Método de análise do *docking* molecular

Os derivados dos dois grupos de benzoxazinonas foram analisadas baseando-se nos resultados obtidos através do SAR dos compostos. Para tal, foram avaliadas todos os compostos e os resultados obtidos foram comparados com os resultados vistos através do SAR. (mais detalhes no item 5.2).

### 5.3.4 *Docking* molecular do composto **26**

O composto **26** é o mais ativo da série de benzoxazinonas. Sendo assim, as interações apresentadas por este ligante e dados descritos na literatura foram utilizados como base para avaliação dos *dockings* seguintes.

Os resultados mostraram que ocorre possivelmente uma ligação hidrogênio importante entre o átomo de oxigênio da carbonila amídica presente na cadeia lateral do composto **26** e a Ser129 da protease de HSV-1 com distância de 3,0 Å (Figura 30). A existência desta interação pode indicar um dos motivos pelo qual o composto **26** se apresenta como mais ativo, em que a proximidade da carbonila em relação ao resíduo Ser129 poderia ser suficiente para a formação de uma ligação covalente, através do ataque nucleofílico da Ser129 à carbonila da amida do inibidor, conforme o mecanismo proposto na literatura (JARVEST *et al.*, 1996).

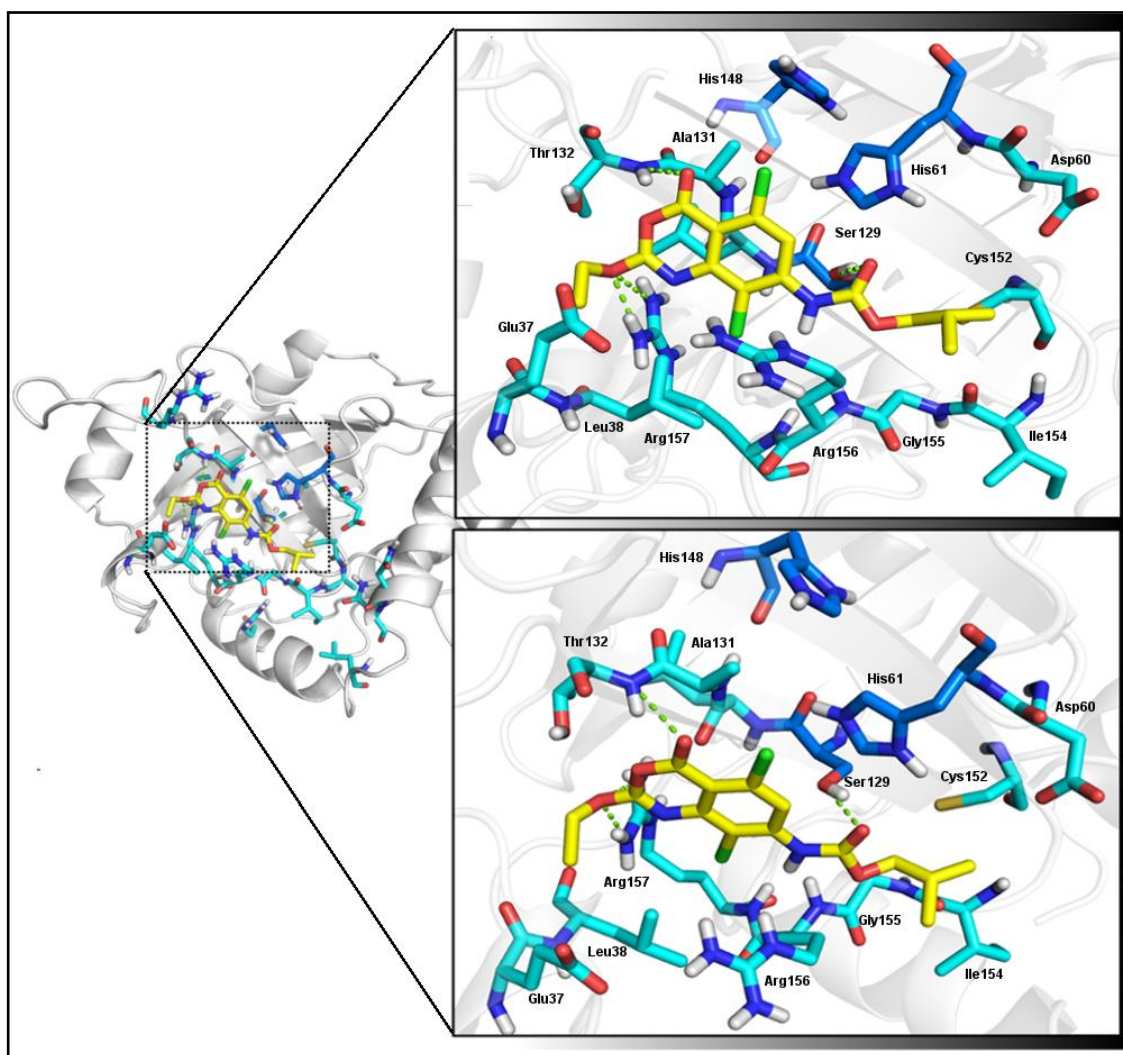


Figura 30: *Docking* molecular do composto **26** (amarelo), o mais ativo da série de benzoxazinonas, e resíduos de aminoácidos proximais (azul claro) com destaque para a tríade catalítica (azul escuro). As ligações hidrogênio estão ilustradas por linhas pontilhadas em verde.

Duas ligações hidrogênio entre o resíduo de Arg157 e o átomo de oxigênio do grupamento éter da cadeia lateral com distâncias de 3,1 Å e 2,9 Å, respectivamente, também foram observadas (Figura 30). Este resíduo desempenha um papel importante na atividade catalítica da protease de HSV-1 onde, ao formar as ligações hidrogênio, é provável que o resíduo se encontre menos disponível para interagir com outros resíduos vizinhos, reduzindo sua contribuição para a atividade catalítica da protease (LIANG *et al.*, 1998).

As análises do *docking* molecular ainda mostraram uma ligação hidrogênio entre o átomo de oxigênio do anel da amino-benzoxazinona **26** e o resíduo Thr132, com distância de 3,2 Å, além de interações de van der Waals que ocorrem quando um dos átomos de cloro está orientado em direção às cavidades hidrofóbicas formada pelos resíduos Leu27, Ala28, Leu38,

Ala39, Val28, Leu130, Ala131, Ala150, Leu151, Ile154, Gly155, Leu158 e Gly159, aminoácidos de característica hidrofóbica (Figura 31). Como a tríade catalítica e as cavidades vizinhas são bastante expostas ao solvente, é possível que estas interações hidrofóbicas estejam contribuindo para a redução da entalpia do sistema, minimizando a exposição de resíduos de característica hidrofóbica ao meio fisiológico de característica hidrofílica, através da dessolvatação destes aminoácidos. Não obstante, esta interação pode ocasionar o aumento da entropia do sistema devido à formação do agregado ligante-receptor que promove redução da área hidrofóbica exposta tanto do ligante, quanto do receptor. Assim, é possível que haja aumento da entropia que, associado à perda entálpica, diminui a energia livre de ligação do complexo.

Estas evidências sugerem a contribuição destas interações na estabilização do ligante na cavidade, que contribuem para a atividade inibitória deste composto. A presença do conjunto de interações vistas através do estudo de *docking* molecular do composto **26** corrobora o mecanismo proposto para as benzoxazinonas e o dado referente à atividade encontrado na literatura (JARVEST *et al.*, 1996).

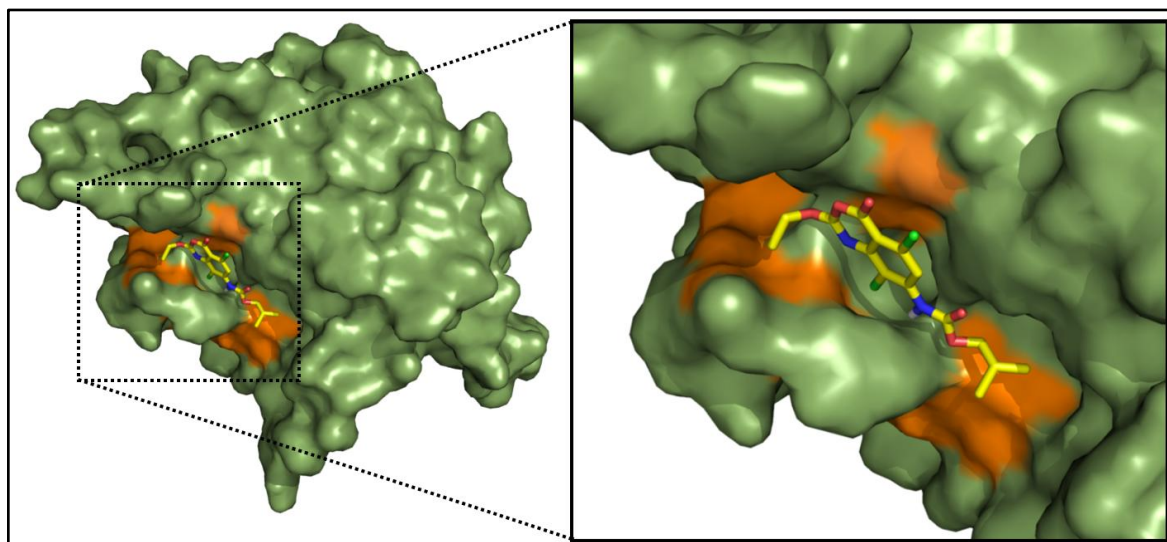


Figura 31: Composto **26** (amarelo) na superfície da protease (verde), após o *docking* molecular. Em laranja, resíduos com característica hidrofóbica da cavidade.

O complexo formado pela protease de HSV-1 e a benzoxazinona **26** também foi analisado utilizando o servidor PoseView, cujo resultado foi comparado ao resultado da Figura 30. Este servidor considera como parâmetros para a formação de ligações hidrogênio entre átomos numa distância ótima de (1,4 - 2,4 Å) e um ângulo de no mínimo 120°

(STIERAND & RAREY, 2010). Apesar de possuir parâmetros para a geração dos modelos de interação, este servidor não fornece as distâncias nem ângulos de cada ligação formada.

De acordo com a Figura 32 é possível observar a ocorrência de outras três ligações hidrogênio entre o composto **26** e a protease de HSV-1. Uma destas interações ocorre entre o átomo de nitrogênio presente no resíduo Thr132 e o grupamento carbonila presente no anel da benzoxazinona. A outra, entre o grupamento hidroxila deste mesmo aminoácido com o átomo de oxigênio presente na cadeia lateral do ligante. A terceira interação encontrada ocorre entre a His61 e a carbonila presente na cadeia lateral do composto **26**. Não existem evidências na literatura que indiquem a importância do resíduo Thr132 na atividade catalítica da protease de HSV-1, porém já foi relatada a importância do resíduo His61 (HOOG *et al.*, 1997). As interações existentes entre o ligante e o resíduo Thr132 podem contribuir para estabilizar ainda mais o ligante na cavidade, em contrapartida a interação com o resíduo His61 não só estabilizaria o ligante, mas também impediria a estabilização do intermediário formado durante a autoclivagem da protease de HSV-1.

Apesar destas interações não serem ilustradas na Figura 32, é provável que outras ligações hidrogênio se formem após pequenos ajustes torcionais, uma vez que o composto **26** em questão se trata apenas de uma das conformações possíveis de baixa energia encontradas através do cálculo do programa AutoDock4.2.

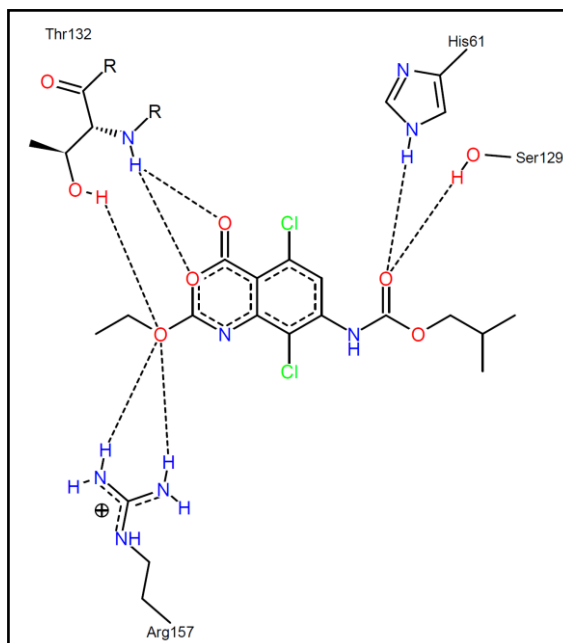


Figura 32: Análise das interações entre o composto **26** e a protease de HSV-1 através do servidor Pose View. As possíveis ligações hidrogênio são indicadas por linhas pontilhadas pretas.

### 5.3.5 Docking molecular das demais benzoxazinonas

A análise de *docking* das benzoxazinonas **12-25** e **27-29** compostos foi realizada para verificar se as interações apresentadas no estudo de *docking* seguem o mesmo perfil e se podem ser relacionadas com as interações mostradas para o composto **26**.

O ligante **29**, o segundo mais ativo do grupo com  $IC_{50}$  de 2,5  $\mu$ M, participa de ligação hidrogênio com o átomo de nitrogênio dos resíduos Thr132, Arg156 e Arg157, cujas distâncias são de 3,4, 2,9 e 3,1 Å, respectivamente (Figura 33). Estas duas últimas ligações hidrogênio parecem contribuir para a atividade, uma vez que o composto **29** não realiza nenhuma ligação hidrogênio com a Ser129, e que há evidências na literatura que indicam a importância do resíduo Arg157.

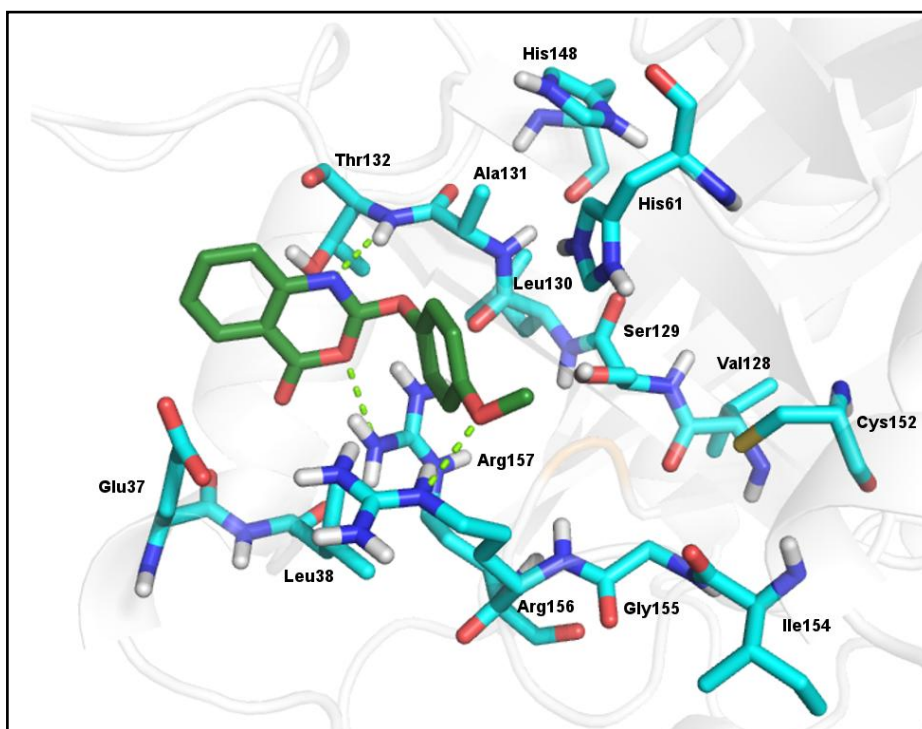


Figura 33: *Docking* molecular do composto **29** (verde) da série de benzoxazinonas e ligações hidrogênio (verde) com resíduos da protease de HSV-1 (azul claro).

Os resultados de *docking* molecular do composto **15** mostrou que o mesmo realiza ligações hidrogênio com o átomo de nitrogênio presente na cadeia lateral do resíduo Arg157 e com o átomo de oxigênio da cadeia lateral do resíduo Glu37, com distâncias de 3,0 e 2,7 Å, respectivamente (Figura 34). A menor atividade do composto **15** em relação ao composto **29** parece estar relacionada à ausência da ligação hidrogênio com o resíduo Arg156, cuja contribuição para a autoclivagem da protease de HSV-1 não deve ser descartada mesmo



existindo evidências da maior contribuição do resíduo Arg157. Além destas interações, a existência de uma ligação hidrogênio com o resíduo Glu37 indica um possível mecanismo de estabilização do ligante no sítio ativo.

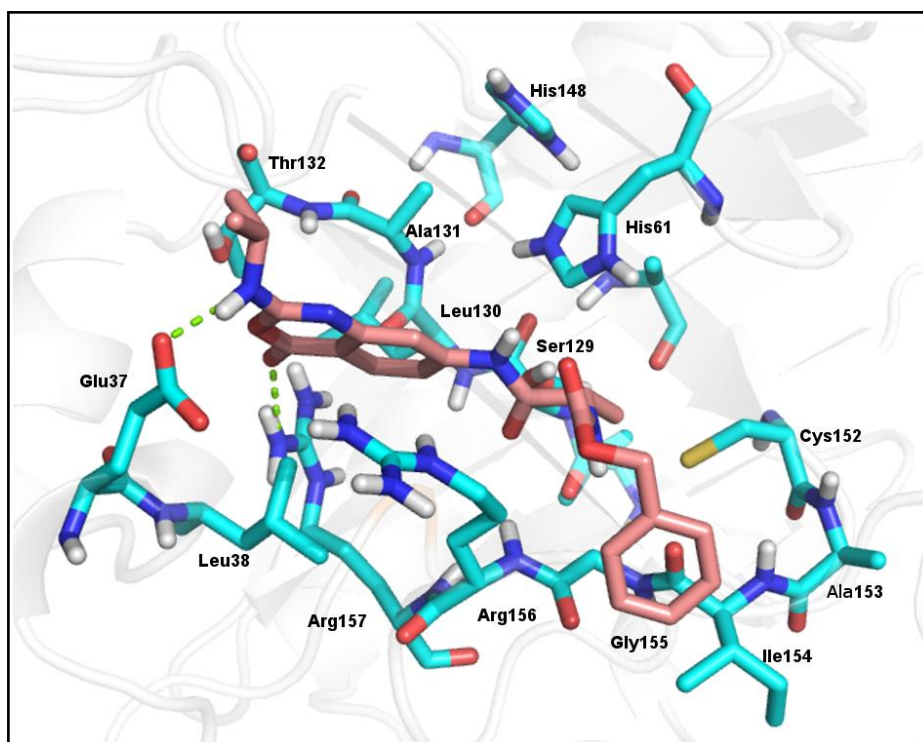


Figura 34: *Docking* molecular do composto **15** (rosa) da série de benzoxazinonas e ligações hidrogênio (verde) com resíduos da protease de HSV-1 (azul claro).

Apesar da semelhança estrutural entre os compostos **15** e **24**, este último apresentou-se deslocado no sítio ativo da protease de HSV-1 (Figura 35). Sugere-se que esta diferença está relacionada à presença do átomo de oxigênio da cadeia lateral, um aceptor de hidrogênio que estaria emparelhado com outro átomo de oxigênio de característica aceptor presente no resíduo Glu37. Outra justificativa é a possível repulsão de elétrons dos átomos de oxigênio do resíduo Glu37 e da cadeia lateral do ligante. Além disso, a interação com o resíduo Arg157, parece estar relacionada com a maior atividade inibitória do composto **15** em relação ao composto **24**. Sendo assim, as possíveis justificativas para o valor baixo de  $IC_{50}$  do composto **24** ( $7 \mu\text{M}$ ) seriam: a presença da ligação hidrogênio entre o ligante e o átomo de nitrogênio do resíduo Arg156 (distância de  $3,1 \text{ \AA}$ ); a ocorrência de uma interação do tipo cátion- $\pi$  entre o grupo -CH polarizado do resíduo Arg157 e o anel aromático presente na cadeia lateral da benzoxazinona; a presença da ligação hidrogênio com o átomo de nitrogênio do resíduo da tríade catalítica His148 (distância de  $2,9 \text{ \AA}$ ). É importante destacar neste caso, que a interação

do tipo cátion- $\pi$  é uma interação fraca, apesar da distância de 3,2 Å ser considerada curta, entretanto há alguns dados da literatura que indicam a importância da contribuição deste tipo de interação para a atividade de alguns compostos (MO *et al.*, 2002; SALONEN *et al.*, 2009). Em relação ao resíduo da tríade catalítica His148, dados da literatura indicam uma contribuição maior da His61 em relação à His148 para a atividade catalítica da protease (WELCH *et al.*, 1993; REGISTER & SHAFER, 1997), o que reafirma o dado de atividade do composto **24** em relação aos anteriormente descritos (Figura 35).

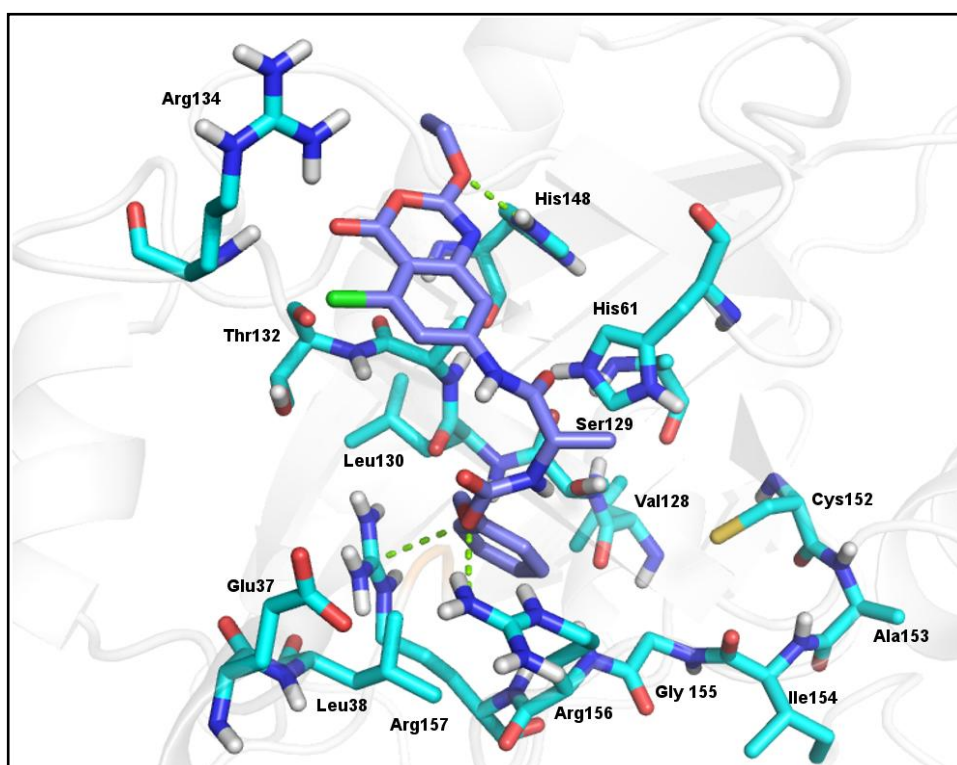


Figura 35: *Docking* molecular do composto **24** (azul escuro) da série de benzoxazinonas e ligações hidrogênio (verde) com resíduos da protease de HSV-1 (azul claro).

A importância da contribuição da interação com o resíduo Arg157 pode ser reforçada na análise do *docking* molecular do composto **28** (Figura 36), que apresenta uma ligação hidrogênio de 3,0Å de distância entre o átomo de oxigênio do composto **28** e o átomo de nitrogênio desse resíduo. Outra ligação hidrogênio entre o resíduo Thr132 e o ligante com distância de 2,8 Å, parecem contribuir para a estabilização do mesmo na cavidade (Figura 36). Embora a estrutura do composto **28** seja semelhante à estrutura do composto **29** (atividade de 10  $\mu\text{M}$  e 2,5  $\mu\text{M}$ , respectivamente), o último apresenta uma ligação hidrogênio extra com o resíduo Arg156 indicando uma possível contribuição desta ligação no aumento da atividade.

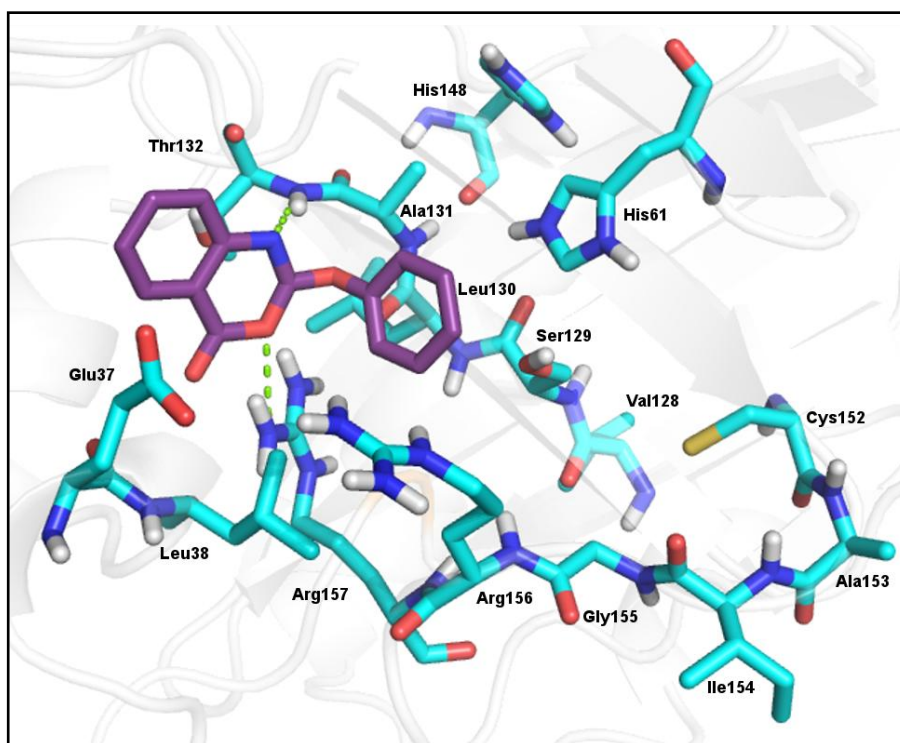


Figura 36: Representação do complexo obtido por docking molecular do composto **28** (roxo) da série de benzoxazinonas. Em destaque, as ligações hidrogênio (em verde) do composto **28** com resíduos da protease de HSV-1 (azul claro).

Outra característica que parece importante para a atividade das benzoxazinonas é o volume dos substituintes. O posicionamento dos ligantes no sítio ativo da protease de HSV-1 apresenta relação com o tamanho dos substituintes dos mesmos, visto que cadeias muito volumosas não permitem que o ligante adote o mesmo posicionamento do ligante **26**, o mais ativo da série. Para ligantes como o composto **24**, este fator exerce uma influência a atividade de forma negativa uma vez que esse derivado possui um grupamento carbonila semelhante àquela presente no composto **26**. Essa carbonila estaria sujeita ao ataque nucleofílico do átomo de oxigênio da Ser129, porém a mesma apresenta ângulo desfavorável à reação (99,3°). Foi realizada uma análise no servidor CASTp (*Computed Atlas of Surface and Topography of proteins*), que faz uma estimativa do volume e área das cavidades de proteínas, através da tentativa de inserção de esferas com raio de 1,4 Å. Essa análise comprovou a limitação do volume dos substituintes.

A análise do tamanho do mapa de grade gerado no processo de *docking* também não deve ser descartada, uma vez que o mesmo limita o espaço da busca conformacional do ligante. Em contrapartida, o aumento do mapa de grade pode não modificar o perfil das



interações dos ligantes volumosos. Sugere-se que a baixa atividade dos compostos **25** e **16**, em relação aos cinco mais ativos, estejam relacionados ao volume das cadeias laterais.

Apesar dos compostos **25** e **16** não exibirem o mesmo perfil de interações dos ligantes mais ativos, eles também interagem por ligações hidrogênio com outros resíduos. O resíduo Lys133 interage com o oxigênio do grupamento carbonila do anel da benzoxazinona **25** com distância de 2,7 Å, estabilizando o ligante na cavidade (Figura 37). Dados da literatura já evidenciaram a ocorrência deste tipo de interação entre o ligante peptidomimético utilizado na etapa de validação de *docking* e a protease de CMV (KHAYAT *et al.*, 2003). De acordo com o *docking* molecular desse composto, também pode ser observada uma interação do tipo cátion- $\pi$ , em uma distância de 3,3 Å com o anel aromático fenila da cadeia lateral do ligante com o carbono polarizado do resíduo Arg157 presente na protease (Figura 37). Essa última interação pode desempenhar um papel importante na atividade ( $IC_{50} = 20\mu M$ ) desse ligante, uma vez que já foi discutida a importância desse resíduo para a atividade catalítica da protease de HSV-1. A fenila da cadeia lateral do ligante ainda participa da interação hidrofóbica com os resíduos da cavidade hidrofóbica, contribuindo para a redução da energia livre de ligação.

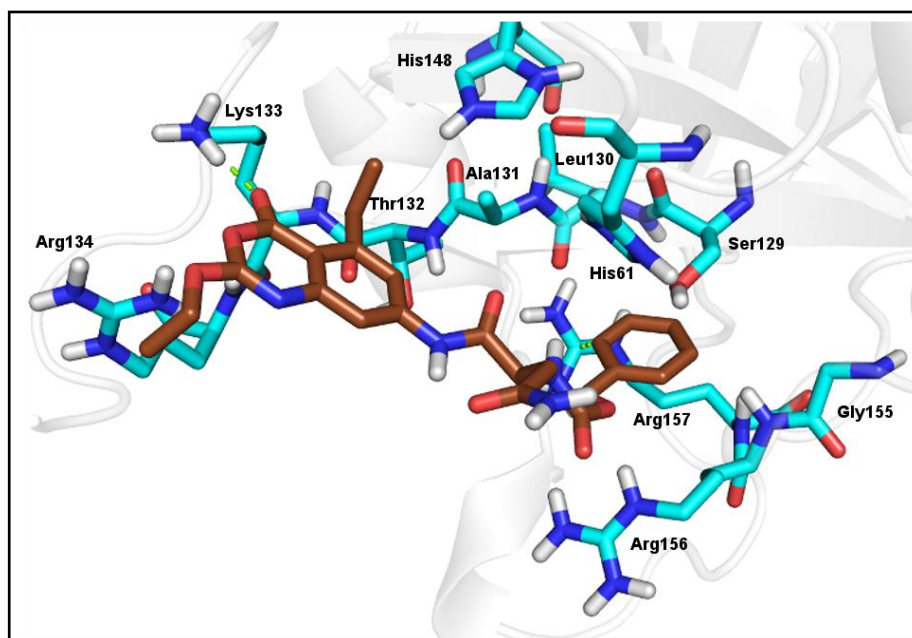


Figura 37: Representação do complexo obtido por *docking* molecular do composto **25** (marrom) da série de benzoxazinonas. Em destaque, as ligações hidrogênio (em verde) do composto **25** com resíduos da protease de HSV-1 (azul claro).

O ligante **16**, que também possui cadeia lateral volumosa, apresenta duas interações com resíduos da protease de HSV-1 também observadas para o ligante **25**, uma interação do

tipo cátion- $\pi$  entre o anel fenila e a Arg157 com distância de 3,1 Å e uma ligação hidrogênio entre o átomo de oxigênio da carbonila da cadeia lateral e a Lys133, com distância de 2,8 Å (Figura 38). A distância da interação cátion- $\pi$  do anel aromático com o resíduo Arg157 parece ter influência na atividade uma vez que, o composto **16** participa dessa interação com uma distância menor do que o composto **25** (distâncias de 3,1 Å e 3,3 Å, respectivamente).

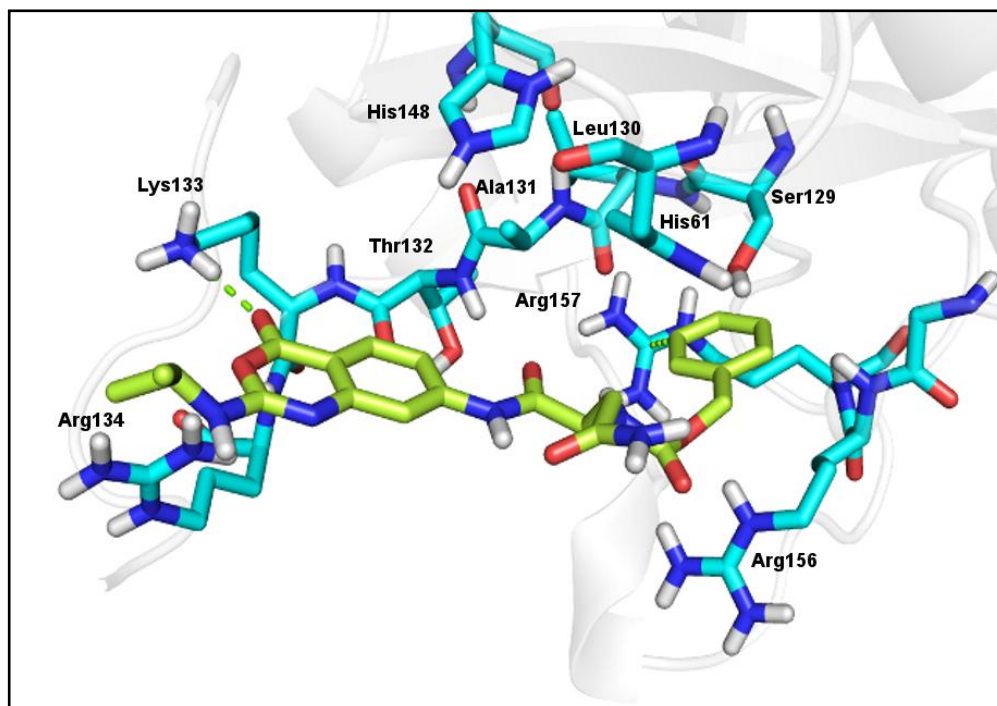


Figura 38: Representação do complexo obtido por *docking* molecular do composto **16** (verde) da série de benzoxazinonas. Em destaque, as ligações hidrogênio (em verde) do composto **16** com resíduos da protease de HSV-1 (azul claro).

Ligantes pouco volumosos com atividade média apresentam posicionamentos semelhantes na superfície da protease de HSV-1, variando apenas os tipos de interações e a direção do anel benzoxazinona. As oxi-benzoxazinonas **23**, **27** e **21**, ( $IC_{50} = 15 \mu\text{M}$ ,  $15 \mu\text{M}$  e  $25 \mu\text{M}$  respectivamente) apresentaram posicionamento bastante parecido, além do número de ligações hidrogênio (duas) em comum para cada composto. Os três compostos realizam pelo menos uma ligação hidrogênio com o resíduo Arg156, importante para a atividade catalítica da protease de HSV-1 (Figura 39). O composto **23** apresenta uma ligação de hidrogênio com esse resíduo de aminoácido com distância de 1,8 Å. O composto **27** apresenta uma ligação hidrogênio entre o átomo de oxigênio do grupo alcoxi e o átomo de nitrogênio do grupo amino do resíduo Arg156 (distância 3,3 Å) e outra entre o átomo de nitrogênio do anel da benzoxazinona e o grupo amino do resíduo Arg156 (distância 3,1 Å). O composto **21** interage com esse resíduo através de uma ligação hidrogênio entre o átomo de oxigênio do

grupamento alcoxi e o grupo amino do resíduo Arg156 (distância 3,3 Å) e outra entre o átomo de nitrogênio do anel da benzoxazinona e o grupo amino do resíduo Arg156 (distância 3,0 Å) (Figura 39).

Apesar dos compostos **23** e **27** apresentarem a mesma atividade, uma das interações observadas no *docking* molecular é diferente, em que o oxigênio do grupamento carbonila presente no anel benzoxazinona do composto **23** faz uma ligação hidrogênio com o resíduo Thr132 (d=3,1 Å), também observada nos compostos mais ativos, e o oxigênio da cadeia lateral da benzoxazinona **27** realiza outra ligação hidrogênio com o átomo de nitrogênio do resíduo Arg156 com distância de 3,3 Å (Figura 39). Ainda que este resíduo seja de grande importância para a atividade catalítica, outro aspecto interessante parece influenciar a atividade. O composto **21** apresenta as mesmas interações com o resíduo Arg156 observadas para o composto **27**, apesar de ser menos ativo. A atividade maior do composto **27** pode estar associada à presença de um carbono a mais na cadeia lateral, que através de interações hidrofóbicas nesta região estabiliza ainda mais o ligante na cavidade.

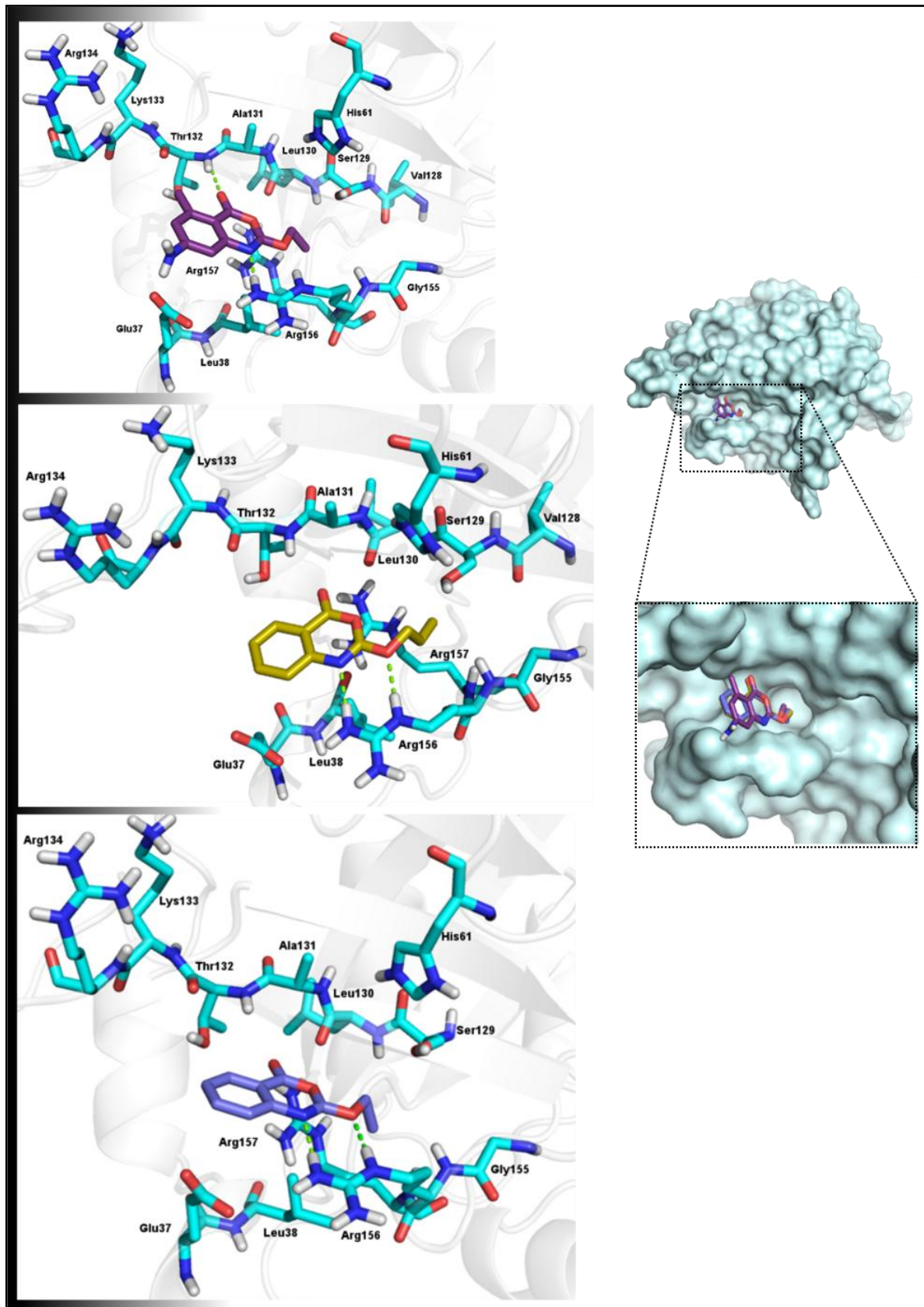


Figura 39: *Docking* molecular das moléculas **23** (roxo), **27** (amarelo), **21** (azul escuro) da série de benzoxazinonas e ligações hidrogênio (verde) com resíduos da protease de HSV-1 (azul claro). À direita, posicionamento dos compostos **23**, **27** e **21** na superfície da protease de HSV-1.

O *docking* molecular do composto **13** evidencia a importância da interação hidrofóbica nesta região novamente pela orientação do anel aromático no sentido da cavidade hidrofóbica. Apesar deste composto ser pouco volumoso, a cadeia principal orienta-se em direção oposta aos outros ligantes de atividade média e pouco volumosos, realizando uma ligação hidrogênio entre o oxigênio da carbonila presente no anel da benzoxazinona e o resíduo Thr132 com distância de 2,9 Å e uma interação do tipo cátion- $\pi$  (distância de 3,4 Å) entre o anel aromático da cadeia principal e o átomo de carbono polarizado presente no resíduo Arg157 (Figura 40). Esta última interação parece contribuir para a atividade ( $IC_{50}=25 \mu M$ ) desse composto, sendo uma interação de caráter fraco apesar da importância do resíduo.

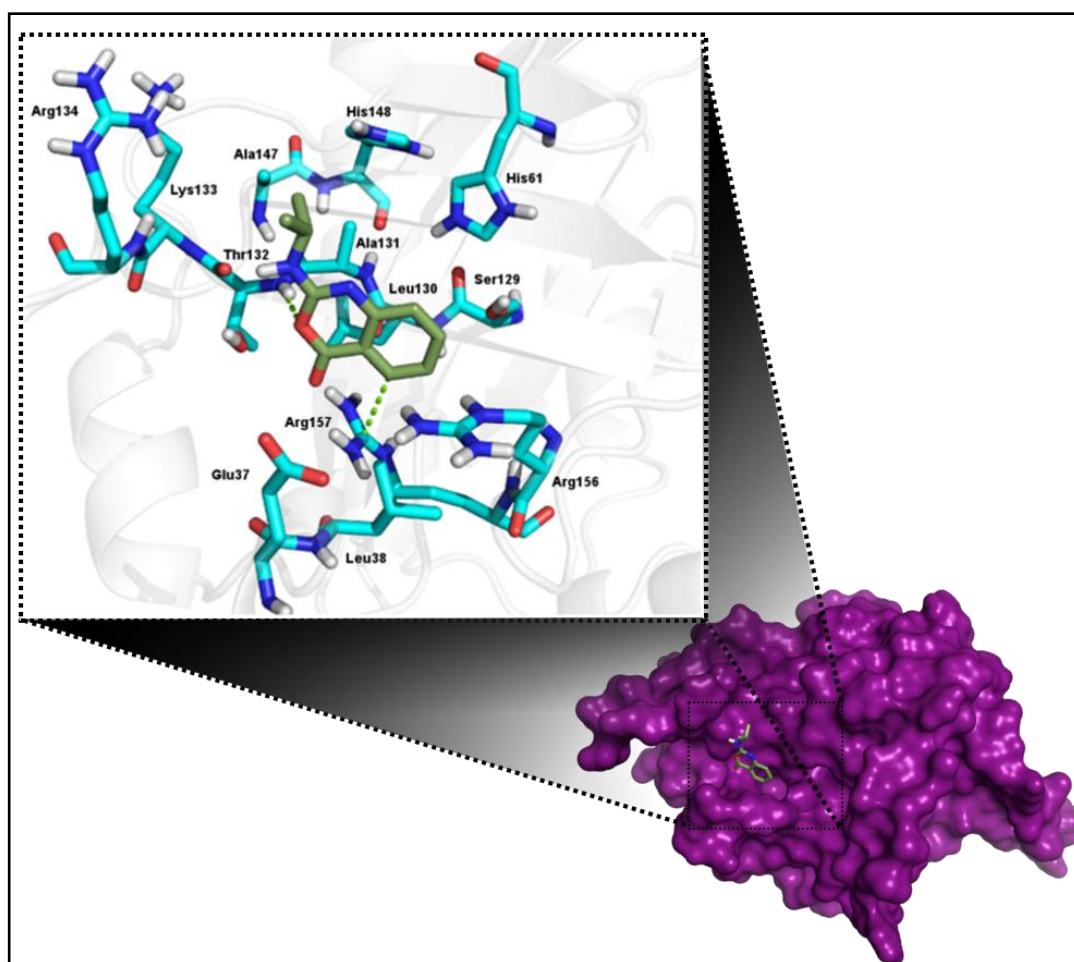


Figura 40: Composto **13** (verde) na superfície da protease de HSV-1 após *docking* molecular (acima). Docking molecular da molécula **13** da série de benzoxazinonas e ligações hidrogênio (verde) com resíduos da protease de HSV-1 (azul claro) (abaixo).



As interações encontradas e o posicionamento do composto **18**, novamente demonstram a importância da orientação do grupo hidrofóbico. Apesar deste composto ser uma aminobenzoxazinona, o anel benzoxazinona se apresenta na mesma direção das oxibenzoxazinonas de média atividade pouco volumosas. Sugere-se que as duas ligações hidrogênio entre o resíduo Arg156 e o oxigênio da hidroxila presente na cadeia lateral (2,8 Å) e aquele ligado à metila (3,0 Å), e a interação hidrofóbica entre o grupamento metila da cadeia lateral e os resíduos das cavidades hidrofóbicas (Leu27, Ala28, Leu38, Ala39, Val28, Leu130, Ala131, Ala150, Leu151, Ile154, Gly155, Leu158 e Gly159) (Figura 41), sejam importantes para a orientação e conformação do ligante no sítio de ligação. Ainda, é importante destacar que as interações realizadas por este composto são as mesmas interações vistas para o composto **26** que apresenta atividade maior que o composto **18** ( $IC_{50}=25 \mu M$ ). A presença dos grupos amino e oxi das benzoxazinonas devem contribuir para o aumento ou redução das atividades, o que pode ser observado ao analisar as atividades biológicas dos dois grupos de benzoxazinonas. O grupo das oxibenzoxazinonas apresenta compostos com atividades melhores que os compostos pertencentes ao grupo das amino-benzoxazinonas.

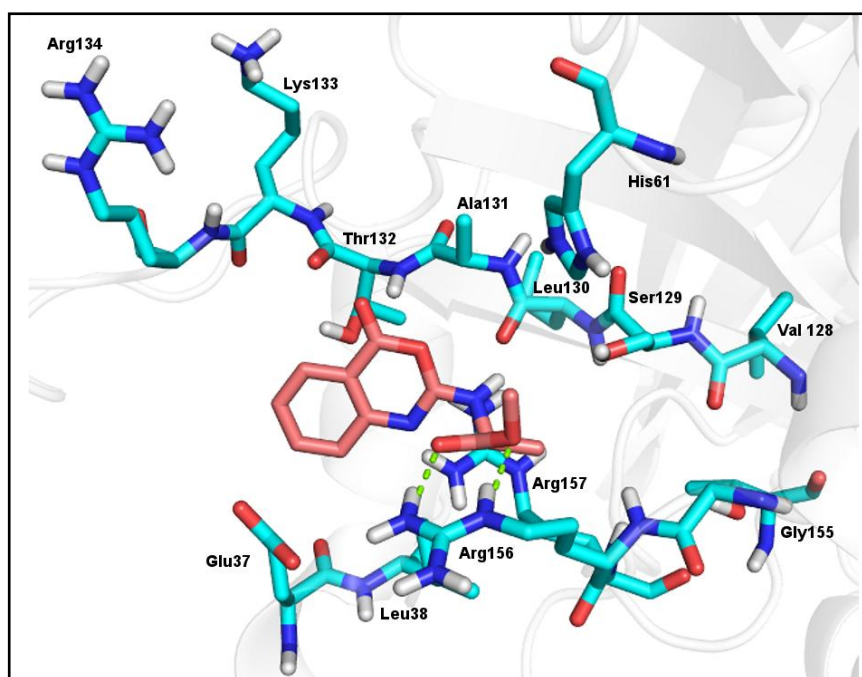


Figura 41: Representação do complexo obtido por *docking* molecular do composto **18** (rosa) da série de benzoxazinonas. Em destaque, as ligações hidrogênio (em verde) do composto **18** com resíduos da protease de HSV-1 (azul claro).

No grupo dos ligantes com baixa atividade (cor laranja Tabela 4) o *docking* molecular mostrou a presença de poucas ligações hidrogênio. Para o composto **17**, é possível observar a formação de uma ligação hidrogênio entre o oxigênio do anel da benzoxazinona e o

nitrogênio no resíduo Thr132 com distância de 2,8 Å e outra ligação hidrogênio entre o oxigênio da carbonila presente no anel da benzoxazinona e o átomo de nitrogênio do resíduo Arg157 com distância de 2,7 Å (Figura 42).

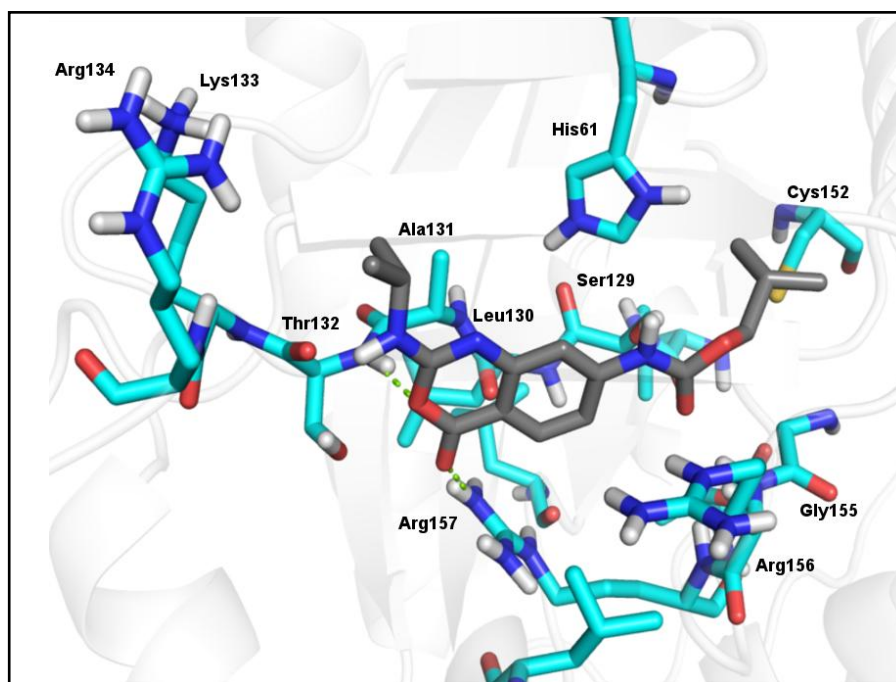


Figura 42: Representação do complexo obtido por *docking* molecular do composto **17** (cinza) da série de benzoxazinonas. Em destaque, as ligações hidrogênio (em verde) do composto **17** com resíduos da protease de HSV-1 (azul claro).

Apesar do composto **17** possuir uma estrutura semelhante ao composto **26**, o valor de atividade para esse composto é de 50  $\mu$ M. Essa diferença nos valores de atividade pode estar relacionada com o número de ligações hidrogênio formadas (duas) do composto **17** em comparação com quatro do composto **26** com a protease de HSV-1. Analisando-se de forma mais detalhada essas ligações formadas, é possível observar a ocorrência de apenas uma ligação hidrogênio entre o composto **17** e o resíduo Arg157 e duas ligações entre o composto **26** e esse mesmo resíduo. Conforme já foi descrito anteriormente (HOOG *et al.*, 1997), o resíduo Arg157 possui influência sobre a atividade da protease de HSV-1. Além disso, para o composto **17**, não há ligação hidrogênio com o resíduo Ser129, apesar de possuir a mesma cadeia lateral onde ocorre a interação para o composto **25**. Outro fator que pode influenciar a diferença nos valores de atividade dos compostos **17** e **26**, é o fato do primeiro ser uma amino- e o último uma oxi-benzoxazinona, o que corrobora o estudo de SAR, que indicou melhores valores de atividade para o grupo das oxi-benzoxazinonas. De acordo com a Figura 43, observa-se que o posicionamento do composto **17** na cavidade é diferente do

composto **26**, cuja estrutura molecular é semelhante. De acordo com o estudo de SAR constatou-se que o grupo amino poderia atuar tanto como doador como acceptor de hidrogênio enquanto o átomo de oxigênio presente no grupo oxi, atuaria apenas como acceptor. A proximidade do grupo oxi do resíduo Arg157 satisfaz dois grupos aminos, que são doadores de ligação hidrogênio, o que poderia não ocorrer na presença do grupo amino, cuja atuação é como doador ou acceptor de hidrogênio. A possível não satisfação do grupo doador da Arg157 pelo grupamento amino do composto **17**, pode gerar confôrmeros cuja energia é elevada e com orientação diferente do composto **26**. Dessa forma, não ocorre a interação com o resíduo Ser129, uma vez que o confôrmero gerado além de encontrar-se deslocado, também apresenta o átomo de oxigênio orientado em sentido oposto.

A interação hidrofóbica entre o átomo de cloro e a cavidade hidrofóbica observada para o composto **26** não está presente no composto **17** que não possui o substituinte cloro na mesma posição. A ausência desta interação também pode estar relacionada com o ganho energético da molécula **17**. Apesar disto, uma interação que parece compensar o ganho de energia deste composto é a interação hidrofóbica que foi observada entre o anel aromático da benzoxazinona e a cavidade de característica hidrofóbica (já observada anteriormente para outros compostos da série).



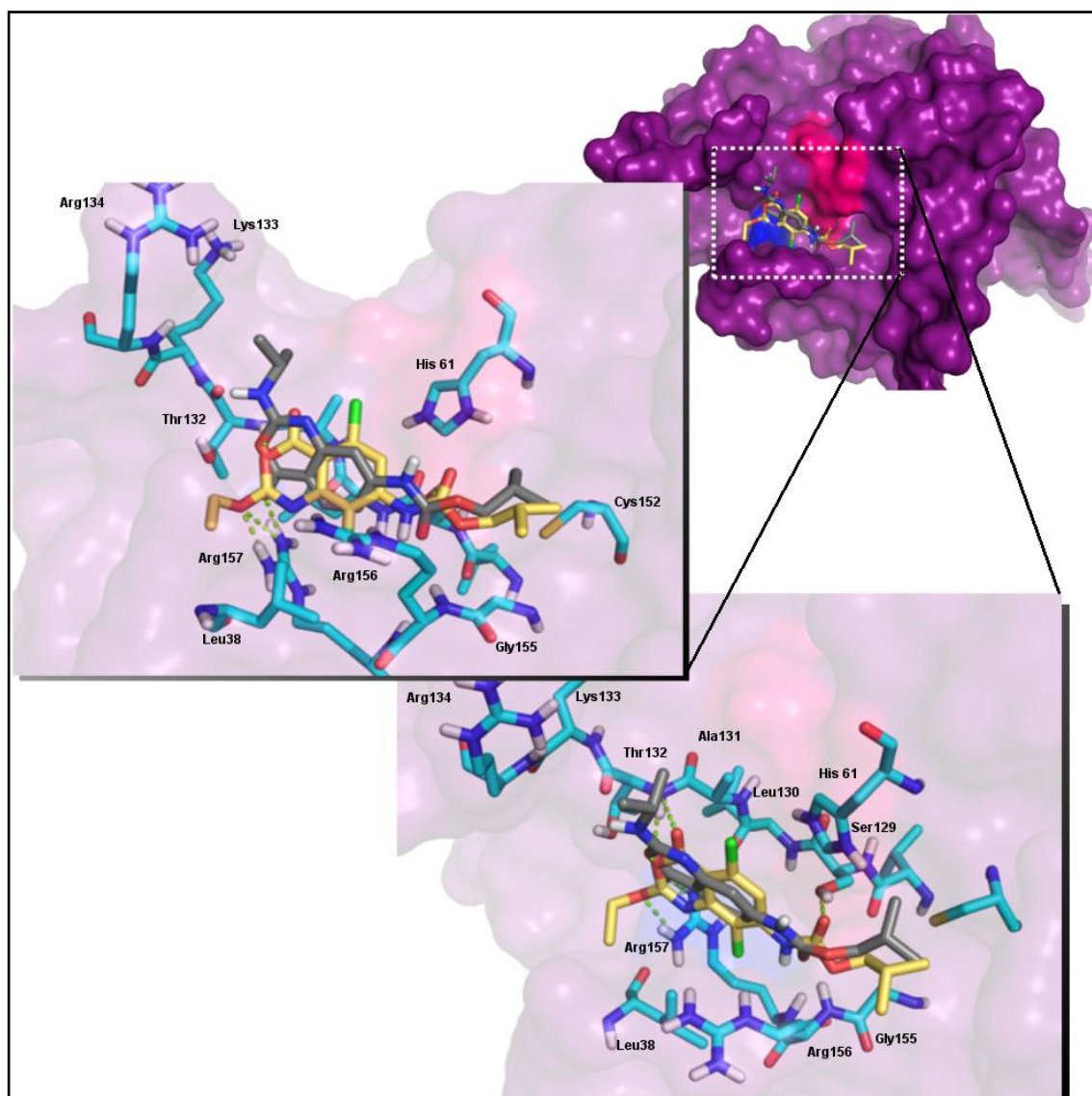


Figura 43: Comparação entre os confôrmeros dos compostos **17** (cinza) e **26** (amarelo) e suas ligações hidrogênio (verde).

Analisando-se os resultados do composto **14**, novamente são observadas apenas duas ligações hidrogênio, uma entre o átomo de oxigênio do resíduo Thr132 e o átomo de nitrogênio presente no substituinte R<sub>2</sub>, com distância de 2,7 Å. A outra ocorre entre o oxigênio do anel da benzoxazinona e o nitrogênio do resíduo Arg156 com distância de 3,0 Å (Figura 44). Comparando-se as atividades dos compostos **14** e **13**, (IC<sub>50</sub>=55µM e 2,5µM, respectivamente), nota-se uma diminuição da atividade do composto **14** em relação ao composto **13**, provavelmente relacionada com a interação cátion-π entre o carbono polarizado deste composto e o resíduo Arg157, cuja importância superior em relação ao resíduo Arg156 já se encontra descrita na literatura (HOOG *et al.*, 1997). O composto **14**, além das ligações

hidrogênio, também participa da interação hidrofóbica entre o grupamento iso-propila presente no substituinte  $R_1$  com os resíduos hidrofóbicos existentes nesta região.

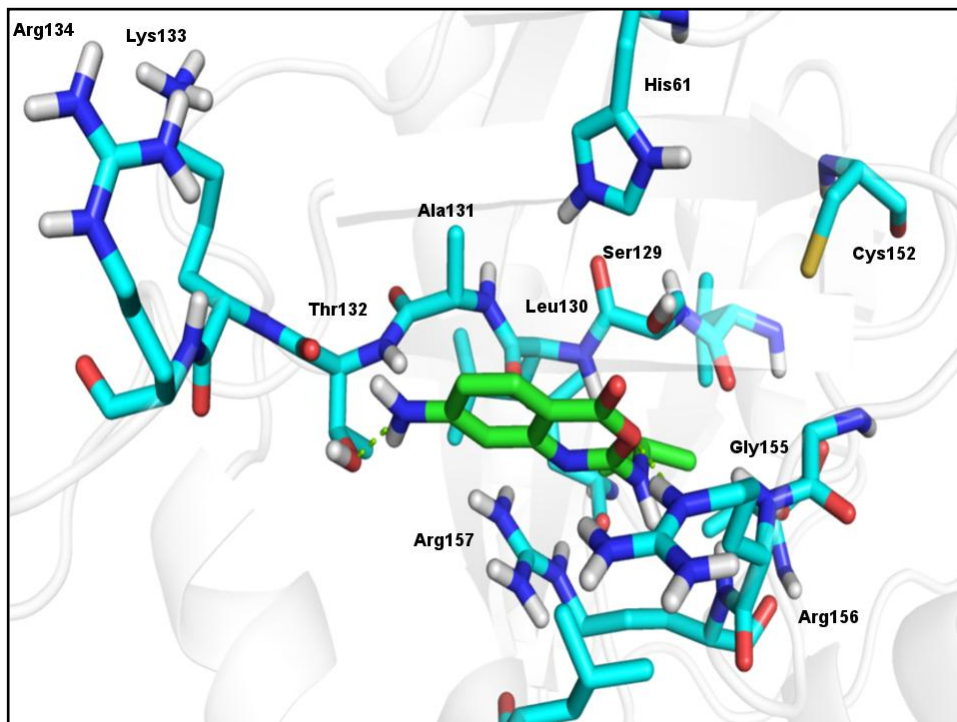


Figura 44: Representação do complexo obtido por *docking* molecular do composto **14** (verde) da série de benzoxazinonas. Em destaque, as ligações hidrogênio (em verde) do composto **14** com resíduos da protease de HSV-1 (azul claro).

Para o composto **19**, a menor atividade ( $IC_{50}=60 \mu M$ ) parece também se relacionar à redução do número de ligações hidrogênio bem como o aumento da distância dos átomos envolvidos nessa interação. Esse composto apresentou uma ligação hidrogênio entre o átomo de nitrogênio do resíduo Thr132 e o átomo de nitrogênio do anel da benzoxazinona cuja distância é de 3,4 Å (Figura 45). Além dessa ligação hidrogênio, este composto participa uma interação do tipo cátion- $\pi$  entre o carbono polarizado do resíduo Arg157 e o anel aromático presente no substituinte  $R_1$ , com distância de 3,9 Å. Essa interação é considerada mais fraca do que a ligação hidrogênio e apresenta uma distância maior que as interações deste tipo realizadas por alguns compostos da série de benzoxazinonas. Os resultados também mostram a existência de interações hidrofóbicas entre o anel aromático e os resíduos hidrofóbicos presentes nesta região (Leu27, Ala28, Leu38, Ala39, Val28, Leu130, Ala131, Ala150, Leu151, Ile154, Gly155, Leu158 e Gly159).

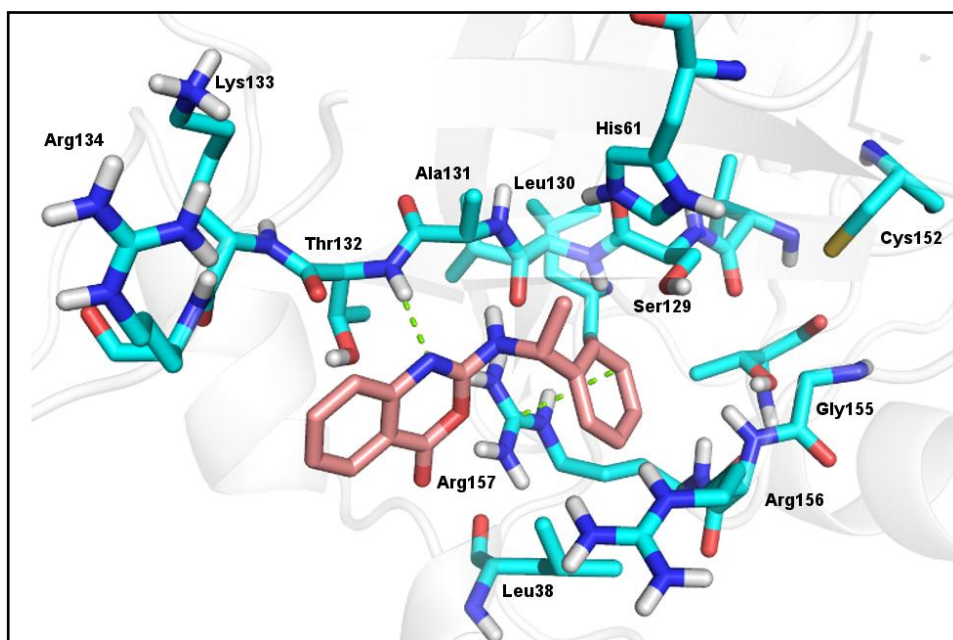


Figura 45: Representação do complexo obtido por *docking* molecular do composto **19** (rosa) da série de benzoxazinonas. Em destaque, as ligações hidrogênio (em verde) do composto **19** com resíduos da protease de HSV-1 (azul claro).

A análise do complexo formado entre o composto **22** e a protease de HSV-1 exibe uma molécula deslocada do sítio que contém os aminoácidos considerados mais importantes. Esse composto participa de duas ligações hidrogênio, uma delas entre o átomo de nitrogênio do resíduo Arg134 e o oxigênio da carbonila presente na benzoxazinona, e outra entre o átomo de nitrogênio presente do resíduo Lys133 e o oxigênio presente no anel da benzoxazinona com distâncias de 3,1 e 3,0 Å respectivamente (Figura 46).

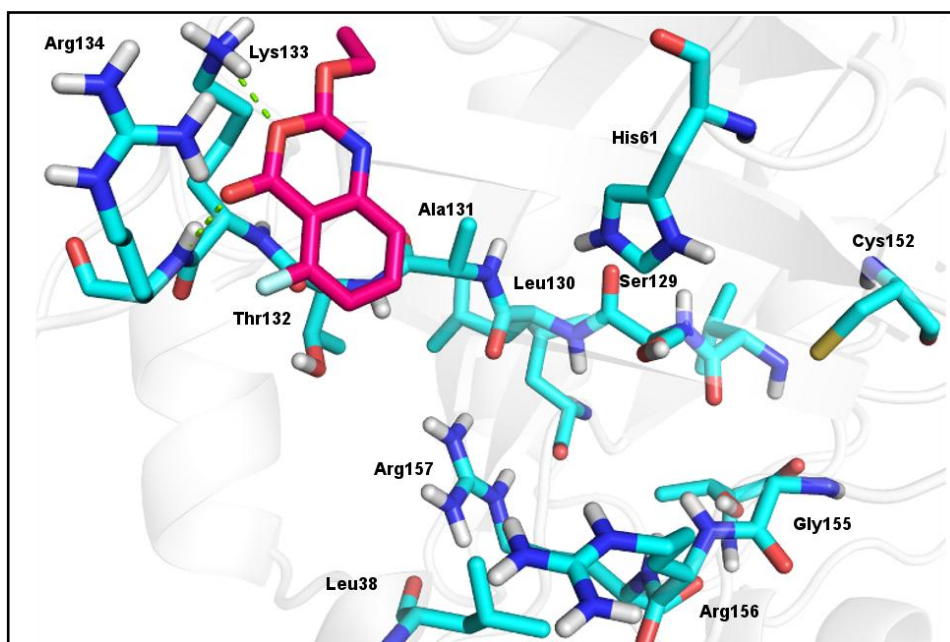


Figura 46: Representação do complexo obtido por *docking* molecular do composto **22** (rosa) da série de benzoxazinonas. Em destaque, as ligações hidrogênio (em verde) do composto **22** com resíduos da protease de HSV-1 (azul claro).

De acordo com a estrutura cristalográfica da protease de citomegalovírus complexada ao inibidor peptidomimético (**31**) (código PDB 0FP) ocorre uma ligação hidrogênio entre o oxigênio do inibidor com o resíduo Arg137 da protease de citomegalovírus, correspondente ao resíduo Arg134 da protease de HSV-1 (Figura 47). Porém, não existem evidências na literatura do envolvimento desses resíduos com a atividade da protease de HSV-1. Desta maneira, apesar das ligações hidrogênio contribuírem para novos arranjos conformacionais protéicos e para a estabilidade de ligantes no sítio catalítico, a baixa atividade do composto **22** ( $IC_{50} = 75 \mu M$ ) pode ser atribuída à discreta importância dos resíduos Arg134 e Lys133. Esse composto ainda participa de uma interação hidrofóbica entre o átomo de flúor, substituinte  $R_4$  do anel aromático da benzoxazinona e a resíduos hidrofóbicos presentes nesta região.

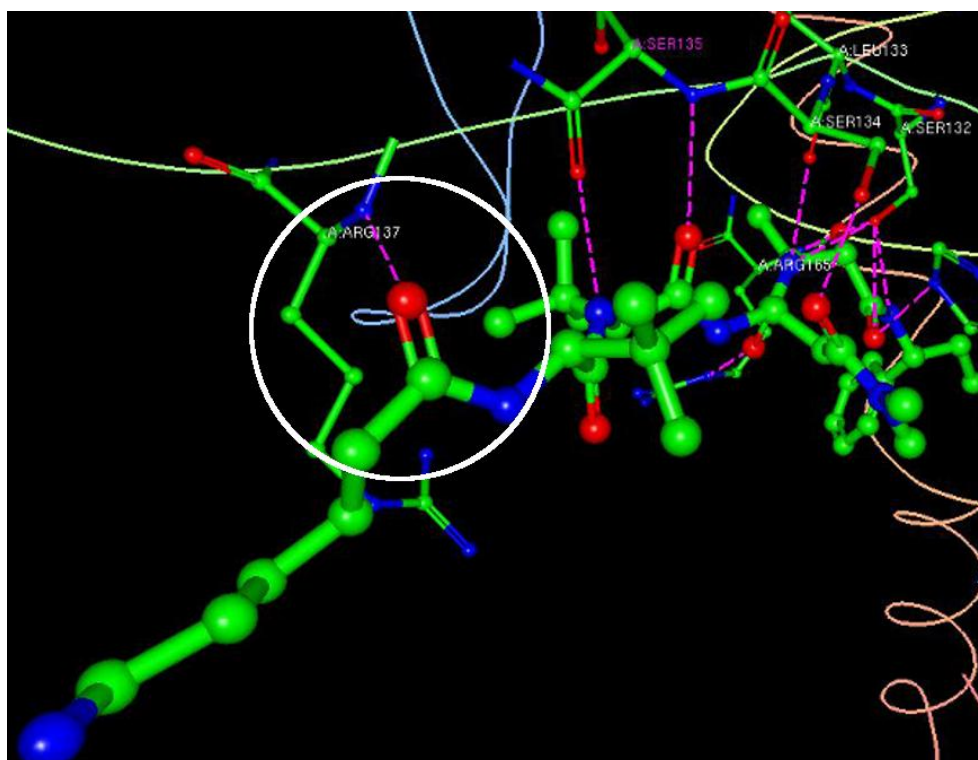


Figura 47: Peptidomimético 0FP (**31**) complexado à protease de citomegalovírus e ligações hidrogênio (rosa). Destaque para a ligação entre o oxigênio da carbonila amídica do ligante e o átomo de nitrogênio do resíduo ARG 137. Figura obtida através do programa Ligand Explorer.

De todas as benzoxazinonas a molécula **20** foi a menos ativa. Entretanto, como o valor de  $IC_{50}$  não foi preciso ( $>300 \mu M$ ), considerou-se a molécula **12** como a menos ativa do grupo, cujo  $IC_{50}$  é igual a  $300 \mu M$ . A molécula **12** também foi avaliada no estudo de *docking* molecular, (Figura 48). De acordo com os resultados obtidos, o confôrmero selecionado não interage por nenhuma ligação hidrogênio com nenhum resíduo da cavidade de ligação. Apesar dessa evidência, é possível observar interações hidrofóbicas entre o substituinte  $R_1$  e os resíduos localizados nas vizinhanças de característica hidrofóbica (Leu27, Ala28, Leu38, Ala39, Val28, Leu130, Ala131, Ala150, Leu151, Ile154, Gly155, Leu158 e Gly159). Estas interações foram observadas na maior parte das benzoxazinonas e parecem contribuir para estabilização do ligante na cavidade do receptor. Sendo assim, a baixa atividade do composto **12** pode estar associada com a ausência de ligações hidrogênio com resíduos importantes para a atividade da protease, localizados na cavidade. Ainda que se observem a ocorrência de interações hidrofóbicas que contribuem para a estabilização do ligante na cavidade, estas parecem não ser cruciais para aumentar a potência dos compostos.



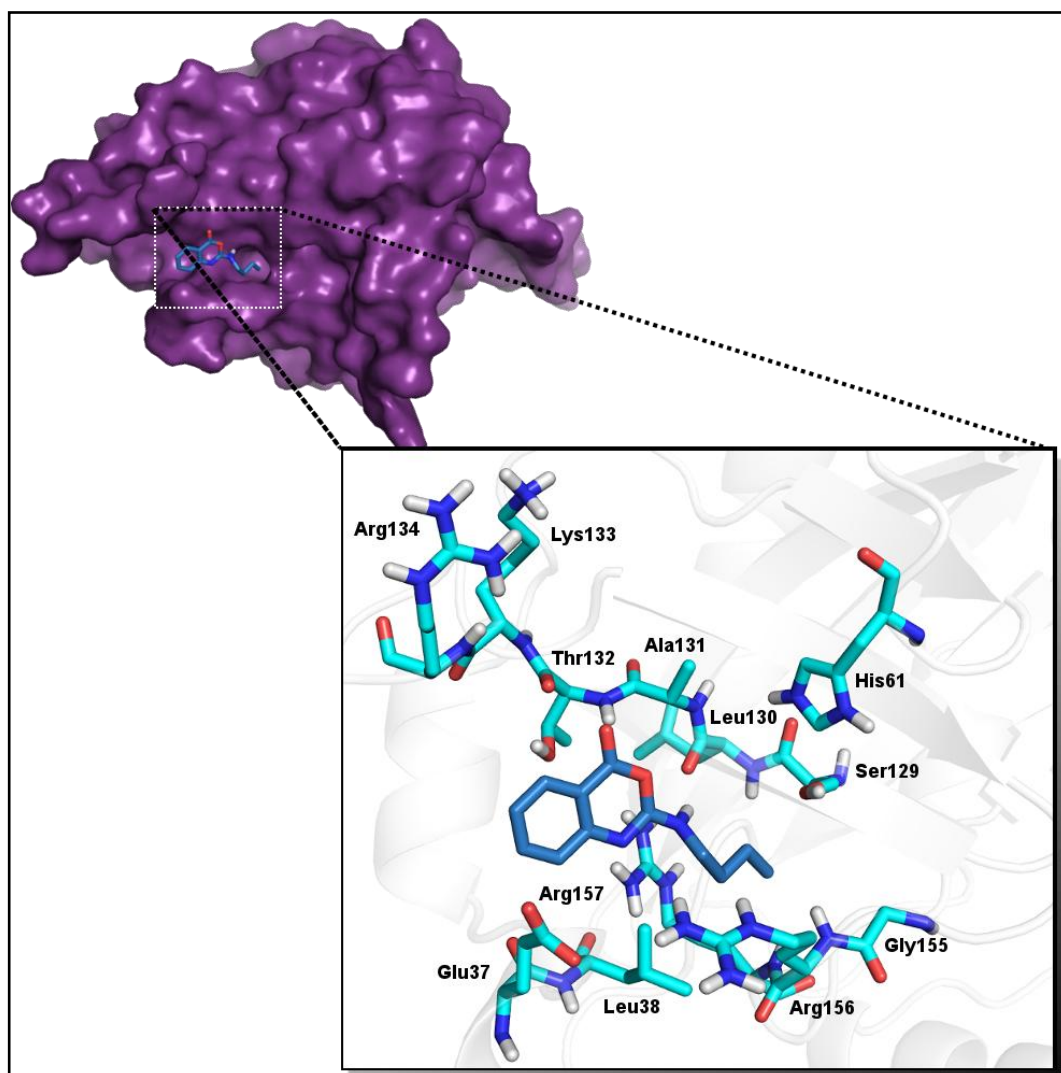


Figura 48: Superfície da protease (roxo) com destaque para o composto **12** presente na cavidade. *Docking* molecular do composto **12** (azul) da série de benzoxazinonas com resíduos da protease de HSV-1 (azul claro) (abaixo).

Na Tabela do APENDICE B encontram-se listadas todas as distâncias de ligações hidrogênio observadas nesse estudo de docking molecular entre as 18 benzoxazinonas descritas nas Tabelas 1 e 2 e a protease de HSV-1.

#### 5.4 AVALIAÇÃO DE *DRUGLIKENESS* E *DRUGSCORE*

Foram selecionadas para esta etapa as quatro moléculas mais ativas da série, **15**, **24**, **26** e **29**, para avaliação da propriedade *Druglikeness* e *Drugscore* através do programa Osiris (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo.html>).

Os fármacos utilizados na terapia contra o HSV, aciclovir (**1**), famciclovir (**3**) penciclovir (**5**), e trifluridina (**8**) também foram analisados no programa Osiris, a fim de comparar os resultados dos mesmos com os resultados obtidos para as benzoxazinonas mais ativas.

Conforme observado na Figura 49(A) no grupo de benzoxazinonas mais ativas, a molécula que apresentou maior potencial *Druglikeness* foi a benzoxazinona **29**, cujo resultado foi igual a 1,3. O composto **24** apresentou o menor potencial *Druglikeness* (-30,7), seguido da molécula **15** (-28,3) e da molécula **26** (-11,5).

Comparou-se também o composto **26**, o mais ativo do grupo de benzoxazinonas, aos fármacos disponíveis atualmente na terapia do herpes aciclovir, penciclovir, famciclovir e trifluridina. O composto **26** apresentou potencial *Druglikeness* menor que todos os fármacos disponíveis para a terapia anti HSV-1 avaliados conforme visto no gráfico da Figura 49. Também foram confrontados os resultados obtidos para o composto **29**, segundo mais ativo do grupo das benzoxazinonas e os principais fármacos disponíveis. A molécula **29** foi a única que obteve valor positivo de *Druglikeness* (1,3) incluindo os principais fármacos disponíveis para terapia do herpes, aciclovir (-2,42), penciclovir (-5,54), famciclovir (-0,69) e trifluridina (-6,91).

De acordo com os dados obtidos na análise do *Drugscore* (Figura 49), o composto **24** apresentou o menor resultado entre todas as moléculas analisadas (0,12) e o composto **29** o maior resultado (0,72), superando não só as benzoxazinonas analisadas como também os principais fármacos atualmente disponíveis para a terapia contra o herpes, aciclovir (0,31), penciclovir (0,17), famciclovir (0,22), trifluridina (0,28). Já o composto **26**, o mais ativo do grupo de benzoxazinonas, apresentou o segundo maior resultado (0,25) no grupo das benzoxazinonas analisadas. Entretanto, no grupo dos principais fármacos disponíveis, esse composto superou apenas os valores de *Drugscore* obtidos para o Penciclovir e Famciclovir.

Levando em consideração os resultados obtidos tanto para o *Drugscore* quanto para o *Druglikeness*, é possível eleger o composto **29** ( $IC_{50}=2,5 \mu M$ ), o segundo mais ativo do grupo das benzoxazinonas, como um possível protótipo para o planejamento de fármacos para

terapia antiviral do herpes, superando o composto **26**, o mais ativo do grupo, uma vez que o último apresentou valores inferiores para as duas propriedades analisadas.

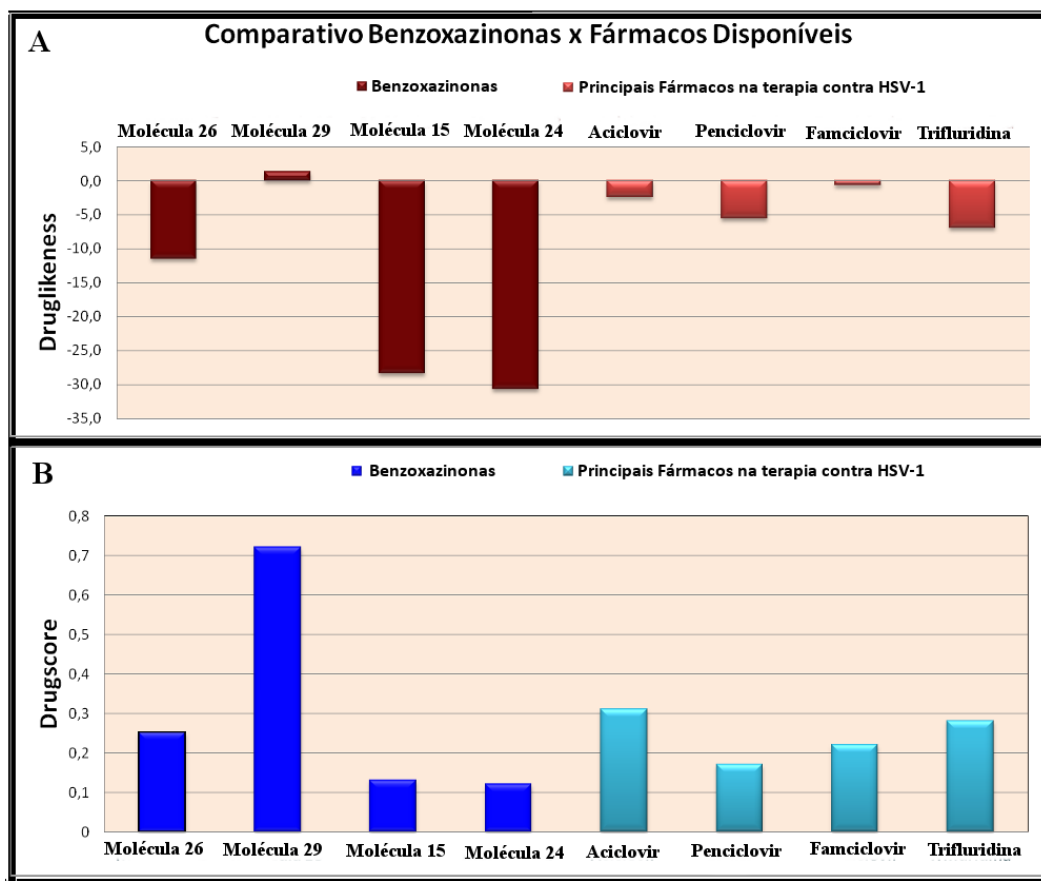


Figura 49: (A) Gráfico dos valores obtidos para *Druglikeness* das benzoxazinonas (vinho) e principais fármacos disponíveis para terapia do HSV-1 (vermelho). (B) Gráfico dos valores de *Drugscore* obtidos para benzoxazinonas (azul escuro) e principais fármacos disponíveis para terapia do HSV-1 (azul claro).



## 5.5 PROPOSTA DE NOVAS MOLÉCULAS PARA A TERAPIA ANTI-HSV-1

### 5.5.1 *Docking* Molecular Novos Compostos

Com base nos resultados de SAR, *docking* molecular e análise através do programa Osiris, foram selecionados dois dos compostos estudados para a realização de modificações estruturais. O composto **26** foi escolhido, uma vez que apresentou a melhor atividade biológica e o resultado de *docking* molecular com maior número de interações por ligação hidrogênio com resíduos importantes para a atividade da protease de HSV-1; e a molécula **29**, que apresentou os melhores resultados de *Drugscore* e *Druglikeness*.

Através de mudanças estruturais foram propostos quatro (**32-35**) compostos inéditos que foram estudados através de *docking*, visando à predição do melhor modo de interação destas moléculas com a protease de HSV-1 (Figura 50). O composto **32** foi proposto através da hibridização dos compostos **26** e **29**, selecionando os grupos de maior importância em cada molécula (verde e azul) e os compostos **33-35** foram propostos utilizando a técnica de bioisosterismo (ABRAHAM, 2003).

Na molécula **32** foi feita uma substituição do anel fenila por um anel imidazólico (vermelho), mantendo-se a estrutura molecular restante semelhante ao composto **29**. A obtenção da molécula **33** foi concluída através da modificação do átomo de cloro, substituinte R<sub>3</sub> do anel aromático fenila, por um átomo de bromo (amarelo). Esta modificação foi baseada também nos resultados de *docking* molecular do grupo de benzoxazinonas que mostrou a importância de grupos polarizáveis nesta posição. A estrutura química restante foi mantida semelhante a do composto **26**. Para a molécula **35** também foi feita uma mudança bioisostérica através da substituição do anel aromático fenila por um anel piridina (rosa), permanecendo com a estrutura restante semelhante a estrutura do composto **26**.

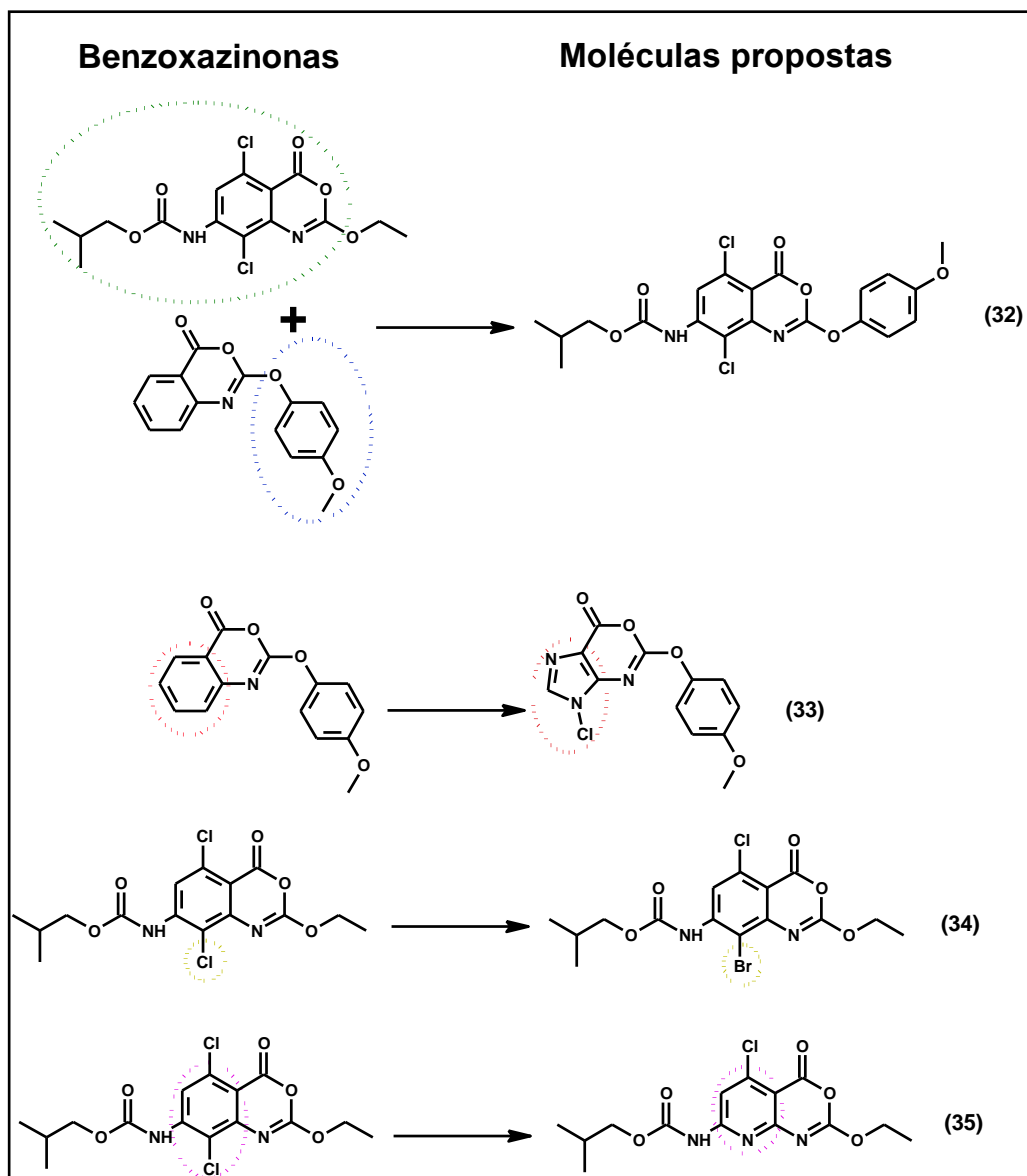


Figura 50: Planejamento de novos análogos para a terapia de HSV-1. Grupamentos da molécula **26** (pontilhado verde) e da molécula **29** (pontilhado azul) utilizados na hibridação molecular. Modificação do anel fenila pelo anel imidazól (pontilhado vermelho) gerando o composto **33**; modificação do átomo cloro pelo átomo bromo (pontilhado amarelo) gerando a estrutura **34**; Modificação do anel cloro-fenila pelo grupo piridina (pontilhado rosa) gerando a estrutura **35**.

Após a construção das moléculas propostas (**32-35**), estas foram estudadas através do *docking* molecular com a protease do HSV-1 utilizando o programa AutoDock4.2 e os mesmos parâmetros validados para o estudo com as benzoxazinonas (conforme item 4.3).

Os valores de energia livre de ligação obtidos no estudo de *docking* molecular não são considerados exatos, uma vez que diversas simplificações são realizadas durante o cálculo (HUEY *et al.*, 2007). Apesar desta evidência, os valores de energia foram comparados

qualitativamente, e foi considerada a possibilidade da ocorrência de desvios de  $\pm 1,0$  kcal/mol para o valor encontrado de energia livre de ligação estimada de acordo com dados da literatura. Dessa forma, as diferenças entre as energias livres de ligação estimadas inferiores a 1,0 kcal/mol, não podem ser consideradas significativas (HUEY *et al.*, 2007).

As energias livres de ligação encontradas para as moléculas propostas foram comparadas às energias livres de ligação estimadas para as benzoxazinonas **26** e **29**. Diferenças significativas entre as energias das moléculas propostas foram vistas para a molécula proposta **34** em relação à molécula **29** e entre a molécula **35** proposta e ambas benzoxazinonas (**26** e **29**). As outras moléculas não apresentaram diferença significativa de energia livre de ligação estimada em relação às benzoxazinonas **26** e **29**.

Tabela 7: Resultados obtidos no *docking* molecular das moléculas propostas para terapia do HSV-1 em relação aos resultados obtidos para as benzoxazinonas **26** e **29**.

Molécula	Algoerado selecionado	Energia de ligação do confôrmero selecionado	Critério de seleção
<b>32</b>	3	-3,09	Mais Populoso
<b>33</b>	2	-3,99	Mais Populoso
<b>34</b>	1	-2,74	Menor Energia
<b>35</b>	1	-1,64	Menor Energia
<b>26</b>	1	-3,61	Mais Populoso e Menor Energia
<b>29</b>	2	-3,74	Mais populoso

Os resultados dos estudos de *docking* molecular foram analisados através do programa PyMol (mesmo programa utilizado para as benzoxazinonas).

A molécula proposta **32** apresenta duas ligações hidrogênio com resíduos de aminoácido da protease de HSV-1, uma entre o átomo de oxigênio do grupamento metóxi e o resíduo His148 e outra entre o átomo de oxigênio presente no anel da benzoxazinona e o resíduo Thr132, ambas com distância de 3,1 Å (Figura 51). Já foi discutida na literatura a importância do resíduo His148 para a atividade catalítica da protease de HSV-1 (WELCH *et al.*, 1993; REGISTER & SHAFER, 1997), além de ser um dos resíduos pertencentes à tríade catalítica da HSV-1 protease. Desta forma, apesar do composto **32** apresentar um número de ligações hidrogênio inferior às encontradas para os compostos **26** e **29**, esta apresenta uma ligação relevante quando se trata da atividade autocatalítica da protease de HSV-1. Além das

ligações hidrogênio, também se observa a proximidade do anel aromático contendo como substituintes dois átomos de cloro da cavidade de característica hidrofóbica, interação também observada para a benzoxazinona **26**.

O posicionamento do composto **32** diferente da molécula **26** impossibilitou a formação da ligação hidrogênio com o resíduo Ser129 (que parece ser a mais importante para a alta atividade) indicando uma possível relação com o tamanho da molécula proposta. Já foi discutido anteriormente (item 5.3.5) o impedimento estérico da cavidade da protease para moléculas de alto peso molecular além da limitação associada ao tamanho do mapa de grade adotado para o estudo. Este dois fatores podem ter contribuído para que o composto **32** proposto não se posicionasse favoravelmente a ocorrência da mais importante interação vista neste estudo de *docking* molecular, a ligação hidrogênio com o resíduo Ser129.

As interações apresentadas pelo composto **33** encontram-se descritas na Figura 51. Uma ligação hidrogênio é formada entre o átomo de nitrogênio presente no anel imidazol e o resíduo Arg134 com distância de 3,3 Å. Não foi encontrado na literatura nenhum dado relevante sobre este resíduo. Também se observa uma ligação hidrogênio entre o átomo de oxigênio do grupamento metóxi e o resíduo Arg157 (distância 3,1 Å), de grande importância para a atividade catalítica da protease de HSV-1. A metila do grupamento metóxi voltada para a parte hidrofóbica do resíduo Glu37 indica a ocorrência de interações hidrofóbicas nesta região. A modificação realizada parece não ter favorecido a atividade da molécula proposta **33** e pode estar relacionada com a substituição de um grupo de característica hidrofóbica (anel fenila) por um grupo de característica hidrofílica (imidazol). A presença de um grupo hidrofóbico parece ajudar na interiorização do ligante no receptor, favorecendo interações com resíduos importantes nesta região. Já a presença de grupos hidrofílicos parece promover a exposição do ligante ao solvente, distanciando o ligante dos aminoácidos importantes da cavidade e dificultando a interação com os mesmos. O cálculo realizado pelo programa AutoDock4.2 considera a dessolvatação de grupos polares e apolares. Entretanto, para chegar ao resultado final são feitas diversas aproximações que tornam o cálculo menos preciso, principalmente na dessolvatação de grupos apolares (HUEY *et al.*, 2007). Desta forma, além da diferença das energias livres de ligação das moléculas **33** e **29** não ser significativa, não necessariamente a energia livre de ligação estimada do composto **33** proposto (-3,99 kcal/mol) pode ser considerada melhor que a energia livre de ligação da benzoxazinona **29** (-3,74 kcal/mol) devido à imprecisão dos cálculos.

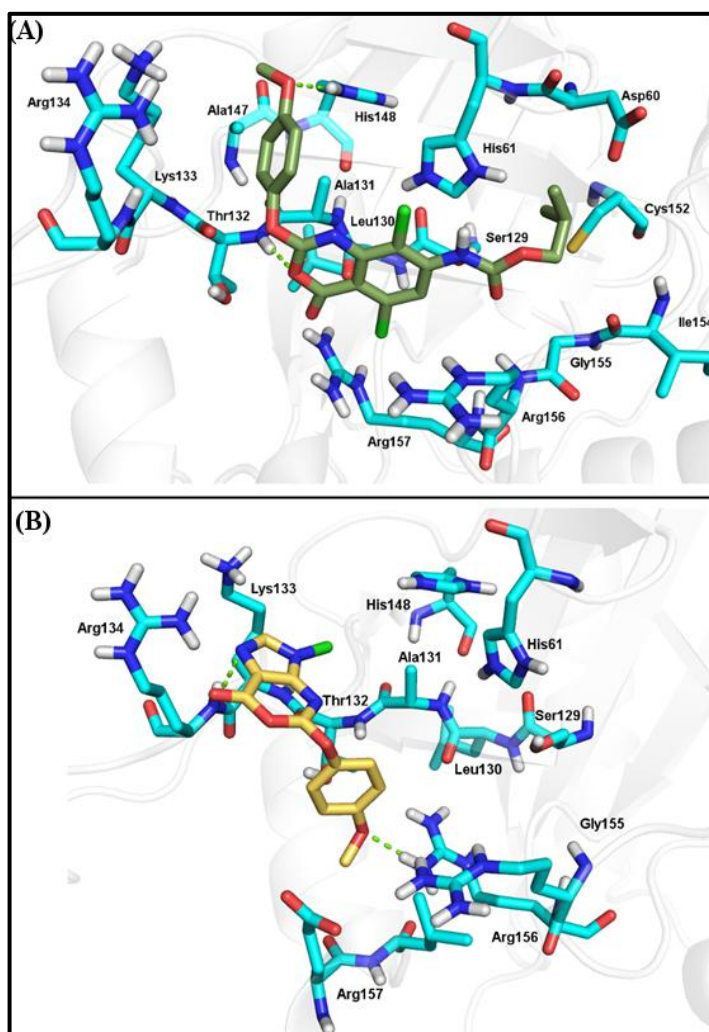


Figura 51: (A) *Docking* molecular do composto proposto **32**(verde) e (B) *Docking* molecular do composto **33** proposto (amarelo) com resíduos da protease de HSV-1 (azul claro).

O composto **34** foi o que apresentou o melhor resultado dos quatro compostos, realizando três ligações hidrogênio com a protease de HSV-1. Esta quantidade é igual àquela apresentada pela benzoxazinona **29** e inferior à apresentada pela benzoxazinona **26**, que realizou quatro ligações hidrogênio com a protease de HSV-1. O resultado do *docking* molecular do composto **34** mostrou uma ligação hidrogênio entre o átomo de oxigênio do grupo carbonila presente no substituinte R<sub>2</sub> e o resíduo Ser129 com distância de 3,1 Å, uma ligação hidrogênio entre o átomo de oxigênio do grupo oxi- e o resíduo Arg157 com distância de 2,9 Å e uma ligação hidrogênio entre o átomo de oxigênio do anel da benzoxazinona e o resíduo Thr132 com distância de 3,1 Å (Figura 52). Dois dos resíduos que a molécula **34** mostrou interagir, apresentam importância para a atividade catalítica da protease de HSV-1, Arg157 e principalmente Ser129. Estas interações também foram observadas para o composto **26** das benzoxazinonas, porém este ainda realiza outra ligação hidrogênio com o resíduo

Arg157. Quando comparado o posicionamento na superfície da protease dos compostos **34** proposto e a benzoxazinona **26**, nota-se uma variação muito pequena que parece estar relacionada com a ausência da segunda ligação hidrogênio da benzoxazinona **26** com o resíduo Arg157, entre o composto **34** e a protease. É possível que a busca por conformações, que é feita de forma aleatória, não tenha encontrado o confôrmero que realizaria esta interação, igualando a quantidade de ligações hidrogênio do composto **34** à do composto **26**.

Para o composto **34** a modificação realizada pode ter favorecido o aumento da atividade, uma vez que o posicionamento do átomo de bromo foi exatamente o esperado, voltando-se para a cavidade hidrofóbica. Esta cavidade parece ter grande importância para a atividade do ligante, uma vez que a maior parte das moléculas testadas apresentou interações hidrofóbicas nesta região. Além da hidrofobicidade, outro fator discutido que parece influenciar a atividade é a polarizabilidade de átomos desta posição. Como o átomo de bromo é mais polarizável e mais lipofílico que o átomo de cloro (ABRAHAM, 2003), os resultados indicam que o primeiro favorece o aumento da atividade. Sugere-se que este composto seja testado *in vitro* para que seja comprovada a hipótese.

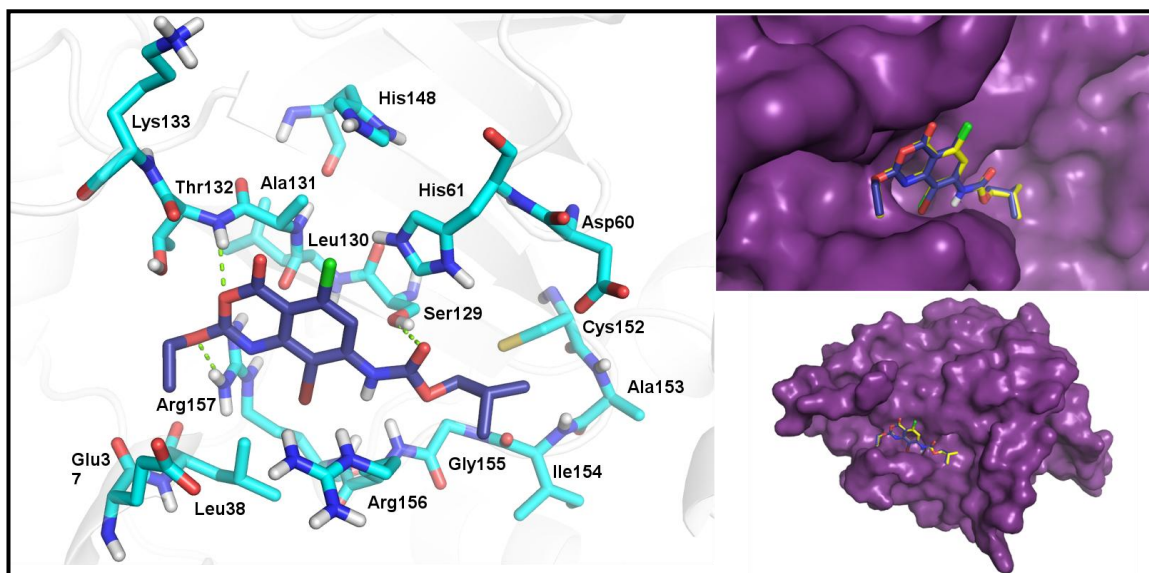


Figura 52: *Docking* molecular do composto **34** proposto (roxo) com resíduos da protease de HSV-1 (azul claro). À direita, sobreposição do composto **34** proposto (azul escuro) com o composto **26** do grupo de benzoxazinonas na superfície da protease de HSV-1.

A análise dos resultados de *docking* molecular do composto **35** mostrou que o mesmo realiza três ligações hidrogênio, assim como o composto **34**. Duas ligações hidrogênio com o resíduo Arg134, com distâncias de 3,1 e 2,9 Å, foram observadas entre este resíduo e o átomo

de oxigênio da carbonila do substituinte  $R_2$  e com o átomo de oxigênio presente na cadeia do substituinte  $R_2$ , respectivamente (Figura 53). A terceira ligação hidrogênio observada foi entre o átomo de oxigênio do grupo oxi e o resíduo Arg157 com distância de 3,2 Å (Figura 53). Apesar desse resíduo ter importância para a atividade catalítica da protease de HSV-1, o resultado de *docking* estimou uma energia livre de ligação significativamente mais baixa para este composto (Tabela 7). A substituição do grupamento hidrofóbico fenila pela piridina, menos hidrofóbico que a fenila, parece ter influenciado negativamente na atividade afastando o ligante do interior da cavidade, impedindo a interação do mesmo com resíduos importantes desta região. Este dado corrobora o resultado encontrado para o composto proposto **33**.

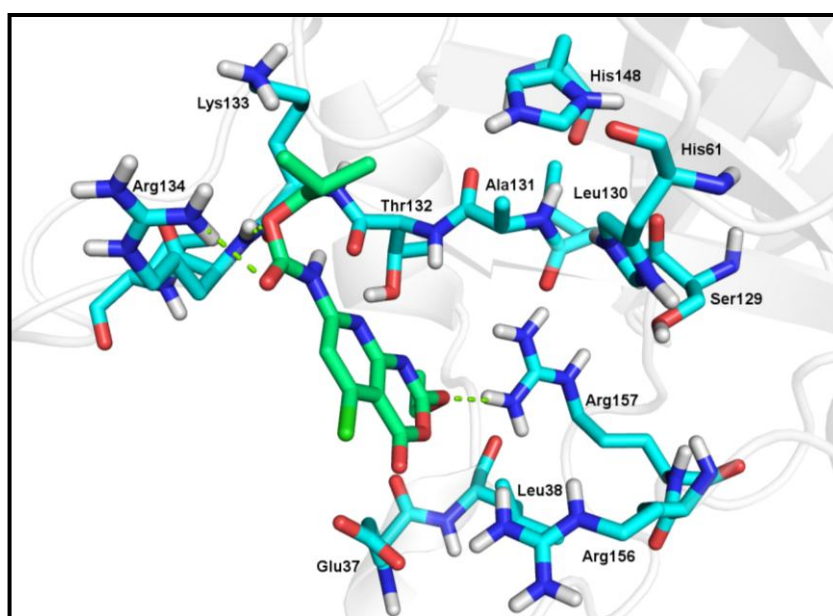


Figura 53: *Docking* molecular do composto **35** proposto (verde) com resíduos da protease de HSV-1 (azul claro).

### 5.5.2 Estudo de *Druglikeness* e *Drugscore* dos Novos Compostos

Foi realizado um estudo de *Druglikeness* e *Drugscore* dos novos compostos (**32-35**) para verificar se as moléculas propostas apresentam resultados superiores aos obtidos para as benzoxazinonas mais ativas **26** e **29**.

De acordo com o resultado de *Druglikeness*, no grupo de compostos propostos o que apresentou o maior resultado foi o composto **33** (0,0) seguido do composto **32** (-7,92), composto **35** (-11,5) e composto **34** (-13,3) (Figura 54). Apesar do composto **34** ter sido



indicado como um possível protótipo entre as moléculas propostas, seu resultado de *Druglikeness* foi o mais baixo do grupo.

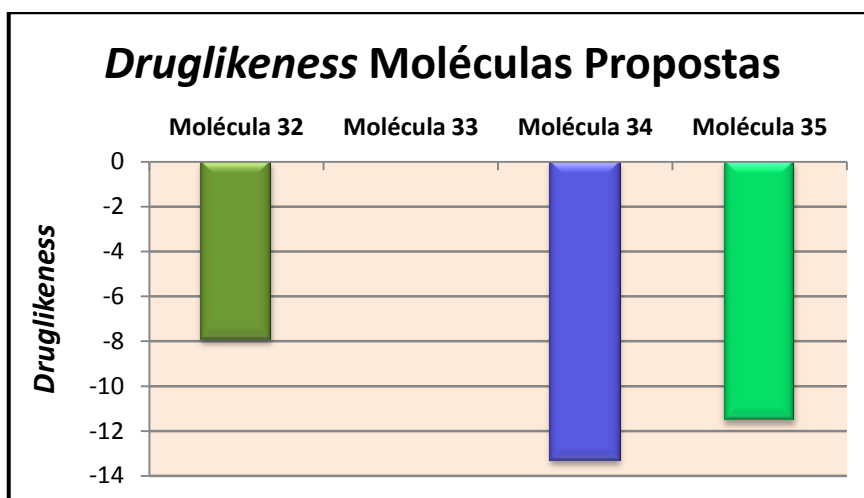


Figura 54: Gráfico do estudo de *Druglikeness* das moléculas propostas 32 (verde), 33 (amarelo), 34 (roxo), 35 (verde).

Comparando os resultados obtidos para os compostos propostos aos resultados das benzoxazinonas **26** (-11,5) e **29** (1,3), é possível observar que todos os compostos apresentaram resultados inferiores aos do composto **29**, porém os compostos **33** e **32** apresentaram resultado superior à benzoxazinona **26**.

Os resultados obtidos no estudo de *Drugscore* mostraram que o composto **33** apresentou o maior resultado (0,48) seguido dos compostos **35** (0,31), **34** (0,23) e **32** (0,17) (Figura 55). Ao se comparar estes resultados aos das benzoxazinonas **26** (0,25) e **29** (0,72), nota-se que o composto **29** continua tendo resultado superior aos compostos propostos, porém os compostos **33** e **35** apresentaram resultados superiores ao do composto **26**.

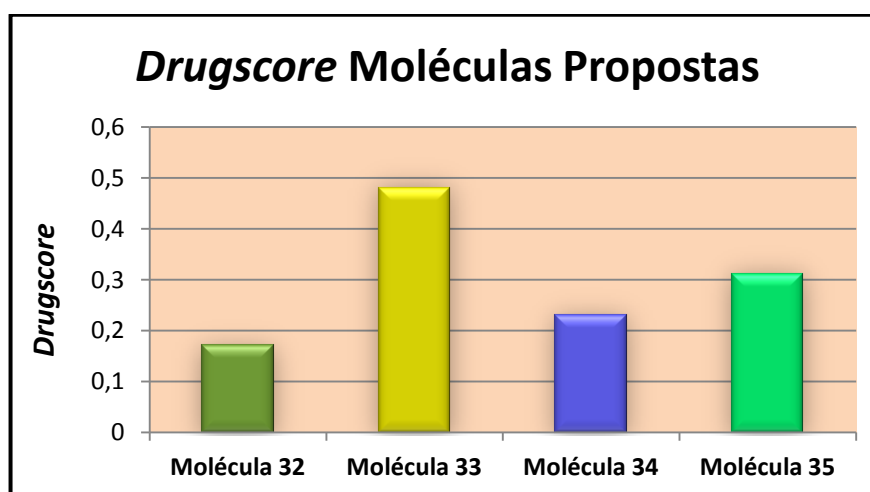


Figura 55: Gráfico do estudo de *Drugscore* das moléculas propostas 32 (verde), 33 (amarelo), 34 (roxo), 35 (verde).



Estes resultados indicam que as mudanças estruturais realizadas resultando nos compostos **32**, **35** e **33**, podem gerar possíveis candidatos à fármacos uma vez que apresentaram resultados superiores aos da benzoxazinona **26**. Apesar disto, a benzoxazinona **29**, ainda mostrou resultados superiores aos vistos para as benzoxazinonas, para as moléculas propostas e para os fármacos utilizados na terapia atual contra o HSV-1.

## 6 CONCLUSÕES

Os estudos de modelagem comparativa foram realizados de forma a obter a estrutura tridimensional da protease do HSV-1, cuja estrutura não se encontra elucidada na literatura. O modelo foi obtido e validado para ser utilizado na simulação de *docking* molecular.

Os resultados de *docking* molecular mostraram correlação com os valores de atividade dos compostos, confirmando a importância, de alguns resíduos para a atividade da protease. O resíduo Ser129 parece ser o mais importante da tríade catalítica, seguido dos resíduos His61, His148, Arg157 e Arg156, uma vez que o composto mais ativo (**26**) foi o único da série de benzoxazinonas que apresentou interação com o resíduo Ser129 e outros compostos com alta atividade apresentaram interações com estes outros resíduos. Interações hidrofóbicas, não observadas até o momento na literatura, entre uma cavidade hidrofóbica composta pelos resíduos Leu27, Ala28, Leu38, Ala39, Val28, Leu130, Ala131, Ala150, Leu151, Ile154, Gly155, Leu158 e Gly159 e as benzoxazinonas avaliadas sugerem a importância dessa cavidade para a atividade da protease de HSV-1.

Os estudos de *Druglikeness* e *Drugscore* realizados no programa Osiris indicaram o composto **29** para a realização de modificações estruturais para obtenção de um protótipo. Apesar disto, o composto **26** foi também considerado devido à sua alta atividade.

Foram propostos quatro compostos por técnicas de hibridização molecular e bioisosterismo que foram analisados através de um estudo de *docking* molecular. Esse estudo apontou a molécula **34** como protótipo, indicando um possível aumento da atividade em relação aos compostos **26** e **29**. Apesar desta evidência, os estudos de *Druglikeness* e *Drugscore* dos compostos propostos mostraram resultados inferiores aos do composto **29**. Desta forma, outros ensaios experimentais devem ser realizados para sustentar a hipótese do aumento da atividade do composto **34** em relação às demais benzoxazinonas.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, D. J. *Burguer's Medicinal Chemistry & Drug Discovery*. Wiley-Interscience, ed., 2003.
- ARDUINO, P. G.; PORTER, S. R. Oral and perioral herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection: review of its management. **Oral Dis**, v. 12, 3, p. 254-70, 2006.
- ARNOLD, K.; BORDOLI, L.; KOPP, J.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, v. 22, 2, p. 195-201, 2006.
- ARROIO, A.; HONÓRIO, K. M.; SILVA, A. B. F. D. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. **Química Nova**, v. 33, p. 694-699, 2010.
- ARROYO, E.; CHINCHILLA, N.; MOLINILLO, J. M.; MACIAS, F. A.; ASTOLA, A.; ORTIZ, M.; VALDIVIA, M. M. Aneugenic effects of benzoxazinones in cultured human cells. **Mutat Res**, v. 695, 1-2, p. 81-6, 2010.
- BABE, L. M.; CRAIK, C. S. Viral proteases: evolution of diverse structural motifs to optimize function. **Cell**, v. 91, 4, p. 427-30, 1997.
- BAINES, J. D. Herpes simplex virus capsid assembly and DNA packaging: a present and future antiviral drug target. **Trends Microbiol**, v. 19, 12, p. 606-13, 2011.
- BARREIRO, E. J. A Química Medicinal e o paradigma do composto-protótipo. **RVQ**, v. 1, 1, p. 26-34, 2009.
- BARREIRO, E. J.; RODRIGUES, C. R.; ALBUQUERQUE, M. G.; SANT'ANNA, C. M. R. D.; ALENCASTRO, R. B. D. Modelagem Molecular: Uma Ferramenta para o Planejamento Racional de Fármacos em Química Medicinal. **Química Nova**, v. 20, p. 300-310, 1997.
- BEHRENS-BAUMANN, W. Herpes simplex keratitis. A short overview of the current therapy. **Klin Monbl Augenheilkd**, v. 227, 5, p. 388-92, 2010.
- BISSANTZ, C.; KUHN, B.; STAHL, M. A medicinal chemist's guide to molecular interactions. **J Med Chem**, v. 53, 14, p. 5061-84, 2010.
- BODE, W.; MEYER, E., JR.; POWERS, J. C. Human leukocyte and porcine pancreatic elastase: X-ray crystal structures, mechanism, substrate specificity, and mechanism-based inhibitors. **Biochemistry**, v. 28, 5, p. 1951-63, 1989.
- BOND, C. S.; SCHUTTELKOPF, A. W. ALINE: a WYSIWYG protein-sequence alignment editor for publication-quality alignments. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 65, Pt 5, p. 510-2, 2009.
- BOWIE, J. U.; LUTHY, R.; EISENBERG, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. **Science**, v. 253, 5016, p. 164-70, 1991.
- BUISSON, M.; HERNANDEZ, J. F.; LASCOUX, D.; SCHOEHN, G.; FOREST, E.; ARLAUD, G.; SEIGNEURIN, J. M.; RUIGROK, R. W.; BURMEISTER, W. P. The crystal structure of the Epstein-Barr virus protease shows rearrangement of the processed C terminus. **J Mol Biol**, v. 324, 1, p. 89-103, 2002.
- BUISSON, M.; RIVAIL, L.; HERNANDEZ, J. F.; JAMIN, M.; MARTINEZ, J.; RUIGROK, R. W.; BURMEISTER, W. P. Kinetics, inhibition and oligomerization of Epstein-Barr virus protease. **FEBS Lett**, v. 580, 28-29, p. 6570-8, 2006.
- CHIDA, Y.; MAO, X. Does psychosocial stress predict symptomatic herpes simplex virus recurrence? A meta-analytic investigation on prospective studies. **Brain Behav Immun**, v. 23, 7, p. 917-25, 2009.
- CHONO, K.; KATSUMATA, K.; KONTANI, T.; KOBAYASHI, M.; SUDO, K.; YOKOTA, T.; KONNO, K.; SHIMIZU, Y.; SUZUKI, H. ASP2151, a novel helicase-primase inhibitor, possesses antiviral activity against

varicella-zoster virus and herpes simplex virus types 1 and 2. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, 8, p. 1733-41, 2010.

COELHO, L. W.; JUNQUEIRA, G. M. A.; MACHUCA HERRERA, J. O.; MACHADO, S. D. P.; MACHADO, B. D. C. Aplicação de mecânica molecular em química inorgânica. **Química Nova**, v. 22, p. 396-404, 1999.

COHEN, N. C.; BLANEY, J. M.; HUMBLET, C.; GUND, P.; BARRY, D. C. Molecular modeling software and methods for medicinal chemistry. **J Med Chem**, v. 33, 3, p. 883-94, 1990.

CONRADY, C. D.; DREVETS, D. A.; CARR, D. J. Herpes simplex type I (HSV-1) infection of the nervous system: is an immune response a good thing? **J Neuroimmunol**, v. 220, 1-2, p. 1-9, 2010.

CORREA, B. A. M. **Modelagem molecular, docking e estudos teóricos do espectro eletrônico de absorção de derivados da benzofenona** 1-111 (Mestrado). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio da Janeiro, 2010.

DE CLERCQ, E. In search of a selective therapy of viral infections. **Antiviral Res**, v. 85, 1, p. 19-24, 2010.

DORELEIJERS, J. F.; RAVES, M. L.; RULLMANN, T.; KAPTEIN, R. Completeness of NOEs in protein structure: a statistical analysis of NMR. **J Biomol NMR**, v. 14, 2, p. 123-32, 1999.

DORELEIJERS, J. F.; RULLMANN, J. A.; KAPTEIN, R. Quality assessment of NMR structures: a statistical survey. **J Mol Biol**, v. 281, 1, p. 149-64, 1998.

EIZURU, Y. Development of new antivirals for herpesviruses. **Antivir Chem Chemother**, v. 14, 6, p. 299-308, 2003.

ESWAR, N.; JOHN, B.; MIRKOVIC, N.; FISER, A.; ILYIN, V. A.; PIEPER, U.; STUART, A. C.; MARTIRENOM, M. A.; MADHUSUDHAN, M. S.; YERKOVICH, B.; SALI, A. Tools for comparative protein structure modeling and analysis. **Nucleic Acids Res**, v. 31, 13, p. 3375-80, 2003.

FISER, A.; DO, R. K.; SALI, A. Modeling of loops in protein structures. **Protein Sci**, v. 9, 9, p. 1753-73, 2000.

FISER, A.; SALI, A. Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models. **Methods Enzymol**, v. 374, p. 461-91, 2003.

FLORE ROZENBERG, C. D., HENRI AGUT Herpes Simplex Encephalitis: From Virus to Therapy. **Infect Disord Drug Targets**, v. 11, 3, p. 235-250, 2011.

GAO, M.; MATUSICK-KUMAR, L.; HURLBURT, W.; DITUSA, S. F.; NEWCOMB, W. W.; BROWN, J. C.; MCCANN, P. J., 3RD; DECKMAN, I.; COLONNO, R. J. The protease of herpes simplex virus type 1 is essential for functional capsid formation and viral growth. **J Virol**, v. 68, 6, p. 3702-12, 1994.

GONÇALVES, R. B. **Desenvolvimento e Validação de Novos Métodos de Distribuição da População Inicial em Algoritmos Genéticos para o Problema de Docking Proteína-Ligante**. . (Mestrado). Laboratório Nacional de Computação Científica, Petrópolis 2008.

GUDMUNDSSON, K. S.; JOHNS, B. A. Imidazo[1,2-a]pyridines with potent activity against herpesviruses. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 17, 10, p. 2735-9, 2007.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, p. 81-98, 2010.

HALGREN, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. **J Comput Chem**, v. 17, 5-6, p. 490-519, 1996.

HAYS, S. J.; CAPRATHE, B. W.; GILMORE, J. L.; AMIN, N.; EMMERLING, M. R.; MICHAEL, W.; NADIMPALLI, R.; NATH, R.; RASER, K. J.; STAFFORD, D.; WATSON, D.; WANG, K.; JAEN, J. C. 2-amino-4H-3,1-benzoxazin-4-ones as inhibitors of C1r serine protease. **J Med Chem**, v. 41, 7, p. 1060-7, 1998.

- HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chem Rev**, v. 102, 12, p. 4501-24, 2002.
- HEDSTROM, L.; MOORMAN, A. R.; DOBBS, J.; ABELES, R. H. Suicide inactivation of chymotrypsin by benzoxazinones. **Biochemistry**, v. 23, 8, p. 1753-9, 1984.
- HEHRE, W. J. A Guide to Molecular Mechanisms and Quantum Chemical Calculations. . INC, W. 2003.
- HEMMATEENEJAD, B.; ELYASI, M. A segmented principal component analysis-regression approach to quantitative structure-activity relationship modeling. **Anal Chim Acta**, v. 646, 1-2, p. 30-8, 2009.
- HEWLETT, G.; HALLENBERGER, S.; RUBSAMEN-WAIGMANN, H. Antivirals against DNA viruses (hepatitis B and the herpes viruses). **Curr Opin Pharmacol**, v. 4, 5, p. 453-64, 2004.
- HONJO, K.; VAN REEKUM, R.; VERHOEFF, N. P. Alzheimer's disease and infection: do infectious agents contribute to progression of Alzheimer's disease? **Alzheimers Dement**, v. 5, 4, p. 348-60, 2009.
- HOOG, S. S.; SMITH, W. W.; QIU, X.; JANSON, C. A.; HELLMIG, B.; MCQUENEY, M. S.; O'DONNELL, K.; O'SHANNESY, D.; DILELLA, A. G.; DEBOUCK, C.; ABDEL-MEGUID, S. S. Active site cavity of herpesvirus proteases revealed by the crystal structure of herpes simplex virus protease/inhibitor complex. **Biochemistry**, v. 36, 46, p. 14023-9, 1997.
- HSIEH, P. W.; HWANG, T. L.; WU, C. C.; CHANG, F. R.; WANG, T. W.; WU, Y. C. The evaluation of 2,8-disubstituted benzoxazinone derivatives as anti-inflammatory and anti-platelet aggregation agents. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 15, 11, p. 2786-9, 2005.
- HUEY, R.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J.; GOODSELL, D. S. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. **J Comput Chem**, v. 28, 6, p. 1145-52, 2007.
- JAKOBSEN, P.; PEDERSEN, B. R.; PERSSON, E. Inhibitors of the tissue factor/factor VIIa-induced coagulation: synthesis and in vitro evaluation of novel specific 2-aryl substituted 4H-3,1-benzoxazin-4-ones. **Bioorg Med Chem**, v. 8, 8, p. 2095-103, 2000.
- JARVEST, R. L.; PARRATT, M. J.; DEBOUCK, C. M.; GORNIK, J. G.; JENNINGS, L. J.; SERAFINOWSKA, H. T.; STRICKLER, J. E. Inhibition of HSV-1 protease by benzoxazinones. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 6, 20, p. 2463-2466, 1996.
- KHAYAT, R.; BATRA, R.; QIAN, C.; HALMOS, T.; BAILEY, M.; TONG, L. Structural and biochemical studies of inhibitor binding to human cytomegalovirus protease. **Biochemistry**, v. 42, 4, p. 885-91, 2003.
- KIEFER, F.; ARNOLD, K.; KUNZLI, M.; BORDOLI, L.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. **Nucleic Acids Res**, v. 37, Database issue, p. D387-92, 2009.
- KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, 11, p. 935-49, 2004.
- KOSHLAND, D. E. The Role of Flexibility in Enzyme Action. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 28, p. 473-482, 1963.
- KRAUSSLICH, H. G.; WIMMER, E. Viral proteinases. **Annu Rev Biochem**, v. 57, p. 701-54, 1988.
- KUHLMANN, I.; MINIHANE, A. M.; HUEBBE, P.; NEBEL, A.; RIMBACH, G. Apolipoprotein E genotype and hepatitis C, HIV and herpes simplex disease risk: a literature review. **Lipids Health Dis**, v. 9, p. 8, 2010.
- LAL, R.; ARNSDORF, M. F. Multidimensional atomic force microscopy for drug discovery: a versatile tool for defining targets, designing therapeutics and monitoring their efficacy. **Life Sci**, v. 86, 15-16, p. 545-62, 2010.
- LASKOWSKI, R. A. PDBsum: summaries and analyses of PDB structures. **Nucleic Acids Res**, v. 29, 1, p. 221-222, 2001.

\_\_\_\_\_. PDBsum new things. **Nucleic Acids Res**, v. 37, p. D355-D359, 2009.

LASKOWSKI, R. A.; CHISTYAKOV, V. V.; THORNTON, J. M. PDBsum more: new summaries and analyses of the known 3D structures of proteins and nucleic acids. **Nucleic Acids Res**, v. 33, p. D266-D268, 2005.

LASKOWSKI, R. A.; HUTCHINSON, E. G.; MICHIE, A. D.; WALLACE, A. C.; JONES, M. L.; THORNTON, J. M. PDBsum: a Web-based database of summaries and analyses of all PDB structures. **Trends Biochem Sci**, v. 22, 12, p. 488-490, 1997.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, 2, p. 283-291, 1993.

LASKOWSKI, R. A.; RULLMANN, J. A.; MACARTHUR, M. W.; KAPTEIN, R.; THORNTON, J. M. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. **J Biomol NMR**, v. 8, 4, p. 477-86, 1996.

LEACH, A. R. Molecular Modelling: Principles and Applications. Pearson Education Limited 2<sup>a</sup> ed., 2001.

LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. Foye's Principles of Medicinal Chemistry. Lippincott Williams & Wilkins, 6 ed ed., 2008.

LIANG, P. H.; BRUN, K. A.; FEILD, J. A.; O'DONNELL, K.; DOYLE, M. L.; GREEN, S. M.; BAKER, A. E.; BLACKBURN, M. N.; ABDEL-MEGUID, S. S. Site-directed mutagenesis probing the catalytic role of arginines 165 and 166 of human cytomegalovirus protease. **Biochemistry**, v. 37, 17, p. 5923-9, 1998.

LILL, M.; DANIELSON, M. Computer-aided drug design platform using PyMOL. **J Comput Aided Mol Des**, v. 25, 1, p. 13-19, 2011.

LIM, M. D.; CRAIK, C. S. Using specificity to strategically target proteases. **Bioorg Med Chem**, v. 17, 3, p. 1094-100, 2009.

LIU, F. Y.; ROIZMAN, B. The herpes simplex virus 1 gene encoding a protease also contains within its coding domain the gene encoding the more abundant substrate. **J Virol**, v. 65, 10, p. 5149-56, 1991.

LUCERO, B.; GOMES, C. R.; FRUGULHETTI, I. C.; FARO, L. V.; ALVARENGA, L.; DE SOUZA, M. C.; DE SOUZA, T. M.; FERREIRA, V. F. Synthesis and anti-HSV-1 activity of quinolonic acyclovir analogues. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 16, 4, p. 1010-3, 2006.

LUPI, O. Herpes simples. **An. Bras.Dermatol.**, v. 75 3, p. 261-275, 2000.

LUTHY, R.; BOWIE, J. U.; EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, v. 356, 6364, p. 83-5, 1992.

MA, D.-L.; CHAN, D. S.-H.; LEE, P.; KWAN, M. H.-T.; LEUNG, C.-H. Molecular modeling of drug-DNA interactions: Virtual screening to structure-based design. **Biochimie**, v. 93, 8, p. 1252-1266, 2011.

MADURGA, S.; BELDA, I.; LLORÀ, X.; GIRALT, E. Design of enhanced agonists through the use of a new virtual screening method: Application to peptides that bind class I major histocompatibility complex (MHC) molecules. **Protein Science**, v. 14, 8, p. 2069-2079, 2005.

MAMIDYALA, S. K.; FIRESTINE, S. M. Advances in herpes simplex virus antiviral therapies. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 16, 11, p. 1463-1480, 2006.

MARNETT, A. B.; NOMURA, A. M.; SHIMBA, N.; ORTIZ DE MONTELLANO, P. R.; CRAIK, C. S. Communication between the active sites and dimer interface of a herpesvirus protease revealed by a transition-state inhibitor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, 18, p. 6870-5, 2004.

- MARQUES, M. A. L.; BOTTI, S. O que é e para que serve a Teoria dos Funcionais da Densidade? . G. Fis. 29 42006.
- MARTI-RENOM, M. A.; STUART, A. C.; FISER, A.; SANCHEZ, R.; MELO, F.; SALI, A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. **Annu Rev Biophys Biomol Struct**, v. 29, p. 291-325, 2000.
- MARTI-RENOM, M. A.; YERKOVICH, B.; SALI, A. **Comparative Protein Structure Prediction**. Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, Inc. 2001.
- MARTINS, F. T.; ASSIS, D. M.; DOS SANTOS, M. H.; CAMPS, I.; VELOSO, M. P.; JULIANO, M. A.; ALVES, L. C.; DORIGUETTO, A. C. Natural polyprenylated benzophenones inhibiting cysteine and serine proteases. **Eur J Med Chem**, v. 44, 3, p. 1230-9, 2009.
- MELO, F.; SANCHEZ, R.; SALI, A. Statistical potentials for fold assessment. **Protein Sci**, v. 11, 2, p. 430-48, 2002.
- MO, Y.; SUBRAMANIAN, G.; GAO, J.; FERGUSON, D. M. Cation- $\pi$  Interactions: An Energy Decomposition Analysis and Its Implication in  $\delta$ -Opioid Receptor-Ligand Binding. **J Am Chem Soc**, v. 124, 17, p. 4832-4837, 2002.
- MONTANARI, C. A. A química medicinal na próxima década. **Química Nova**, v. 23, p. 134-137, 2000.
- MORGON, N. H.; COUTINHO, K. Métodos de química teórica e modelagem molecular. Editora Livraria de Física, 1ª Ed ed., 2007.
- MORI, I. Herpes simplex virus type 1 persists in the aged brain through hypothetical expression of accessory genes. **J Neurovirol**, v. 16, 3, p. 203-7, 2010.
- MORRIS, G. M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; LI, C.; ZHAO, Y.; HART, W. E.; BELEW, R.; SANNER, M. F.; GOODSELL, D. S.; OLSON, A. J. Recent advances in AutoDock: Search, representation and scoring. 2004. Disponível em: <<http://oasys2.confex.com/acs/228nm/techprogram/P749648.HTM>>. Acesso em: 24-05-2012.
- MORRIS, G. M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M. F.; BELEW, R. K.; GOODSELL, D. S.; OLSON, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **J Comput Chem**, v. 30, 16, p. 2785-91, 2009.
- NEWCOMB, W. W.; HOMA, F. L.; THOMSEN, D. R.; BROWN, J. C. In Vitro Assembly of the Herpes Simplex Virus Procapsid: Formation of Small Procapsids at Reduced Scaffolding Protein Concentration. **Journal of Structural Biology**, v. 133, 1, p. 23-31, 2001.
- NEWCOMB, W. W.; HOMA, F. L.; THOMSEN, D. R.; TRUS, B. L.; CHENG, N.; STEVEN, A.; BOOY, F.; BROWN, J. C. Assembly of the Herpes Simplex Virus Procapsid from Purified Components and Identification of Small Complexes Containing the Major Capsid and Scaffolding Proteins. **J Virol**, v. 73, 5, p. 4239-4250, 1999.
- NOLKEMPER, S.; REICHLING, J.; SENSCH, K. H.; SCHNITZLER, P. Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts. **Phytomedicine**, v. 17, 2, p. 132-8, 2010.
- NOTREDAME, C.; HIGGINS, D. G.; HERINGA, J. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. **J Mol Biol**, v. 302, 1, p. 205-17, 2000.
- OSTERBERG, F.; MORRIS, G. M.; SANNER, M. F.; OLSON, A. J.; GOODSELL, D. S. Automated docking to multiple target structures: incorporation of protein mobility and structural water heterogeneity in AutoDock. **Proteins**, v. 46, 1, p. 34-40, 2002.
- ÖSTERBERG, F. E. **Implementation and evaluation of high throughput docking using AutoDock and medial maps**. Molecular Biotechnology Programme, Uppsala University School of Engineering 2000.
- PEITSCH, M. C. Protein Modeling by E-mail. **Nat Biotech**, v. 13, 7, p. 658-660, 1995.

PIEPER, U.; ESWAR, N.; BRABERG, H.; MADHUSUDHAN, M. S.; DAVIS, F. P.; STUART, A. C.; MIRKOVIC, N.; ROSSI, A.; MARTI-RENOM, M. A.; FISER, A.; WEBB, B.; GREENBLATT, D.; HUANG, C. C.; FERRIN, T. E.; SALI, A. MODBASE, a database of annotated comparative protein structure models, and associated resources. **Nucleic Acids Res**, v. 32, Database issue, p. D217-22, 2004.

PIERRI, C. L.; PARISI, G.; PORCELLI, V. Computational approaches for protein function prediction: A combined strategy from multiple sequence alignment to molecular docking-based virtual screening. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics**, v. 1804, 9, p. 1695-1712, 2010.

POWERS, J. C.; ASGIAN, J. L.; EKICI, O. D.; JAMES, K. E. Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. **Chem Rev**, v. 102, 12, p. 4639-750, 2002.

PYRKOV, T.; OZEROV, I.; BALITSKAYA, E.; EFREMOV, R. Molecular docking: The role of noncovalent interactions in the formation of protein-nucleotide and protein-peptide complexes. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 36, 4, p. 446-455, 2010.

QIU, X.; CULP, J. S.; DILELLA, A. G.; HELLMIG, B.; HOOG, S. S.; JANSON, C. A.; SMITH, W. W.; ABDEL-MEGUID, S. S. Unique fold and active site in cytomegalovirus protease. **Nature**, v. 383, 6597, p. 275-9, 1996.

REGISTER, R. B.; SHAFER, J. A. Alterations in catalytic activity and virus maturation produced by mutation of the conserved histidine residues of herpes simplex virus type 1 protease. **J Virol**, v. 71, 11, p. 8572-81, 1997.

REILING, K. K.; PRAY, T. R.; CRAIK, C. S.; STROUD, R. M. Functional consequences of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus protease structure: regulation of activity and dimerization by conserved structural elements. **Biochemistry**, v. 39, 42, p. 12796-803, 2000.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **J Mol Biol**, v. 234, 3, p. 779-815, 1993.

SALI, A.; OVERINGTON, J. P. Derivation of rules for comparative protein modeling from a database of protein structure alignments. **Protein Sci**, v. 3, 9, p. 1582-96, 1994.

SALONEN, L. M.; BUCHER, C.; BANNER, D. W.; HAAP, W.; MARY, J.-L.; BENZ, J.; KUSTER, O.; SEILER, P.; SCHWEIZER, W. B.; DIEDERICH, F. Cation- $\pi$  Interactions at the Active Site of Factor Xa: Dramatic Enhancement upon Stepwise N-Alkylation of Ammonium Ions. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 48, 4, p. 811-814, 2009.

SANCHEZ, R.; SALI, A. Comparative protein structure modeling. Introduction and practical examples with modeller. **Methods Mol Biol**, v. 143, p. 97-129, 2000.

SANT'ANNA, C. M. R. Métodos de Modelagem Molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução. **Rev. Virtual Quim.**, v. 1, 1, p. 49-57, 2009.

SCHMIDT, U.; DARKE, P. L. Dimerization and Activation of the Herpes Simplex Virus Type 1 Protease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, 12, p. 7732-7735, 1997.

SHREDER, K. R.; CAJICA, J.; DU, L.; FRASER, A.; HU, Y.; KOHNO, Y.; LIN, E. C.; LIU, S. J.; OKERBERG, E.; PHAM, L.; WU, J.; KOZARICH, J. W. Synthesis and optimization of 2-pyridin-3-yl-benzo[d][1,3]oxazin-4-one based inhibitors of human neutrophil elastase. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 19, 16, p. 4743-6, 2009.

SIKALLIS, G.; SPANDIDOS, D. A.; SOURVINOS, G. Herpesviridae and novel inhibitors. **Antivir Ther**, v. 14, 8, p. 1051-64, 2009.

SODERO, A. C. R. **Modelagem Molecular de Aspartil Proteases de Schistosoma mansoni (SmAPs) para o Desenvolvimento de Potenciais Moléculas Esquistossomicidas**. (Doutorado). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.



- STIERAND, K.; RAREY, M. Drawing the PDB: Protein–Ligand Complexes in Two Dimensions. **ACS Med Chem Lett**, v. 1, 9, p. 540-545, 2010.
- TAYLOR, R. D.; JEWSEBURY, P. J.; ESSEX, J. W. A review of protein-small molecule docking methods. **J Comput Aided Mol Des**, v. 16, 3, p. 151-66, 2002.
- TERAMOTO, R.; FUKUNISHI, H. Supervised consensus scoring for docking and virtual screening. **J Chem Inf Model**, v. 47, 2, p. 526-34, 2007.
- TONG, L. Viral proteases. **Chem Rev**, v. 102, 12, p. 4609-26, 2002.
- TONG, L.; QIAN, C.; MASSARIOL, M. J.; BONNEAU, P. R.; CORDINGLEY, M. G.; LAGACE, L. A new serine-protease fold revealed by the crystal structure of human cytomegalovirus protease. **Nature**, v. 383, 6597, p. 272-5, 1996.
- TOSTES, J. G. Estrutura molecular: o conceito fundamental da química. **Química Nova na Escola**, v. 7, p. 17-20, 1998.
- TURNER, G. W.; TEDESCO, E.; HARRIS, K. D. M.; JOHNSTON, R. L.; KARIUKI, B. M. Implementation of Lamarckian concepts in a Genetic Algorithm for structure solution from powder diffraction data. **Chemical Physics Letters**, v. 321, 3–4, p. 183-190, 2000.
- VERLI, H.; BARREIRO, E. J. Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores. **Química Nova**, v. 28, p. 95-102, 2005.
- VIEIRA, M. R. **Estudo da Biorredução de compostos carbonílicos por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* sp.** (Mestrado). Centro de Ciências, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2006.
- WATANABE, D. Medical application of herpes simplex virus. **J Dermatol Sci**, v. 57, 2, p. 75-82, 2010.
- WAXMAN, L.; DARKE, P. L. The herpesvirus proteases as targets for antiviral chemotherapy. **Antivir Chem Chemother**, v. 11, 1, p. 1-22, 2000.
- WELCH, A. R.; MCNALLY, L. M.; HALL, M. R.; GIBSON, W. Herpesvirus proteinase: site-directed mutagenesis used to study maturational, release, and inactivation cleavage sites of precursor and to identify a possible catalytic site serine and histidine. **J Virol**, v. 67, 12, p. 7360-7372, 1993.
- WERMUTH, C. G. *The Practice of Medicinal Chemistry*. 2 ed ed., 2003.
- WILLIAMS, C. H.; HONG, C. C. Multi-step usage of in vivo models during rational drug design and discovery. **Int J Mol Sci**, v. 12, 4, p. 2262-74, 2011.
- YAN, A.; CHONG, Y.; WANG, L.; HU, X.; WANG, K. Prediction of biological activity of Aurora-A kinase inhibitors by multilinear regression analysis and support vector machine. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 21, 8, p. 2238-43, 2011.
- ZENG, Q. H.; YU, A. B.; LU, G. Q. Multiscale modeling and simulation of polymer nanocomposites. **Progress in Polymer Science**, v. 33, 2, p. 191-269, 2008.

**APÊNDICE A** – Tabelas dos resultados de docking molecular da série de benzoxazinonas (12-29)

Tabela 8: Parâmetros agrupados do arquivo de saída do programa AutoDock4.2 no cálculo do composto 12 do grupo de benzoxazinonas.

Parâmetros arquivo de saída AutoDock (Composto 12)	Aglomerado de Menor Energia	Aglomerado Mais Populoso
Posição do aglomerado	1	2
Número de conformações	45	55
Menor energia de ligação	-3,42	-2,82
Número total de aglomerados	2	

Tabela 9: Parâmetros agrupados do arquivo de saída do programa AutoDock4.2 no cálculo do composto 13 do grupo de benzoxazinonas.

Parâmetros arquivo de saída AutoDock (Composto 13)	Aglomerado de Menor Energia	Aglomerado Mais Populoso
Posição do aglomerado	1	2
Número de conformações	21	78
Menor energia de ligação	-2,60	-2,57
Número total de aglomerados	3	

Tabela 10: Parâmetros agrupados do arquivo de saída do programa AutoDock4.2 no cálculo do composto 14 do grupo de benzoxazinonas.

Parâmetros arquivo de saída AutoDock (Composto 14)	Aglomerado de Menor Energia	Aglomerado Mais Populoso
Posição do aglomerado	1	3
Número de conformações	15	47
Menor energia de ligação	-4,90	-4,65
Número total de aglomerados	6	

Tabela 11: Parâmetros agrupados do arquivo de saída do programa AutoDock4.2 no cálculo do composto 15 do grupo de benzoxazinonas.

Parâmetros arquivo de saída	Aglomerado de Menor	Aglomerado Mais
AutoDock (Composto 15)	Energia	Populoso
Posição do aglomerado	1	2
Número de conformações	7	31
Menor energia de ligação	-2,12	-1,95
Número total de aglomerados	14	

Tabela 12: Parâmetros agrupados do arquivo de saída do programa AutoDock4.2 no cálculo do composto 16 do grupo de benzoxazinonas.

Parâmetros arquivo de saída	Aglomerado de Menor	Aglomerado Mais
AutoDock (Composto 16)	Energia	Populoso
Posição do aglomerado	1	2
Número de conformações	1	24
Menor energia de ligação	-1,75	-1,03
Número total de aglomerados	23	

Tabela 13: Parâmetros agrupados do arquivo de saída do programa AutoDock4.2 no cálculo do composto 17 do grupo de benzoxazinonas.

Parâmetros arquivo de saída	Aglomerado de Menor	Aglomerado Mais
AutoDock (Composto 17)	Energia	Populoso
Posição do aglomerado	1	1
Número de conformações	60	60
Menor energia de ligação	-2,02	-2,02
Número total de aglomerados	3	

Tabela 14: Parâmetros agrupados do arquivo de saída do programa AutoDock4.2 no cálculo do composto 18 do grupo de benzoxazinonas.

Parâmetros arquivo de saída	Aglomerado de Menor	Aglomerado Mais
AutoDock (Composto 18)	Energia	Populoso
Posição do aglomerado	1	1
Número de conformações	82	82
Menor energia de ligação	-2,62	-2,62
Número total de aglomerados	3	

Tabela 15: Parâmetros agrupados do arquivo de saída do programa AutoDock4.2 no cálculo do composto 19 do grupo de benzoxazinonas.

Parâmetros arquivo de saída	Aglomerado de Menor	Aglomerado Mais
AutoDock (Composto 19)	Energia	Populoso
Posição do aglomerado	1	1
Número de conformações	98	98
Menor energia de ligação	-3,65	-3,65
Número total de aglomerados	2	

Tabela 16: Parâmetros agrupados do arquivo de saída do programa AutoDock4.2 no cálculo do composto 20 do grupo de benzoxazinonas.

Parâmetros arquivo de saída	Aglomerado de Menor	Aglomerado Mais
AutoDock (Composto 20)	Energia	Populoso
Posição do aglomerado	1	1
Número de conformações	80	80
Menor energia de ligação	-2,95	-2,95
Número total de aglomerados	2	

Tabela 17: Parâmetros agrupados do arquivo de saída do programa AutoDock4.2 no cálculo do composto 21 do grupo de benzoxazinonas.

Parâmetros arquivo de saída	Aglomerado de Menor	Aglomerado Mais
AutoDock (Composto 21)	Energia	Populoso
Posição do aglomerado	1	2
Número de conformações	17	45
Menor energia de ligação	-2,73	-2,68
Número total de aglomerados	5	

Tabela 18: Parâmetros agrupados do arquivo de saída do programa AutoDock4.2 no cálculo do composto 22 do grupo de benzoxazinonas.

Parâmetros arquivo de saída	Aglomerado de Menor	Aglomerado Mais
AutoDock (Composto 22)	Energia	Populoso
Posição do aglomerado	1	1
Número de conformações	67	67
Menor energia de ligação	-2,29	-2,29
Número total de aglomerados	5	

Tabela 19: Parâmetros agrupados do arquivo de saída do programa AutoDock4.2 no cálculo do composto 23 do grupo de benzoxazinonas.

Parâmetros arquivo de saída	Aglomerado de Menor	Aglomerado Mais
AutoDock (Composto 23)	Energia	Populoso
Posição do aglomerado	1	1
Número de conformações	87	87
Menor energia de ligação	-2,21	-2,21
Número total de aglomerados	4	

Tabela 20: Parâmetros agrupados do arquivo de saída do programa AutoDock4.2 no cálculo do composto 24 do grupo de benzoxazinonas.

Parâmetros arquivo de saída AutoDock (Composto 24)	Aglomerado de Menor Energia	Aglomerado Mais Populoso
Posição do aglomerado	1	2
Número de conformações	5	52
Menor energia de ligação	-3,03	-2,84
Número total de aglomerados	11	

Tabela 21: Parâmetros agrupados do arquivo de saída do programa AutoDock4.2 no cálculo do composto 25 do grupo de benzoxazinonas.

Parâmetros arquivo de saída AutoDock (Composto 25)	Aglomerado de Menor Energia	Aglomerado Mais Populoso
Posição do aglomerado	1	1
Número de conformações	50	50
Menor energia de ligação	-1,81	-1,81
Número total de aglomerados	15	

Tabela 22: Parâmetros agrupados do arquivo de saída do programa AutoDock4.2 no cálculo do composto 26 do grupo de benzoxazinonas.

Parâmetros arquivo de saída AutoDock (Composto 26)	Aglomerado de Menor Energia	Aglomerado Mais Populoso
Posição do aglomerado	1	1
Número de conformações	35	35
Menor energia de ligação	-3,61	-3,61
Número total de aglomerados	10	

Tabela 23: Parâmetros agrupados do arquivo de saída do programa AutoDock4.2 no cálculo do composto 27 do grupo de benzoxazinonas.

Parâmetros arquivo de saída AutoDock (Composto 27)	Aglomerado de Menor Energia	Aglomerado Mais Populoso
Posição do aglomerado	1	1
Número de conformações	72	72
Menor energia de ligação	-3,53	-3,53
Número total de aglomerados		4

Tabela 24: Parâmetros agrupados do arquivo de saída do programa AutoDock4.2 no cálculo do composto 28 do grupo de benzoxazinonas.

Parâmetros arquivo de saída AutoDock (Composto 28)	Aglomerado de Menor Energia	Aglomerado Mais Populoso
Posição do aglomerado	1	3
Número de conformações	9	62
Menor energia de ligação	-3,37	-3,30
Número total de aglomerados		5

Tabela 25: Parâmetros agrupados do arquivo de saída do programa AutoDock4.2 no cálculo do composto 29 do grupo de benzoxazinonas.

Parâmetros arquivo de saída AutoDock (Composto 29)	Aglomerado de Menor Energia	Aglomerado Mais Populoso
Posição do aglomerado	1	2
Número de conformações	19	30
Menor energia de ligação	-3,94	-3,74
Número total de aglomerados		9

**APENDICE B** - Distâncias de ligações hidrogênio entre as moléculas benzoxazinonas e os resíduos de aminoácidos listados.

Moléculas	Distância de ligação hidrogênio para cada resíduo							
	Arg157	Arg156	His148	Arg134	Lys133	Thr132	Ser129	Glu38
12	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	2,9	-	-
14	-	3,0	-	-	-	2,7	-	-
15	3,0	-	-	-	-	-	-	2,7
16	3,1				2,8			
17	2,7	-	-	-	-	2,8	-	-
18	-	2,8 3,0	-	-	-	-	-	-
19						3,4		
20	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	3,3 3,0	-	-	-	-	-	-
22				3,1	3,0			
23	-	1,8	-	-	-	3,1	-	-
24		3,1	2,9					
25	-	-	-	-	2,7	-	-	-
26	3,1 2,9	-	-	-	-	3,2	3,0	-
27	-	3,3 3,1	-	-	-	-	-	-
28	3,0	-	-	-	-	2,8	-	-
29	3,1	2,9	-	-	-	3,4	-	-