



MODELAGEM MOLECULAR NO ENSINO DE QUÍMICA FARMACÊUTICA

Molecular modeling on medicinal chemistry education

Carolina Horta Andrade^{1*}, Gustavo Henrique Goulart Trossini², Elizabeth Igne Ferreira³

¹ Farmacêutica. Dra. em Fármaco e Medicamentos pela Universidade de São Paulo.

² Farmacêutico. Dr. em Fármaco e Medicamentos pela Universidade de São Paulo.

³ Farmacêutica, Dra. em Química Orgânica. Professora Titular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP. Av. Prof. Lineu Prestes 580, Bloco 13 São Paulo (SP), 05508-900, Brasil.

E-mail do autor para correspondência: carolhorta@usp.br

Recebido em 12/02/2010 - Aceito em 25/02/2010

RESUMO: A modelagem molecular é uma importante ferramenta para auxiliar o entendimento de conceitos fundamentais de relações estrutura-atividade e mecanismo de ação de fármacos na disciplina de Química Farmacêutica (QF). As propriedades físico-químicas, bem como a visualização tridimensional das propriedades esteroeletrônicas moleculares e elucidação da interação entre fármacos e macromoléculas-alvo podem ser calculadas e/ou sugeridas por programas de modelagem molecular. Assim sendo, no presente trabalho foi realizada uma abordagem prática na disciplina de QF utilizando as ferramentas da modelagem molecular, visando o melhor entendimento dos alunos no planejamento de fármacos e nas relações entre estrutura química e atividade biológica. Os conceitos estudados foram relacionados à propriedades estruturais e eletrônicas que estão envolvidas nos mecanismos de ação de substâncias biologicamente ativas. Desta maneira, foram contextualizados os fundamentos de QF, de maneira a serem relacionados com suas aplicações, e mostrou-se de grande valia processo interativo de ensino e aprendizagem.

Palavras chaves: Modelagem Molecular, Ensino, Química Farmacêutica, Propriedades Moleculares, Relações Estrutura-Atividade.

ABSTRACT: Molecular modeling is a useful tool to aid the understanding of fundamental concepts of structure-activity relationships and mechanism of action of drugs in a medicinal chemistry course. The relevant molecular features of drugs are investigated by 3D visualization, their physical-chemical properties measured, and the molecular interaction pattern on target macromolecules can

be calculated or suggested by molecular modeling softwares. In this paper, we describe a practical approach to introduce medicinal chemistry concepts using molecular modeling as a tool, aimed at a better understanding of students for drug design and structure–activity relationships. The concepts studied were correlated to structural and electronic properties that are involved in the mechanisms of action of biologically active substances. Thus, were contextualized the fundamentals of medicinal chemistry, so as to be associated to their applications, and proved very useful interactive process of teaching and learning.

KEY WORDS: Molecular Modeling, Teaching, Medicinal Chemistry, Molecular Properties, Structure-activity Relationships.

INTRODUÇÃO

Um dos mais importantes avanços no planejamento e na descoberta de novos fármacos tem sido a utilização da modelagem molecular (MM). Atualmente, a MM é uma ferramenta indispensável não somente no processo de descoberta de novos fármacos, mas também na otimização de protótipos já existentes e no planejamento racional de candidatos a fármacos (COHEN, 1996; SANT'ANNA, 2002; CARVALHO *et al.*, 2005; WERMUTH, 2009). Segundo a IUPAC, a MM é a investigação das estruturas e das propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica, visando fornecer uma representação tridimensional, sob um dado conjunto de circunstâncias (SANT'ANNA, 2002):

O grande desenvolvimento da MM nos últimos anos deveu-se em grande parte ao avanço dos recursos computacionais em termos de *hardware* (velocidade de cálculo) e de *software* (programas computacionais), além dos avanços em química computacional, ressonância magnética nuclear, cristalografia de raios-X, bioquímica e biologia molecular (COHEN, 1996). Isto permitiu grande contribuição na descoberta de candidatos a fármacos, conduzindo a rápidos progressos em pesquisas e despertando o interesse tanto do meio acadêmico como de indústrias farmacêuticas (COHEN, 1996; WERMUTH, 2009).

Além disso, a MM pode desempenhar importante papel no processo interativo de ensino e aprendizagem, por ressaltar aspectos importantes das disciplinas de Planejamento de Fármacos e Química Farmacêutica (QF) (COHEN, 1996; SANT'ANNA, 2002; CARVALHO *et al.*, 2005; WERMUTH, 2009). Como

conseqüência, a elucidação dos mecanismos envolvidos nas ações moleculares dos fármacos pode ser compreendida pela integração de conhecimentos fundamentais de Química Orgânica, Bioquímica, Biologia Molecular e Farmacologia. Os estudos de propriedades estéricas, eletrônicas e físico-químicas, de mecanismo de ação, das relações entre estrutura química e atividade biológica (SAR) e das interações fármaco/ligante-receptor são aspectos que podem ser explorados através da MM (SANT'ANNA, 2002; CARVALHO *et al.*, 2005; WERMUTH, 2009).

Além de auxiliar na compreensão destes conteúdos, a aplicação da MM a problemas de interesse pode ser inserida com a finalidade de contextualizar o ensino de QF, podendo ainda despertar o interesse do aluno para atividades de pesquisa na área.

Dentre os principais objetivos da MM, podem-se citar:

- Construção, desenho, manipulação e visualização gráfica de estruturas moleculares;
- Determinação e análise de propriedades moleculares (eletrônicas e geométricas);
- Estudo da interação fármaco/ligante com o receptor/sítio de ação;
- Proposição de novos candidatos a fármacos: aplicação da ferramenta de Planejamento de Fármacos Auxiliado por Computador (CADD, "Computer-Assisted Drug Design").

Dentro deste contexto, neste trabalho descrevemos a aplicação da Modelagem Molecular como ferramenta para o ensino de

Química Farmacêutica (QF), visando auxiliar o estudo das relações entre estrutura química e atividade biológica e das interações entre fármaco e receptor.

As aulas práticas propostas foram ministradas no contexto da disciplina de QF, juntamente com os conteúdos específicos das aulas teóricas. Cabe ressaltar que este curso prático foi realizado utilizando apenas programas de domínio público, a fim de facilitar sua aplicação por qualquer Instituição de Ensino Superior (IES) do país.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Os procedimentos de desenho tridimensional (3D), minimização de energia, otimização da geometria, análise conformacional e cálculos de propriedades e superfícies foram realizados empregando o programa VegaZZ (PEDRETTI *et al.*, 2002), disponível no site www.vegazz.net. Diversos parâmetros físico-químicos foram calculados no programa VegaZZ, incluindo distâncias interatômicas, ângulos diédricos, volume, comprimento e peso moleculares, coeficiente de partição (ClogP), polaridade, conectividade molecular, momento dipolar, entre outros. A visualização e análise das interações entre fármaco-receptor foram realizadas nos programas Discovery Studio (DS) Visualizer (DISCOVERY, 2007) e PyMOL (DELANO, 2004).

Para ilustrar aplicação de técnicas de MM no curso prático de QF, selecionamos algumas aulas práticas, que compreendem o estudo das características e propriedades das seguintes classes de fármacos: antibióticos β -lactâmicos, tuberculostáticos, antivirais, hipnoanalgésicos,

analgésicos e antiinflamatórios não esteróides (AINES) e benzodiazepínicos.

De modo geral, a metodologia empregada para a realização das aulas práticas utilizando o programa VegaZZ (PEDRETTI *et al.*, 2002), compreendeu as etapas:

- 1) Desenho tridimensional das estruturas;
- 2) Cálculo das cargas parciais e minimização da energia (métodos de mecânica molecular MM2 ou MM+);
- 3) Análise conformacional – apenas dos ângulos torsionais flexíveis;
- 4) Cálculo de ponto de carga única (*Single point*) – métodos semi-empíricos AM1 ou PM3;
- 5) Obtenção das propriedades moleculares: Superfícies de mapas de potencial eletrostático (MEP), volume molecular, área superficial, momento dipolar, ClogP.

A análise conformacional de uma molécula é realizada pela rotação de uma ligação, com mudança paralela dos ângulos torsionais ou diédricos das ligações, e cálculos correspondentes de energia estérica, decorrente da sobreposição espacial de átomos não-ligados e barreiras torsionais de rotação.

As duas aproximações que têm sido usadas predominantemente em estudos de modelagem molecular são a clássica, que inclui os métodos da mecânica molecular e dinâmica molecular, e a aproximação quântica, que inclui os métodos *ab initio* e semi-empíricos. De modo geral, a escolha entre estas aproximações depende das propriedades que se deseja avaliar, da precisão desejada e da capacidade computacional disponível para a realização dos cálculos.

ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Antibióticos β -lactâmicos

A penicilina foi descoberta em 1928, pelo médico e bacteriologista escocês Alexander Fleming e está disponível como fármaco desde 1941, sendo o primeiro antibiótico a ser utilizado com sucesso (PATRICK, 2009). O termo penicilina delimita o grupo de antibióticos β -lactâmicos, do qual as cefalosporinas também fazem parte. Estes fármacos contêm em sua

estrutura um anel β -lactâmico, que interage com proteínas denominadas ligantes de penicilinas: PBPs (*Penicillin Binding Protein*), inibindo a enzima transpeptidase, responsável pela ligação cruzada entre as cadeias de tetrapeptídeos do peptideoglicano. Com isso, há o impedimento da formação das ligações entre os tetrapeptídeos de cadeias adjacentes de peptideoglicano, ocasionando inibição da síntese da parede celular. Todas penicilinas possuem a mesma estrutura geral: um anel tiazolidínico unido a um anel β -lactâmico ligado a um grupo amida (PATRICK, 2009) (Figura 1).

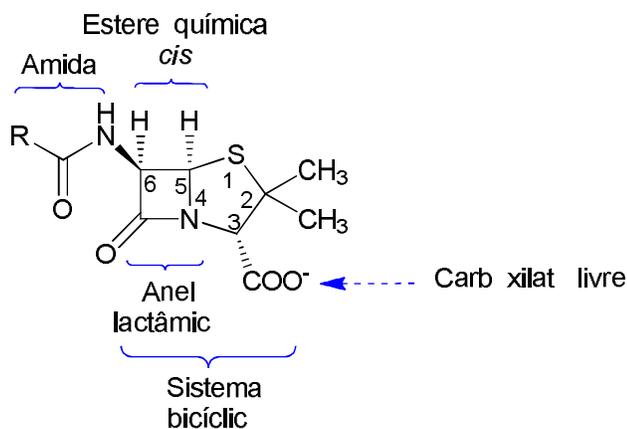


Figura 1 – Estrutura geral das penicilinas e as relações estrutura-atividade. As características destacadas são essenciais para a atividade biológica.

Devido a não coplanaridade entre os dois anéis, a estabilização do grupo carbonila da amida terciária é impossível no anel β -lactâmico e, assim, o grupo carbonila é mais eletrofílico que o esperado. A instabilidade em meio ácido da benzilpenicilina é devido a não-deslocalização dos elétrons nas duas carbonilas, ou seja, em meio ácido, ocorrem reações intramoleculares, iniciadas pelo oxigênio nucleofílico (amida) da cadeia lateral (Esquema 1).

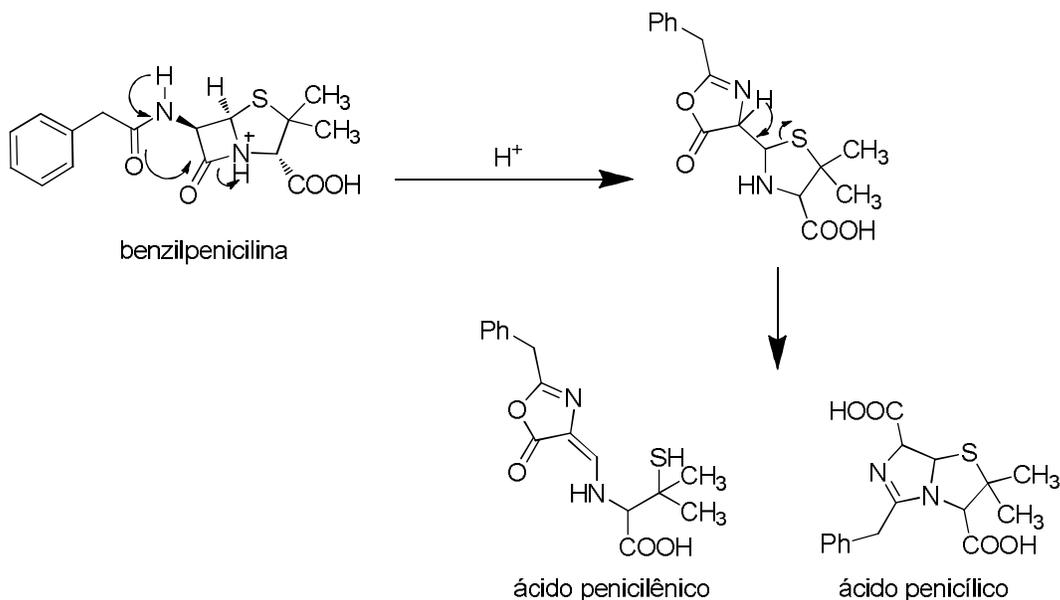
Para resolver o problema de instabilidade em meio ácido, é necessário adicionar no substituinte R (Figura 1) um grupo retirador de elétrons (eletronegativo), que por efeito indutivo, impede o rearranjo do anel.

Nesta aula prática os alunos puderam calcular e visualizar as cargas parciais atômicas para melhor compreender a instabilidade em meio ácido da benzilpenicilina, utilizando o programa VegaZZ. Além disso, foi possível

observar as características geométricas e moleculares essenciais para a atividade biológica dos antibióticos β -lactâmicos, como a conformação angulosa do sistema bicíclico,

assim como sua semelhança estrutural com a molécula D-alanil-D-alanina.

O entendimento do mecanismo de ação de antibióticos β -lactâmicos depende, em



Esquema 1 - Instabilidade da benzilpenicilina em meio ácido.

grande parte, da análise da reatividade do fármaco. Dentro deste contexto, é possível analisar a reatividade da molécula da benzilpenicilina. A sensibilidade da benzilpenicilina em meio ácido pode ser justificada por três fatores: (i) a tensão torsional do anel β -lactâmico, (ii) a alta reatividade do carbono carbonílico β -lactâmico e (iii) a influência do grupo acila (amida) da cadeia lateral (PATRICK, 2009). Em contrapartida, os antibióticos β -lactâmicos ácido-resistentes, como a ampicilina e amoxicilina, possuem o grupo amino adjacente à carbonila (amida) da cadeia lateral, que retira elétrons do grupo amida vizinho e, conseqüentemente, diminui o ataque junto ao anel β -lactâmico. O estudo da reatividade dos β -lactâmicos torna-se mais compreensível

quando se analisam as superfícies de distribuição de cargas ou mapas de potencial eletrostáticos (MEPs) (Figura 2) e as cargas parciais atômicas.

As diferenças de carga dos átomos correspondentes de oxigênio (carbonílico) da amida lateral da penicilina (-0,34) e ampicilina (-0,28) podem ser visualizadas pelo emprego do método semi-empírico AM1, disponível no pacote MOPAC do programa VegaZZ. A presença do grupo α -amino, adicional na ampicilina, diminui a carga negativa do átomo de oxigênio da amida lateral, tornando-o menos reativo para realizar ataque nucleofílico no carbono carbonílico do anel β -lactâmico em meio ácido. As cargas dos átomos de carbono e nitrogênio da função amida da ampicilina são alterados em menor proporção, como podem

ser observados na Figura 2 e na Tabela 1.

Com relação ao mecanismo de ação, tem sido proposto que as penicilinas possuem uma conformação semelhante à conformação do estado de transição da molécula D-alanil-D-alanina durante a reação de ligação cruzada

entre as cadeias de tetrapeptídeos do peptidoglicano. Assim a penicilina se liga no sítio ativo da enzima transpeptidase, impedindo a ligação da D-alanil-D-alanina, inibindo assim, a síntese da parede celular bacteriana (PATRICK, 2009).

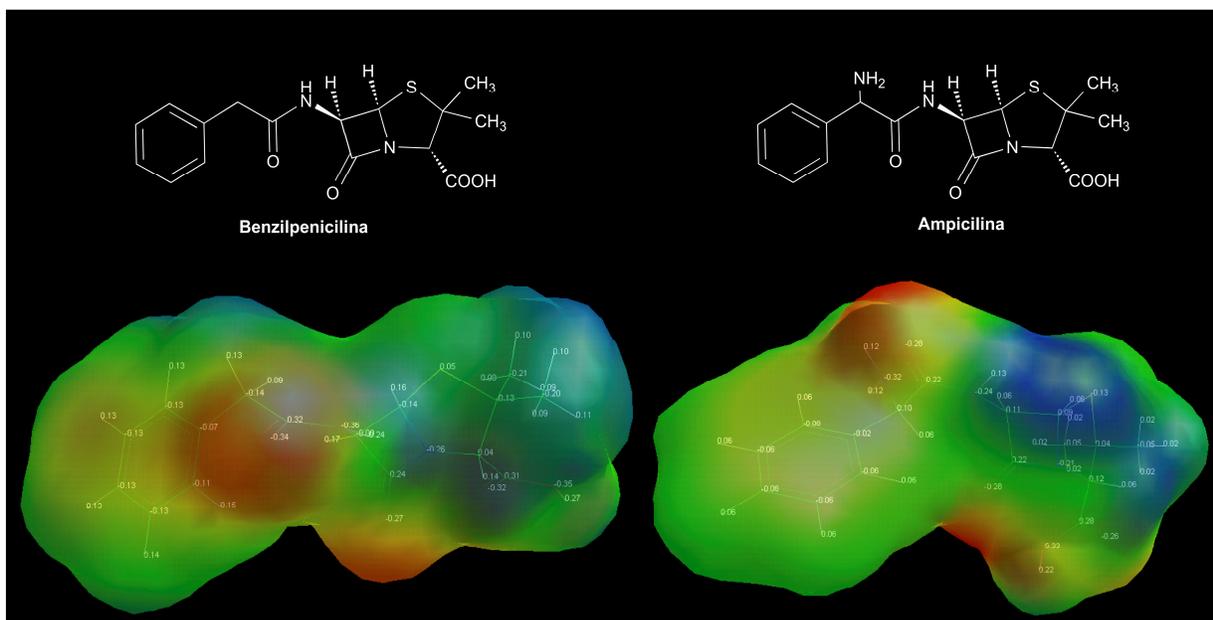


Figura 2 – Representação dos mapas de potencial eletrostático (MEPs) da benzilpenicilina e da ampicilina, evidenciando as cargas parciais atômicas. MEPs apresentados na faixa de -65 (vermelho intenso) a +40 (azul intenso) kcal/mol.

Tabela 1 – Cargas parciais atômicas do grupo amida dos antibióticos β -lactâmicos, calculadas utilizando o método semi-empírico AM1.

| Antibiótico β -lactâmico | Cargas parciais atômicas da amida | | |
|--------------------------------|-----------------------------------|-------|-------|
| | C | O | N |
| benzilpenicilina | -0,32 | -0,34 | -0,36 |
| ampicilina | -0,22 | -0,28 | -0,24 |

As semelhanças espaciais entre antibióticos β -lactâmicos e o grupamento D-alanil-D-alanina

do peptidoglicano foram observadas na aula prática, como demonstrado na Figura 3.

Tuberculostáticos

A atividade antimicrobacteriana da

isoniazida (INH) foi descoberta em 1952 e ainda hoje a INH é considerada como fármaco-base da quimioterapia anti-TB (Figura 4), tanto para infecções ativas quanto para aquelas latentes. Isso é devido à excelente atividade, ao baixo custo e à relativamente baixa toxicidade deste fármaco (VILCHÊZE *et al.*, 2006). A INH é um pró-fármaco (bioprecursor), que precisa ser ativada *in vivo* pela enzima KatG, uma

catalase-peroxidase micobacteriana, para gerar suas formas ativas, ânion e radical, e estas formam um complexo covalente com o cofator NAD, no sítio ativo da enzima enoil-ACP redutase do *M. tuberculosis* (InhA), inativando-a. A inibição da InhA irá interromper a biossíntese dos ácidos micólicos, principais constituintes da parede celular micobacteriana (ROZWARSKI *et al.*, 1998).

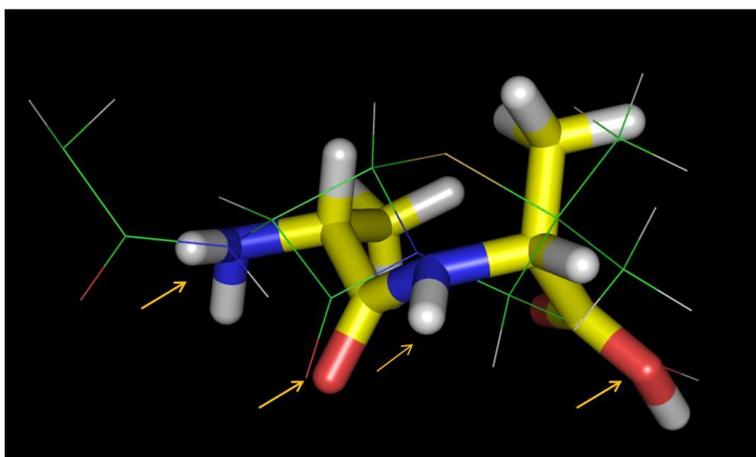


Figura 3 – Sobreposição da benzilpenicilina (átomos de carbono em verde) com a D-alanil-D-alanina (átomos de carbono em amarelo, apresentados em tubo). O grupamento lateral da benzilpenicilina foi omitido para a melhor visualização. Os grupos importantes sobrepostos estão indicados com uma seta.

Visto que o mecanismo predominante de resistência à INH resulta de mutações na no gene *katG*, agentes que inibem a InhA, mas que não requerem ativação pela KatG, são promissores como novos compostos com atividade contra cepas multi-resistentes (MDR-TB) e extensivamente resistentes (XDR-TB) (ANDRADE *et al.*, 2008; LU and TONG, 2008). Já a triclosana (TCL) é um bisfenol clorado (Figura 4), originalmente patenteada como herbicida, mas logo descobriu-se seu amplo espectro antibacteriano. O grupo hidroxila é essencial à atividade biológica e a troca da ponte de O por S diminui drasticamente a

atividade. Estudos provaram que a triclosana inibe a biossíntese de ácidos graxos, sendo o seu alvo a enzima enoil-ACP redutase (FabI). Ao contrário da INH, este inibidor não se liga de forma covalente ao cofator no sítio ativo da enzima enoil-ACP redutase (ANDRADE *et al.*, 2008; LU and TONG, 2008).

Recentemente, Sullivan e colaboradores (SULLIVAN *et al.*, 2006) utilizaram ferramentas computacionais para explorar as interações de análogos da triclosana com a InhA. Eles desenvolveram uma série de éteres difenilalquílicos (Figura 4), que são potentes inibidores *in vitro* da InhA e previnem o

crescimento de ambas as cepas, sensíveis e resistentes à INH. Estes compostos não

requerem ativação da KatG e, por isso, evitam o mecanismo normal de resistência da INH.

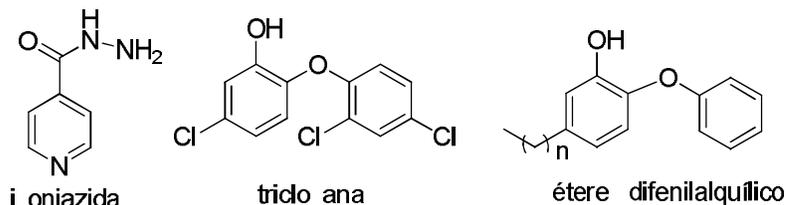


Figura 4 – Estruturas dos inibidores de enoil-ACP redutase.

As interações moleculares entre a isoniazida e potenciais novos tuberculostáticos com a enzima enoil-ACP redutase do *M. tuberculosis* (InhA) foram visualizadas nesta aula prática. Os alunos utilizaram o programa DS Visualizer (Discovery, 2007) para a visualização e manipulação das estruturas tridimensionais cristalográficas dos fármacos/ligantes complexados com suas enzimas-alvo.

Em um primeiro momento os alunos tiveram contato com o banco de dados de proteínas *Protein Data Bank* (PDB) (<http://www.pdb.org>). Após apresentação dos métodos de busca no PDB, os alunos buscaram e extraíram as estruturas dos complexos isoniazida-InhA (código PDB: **1ZID**) e triclosana-enoil redutase (FabI) (código PDB: **1D8A**). No programa DS Visualizer, os alunos abriram os arquivos separadamente e selecionaram o fármaco/ligante. A partir da localização do fármaco, definiram-se o sítio ativo e os aminoácidos importantes para interação fármaco-receptor, com o auxílio da literatura que apresenta os resíduos de aminoácidos que interagem com estes inibidores (ROZWARSKI *et al.*, 1998; SULLIVAN *et al.*, 2006). Foi possível a comparação do mecanismo de ação dos dois inibidores, uma

vez que a isoniazida se apresenta ligada covalentemente ao NAD, enquanto que a triclosana realiza interações não-covalentes com o NAD (Figura 5). Com o auxílio da ferramenta que mostra as possíveis ligações hidrogênio, disponível no programa, os alunos localizaram as ligações hidrogênio. Além disso, realizaram o cálculo das distâncias entre o inibidor e os principais resíduos de aminoácidos do sítio ativo. Foi possível observar que a TCL interage com o grupo 2'-hidroxila da ribose do cofator, enquanto que a INH interage de forma covalente com o NAD. Além disso, a INH ocupa posição diferente no sítio ativo (Figura 5).

Os alunos anotaram todas as possíveis interações do fármaco com os resíduos de aminoácidos. Ao final da aula, cada aluno propôs um mapa farmacofórico, com base nas principais diferenças de interação entre os dois inibidores.

Antivirais

As infecções causadas pelo vírus influenza vêm representando, ao longo dos anos, um grande problema de saúde pública mundial. Destaca-se a preocupação para cepas resistentes aos fármacos atualmente utilizados. Adicionalmente, no ano de 2009 houve uma nova pandemia de influenza, causada por uma cepa mutante do vírus conhecida como H1N1 e

suas infecções foram denominadas de gripe suína (WANG *et al.*, 2009).

O vírus influenza apresenta duas proteínas de superfície, hemaglutinina e neuramidase, que estão relacionadas nos processos de fixação, infecção e liberação de partículas virais. As enzimas neuraminidasas (NAs) estão presentes nos vírus influenza tipo A e B, e estão envolvidas no processo de ativação da partícula viral. Essa enzima catalisa clivagem glicosídica entre o ácido siálico terminal e o açúcar adjacente liberando a partícula viral, o que causa aumento da infecção e da patogenicidade (PATRICK, 2009). Os fármacos atualmente utilizados contra infecções por influenza inibidores de NAs (Figura 5), são

representados pelo zanamivir (Relenza®) e oseltamivir (Tamiflu®). Tais fármacos são ativos contra infecções por influenza A H1N1. No entanto, diversas cepas de influenza se mostram resistentes a esses fármacos, principalmente ao oseltamivir, como reportado por COLLINS e colaboradores em 2008 (COLLINS *et al.*, 2008), quando definiram a estrutura cristalográfica da NA de influenza, H5N1, resistente ao oseltamivir. Essa resistência é sugerida, entre outros fatores, a mutações nos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo das NAs diminuindo, assim, a afinidade do fármaco pelo sítio ativo da enzima (COLLINS *et al.*, 2008).

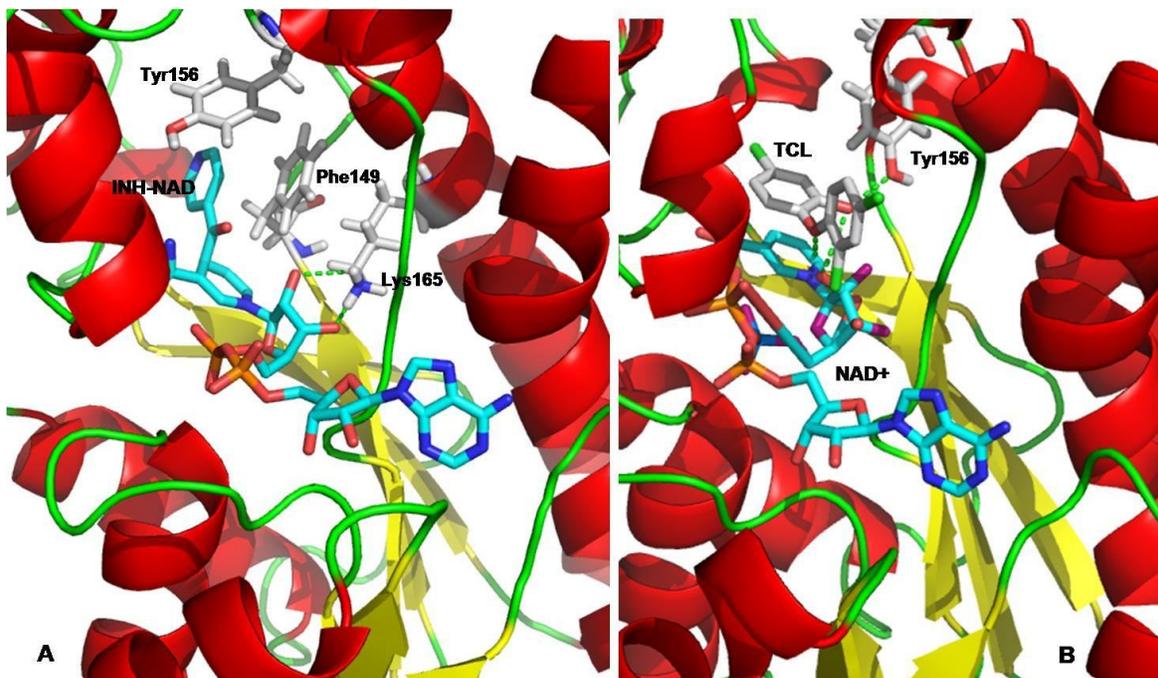


Figura 5 - Estruturas da INH e TCL ligadas às enzimas enoil-ACP redutase: (A) estrutura do aduto INH-NAD (azul ciano) ligado à InhA (**1ZID**), evidenciando alguns dos resíduos do sítio ativo; e (B) estrutura da TCL (cinza) complexada com a FabI e NAD (azul ciano) (**1D8A**), evidenciando a interação entre a TCL, o resíduo Tyr156 e a hidroxila da ribose do NAD.

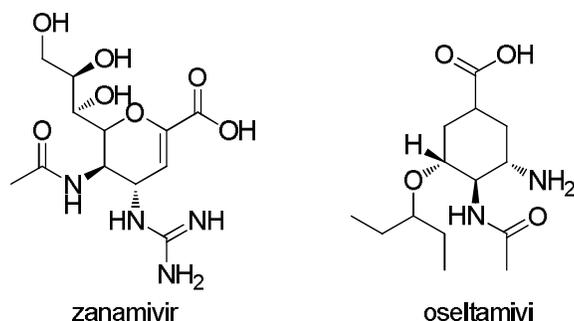


Figura 5 - Estrutura dos inibidores de neuraminidase utilizados na terapêutica contra infecções virais.

Nesta aula prática, as interações moleculares entre os inibidores de NAs, zanamivir e oseltamivir, com suas enzimas alvo, e as mutações responsáveis pela possível resistência ao oseltamivir, foram visualizadas utilizando as estruturas cristalográficas das NAs complexadas com seus inibidores.

O procedimento de aula envolveu a visualização e manipulação das estruturas tridimensionais das NAs, a localização dos fármacos no sítio ativo e a verificação das principais mutações envolvidas no processo de resistência, dos resíduos 275 e 295 (COLLINS *et al.*, 2008). Este processo foi realizado na seguinte ordem:

1. Extração das estruturas do *Protein Data Bank* (PDB);
2. Inspeção visual das estruturas, separadamente, das NAs e localização do sítio ativo e do ligante (fármaco) co-cristalizado utilizando o programa PyMOL⁽⁷⁾;
3. Alinhamento das três estruturas de NAs;
4. Nova análise dos sítios ativos e avaliação dos resíduos que sofreram mutação, His-275-Tyr e Ser-295-Asn;
5. Avaliação nas diferenças da interação dos fármacos, oseltamivir e zanamivir,

em relação aos resíduos do receptor.

Os alunos localizaram e extraíram do PDB as estruturas cristalográficas das NAs complexadas com oseltamivir (código PDB: **3CL2** e **3CLO**) e zanamivir (código PDB: **3CLK**). Com auxílio do programa PyMOL, as estruturas foram analisadas isoladamente, utilizando os vários modelos de visualização disponíveis no programa, de forma aos alunos localizarem o sítio ativo e o fármaco co-cristalizado. A cadeia linear apresentada pelo PyMOL tem todos os aminoácidos, ligante, moléculas de água e outros átomos que compõem a estrutura cristalográfica. Desta forma, a cadeia linear foi utilizada para fácil localização da molécula do fármaco co-cristalizado. A partir da localização do fármaco, definiram-se o sítio ativo e os aminoácidos importantes para interação fármaco-receptor. Essa tarefa foi feita com auxílio da literatura que apresenta os resíduos que interagem com os dois fármacos, zanamivir e oseltamivir⁽⁸⁾. Realizou-se também o alinhamento das três estruturas cristalográficas, utilizando a opção de alinhamento do PyMOL. Para melhor visualização dessas interações utilizamos a superfície das NAs e as estruturas dos ligantes co-cristalizados (Figura 6).

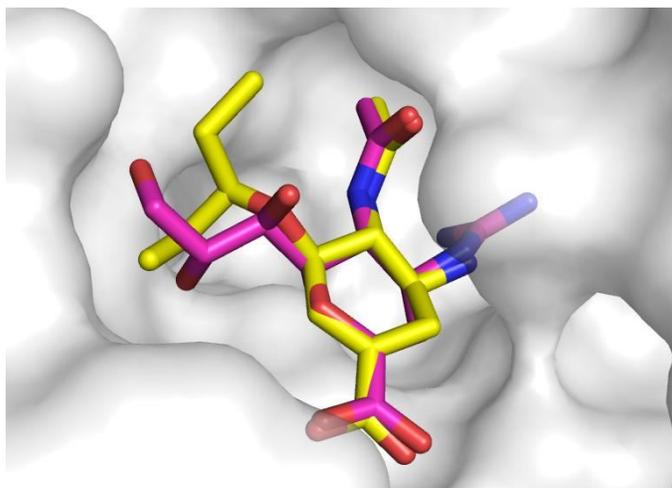


Figura 6 – Estruturas sobrepostas das NAs co-cristalizadas com os inibidores zanamivir (rosa) e oseltamivir (amarelo). Códigos PDB: **3CLK**, **3CL2**.

Para o entendimento das interações entre os fármacos e a NA foram medidas as distâncias entre os principais resíduos de aminoácidos e os fármacos. Em um primeiro estágio de reconhecimento das interações, foram verificadas as interações importantes do grupo ácido dos fármacos, zanamivir e oseltamivir, com os resíduos Arg118, Arg292 e Arg371. Outros dois resíduos de aminoácidos apresentaram pontos comuns de interação com os dois fármacos: Arg152 sugere interação com o grupo metil-amida dos dois fármacos; e Glu119 sugere interação com o grupo guanidina do zanamivir e com o grupo amina, que se apresenta na mesma posição, para o oseltamivir. A grande diferença na interação entre os dois fármacos e o sítio receptor das NAs está em um grupamento glicerol do zanamivir, que sugere ligação de hidrogênio com o resíduo Glu276 e o grupo pentiloxi do oseltamivir. O grupamento glicerol foi mantido

no planejamento do zanamivir por ser comum ao ácido siálico, e apresentar as mesmas interações em estruturas de cristalografia de raios-X (COLLINS *et al.*, 2008). No oseltamivir esse grupamento foi substituído por um grupo pentiloxi, que sugere forte interação lipofílica na enzima NA. A característica lipofílica de um bolso acessório nas NAs se dá, entre outros fatores, pela rotação do resíduo Glu276 que se aproxima do resíduo His275 fazendo uma ligação intramolecular e expondo a cadeia carbônica para o interior do bolso, tornando-o lipofílico (COLLINS *et al.*, 2008).

A última parte da aula prática envolveu a análise comparativa entre as três estruturas cristalográficas das NAs selecionadas, visando reconhecer a influência das mutações na interação entre os fármacos e o receptor. As diferenças entre as duas estruturas cristalizadas com o oseltamivir (**3CL2** e **3CLO** que apresenta os resíduos mutantes) foram analisadas.

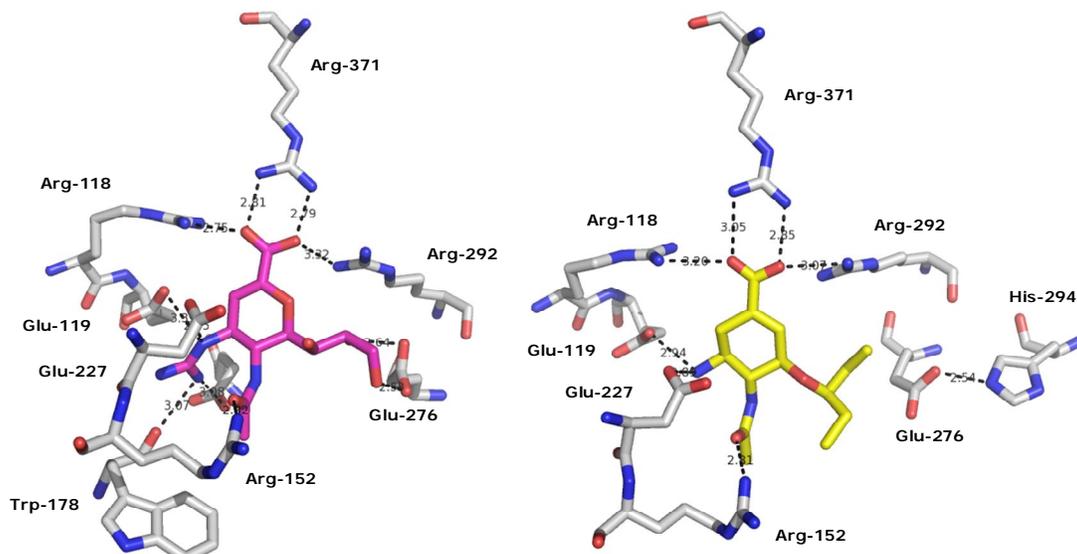


Figura 7 – Estruturas dos inibidores de NA e as principais interações com resíduos da proteína. Em rosa zanamivir, amarelo oseltamivir e cinza resíduos da neuraminidase.

A estrutura da NA **3CLO** apresenta como principais mutações no sítio ativo a troca de aminoácidos nas posições His-274-Trp e Ser-294-Gln, as quais diminuíram a lipofilicidade no bolso de interação do grupo pentiloxi do oseltamivir (Figura 8) (COLLINS *et al.*, 2008). Foi possível verificar que a mutação no resíduo 274 (His-Trp) proporcionou o deslocamento do resíduo Glu276 em cerca de 2 Å, desfavorecendo a lipofilicidade do bolso da proteína e, concomitantemente, diminuindo a afinidade do oseltamivir, que teve um deslocamento na interação de cerca de 2 Å (Figura 8A). Para o zanamivir, a mutação nos resíduos 274 (His-Trp) da NA não proporcionou grande mudança visto que o grupo glicerol continua apresentando uma distância favorável à ligação de hidrogênio (2,53 Å) com o resíduo Glu276 (Figura 8B).

Hipnoanalésicos

Os hipnoanalésicos são fármacos que deprimem seletivamente o sistema nervoso central (SNC) e são empregados para aliviar dores moderada a grave (tanto aguda quanto crônica) de etiologias diversas. Estes fármacos agem no cérebro, atuando em receptores estereoespecíficos (receptores μ , κ , δ , acoplados à proteína G), elevando o limiar da dor e, conseqüentemente, diminuindo a resposta cerebral de dor (PATRICK, 2009). A morfina é o analgésico mais eficaz disponível na terapêutica. Sua estrutura (Figura 9) possui cinco anéis rígidos, nomeados de A-E, dispostos em uma conformação perpendicular em forma de "T". A nalorfina é um hipnoanalésico agonista parcial e a naloxona é um antagonista (Figura 9) (Patrick, 2009).

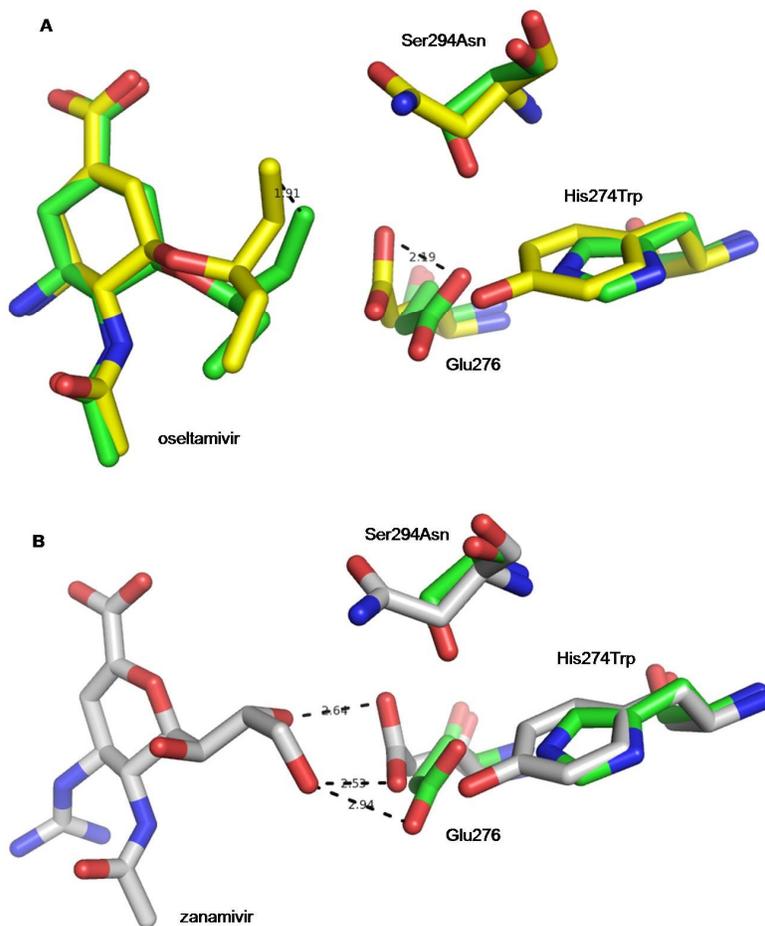


Figura 8 - Estruturas dos inibidores complexados com a NA de vírus influenza mutante. A) Estruturas do oseltamivir complexada com a NA (verde) que não apresenta resistência e NA resistente ao oseltamivir (amarelo). B) Estrutura do zanamivir com a neuraminidase resistente (cinza) e não resistente ao oseltamivir.

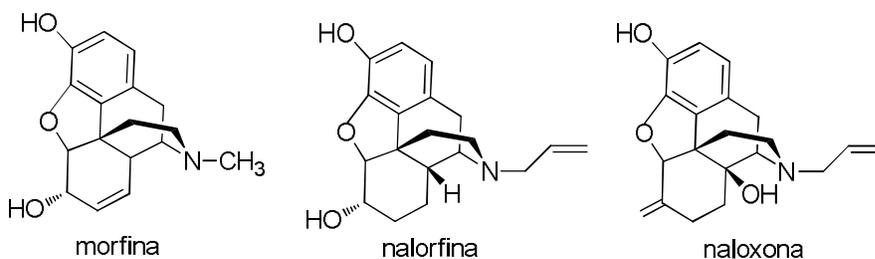


Figura 9 – Estruturas dos hipnoanalgésicos morfina, nalorfina e naloxona.

Nesta aula prática, a aplicação da MM permitiu aos alunos a visualização das principais diferenças entre fármacos agonistas e antagonistas hipnoanalgésicos, utilizando as estruturas da morfina (agonista), nalorfina (agonista parcial) e naloxona (antagonista). Com o modelo CPK ou preenchido (Figura 10), é possível comparar os três fármacos, e visualizar a presença de grupos volumosos e pontos adicionais de interação com o receptor no agonista parcial e antagonista. A condição de agonista parcial é caracterizada pela flexibilidade do grupamento alila da nalorfina, o que permite que o grupo fique tanto na posição axial quanto na equatorial, que correspondem, respectivamente, a região de ligação agonista e antagonista, e assim o fármaco se comporte tanto como antagonista quanto como agonista. Já a naloxona possui uma hidroxila na posição C14, que promove impedimento estérico e rigidez ao grupamento alila, forçando que o substituinte permaneça na posição equatorial, impedindo assim a sua interação com o sítio agonista.

A tabela 2 apresenta alguns dos

parâmetros obtidos na análise comparativa entre os fármacos hipnoanalgésicos. A interpretação destes dados contribui para o entendimento dos alunos como, por exemplo, a observação do aumento de volume molecular, caracterizando a presença de grupos volumosos nos antagonistas. Além disso, propriedades importantes como a lipofilicidade foram calculadas (ClogP) e observadas (Tabela 2).

Benzodiazepínicos

Os benzodiazepínicos são fármacos utilizados como ansiolíticos, hipnóticos, pré-anestésicos, anticonvulsivantes e relaxantes musculares. Possuem alta eficácia e relativa segurança. Grande parte das ações benzodiazepínicas (anticonvulsivantes e miorelaxantes) resulta da sua capacidade em potencializar a ação inibidora neuronal mediada pelo ácido gama-aminobutírico (GABA).

Já o antagonista benzodiazepínico flumazenil bloqueia a ação sedativa de substâncias que agem nos receptores dos benzodiazepínicos, e pode ser útil na reversão da superdosagem por benzodiazepínicos (STERNBACH, 1979).

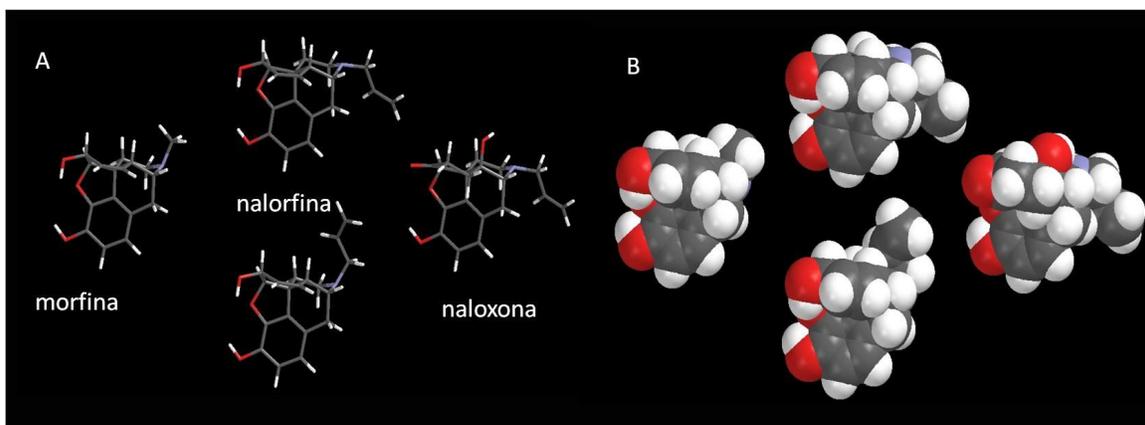


Figura 10 - Representação dos confôrmeros de energia mínima dos hipnoanalgésicos nos modelos tubo (A) e CPK (B). A nalorfina é representada nos dois confôrmeros de menor energia (confôrmeros 1 e 2).

Tabela 2 - Parâmetros obtidos para análise comparativa dos fármacos hipnoanalgésicos.

| Hipnoanalgésicos | Fórmula molecular | Energia Total (Kcal/mol) | Volume Molecular (Å ³) | Área Superficial (Å ²) | ClogP (Crippen) |
|------------------|---|--------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------|
| morfina | C ₁₇ H ₁₉ NO ₃ | -65,9364 | 281,91 | 279,60 | 1.48 |
| nalorfina 1* | C ₁₉ H ₂₃ NO ₃ | -46,6416 | 314,22 | 311,24 | 1.41 |
| nalorfina 2* | C ₁₉ H ₂₃ NO ₃ | -46,1836 | 314,22 | 311,24 | 1.41 |
| naloxona | C ₁₉ H ₂₁ NO ₄ | -91,9887 | 320,46 | 315,75 | 1.32 |

* Dois conformêros de menor energia da nalorfina (conformêros 1 e 2).

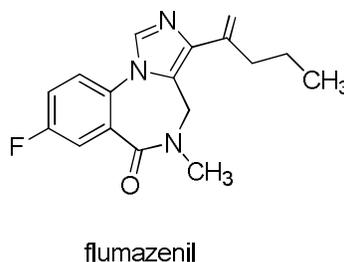
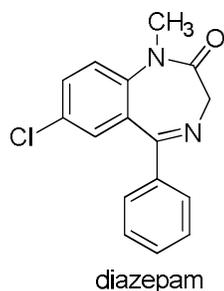


Figura 11 – Estruturas dos benzodiazepínicos diazepam (agonista) e flumazenil (antagonista).

Nesta aula prática, semelhanças e diferenças estruturais entre agonista e antagonista benzodiazepínicos puderam ser observadas, além da visualização das características geométricas e moleculares essenciais para a atividade biológica dessa classe de fármacos, tais como a conformação dos anéis A e B, semelhante para ambos agonista e antagonista. Foi também calculada a distância entre o anel A e a carbonila de C2, que define o caráter agonista ou antagonista (Figura 12 e Tabela 3). A tabela 3 apresenta os parâmetros obtidos na análise comparativa entre os benzodiazepínicos. Assim como estudado para os fármacos hipnoanalgésicos, foram observadas diferenças

entre agonistas e antagonistas, como o aumento de volume molecular, caracterizando os antagonistas. Além disso, propriedades físico-químicas como a lipofilicidade (ClogP) e o momento dipolar foram calculadas e analisadas (Tabela 3). O momento dipolar, calculado para os fármacos benzodiazepínicos, traduz o caráter polar das moléculas, uma vez que representa a somatória de vetores das forças de polarização exercida pelos grupos funcionais presentes. De acordo com os dados calculados e apresentados na Tabela 3, foi possível comprovar o maior caráter polar do antagonista benzodiazepínico flumazenil.

Anti-inflamatórios não esteróides (AINES)

Os anti-inflamatórios não esteróides (AINES) são uma importante classe terapêutica

que exerce seus efeitos devido ao bloqueio do

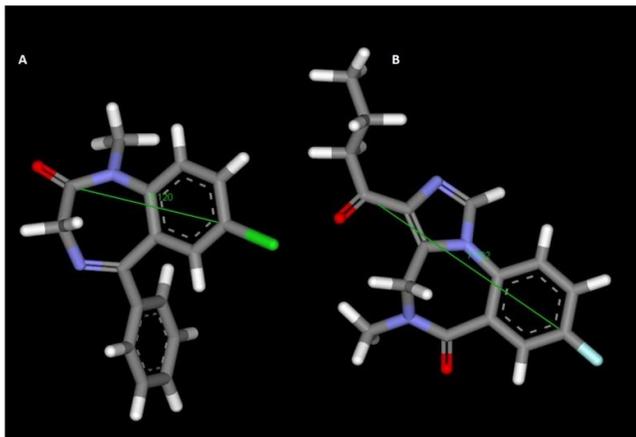


Figura 12 – Representação em tubo dos benzodiazepínicos (A) diazepam e (B) flumazenil. Distâncias entre o carbono C7 do anel A e o carbono C2 da carbonila, calculadas no programa DS Visualizer.

sítio cicloxigenase (COX) da enzima prostaglandina endoperóxido sintase (PGHS). Tal inibição bloqueia a síntese de prostaglandinas, as quais estão envolvidas em diversos processos fisiológicos e patológicos⁽¹⁷⁾.

A introdução dos inibidores seletivos da cicloxigenase tipo 2 (COX-2), conhecidos como “coxibs”, merece destaque porque resultou na maior utilização de novos fármacos de todos os tempos. Os “coxibs” foram desenvolvidos com base na hipótese de que a inibição seletiva da COX-2 resultaria na manutenção dos efeitos terapêuticos dos AINEs com restrição de seus efeitos adversos tradicionais (EMERY, 2001).

A aula prática de AINES foi dividida em duas partes: na primeira abordaram-se os aspectos essenciais à atividade biológica dos AINES, analisando três diferentes fármacos: ácido acetilsalicílico, flurbiprofeno e celecoxibe (Figura 13). Os alunos realizaram a visualização do grupo farmacofórico, calcularam

propriedades como mapas de potencial eletrostático (MEP), assim como suas semelhanças e diferenças com o ácido araquidônico. Ademais, nesta aula o aluno teve a oportunidade de observar tridimensionalmente as semelhanças e diferenças estruturais e eletrônicas entre os inibidores não-seletivos e seletivos da COX-2 (Figura 14 e Tabela 4).

Na segunda parte da aula prática de AINES, as interações entre fármacos e receptor foram estudadas, utilizando o programa DS Visualizer (SANT’ANNA, 1997). Assim, foi possível proporcionar uma comparação entre as semelhanças e diferenças estruturais e espaciais entre os sítios ativos das duas isoformas COX-1 e COX-2 complexadas com diferentes inibidores.

Nesta aula, realizou-se essencialmente a visualização e manipulação das estruturas cristalográficas das enzimas COX-1 complexada

com o ácido acetilsalicílico (código PDB: **1PTH**); COX-2 complexada com o inibidor não-seletivo flurbiprofeno (código PDB: **3PGH**) e COX-2 complexada com o inibidor seletivo SC-558 (código PDB: **1CX2**), o protótipo dos “coxibs”. Após o *download* das estruturas do PDB, os alunos iniciaram a visualização das estruturas e realizaram o reconhecimento das interações moleculares entre os fármacos e as enzimas COX-1 e COX-2, com o auxílio da literatura que

apresenta os resíduos de aminoácidos dos sítios ativos (FITZDEALD, 2003). Além disso, os alunos calcularam as distâncias entre os aminoácidos e os fármacos, propondo os possíveis tipos de interação fármaco-receptor. Foi possível a visualização do resíduo Ser530 acetilado, no caso da COX-1 complexada com o AAS, uma vez que o mecanismo de ação deste fármaco envolve a ligação covalente do grupo acetila do AAS na Ser530.

Tabela 3 - Parâmetros obtidos para análise comparativa dos benzodiazepínicos.

| Benzodiazepínico | Fórmula molecular | Volume Molecular (Å ³) | Distância entre o anel A e carbonila C2 (Å) | Momento dipolar (Debye) | ClogP (Crippen) |
|------------------|---|------------------------------------|---|-------------------------|-----------------|
| diazepam | C ₁₆ H ₁₃ N ₂ OCl | 246,5 | 5,12 | 1,80 | 3,32 |
| flumazenil | C ₁₆ H ₁₆ N ₃ O ₂ F | 268,4 | 7,76 | 3,47 | 2,37 |

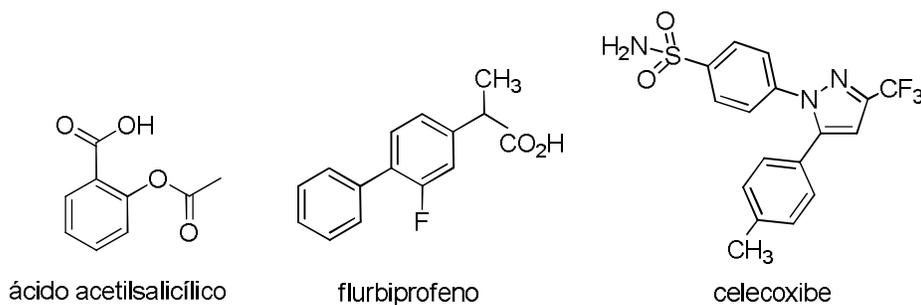


Figura 13 – Estruturas dos AINES.

Tabela 4 – Parâmetros obtidos para a análise comparativa entre os AINES.

| AINES | Fórmula molecular | Volume Molecular (Å ³) | Área Superficial (Å ²) | ClogP (Crippen) |
|------------------------|---|------------------------------------|------------------------------------|-----------------|
| ácido acetilsalicílico | C ₉ H ₈ O ₄ | 149,76 | 188,04 | -0,26 |
| flurbiprofeno | C ₁₅ H ₁₃ O ₂ F | 214,93 | 248,28 | 1,48 |
| celecoxibe | C ₁₇ H ₁₄ N ₃ O ₂ SF ₃ | 288,25 | 340,01 | 1,02 |

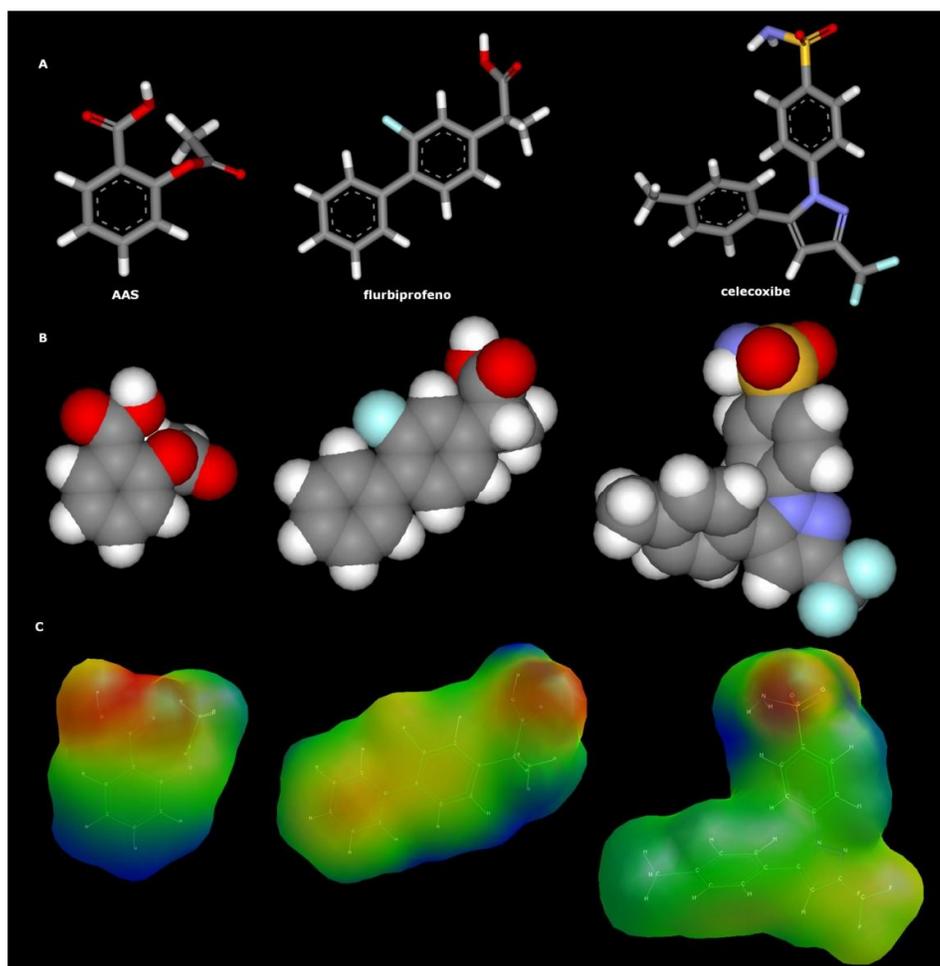


Figura 14 – Representação dos conformêros de energia mínima nos modelos tubo (A) e CPK (B) dos AINES estudados: AAS, flurbiprofeno e celecoxibe. Em (C) tem-se os MEPS destes conformêros na faixa de -65 (vermelho intenso) a +40 (azul intenso) kcal/mol.

Por essa razão, na estrutura cristalográfica o AAS está representado como ácido salicílico. Observaram-se as ligações de hidrogênio entre o AAS e os resíduos Arg120 e Tyr355 (Figura 15A) assim como entre o flurbiprofeno e os mesmos resíduos de aminoácidos (Figura 15B). Já o inibidor seletivo da COX-2 realiza ligações de hidrogênio com vários resíduos, entre eles: Gln192, Phe518, Ser353, Leu352 e Tyr355 (Figura 15C). Dentre as principais mudanças de aminoácidos

entre as isoformas COX-1 e COX-2, têm-se a substituição da isoleucina nas posições 434 e 523 por valina na COX-2. Esta mudança permite acesso à região hidrofóbica próxima à entrada e adjacente ao canal central hidrofóbico do sítio ligante, aumentando muitas vezes o volume do sítio ativo ligante da COX-2, o que resulta numa influência do volume molecular do inibidor sobre a seletividade à isoforma da enzima (Tabela 4). Essas substituições de aminoácidos entre as isoformas COX-1 e COX-2

também foram observadas pelos alunos, através da sobreposição das duas enzimas.

CONCLUSÕES

As aulas práticas apresentadas neste trabalho foram aplicadas aos alunos do quinto período do curso de Farmácia da FF-UFG, com turmas de 12 a 15 alunos e duração de uma hora e quarenta minutos. As aulas foram ministradas no contexto da disciplina de Química Farmacêutica Medicinal, contextualizando os conteúdos das aulas teóricas com as práticas.

Os alunos, que realizaram desde o desenho 2D e 3D até a análise das

conformações de moléculas com atividade biológica, além de estudos da interação entre fármaco-receptor, desenvolveram as atividades com êxito e demonstraram maior sedimentação dos conhecimentos da disciplina. Com a aplicação deste trabalho, pode-se concluir que a utilização da modelagem molecular nas aulas práticas proporcionou contribuições significativas ao ensino de QF.

As atividades realizadas, com o uso de ferramentas tecnológicas e computacionais, surgem como uma alternativa educacional visando atender às necessidades atuais e individuais dos estudantes, uma vez que a aprendizagem é fundamentalmente ativa, integrativa e reflexiva.

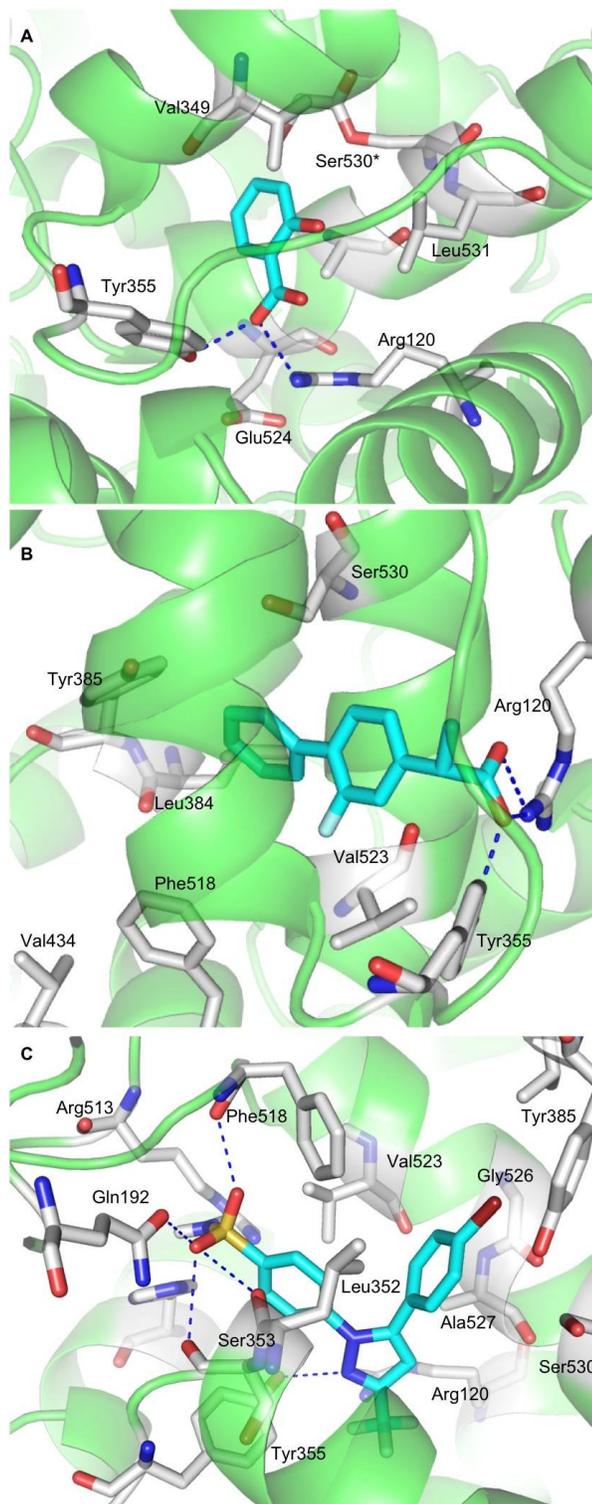


Figura 15 – Estruturas dos AINES ligados à COX: (A) estrutura do AAS (azul ciano) ligado à COX-1 (1PTH), evidenciando as ligações de hidrogênio realizadas com os resíduos Arg120 e Tyr155; (B) estrutura do flurbiprofeno (azul ciano) complexada com a COX-2 (3PGH); e (C) estrutura do inibidor seletivo SC-558 (azul ciano) com a COX-2 (1CX2) mostrando suas principais interações. As ligações de hidrogênio estão representadas em linhas azuis pontilhadas.

Andrade, C. H., Trossini, G. H. G., Ferreira, E. I./Revista Eletrônica de Farmácia Vol 7 (1), 1-23, 2010.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade CH, Pasqualoto KFM, Zaim MH, Igne F. Abordagem racional no planejamento de novos tuberculostáticos: Inibidores da InhA, enoil-ACP redutase do *M. tuberculosis*. Rev.Bras. Ciências Farm. 2008;44(2):167-79.

Carvalho I, Borges ADL, Bernardes LSC. Medicinal Chemistry and Molecular Modeling: An Integration To Teach Drug Structure–Activity Relationship and the Molecular Basis of Drug Action. J. Chem. Educ. 2005;82(4):588-96.

Cohen NC. Guidebook on molecular modeling in drug design. San Diego: Academic Press, 1996.

Collins PJ, Haire LF, Lin YP, Liu J, Russell RJ, Walker PA, *et al.* Crystal structures of oseltamivir-resistant influenza virus neuraminidase mutants. Nature. 2008;(453):1258-61.

DeLano WL (2004) The Pymol Molecular Graphics System version 1.0. Delano Scientific LLC: Palo Alto, CA. <http://www.pymol.org/>

Discovery Studio Visualizer version 2.0 (2007) Accelrys Software Inc. San Diego, CA. <http://accelrys.com/>

Emery P. Cyclooxygenase-2: A Major Therapeutic Advance? Am. J. Med. 2001;110(1):42S-45S.

Fitzdeald GA. COX-2 and Beyond: Approaches to Prostaglandin Inhibition in Human Disease. Nat. Rev. Drug Dis. 2003;(2):879-90.

Lu H, Tong, PJ. Inhibitors of FabI, an Enzyme Drug Target in the Bacterial Fatty Acid Biosynthesis Pathway. Acc. Chem. Res. 2008;41(1):11-20.

Patrick GL. An Introduction to Medicinal Chemistry. 4th ed. New York: Oxford; 2009.

Pedretti A, Villa L, Vistoli G. Vega: a versatile program to convert, handle and visualize molecular structure on windows-based pcs. J. Mol. Graph. 2002;21(1):47-9.

Rozwarski DA, Grant GA, Jr. Barton DHR, Jacobs WR, Sacchettini JC. Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. Science. 1998;279(5347):98-102.

Sant'anna CMR. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos. (Recomendações da IUPAC para 1997), Quim. Nova, 2002;25(3):505-12.

Sternbach LH. The benzodiazepine story. J. Med. Chem. 1979;22(1):1–7.

Andrade, C. H., Trossini, G. H. G., Ferreira, E. I./Revista Eletrônica de Farmácia Vol 7 (1), 1-23, 2010.

Sullivan TJ, Truglio JJ, Boyne ME, Novichenok P, Zhang X, Stratton CF, *et al.* High affinity InhA inhibitors with activity against drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. ACS. Chem. Biol., 2006;1(1):43-53.

Vilchèze C, Wang F, Arai M, Hazbon Mh, Colangeli R, Kremer L, *et al.* Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis inhA* resolves the target of isoniazid. Nat. Med. 2006;(12):1027-29.

Wang SQ, Du QS, Huang RB, Zhang DW, Chou KC. Insights from investigating the interaction of oseltamivir (Tamiflu) with neuraminidase of the 2009 H1N1 swine flu virus. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009;386(3):432-6.

Wermuth CG, The practice of medicinal chemistry. 3rd ed. London: Academic Press; 2009.

Williams DA, Lemke TL. Foye's Principles of Medicinal Chemistry. In: Borne RF. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Agents. 6th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.