

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

FÁBIO DOS SANTOS GASEL

***INVESTIGAÇÃO DA INTERAÇÃO DE LIGANTES
FLUORESCENTES DERIVADOS DE BENZAZÓIS COM B-DNA POR
DOCKING E DINÂMICA MOLECULAR***

Porto Alegre, Dezembro de 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

FÁBIO DOS SANTOS GASEL

***INVESTIGAÇÃO DA INTERAÇÃO DE LIGANTES
FLUORESCENTES DERIVADOS DE BENZAZÓIS COM B-DNA POR
DOCKING E DINÂMICA MOLECULAR***

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em Química

Prof. Dr. Paulo Augusto Netz
Orientador

Porto Alegre, Dezembro de 2013.

A presente tese foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre agosto de 2010 e dezembro de 2013, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação do Professor Dr. Paulo Augusto Netz. A tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Rodolfo Wolf
ULBRA

Prof. Dr. Jairton Dupont
UFRGS

Prof. Dr. Paulo Fernando Bruno Gonçalves
UFRGS

Prof. Dr. Rafael Andrade Caceres
UFCSPA

Prof. Dr. Paulo Augusto Netz
Orientador

MSc. Fábio dos Santos Grasel

Dedico este trabalho aos meus Pais:
Ari Miguel Grasel e Nair dos Santos Grasel

O temor do Senhor é o princípio
da sabedoria, e o conhecimento
do Santo a prudência.

Provérbio 9:10

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Espírito Santo de Deus por todo discernimento, pois sem Ele não seria ninguém hoje.

À minha esposa, Jaqueline Silveira de Souza por todo amor, carinho e compreensão em minhas ausências.

Aos meus pais, Ari Miguel Grasel e Nair dos Santos Grasel, além de meu irmão Diego dos Santos Grasel, pois eu sou apenas um fruto de uma família abençoada.

Ao meu amigo Luiz Antonio Mazzini Fontoura, o qual, em minhas primeiras orientações de TCC, já me incentivava ao mestrado e posteriormente ao doutorado.

Aos meus colegas e amigos de laboratório Vanessa, Willian, Josene e Gilherme, pelo apoio, além das sugestões e dicas valorosas.

Aos meus amigos Tiago e Luis André, os quais me ajudaram nas discussões de meus resultados, além da rica troca de experiências.

A Deborah que me auxiliou nas traduções neste trabalho.

Aos meus colegas da Tanac, Luiza Inês, Carlos Wolf, Igor, Anderson, Tanira, Mírian, Valdir, Rodrigo, Ana Paula, Claudemir, Paulo, Wagner e José Zanatta.

Ao meu orientador e amigo Paulo Augusto Netz, o qual foi além das expectativas.

Ao Paulo Gonçalves e Hubert por todo suporte técnico e apoio.

Também quero agradecer a aqueles que em silêncio intercederam por mim.

Peço desculpas se esqueci de alguém, mas mesmo assim, Muito Obrigado.

RESUMO

Neste trabalho foi realizado o estudo por docagem e simulação de dinâmica molecular de doze derivados benzazólicos fluorescentes por ESIPT, interagindo com o dodecâmero de Dickerson-Drew na forma B-DNA. Estes doze ligantes foram divididos em dois grupos (A e B), sendo o primeiro grupo composto por derivados do 2-(2'-hidroxifenil)-benzoxazol e o segundo grupo composto por três derivados do 2-(4'-amino-2'-hidroxifenil)-benzazóis, alternando entre N, S e O no anel azólico, mais três bases de Tröger derivadas dos mesmos. Na análise da docagem molecular do grupo A, os derivados com grupamento $-NH_2$ no anel fenólico apresentaram energias de interação mais favoráveis com o DNA, verificando um favorecimento ainda maior, para os ligantes que continham $-NO_2$ como substituinte no anel benzoxazólico. Na análise da docagem molecular para grupo B, as bases de Tröger (**4ac**) apresentaram interações significativamente mais favoráveis, quando comparados com seus respectivos precursores (**3ac**). Na análise da DM, tanto o grupo A, quanto o B, apresentaram a formação de complexos estáveis. O grupo A apresentou uma indução a alterações estruturais mínimas no DNA, sendo as maiores alterações a abertura do *Rise* quando os ligantes estavam intercalados, acompanhado pelo desenrolamento do parâmetro *Twist*. Nas interações de sulco menor, o ligante **2a** foi o que formou o complexo mais estável com o DNA. Na análise da DM do grupo B, as bases de Tröger apresentaram uma preferência maior por interações do tipo intercalação que seus precursores, sendo os primeiros, os quais induziram o oligonucleotídeo a maiores alterações estruturais. Durante todas as simulações os ligantes mantiveram-se com uma forte interação com o oligonucleotídeo, sem causar a desnaturação do mesmo. Devido às interações estáveis, e também as propriedades fotofísicas peculiares dos ligantes estudados, esta classe de moléculas pode atuar como possíveis sondas biológicas.

Palavras-chave: *Derivados Benzazólicos, Docagem Molecular, Dinâmica Molecular, B-DNA, Bases de Tröger.*

ABSTRACT

In this work we carried out a study by docking and molecular dynamics simulations of twelve ES IPT-fluorescent benzazoles, interacting with the Dickerson-Drew dodecamer in the canonical B-DNA form. These twelve ligands were divided into two groups (A and B), with the first group consisting of derivatives of 2-(2'-hydroxyphenyl)-benzoxazole and the second group consisting of three derivatives of 2-(4'-amino-2'-hydroxyphenyl)-benzazoles, alternating between N, S and O in the azole ring and three Tröger bases derived from them. In the analysis of the molecular docking of group A, the derivatives with group $-NH_2$ in the phenolic ring presented more favorable interaction energies with the DNA, and the score was even more favorable for the ligands which contained $-NO_2$ as substituent in the benzoxazolic ring. In the analysis of the molecular docking for group B, the Tröger bases (**4ac**) presented significantly more favorable interactions, when compared with their respective precursors (**3ac**). In the analysis of the DM, both groups A and B formed stable complexes. Group A induced only slight structural distortions in the DNA, being the largest modifications the increase of the *Rise* parameter when the ligands were intercalated, accompanied by the unwinding of *Twist* parameter. Regarding minor groove interactions, the ligand **2a** formed the most stable complex with the DNA. In the analysis of the DM both groups A and B, the Tröger bases presented a greater preference for intercalation interactions than their precursors and the Tröger bases induced the largest structural changes to the oligonucleotide. During all the simulations the ligands maintained a strong interaction with the oligonucleotide, without causing the denaturation of the same. Due to the stable interactions, and also the peculiar photophysical properties of the ligands studied, this class of molecules can act as possible biological probes.

Keywords: *Benzazoles Derivates, Molecular Docking, Molecular Dynamics, B-DNA, Tröger's Bases.*

Produção científica no período do doutorado (08/2010 - 12/2013)

Artigos completos publicados em periódicos

Kuplich, M. D.; **Grasel, F. S.**; Campos, L. F.; Rodembusch, F. S.; Stefani, V. Synthesis, characterization and photophysical properties of ESIPT reactive triazine derivatives. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 23, p. 25-31, 2012.

Grasel, F. S.; De Oliveira, T. C.; Fontoura, L. A. M.; Rigotti, I. J.; **Netz, P.A.** N-arylamides and N-arylcarbamates N-CO internal rotation barrier study by molecular modeling. *International Journal of Quantum Chemistry*, v. 112, p. 1678-1687, 2011.

Resumos publicados em anais de congressos

de Oliveira, T. E.; **Grasel, F.S.**; **Netz, P. A.** Computational analysis of the interaction between new fluorescent Tröger's bases and a B-DNA oligonucleotide by docking and molecular dynamics. *International Soft Matter Conference*, 2013, Roma - IT.

Grasel, F.S.; de Oliveira, T. E.; **Netz, P. A.** Study of the Interactions of Fluorescent Benzazole-Derivad Tröger's Bases with B-DNA by Docking e Molecular Dynamics. *2nd International Conference and Exhibition Drug Design*, 2013, Oxford - UK.

Grasel, F.S.; de Oliveira, T. E.; **Netz, P. A.** Estudo da interação de Biossensores Fluorescentes por ESIPT com DNA por Docking e Dinâmica Molecular. *35º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, 2012, Águas de Lindóia - SP.

Netz, P.A.; de Oliveira, T. E.; **Grasel, F.S.** Computacional Analysis of the Interaction Between New Fluorescent Tröger's Bases and B-DNA by Docking and Molecular Dinamics. *XXXVIII Congress of Theoretical Chemists of Latin Expression*, 2012, Natal - RN.

Grasel, F.S.; Stefani, V. Síntese, Caracterização e Estudo Fotofísico de Corantes Fluorescentes do Tipo Triazinil-benzazólicos Para Marcação de Matrizes de Celulose. *34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, 2011, Florianópolis - SC.

de Oliveira, T. E.; Descalzo, R. R.; **Grasel, F.S.**; **Netz, P.A.**; Stefani, V. Análise Computacional da Interação entre Novas Bases de Tröger Fluorescentes via ESIPT e o DNA. *34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, 2011, Florianópolis - SC.

Grasel, F.S.; Fontoura, L. A. M. Estudo teórico da influência do efeito eletrônico do beta-substituinte no equilíbrio tautomérico de derivados da naftazarina. *34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, 2011, Florianópolis - SC.

Grasel, F.S.; de Oliveira, T. E.; **Netz, P.A.** Dinâmica Molecular do Fármaco S-Monastrol como inibidor alostérico da Cinesina Eg5. *XVI Simpósio Brasileiro de Química Teórica*, 2011, Ouro Preto - MG.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	Adenina
ADT	<i>AutoDockTools</i>
BT	Base de Tröger
C	Citosina
Complexo	Conjunto formado por ligante mais oligonucleotídeo
CPB	Conjuntos de pares de bases
DM	Dinâmica Molecular
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ESIPT	<i>Excited State Intramolecular Proton Transference</i>
Exp.	Experimental
G	Guanina
kcal	Quilocaloria
kJ	Quilojoule
PB	Pares de bases
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PRBE	Planejamento Racional de Fármacos Baseado em Estrutura
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
RMSF	<i>Root Mean Square Fluctuation</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
T	Timina

ÍNDICE GERAL

1	Introdução.....	1
2	Revisão bibliográfica.....	3
2.1	Ácido Desoxirribonucleico.....	3
2.2	Métodos para detecção de DNA por fluorescência.....	8
2.3	Corantes Fluorescentes.....	9
2.3.1	Fluorescência e transferência protônica intramolecular no estado eletrônico excitado.....	10
2.3.2	Fatores que influenciam o mecanismo de ESPIT.....	13
2.4	Bases de Tröger.....	18
2.4.1	Aplicações das Bases de Tröger.....	19
2.5	Docagem Molecular.....	21
2.6	Dinâmica molecular.....	25
3	Objetivos.....	28
3.1	Objetivo Geral.....	28
3.2	Objetivos Específicos.....	28
4	Metodologia.....	29
4.1	Construção dos Ligantes.....	29
4.2	Oligonucleotídeo.....	29
4.3	Docagem Molecular.....	30
4.4	Dinâmica Molecular.....	30
5	Resultados e discussão.....	32
5.1	Docagem Molecular.....	32
5.2	estudo da estabilidade conformacional dos ligantes de dna.....	37
5.2.1	Estudo da Estabilidade Conformacional dos Ligantes do Grupo A.....	38
5.2.2	Estudo da Estabilidade Conformacional dos Ligantes do Grupo B.....	40
5.3	Dinâmica Molecular.....	43

5.3.1	Análise do Oligonucleotídeo sem Ligante.....	44
5.3.2	Análise do Grupo A.....	45
5.3.3	Análise do Grupo B.....	65
6	Conclusões.....	92
7	Referências Bibliográficas.....	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura básica de um nucleotídeo.	4
Figura 2: Sequência de três nucleotídeos no sentido de 5' - 3'.	4
Figura 3: Estrutura do B-DNA, gerada no X3DNA. Adaptado de Ricci e colaboradores.	5
Figura 4: Pareamento GC com três ligações de hidrogênio e AT com duas ligações de hidrogênio.	6
Figura 5: Parâmetros geométricos de polinucleotídeos. Os PB são representados por retângulos sólidos. Adaptado de Lu e colaboradores	8
Figura 6: Compostos heterocíclicos benzazólicos.	10
Figura 7: Heterociclos do tipo 2-(2'-hidroxifenil)benzazóis.	10
Figura 8: Deslocamento de Stokes ($\Delta\lambda_{ST}$). Adaptado de Rodembusch e colaboradores	13
Figura 9: Geometrias da forma enol. Adaptado de Rodembusch e colaboradores.	14
Figura 10: Novos derivados da 3-hidroxicromona com a espermina. Adaptado de Klymchenko e colaboradores.	14
Figura 11: Estudo fotofísico dos novos compostos sintetizados por Klymchenko e colaboradores. Na parte superior, diferentes solventes e na parte inferior variando a concentração de água na acetona. Adaptado de Klymchenko e colaboradores.	16
Figura 12: A esquerda o novo derivado benzazólicos sintetizado e a direita a representação da incorporação do mesmo na sequência de DNA. Adaptado de Klymchenko e colaboradores.	17
Figura 13: Formas enantioméricas da Base de Tröger	19
Figura 14: BT que interagem com o DNA. (a) Base de Tröger simétrica com dois substituintes de fenantrolina; (b) Base de Tröger simétrica com dois substituintes de proflavina; (c) Base de Tröger assimétrica com um substituinte de proflavina e outro de fenantrolina.	20
Figura 15: Ligantes fluorescentes estudados.	29
Figura 16: Energia livre de interação (ADT) dos ligantes 1ac e 2ac com o B-DNA (X3DNA) e a energia média de interação (- -).	32
Figura 17: Energia livre de interação (ADT) dos ligantes 3ac e 4ac com o B-DNA (X3DNA) e a energia média de interação (- -).	35

Figura 18: Energia relativa (kcal.mol ⁻¹) X Ângulos de diedro (graus): valores obtidos para os ligantes 1a e 2a no vácuo e em meio aquoso, através de cálculo de funcional de densidade B3LYP no conjunto de bases 6-31G(d) (Spartan '08, versão 1.2.0).	38
Figura 19: Energia relativa (kcal.mol ⁻¹) X Ângulos de diedro (graus): valores obtidos para os ligantes 1b e 2b no vácuo e em meio aquoso, através de cálculo de funcional de densidade B3LYP no conjunto de bases 6-31G(d) (Spartan '08, versão 1.2.0).	38
Figura 20: Energia relativa (kcal.mol ⁻¹) X Ângulos de diedro (graus): valores obtidos para os ligantes 1c e 2c no vácuo e em meio aquoso, através de cálculo de funcional de densidade B3LYP no conjunto de bases 6-31G(d) (Spartan '08, versão 1.2.0).	39
Figura 21: Energia relativa (kcal.mol ⁻¹) X Ângulos de diedro (graus): valores obtidos para os ligantes 3a e 4a no vácuo e em meio aquoso, através de cálculo de funcional de densidade B3LYP no conjunto de bases 6-31G(d) (Spartan '08, versão 1.2.0).	41
Figura 22: Energia relativa (kcal.mol ⁻¹) X Ângulos de diedro (graus): valores obtidos para os ligantes 3b e 4b no vácuo e em meio aquoso, através de cálculo de funcional de densidade B3LYP no conjunto de bases 6-31G(d) (Spartan '08, versão 1.2.0).	41
Figura 23: Energia relativa (kcal.mol ⁻¹) X Ângulos de diedro (graus): valores obtidos para os ligantes 3c e 4c no vácuo e em meio aquoso, através de cálculo de funcional de densidade B3LYP no conjunto de bases 6-31G(d) (Spartan '08, versão 1.2.0).	41
Figura 24: Os seis parâmetros básicos das possíveis alterações dos pares de bases do DNA representados por retângulos sólidos. Adaptado de Ghorbani e colaboradores....	44
Figura 25: Distância dos ligantes do Grupo A em relação aos pares de bases do DNA ao longo da simulação.	46
Figura 26: Número de Ligações de Hidrogênio dos ligantes do Grupo A com o DNA ao longo da simulação.	47
Figura 27: RMSD do oligonucleotídeo sem ligante e dos complexos (ligante e DNA) do Grupo A após a rampa de aquecimento.	48
Figura 28: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo 1aI de 0 a 25ns.	49
Figura 29: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo 1bI de 0 a 25ns.	50
Figura 30: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo 1cI de 0 a 25ns.	50

Figura 31: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo 2aI de 0 a 25ns.....	50
Figura 32: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo 2bI de 0 a 25ns.....	51
Figura 33: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo 2cI de 0 a 25ns.....	51
Figura 34: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo 1aS de 0 a 25ns.....	51
Figura 35: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo 1bS de 0 a 25ns.....	52
Figura 36: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo 1cS de 0 a 25ns.....	52
Figura 37: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo 2aS de 0 a 25ns.....	52
Figura 38: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo 2bS de 0 a 25ns.....	53
Figura 39: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo 2cS de 0 a 25ns.....	53
Figura 40: Parâmetro <i>Rise</i> das interações do tipo intercalação dos ligantes do Grupo A com o DNA.....	55
Figura 41: Parâmetro <i>Rise</i> , para o conjunto de pares de bases AATT das interações do tipo sulco dos ligantes do Grupo A com o DNA.....	56
Figura 42: Parâmetro <i>Rise</i> das interações do tipo sulco dos ligantes do Grupo A com o DNA.	57
Figura 43: Parâmetro <i>Roll</i> das interações do tipo intercalação dos ligantes do Grupo A com o DNA.....	58
Figura 44: Complexo 2aI com ligante intercalado no DNA, resultando um <i>Roll</i> negativo.	60
Figura 45: Parâmetro <i>Roll</i> das interações do tipo sulco dos ligantes do Grupo A com o DNA.	60
Figura 46: Parâmetro <i>Twist</i> das interações do tipo intercalação dos ligantes do Grupo A com o DNA.....	61

Figura 47: Parâmetro <i>Twist</i> das interações do tipo sulco dos ligantes do Grupo A com o DNA.	64
Figura 48: Distância dos ligantes do Grupo B em relação aos Pares de Bases do DNA ao longo da simulação.	65
Figura 49: Número de Ligações de Hidrogênio dos ligantes do Grupo B com o DNA ao longo da simulação.	67
Figura 50: RMSD do oligonucleotídeo sem ligante e dos complexos (ligante e DNA) do Grupo B.	68
Figura 51: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo 3aI de 0 a 25ns.	69
Figura 52: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo 3bI de 0 a 25ns.	70
Figura 53: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo 3cI de 0 a 25ns.	70
Figura 54: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo 4aI de 0 a 25ns.	70
Figura 55: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo 4bI de 0 a 25ns.	71
Figura 56: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo 4cI de 0 a 25ns.	71
Figura 57: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo 3aS de 0 a 25ns.	71
Figura 58: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo 3bS de 0 a 25ns.	72
Figura 59: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo 3cS de 0 a 25ns.	72
Figura 60: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo 4aS de 0 a 25ns.	72
Figura 61: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo 4bS de 0 a 25ns.	73
Figura 62: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo 4cS de 0 a 25ns.	73

Figura 63: Parâmetro <i>Rise</i> das interações do tipo intercalação dos ligantes do Grupo B com o DNA.....	74
Figura 64: Movimento do ligante se acomodando no gap no complexo 4bI.	76
Figura 65: Parâmetro <i>Rise</i> das interações do tipo sulco dos ligantes do Grupo A com o DNA.	76
Figura 66: Intercalação via sulco menor do complexo 4bS, resultando a compressão do conjunto de pares de bases ATAT. As setas vermelhas indicam as posições que o ligante exerce pressão sobre o DNA.	77
Figura 67: Parâmetro <i>Roll</i> das interações do tipo intercalação dos ligantes do Grupo A com o DNA.....	78
Figura 68: Representação esquemática do complexo 3aI, destacando o gap no CPB AATT e as tarjas vermelhas indicando o resultado de <i>Roll</i> negativo.....	79
Figura 69: Representação da movimentação do ligante no gap do complexo 4aI.	80
Figura 70: Representação esquemática do complexo 4bI aos 15ns de simulação, resultando um <i>Roll</i> positivo para o CPB GATC e um negativo para o AATT.	81
Figura 71: Representação da movimentação do ligante no gap do complexo 4cI.	82
Figura 72: Parâmetro <i>Roll</i> das interações do tipo sulco dos ligantes do Grupo B com o DNA.	83
Figura 73: Representação esquemática da indução a um <i>Roll</i> negativo do CPB TTAA, pelos respectivos ligantes dos complexos 4aS e 4bS.	85
Figura 74: Parâmetro <i>Twist</i> das interações do tipo intercalação dos ligantes do Grupo B com o DNA.....	86
Figura 75: Movimentação do ligante no gap do complexo 3cI. A: ligante mais intercalado, B: ligante menos intercalado.	88
Figura 76: Parâmetro <i>Twist</i> das interações do tipo sulco dos ligantes do Grupo A com o DNA.	90

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1: Diagrama de Jablonski. Adaptado de Jäeger e colaboradores	11
Esquema 2: Mecanismo ESIPT para os 2-(2'-hidroxifenil)benzazóis. Adaptado de Rodembusch e colaboradores	12
Esquema 3: Síntese da primeira BT.	18
Esquema 4: Proposta sintética de Wagner para o mecanismo de reação das BT.....	18
Esquema 5: Síntese das BT fluorescentes por ESIPT; X = S, O e NH.	21
Esquema 6: Funcionamento do algoritmo genético. Adaptado de Morris e colaboradores.....	23
Esquema 7: Interconversão do conformero <i>cis</i> no conformero <i>trans</i> em hidroxibenzazóis em solvente aquoso.....	38
Esquema 8: Representação esquemática das principais estruturas canônicas dos ligantes 2ac.....	39
Esquema 9: Interconversão do conformero <i>cis</i> no conformero <i>trans</i> em hidroxibenzimidazóis 3a e 4a em solvente aquoso.....	42
Esquema 10: Interconversão do conformero <i>cis</i> no conformero <i>trans</i> em hidroxibenzimidazóis 3b e 4b em solvente aquoso.	43

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Características estruturais do A-, B- e Z-DNA.....	6
Tabela 2: Identificação dos PB, <i>gap</i> e CPB do DNA, vistos a partir do sulco menor. ..	30
Tabela 3: Resultados das docagens moleculares do Grupo de Ligantes A com o DNA.	33
Tabela 4: Resultados das docagens moleculares do Grupo de Ligantes B com o DNA.	36
Tabela 5: Valores de barreira de interconversão do rotâmetro <i>cis</i> para <i>trans</i> em kcal.mol ⁻¹	39
Tabela 6: Comprimentos de ligações para os ligantes 1ac e 2ac.....	40
Tabela 7: Valores de barreira de interconversão do rotâmetro <i>cis</i> para <i>trans</i> em kcal.mol ⁻¹	42
Tabela 8: Resultados médios de RMSD do oligonucleotídeo sem ligante e dos complexos (ligante e DNA) do Grupo A após a rampa de aquecimento	49
Tabela 9: Resultados experimentais do parâmetro <i>Rise</i> do oligonucleotídeo e do primeiro, mais os complexos com interações do tipo intercalação por simulação de dinâmica molecular.....	56
Tabela 10: Resultados experimentais do parâmetro <i>Rise</i> do oligonucleotídeo e por simulação de dinâmica molecular do primeiro mais os complexos com interações do tipo sulco.	58
Tabela 11: Resultados do parâmetro <i>Roll</i> para os conjuntos de pares de bases próximos ao ligante nas interações do tipo intercalação do grupo A.	59
Tabela 12: Resultados do parâmetro <i>Roll</i> para os conjuntos de pares de bases próximos ao ligante nas interações do tipo sulco do grupo A.	61
Tabela 13: Resultados do parâmetro <i>Twist</i> para os conjuntos de pares de bases próximos ao ligante nas interações do tipo intercalação do grupo A.	63
Tabela 14: Resultados do parâmetro <i>Twist</i> para os conjuntos de pares de bases próximos ao ligante nas interações do tipo intercalação do grupo A.	64
Tabela 15: Resultados médios de RMSD do oligonucleotídeo sem ligante e dos complexos (ligante e DNA) do Grupo B após a rampa de aquecimento.....	69
Tabela 16: Resultados experimentais do parâmetro <i>Rise</i> do oligonucleotídeo e por simulação de dinâmica molecular do primeiro mais os complexos com interações do tipo intercalação.....	75

Tabela 17: Resultados experimentais do parâmetro <i>Rise</i> do oligonucleotídeo e por simulação de dinâmica molecular do primeiro mais os complexos com interações do tipo sulco.	77
Tabela 18: Resultados do parâmetro <i>Roll</i> para os conjuntos de pares de bases do DNA próximos ao ligante nas interações do tipo intercalação do grupo B.	83
Tabela 19: Resultados do parâmetro <i>Roll</i> para os conjuntos de pares de bases do DNA próximos ao ligante nas interações do tipo sulco do grupo B.	84
Tabela 20: Resultados do parâmetro <i>Twist</i> para os conjuntos de pares de bases do DNA próximos ao ligante nas interações do tipo intercalação do Grupo B.	87
Tabela 21: Resultados do parâmetro <i>Twist</i> para os conjuntos de pares de bases do DNA próximos ao ligante nas interações do tipo sulco do Grupo B.	91

1 INTRODUÇÃO

Compostos benzazólicos pertencem a uma classe de moléculas com propriedades fotofísicas muito interessantes, sendo estes muito utilizados como precursores sintéticos para a obtenção de novos materiais fotoluminescentes, tais como: matrizes poliméricas^{1,2}, matrizes de sílica^{3,4}, compostos celulósicos⁵, sensores fluorescentes⁶ e sensores químicos⁷.

Para esta classe de moléculas, pode-se citar além de propriedades fotofísicas peculiares, também propriedades farmacológicas muito interessantes. Dentre estas propriedades farmacológicas estão: atividade bactericida⁸, anti-inflamatória⁹, antiglicação¹⁰, anticâncer^{11,12} e antimicrobiana^{9,13,14}. Elzahabi¹¹ sintetizou treze novos possíveis agentes anticânceres derivados de compostos benzazólicos, os quais foram testados no Instituto Nacional do Câncer (NCI), EUA, contra sessenta tipos de células de câncer. Os novos compostos apresentaram atividade de moderadas a altas em um bom percentual de células doentes. Em trabalho recente Zablotskaya e colaboradores⁹ sintetizaram uma série de novos derivados benzazólicos e estudaram suas atividades anti-inflamatória e psicotrópica, *in vivo* e avaliaram a citotoxicidade *in vitro*. Estes compostos apresentaram ação sedativa, elevada atividade anti-inflamatória possuindo efeitos citotóxicos seletivos, além disto, alguns demonstram ação antimicrobiana. Em outro trabalho, Hussein e colaboradores¹⁵ sintetizaram dois complexos com os lantanídeos Európio ou Térbio com o ácido 2-tiaceticobenzotiazol. Para os complexos sintetizados foram estudados a afinidade pelo DNA, atividade antimicrobiana e a citotoxicidade. Por estudo fotofísicos os autores concluem que os novos compostos tem alta afinidade com DNA. Além disso, apresentaram resultados positivos em atividade antibacteriana e antitumoral, confirmando a hipótese inicial dos autores. Abella e colaboradores¹⁶ sintetizaram e estudaram o comportamento fotofísico de três novas bases de Tröger fluorescentes derivadas de benzazóis. Sabe-se que as bases de Tröger possuem atividades biológicas bem interessantes, além de uma grande afinidade pelo DNA, devido a sua estrutura rígida em forma de “V”, mas o mecanismo de ação desta nova classe de moléculas em sistemas biológicos, ainda não foi elucidado. Oliveira e colaboradores¹⁷ recentemente realizaram estudos por docagem e dinâmica molecular de três bases de Tröger similares às sintetizadas por Abella e colaboradores¹⁶. Os estudos apontam que as bases de Tröger derivadas de benzazóis possuem uma grande afinidade pelo DNA, podendo interagir tanto em sulco menor, quanto em intercalação¹⁸.

Neste trabalho foi realizado o estudo por docagem e dinâmica molecular dos precursores sintéticos das bases de Tröger estudadas por Oliveira, como também para as sintetizadas por Abella, além dos respectivos precursores. O intuito foi avaliar se a afinidade se deve à estrutura peculiar das bases de Tröger ou às características dos precursores.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO

O ácido desoxirribonucleico (DNA), em inglês: *deoxyribonucleic acid*, é uma molécula orgânica, formada pela junção de um grande número de nucleotídeos, e que contém as informações genéticas que coordenam o desenvolvimento e funcionamento de todos os seres vivos. O DNA tem dois propósitos principais, o primeiro é fazer cópias de si mesmo, de modo que as células possam se dividir e continuar as mesmas informações, e o segundo, conter instruções sobre a produção de proteínas para que as células possam construir os tecidos de todas as formas de vida.^{19,20,21} Os dados codificados dentro da estrutura do DNA são passados de geração para geração, com uma metade das informações provenientes de sua mãe e a outra metade proveniente do seu pai¹⁹.

A descoberta da estrutura da molécula de DNA foi feita em 1953 pelo norte-americano James Watson e pelo britânico Francis Crick²⁰, o que lhes valeu o Prêmio Nobel de Medicina em 1962, juntamente com Maurice Wilkins.

A molécula de DNA é constituída por uma sequência de nucleotídeos, que por sua vez é formado por três diferentes tipos de moléculas: um açúcar (pentose), um grupo fosfato e uma base nitrogenada (Figura 1)^{19,21}. O açúcar e o fosfato são componentes invariáveis nos nucleotídeos e apresentam função unicamente estrutural na molécula de DNA, sendo as bases nitrogenadas as quais guardam todas as informações necessárias para a síntese das proteínas.

A orientação das ligações entre as três moléculas constituintes dos nucleotídeos é essencial para se determinar o sentido da dupla fita de DNA. A ligação entre a base nitrogenada e a pentose é feita covalentemente através de uma ligação *N*-glicosídica com o carbono-1 da pentose e a ligação entre o grupo fosfato e a pentose é feita através de uma ligação fosfoéster com o carbono-5 da pentose (Figura 1). Para a formação da molécula de DNA é necessário que ocorra a ligação entre os nucleotídeos. Os nucleotídeos estão ligados covalentemente por ligações fosfodiéster formando entre si pontes de fosfato. O grupo hidroxila do carbono-3 da pentose do primeiro nucleotídeo é substituído pelo grupo fosfato, que também substitui a hidroxila do carbono-5 da pentose do segundo nucleotídeo através de uma ligação fosfodiéster²² (Figura 2).

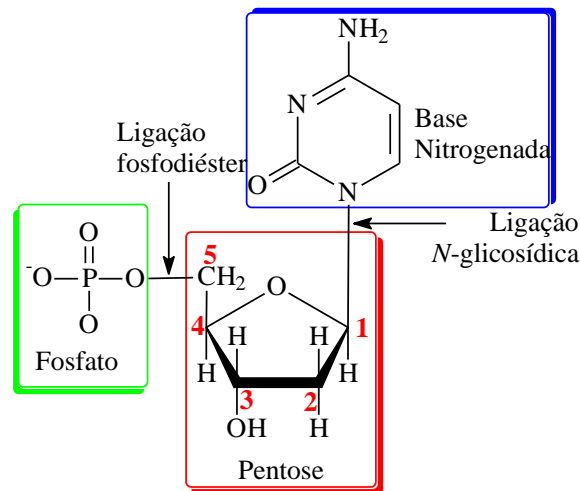


Figura 1: Estrutura básica de um nucleotídeo.

Devido a esta formação, a cadeia de DNA fica com uma direção determinada, isto é, em uma extremidade se encontra livre a hidroxila do carbono-5 da primeira pentose e na outra se tem livre a hidroxila do carbono-3 da última pentose (Figura 2). O crescimento do DNA se dá na direção de 5' para 3', formando assim a fita de DNA. James Watson e Francis Crick²⁰ postularam um modelo tridimensional para a estrutura do DNA baseando-se em estudos de difração de raios X. O DNA consiste de duas cadeias helicoidais de DNA, enroladas ao longo de um mesmo eixo, formando uma dupla hélice de sentido rotacional à direita, considerando que o mesmo se encontra em condições fisiológicas ideais.^{19,20,21,22}

Ainda com base nestes estudos, concluiu-se que na dupla hélice as duas fitas de DNA estão na mesma direção, com sentidos opostos, isto significa que são anti-paralelas. O termo anti-paralelas deve-se ao fato de que uma das fitas tem a direção exata da sua síntese (5'---3') enquanto que a outra está invertida (3'---5').¹⁹

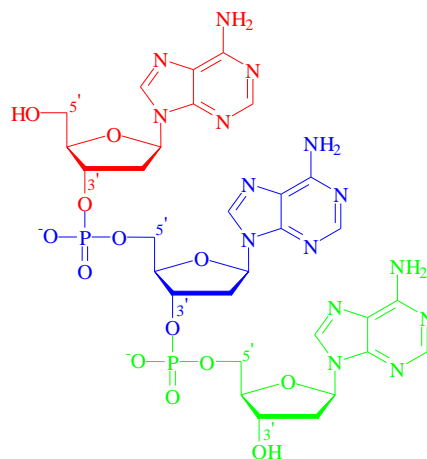


Figura 2: Sequência de três nucleotídeos no sentido de 5' - 3'.

O DNA normalmente encontra-se em forma de uma espiral dextrógira (gira para a direita, ou no sentido horário). Portanto, as duas cadeias de nucleotídeos giram uma sobre a outra e acabam por formar sulcos entre as cadeias de fosfato, deixando expostas as faces das bases nitrogenadas, que não estão unidas por ligações de hidrogênio com a base complementar.²³ Há dois tipos de sulcos na superfície da dupla hélice: um com cerca de 22 Å de largura, denominado sulco maior e outro com cerca de 12 Å de largura, designado de sulco menor (Figura 3).^{24,25,26} Estas dimensões são as médias considerando condições fisiológicas normais, as quais resultam na conformação B-DNA.

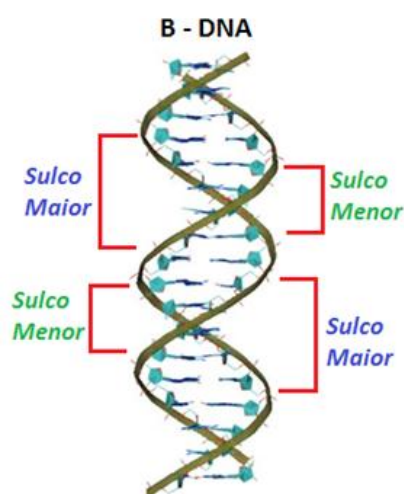


Figura 3: Estrutura do B-DNA, gerada no X3DNA. Adaptado de Ricci e colaboradores.²⁷

Cada tipo de base numa cadeia forma ligações com apenas um tipo de base na outra cadeia. Este comportamento é designado de complementaridade de bases.^{19,21,22} Assim, as purinas formam ligações de hidrogênio com pirimidinas: adenina liga-se com timina e citosina com guanina). Este arranjo de dois nucleotídeos complementares na dupla hélice é chamado de pares de bases (Figura 4). Além das ligações de hidrogênio entre as bases, as duas cadeias são mantidas juntas devido a forças geradas por interações hidrofóbicas entre as bases empilhadas, as quais não são influenciadas pela sequência do DNA^{19,28}.

Os dois tipos de pares de base formam diferentes números de ligações de hidrogênio: AT formam duas ligações de hidrogênio enquanto que GC formam três ligações de hidrogênio. Desta forma a interação entre GC é mais forte que AT^{19,29}.

As várias combinações destas quatro bases são responsáveis pelas diversas diferenças biológicas entre os seres humanos e de todos os seres vivos¹⁹. Os seres humanos têm cerca de três bilhões de posições de nucleotídeos em seu DNA. Assim, com quatro possibilidades (A, T, C ou G) em cada posição, há inúmeras combinações possíveis¹⁹.

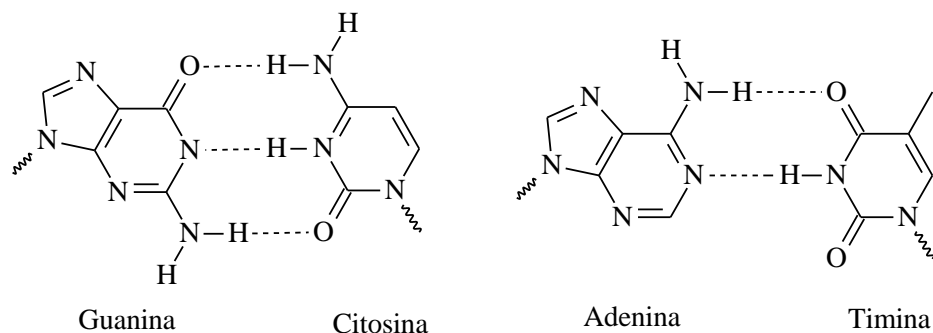


Figura 4: Pareamento GC com três ligações de hidrogênio e AT com duas ligações de hidrogênio.

Mesmo o DNA sendo formado por uma dupla hélice com ligações de hidrogênio entre as bases complementares, é uma molécula flexível, sendo induzida a alterações estruturais conforme o meio em que se encontra. As três estruturas mais comuns são o A-DNA, B-DNA e Z-DNA, sendo a segunda a mais comum em condições fisiológicas comuns. As características estruturais de oligonucleotídeos ou polinucleotídeos com estruturas A, B e Z são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Características estruturais do A-, B- e Z-DNA.

Características estruturais	A	B	Z
Sentido da hélice	À direita	À direita	À esquerda
Diâmetro	~26 Å	~20 Å	~18 Å
Pares de bases por volta helicoidal	11	10	12 (6 dímero)
Torção da hélice por volta de base	33°	36°	60° (por dímero)
Passo da hélice (elevação por volta)	28 Å	34 Å	45 Å
Elevação da hélice por par de base	2,6 Å	3,4 Å	3,7 Å
Inclinação da base perpendicular ao eixo da hélice	20°	6°	7°
Cavidade maior	Estreita e profunda	Larga e profunda	Achatada
Cavidade menor	Larga e rasa	Estreita e profunda	Estreita e profunda
Conformação do anel da ribose	C3'-endo	C2'-endo	C2'-endo em pirimidinas; C3'-endo em purinas
Ligação glicosídica	Anti	Anti	Anti em pirimidinas; syn em purinas

Para o melhor entendimento destas alterações estruturais, se faz necessário o conhecimento das definições e nomenclatura dos parâmetros das estruturas de ácidos nucléicos.³⁰ Estas definições resultaram de discussões em um Workshop sobre DNA realizado no Churchill College em Cambridge, em setembro de 1988, com os maiores pesquisadores da área na época. A necessidade de definições de nomenclaturas para tais parâmetros surgiu devido ao fato que os grupos de pesquisa da época estavam trabalhando de forma independente no desenvolvimento de programas alternativos para a análise geométrica das cadeias polinucleotídicas, mas com diferentes definições e com nomenclatura amplamente diferente, mesmo quando se tratava do mesmo parâmetro.³⁰

O intuito do Workshop foi definir uma linguagem única para quando se falasse de ácidos nucléicos, que viesse a ser aceita como nomenclatura oficial. As possíveis alterações estruturais nos oligonucleotídeos estão apresentadas na Figura 5.

Os parâmetros geométricos dos oligonucleotídeos ou polinucleotídeos podem ser divididos em duas classes: rotacionais e translacionais.

Dentro dos parâmetros rotacionais se encontram o *Inclination*, *Buckle* e *Tilt* no eixo x, *Tip*, *Propeller Twist* e *Roll* no eixo y, *Opening* e *Twist* no eixo z e nos translacionais se encontram *Shear* e *Shift* no eixo x, *Stretch* e *Slide* no eixo y e *Displacement* em ambos os eixos, além de *Stagger* e *Rise* no eixo z.³⁰

Através da interpretação destes parâmetros é possível se definir a geometria global de um oligonucleotídeo ou polinucleotídeo.

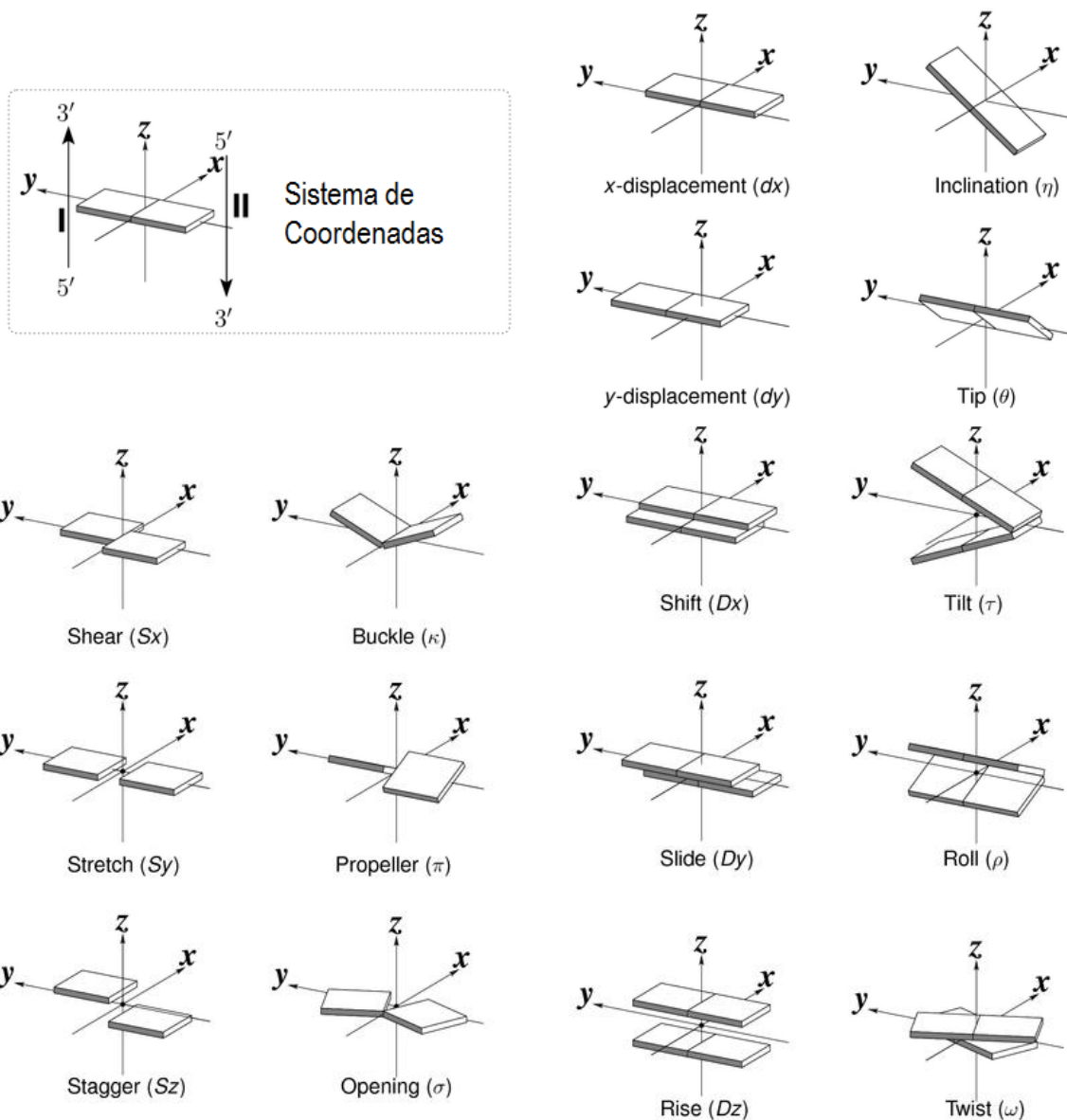


Figura 5: Parâmetros geométricos de polinucleotídeos. Os PB são representados por retângulos sólidos. Adaptado de Lu e colaboradores²⁶

2.2 MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE DNA POR FLUORESCÊNCIA

Ao longo dos anos um grande número de métodos tem sido desenvolvido para detecção de moléculas de DNA. As primeiras técnicas envolviam marcadores radioativos e autorradiografia. Estes métodos foram sensíveis e eficazes, mas demorados. Além disso, a utilização de técnicas de radioisótopos tinha um custo elevado devido à necessidade de películas fotográficas, materiais especiais e os extensos requisitos para manuseio de materias radioativos, além do descarte dos mesmos¹⁹.

A partir de 1980, técnicas de fluorescência ganharam popularidade para a detecção de DNA devido ao seu baixo custo, tornando-se populares na medicina forense^{19,31}.

Os ensaios de detecção baseados em fluorescência são amplamente utilizados em laboratórios forenses, devido às suas capacidades para análise multicolor, bem como seu rápido e fácil manuseio. Medições de fluorescência envolvem uma molécula corante excitada e, em seguida, a detecção da luz que é emitida a partir do corante que retorna ao estado fundamental^{19,32}.

Na aplicação para detecção de DNA com marcadores fluorescentes, o corante é incorporado no DNA e a detecção é amplificada e são visualizados como bandas em um gel ou representados por picos em um eletroferograma.^{19,32}

Na medicina forense pode-se utilizar o DNA presente no sangue, no semen, na pele, na saliva ou em pelos existentes na cena de um crime para identificar o responsável¹⁹.

Esta técnica denomina-se impressão genética ou perfil de DNA. Ao realizar a impressão genética, compara-se o comprimento de seções altamente variáveis do DNA, entre pessoas diferentes. Este método é muito confiável para identificar um criminoso³³. Pode-se requerer às pessoas acusadas de certos tipos de crimes que cedam uma amostra de DNA para ser introduzida numa base de dados. Isto tem facilitado o trabalho dos investigadores na resolução de casos antigos, onde só se obteve uma amostra de DNA da cena do crime³⁴. A impressão genética também pode ser utilizada para identificar vítimas de acidentes em massa,^{35,36} ou para realizar provas de consanguinidade³⁷.

2.3 CORANTES FLUORESCENTES

Uma molécula que é capaz de exibir fluorescência é chamada fluoróforo ou fluorocromo. Fluoróforos são moléculas ou grupamentos com capacidade de absorver e emitir luz a um comprimento de onda específico com base na sua estrutura química e condições ambientais. Os que são utilizados principalmente na rotulagem de DNA são corantes que fluorescem na região visível do espectro, que consiste de luz emitida na faixa de 400-600 nm.

Benzazol é o nome genérico utilizado para identificar um grupo de compostos orgânicos heterocíclicos. Estas substâncias possuem em sua estrutura um anel azólico

condensado a um anel benzênico. O anel azólico caracteriza-se por apresentar dois heteroátomos nas posições 1,3 em um anel de cinco membros, sendo que um deles sempre é o átomo de nitrogênio. Este grupo abrange a família dos benzoxazóis (X = O), benzotiazóis (X = S) e benzimidazóis (X = NH).³⁸ A Figura 6 apresenta a estrutura genérica dos benzazóis.

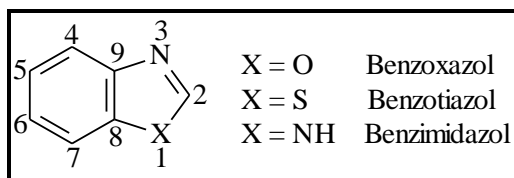


Figura 6: Compostos heterocíclicos benzazólicos.

A introdução de uma fenila com um grupamento OH em *orto* na posição 2 do anel de cinco membros proporciona a formação dos heterociclos chamados 2-(2'-hidroxifenil)benzazóis como pode ser visto na Figura 7.

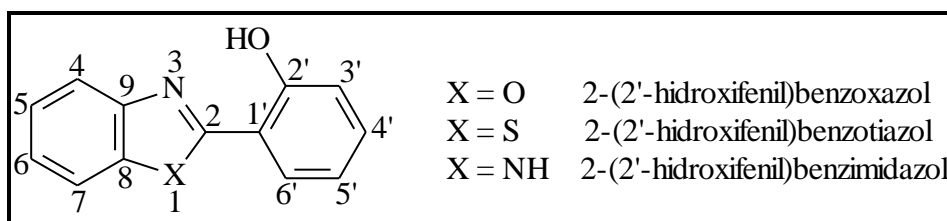


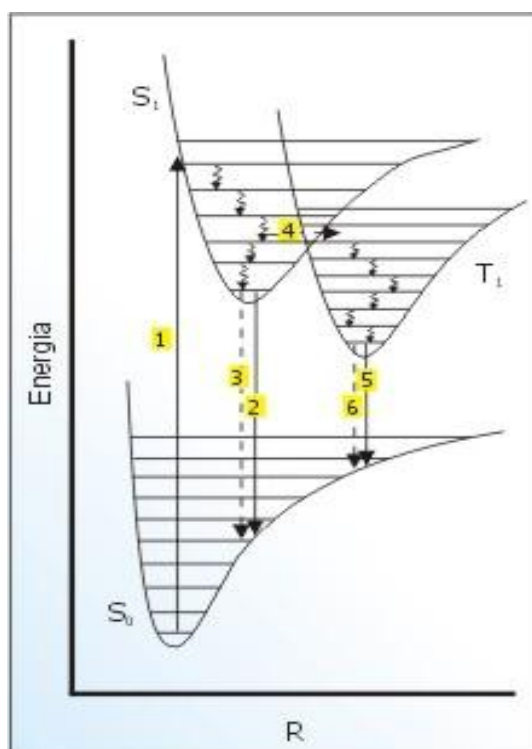
Figura 7: Heterociclos do tipo 2-(2'-hidroxifenil)benzazóis.

Estas moléculas caracterizam-se por apresentar propriedades fotofísicas muito interessantes, como uma emissão de fluorescência através de um mecanismo de transferência protônica intramolecular no estado eletrônico excitado (ESIPT).^{39,40,41} Todos eles apresentam ligações intramoleculares do tipo ligações de hidrogênio.⁴²

2.3.1 Fluorescência e transferência protônica intramolecular no estado eletrônico excitado

A fluorescência é uma propriedade importante que está presente em certos tipos de moléculas e como método analítico óptico é conhecida como fluorescência molecular.⁴³ Neste método as moléculas de interesse são excitadas para obter-se uma espécie cujo espectro de emissão fornece informações úteis para análises quali e quantitativas. A excitação é feita por absorção de fótons a partir de uma fonte e as transições eletrônicas responsáveis pela fluorescência não envolvem mudanças de *spin* eletrônico¹⁹, conforme observado no diagrama do Esquema 1.

O diagrama hipotético do Esquema 1 mostra as curvas de energia potencial para os estados eletrônicos fundamental (S_0), excitados (S_1) e triplete (T_1) e os eventos radiativos e não radiativos que podem ocorrer: 1. Absorção de radiação ($S_0 \rightarrow S_1$), 2. Emissão de fluorescência ($S_1 \rightarrow S_0$), 3. Conversão interna e relaxação vibracional ($S_1 \rightarrow S_0$), 4. Cruzamento intersistemas ($S_1 \rightarrow T_1$), 5. Emissão de fosforescência ($T_1 \rightarrow S_0$), 6. Cruzamento intersistemas ($T_1 \rightarrow S_0$).



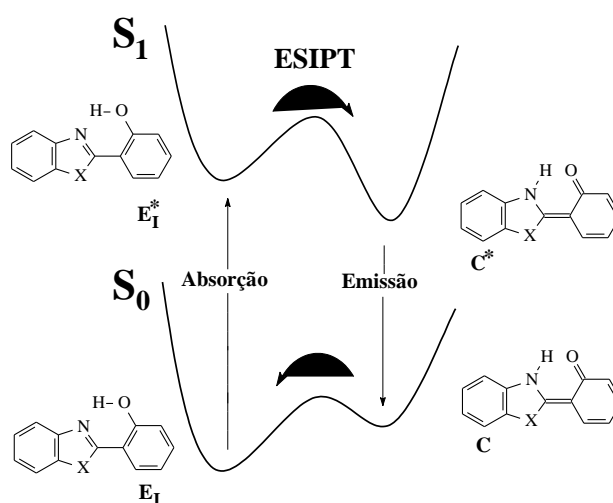
Esquema 1: Diagrama de Jablonski. Adaptado de Jäeger e colaboradores⁴⁴

Uma das grandes vantagens deste tipo de método é sua alta sensibilidade, com limites de detecção de 1 a 3 ordens de grandeza menores que os encontrados na técnica de espectroscopia de absorção molecular. Frequentemente as bandas de fluorescência molecular são encontradas centradas em comprimentos de onda que são maiores que a linha de ressonância. Esse deslocamento para comprimentos de onda maiores é denominado deslocamento de Stokes.^{43,45}

O Esquema 2 apresenta o mecanismo ESIPT para os 2-(2'-hidroxifenil)benzazóis. O confômero enol-*cis* (E_1) representa a espécie predominante no estado fundamental, com uma forte ligação de hidrogênio intramolecular entre o átomo de nitrogênio e o hidrogênio da hidroxila fenólica. Através da excitação deste

confômero gera-se a forma enol-*cis* excitada (E_1^*), que é sucessivamente convertida no tautômero ceto excitado (C_1^*), através da transferência do próton (do -OH fenólico).

Este fenômeno acontece porque o grupo doador de elétrons torna-se mais ácido e o grupo aceptor torna-se mais básico no estado excitado e a distância do átomo de hidrogênio (grupo ácido / 2'-OH) e o do grupo aceptor (grupo básico / N-3) deve estar em proximidade inferior a 2 Å e com uma geometria adequada.⁴⁶ O tautômero ceto (C^*) excitado relaxa emitindo fluorescência e retornando ao estado fundamental (C) e a partir deste estado, o próton retorna ao seu estado inicial regenerando a forma normal (E_1) sem qualquer alteração fotoquímica.^{39,40}



Esquema 2: Mecanismo ES IPT para os 2-(2'-hidroxifenil)benzazóis. Adaptado de Rodembusch e colaboradores⁵¹

Esta transferência protônica é um processo extremamente rápido ($<10^{-12}$ s). Por outro lado, o estado C^* por si tem um tempo de vida de alguns nanosegundos (10^{-9} s), ou seja, três ordens de grandeza maior do que o estado E_1^* . Por causa desta diferença de tempos de vida as moléculas excitadas acumulam-se no estado C^* provocando uma inversão de população entre os estados fundamental e excitado.⁴⁷

Embora inúmeras moléculas orgânicas absorvam luz na região ultravioleta ou visível, nem todas possuem a capacidade de exibir luminescência. As moléculas que apresentam o mecanismo ES IPT absorvem na região do ultravioleta e emitem na região do visível, observando-se o aparecimento de uma grande separação entre as bandas de absorção e emissão de fluorescência. Esta separação entre as bandas, medida em termos de deslocamento de Stokes, é definida como a diferença entre os comprimentos de onda dos máximos de absorção e emissão da molécula¹⁹, conforme apresentado na Figura 8.

Um grande deslocamento de Stokes é uma característica interessante para uma sonda biológica, pois permite uma melhor separação entre a luz inerente da matriz e a luz dispersa pela amostra.^{38,48}

Esta mudança permite o uso de filtros ópticos para a luz de excitação separada da emissão de luz. Com uma seleção cuidadosa e filtros ópticos, os fluoróforos podem ser escolhidos com espectros de emissão em comprimento de onda desejável.^{19,49}

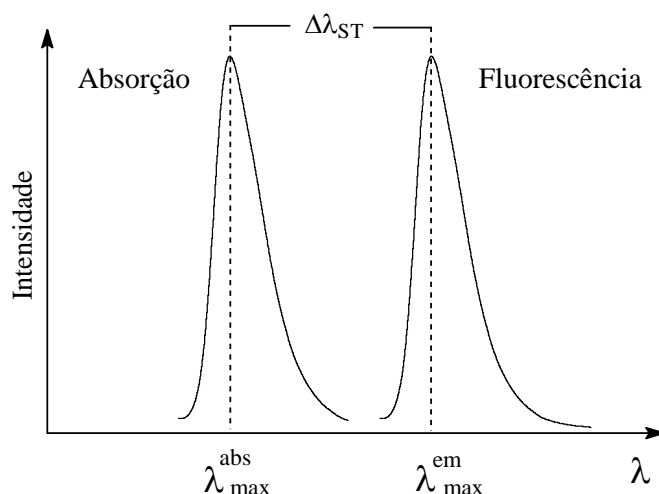


Figura 8: Deslocamento de Stokes ($\Delta\lambda_{ST}$). Adaptado de Rodembusch e colaboradores⁵¹

O deslocamento de Stokes da maioria das espécies fluorescentes encontra-se na faixa de 30 a 70 nm. Entretanto, quando a espécie envolvida sofre mudanças estruturais no estado excitado, como o fototautomerismo da ESIPT, assumindo uma estrutura de menor energia antes de emitir luz, o deslocamento de Stokes poderá se tornar maior, usualmente na faixa de 100 a 250 nm⁵⁰, fenômeno amplamente observado nos 2-(2'-hidroxifenil)benzazóis.

A rigidez estrutural desta família de moléculas, propiciada pela presença da ligação de hidrogênio intramolecular, aumenta a probabilidade de transição radiativa entre o estado excitado e o estado fundamental, condição que favorece a ocorrência de fluorescência.^{43,45,51}

2.3.2 Fatores que influenciam o mecanismo de ESIPT

Sabe-se que o mecanismo de ESIPT é completamente dependente do meio, podendo sofrer influência pela natureza do solvente^{52,53} ou pela matriz^{5,54} em que o ligante se encontra. Muitos estudos experimentais^{55,56,57,58,59} e teóricos^{60,61,62,63,64,65,66}

têm sido realizados para melhor compreender a influência da polaridade do solvente nas diferentes geometrias estabilizadas em solução (Figura 9).

Em solventes próticos ou polares, existe uma competição entre a transferência do próton intramolecular e a intermolecular com o solvente. Desta forma acaba enfraquecendo a ligação de hidrogênio intramolecular e possibilitando a estabilização do confôrmero enol-*cis* aberto (E_{II}), originário da ruptura da ligação de hidrogênio entre a hidroxila fenólica e o nitrogênio da posição 3, seguido por uma rotação de 180° do grupo 2'-hidroxifenila sob a ligação C_2-C_1 .⁶⁷

Em solventes apolares ou pouco polares, confôrmeros do tipo enol-*trans* (E_{III}) e enol-*trans* aberto (E_{IV}) podem ser estabilizados. Todos os confôrmeros (E_{II} - E_{IV}) que apresentam relaxação normal podem competir com o confôrmero enol-*cis* (E_I) responsável pelo mecanismo de ESIPT,⁶⁸ apresentando em muitos casos uma dupla emissão de fluorescência em um mesmo solvente.⁶⁷

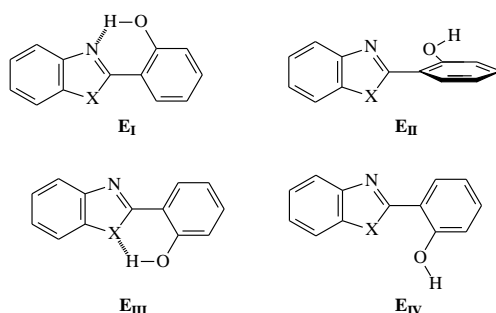


Figura 9: Geometrias da forma enol. Adaptado de Rodembusch e colaboradores⁵¹

Klymchenko e colaboradores⁶⁹ sintetizaram dois novos compostos fluorescentes por ESIPT a partir da reação da 3-hidroxicromona com a espermina, os quais estão apresentados na *Figura 10*.

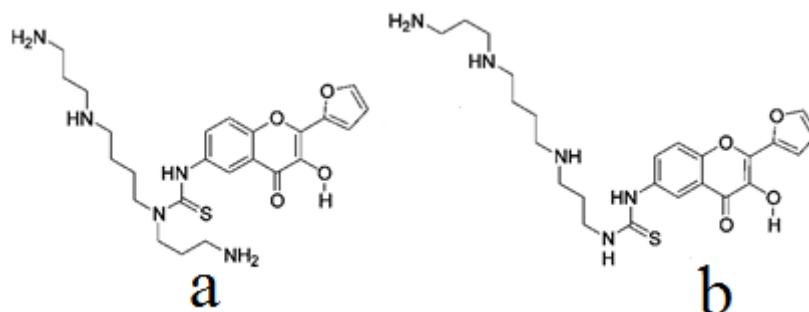


Figura 10: Novos derivados da 3-hidroxicromona com a espermina. Adaptado de Klymchenko e colaboradores.⁶⁹

Os autores descrevem que estes novos compostos são muito sensíveis ao meio. No estudo fotofísico foi observado em solventes apróticos a emissão de fluorescência é decorrente do mecanismo de ESIPT. Em solventes próticos, a emissão por ESIPT sofre uma grande decréscimo, sendo observada uma dupla emissão de fluorescência devido às ligações de hidrogênio formadas com os átomos envolvidos no mecanismo. Além disso, em solventes próticos a dupla emissão varia também em função da polaridade do solvente, de modo que em metanol a emissão do tautômero ceto é cerca de cinco vezes menor do que em octanol, que é menos polar (Figura 11). Como a água é um solvente chave no estudo de sistema biológicos, os autores estudaram a influência deste primeiro na dupla emissão de fluorescência dos novos compostos obtidos. Os espectros de fluorescência apresentaram um forte decréscimo na emissão pelo tautômero ceto, conforme o aumento do percentual de água em acetona (Figura 11). Além disso, o aumento do teor de água muda consideravelmente à banda de emissão máxima para o azul. Deste modo, informações sobre o conteúdo de água na proximidade do ligante pode ser obtida tanto pela proporção das duas bandas de emissão como também pela posição da banda máxima, sendo muito útil para estudo em sistemas biomoleculares. Estes novos ligantes em interações com o DNA de fita dupla, a intensidade de emissão de fluorescência aumenta drasticamente, principalmente pelo mecanismo de ESIPT, o que não é observado em interações com o DNA de fita simples. Isto sugere que no primeiro caso, o ligante está intercalado, não ficando tão exposto a solvatação pela água, como no segundo caso. Os resultados demonstram que estes novos compostos são muito úteis como sondas em sistemas biológicos.⁶⁹

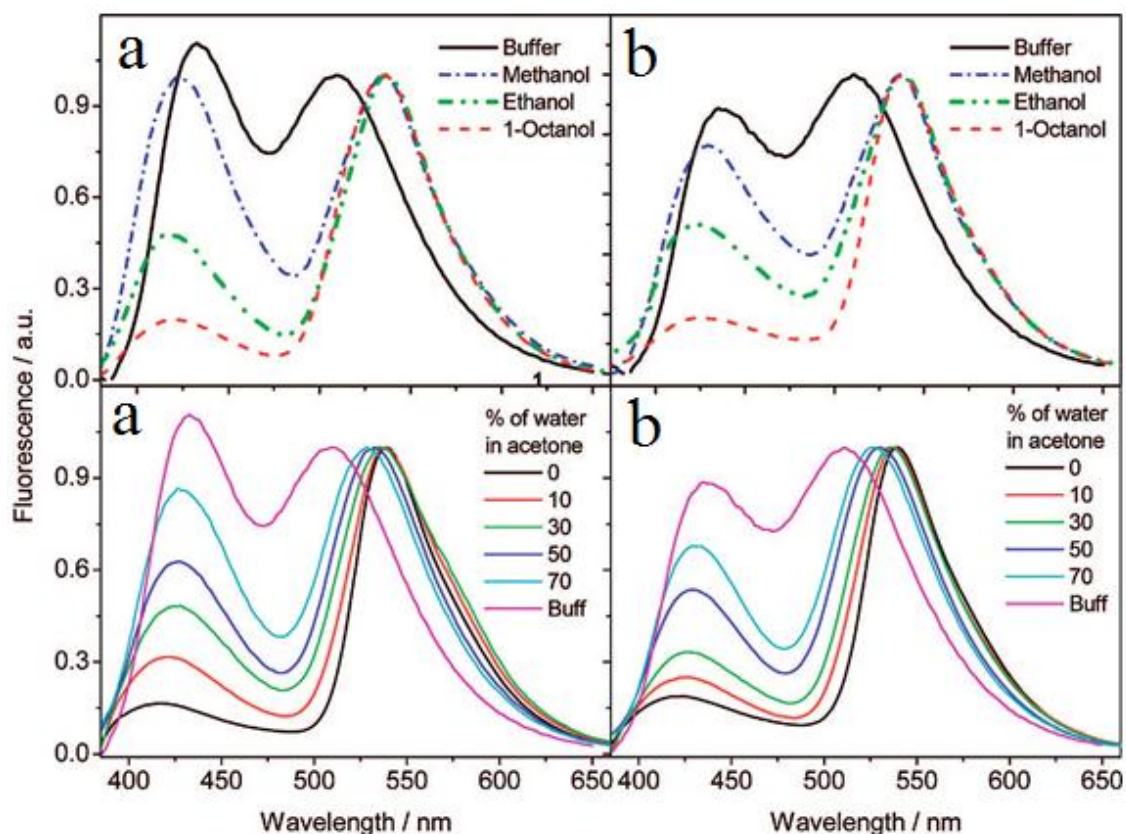


Figura 11: Estudo fotofísico dos novos compostos sintetizados por Klymchenko e colaboradores. Na parte superior, diferentes solventes e na parte inferior variando a concentração de água na acetona. Adaptado de Klymchenko e colaboradores.⁶⁹

Dupradeau e colaboradores⁷⁰ utilizaram o 2-(2'-hidroxifenil)-benzoxazol (HBO) para estudar o ambiente de hidratação em estruturas de DNA de fita dupla. Os autores sugerem que o aumento da hidratação em sulco pode diminuir a fração molar do conformero E_I (Figura 9), o qual é responsável pelo mecanismo de ESIPT. Desta forma, quanto maior a probabilidade de fazer ligações de hidrogênio intermolecular com o HBO, menor a probabilidade de ocorrer o mecanismo de ESIPT, resultando em emissões de fluorescência a menores comprimentos de onda.

Os autores sintetizaram um novo derivado de HBO e incorporaram ao oligonucleotídeo de DNA (Figura 12), nas sequências 5'-CGTTTC(HBO)TTCTC e 5'-GAGAA(HBO)GAAACG.

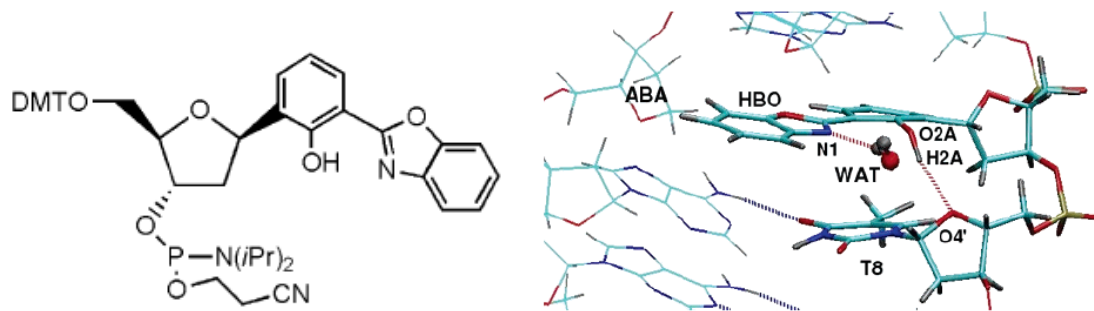


Figura 12: A esquerda o novo derivado benzazólicos sintetizado e a direita a representação da incorporação do mesmo na sequência de DNA. Adaptado de Klymchenko e colaboradores.⁶⁹

Para caracterizar a estabilidade dos oligonucleotídeos com o HBO foi analisada a temperatura de desnaturação dos mesmos, estando ambos os resultados muito próximos aos respectivos padrões (DNA *in natura*).

Para o melhor entendimento do sistema foi realizado análises de DM, verificando que o HBO ficou bem acomodado entre as bases nitrogenadas, induzindo a um pequeno alargamento do sulco menor sem causar grandes perturbações ao sistema. Desta forma, os autores concluem o ligante está em uma localização hidrofóbica e bem acomodado entre as bases nitrogenadas, sendo possível identificar o mesmo devido a uma emissão de fluorescência bem característica.^{70,71}

Este efeito de dupla emissão de fluorescência também pode ser observado, quando um composto benzazólico é incorporado em uma matriz sólida.

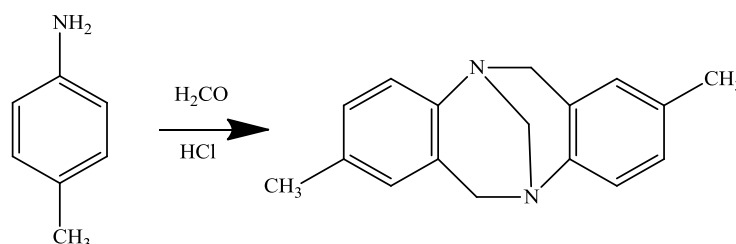
Hoffmann e colaboradores⁴ sintetizaram novos materiais híbridos de sílica incorporados com corantes benzimidazólicos fluorescentes por ESIPT, através do processo sol gel, seguido de uma alta compressão de 6,0 GPa. No estudo fotofísico, os autores observaram que há uma mudança nos comprimentos de onda de emissão para mais baixos, quando comparado com os corantes puros. Este comportamento é atribuído à interação entre as moléculas de corante através da conformação enol-*cis* aberto (E_{II}, Figura 9) e os grupos silanol e água adsorvida pela superfície da sílica.

Comportamento similar também foi observado por Kuplich e colaboradores⁵ ao sintetizaram uma série de quatro compostos fotoativos derivados da triazina a partir da substituição nucleofílica aromática no cloreto cianúrico. Os derivados sintetizados neste trabalho foram incorporados a uma matriz celulósica para a obtenção de novos materiais fluorescentes. No estudo fotofísico em estado sólido, os autores observaram que estes novos compostos ao serem incorporados em uma matriz celulósica acabavam emitindo

uma dupla fluorescência, sendo provavelmente a emissão do tautômero enol e ceto no estado excitado. A emissão do tautômero enol se deve a possíveis ligações de hidrogênio com as hidroxilas da celulose, inibindo o mecanismo de ESIPT.

2.4 BASES DE TRÖGER

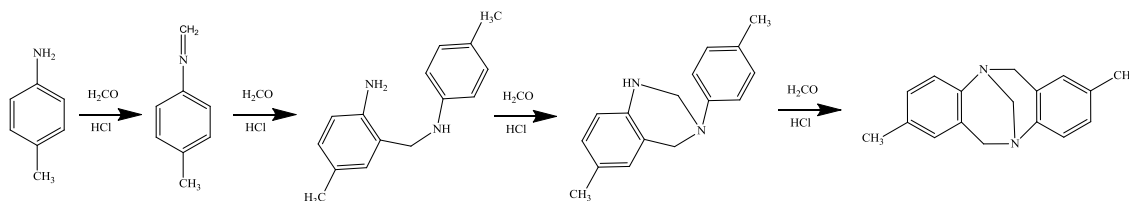
A história das bases de Tröger (TB) começou em 1887, quando Carl Julius Ludwig Tröger sintetizou um composto derivado da reação entre a *para*-metilanilina e o formaldeído em presença de ácido clorídrico, obtendo a 2,8-dimetil-6H,12H-(5,11)-metanodibenzo[b,f][1,5]diazocina (*Esquema 3*)^{72,73,74}.



Esquema 3: Síntese da primeira BT.

A estrutura correta do composto sintetizado por Julius Tröger, após muitas controvérsias, só foi determinada em 1935 por Spielman, a partir de estudos cuidadosos da reatividade de cada reagente.⁷⁵ O composto apresentava uma estrutura na forma de “V” e rígida, com os anéis aromáticos planos e praticamente perpendiculares entre si.⁷⁴

Também em 1935, Wagner⁷⁶ apresenta uma proposta do mecanismo de reação de formação das BT, conforme apresentado no Esquema 4.



Esquema 4: Proposta sintética de Wagner para o mecanismo de reação das BT.

O autor descreve que a reação ocorre basicamente, através da formação de uma imina, seguido de condensações cruzadas entre o nitrogênio e a posição orto do mesmo com o formaldeído. O mecanismo de reação para as BT proposto por Wagner foi confirmado recentemente por outros autores, através de técnicas de ESI-MS/MS⁷⁷ e através de isolamento de intermediários durante a reação.⁷⁸

As Bases de Tröger são moléculas quirais, por possuírem dois nitrogênios estereogênicos. Prelog e Wieland^{74,79}, em 1944, determinaram suas formas enantioméricas, por separação cromatográfica com ácido (+)-lactose hidratada (Figura 13), tornando esta classe de moléculas uma das primeiras a serem resolvidos numa fase estacionária enantiomericamente pura.

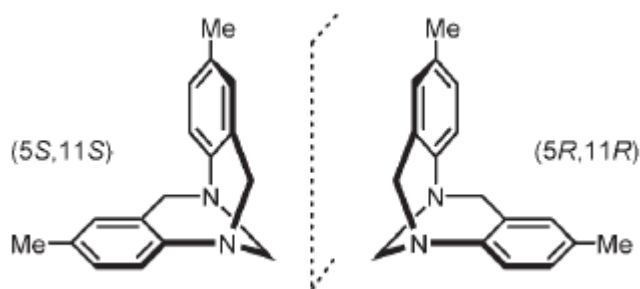


Figura 13: Formas enantioméricas da Base de Tröger

Em 1986, Larson e Wilcox confirmaram por análise de difração de raios X, que a questionável estrutura proposta por Spielman estava correta.⁸⁰ A questão da configuração absoluta das BT só foi resolvida em 1991, quando analisado por cristalografia de raios X um sal de diastereoisômeros de uma BT monoprotonada contendo um contra quiral de configuração conhecida, concluindo que a (+)-BT tem configuração 5S,11S.^{74,81}

2.4.1 Aplicações das Bases de Tröger

Através da evolução dos conhecimentos referentes ao genoma de diversos organismos e dos inúmeros processos celulares diretamente ligados aos ácidos nucleicos, há um crescente interesse para descoberta de novas moléculas capazes de interagir com o DNA⁸². Tais estudos são uma tendência, porque a maioria dos agentes antitumorais utilizados atualmente, que atuam sobre o DNA são pouco seletivos e extremamente tóxicos⁸³.

As BT têm se mostrado como moléculas capazes de interagir com o DNA graças a sua quiralidade e estrutura rígida. Em 1991, Yashima e colaboradores⁸⁴ sintetizaram uma nova BT condensado de 5-amino-1,10-fenantrolina com formaldeído catalisado por ácido clorídrico com solvente etanol, obtendo um rendimento de 22 % do novo produto. Os autores elucidaram pela primeira vez a capacidade dessa classe de compostos em ligar-se de forma não covalente ao DNA. Esse foi o marco inicial para uma série de investigações sobre a interação das BT com o DNA. Em 1991, Yashima e seu grupo

sugeriram que o isômero levorrotatório (-)-(R,R), de mão direita, resultaria em um melhor encaixe às hélices em um B-DNA⁸⁴.

Essa previsão foi confirmada posteriormente por Tatibouët e colaboradores⁸⁵ que demonstraram através de estudos de desnaturação térmica do complexo B-DNA e a BT derivada da acridina que o enantiômero (-)-(R,R) possui maior afinidade pelo oligonucleotídeo do que o enantiômero (+)-(S,S). Em trabalho similar, Bailly e colaboradores⁸⁶ comprovaram a mesma tendência para a BT derivada da proflavina e Baldeyrou e colaboradores⁸⁷ para a BT mista, proflavina e fenantrolina. A estrutura destas BT utilizadas em trabalhos pioneiros com o B-DNA estão apresentadas na Figura 14.

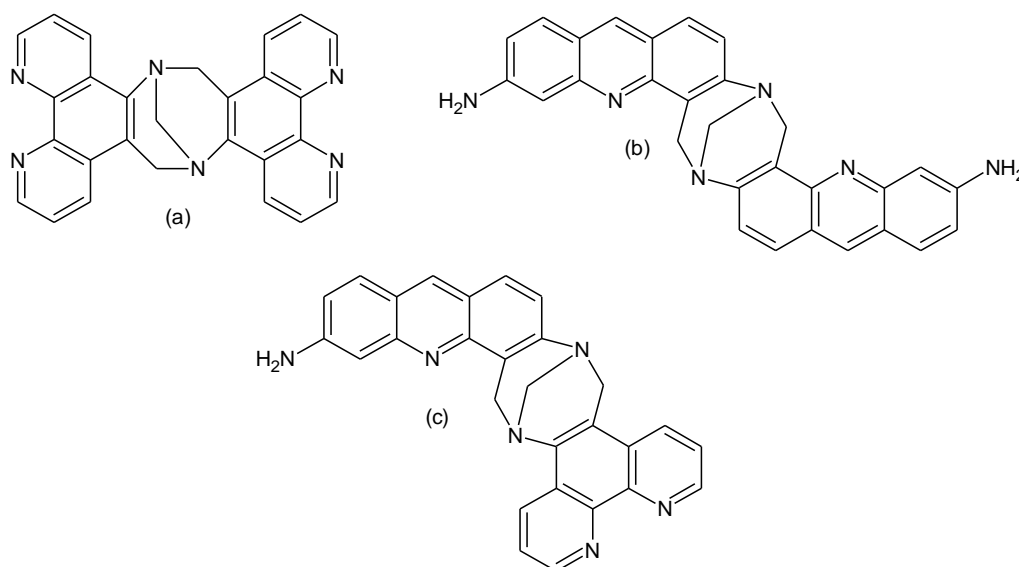
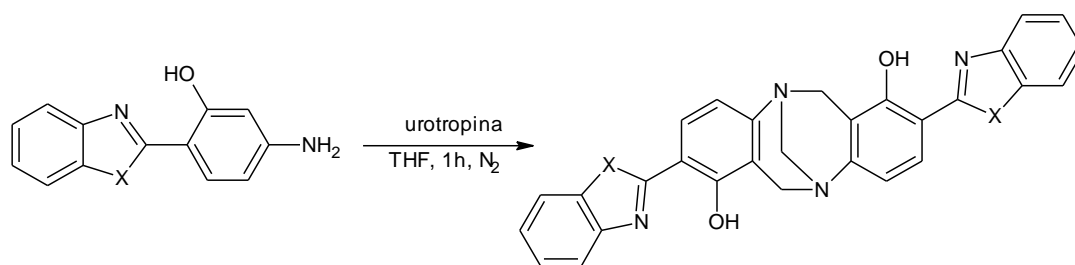


Figura 14: BT que interagem com o DNA. (a) Base de Tröger simétrica com dois substituintes de fenantrolina; (b) Base de Tröger simétrica com dois substituintes de proflavina; (c) Base de Tröger assimétrica com um substituinte de proflavina e outro de fenantrolina

Outras aplicações das bases de Tröger apresentam usos como catalisadores⁸⁸, ligantes quirais⁸⁹ e diferentes atividades biológicas. Um análogo também demonstrou possuir atividade inibitória em relação a uma enzima responsável por desencadear problemas circulatórios e enfarto⁹⁰.

Dentre as diversas sínteses propostas na literatura, pode-se destacar as realizadas em 2004 por Abella e colaboradores¹⁶. Esse grupo sintetizou novos análogos das bases de Tröger, compostos fluorescentes via ESIPT, os quais apresentaram um grande potencial para utilização como sondas biológicas (Esquema 5).



Esquema 5: Síntese das BT fluorescentes por ES IPT; X = S, O e NH.

No entanto, a falta de um conjunto vasto de dados experimentais torna de grande importância à elucidação dos mecanismos da interação destas novas BT com o DNA, para possíveis aplicações futuras.

2.5 DOCAGEM MOLECULAR

A docagem molecular é uma metodologia computacional, que tem por objetivo, prever a afinidade de um ligante e uma macromolécula, permitindo desta forma, caracterizar o comportamento de complexos, bem como elucidar os processos bioquímicos fundamentais. Os estudos de como os ligantes interagem com as macromoléculas receptoras é um dos aspectos centrais na área de Planejamento Racional de Fármacos Baseado em Estrutura (PRBE). Normalmente estas macromoléculas de interesse são caracterizadas por cristalografia de raios X ou espectroscopia de RMN e suas coordenadas atômicas são depositadas em bancos de dados específicos, como por exemplo, *Protein Data Bank*.⁹¹

A capacidade computacional tem aumentado drasticamente nas últimas décadas, tornando possível a utilização de métodos mais sofisticados no *design* de drogas, no entanto, lidar com a flexibilidade do receptor neste tipo de metodologia, ainda é uma questão bastante delicada. A principal razão para esta dificuldade é o grande número de graus de liberdade que devem ser considerados neste tipo de cálculo.⁹²

Normalmente, os programas de docagem molecular são baseados em um algoritmo de busca e uma função de escore.^{93,94} O algoritmo de busca explora o espaço de fases, buscando possíveis conformações e orientações do ligante, enquanto a função de escore pontua os resultados obtidos pelo primeiro, indicando a probabilidade de que a forma de interação encontrada seja a mais favorável. Dessa forma, a função de escore não somente direciona o processo de docagem para o modo de ligação mais favorável, como também fornece um *ranking* dos resultados obtidos ao final do processo.⁹⁴

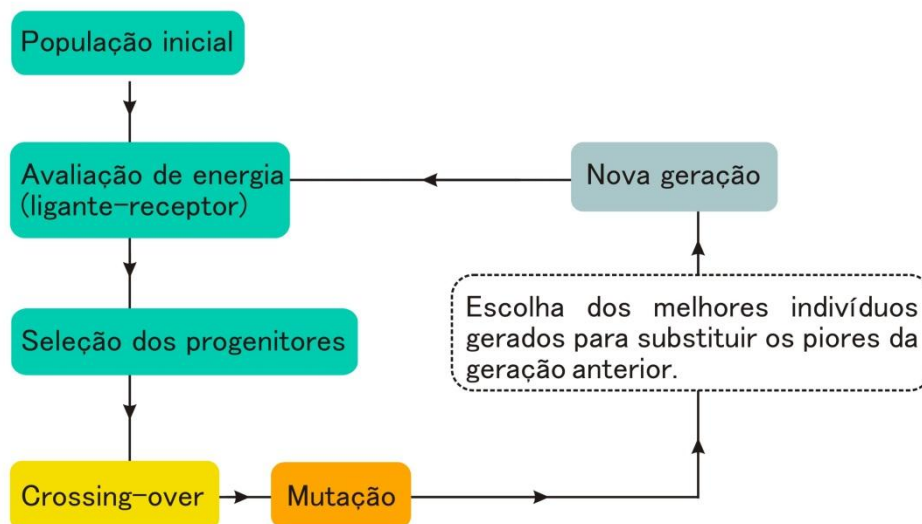
Os algoritmos de busca podem ser divididos em três classes: métodos de simulação, métodos sistemáticos e métodos estocásticos ou randômicos.^{95,96,97}

Os métodos de simulação incluem a simulação por dinâmica molecular e métodos de minimização de energia, mas embora permitam um tratamento detalhado do sistema, dificilmente são capazes de transpor barreiras energéticas entre mínimos locais em um tempo computacionalmente viável. Sendo assim, há sempre a possibilidade de que o ligante fique acomodado num vale de mínimo local. Dessa forma, geralmente são utilizados apenas como algoritmos de busca local para complementar algoritmo de busca global.^{98,94,92}

Os métodos sistemáticos exploram sistematicamente todo o espaço de fases, mas enfrentam o problema da explosão combinatorial quando o ligante é uma molécula flexível, devido ao grande número de graus de liberdade.⁹⁴

Já os métodos estocásticos ou randômicos operam aplicando alterações aleatórias para cada ligante, que são avaliadas, podendo ou não serem aceitas em cada etapa. Na docagem molecular, as duas abordagens estocásticas mais populares são o método de Monte Carlo (MC) e os algoritmos genéticos. No método de Monte Carlo, a probabilidade de se aceitar uma mudança aleatória na estrutura do ligante é calculada utilizando-se uma distribuição de probabilidade de Boltzmann. Já em um método baseado em algoritmos genéticos, a busca por uma interação favorável é baseada na ideia do processo evolucionário em sistemas biológicos. Algoritmos genéticos são uma classe particular de algoritmos evolutivos que usam técnicas inspiradas pela biologia evolutiva como hereditariedade, mutação, seleção natural e recombinação (ou *crossing over*).

Nesta simulação uma população inicial é gerada aleatoriamente, onde os indivíduos são codificados através de suas posições de interações com a macromolécula. Em cada passo da simulação, pequenas modificações aleatórias são feitas, tais como: translação do centro de gravidade, orientação, e rotação ao redor de cada um dos ângulos diedros internos flexíveis. Estas modificações resultam em uma nova configuração, e a energia deste modo de ligação é novamente avaliada. O valor desta nova energia é comparado ao valor obtido no passo anterior. Se o valor da nova energia for menor, a nova configuração é aceita, caso contrário, utilizasse a anterior para uma nova busca (*Esquema 6*).^{92,94,96,97}



Esquema 6: Funcionamento do algoritmo genético. Adaptado de Morris e colaboradores.⁹⁷

As funções de escore avaliam e pontuam as interações encontradas pelos algoritmos de busca e fornecem um *ranking*, podendo ser agrupadas em funções baseadas em: campos de forças, funções empíricas e funções baseadas em conhecimento.^{94,99,100}

Funções de escore baseadas em campos de forças são aquelas que utilizam funções de energia da mecânica molecular clássica⁹⁹, sendo basicamente a afinidade de interação estimada pela soma das interações intermoleculares de van der Waals e as interações eletrostáticas entre todos os átomos das duas moléculas no complexo.⁹⁹

Nos métodos empíricos, para a avaliação da energia livre de ligação entre ligante-receptor, os coeficientes da função de energia livre de ligação são calibrados a partir de dados experimentais.⁹⁴ Um aspecto negativo da utilização deste tipo de avaliação é que os resultados provenientes são dependentes do conjunto de dados utilizado no processo de parametrização.^{101,102}

Com o número cada vez maior de estruturas determinadas experimentalmente, é possível utilizar as informações que delas derivam para construir uma função de energia. A estas funções se dá o nome de funções baseadas em conhecimento.^{92,94,100} Estes métodos tem por base a física estatística clássica, onde se pode utilizar a distribuição das geometrias observadas, com o intuito de se deduzir o potencial de força média, através da lei de Boltzmann que dê como resposta a distribuição observada.¹⁰⁰ Deste modo, ao contrário das funções empíricas, as funções baseadas em conhecimento

não são construídas pela utilização de dados da constante de inibição receptor-ligante determinados experimentalmente.

A avaliação das interações encontradas pelos algoritmos de busca, entre os ligantes e macromoléculas é completamente dependente da função de escore, sendo esta uma das principais limitações atualmente. O fato se deve que a maior parte das funções de escores disponíveis foram parametrizadas com proteínas, e os programas validados apenas para essa classe de moléculas e seus ligantes. Muito provavelmente por essa razão, existe ainda um número muito pequeno de trabalhos utilizando a docagem molecular para ácidos nucleicos,^{103,104} apesar de o DNA ser sabidamente alvo de uma série de fármacos antibióticos e antitumorais.

Os ácidos nucleicos são estruturalmente bastante diferentes das proteínas e possuem características únicas, como alta densidade de carga e geometria quiral. Além disso, os ácidos nucleicos não apresentam um sítio de ligação único e bem definido para cada ligante, como ocorre com as proteínas.^{103,104}

Holt e colaboradores¹⁰³ validaram protocolos de docagem para ácidos nucleicos utilizando os softwares *AutoDock*¹⁰⁵ e *Surflex*.¹⁰⁶ Para isto os autores selecionaram os ligantes de sulco menor distamicina e pentamidina, bem como os intercaladores daunorrubicina e elipticina para estes os estudos. Primeiramente foram selecionadas estruturas cristalográficas caracterizadas com estes ligantes depositadas do PDB. Os ligantes foram retirados das respectivas estruturas cristalográficas, as quais foram utilizadas como dados de entrada para as redocagens (considera-se redocagens porque estas macromoléculas já foram docadas experimentalmente).

Em seguida os autores testaram alguns protocolos de docagem conseguindo reproduzir com precisão as estruturas cristalográficas iniciais. Estes conjuntos de experiências demonstram a utilidade destes programas para o estudo de docagem molecular entre ligantes e ácidos nucleicos alvos. Estas experiências demonstraram que as técnicas de docagem molecular podem ser estendidas com sucesso para incluir como meta, ácidos nucleicos em estudos de triagens virtuais e na concepção de novas drogas.

Em outro trabalho, Ricci e Netz¹⁰⁴ utilizando o programa *AutoDock* desenvolveram um protocolo único para docagem de ácidos nucleicos. Nesse contexto, os autores realizaram não apenas redocagens, como também docagens cruzadas entre os ligantes elipticina e netropsina e quatro oligômeros, sendo estes: um DNA cristalográfico sem *gap*, um DNA cristalográfico com *gap*, um B-DNA canônico e um

B-DNA canônico com um *gap* artificial, a fim de estabelecer um protocolo padrão, capaz de identificar os dois principais modos de interação destes complexos. Elipticina é um agente de intercalação típico com atividade antitumoral, enquanto que netropsina é um antibiótico que ocorre naturalmente, que interage com o DNA através do reconhecimento sulco menor. Os autores ainda aplicaram este protocolo para prever os modos de interação de duas bases de Tröger: uma base simétrica derivada da proflavina e uma base assimétrica derivada proflavina e fenantrolina. Os dados referentes a essas moléculas na literatura permanecem inconclusivos. No entanto, embora o modo de ligação ainda não esteja elucidado, as experiências de espectroscopia e bioquímicas sugerem dois modos de ligação diferentes para estas bases de Tröger, com proflavina intercalada e fenantrolina residente no sulco menor. Finalmente, os autores decidiram testar este protocolo com uma molécula que se liga covalentemente ao DNA e comparar os resultados com os experimentais, optando pela aflatoxina B1 exo-8,9-epóxido, um potente cancerígeno conhecido por intercalar ao DNA formando posteriormente uma ligação covalente com uma guanina. Os autores demonstraram que as limitações dos métodos de docagem atuais podem ser superados por uma escolha apropriada da conformação alvo, como mostraram também que o *AutoDock* é capaz de identificar corretamente dois dos principais modos de interação entre ligante e DNA, fornecendo resultados em completo acordo com dados experimentais da literatura.

Mesmo tendo em conta as limitações e incertezas referentes à utilização destas ferramentas com ácidos nucleicos, estes resultados demonstraram que esses softwares podem reproduzir com precisão as estruturas cristalinas, tanto como interações de sulco menor como em intercalações. Desta forma, estas abordagens podem ser utilizadas para investigar outros ligantes, cujo modo de interação com o DNA ainda é desconhecido, obtendo-se um ponto de partida adequado para estudos posteriores, tais como simulações teóricas de dinâmica molecular.

2.6 DINÂMICA MOLECULAR

Atualmente a simulação de DM é uma das ferramentas mais utilizadas em estudo de macromoléculas biológicas.^{107,108,109} A dinâmica molecular é fundamentada nos princípios da Mecânica Clássica e fornece informações sobre o comportamento microscópico de seus átomos individuais, o qual é dependente do tempo.¹¹⁰ Para a obtenção das propriedades macroscópicas, aplica-se a mecânica estatística, a qual calcula propriedades tais como; pressão, energia interna, volume, temperatura, energia

livre, dentre outros. As moléculas são tratadas como uma coleção de átomos, cuja dinâmica pode ser descrita por forças newtonianas. As equações da segunda lei de movimento de Newton são numericamente integradas para reproduzir a evolução dos átomos no sistema em questão, ou seja, produzir sucessivas configurações do sistema em estudo. Como resultado deste processo, se obtém uma trajetória através do espaço de fases que especifica as posições e as velocidades (ou momentos) das partículas do sistema em instantes sucessivos de tempo.¹¹⁰ Um conjunto de interações é referido como “campo de força”, e é conhecido como uma função da energia potencial, e assim permite que a energia potencial total do sistema seja calculada a partir da estrutura tridimensional (3D) do mesmo. O campo de força empírico é descrito como a soma de vários termos de energia, incluindo os termos para átomos ligados (comprimentos e ângulos de ligação, ângulos diedros) e os termos para átomos não ligados (interações de van der Waals e de Coulomb). Os campos de forças existentes foram desenvolvidos de maneira independente e com todos os conjuntos de parâmetros específicos. Alguns incluem outros termos para descrever especificamente as ligações de hidrogênio ou para acoplar oscilações entre ângulos e comprimentos de ligação, com o objetivo de se obter uma melhor concordância com espectros vibracionais.¹¹¹ A confiabilidade dos resultados é baseada na elaboração de um campo de força com parâmetros bem definidos. A escolha do campo de força depende, em grande parte, do sistema a ser estudado e das propriedades que serão investigadas. No caso de sistemas biomoleculares, os campos de força mais utilizados são CHARMM,^{112,113} GROMOS,^{111,114} AMBER,^{115,116}, OPLS,^{117,118} entre outros.

Um dos métodos mais utilizados em dinâmica molecular para integrar as equações de movimento é o algoritmo de Verlet,¹¹⁹ que utiliza as posições e acelerações dos átomos no tempo e as posições do passo anterior, para determinar as novas posições no tempo, sendo possível utilizar também outros algoritmos, como por exemplo, o de Beeman¹²⁰ e o método *leap-frog*¹²¹. A realização de uma simulação de dinâmica molecular consiste basicamente da inicialização, cálculo das forças, integração das equações do movimento e amostragem.

A inicialização do sistema consiste das coordenadas do sistema a ser estudado dentro de uma caixa, podendo ser esta cúbica ou não, onde são aplicadas as condições periódicas de contorno, bem como a convenção de imagem mínima ou raio de corte esférico. Após são adicionadas moléculas de água, íons e contra-íons de acordo com o

sistema que se deseja estudar, cuidando com as minimizações de energia necessárias para não haver sobreposições de átomos. Os algoritmos de minimização mais conhecidos são: o método *steepest descent*, o método dos gradientes conjugados¹²² e o método de Newton-Raphson. O método *steepest descent* usa a derivada primeira para determinar a direção para o mínimo. Esta técnica é robusta e é usada para minimizar inicialmente uma estrutura que está longe de um ponto de mínimo. Além disto, as velocidades iniciais das partículas devem ser especificadas, bem como a definição do ensemble a ser utilizado. Por último, há integração do movimento, que calcula as novas posições e velocidades, atualizando a trajetória e gravando passos pré-determinados desta, para o cálculo posterior (amostragem), das propriedades de interesse, as quais devem ser expressas em função das posições e velocidades atômicas.

Outro fator importante na simulação de dinâmica molecular é o controle da temperatura e pressão, desta forma se faz necessário o acoplamento de um termostato e um barostato ao mesmo. O termostato para manter a temperatura, sendo o sistema acoplado a um banho térmico com temperatura fixa. Durante as simulações as velocidades são re-escaladas periodicamente, para que a temperatura real do sistema relaxe para se igualar a temperatura selecionada.¹²³ No termostato de Nosé-Hoover,^{124,125} o sistema original Lagrangiano é modificado pela introdução de um grau de liberdade adicional, o qual tem a função de um fator de escalonamento para o momento. O efeito desta modificação na Lagrangiana é a introdução de um parâmetro de atrito na equação do movimento, cuja solução produz uma amostragem da trajetória do ensemble canônico. Para o controle da pressão, a metodologia é semelhante, sendo que neste caso as coordenadas são re-escaladas periodicamente, de modo que a pressão real do sistema iguale-se a pressão selecionada. A fim de alcançar o conjunto de método Lagrangiano estendido, um método similar ao de Nosé pode ser aplicado. Este é chamado de o barostato de Parinello-Rahman¹²⁵, no qual a matriz dos vetores da caixa é atualizada pela própria equação, com o intuito de manter a pressão desejada.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o mecanismo de interação de compostos fluorescentes benzazólicos com o B-DNA, investigando a estabilidade dos complexos e analisando a potencialidade de aplicação de tais compostos como sondas biológicas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter a geometria de diferentes complexos de interação entre os compostos fluorescentes e o B-DNA, a partir do *docking* molecular, utilizando estes mesmos como ponto de partida para simulações de dinâmica molecular;
- Analisar a estabilidade dos complexos obtidos através das simulações de dinâmica molecular;
- Verificar as alterações estruturais, causadas pelos benzazóis e derivados, nos oligonucleotídeos;
- Determinar o modo de interação dos ligantes com o B-DNA, através da simulação para avaliar a potencial aplicação dos mesmos em sistemas biológicos.

4 METODOLOGIA

4.1 CONSTRUÇÃO DOS LIGANTES

Doze ligantes, entre precursores e bases de Tröger fluorescentes via ESIPT (Figura 15), foram construídos utilizando o programa GaussView¹²⁶. Estes ligantes foram divididos em dois grupos. O primeiro grupo contém seis ligantes precursores de bases de Tröger com substituintes de diferentes efeitos eletrônicos ligado ao anel benzazólico, com e sem substituinte amina ligada à posição 4' do anel fenólico. O segundo grupo contém seis ligantes entre precursores e bases de Tröger, variando o substituinte entre nitrogênio, oxigênio e enxofre no anel benzazólico.

As geometrias foram otimizadas com o cálculo de Funcional de Densidade B3LYP usando o conjunto de bases 6-31G(d), com o programa Gaussian98¹²⁷.

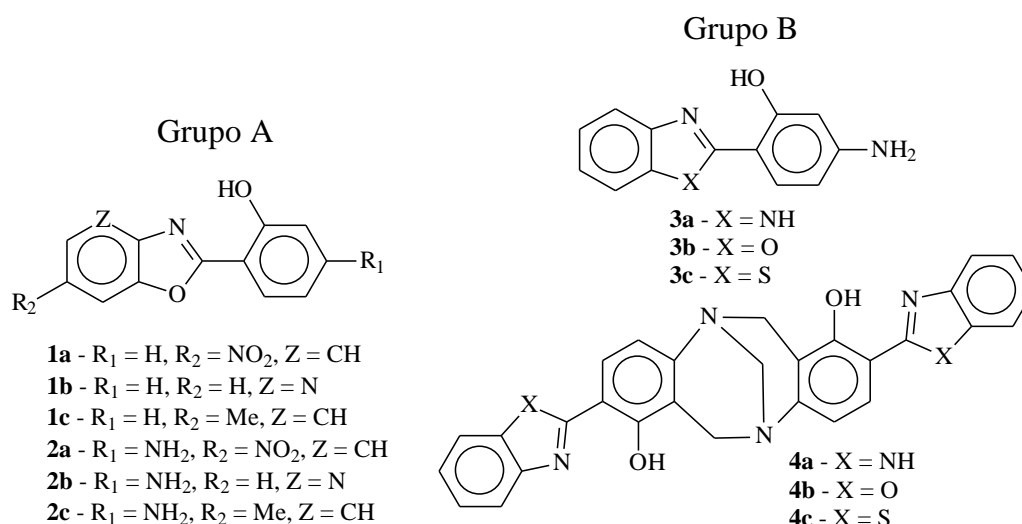


Figura 15: Ligantes fluorescentes estudados.

Os estudos da estabilidade conformacional dos ligantes foram realizados nas mesmas condições com que foram otimizadas as geometrias de equilíbrio, realizando um giro de 180° da ligação do anel fenólico com o anel benzazólico, com incrementos de 10 em 10°.

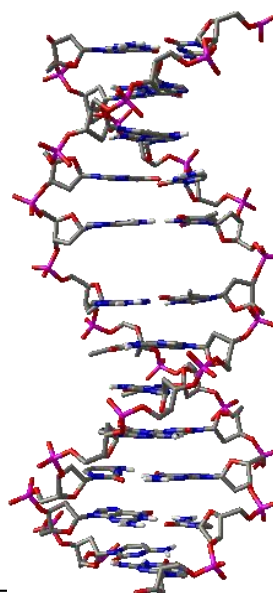
4.2 OLIGONUCLEOTÍDEO

O receptor utilizado foi o oligômero canônico de B-DNA, gerado no programa X3DNA²⁶, com a mesma sequência do oligômero Dickerson-Drew, d(CGCGAATTCGCG)₂. Foi escolhido este dodecâmero, pois o mesmo tem sido utilizado como referência para muitos trabalhos experimentais^{128,129,130} e teóricos.^{18,104,131} Este oligômero foi modificado no mesmo programa, de forma a se

obter um *gap* artificial no conjunto de pares de bases AATT (5° e 6° pares de base a partir da extremidade da fita A), conforme apresentado na Tabela 2.¹⁰⁴

Tabela 2: Identificação dos PB, *gap* e CPB do DNA, vistos a partir do sulco menor.

PB	3'	5'	CPB
1	G	C	}CGCG1
2	C	G	
3	G	C	}CGCG2
4	C	G	
5	T	A	}GATC
	Gap	6,5Å	
6	T	A	}AATT
7	A	T	
8	A	T	}ATAT
9	G	C	
9	G	C	}TTAA
10	C	G	
11	G	C	}TCGA
12	C	G	



4.3 DOCAGEM MOLECULAR

As docagens foram realizadas no programa *AutoDock 4.0*⁹⁷ (função de escore empírica baseada na variação de energia livre de ligação), utilizando o algoritmo estocástico *LGA* (algoritmo genético Lamarckiano), que combina o algoritmo genético (algoritmo de busca global) e o algoritmo de Solis e Wets (algoritmo de busca local). Utilizando o programa *AutoDockTools* (ADT)¹³² foi construída uma malha de afinidade com 96×96×110 pontos e uma resolução de 0,375 Å. O DNA foi centralizado na malha de afinidade e os mapas de afinidade entre os átomos do ligante e da macromolécula (DNA) foram gerados utilizando o módulo *AutoGrid 4.0*. Os parâmetros utilizados para o *docking* foram 100 corridas, 5×10⁷ avaliações de energia, número máximo de 27000 gerações, operador de mutação 0,02, operador de *crossing-over* 0,80, passo translacional de 0,2 Å, passo de orientação 5°, passo torsional 5° e para o restante dos parâmetros foram utilizados os valores *default* do programa.¹³²

4.4 DINÂMICA MOLECULAR

Para a simulação de dinâmica molecular foram selecionadas como estruturas de partida, algumas conformações distintas de menor energia de cada um dos sistemas de *docking*. As interações foram descritas utilizando os potenciais do campo de força

AMBER03¹³³, a topologia do ligante foi determinada utilizando o script ACPYPI¹³⁴. Os sistemas foram colocados em caixas cúbicas com uma distância mínima entre a molécula do soluto e as paredes da caixa de 18 Å. Então, foram adicionados contra-íons de sódio ao sistema contendo o DNA e todos os sistemas foram solvatados com moléculas de água TIP3P, ambos submetidos a minimizações utilizando o método *steepest descent*. Para simulação de condições fisiológicas foram acrescentados íons de sódio e cloreto (0,154 mol/L). Os sistemas foram aquecidos linearmente por 5ns de 50K a 300K, seguido de mais 20ns de simulação a 310K em simulação NPT, com barostato de Parrinello-Rahman ($\tau_p = 2\text{ps}$) a 1 atmosfera de pressão, termostato de Nose-Hoover. Para análise dos dados foram utilizados módulos do pacote *GROMACS*, *X3DNA* e *scripts*.¹³⁵

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DOCAGEM MOLECULAR

Na Figura 16 e Figura 17 são apresentados os resultados das docagens moleculares para o grupo A e B, respectivamente, sendo que em cada sistema as 100 corridas são organizadas em *clusters* conforme similaridades de interação, com uma resolução de 2,0 Å. Nas Tabelas 3 e 4 são apresentados os resultados das interações via *docking* molecular contendo a identificação do ligante, a energia média de cada *cluster*, o tipo de interação de cada *cluster* com o percentual de interações, a energia média geral e por tipo de interação (sulco e intercalação).

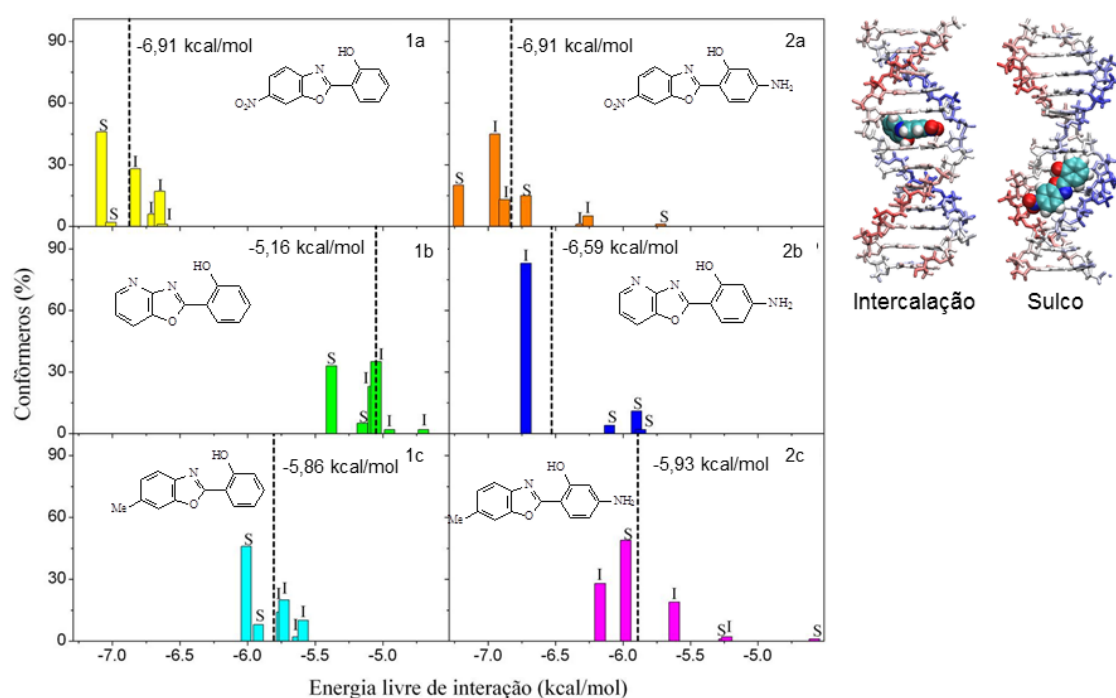


Figura 16: Energia livre de interação (ADT) dos ligantes *1ac* e *2ac* com o B-DNA (X3DNA) e a energia média de interação (- - -).

Tabela 3: Resultados das docagens moleculares do Grupo de Ligantes A com o DNA.

Ligante	ΔG (kcal/mol)	Forma de interação	
		(%)	$\Delta G_{\text{médio}}$ (kcal/mol)
1a	-7,08	sulco menor (46)	-6,91
	-7,01	sulco menor (2)	sulco (-7,08)
	-6,83	intercalação (28)	intercalação (-6,75)
	-6,70	intercalação (6)	
	-6,65	intercalação (17)	
	-6,63	intercalação (1)	
2a	-7,22	sulco menor (20)	-6,91
	-6,95	intercalação (45)	sulco (-6,97)
	-6,88	intercalação (13)	intercalação (-6,87)
	-6,72	sulco menor (15)	
	-6,31	intercalação (1)	
	-6,26	intercalação (5)	
	-5,72	sulco maior (1)	
1b	-5,38	sulco menor (33)	-5,16
	-5,15	sulco menor (5)	sulco (-5,35)
	-5,07	intercalação (23)	intercalação (-5,04)
	-5,05	intercalação (35)	
	-4,95	intercalação (2)	
	-4,70	intercalação (2)	
2b	-6,72	intercalação (83)	-6,59
	-6,10	sulco menor (4)	intercalação (-6,72)
	-5,90	sulco menor (11)	sulco (-5,94)
	-5,87	sulco menor (2)	
1c	-6,01	sulco menor (46)	-5,86
	-5,92	sulco menor (8)	sulco (-6,00)
	-5,75	intercalação (14)	intercalação (-5,70)
	-5,73	intercalação (20)	
	-5,63	intercalação (2)	
	-5,59	intercalação (10)	
2c	-6,17	intercalação (28)	-5,93
	-5,98	sulco menor (49)	sulco (-5,94)
	-5,62	intercalação (19)	intercalação (-5,92)
	-5,25	sulco menor (1)	
	-5,23	intercalação (2)	
	-4,58	sulco maior (1)	

Com relação ao grupo A, os ligantes com grupamento nitro como substituintes no anel benzazólico (**1a** e **2a**), apresentaram as interações mais favoráveis por docagem molecular com o DNA, quando comparados com seus análogos (ligantes **1bc** e **2bc**), com energia média de -6,91 kcal/mol para ambos, tendo uma pequena preferência por interações de sulco menor.

Comparando os ligantes **1b** e **2b** (ligantes com anel pirimidínico), o segundo (**2b**), que possui como substituinte grupamento amino, apresentou energia de interação bem mais favorável (-6,59 kcal/mol) quando comprado com o primeiro (**1b**, -5,16 kcal/mol), que não possui este substituinte. Neste caso, o substituinte amino do ligante **2b** proporciona uma energia de interação bem mais favorável, com uma pronunciada preferência por intercalação, enquanto seu precursor (**1b**), sem este substituinte possui uma pequena preferência por interações de sulco menor. O ligante **2b** possui energia de interação mais forte quando comparado com seu precursor, ligante **1b**, provavelmente devido à possibilidade de fazer ligações de hidrogênio adicionais.

Os ligantes **1c** e **2c** apresentaram as energias de interações menos favoráveis, (-5,86 e -5,93 kcal/mol, respectivamente), exceto quando comparado com o ligante **2a** (-5,16 kcal/mol). Isto se deve provavelmente pela menor capacidade de fazer ligações de hidrogênio, quando comparado com seus análogos. Quando comparado as energias de interação dos ligantes **1c** e **2c**, o segundo, com grupamento amino apresentou uma energia de interação mais favorável que o primeiro, com uma pequena preferência por interação de sulco menor para ambos.

Para todos ligantes exceto o 2-(4'-amino-2'-hidroxifenil)oxazolo[4,5-b]piridina (**2b**), apresentaram uma ligeira preferência para interação tipo sulco (Tabela 3), tendo interações mais favoráveis para os ligantes com maior capacidade de fazer ligações de hidrogênio (ligantes com substituinte amino no anel fenólico).

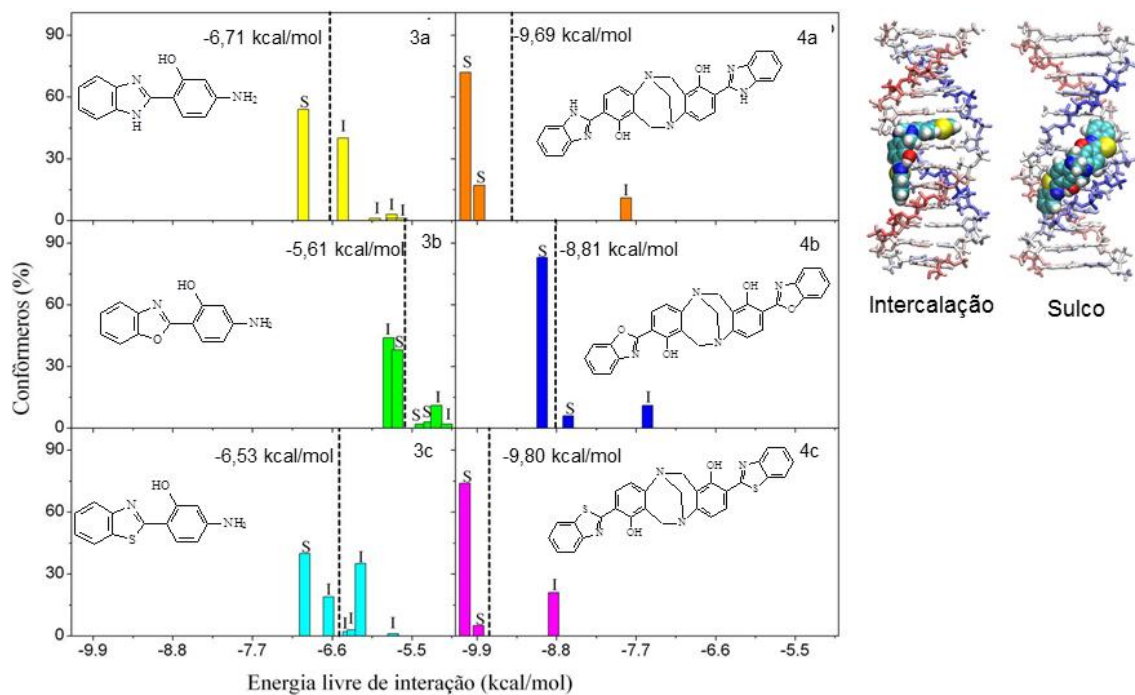


Figura 17: Energia livre de interação (ADT) dos ligantes 3ac e 4ac com o B-DNA (X3DNA) e a energia média de interação (- - -).

Tabela 4: Resultados das docagens moleculares do Grupo de Ligantes B com o DNA.

Ligante	Forma de interação		
	ΔG (kcal/mol)	(%)	$\Delta G_{\text{m\u00e9dio}}$ (kcal/mol)
3a	-7,00	sulco menor (54)	-6,71
	-6,45	intercalação (40)	sulco menor (-7,00)
	-6,01	intercalação (1)	intercalação (-6,36)
	-5,78	intercalação (3)	
	-5,77	intercalação (1)	
	-5,64	intercalação (1)	
4a	-10,06	sulco menor (72)	-9,69
	-9,87	sulco menor (17)	sulco menor (-10,02)
	-7,84	misto (11)	misto (-7,84)
3b	-5,82	intercalação (44)	-5,66
	-5,70	sulco menor (38)	intercalação (-5,66)
	-5,38	sulco menor (2)	sulco menor (-5,65)
	-5,26	sulco menor (3)	
	-5,16	intercalação (11)	
	-5,02	intercalação (2)	
4b	-9,00	sulco menor (83)	-8,81
	-8,64	sulco menor (6)	sulco menor (-8,98)
	-7,54	misto (11)	misto (-7,54)
3c	-6,98	sulco menor (40)	-6,53
	-6,65	intercalação (19)	sulco menor (-6,98)
	-6,38	intercalação (2)	intercalação (-6,35)
	-6,32	intercalação (3)	
	-6,21	intercalação (35)	
	-5,76	intercalação (1)	
4c	-10,07	sulco menor (74)	-9,80
	-9,88	sulco menor (5)	sulco menor (-10,06)
	-8,84	misto (21)	misto (-8,84)

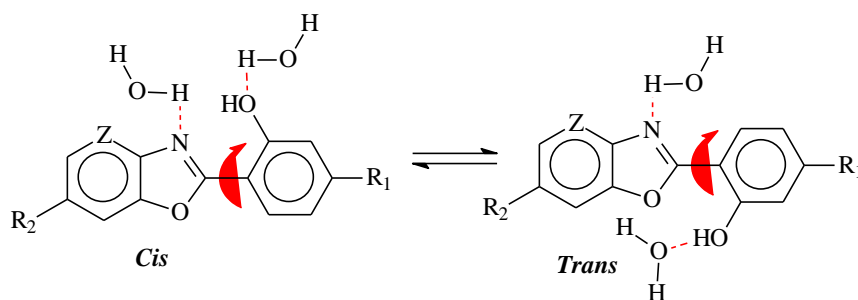
Na análise do *docking* molecular para grupo B, as bases de Tröger (**4ac**) apresentaram interações significativamente mais favoráveis, quando comparados com seus respectivos precursores (**3ac**), sendo cerca de 3,07 a 3,22 kcal/mol mais estáveis. A ordem de estabilidade para os precursores ficaram em **3a** > **3c** > **3b** e para as bases de Tröger **4c** > **4a** > **4b**. Os precursores **3a** e **3c** e as bases de Tröger **4a** e **4c** apresentaram energias muito próximas no resultado de interação com o DNA por *docking*. Já no caso dos ligantes **3b** e **4b** tiveram uma energia de estabilização em torno de 1kcal/mol (0.88 a 1.01kcal/mol) menos favorável que seus respectivos análogos. Isto significa que compostos que contenham anel oxazólico tem uma menor estabilidade de interação com oligonucleotídeos que seus demais análogos. Os precursores das bases de Tröger, **3ac** apresentaram interações do tipo intercalação e sulco menor. O ligante **3a** teve uma preferência por interações tipo sulco menor, o **3b** apresentou energias muito próximas de ambas as interações e o **3c** apresentou uma preferência por intercalação.

Já as bases de Tröger, **4ac** apresentaram interações do tipo mista (intercalação mais sulco maior) e sulco menor, tendo uma preferência pela segunda em todos os casos.

5.2 ESTUDO DA ESTABILIDADE CONFORMACIONAL DOS LIGANTES DE DNA

A ESIPT (transferência protônica intramolecular no estado excitado) está intimamente relacionada com o efeito da solvatação. Solventes polares próticos, como a água tendem a solvatar os ligantes através de ligações de hidrogênio. Quanto maior a influência do solvente, menor a energia da barreira de interconversão de um rotâmero ao outro, devido ao enfraquecimento da ligação de hidrogênio intramolecular do hidroxibenzazol conforme apresentado no Esquema 7. A estabilidade da ligação de hidrogênio foi analisada através da interconversão do rotâmero *cis* (hidroxila fenólica em posição *cis* ao nitrogênio azólico) para *trans* (hidroxila fenólica em posição *trans* ao nitrogênio azólico), através de um giro de 180° entre o anel azólico e o anel fenólico com incrementos de 10 em 10°.

5.2.1 Estudo da Estabilidade Conformacional dos Ligantes do Grupo A



Esquema 7: Interconversão do confômero cis no confômero trans em hidroxibenzazóis em solvente aquoso.

As Figura 18 a Figura 20 apresentam os valores de barreiras de interconversão do rotâmero cis em trans e o efeito do solvente no valor da mesma.

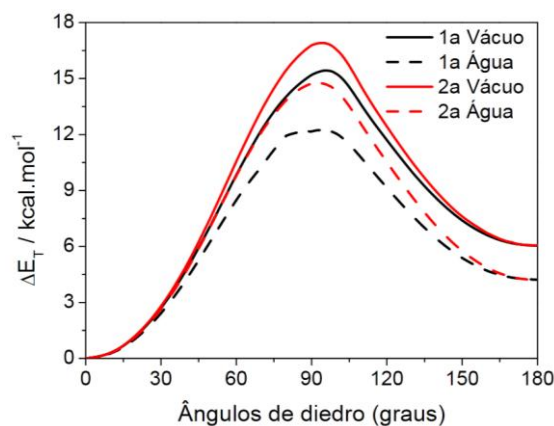


Figura 18: Energia relativa (kcal.mol^{-1}) X Ângulos de diedro (graus): valores obtidos para os ligantes **1a** e **2a** no vácuo e em meio aquoso, através de cálculo de funcional de densidade B3LYP no conjunto de bases 6-31G(d) (Spartan '08, versão 1.2.0).

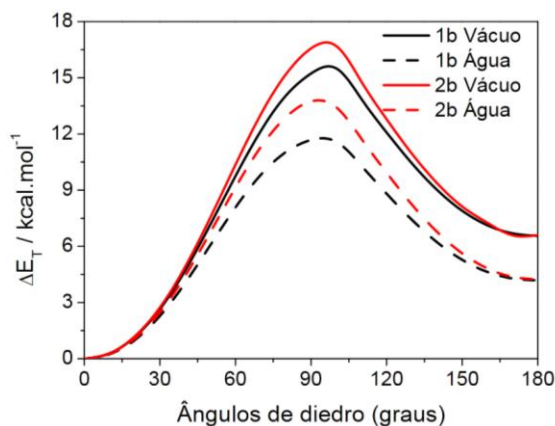


Figura 19: Energia relativa (kcal.mol^{-1}) X Ângulos de diedro (graus): valores obtidos para os ligantes **1b** e **2b** no vácuo e em meio aquoso, através de cálculo de funcional de densidade B3LYP no conjunto de bases 6-31G(d) (Spartan '08, versão 1.2.0).

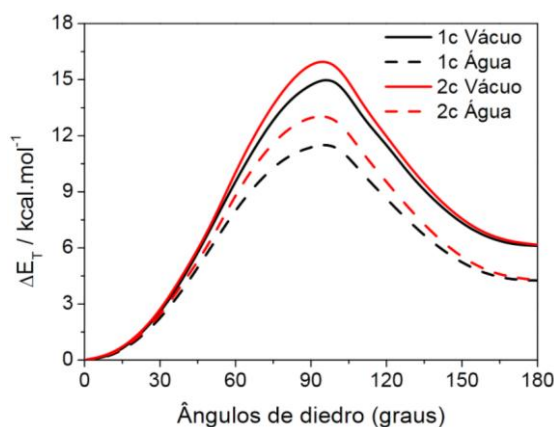


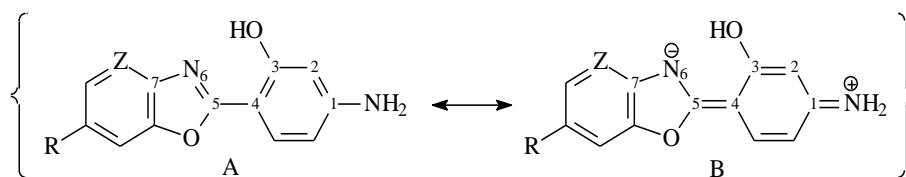
Figura 20: Energia relativa (kcal.mol^{-1}) X Ângulos de diedro (graus): valores obtidos para os ligantes **1c** e **2c** no vácuo e em meio aquoso, através de cálculo de funcional de densidade B3LYP no conjunto de bases 6-31G(d) (Spartan '08, versão 1.2.0).

Analisando o efeito do solvente sobre a barreira de interconversão do rotâmero *cis* para *trans* (Tabela 5), observa-se que há uma diminuição de 3,1 a 3,8 kcal.mol^{-1} , para os ligantes **1ac** e 2,1 a 3,0 kcal.mol^{-1} para os ligantes **2ac**.

Tabela 5: Valores de barreira de interconversão do rotâmero *cis* para *trans* em kcal.mol^{-1} .

Ligante	Vácuo	Água	ΔE_T (kcal.mol^{-1})
1a	15,25	12,16	3,09
2a	16,78	14,73	2,05
1b	15,50	11,68	3,82
2b	16,70	13,74	2,96
1c	14,80	11,38	3,42
2c	15,79	12,95	2,84

Este efeito é mais pronunciado para os ligantes **1ac** por não possuírem grupamento amino na posição 4 do anel fenólico, pois o mesmo é responsável pelo aumento da basicidade do nitrogênio azólico conforme apresentado no Esquema 8, aumentado a força da ligação de hidrogênio intramolecular.



Esquema 8: Representação esquemática das principais estruturas canônicas dos ligantes **2ac**.

Este efeito pode ser nitidamente observado através dos comprimentos das ligações, conforme tabela a seguir.

Tabela 6: Comprimentos de ligações para os ligantes **1ac** e **2ac**.

Ligantes	Comprimento das ligações (Å)					
	C1-C2	C2-C3	C3-C4	C4-C5	C5-N6	N6-C7
1a	1,389	1,400	1,420	1,441	1,315	1,386
2a	1,408	1,387	1,427	1,424	1,324	1,381
1b	1,389	1,399	1,419	1,444	1,314	1,392
2b	1,407	1,388	1,424	1,430	1,320	1,389
1c	1,390	1,399	1,418	1,466	1,310	1,397
2c	1,406	1,389	1,422	1,435	1,315	1,396

Como pode ser observada na Tabela 6, a inserção do grupamento amino aumenta a participação da estrutura canônica B. Com a inserção do grupamento amino pode-se observar o aumento das ligações C1-C2 (0,016-0,018), C3-C4 (0,004-0,007) e C5-N6 (0,005-0,009) e a diminuição das ligações C2-C3 (0,010-0,013), C4-C5 (0,014-0,031) e N6-C7 (0,001-0,005). Evidencia-se desta forma uma maior efetividade da participação da forma canônica B nas estruturas de ressonância (Esquema 8), devido ao deslocamento eletrônico da nuvem do grupamento amino na posição 4'. Desta forma, aumentado a basicidade do grupamento amino do anel azólico, resulta em uma ligação de hidrogênio mais forte, favorecendo assim a ESIPT.

5.2.2 Estudo da Estabilidade Conformacional dos Ligantes do Grupo B

As Figura 21 a Figura 23 apresentam os valores de barreiras de interconversão do rotâmero *cis* em *trans* e o efeito do solvente no valor desta barreira.

Analisando o efeito do solvente sobre a barreira de interconversão do rotâmero *cis* para *trans* (Esquema 7), observa-se que há uma diminuição de 1,9 a 2,8 kcal.mol⁻¹, para os ligantes **3ac** e 2,6 a 3,5 kcal.mol⁻¹ para os ligantes **4ac**, conforme apresentado na Tabela 7. A diminuição do valor de barreira pelo efeito do solvente aquoso é mais pronunciada para os ligantes **3ab** e **4ab**, pois os mesmos possuem nitrogênio ou oxigênio no anel azólico, fazendo desta forma ligações de hidrogênio com o solvente e diminuindo a força da interação intramolecular.

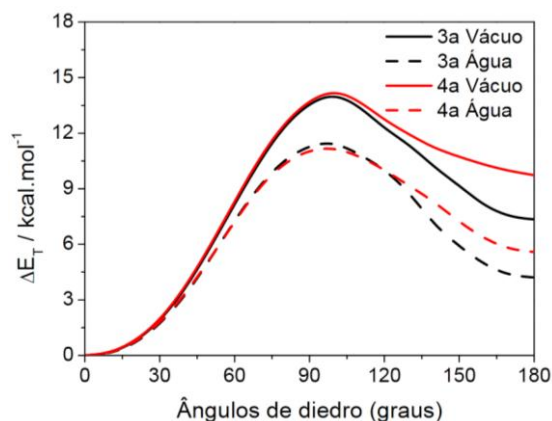


Figura 21: Energia relativa (kcal.mol⁻¹) X Ângulos de diedro (graus): valores obtidos para os ligantes **3a** e **4a** no vácuo e em meio aquoso, através de cálculo de funcional de densidade B3LYP no conjunto de bases 6-31G(d) (Spartan '08, versão 1.2.0).

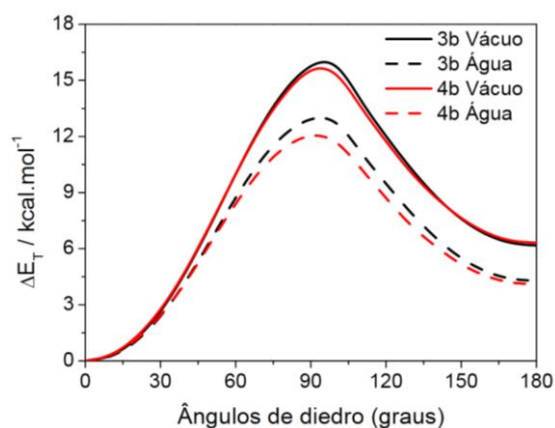


Figura 22: Energia relativa (kcal.mol⁻¹) X Ângulos de diedro (graus): valores obtidos para os ligantes **3b** e **4b** no vácuo e em meio aquoso, através de cálculo de funcional de densidade B3LYP no conjunto de bases 6-31G(d) (Spartan '08, versão 1.2.0).

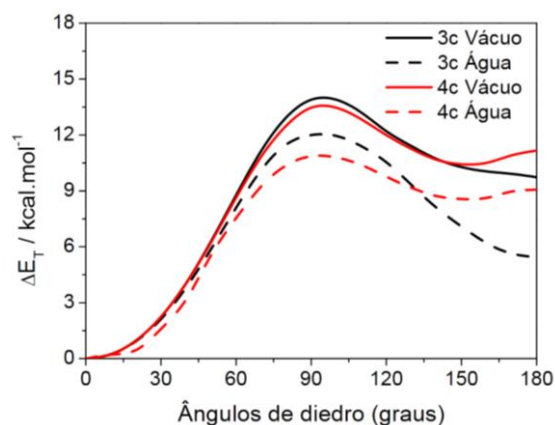
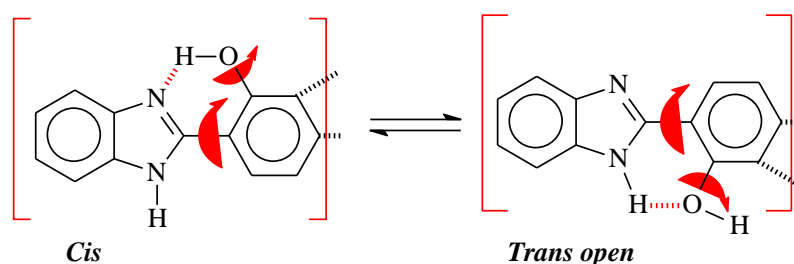


Figura 23: Energia relativa (kcal.mol⁻¹) X Ângulos de diedro (graus): valores obtidos para os ligantes **3c** e **4c** no vácuo e em meio aquoso, através de cálculo de funcional de densidade B3LYP no conjunto de bases 6-31G(d) (Spartan '08, versão 1.2.0).

Tabela 7: Valores de barreira de interconversão do rotâmetro *cis* para *trans* em kcal.mol⁻¹.

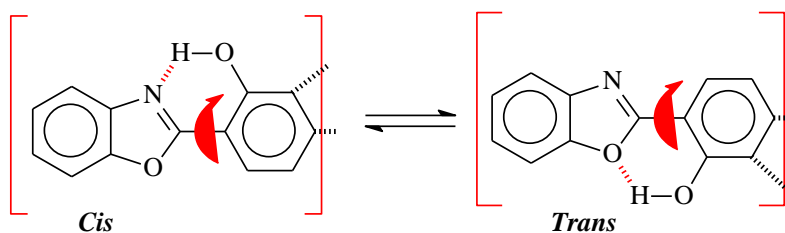
Ligante	Vácuo	Água	ΔE_T (kcal.mol ⁻¹)
3a	13,97	11,40	2,56
4a	14,16	11,14	3,02
3b	15,76	12,91	2,84
4b	15,52	12,02	3,50
3c	13,89	12,00	1,90
4c	13,47	10,86	2,60

Os ligantes **3a** e **4a** no processo de interconversão do rotâmetro *cis* em *trans*, acaba tendo que girar mais uma ligação para diminuir a repulsão eletrônica. O hidrogênio da hidroxila, que no rotâmetro *cis*, que faz ligação de hidrogênio, no rotâmetro *trans* acaba tendo que fazer um giro de 180° para diminuir esta repulsão, resultando em uma nova ligação de hidrogênio entre o hidrogênio azólico e o oxigênio da hidroxila (Esquema 9). No vácuo este giro da hidroxila acontece em 170° e em solvente aquoso, este giro acontece em 140°.



Esquema 9: Interconversão do conformero *cis* no conformero *trans* em hidroxibenzimidazóis **3a** e **4a** em solvente aquoso.

Os ligantes **3b** e **4b** são os que possuem o maior valor de barreira e a menor diferença de energia do rotâmetro *cis* e *trans*, comportamento o qual se deve as fortes interações intramoleculares (Esquema 10). A menor diferença de energia entre rotâmetro *cis* e *trans*, se deve ao fato que os dois rotâmetros possuem a possibilidade de fazerem ligações de hidrogênio mais fortes que os demais ligantes.



Esquema 10: Interconversão do conformero cis no conformero trans em hidroxibenzimidazóis **3b** e **4b** em solvente aquoso.

Os ligantes **3c** e **4c** são os que apresentam os menores valores de barreira e a menor influência do solvente aquoso no valor da mesma. Estes ligantes não sofrem tanta influência do solvente aquoso devido ao fato de possuírem enxofre ao invés de nitrogênio ou oxigênio no anel azólico, resultando em uma menor possibilidade de fazer ligações de hidrogênio intermolecular, ao contrário dos demais ligantes. Outra observação interessante é que ao girar 180°, o valor da energia de barreira começa a subir de novo, pois o enxofre não pode fazer ligações de hidrogênio e começa a ter uma repulsão eletrônica entre o mesmo e a hidroxila.

5.3 DINÂMICA MOLECULAR

Com base nas trajetórias obtidas das simulações de Dinâmica Molecular foram analisados os seguintes parâmetros: desvio quadrático médio (RMSD); número de ligações de hidrogênio, distância do ligante em relação aos pares de bases do oligonucleotídeo e as mudanças estruturais no oligonucleotídeo (*Rise*, *Twist* e *Roll*).

As coordenadas de entrada do ligante com o DNA foram obtidas das análises de docagem molecular, sendo utilizada uma conformação de intercalação e uma de interação de sulco. As conformações de partida utilizadas para a DM foram as de menor energia para cada modo de interação. Os ligantes foram identificados como S (sulco) e I (intercalação), baseado nas interações de entrada.

O monitoramento do RMSD permite verificar a estabilidade do oligonucleotídeo durante a simulação, sendo assim possível verificar a existência ou não de desnaturação. Também a partir do desvio quadrático médio é possível determinar o equilíbrio atingido durante a simulação. As análises de RMSD estão identificadas pelo número do ligante, seguido pelo número do tipo de interação, sulco (S) ou intercalação (I).

Depois de verificada a estabilidade do sistema, foram identificados os pares de bases, com os quais o ligante estava interagindo, para analisar posteriormente as

possíveis alterações nos mesmos. Para todos os complexos estudados, os conjuntos de pares de bases AATT foram analisados, pois esta é a localização do *gap* artificial. A localização do ligante no DNA é determinada pela distância do primeiro em relação com os pares de bases do segundo, servindo de dados de entrada para as análises posteriores de mudanças estruturais da macromolécula (*Rise*, *Twist* e *Roll*).

A Figura 24 apresenta um esquema dos pares de bases e das ligações covalentes da posição açúcar-fosfato do DNA, que são simplesmente representados por duas molas.¹³⁶ Em cada par de bases foi considerado um sistema de coordenadas cartesianas xyz. Segundo Dickerson e colaboradores³⁰ é possível quantificar, usando parâmetros geométricos bem definidos, aquelas alterações que são constatadas visualmente, como desenrolamento, movimentos de rotação, abertura ou fechamento de *gap* e desemparelamento de pares de bases, conforme apresentado na figura a seguir.

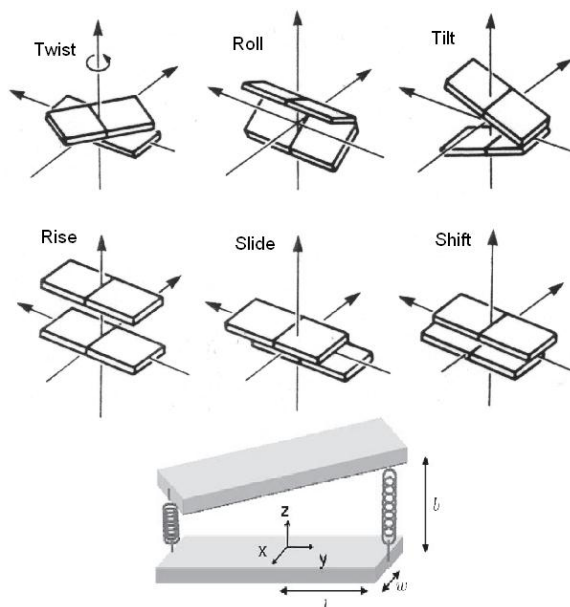


Figura 24: Os seis parâmetros básicos das possíveis alterações dos pares de bases do DNA representados por retângulos sólidos. Adaptado de Ghorbani e colaboradores.¹³⁶

Para este trabalho foram analisados os parâmetros *Rise*, *Roll* e *Twist*, pois são os parâmetros que apresentam as alterações mais significativas para os complexos estudados.

5.3.1 Análise do Oligonucleotídeo sem Ligante

Como padrão de referência dos parâmetros geométricos da forma canônica B-DNA, foi realizada uma simulação de dinâmica molecular apenas com a estrutura do B-DNA sem ligante nas mesmas condições dos demais complexos. Os valores médios e

seus respectivos desvios padrões serão apresentados nos próximos capítulos. Para todos os sistemas estudados, as análises foram realizadas após a rampa de aquecimento, momento em que o sistema está estabilizado, sendo no intervalo de 5 a 25 ns.

5.3.2 Análise do Grupo A

Primeiramente foi analisada a distância do centro de massas do ligante em relação ao centro de massas de cada um dos doze pares de bases do DNA, a contar de cima para baixo (Tabela 2, seção 4.2), ao longo das simulações da dinâmica molecular. As identificações do tipo intercalação (I) e sulco (S) foram considerados a partir dos dados de entrada obtidos na docagem molecular, conforme já citado na seção 5.3.

Na análise da interação do tipo intercalação de cada ligante com o DNA, observa-se que as distâncias não se alteram significativamente ao longo das simulações (Figura 25). O *gap* do DNA está localizado entre os pares de bases cinco e seis (AATT), e todos os ligantes intercalados se mantiveram mais próximo dos mesmos, com uma distância média de 7,5 Å. Isto indica que o complexo (ligante e DNA) se manteve com uma interação estável durante todas as simulações.

Na análise das interações do tipo sulco do ligante com os pares de bases do DNA, observa-se que o ligante 2-(2'-hidroxifenil)oxazolo[4,5-b]piridina (**1bS**) vai migrando do par de base dez (CG) para próximo do par de base oito (AT) ao longo da simulação. Os demais ligantes com exceção do 2-(4'-amino-2'-hidroxifenil)-6-nitrobenzoxazol (**2aS**), vão alternado as interações em regiões específicas do DNA conforme apresentado na Figura 25. O ligante 2-(4'-amino-2'-hidroxifenil)-6-nitrobenzoxazol (**2aS**), após a estabilização do sistema, se manteve com uma interação estável com o par de bases dez (CG), durante toda a simulação, com uma distância média de 5,0 Å do mesmo. Este resultado é um indício de interação forte entre este ligante e o DNA, uma vez que, nos resultados de docagem a interação de sulco do ligante **2a** é bastante negativa (ver Tabela 3).

Outro comportamento importante neste tipo de interação é que a migração do ligante ao longo do sulco se caracteriza pela existência de barreiras energéticas entre um par de bases e outro. Quando o ligante deixa de interagir com um par de bases e passa a interagir com o par vizinho, esta mudança é observada por saltos e não de forma sutil conforme esperado, evidenciando desta forma, a existência de barreiras energéticas.

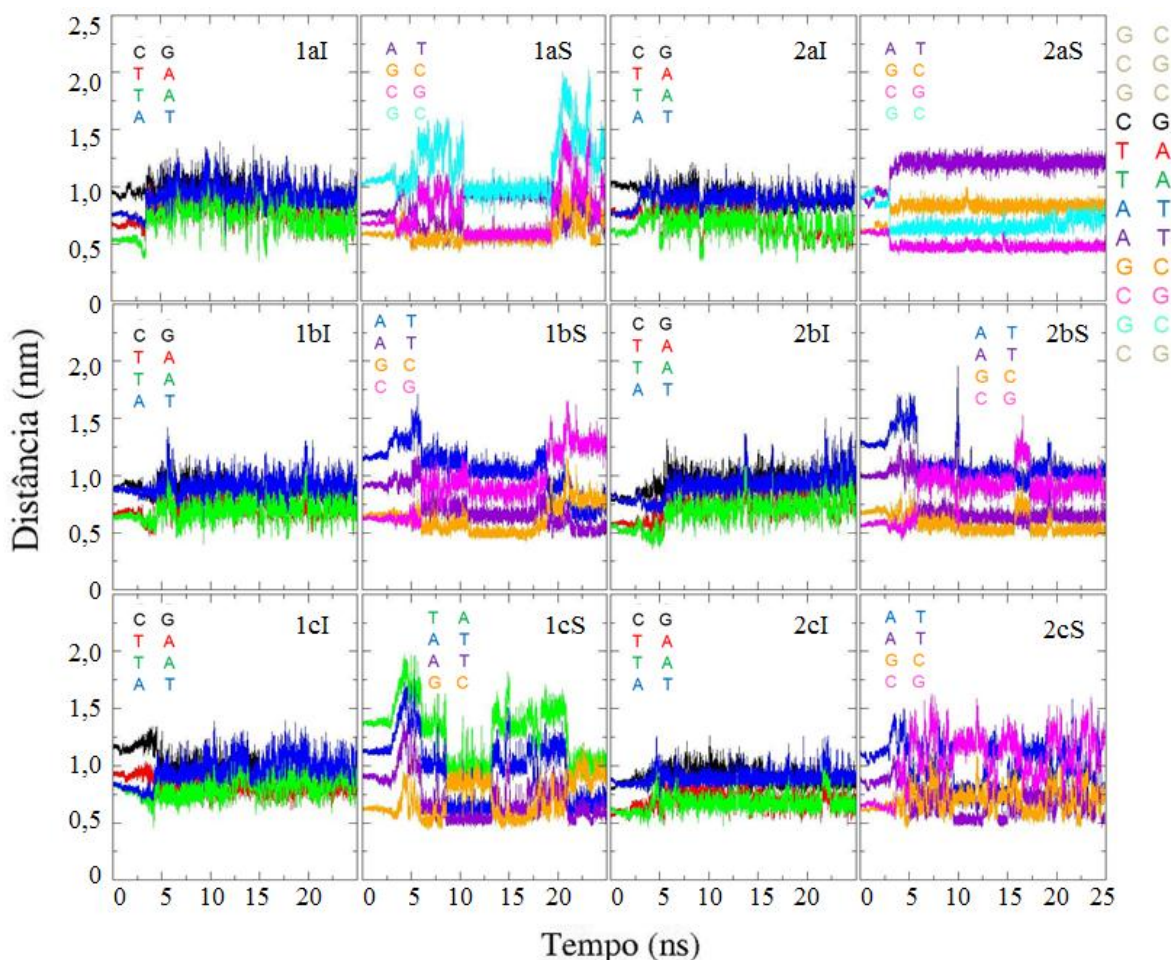


Figura 25: Distância dos ligantes do Grupo A em relação aos pares de bases do DNA ao longo da simulação.

A partir destes resultados foram determinados quais conjuntos de pares de bases do oligonucleotídeo deveriam ser analisados em cada complexo (ligante e DNA).

Na análise das ligações de hidrogênio dos complexos, ao longo das simulações (Figura 26), os ligantes com grupamento 4'-amino (**2ac**) apresentaram em média uma ligação a mais que seus análogos (**1ac**), conforme esperado, exceto o complexo **2cS** que apresentou o mesmo número de ligações que o **1cS**. Os complexos exibiram uma (**1aS**, **1bS**, **1bI**, **1cS**, **1cI** e **2cS**), duas (**2bS**, **2bI** e **2cI**), três (**1aI** e **2aS**) e até quatro (**2aI**) ligações de hidrogênio em alguns momentos.

O complexo **2aS** manteve no mínimo uma ligação de hidrogênio a mais que os outros complexos em interações de sulco, sendo possivelmente o principal fator da interação estável do ligante com o par de bases dez (CG) do oligonucleotídeo, conforme já discutido e apresentado na Figura 25.

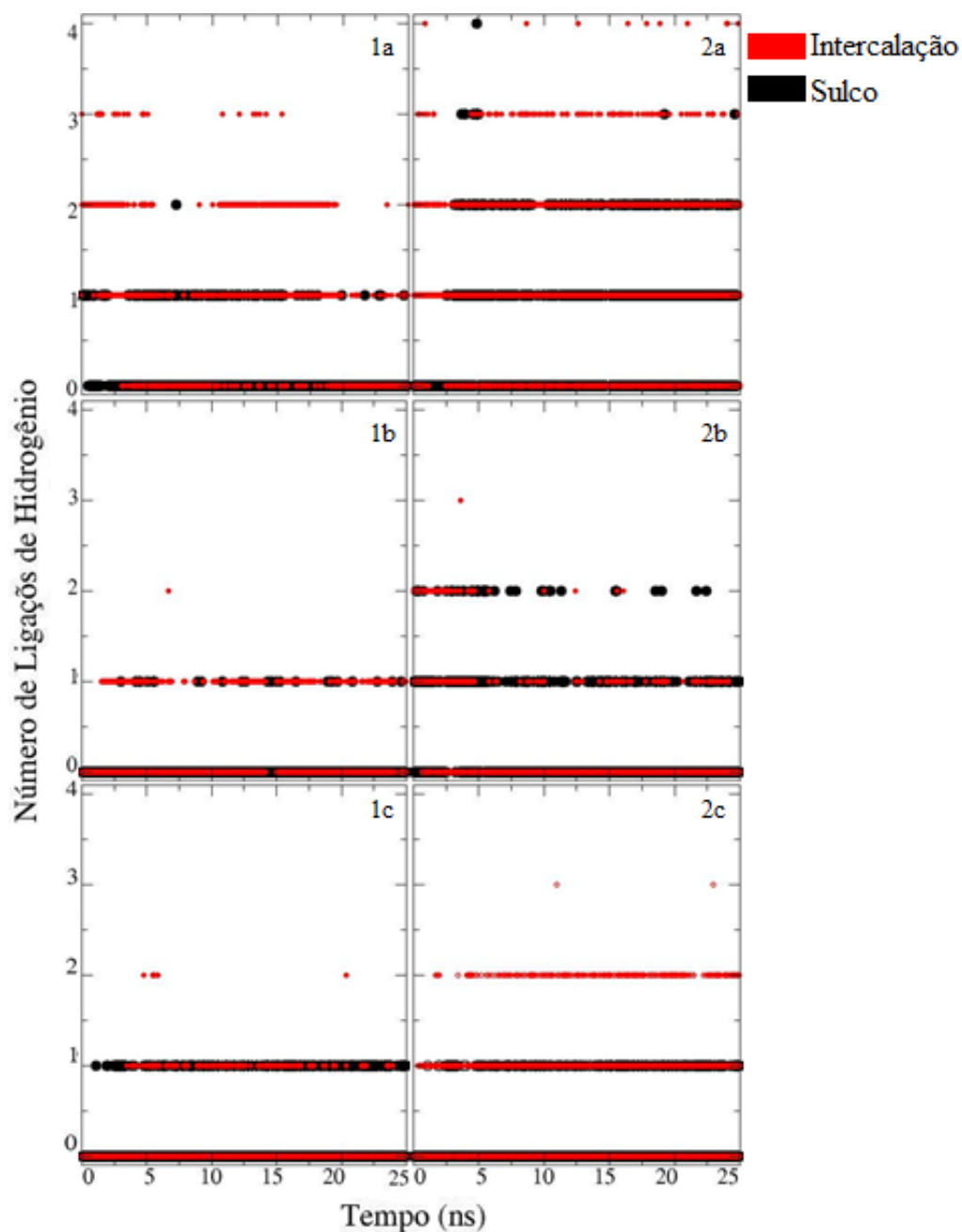


Figura 26: Número de Ligações de Hidrogênio dos ligantes do Grupo A com o DNA ao longo da simulação.

Na Figura 27 estão apresentados os resultados de análises de RMSD dos complexos (ligante e DNA) em interações do tipo intercalação (I) e sulco (S) versus o oligonucleotídeo sem o ligante e na Tabela 8 os valores médios e seus respectivos desvios padrões após a rampa de aquecimento. Verifica-se que os complexos do tipo intercalação apresentam em torno dos 10 ns finais de simulação, flutuações um pouco acima das mesmas do oligonucleotídeo sem ligante, com exceção dos complexos com

os ligantes 2-(4'-amino-2'-hidroxifenil)-6-metilbenzoxazol (**1cI**) e 2-(4'-amino-2'-hidroxifenil)oxazolo[4,5-b]piridina (**2bI**).

Os complexos **1cI** e **2bI** e todos os demais em interações do tipo sulco apresentaram resultados de RMSD muito próximos ao do oligonucleotídeo conforme apresentado na Figura 27. Resultados similares foram descritos recentemente por Netz¹³⁷, em estudos por docagem e dinâmica molecular da interação de benzotidiazóis com o B-DNA de Dickerson-Drew.¹³⁸ O autor descreve que os benzotidiazóis em interações do tipo intercalação induzem o B-DNA a alterações estruturais mais pronunciadas do que quando interagem em sulco, sem causar desnaturação do mesmo.

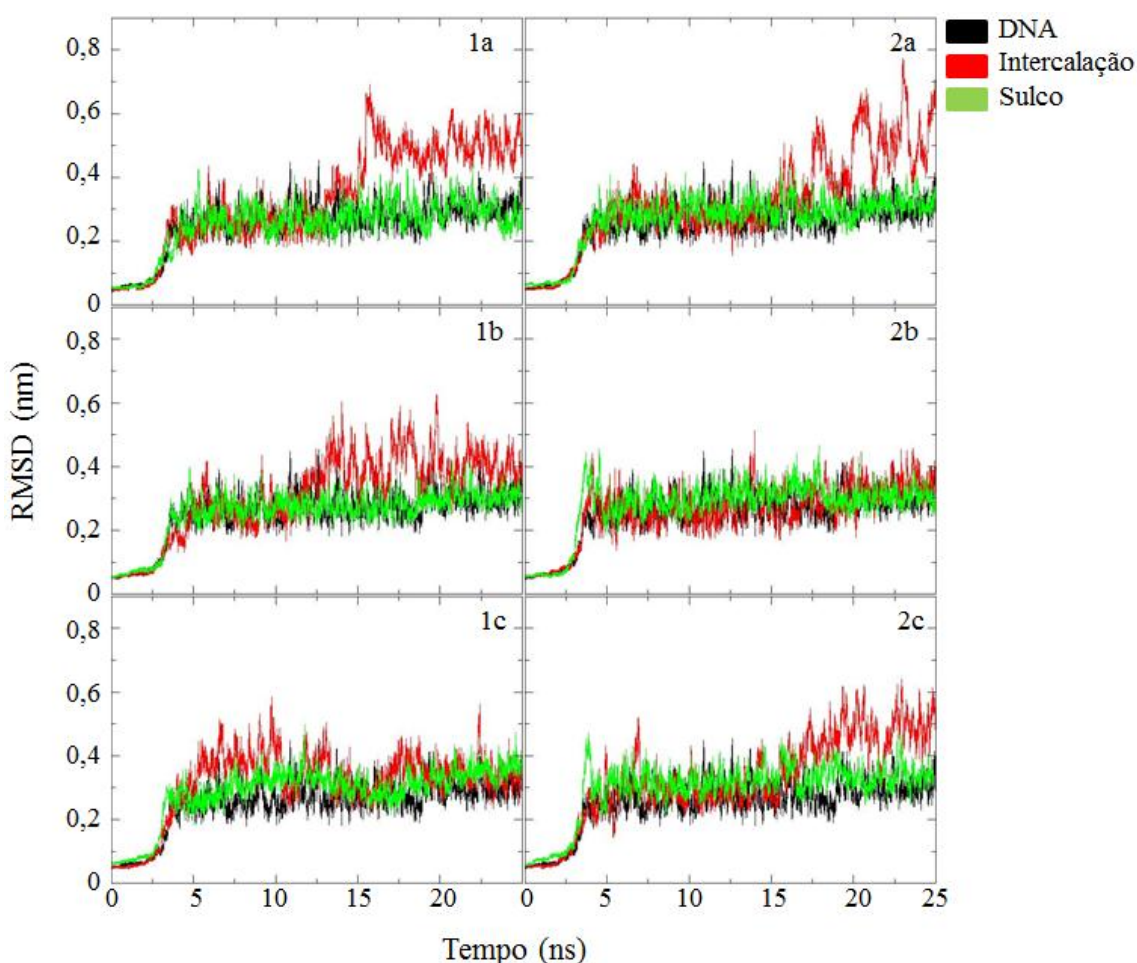


Figura 27: RMSD do oligonucleotídeo sem ligante e dos complexos (ligante e DNA) do Grupo A após a rampa de aquecimento.

Na Tabela 8 estão apresentadas todas as médias de RMSD após a estabilização do sistema com seus respectivos desvios padrões.

Tabela 8: Resultados médios de RMSD do oligonucleotídeo sem ligante e dos complexos (ligante e DNA) do Grupo A após a rampa de aquecimento

Sistema	RMSD
B-DNA	$0,20 \pm 0,04$
1aI	$0,39 \pm 0,12$
1aS	$0,28 \pm 0,04$
2aI	$0,37 \pm 0,12$
2aS	$0,30 \pm 0,03$
1bI	$0,36 \pm 0,08$
1bS	$0,28 \pm 0,03$
2bI	$0,29 \pm 0,05$
2bS	$0,30 \pm 0,04$
1cI	$0,35 \pm 0,05$
1cS	$0,32 \pm 0,04$
2cI	$0,37 \pm 0,10$
2cS	$0,33 \pm 0,04$

Na Figura 28 a Figura 39 estão apresentados as imagens da evolução temporal de todas as simulações do grupo A, com intervalos de 5 em 5ns.

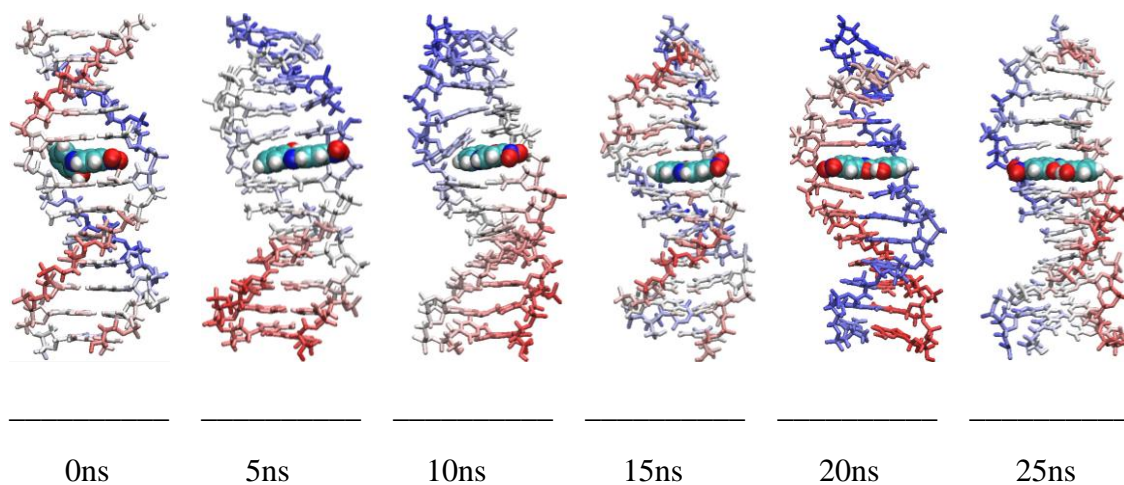


Figura 28: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo **1aI** de 0 a 25ns.

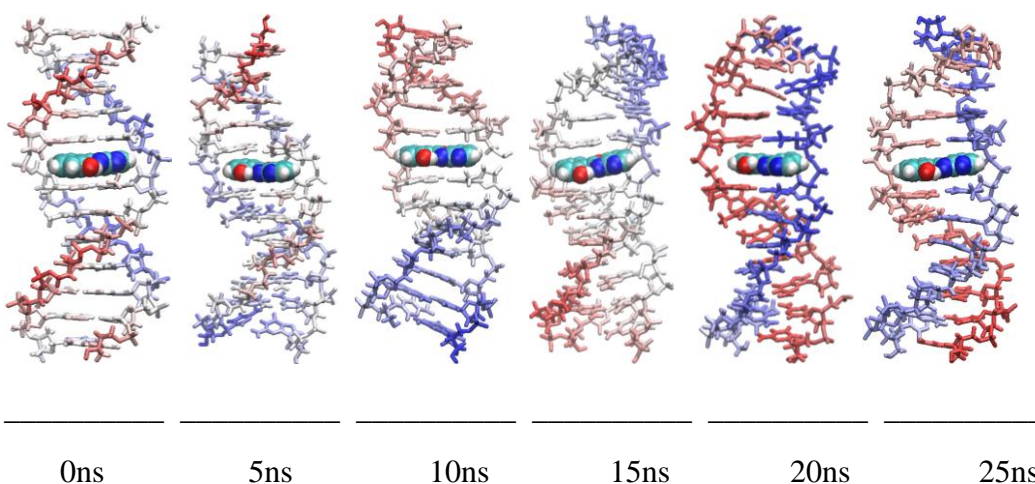


Figura 29: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo **1bI** de 0 a 25ns.

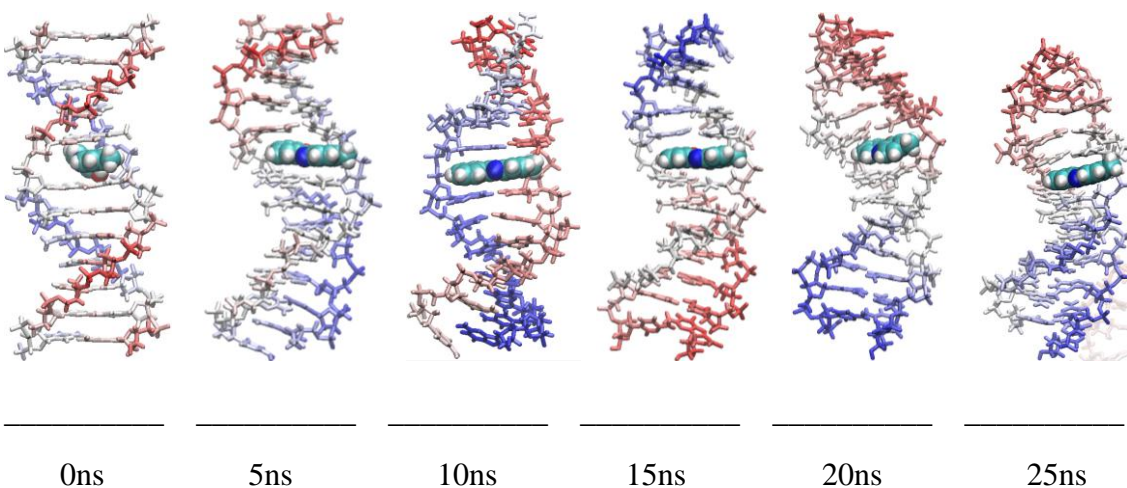


Figura 30: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo **1cI** de 0 a 25ns.

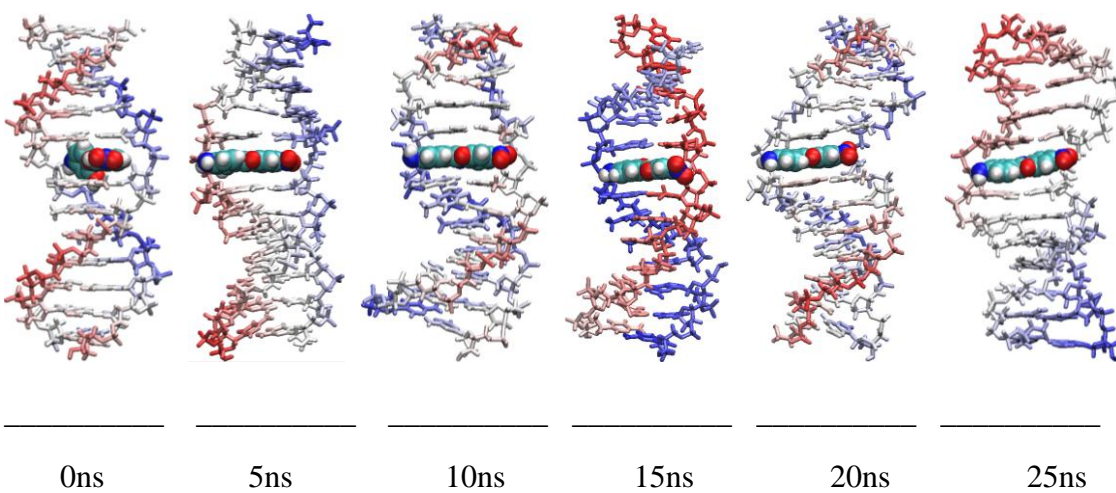


Figura 31: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo **2aI** de 0 a 25ns.

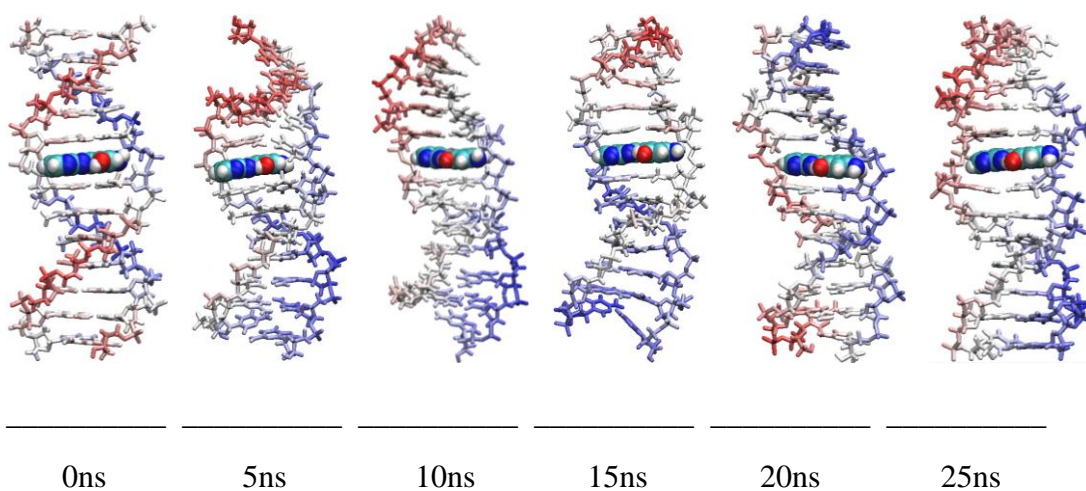


Figura 32: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo **2bI** de 0 a 25ns.

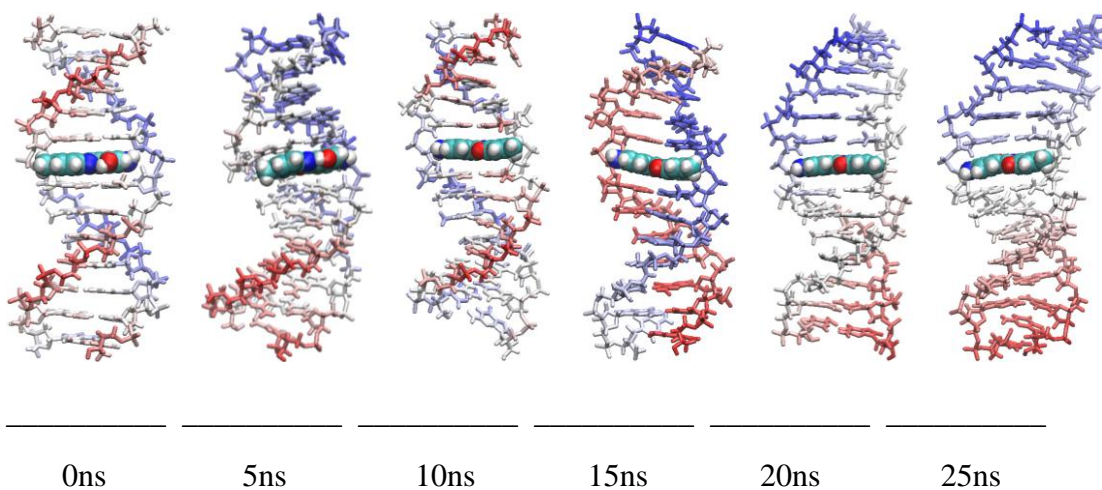


Figura 33: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo **2cI** de 0 a 25ns.

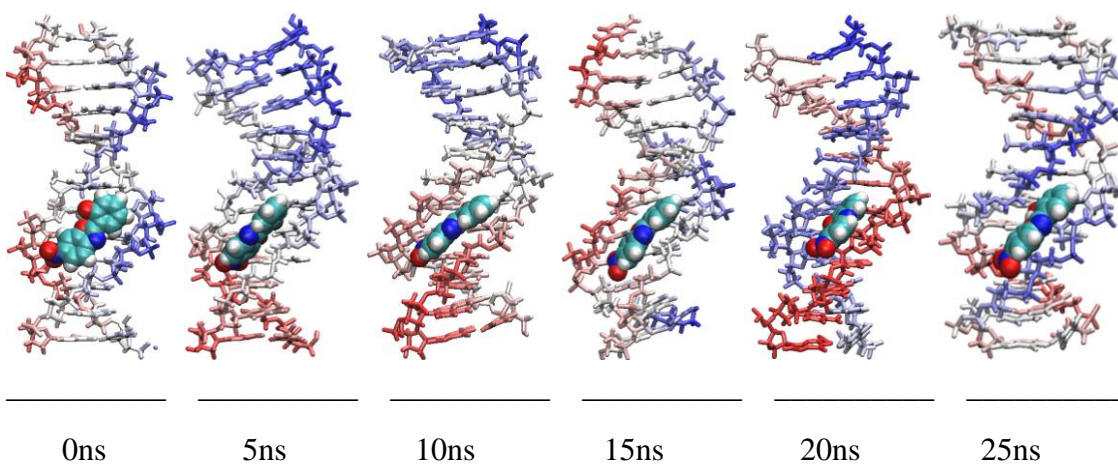


Figura 34: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo **1aS** de 0 a 25ns.

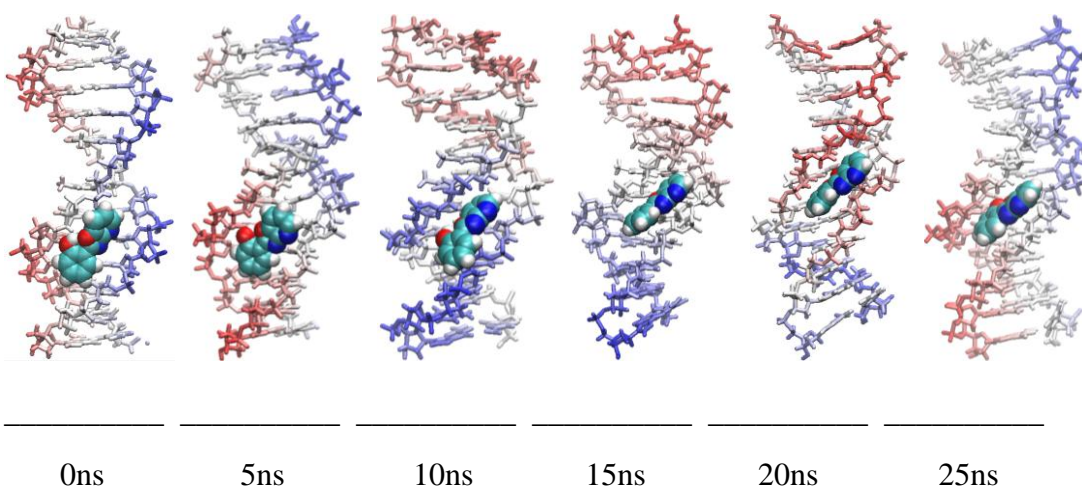


Figura 35: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo **1bS** de 0 a 25ns.

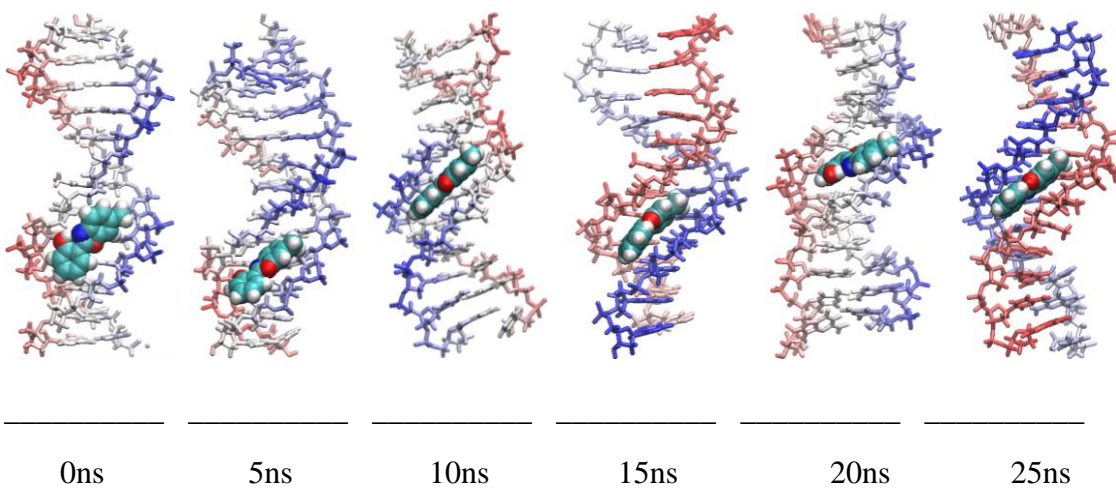


Figura 36: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo **1cS** de 0 a 25ns.

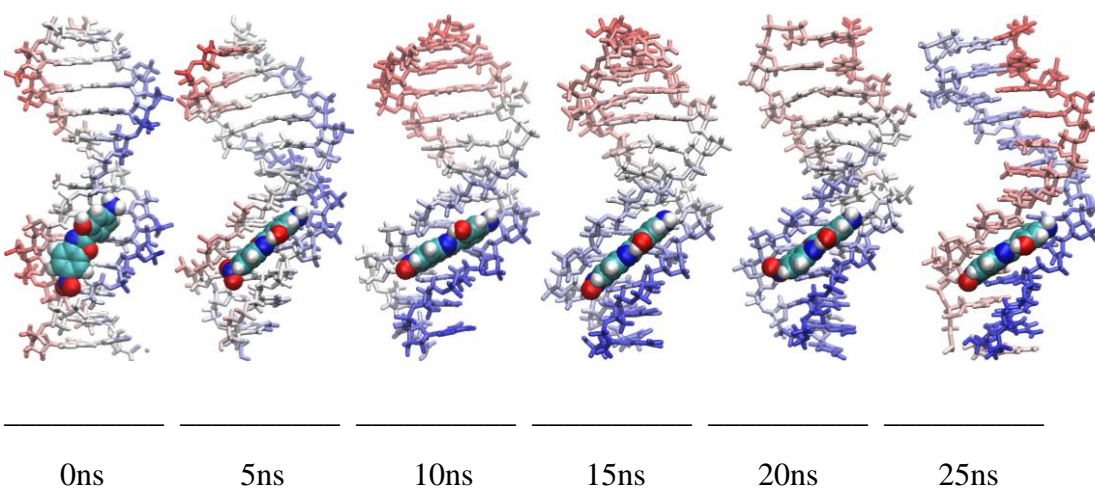


Figura 37: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo **2aS** de 0 a 25ns.

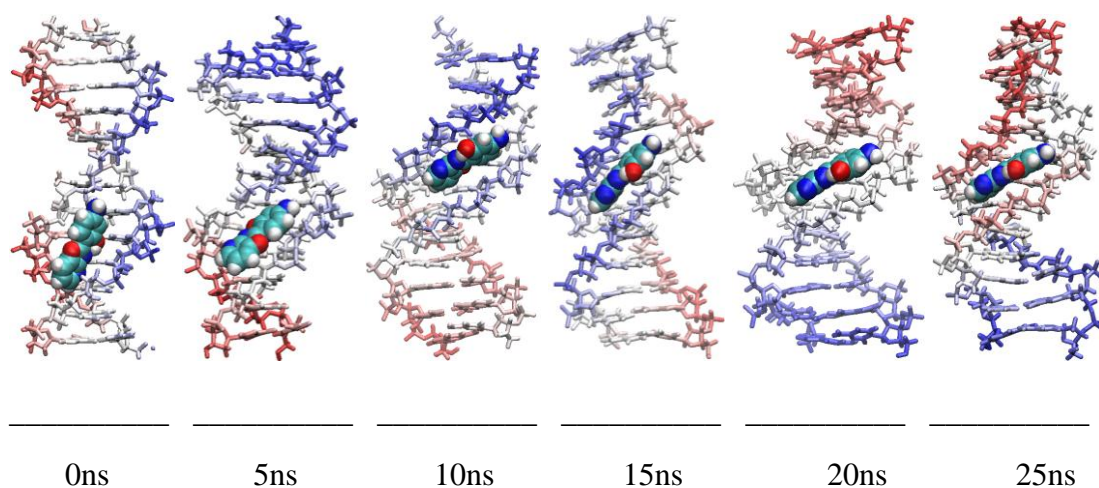


Figura 38: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo **2bS** de 0 a 25ns.

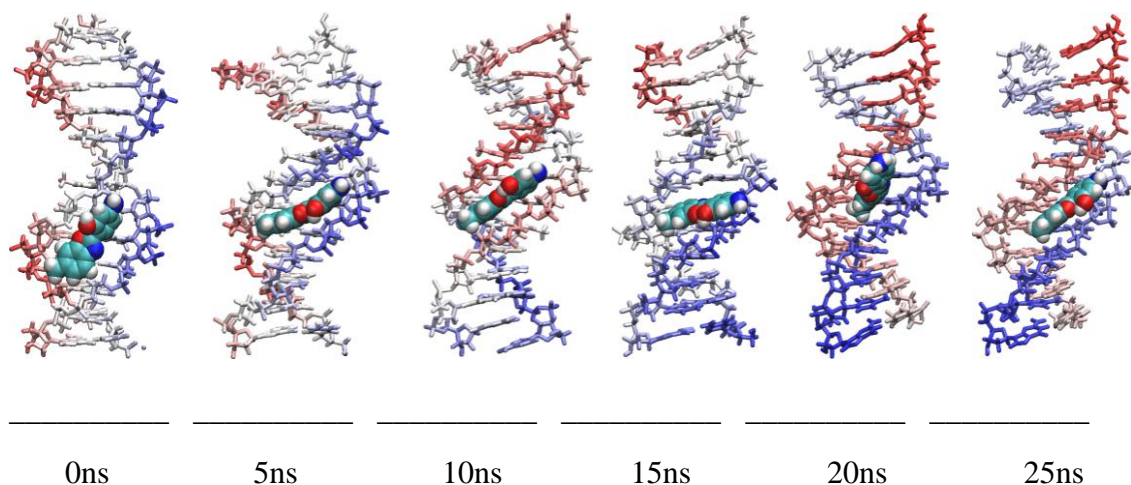


Figura 39: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo **2cS** de 0 a 25ns.

Avaliando as imagens da resolução temporal pode-se observar que nenhum dos ligantes teve alteração no seu tipo de interação com o oligonucleotídeo ao longo das simulações. O que se observa apenas são movimentações do ligante no *gap* (AATT) do oligonucleotídeo e ao longo do sulco. Uma observação interessante é que o ligante **1a** quando intercalado, faz uma rotações de aproximadamente 180° dentro do *gap* do oligonucleotídeo conforme apresentado na Figura 28. O momento exato da rotação do ligante **1a** dentro do *gap* pode ser visto na análise de RMSD logo após os 15 ns chegando a flutuações de até 0,7 nm, indicando o momento de maior alteração estrutural do oligonucleotídeo.

O complexo **2aS**, que pelos padrões de distância (Figura 25) e número de ligações de hidrogênio (Figura 26) exibiu interação mais forte, demonstrou também uma grande manutenção da sua geometria de interação.

A escolha do conjunto de pares de bases para as análises de *Rise*, *Roll* e *Twist* foram determinados, conforme já discutido e apresentado na Figura 25.

Analisando os valores de *Rise* para as interações do tipo intercalação (Figura 40), verifica-se que para todos os complexos estudados, o ligante se mantém no *gap*, confirmando a estabilidade do mesmo, conforme já evidenciado nas análises de distâncias do ligante e os pares de bases do DNA (Figura 25) e pela análise da evolução temporal (Figura 28 a Figura 33).

Os valores de *Rise* do conjunto de Pares Bases AATT ficaram entre 6,8 e 7,0 Å, enquanto o mesmo para o B-DNA canônico sem o ligante ficou em 3,4 Å, conforme apresentado na Tabela 9, mostrando que o *gap* se manteve aberto durante toda a simulação.

Os demais conjuntos de Pares de Bases próximos ao AATT (GATC e ATAT) mantiveram valores de *Rise* entre 3,2-3,5 e 3,2-3,4 Å, respectivamente, enquanto que o oligonucleotídeo manteve 3,4 Å para ambos, sendo estes resultados muito similares. Está média foi obtida no intervalo de 5 ns (fim da rampa de aquecimento), até os 25 ns (tempo total de simulação). O oligonucleotídeo manteve uma média de 3,3 Å e 3,4 Å em resultados experimentais e por simulação, respectivamente, para ambos pares de bases, sendo estes resultados muito próximos aos dos complexos estudados (Tabela 9).

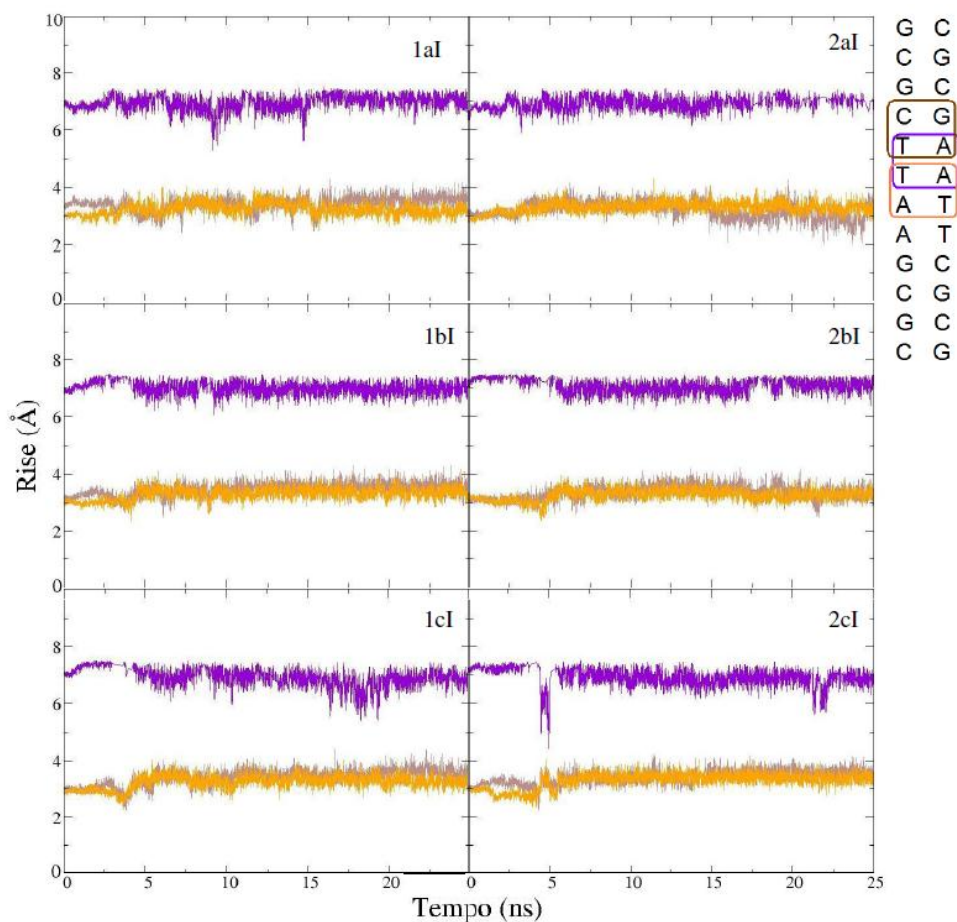


Figura 40: Parâmetro Rise das interações do tipo intercalação dos ligantes do Grupo A com o DNA.

Na Tabela 9 estão apresentadas as médias dos resultados do parâmetro *Rise* para o B-DNA e os demais complexos do tipo intercalação, obtidos por simulação, como também obtidos experimentalmente para o primeiro¹³⁸, estando todos com seus respectivos desvios padrões. Observa-se que os resultados obtidos por simulação de dinâmica molecular para o oligonucleotídeo sem ligante estão muito próximos aos experimentais.

Tabela 9: Resultados experimentais do parâmetro *Rise* do oligonucleotídeo e do primeiro, mais os complexos com interações do tipo intercalação por simulação de dinâmica molecular.

CPB	Exp. ¹³⁸	B-DNA	1aI	2aI	1bI	2bI	1cI	2cI
CGCG1	3,36 ± 0,01	3,35 ± 0,41	3,55 ± 0,48	3,69 ± 0,39	3,64 ± 0,47	3,27 ± 0,48	3,40 ± 0,67	3,62 ± 0,41
GCGC1	3,38 ± 0,08	3,34 ± 0,24	3,43 ± 0,23	3,48 ± 0,20	3,44 ± 0,19	3,21 ± 0,46	3,44 ± 0,22	3,42 ± 0,22
CGCG2	3,26 ± 0,05	3,19 ± 0,33	3,11 ± 0,29	3,27 ± 0,30	3,09 ± 0,25	3,11 ± 0,26	3,04 ± 0,25	3,38 ± 0,41
GATC	3,30 ± 0,10	3,44 ± 0,21	3,43 ± 0,25	3,18 ± 0,32	3,50 ± 0,21	3,41 ± 0,24	3,49 ± 0,22	3,47 ± 0,21
AATT	3,27 ± 0,02	3,37 ± 0,20	6,94 ± 0,29	6,94 ± 0,22	6,97 ± 0,21	7,02 ± 0,22	6,83 ± 0,30	6,87 ± 0,26
ATAT	3,31 ± 0,03	3,37 ± 0,18	3,24 ± 0,22	3,33 ± 0,18	3,34 ± 0,18	3,30 ± 0,18	3,30 ± 0,19	3,38 ± 0,19
TTAA	3,29 ± 0,01	3,32 ± 0,21	3,29 ± 0,22	3,42 ± 0,21	3,30 ± 0,21	3,36 ± 0,20	3,34 ± 0,22	3,43 ± 0,21
TCGA	3,14 ± 0,02	3,36 ± 0,21	3,37 ± 0,24	3,51 ± 0,23	3,52 ± 0,22	3,52 ± 0,20	3,44 ± 0,25	3,51 ± 0,20
CGCG3	3,56 ± 0,07	3,24 ± 0,31	3,41 ± 0,36	3,16 ± 0,34	3,08 ± 0,34	3,26 ± 0,44	3,23 ± 0,29	3,09 ± 0,28
GCGC2	3,21 ± 0,18	3,45 ± 0,20	3,38 ± 0,24	3,48 ± 0,21	3,50 ± 0,18	3,47 ± 0,28	3,35 ± 0,19	3,39 ± 0,22
CGCG4	3,54 ± 0,19	3,47 ± 0,44	3,52 ± 0,37	3,06 ± 0,31	3,60 ± 0,42	3,42 ± 0,73	3,34 ± 0,19	3,71 ± 0,39

Para as interações do tipo sulco, o *gap* inicial, localizado no conjunto de bases AATT do oligonucleotídeo se fechou antes dos primeiros 5ns de simulação, conforme apresentado na Figura 41, confirmando que o ligante não estava intercalado no mesmo.

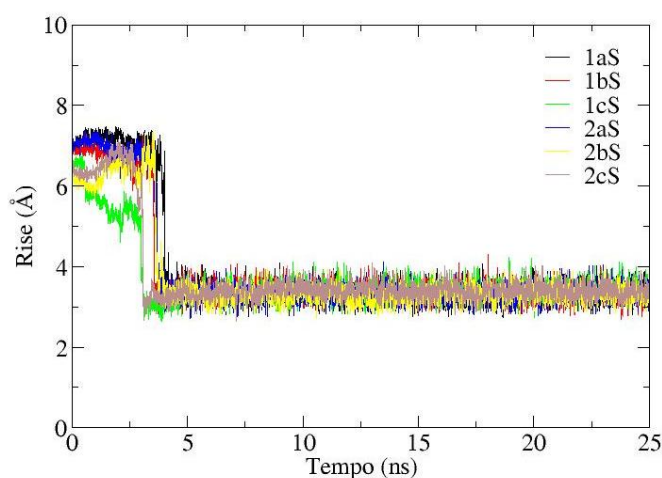


Figura 41: Parâmetro *Rise*, para o conjunto de pares de bases AATT das interações do tipo sulco dos ligantes do Grupo A com o DNA.

Na Figura 42 estão apresentados os resultados de *Rise* para os ligantes em interações do tipo sulco. Observa-se que os ligantes mantêm interações do tipo sulco do início ao fim das simulações, conforme já apresentado nas imagens de resolução temporal (Figura 34 e Figura 39), estando todos os valores de *Rise* muito próximos aos do B-DNA, conforme apresentado na Tabela 10.

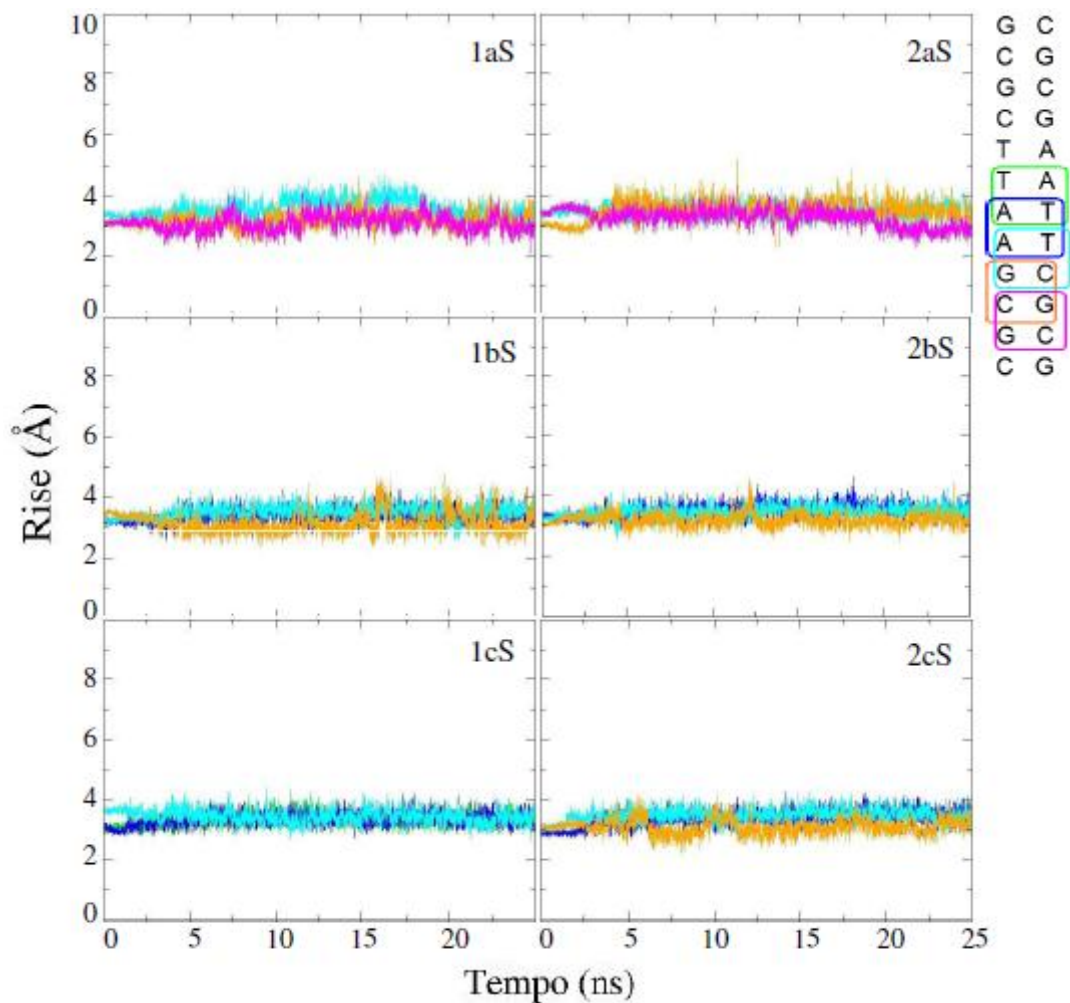


Figura 42: Parâmetro Rise das interações do tipo sulco dos ligantes do Grupo A com o DNA.

Na Tabela 10 estão apresentadas as médias dos resultados do parâmetro Rise para o B-DNA e os demais complexos em interações do tipo sulco, obtidos por simulação, como também obtidos experimentalmente¹³⁸ para o primeiro, estando todos com seus respectivos desvios padrões.

Tabela 10: Resultados experimentais do parâmetro *Rise* do oligonucleotídeo e por simulação de dinâmica molecular do primeiro mais os complexos com interações do tipo sulco.

CPB	Exp. ¹³²	B-DNA	1aS	2aS	1bS	2bS	1cS	2cS
CGCG1	3,36 ± 0,01	3,35 ± 0,41	3,36 ± 0,37	3,64 ± 0,43	3,67 ± 0,39	3,39 ± 0,37	3,40 ± 0,74	3,60 ± 0,41
GCGC1	3,38 ± 0,08	3,34 ± 0,24	3,39 ± 0,20	3,29 ± 0,24	3,47 ± 0,20	3,46 ± 0,18	3,40 ± 0,23	3,43 ± 0,21
CGCG2	3,26 ± 0,05	3,19 ± 0,33	3,11 ± 0,29	3,33 ± 0,54	3,10 ± 0,28	3,08 ± 0,28	3,16 ± 0,26	3,11 ± 0,33
GATC	3,30 ± 0,10	3,44 ± 0,21	3,45 ± 0,22	3,26 ± 0,25	3,44 ± 0,21	3,44 ± 0,21	3,44 ± 0,20	3,45 ± 0,21
AATT	3,27 ± 0,02	3,37 ± 0,20	3,34 ± 0,20	3,30 ± 0,19	3,34 ± 0,19	3,30 ± 0,19	3,30 ± 0,20	3,39 ± 0,19
ATAT	3,31 ± 0,03	3,37 ± 0,18	3,28 ± 0,20	3,28 ± 0,16	3,32 ± 0,18	3,36 ± 0,17	3,37 ± 0,19	3,20 ± 0,17
TTAA	3,29 ± 0,01	3,32 ± 0,21	3,37 ± 0,21	3,25 ± 0,18	3,46 ± 0,22	3,51 ± 0,21	3,40 ± 0,20	3,22 ± 0,18
TCGA	3,14 ± 0,02	3,36 ± 0,21	3,61 ± 0,31	3,51 ± 0,21	3,49 ± 0,20	3,48 ± 0,20	3,41 ± 0,22	3,57 ± 0,21
CGCG3	3,56 ± 0,07	3,24 ± 0,31	3,20 ± 0,27	3,61 ± 0,29	3,10 ± 0,30	3,18 ± 0,22	3,33 ± 0,26	3,62 ± 0,25
GCGC2	3,21 ± 0,18	3,45 ± 0,20	3,34 ± 0,24	3,24 ± 0,30	3,50 ± 0,19	3,38 ± 0,18	3,17 ± 0,25	3,24 ± 0,23
CGCG4	3,54 ± 0,19	3,47 ± 0,44	3,43 ± 0,40	2,73 ± 0,24	3,79 ± 0,37	3,38 ± 0,57	3,43 ± 0,35	3,40 ± 0,32

Na análise do parâmetro *Roll* dos ligantes em interações do tipo intercalação com o B-DNA não foi possível determinar uma tendência, mas alterações entre positivo e negativo durante todas as simulações, conforme apresentado na Figura 43.

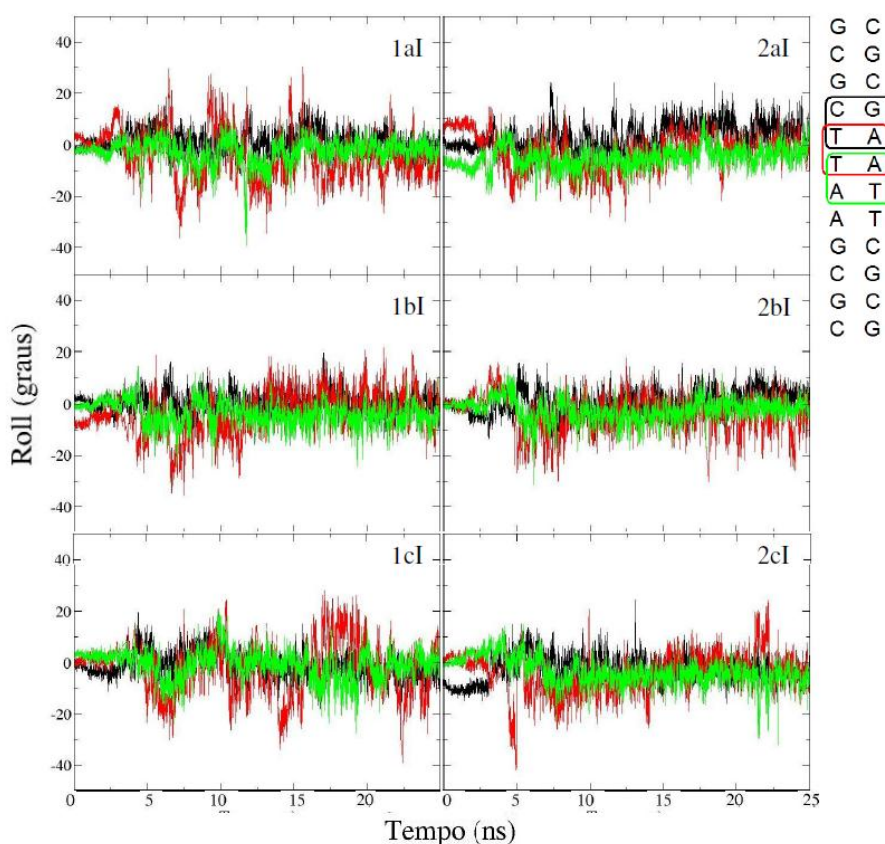


Figura 43: Parâmetro *Roll* das interações do tipo intercalação dos ligantes do Grupo A com o DNA.

Na Tabela 11 estão apresentadas as médias dos resultados do parâmetro *Roll* para o B-DNA e os demais complexos do tipo intercalação, estando todos com seus respectivos desvios padrões.

Tabela 11: Resultados do parâmetro *Roll* para os conjuntos de pares de bases próximos ao ligante nas interações do tipo intercalação do grupo A.

CPB	GATC	AATT	ATAT
B-DNA	2,86 ± 3,89	1,91 ± 3,67	-0,58 ± 3,31
1aI	0,96 ± 4,62	-6,00 ± 9,86	-2,61 ± 4,78
2aI	3,62 ± 5,90	-4,64 ± 6,80	-4,78 ± 4,11
1bI	-0,19 ± 4,30	-2,91 ± 8,36	-4,60 ± 4,57
2bI	0,91 ± 5,00	-4,99 ± 6,96	-3,11 ± 4,18
1cI	-1,32 ± 4,83	-3,24 ± 11,06	-1,45 ± 5,87
2cI	2,50 ± 3,91	1,37 ± 3,96	-0,91 ± 3,40

Na análise dos resultados na Tabela 11 verifica-se uma tendência randômica para o CPB GATC, alternado entre *Roll* positivo e negativo. Para os demais conjuntos de pares de bases, verifica-se uma tendência a um *Roll* negativo, com exceção do complexo **2cI**, que gerou um *Roll* positivo no CPB AATT.

O conjunto de pares de bases AATT foi o que mais sofreu alterações estruturais durante as simulações, com maior tendência a um *Roll* negativo, o que é justificado pela intercalação do ligante, conforme apresentado na Figura 44. Estas maiores alterações estruturais durante as simulações podem ser vistos pelos desvios padrões superiores aos demais (Tabela 11). Apenas o complexo **2cI** manteve um *Roll* positivo, mas mesmo assim com valor inferior ao B-DNA sem ligante. Todos os demais complexos mantiveram valores negativos, obedecendo a seguinte ordem **1aI** < **2bI** < **2aI** < **1cI** < **1bI** < **2cI** < B-DNA.

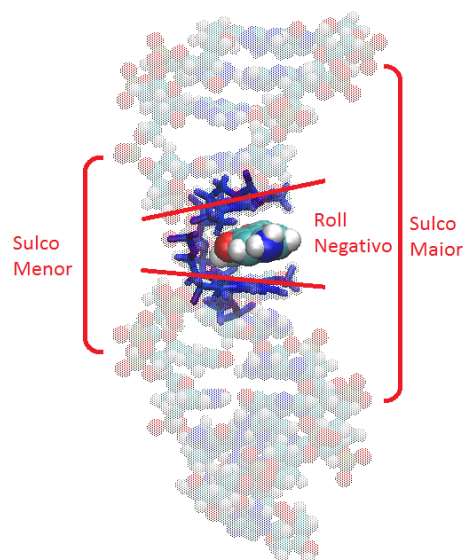


Figura 44: Complexo **2aI** com ligante intercalado no DNA, resultando um *Roll* negativo.

Na análise do parâmetro *Roll* para os complexos com os ligantes em interações do tipo sulco não foi observado nenhuma tendência. Todos os resultados ficaram muito próximos aos do B-DNA sem ligante apresentando pequenas variações conforme apresentado na Figura 45 e Tabela 12.

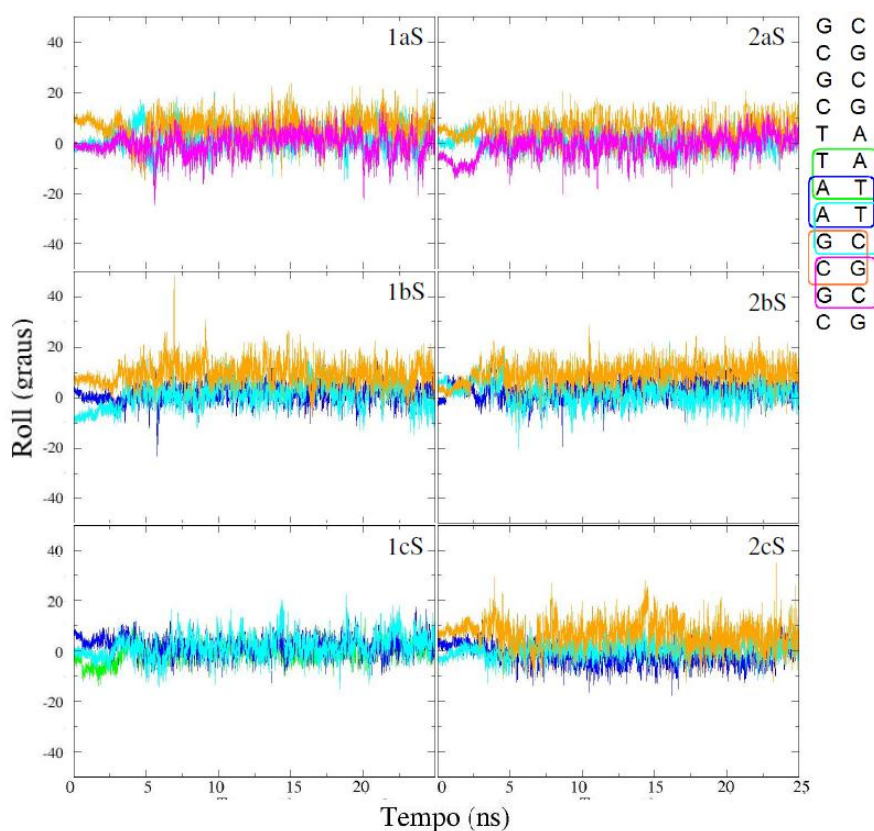


Figura 45: Parâmetro *Roll* das interações do tipo sulco dos ligantes do Grupo A com o DNA.

Na Tabela 12 estão apresentadas as médias dos resultados do parâmetro *Roll* para o B-DNA e os demais complexos com interações do tipo sulco, estando todos com seus respectivos desvios padrões.

Tabela 12: Resultados do parâmetro *Roll* para os conjuntos de pares de bases próximos ao ligante nas interações do tipo sulco do grupo A.

CPB	ATAT	TTAA	TCGA	CGCG3	GCGC2
B-DNA	$-0,58 \pm 3,31$	$2,51 \pm 4,13$	$1,74 \pm 4,52$	$8,11 \pm 5,04$	$-1,93 \pm 4,88$
1aS	-	-	$1,88 \pm 4,54$	$6,53 \pm 4,80$	$-0,32 \pm 4,83$
2aS	-	-	$0,52 \pm 3,34$	$5,63 \pm 5,06$	$-0,49 \pm 4,34$
1bS	-	$2,01 \pm 3,59$	$0,77 \pm 4,29$	$9,75 \pm 4,70$	-
2bS	-	$2,83 \pm 3,63$	$1,08 \pm 4,04$	$10,15 \pm 4,06$	-
1cS	$0,21 \pm 3,99$	$1,43 \pm 3,63$	$2,27 \pm 4,86$	-	-
2cS	-	$1,53 \pm 4,72$	$1,28 \pm 3,79$	$7,48 \pm 4,83$	-

Os resultados do parâmetro *Twist* para os complexos intercalados do grupo A estão apresentados na Figura 46.

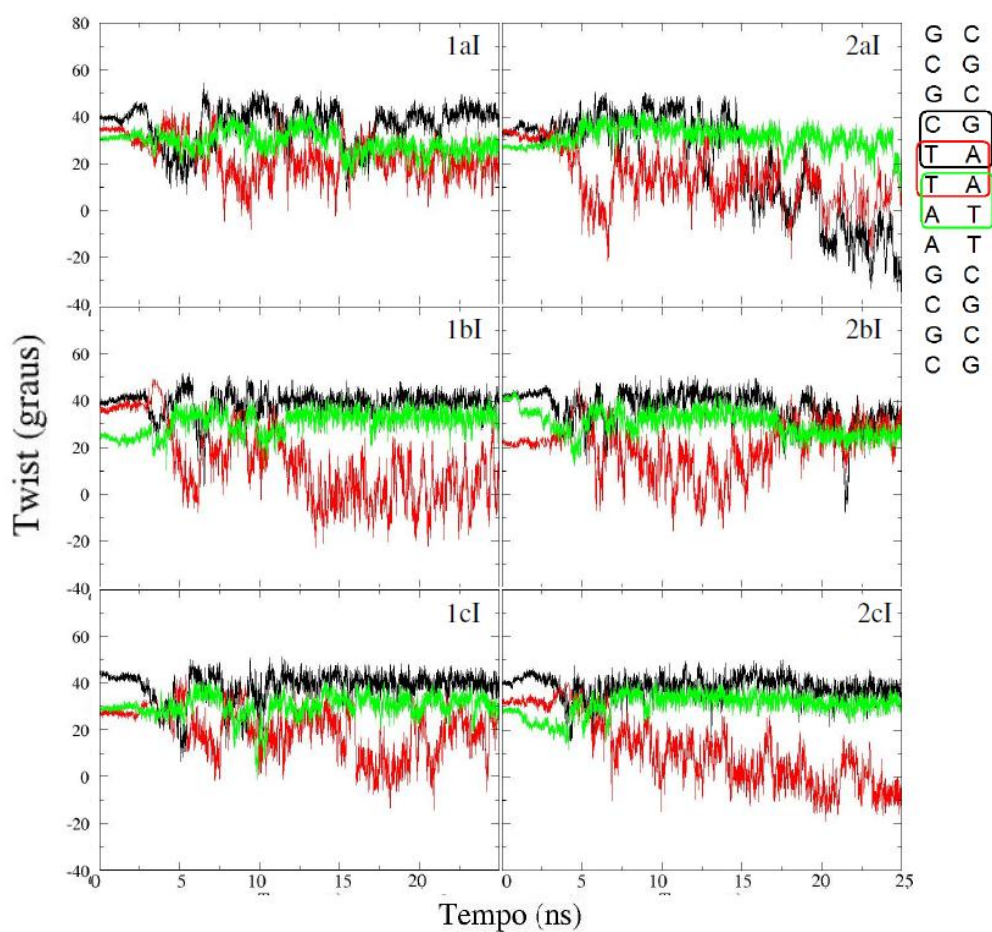


Figura 46: Parâmetro *Twist* das interações do tipo intercalação dos ligantes do Grupo A com o DNA.

O conjunto de pares GATC, que está localizado acima do *gap* não sofreu alterações significativas, mantendo para todos os complexos, resultados muito próximo ao do B-DNA sem ligante, apenas com exceção do complexo com o ligante 2-(4'-amino-2'-hidroxifenil)-6-nitrobenzoxazol (**2aI**). Todos os complexos apresentaram uma pequena tendência ao enrolamento, sendo o resultado de *Twist* para o B-DNA canônico de 35,7° e os resultados encontrados variando de 36,0 a 39,1°, conforme apresentado na Tabela 13.

Para o complexo **2aI**, após a estabilização do sistema apresentou resultados médios de 39° até os 12 ns iniciais. Após os 12 ns, um desenrolamento do conjunto de pares de bases foi observado, chegando a -13° nos últimos 5 ns.

Para o conjunto de pares de bases AATT foi verificada alterações bem significativas, sendo este o local onde o ligante está intercalado. O complexo **1aI** foi o que teve a menor alteração estrutural neste conjunto de pares de bases, tendo uma média após a rampa de aquecimento de 20,3°. Para o complexo **2aI**, após a rampa de aquecimento manteve uma média de 10,6°. O complexo **1bI** após a rampa de aquecimento manteve uma média de 16,6° até os 13 ns, após este período observa-se um maior desenrolamento do CPB AATT, mantendo uma média de 1,90° até o final da simulação. Os complexos **2bI** e **1cI** apresentaram durante a simulação um desenrolamento seguido de um novo enrolamento, provavelmente devido a uma melhor acomodação do ligante. O complexo **2bI** apresentou o desenrolamento máximo no intervalo de 10 a 15 ns, com uma média de 8,5°, voltando para uma média de 26,9° nos últimos 5 ns finais de simulação. O complexo **1cI** teve um desenrolamento máximo entre 16 a 19 ns, chegando a 3,9°, voltado a enrolar chegando a 19,8° nos 3 ns finais de simulação. O conjunto de pares de bases ATAT não apresentou alterações relevantes para todos os complexos estudados, sendo a alteração mais significativa para o **1cI**, chegando a uma média de 28,7°, enquanto que para o B-DNA canônico estava em 32,64, como pode ser visto na Tabela 13. Em geral o CPB que mais desenrola é o AATT pela indução do ligante intercalado.

Na Tabela 13 estão apresentadas as médias dos resultados do parâmetro *Twist* para o B-DNA e os demais complexos do tipo intercalação, estando todos com seus respectivos desvios padrões, como também os resultados experimentais¹³² para o primeiro.

Tabela 13: Resultados do parâmetro *Twist* para os conjuntos de pares de bases próximos ao ligante nas interações do tipo intercalação do grupo A.

CPB	GATC	AATT	ATAT
Exp. ¹³²	37,7 ± 1,7	37,5 ± 0,9	32,2 ± 2,1
B-DNA	35,72 ± 6,36	35,03 ± 4,20	32,64 ± 2,35
1aI	36,88 ± 8,05	20,34 ± 7,41	28,71 ± 5,00
2aI	17,28 ± 22,83	10,57 ± 9,23	31,92 ± 4,84
1bI	39,05 ± 4,97	7,53 ± 11,85	32,19 ± 4,17
2bI	36,00 ± 7,85	17,79 ± 10,83	30,17 ± 5,01
1cI	38,80 ± 6,11	16,39 ± 9,92	30,38 ± 5,40
2cI	38,10 ± 4,40	5,74 ± 10,26	32,34 ± 3,44

Os resultados do parâmetro *Twist* para os complexos em interações de sulco do grupo A estão apresentados na Figura 47 e na Tabela 14. Ao contrário das intercalações, as interações do tipo sulco para os complexos do grupo A, não induzem o oligonucleotídeo a grandes alterações conformacionais. Os ligantes nos complexo 1bS e 2bS induzem o conjunto de pares de bases TCGA a alterações muito sutis, ficando em torno de 36,0° para ambos, enquanto que para o B-DNA canônico, o valor é de 32,32°. No complexo **2aS** é observado um desenrolamento no CPB GCGC2, sendo encontrado um valor médio de 29,7°, enquanto que para o B-DNA canônico foi encontrado um valor de 36,5°. Para o complexo 1bS, o enrolamento do CPB TCGA (38,2°) é acompanhado pelo desenrolamento do CPB CGCG3 (22,4°), quando comparado com a simulação de referência (32,3° e 29,4°, respectivamente). O complexo que sofreu as maiores alterações estruturais foi o **2cS**, que mesmo assim não foram significativas. Para este complexo é observado o enrolamento dos CPB TCGA e CGCG3, acompanhados do desenrolamento do TTAA, sendo os resultados de 38,3°, 36,2° e 29,2°, respectivamente, sendo os resultados de referência de 32,3°, 29,4° e 34,5°.

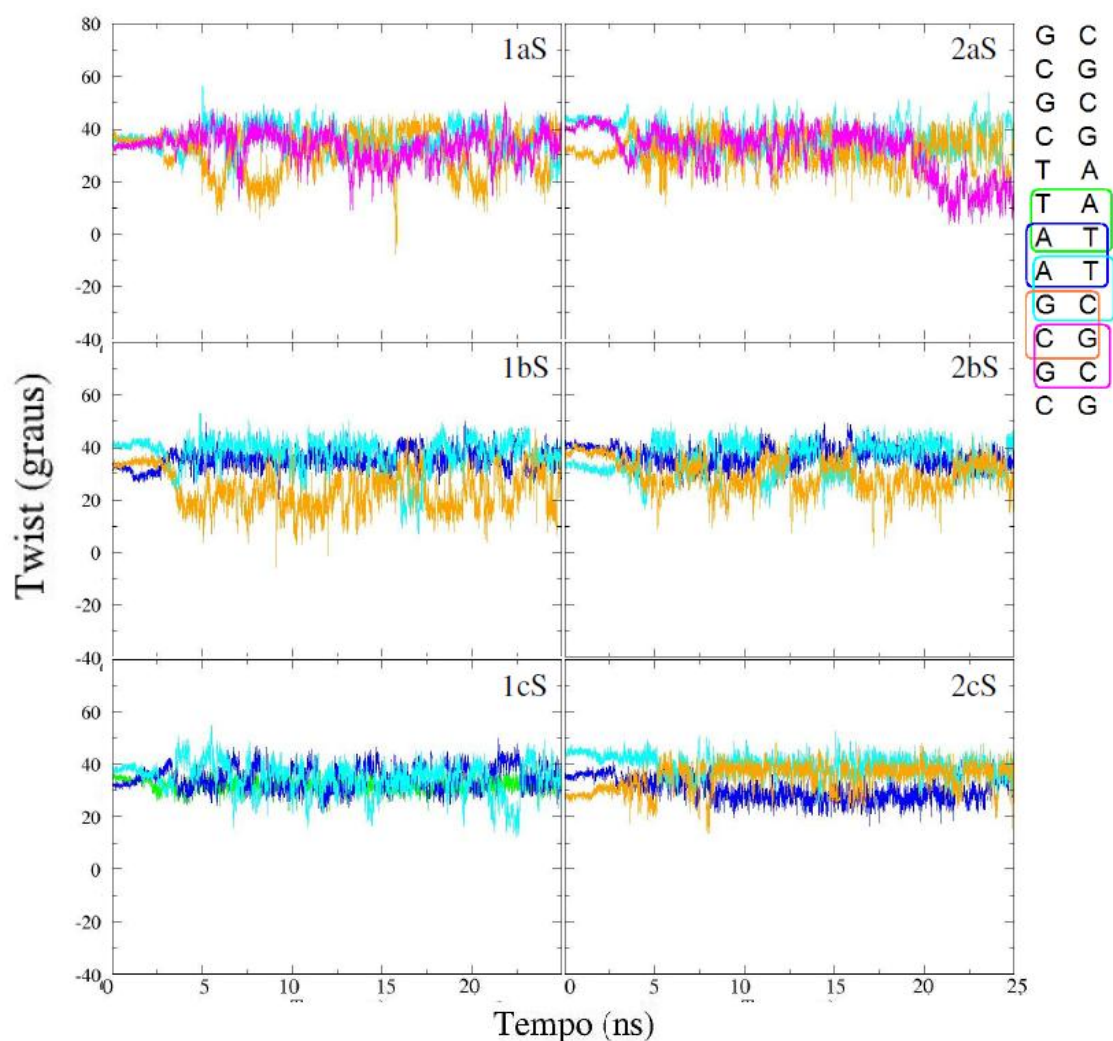


Figura 47: Parâmetro *Twist* das interações do tipo sulco dos ligantes do Grupo A com o DNA.

Na Tabela 14 estão apresentadas as médias dos resultados do parâmetro *Twist* para o B-DNA e os demais complexos em interações do tipo sulco, estando todos com seus respectivos desvios padrões, além dos resultados experimentais¹³² para o primeiro.

Tabela 14: Resultados do parâmetro *Twist* para os conjuntos de pares de bases próximos ao ligante nas interações do tipo intercalação do grupo A.

CPB	ATAT	TTAA	TCGA	CGCG3	GCGC2
Exp. ¹³²	32,2 ± 2,1	36,0 ± 2,8	41,4 ± 2,1	32,3 ± 1,3	44,7 ± 5,4
B-DNA	32,64 ± 2,35	34,46 ± 4,53	32,32 ± 7,35	29,44 ± 8,81	36,48 ± 5,33
1aS	-	-	36,04 ± 5,48	29,74 ± 8,82	33,05 ± 5,96
2aS	-	-	34,53 ± 4,33	32,56 ± 6,03	29,70 ± 9,27
1bS	-	-	38,20 ± 5,69	22,39 ± 7,25	36,08 ± 4,42
2bS	-	35,87 ± 3,85	36,41 ± 5,74	28,29 ± 5,93	-
1cS	31,91 ± 2,30	34,81 ± 4,57	33,76 ± 6,31	-	-
2cS	-	29,22 ± 3,91	38,25 ± 3,75	36,18 ± 4,63	-

5.3.3 Análise do Grupo B

Da mesma forma que foi realizada para o Grupo A, também foi para o Grupo B, sendo primeiramente analisada a distância do centro de massas do ligante em relação ao centro de massas de cada um dos doze pares de bases do DNA (Figura 48), a contar de cima para baixo (Tabela 2, seção 4.2), ao longo das simulações DM. As identificações do tipo intercalação (I) e sulco (S) foram considerados a partir dos dados de entrada obtidos na docagem molecular, conforme já citado na seção 5.3.

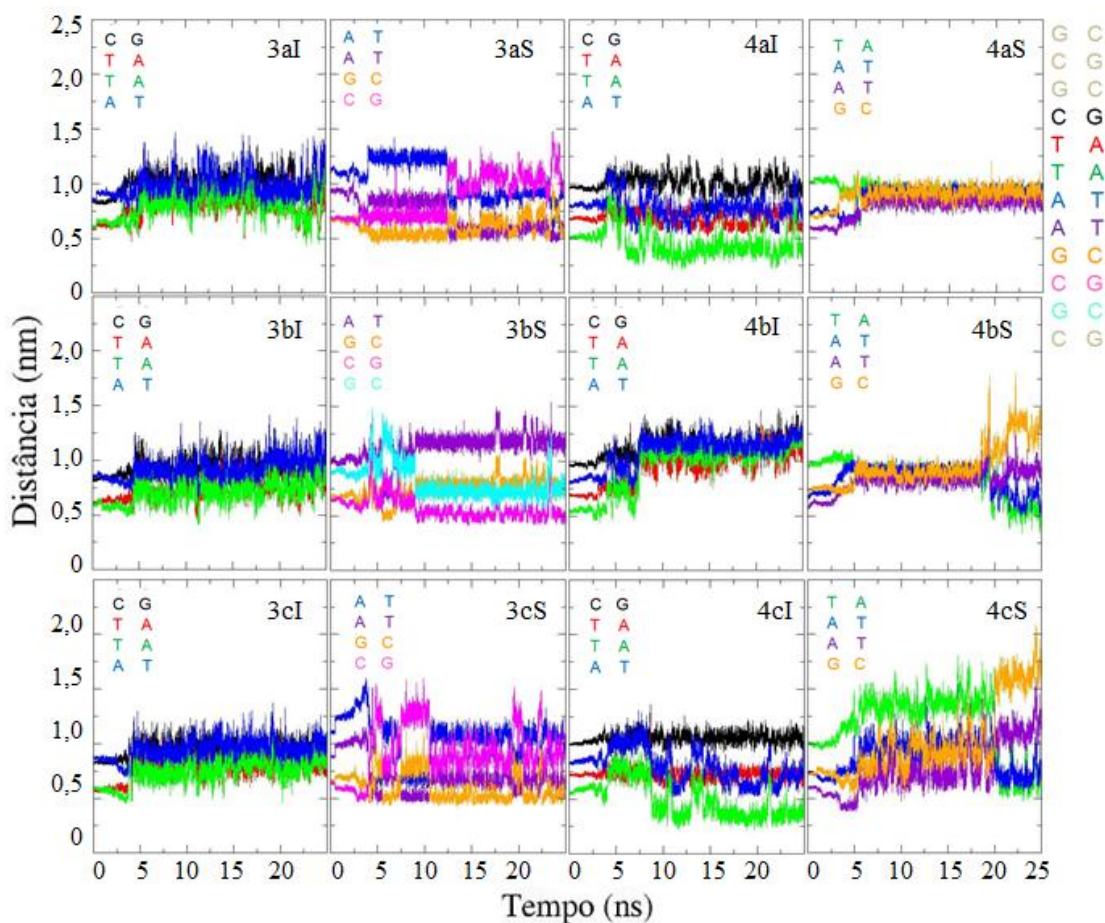


Figura 48: Distância dos ligantes do Grupo B em relação aos Pares de Bases do DNA ao longo da simulação.

Na análise da interação do tipo intercalação de cada ligante com o DNA, observa-se que as distâncias não se alteram significativamente ao longo das simulações. O *gap* artificial do DNA está localizado entre os pares de bases cinco e seis (AATT), e todos os ligantes intercalados se mantiveram mais próximo dos mesmos. Isto mostra que os complexos (ligante e DNA) com interações do tipo intercalação se mantiveram estáveis durante todas as simulações.

Em especial os ligantes **4aI** e **4cI** apresentaram distâncias extremamente pequenas em relação ao par de bases AT (em verde na Figura 48). Os complexos **4a** e **4c** apresentaram na docagem molecular, escores significativamente mais negativos que o **4b**, conforme apresentado na Tabela 4, seção 5.1.

Na análise das interações do tipo sulco dos ligantes com os pares de bases do DNA, observa-se que os complexos **3aS** e **3cS**, que contém os ligantes 2-(4'-amino-2'-hidroxifenil)-benzimidazol e 2-(4'-amino-2'-hidroxifenil)-benzotiazol, respectivamente, se mantiveram com interações na região do par de base sete (TA), com pequenas flutuações, enquanto que o **3bS**, que contém o ligante 2-(4'-amino-2'-hidroxifenil)-benzoxazol, manteve interações mais estáveis na região do par de base dez (GC).

As bases de Tröger (**4ac**) apresentam uma interação com maior número de pares de bases do DNA, devido a serem moléculas maiores que seus precursores (**3**). As bases de Tröger **4aS**, **4bS** e **4cS** mantiveram interações estáveis com os pares de bases seis a nove, tendo os dois últimos pequenas flutuações nos 5ns finais de simulação, enquanto que o primeira apresenta uma interação mais estável.

Outro comportamento interessante é que a migração do ligante ao longo do sulco se caracteriza pela existência de barreiras energéticas entre um par de bases e outro, conforme se pode observar na Figura 48. Quando o ligante deixa de interagir com um par de bases e passa a interagir com o par vizinho, esta mudança é observada por saltos e não de forma sutil conforme esperado, evidenciando desta forma, a existência de barreiras energéticas. Este mesmo comportamento foi observado para o grupo A.

A partir destes resultados foram determinados quais conjuntos de pares de bases seriam analisados em cada complexo (ligante e DNA).

Na análise das interações do tipo intercalação, os complexos **3ab** e **4ab** apresentaram o mesmo número de ligações de hidrogênio, tanto precursores, quanto bases de Tröger. Estes complexos apresentaram até três ligações de hidrogênio. Para estes mesmo ligantes em interações do tipo sulco, os complexos **4ab** apresentaram em média uma ligação de hidrogênio a menos.

Os complexos **4c** e **3c** em interações do tipo sulco e intercalação apresentaram uma e duas ligações de hidrogênio, respectivamente, números menor que para os demais ligantes. Isto se deve ao fato que estes ligantes contêm um átomo de enxofre no anel

azólico, sendo este indisponível para fazer ligações de hidrogênio ao contrário do nitrogênio e oxigênio nos demais casos.

Na análise destes dados, observa-se que as bases de Tröger, mesmo tendo possibilidade de fazer ligações de hidrogênio adicionais, o mesmo não acontece, realizando apenas o mesmo número ou menor que seus respectivos precursores. Estes resultados são apresentados na Figura 49.

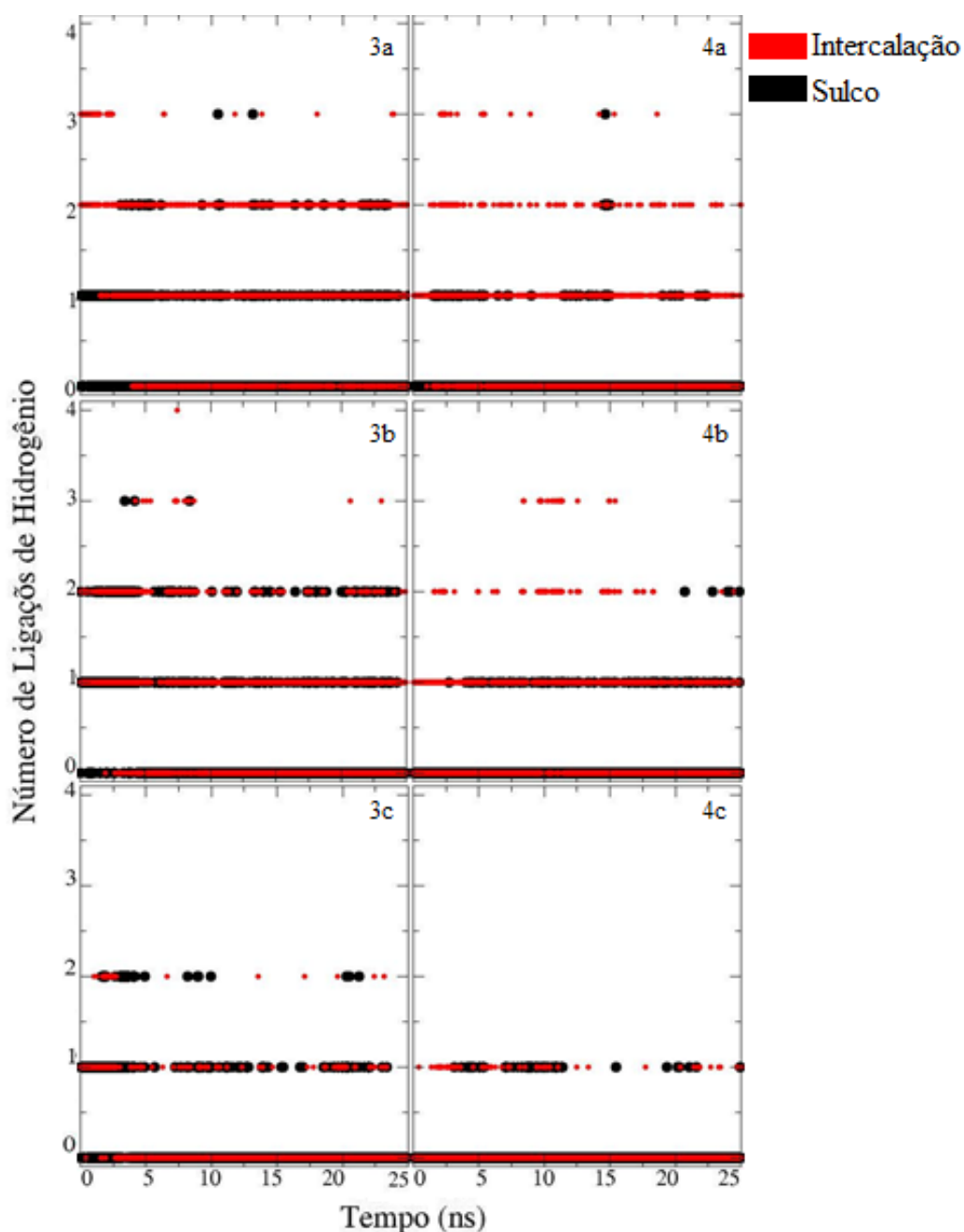


Figura 49: Número de Ligações de Hidrogênio dos ligantes do Grupo B com o DNA ao longo da simulação.

Na Figura 50 estão apresentados os resultados de análises de RMSD dos complexos (ligante e DNA) em interações do tipo intercalação (I) e sulco (S) versus o oligonucleotídeo sem o ligante e na Tabela 15, os valores médios e seus respectivos desvios padrões após a rampa de aquecimento.

Verifica-se que os complexos **3b** e **3c** apresentam flutuações levemente superiores que o B-DNA nos 10 ns finais de simulação em interações do tipo intercalação, enquanto que a base de Tröger **4b** apresentou flutuações bem mais pronunciadas após os 7 ns iniciais de simulação, no mesmo tipo de interação. Os complexos **3a**, **4a** e **4c** apresentaram resultados de RMSD em interações do tipo intercalação muito próximas ao do B-DNA sem ligante.

Nas análises de RMSD das interações do tipo sulco, os precursores das bases de Tröger (**3a**, **3b** e **3c**), também apresentaram resultados muito próximos aos do B-DNA. As bases de Tröger neste tipo de interação apresentaram flutuações levemente superiores ao oligonucleotídeo sem ligante. O ligante **4a** apresentou flutuações superiores no primeiros 15 ns de simulação, o ligante **4b** nos 5 ns finais e o ligante **4c** durante toda a simulação.

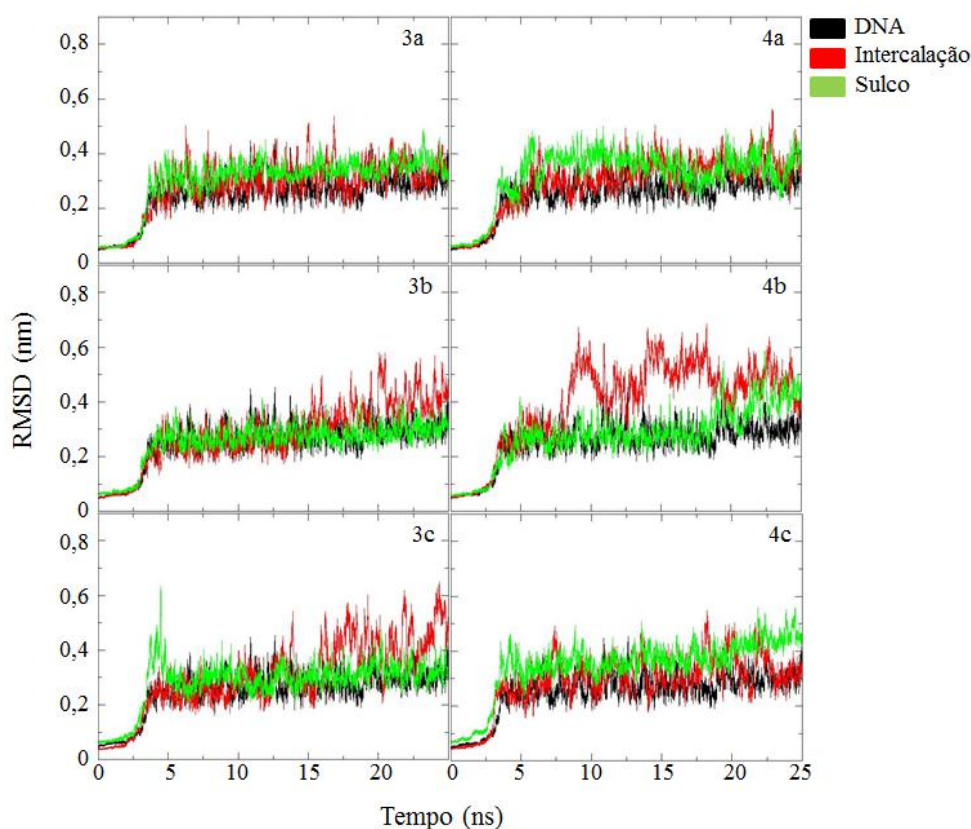


Figura 50: RMSD do oligonucleotídeo sem ligante e dos complexos (ligante e DNA) do Grupo B.

Na Tabela 15 estão apresentadas todas as médias de RMSD após a estabilização do sistema com seus respectivos desvios padrões.

Tabela 15: Resultados médios de RMSD do oligonucleotídeo sem ligante e dos complexos (ligante e DNA) do Grupo B após a rampa de aquecimento

Sistema	RMSD
B-DNA	$0,20 \pm 0,04$
3aI	$0,32 \pm 0,05$
3aS	$0,34 \pm 0,04$
4aI	$0,33 \pm 0,05$
4aS	$0,36 \pm 0,05$
3bI	$0,28 \pm 0,03$
3bS	$0,32 \pm 0,08$
4bI	$0,49 \pm 0,09$
4bS	$0,31 \pm 0,07$
3cI	$0,35 \pm 0,10$
3cS	$0,30 \pm 0,04$
4cI	$0,41 \pm 0,08$
4cS	$0,38 \pm 0,05$

Nas Figura 51 a Figura 62 estão apresentados as imagens da evolução temporal de todas as simulações do grupo B, com intervalos de 5 em 5ns.

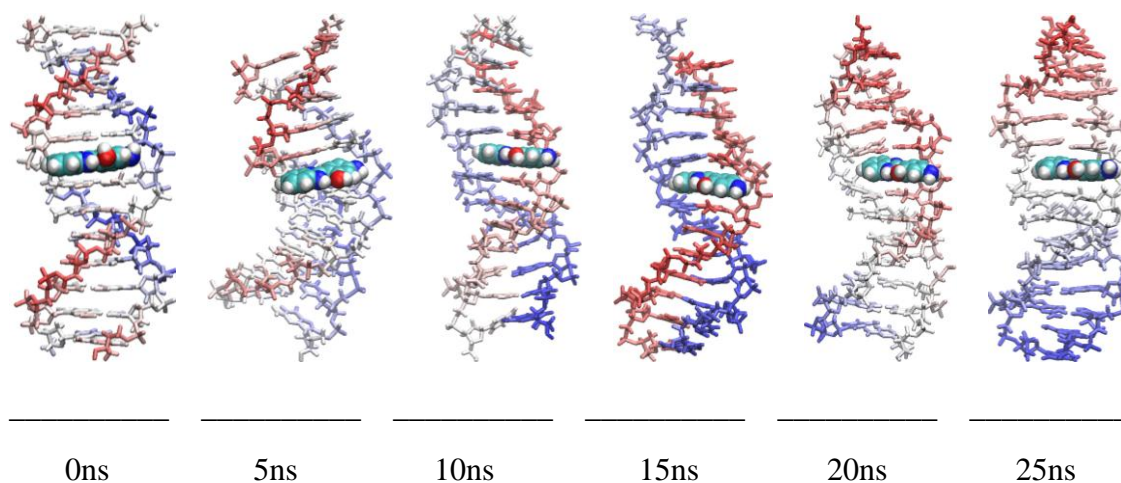


Figura 51: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo **3aI** de 0 a 25ns.

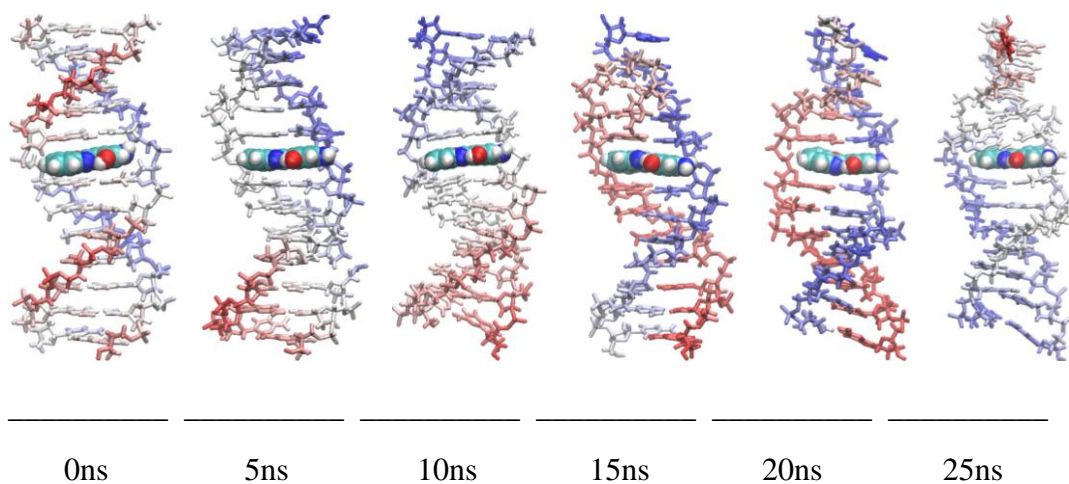


Figura 52: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo **3bI** de 0 a 25ns.

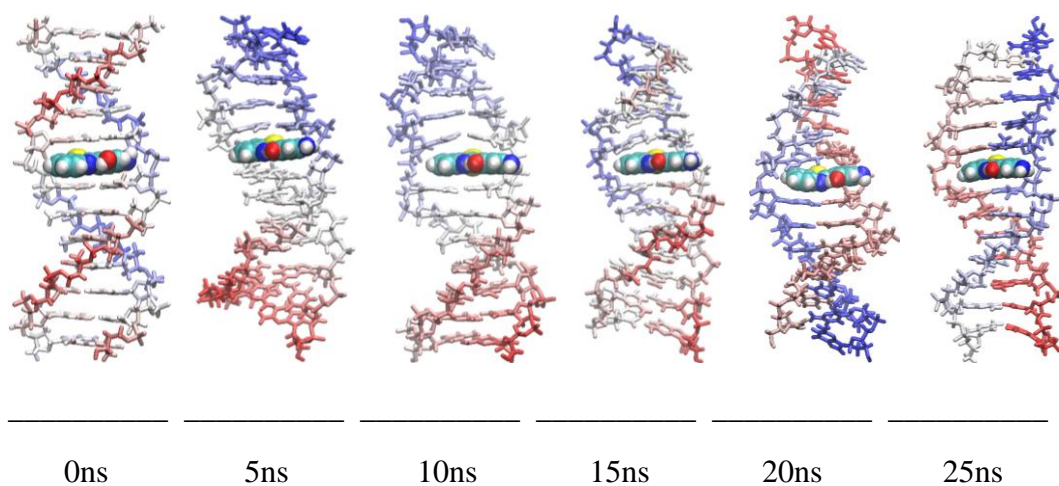


Figura 53: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo **3cI** de 0 a 25ns.

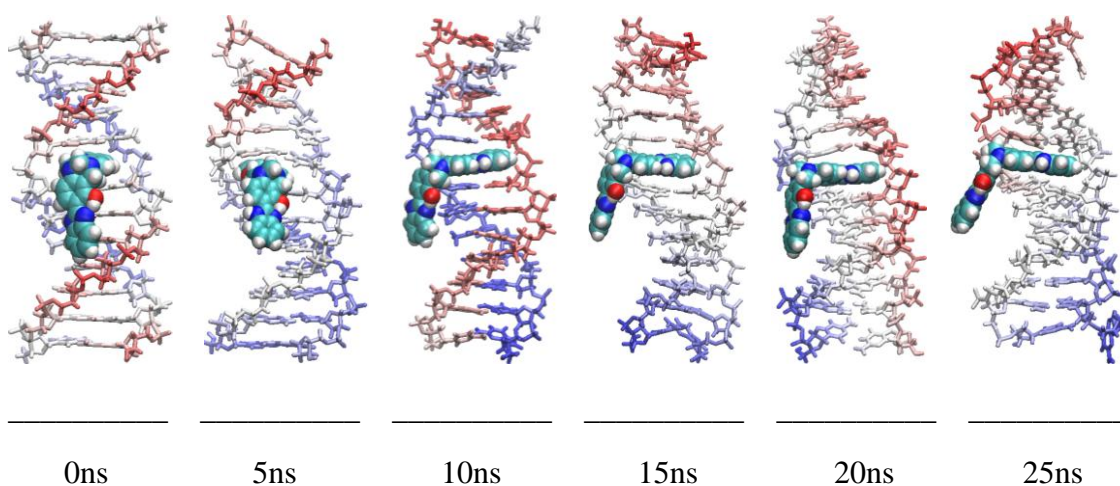


Figura 54: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo **4aI** de 0 a 25ns.

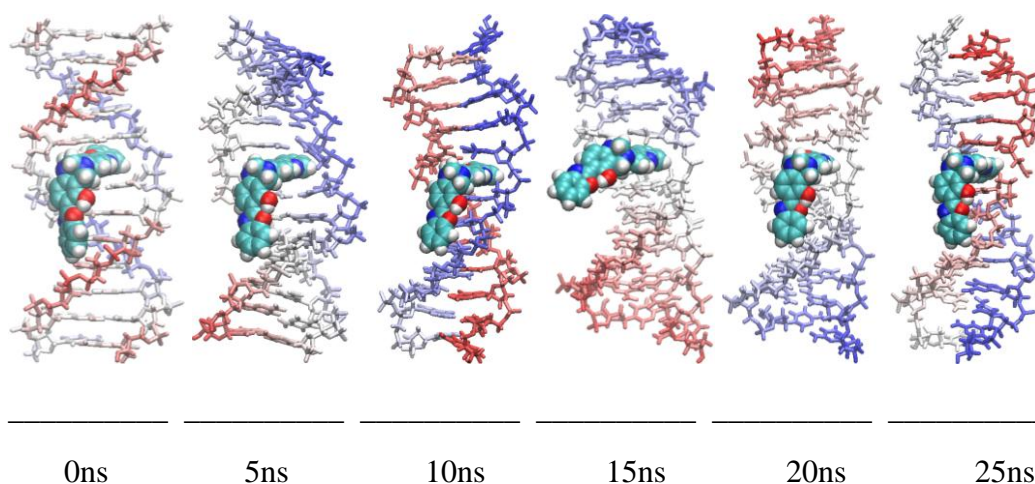


Figura 55: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo **4bI** de 0 a 25ns.

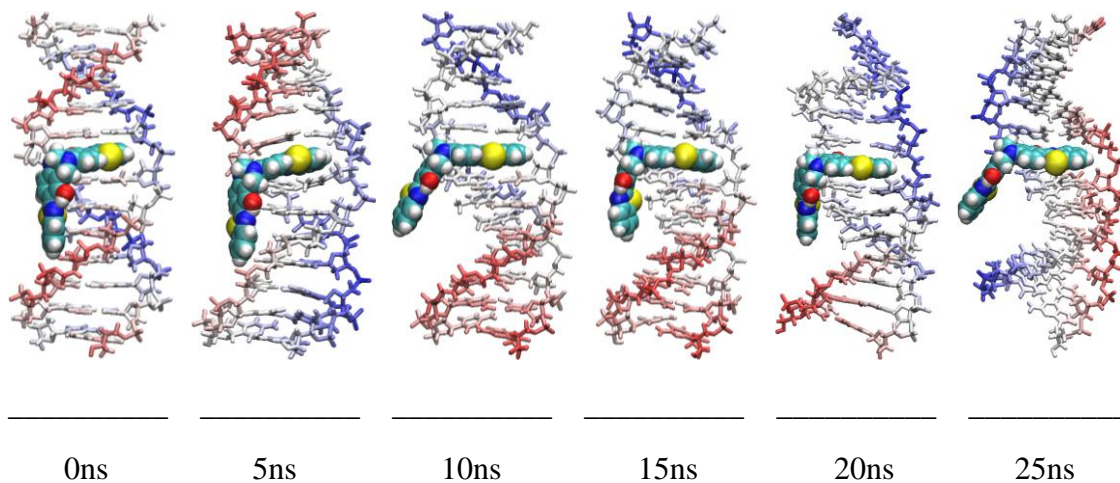


Figura 56: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo **4cI** de 0 a 25ns.

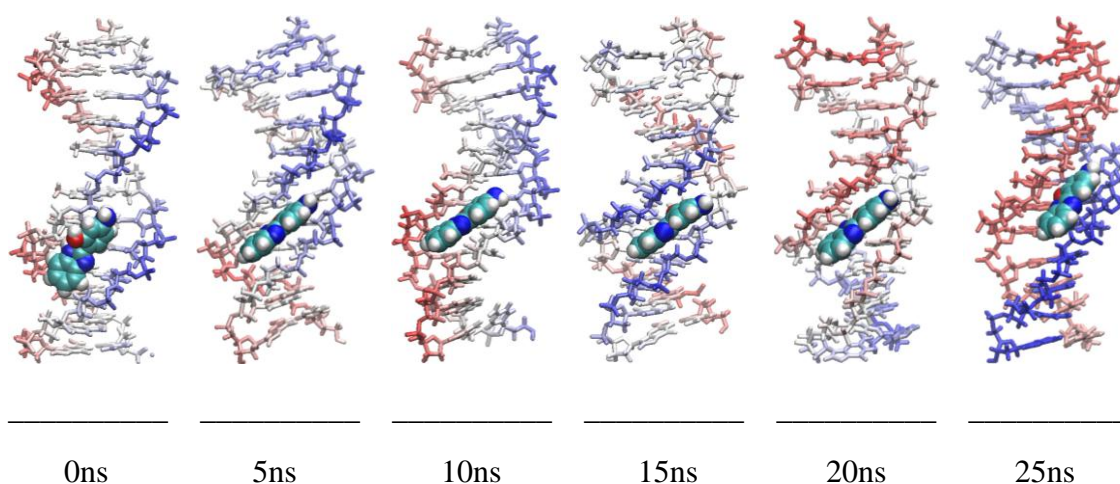


Figura 57: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo **3aS** de 0 a 25ns.

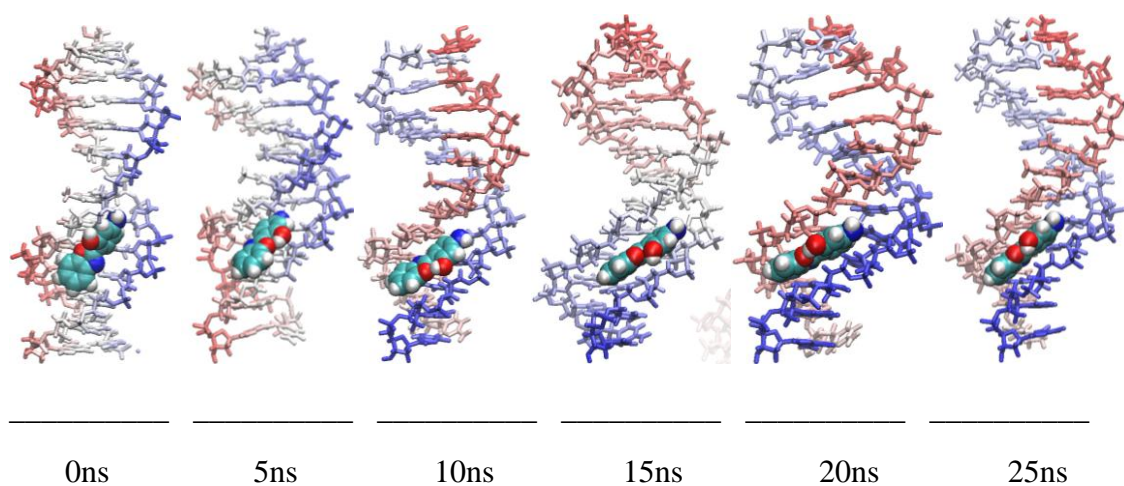


Figura 58: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo **3bS** de 0 a 25ns.

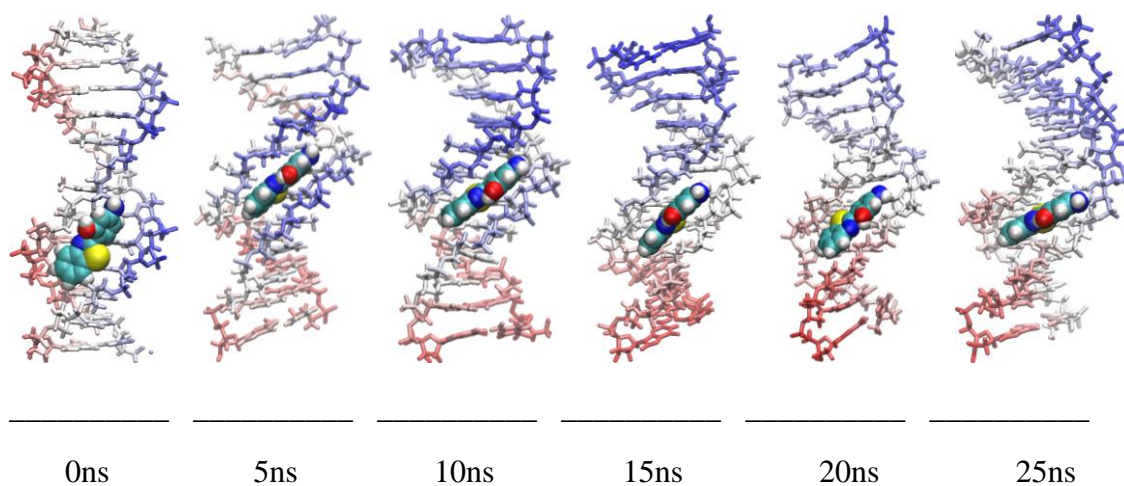


Figura 59: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo **3cS** de 0 a 25ns.

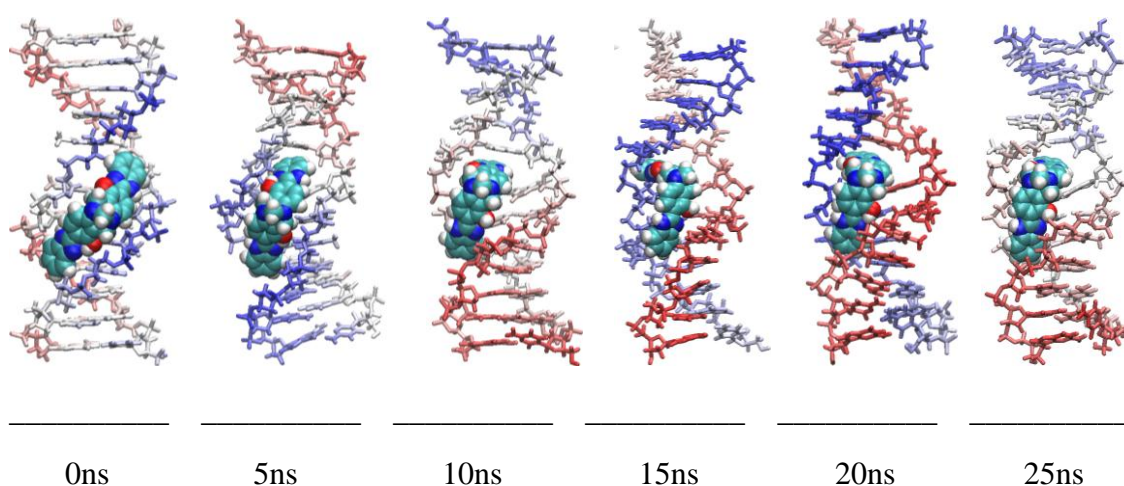


Figura 60: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo **4aS** de 0 a 25ns.

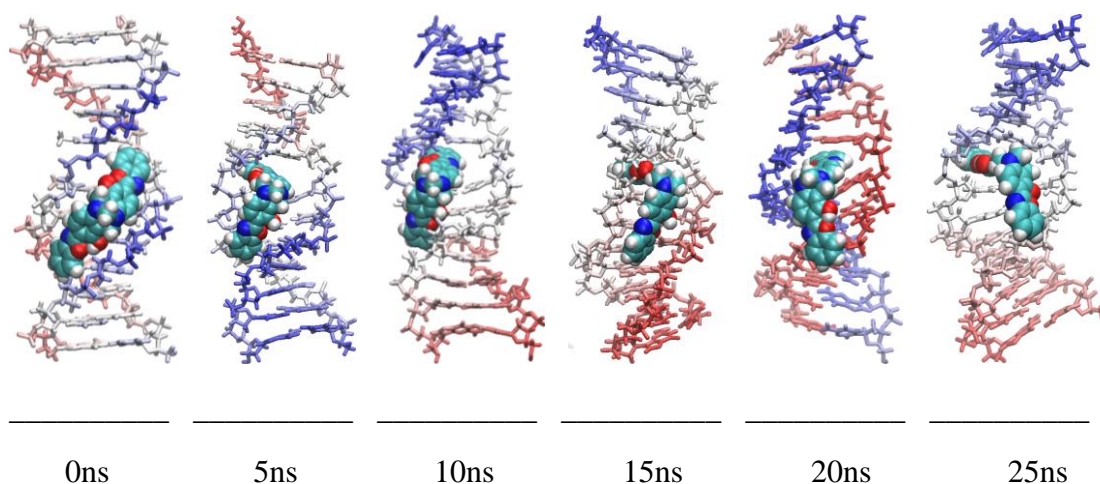


Figura 61: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo **4bS** de 0 a 25ns.

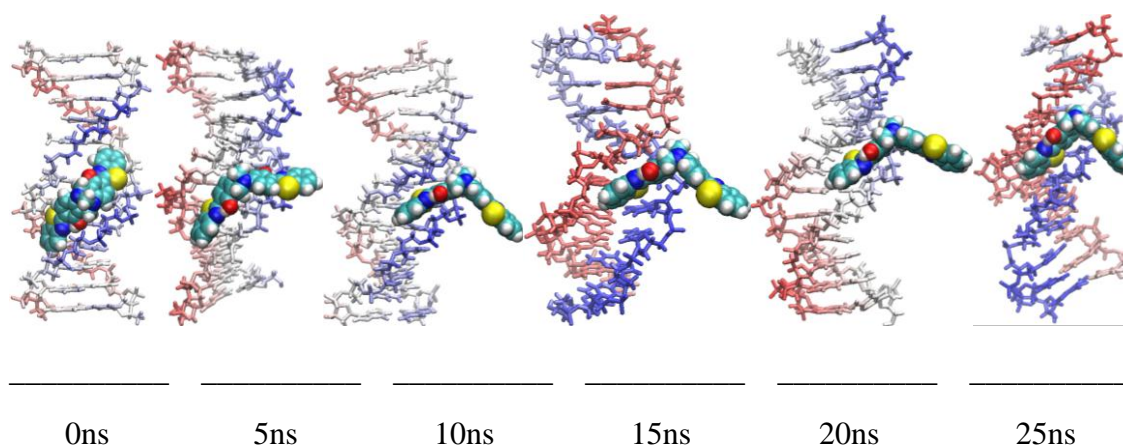


Figura 62: Evolução temporal da simulação de dinâmica molecular do complexo **4cS** de 0 a 25ns.

Avaliando as imagens da resolução temporal, pode-se observar que os complexos **4aS** e **4bS**, as interações passarem de sulco para intercalação, conforme apresentado na Figura 60 e Figura 61. Para os demais complexos nenhum dos ligantes teve alteração no seu tipo interação com o oligonucleotídeo ao longo das simulações. O complexo **4cS** manteve interações do tipo sulco do início ao fim da simulação, mas acabou girando a concavidade “V” da BT para fora do DNA, conforme apresentado na Figura 62. Na análise de RMSD este resultado pode ser visto com uma pequena flutuação superior à encontrada para o DNA sozinho, indicando um maior afastamento da BT sem causar alterações estruturais no oligonucleotídeo.

A escolha do CPB para as análises de *Rise*, *Roll* e *Twist* foram determinados, conforme já discutido e apresentado na Figura 48.

Na análise de intercalação dos complexos do grupo B (Figura 63), verifica-se que os ligantes se mantêm no gap do início ao fim da simulação em todos os complexos. Os valores de *Rise* do conjunto de Pares Bases AATT ficaram entre 6,4 e 7,0 Å, enquanto o mesmo para o B-DNA canônico sem o ligante ficou em 3,4 Å, conforme apresentado na Tabela 16, mostrando que o *gap* se manteve aberto durante toda a simulação.

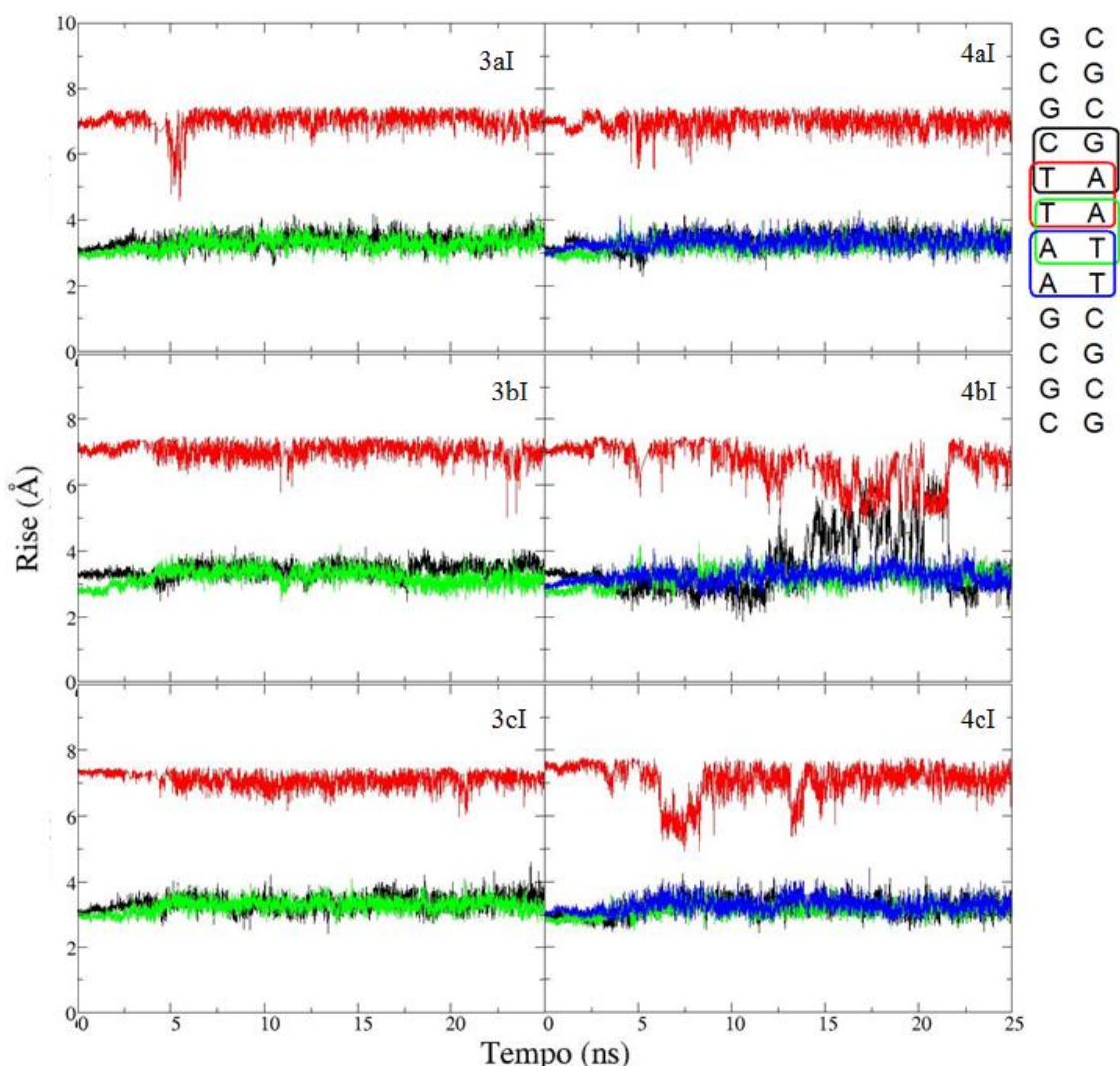


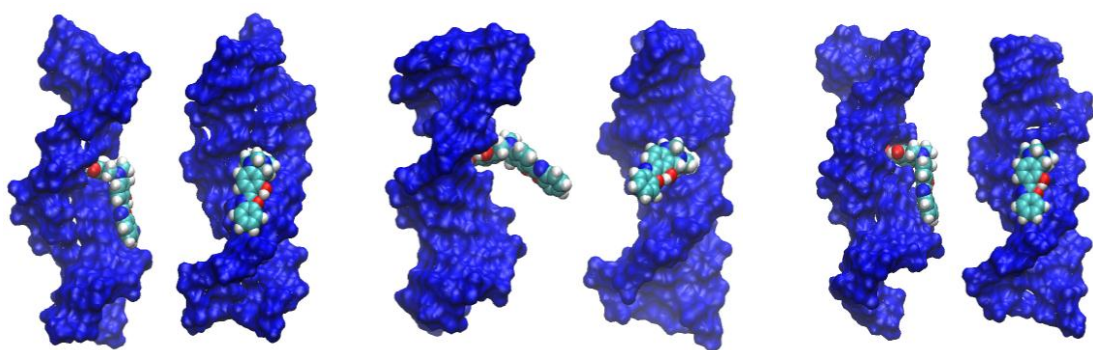
Figura 63: Parâmetro *Rise* das interações do tipo intercalação dos ligantes do Grupo B com o DNA.

Na Tabela 16 estão apresentadas as médias dos resultados do parâmetro *Rise* para o B-DNA e os demais complexos em interações do tipo intercalação, obtidos por simulação, como também obtidos experimentalmente¹³⁸ para o primeiro, estando todos com seus respectivos desvios padrões.

Tabela 16: Resultados experimentais do parâmetro *Rise* do oligonucleotídeo e por simulação de dinâmica molecular do primeiro mais os complexos com interações do tipo intercalação.

CPB	Exp. ¹³⁸	B-DNA	3aI	4aI	3bI	4bI	3cI	4cI
CGCG1	3,36 ± 0,01	3,35 ± 0,41	3,10 ± 0,35	3,36 ± 0,65	3,27 ± 0,38	3,51 ± 0,40	3,75 ± 0,40	3,27 ± 0,30
GCGC1	3,38 ± 0,08	3,34 ± 0,24	3,54 ± 0,20	3,43 ± 0,20	3,36 ± 0,23	3,33 ± 0,23	3,44 ± 0,21	3,44 ± 0,18
CGCG2	3,26 ± 0,05	3,19 ± 0,33	3,06 ± 0,28	3,20 ± 0,30	3,16 ± 0,30	3,26 ± 0,30	3,18 ± 0,28	3,21 ± 0,36
GATC	3,30 ± 0,10	3,44 ± 0,21	3,38 ± 0,22	3,40 ± 0,22	3,44 ± 0,20	3,47 ± 0,90	3,38 ± 0,24	3,31 ± 0,24
AATT	3,27 ± 0,02	3,37 ± 0,20	7,01 ± 0,35	6,95 ± 0,27	7,00 ± 0,25	6,39 ± 0,64	7,05 ± 0,22	6,94 ± 0,52
ATAT	3,31 ± 0,03	3,37 ± 0,18	3,29 ± 0,20	3,24 ± 0,19	3,23 ± 0,23	3,23 ± 0,22	3,31 ± 0,18	3,19 ± 0,18
TTAA	3,29 ± 0,01	3,32 ± 0,21	3,37 ± 0,21	3,35 ± 0,21	3,34 ± 0,20	3,25 ± 0,25	3,32 ± 0,20	3,31 ± 0,23
TCGA	3,14 ± 0,02	3,36 ± 0,21	3,50 ± 0,21	3,42 ± 0,23	3,48 ± 0,22	3,55 ± 0,26	3,43 ± 0,22	3,43 ± 0,22
CGCG3	3,56 ± 0,07	3,24 ± 0,31	3,04 ± 0,27	3,17 ± 0,37	3,42 ± 0,48	3,39 ± 0,46	3,24 ± 0,33	3,25 ± 0,31
GCGC2	3,21 ± 0,18	3,45 ± 0,20	3,51 ± 0,20	3,34 ± 0,21	3,49 ± 0,19	3,42 ± 0,19	3,40 ± 0,22	3,43 ± 0,19
CGCG4	3,54 ± 0,19	3,47 ± 0,44	3,14 ± 0,33	3,41 ± 0,36	3,76 ± 0,42	3,48 ± 0,66	3,26 ± 0,36	3,53 ± 0,41

Os complexos **4aI** e **4cI** exibem maior estabilidade, o que está de acordo com as distâncias mostradas na Figura 48. Para o complexo **4bI**, pode-se verificar uma alteração no conjunto de bases GATC, tendendo a uma abertura do *gap* aos 13 ns e o fechamento aos 22 ns, enquanto que no mesmo período o conjunto de pares de bases AATT, teve uma leve tendência ao fechamento. Este comportamento se deve ao ligante estar melhor se acomodando no *gap*, conforme apresentado na Figura 64. O que se pode verificar que após os 10 ns, a parte do ligante que estava em interação de sulco se afasta para melhor acomodação do mesmo no *gap*, voltando a interagir em sulco após os 15 ns. Estas alterações estruturais também podem ser evidenciadas pela menor estabilidade neste período de tempo, conforme já apresentado nos resultados de RMSD (Figura 50). Mesmo o complexo **4bI** tendo todas estas alterações estruturais, o ligante se mantém estável no *gap*, durante toda a simulação, conforme já apresentado na Figura 55 e discutido na análise de evolução temporal.



10ns

15ns

20ns

Figura 64: Movimento do ligante se acomodando no gap no complexo 4bI.

Na Figura 65 estão apresentados os resultados de *Rise* para os ligantes em interações do tipo sulco. Para o complexo 4aS e 4bS, observa-se que os ligantes, em ambos os complexos passaram de interações do tipo sulco para intercalação no conjunto de pares de bases AATT, confirmando as observações na análise de evolução temporal.

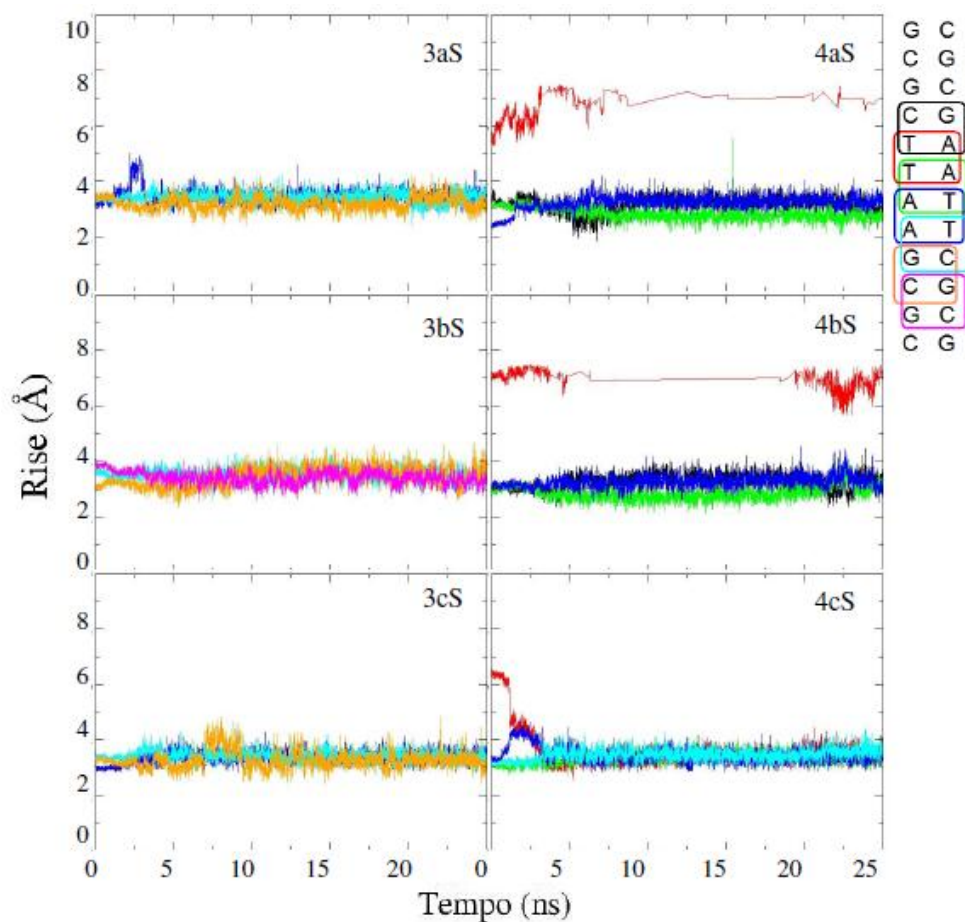


Figura 65: Parâmetro Rise das interações do tipo sulco dos ligantes do Grupo A com o DNA.

Este dois complexos citados intercalaram via sulco menor, enquanto que os mesmo complexos citados na Figura 63 intercalam via sulco maior. O que se pode verificar que estas interações via sulco menor causa uma compressão que se traduz numa diminuição do parâmetro *Rise* para o conjunto de pares de bases ATAT, o que não é observado para o mesmo tipo de interação via sulco maior, conforme apresentado na Figura 66.

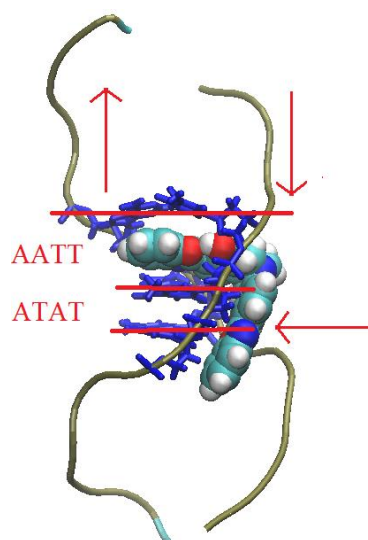


Figura 66: Intercalação via sulco menor do complexo **4bS**, resultando a compressão do conjunto de pares de bases ATAT. As setas vermelhas indicam as posições que o ligante exerce pressão sobre o DNA.

Todos os demais conjuntos de pares de bases estão similares ao do B-DNA canônico, conforme apresentado na Tabela 17.

Tabela 17: Resultados experimentais¹³² do parâmetro *Rise* do oligonucleotídeo e por simulação de dinâmica molecular do primeiro mais os complexos com interações do tipo sulco.

CPB	Exp. ¹³⁸	B-DNA	3aS	4aS	3bS	4bS	3cS	4cS
CGCG1	3,36 ± 0,01	3,35 ± 0,41	3,23 ± 0,40	3,57 ± 0,46	3,65 ± 0,39	3,64 ± 0,44	3,48 ± 0,46	3,44 ± 0,47
GCGC1	3,38 ± 0,08	3,34 ± 0,24	3,38 ± 0,18	3,46 ± 0,19	3,47 ± 0,20	3,50 ± 0,18	3,42 ± 0,22	3,44 ± 0,22
CGCG2	3,26 ± 0,05	3,19 ± 0,33	3,23 ± 0,27	3,16 ± 0,32	3,13 ± 0,32	2,99 ± 0,29	3,20 ± 0,28	3,07 ± 0,26
GATC	3,30 ± 0,10	3,44 ± 0,21	3,39 ± 0,21	3,15 ± 0,29	3,43 ± 0,20	3,30 ± 0,25	3,39 ± 0,20	3,45 ± 0,20
AATT	3,27 ± 0,02	3,37 ± 0,20	3,32 ± 0,20	6,91 ± 0,23	3,33 ± 0,20	6,69 ± 0,38	3,37 ± 0,19	3,42 ± 0,22
ATAT	3,31 ± 0,03	3,37 ± 0,18	3,38 ± 0,18	2,75 ± 0,19	3,29 ± 0,16	2,84 ± 0,26	3,40 ± 0,38	3,38 ± 0,18
TTAA	3,29 ± 0,01	3,32 ± 0,21	3,41 ± 0,20	3,29 ± 0,20	3,27 ± 0,20	3,28 ± 0,23	3,39 ± 0,19	3,37 ± 0,20
TCGA	3,14 ± 0,02	3,36 ± 0,21	3,41 ± 0,21	3,63 ± 0,20	3,50 ± 0,21	3,56 ± 0,21	3,41 ± 0,19	3,49 ± 0,21
CGCG3	3,56 ± 0,07	3,24 ± 0,31	3,18 ± 0,26	3,19 ± 0,33	3,53 ± 0,34	3,21 ± 0,31	3,27 ± 0,25	3,10 ± 0,32
GCGC2	3,21 ± 0,18	3,45 ± 0,20	3,46 ± 0,20	3,47 ± 0,19	3,35 ± 0,22	3,45 ± 0,18	3,52 ± 0,18	3,45 ± 0,20
CGCG4	3,54 ± 0,19	3,47 ± 0,44	3,36 ± 0,34	3,48 ± 0,41	3,62 ± 0,38	3,31 ± 0,37	3,77 ± 0,40	3,47 ± 0,36

Na análise do parâmetro *Roll* dos ligantes em interações do tipo intercalação com o B-DNA da mesma forma que para o Grupo A, não foi possível determinar uma tendência, mas alterações entre positivo e negativo durante todas as simulações, conforme apresentado na Figura 67. As alterações estruturais no complexo **4bI**, também evidentes na Figura 63 tornam-se claras na Figura 67.

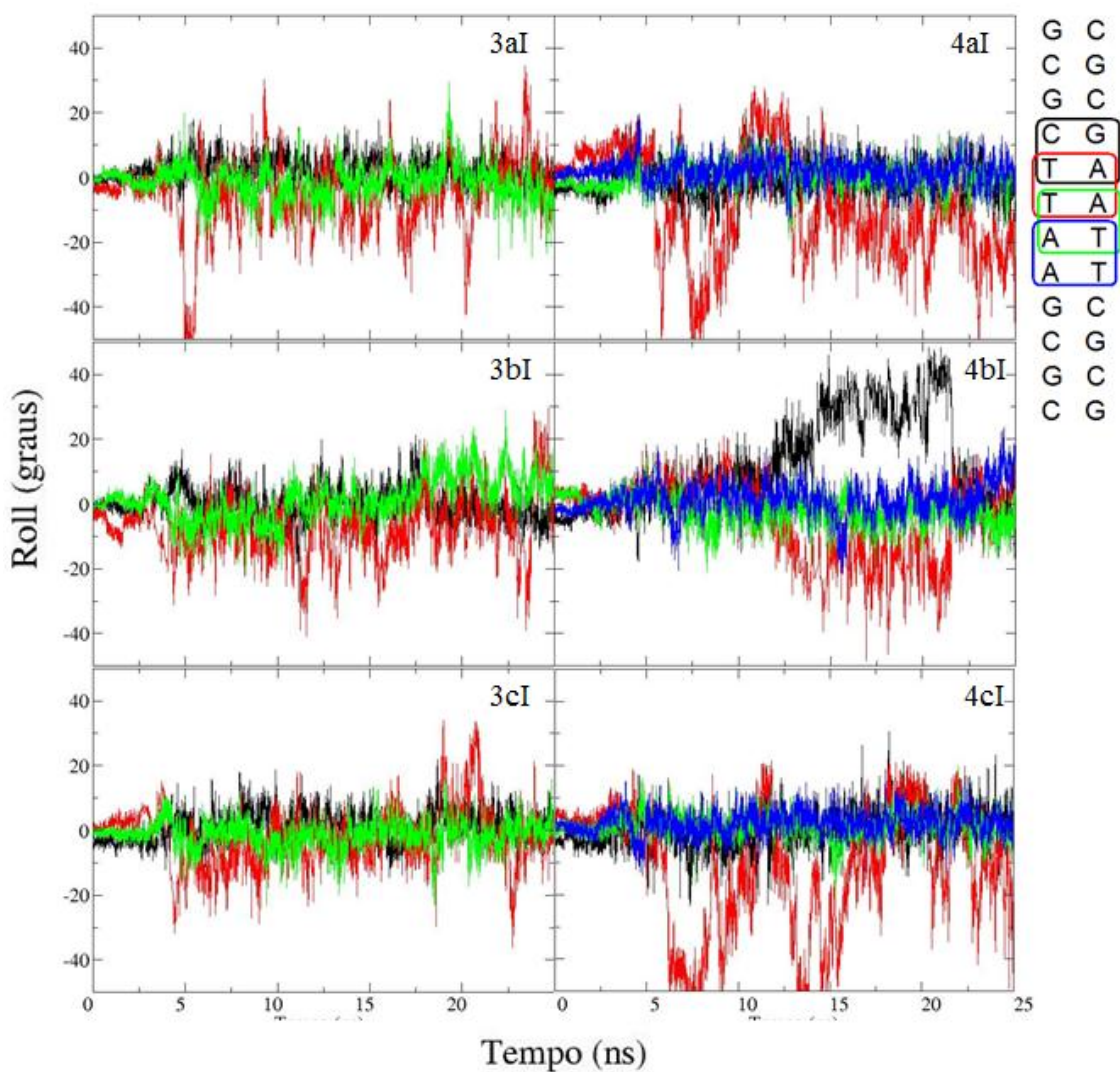


Figura 67: Parâmetro *Roll* das interações do tipo intercalação dos ligantes do Grupo A com o DNA.

Os precursores das bases de Tröger (**3a**, **3b** e **3c**) são os ligantes que formam os complexos mais estáveis, sendo os mesmos, os que induzem as menores alterações estruturais no DNA, quando analisado o parâmetro *Roll*. A única alteração mais relevante nos complexos com estes ligantes foi no conjunto de pares de bases AATT do DNA, sendo que no restante da estrutura não foi observado indução de alterações estruturais significativas.

Enquanto que o DNA sem ligante mantém um *Roll* médio de $1,9^\circ$ para o CPB AATT, os complexos **3a**, **3b** e **3c**, mantêm um valor médio de $-6,3^\circ$, $-7,1^\circ$ e $-2,9^\circ$, respectivamente, sendo todos os valores médios negativos. Esta inversão de sinal indica uma inversão do *Roll*, sendo um fechamento do conjunto de pares de bases para o lado do sulco menor e uma abertura para o lado do sulco maior, além dos desvios padrões superiores ao do DNA sem ligante indicarem uma maior oscilação do sistema durante a simulação (Tabela 13). Este mesmo comportamento foi observado para o grupo A.

Isto se deve ao posicionamento das bases nitrogenadas no DNA, que são expostas para o lado do sulco maior. Desta forma, esta classe de ligantes tende a estar mais exposto para o lado do sulco maior devido às interações com as bases nitrogenadas, resultando em uma maior abertura do *Roll* para este lado, conforme apresentado na Figura 68. Esta observação não quer dizer que os ligantes prefiram interações do tipo sulco maior, mas que ao intercalarem os mesmos melhor se acomodam estando mais expostos para o lado do sulco maior, onde se observa um *Roll* negativo.

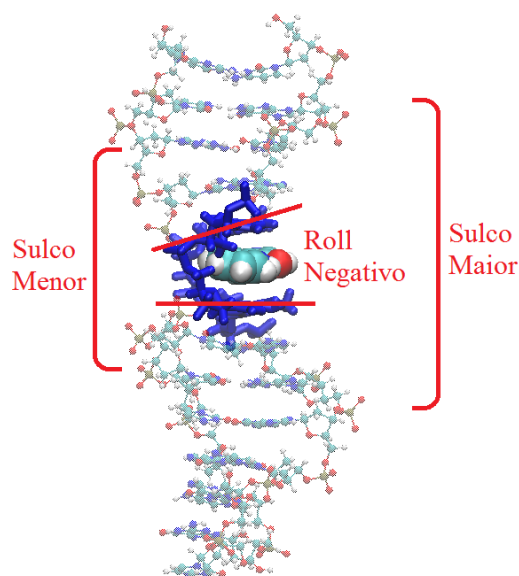


Figura 68: Representação esquemática do complexo **3aI**, destacando o gap no CPB AATT e as tarjas vermelhas indicando o resultado de *Roll* negativo.

No caso das bases de Tröger foi observada a indução de alterações estruturais bem significativas no DNA, quando comparado com seus respectivos precursores.

O complexo **4aI** após a rampa de aquecimento até os 9ns manteve uma média de $-18,9^\circ$ de *Roll*, mudando de sinal logo em seguida para $13,8^\circ$ no intervalo de tempo de 10 a 12,5ns, estabilizando em *Roll* negativo ($-17,3^\circ$) nos últimos 10ns de simulação.

Estas alterações estruturais se devem a melhor acomodação do ligante, conforme apresentado na Figura 69.

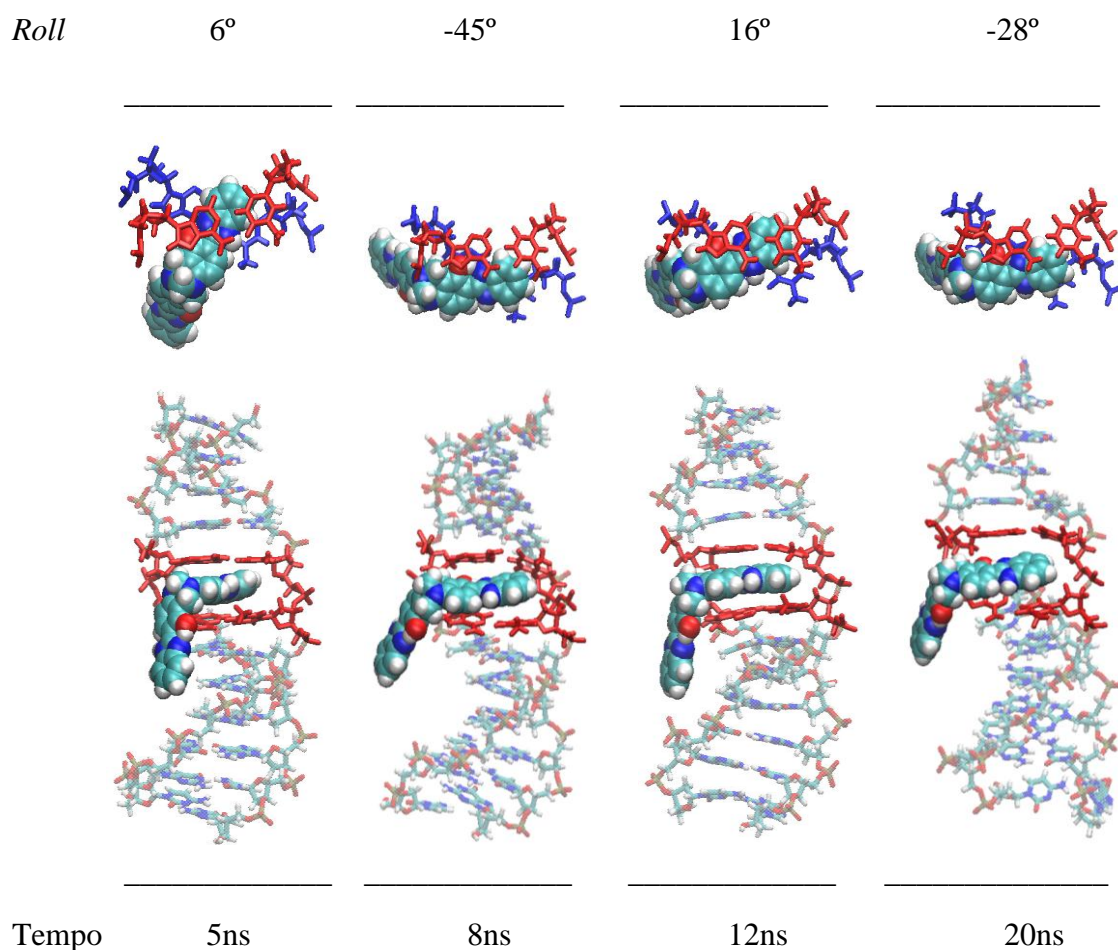


Figura 69: Representação da movimentação do ligante no gap do complexo **4aI**.

O que observa na Figura 69 é que o valor de *Roll* fica mais negativo quando o ligante esta interagindo de forma lateral e não completamente intercalado, sendo esta a forma de interação majoritária no complexo **4aI**. Quanto menos intercalado o ligante no oligonucleotídeo, mais negativa é a tendência do *Roll*, pois tende a uma maior abertura para o lado do sulco maior.

Para o complexo **4bI**, após a rampa de aquecimento até aproximadamente 12ns, o mesmo apresentava-se estável com uma média de 5,6° e 4,0° para os conjuntos de pares de bases GATC e AATT, respectivamente. Após os 12ns foi observada a abertura gradativa do *Roll* do conjunto de pares de bases AATT, sendo acompanhado pelo fechamento do GATC para o lado do sulco maior, chegando a uma média de 21,2 e -15,7°, voltando a estabilizar aos 3ns finais de simulação em 1,3° e 0,7°, respectivamente

conforme apresentado na Figura 67. Neste momento o ligante estava melhor se acomodando no *gap*, forçando a entrada, resultando nas respectivas alterações estruturais conforma apresentado na Figura 70.

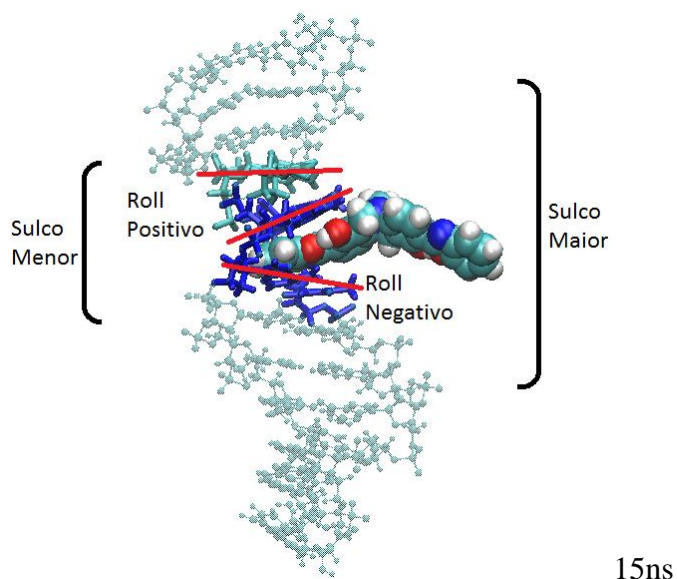


Figura 70: Representação esquemática do complexo **4bI** aos 15ns de simulação, resultando um *Roll* positivo para o CPB GATC e um negativo para o AATT.

O complexo **4cI** os valores de *Roll* se mantiveram muito próximos aos do DNA canônico, com exceção do conjunto de pares de bases AATT, conforme apresentado na Figura 67. As alterações entre *Roll* positivo e negativo se devem aos mesmos motivos do complexo **4aI**. Na Figura 71 pode-se verificar que quando o ligante está menos intercalado no oligonucleotídeo, o *Roll* tende a sinais mais negativos, devido a forçar uma maior abertura para o lado do sulco maior. Este comportamento é reproduzido para todas as BT em intercalações via sulco menor.

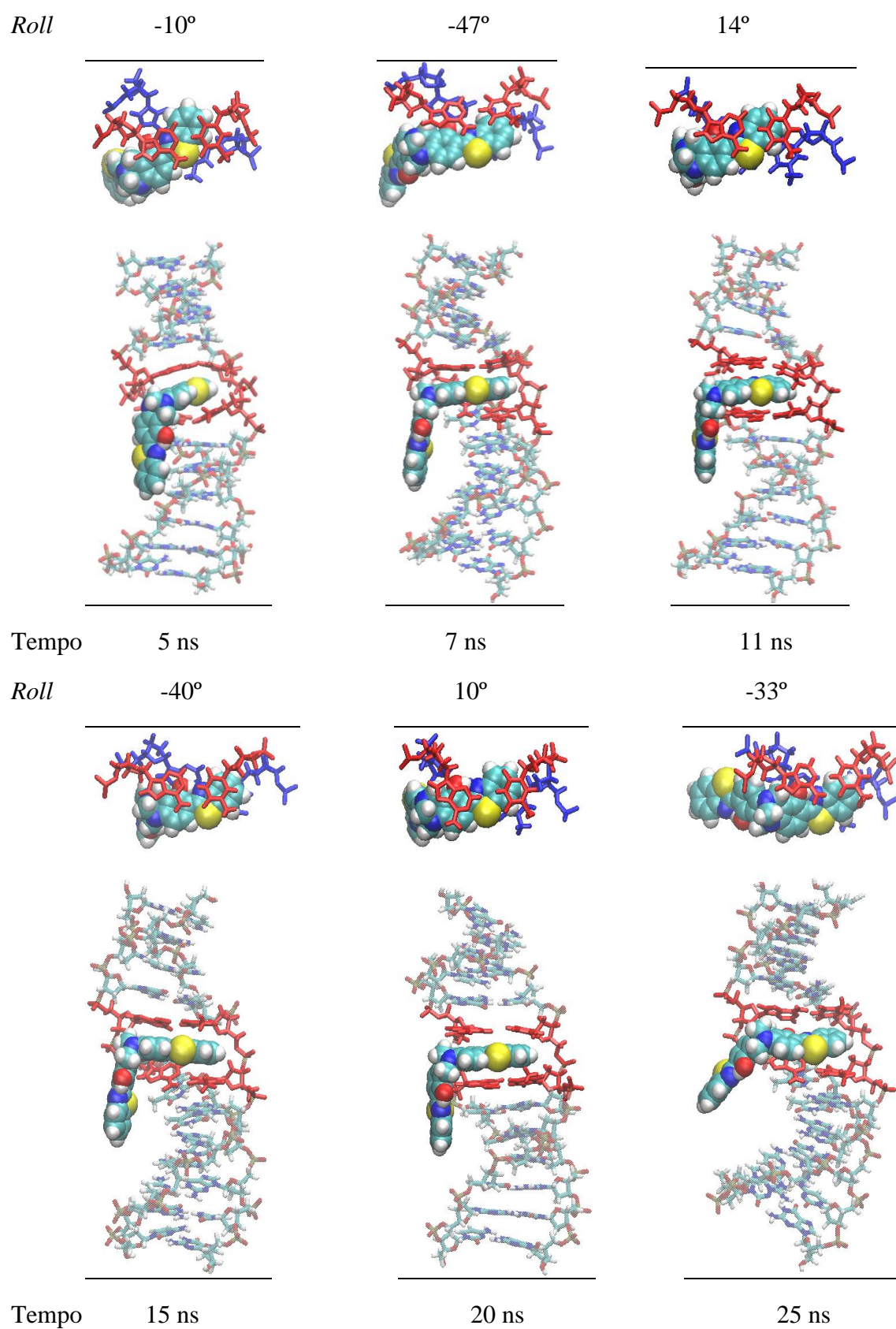


Figura 71: Representação da movimentação do ligante no gap do complexo **4cI**.

Na Tabela 8 estão apresentadas todas as médias de *Roll* após a estabilização do sistema com seus respectivos desvios padrões para os complexos do tipo intercalação.

Tabela 18: Resultados do parâmetro *Roll* para os conjuntos de pares de bases do DNA próximos ao ligante nas interações do tipo intercalação do grupo B.

CPB	GATC	AATT	ATAT	TTAA
B-DNA	$2,86 \pm 3,89$	$1,91 \pm 3,67$	$-0,58 \pm 3,31$	$2,51 \pm 4,13$
3aI	$2,30 \pm 4,39$	$-6,25 \pm 13,34$	$-1,76 \pm 5,72$	-
4aI	$-0,50 \pm 5,22$	$-13,76 \pm 15,31$	$0,74 \pm 4,13$	$1,83 \pm 4,04$
3bI	$-0,47 \pm 5,31$	$-7,12 \pm 9,77$	$1,67 \pm 7,13$	-
4bI	$12,83 \pm 12,84$	$-7,29 \pm 12,15$	$-3,02 \pm 4,46$	$1,60 \pm 5,62$
3cI	$1,65 \pm 4,76$	$-2,88 \pm 9,20$	$-1,63 \pm 4,65$	-
4cI	$0,40 \pm 6,24$	$-16,01 \pm 19,75$	$1,16 \pm 3,95$	$2,42 \pm 3,94$

Na Figura 72 estão apresentados os resultados de análises do parâmetro *Roll*, para as interações de partida do tipo sulco.

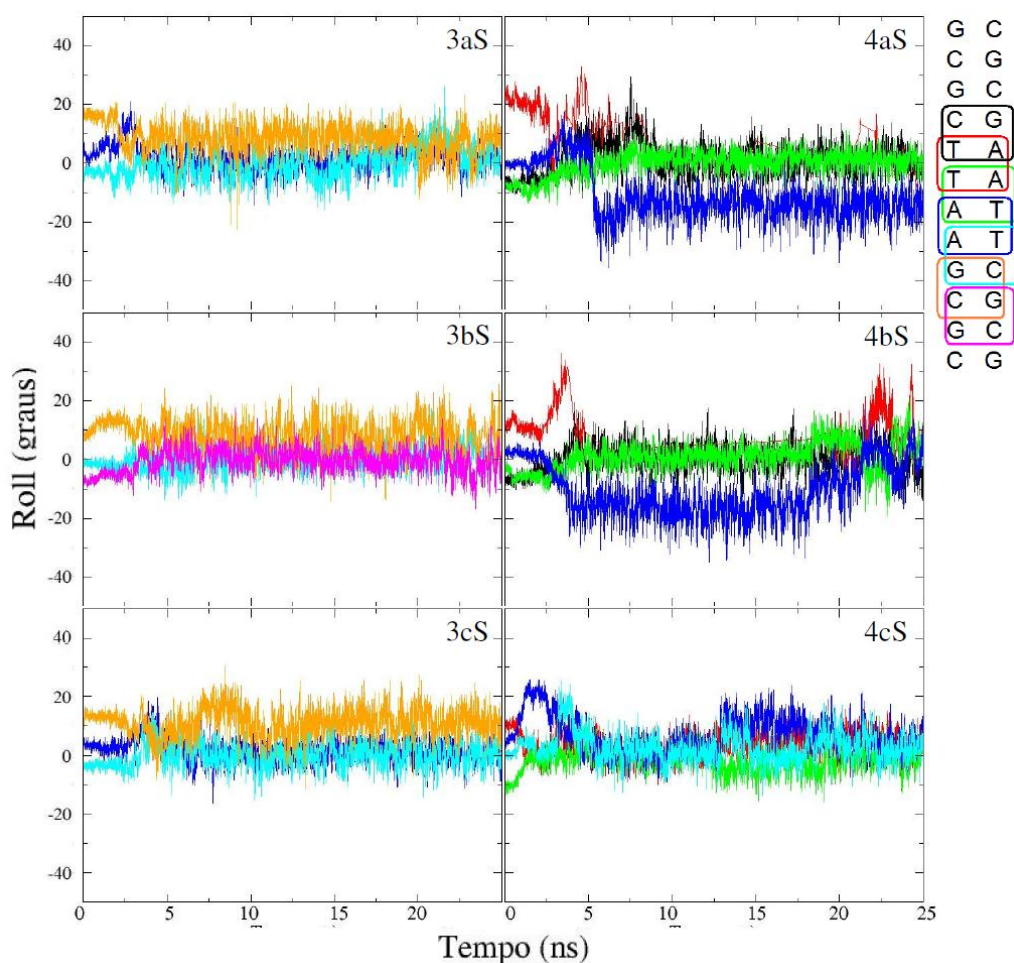


Figura 72: Parâmetro *Roll* das interações do tipo sulco dos ligantes do Grupo B com o DNA.

Na Tabela 19 estão apresentadas todas as médias do parâmetro *Roll* após a estabilização do sistema com seus respectivos desvios padrões para os complexos em interações de sulco e o DNA.

Tabela 19: Resultados do parâmetro *Roll* para os conjuntos de pares de bases do DNA próximos ao ligante nas interações do tipo sulco do grupo B.

CPB	GATC	AATT	ATAT	TTAA	TCGA	CGCG3	GCGC2
B-DNA	2,86 ± 3,89	1,91 ± 3,67	-0,58 ± 3,31	2,51 ± 4,13	1,74 ± 4,52	8,11 ± 5,04	-1,93 ± 4,88
3aS	-	-	-	0,96 ± 3,96	0,49 ± 5,38	7,88 ± 4,97	-
4aS	2,00 ± 5,19	9,48 ± 6,93	1,13 ± 3,02	-14,65 ± 5,35	-	-	-
3bS	-	-	-	-	0,86 ± 3,71	7,71 ± 5,81	-0,01 ± 3,88
4bS	1,08 ± 4,70	11,10 ± 8,41	2,22 ± 4,53	-12,15 ± 8,47	-	-	-
3cS	-	-	-	1,02 ± 3,45	0,16 ± 4,01	11,04 ± 4,84	-
4cS	-	3,37 ± 4,07	-1,63 ± 3,82	5,50 ± 5,32	2,06 ± 4,46	-	-

Na análise do parâmetro *Roll* dos complexos em interações de sulco, para os precursores das bases de Tröger (**3ac**), verifica-se que todos os resultados estão muito próximos aos do B-DNA canônico. Os três ligantes (**3ac**) apresentam um *Roll* positivo para o conjunto de pares de Bases CGCG3 de 7,9°, 7,7° e 11,0°, respectivamente. Apesar de estes valores parecerem um pouco altos, estão bem próximos ao encontrado para o DNA canônico (8,1°), desta forma verifica-se que estes ligantes não induzem a alterações estruturais significativas ao DNA em interações do tipo sulco.

As bases de Tröger, quando comparadas aos seus precursores induzem o DNA a alterações estruturais bem mais significativas. No caso das bases de Tröger **4ab**, conforme já apresentado na Figura 65, passaram de interações do tipo sulco para intercalação, abrindo o *gap* (AATT) até valores de *Rise* superiores a 7,5 nm (resultados acima deste valor, o software X3DNA não consegue interpretar). Esta mesma descontinuidade pode ser vista nas análises de *Roll* e *Twist* para os mesmos. Na análise do *Roll* do conjunto de pares de bases AATT para os complexos **4ab**, as médias dos poucos pontos ficaram em 9,5° e 11,1°, respectivamente, enquanto que o DNA canônico manteve uma média de 1,9°, todos a contar depois da rampa de aquecimento. Para resultados mais conclusivas do CPB AATT dos complexos **4aS** e **4bS** é necessário análises adicionais, pois há uma descontinuidade dos resultados, podendo induzir a conclusões errôneas.

No conjunto de pares de bases TTAA é observado para os mesmos complexos (**4ab**), um fechamento do *Roll* para o lado do sulco menor, o qual se deve a interações

do tipo sulco, pois estes ligantes podem fazer interações do tipo mista (sulco mais intercalação). Desta forma, a parte do ligante em ambos os complexos interagem com as bases nitrogenadas do DNA, induzindo as mesmas a um pequeno giro para melhor interação, conforme apresentado na *Figura 73*, resultando em um *Roll* negativo para este CPB.

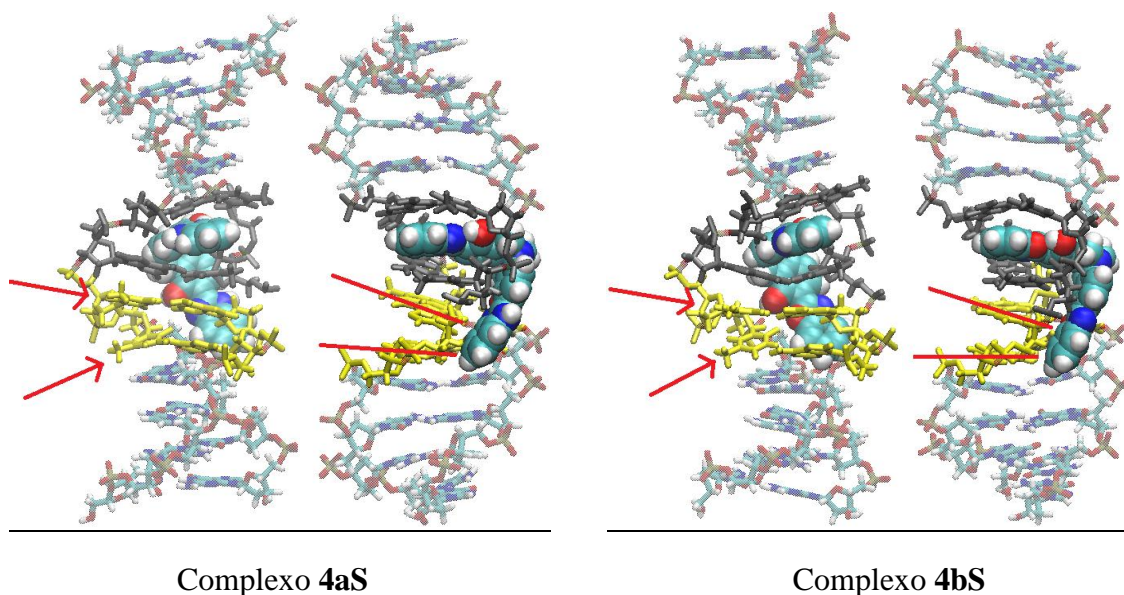


Figura 73: Representação esquemática da indução a um *Roll* negativo do CPB TTAA, pelos respectivos ligantes dos complexos **4aS** e **4bS**.

O ligante **4cS**, ao contrário das demais bases de Tröger, se mantem em interações do tipo sulco do início ao fim da simulação, conforme já discutido nas análises de evolução temporal e do parâmetro *Rise*. Este ligante em interações do tipo sulco, assim como os precursores das bases de Tröger (**3ac**), induz o DNA a alterações estruturais desprezíveis.

O ligante **4cS** induz o conjunto de pares de bases ATAT a uma abertura do *Roll* para o lado do sulco menor e um fechamento do conjunto de pares de bases TTAA para o mesmo lado após os 12,5ns de simulação. O primeiro conjuntos de pares de bases (ATAT) após a rampa de aquecimento até os 12,5ns mantém uma média de zero passando para $-2,6^\circ$ até os 25ns finais de simulação. O segundo conjuntos de pares de bases (TTAA) após a rampa de aquecimento até os 12,5ns mantém uma média de $2,2^\circ$, passando para $9,4^\circ$ até os 20ns e finalizando com uma média de $4,5^\circ$ no 5ns finais de simulação.

Os resultados do parâmetro *Twist* para os complexos com interações do tipo intercalação estão apresentados na Figura 74.

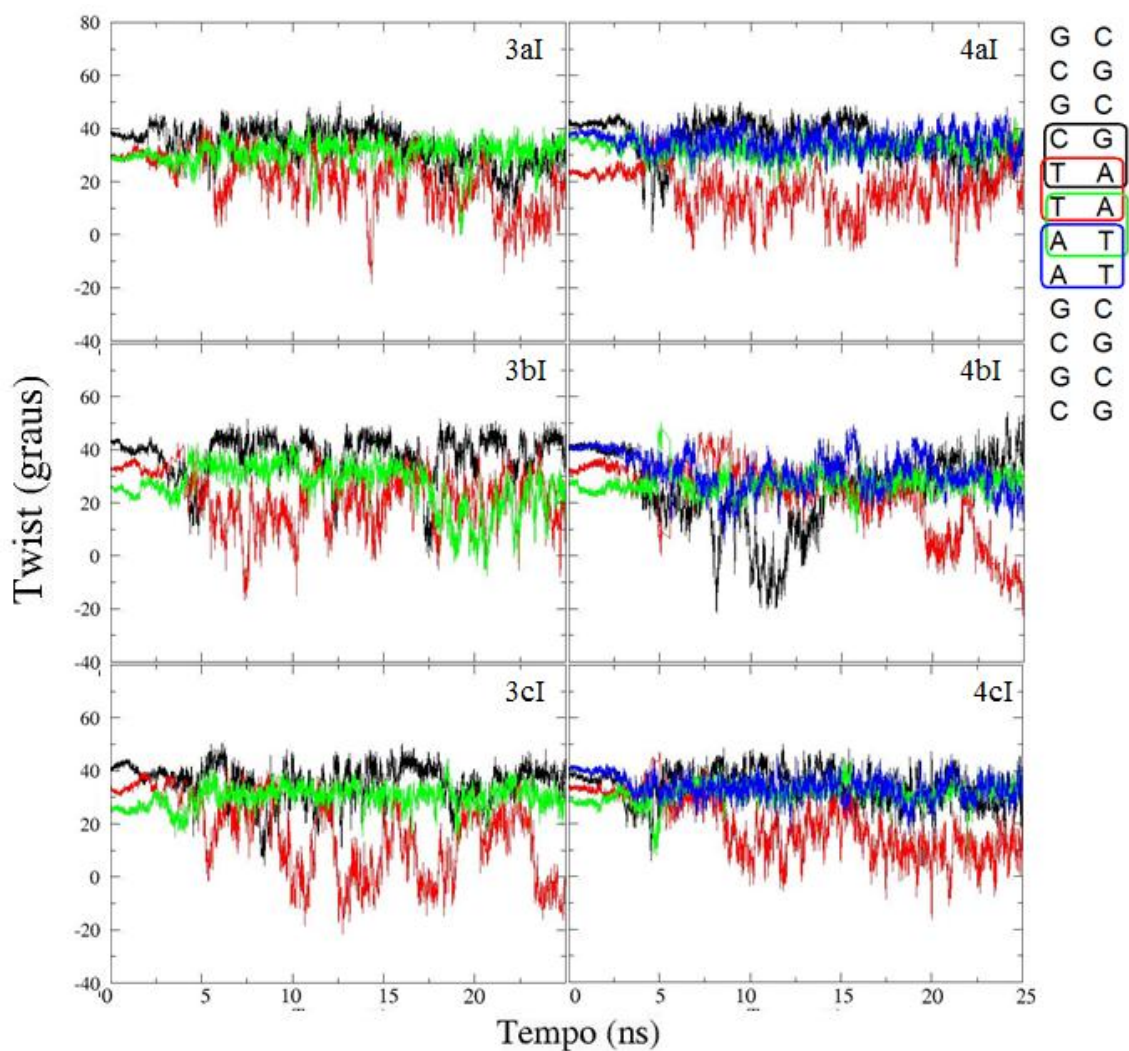


Figura 74: Parâmetro *Twist* das interações do tipo intercalação dos ligantes do Grupo B com o DNA.

Na Tabela 20 estão apresentadas todas as médias de *Twist* após a estabilização do sistema com seus respectivos desvios padrões para o DNA e os complexos do tipo intercalação, como também os resultados experimentais¹³² para o primeiro.

Tabela 20: Resultados do parâmetro *Twist* para os conjuntos de pares de bases do DNA próximos ao ligante nas interações do tipo intercalação do Grupo B.

CPB	GATC	AATT	ATAT	TTAA
Exp.	37,70 ± 1,70	37,50 ± 0,90	32,20 ± 2,10	36,00 ± 2,80
B-DNA	35,72 ± 6,36	35,03 ± 4,20	32,64 ± 2,35	34,46 ± 4,53
3aI	32,57 ± 7,03	18,98 ± 9,94	31,01 ± 5,15	-
4aI	35,43 ± 6,83	14,83 ± 8,38	32,42 ± 3,20	34,77 ± 4,54
3bI	38,57 ± 7,66	18,69 ± 9,54	26,31 ± 9,62	-
4bI	19,99 ± 14,79	19,16 ± 13,18	27,42 ± 3,87	29,48 ± 6,62
3cI	35,14 ± 7,31	11,42 ± 13,76	30,94 ± 3,75	-
4cI	34,03 ± 6,39	15,96 ± 9,56	32,32 ± 3,27	32,91 ± 4,21

Conforme já apresentado na discussão do parâmetro *Rise*, todos os ligantes intercalaram entre o conjunto de pares de bases AATT, local onde foi criado um *gap* artificial. Todos os ligantes se mantiveram intercalados do início ao fim da simulação neste conjunto de pares, onde estes resultados podem ser visualizados pelo desenrolamento do mesmo. Os resultados do parâmetro *Twist* ficaram entre 11,4° a 19,2°, sendo para o B-DNA canônico, 35,0°, resultado muito próximo ao experimental¹³⁸ (37,5°). A maior indução ao desenrolamento do CPB AATT foi para o complexo **3cI** e a menor foi para o **4bI**, não sendo evidenciado uma tendência lógica de acordo com a natureza do ligante, mas resultados randômicos.

Para complexo **3aI**, além do desenrolar do conjunto de pares de bases onde o ligante está intercalado, observa-se que o conjunto de pares de bases GATC também começa a desenrolar após os 18ns. O conjunto de pares de bases GATC do complexo **3aI** manteve uma média de 36°, após a rampa de aquecimento até os 18ns, passando para aproximadamente 26° nos 7ns finais de simulação, enquanto que o ATAT se mantém com uma média muito próximo ao DNA canônico. Na análise do complexo **3bI** observa-se que além do desenrolar do conjunto de pares de bases onde o ligante está intercalado, após os 13ns o conjunto de pares de bases ATAT também começa a desenrolar. O conjunto de pares de bases ATAT, manteve uma média de 31,4° após a rampa de aquecimento até os 18ns passando para 16,9° nos 7ns finais de simulação, enquanto o CPB AATT manteve uma média de 18,7° durante toda a simulação.

Para o complexo **3cI**, o conjunto de pares de bases AATT mantém uma média de -1,5°, nos momentos em que está desenrolado, e passa para 19° ao enrolar, o que acontece de forma brusca em três momentos distintos da simulação, entre 11-12, 15-16

e 19-23ns. Estas alterações no parâmetro *Twist* se deve a movimentação do ligante no *gap*, conforme apresentado na *Figura 75*. Os momentos de maior desenrolamento do CPB AATT são os quais o ligante está mais intercalado, conforme imagem A e os momentos em que o mesmo está mais enrolando são os quais o ligante está menos intercalado conforme imagem B. No geral, estas alterações estruturais são sutis, resultado provável da menor possibilidade de fazer ligações de hidrogênio, não sendo observadas outras alterações nas análises dos demais parâmetros.

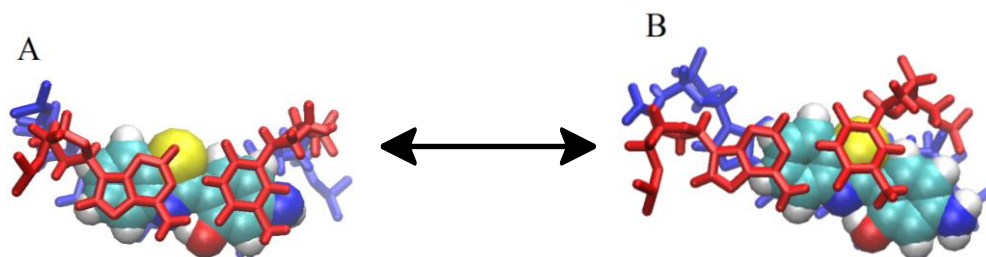


Figura 75: *Movimentação do ligante no gap do complexo 3cI. A: ligante mais intercalado, B: ligante menos intercalado.*

Na análise das bases de Tröger, o complexo **4aI** é o que tem o *gap* mais desenrolado, $14,8^\circ$, enquanto que para os demais complexos mantiveram valores de $19,2$ a $19,8^\circ$, além disto pode-se observar que o conjunto de pares de bases GATC desenrolada a partir dos 18ns, passando de um valor médio de 38° para $30,6^\circ$.

Para o complexo **4bI** observa-se o conjunto de pares de bases GATC desenrola aos 10ns, voltando a enrolar aos 12ns, chegando a uma média de -7° e voltando a enrolar e estabilizar até o final da simulação em 27° . Outra observação interessante é que o conjunto de pares de bases onde o ligante está intercalado vai desenrolando aos poucos iniciando em $31,8^\circ$ até os 10ns iniciais de simulação e terminando em 2° nos últimos 5ns. Estas alterações estruturais iniciam no momento em que o ligante começa a melhor se acomodar no *gap*, conforme já discutido na análise de parâmetros *Rise* e *Roll*.

O complexo **4cI** apresenta apenas o desenrolamento do CPB onde o ligante está intercalado, mantendo uma média de 16° após a rampa de aquecimento.

Os resultados do parâmetro *Twist* para os complexos com interações do tipo sulco estão apresentados na *Figura 76* e *Tabela 21*.

Os complexos **4aS** e **4bS** são os que apresentaram as maiores indução a alterações estruturais do parâmetro *Twist* do DNA, sendo os mesmos os únicos que passaram de interações do tipo sulco para intercalação. Na análise dos complexos, onde os ligantes se mantiveram do início ao fim da simulação em interações de sulco, a

alteração estrutural mais significativa foi para o conjunto de pares de bases TCGA do complexo **3cS**, que se manteve em 38° até 11ns, passando para 26,8° até o fim da simulação. Na análise da distância do ligante em relação aos pares de bases do DNA, pode-se verificar que este conjunto de pares de bases TCGA é exatamente, o qual, o ligante estabiliza sua interação após os 11ns de simulação, resultando na discutida alteração estrutural.

Os demais conjuntos de pares de bases se mantiveram com médias muito próximas as do DNA canônico (Tabela 21).

Para o complexo **4aS**, verifica-se após a rampa de aquecimento grandes alterações estruturais, momento em que o ligante começou a abrir o *gap* e se acomodar. O conjunto de pares de bases GATC que mantinha uma média de 33° durante a rampa de aquecimento, desenrolou até um máximo de -15,2°, no intervalo de tempo entre 6 e 7ns, voltando a enrolar após os 9ns mantendo uma média de 37° até o final da simulação. Para os conjuntos de pares de bases AATT e ATAT, verifica-se o desenrolamento dos mesmos após a rampa de aquecimento, passando de 32° e 26° para 18,4° e 16,3°, respectivamente. O conjunto de pares de bases TTAA acompanha as alterações estruturais do GATC, com movimento opostos, nos mesmos intervalos de tempo. Este mesmo inicia com uma média de 40° durante a rampa de aquecimento, enrolando no intervalo de tempo de 6 a 7ns (48,2°), voltando a desenrolar aos 9ns mantendo uma média de 43,7° até o final da simulação.

Para o complexo **4bS** é verificado o mesmo comportamento do 4aS, mas com menor intensidade. Durante a rampa de aquecimento, logo após os 4ns é verificado o desenrolamento do conjunto de par de bases GATC, AATT, ATAT e o enrolamento do TTAA. O primeiro desenrola chegando a uma média de 18,5°, voltando a enrolar em seguida e mantendo uma média de 38°. O segundo e o terceiro desenrolam e mantêm uma média de 22,1° e 17,8°, respectivamente. O quarto enrola chegando a 46,3° e desenrola estabilizando em 41,8°. Todas estas alterações foram durante a rampa de aquecimento, no momento que o ligante começou a intercalar no *gap*. Entre os 21e 23ns volta a ter alterações estruturais significativas no parâmetro *Twist* para o complexo **4bS**. Os conjuntos de pares de bases GATC e TTAA desenrolam atingindo uma média de 22,5° e 32,4°, voltando a enrolar em seguida, enquanto que os AATT e TATA enrolam até chegar um máximo de 27,6° e 25,4°, voltando a desenrolar em seguida.

As alterações estruturais dos complexos **4aS** e **4bS** se devem a intercalação dos respectivos ligantes no *gap*, seguido da acomodação dos mesmos, conforme resultados apresentados na análise de evolução temporal.

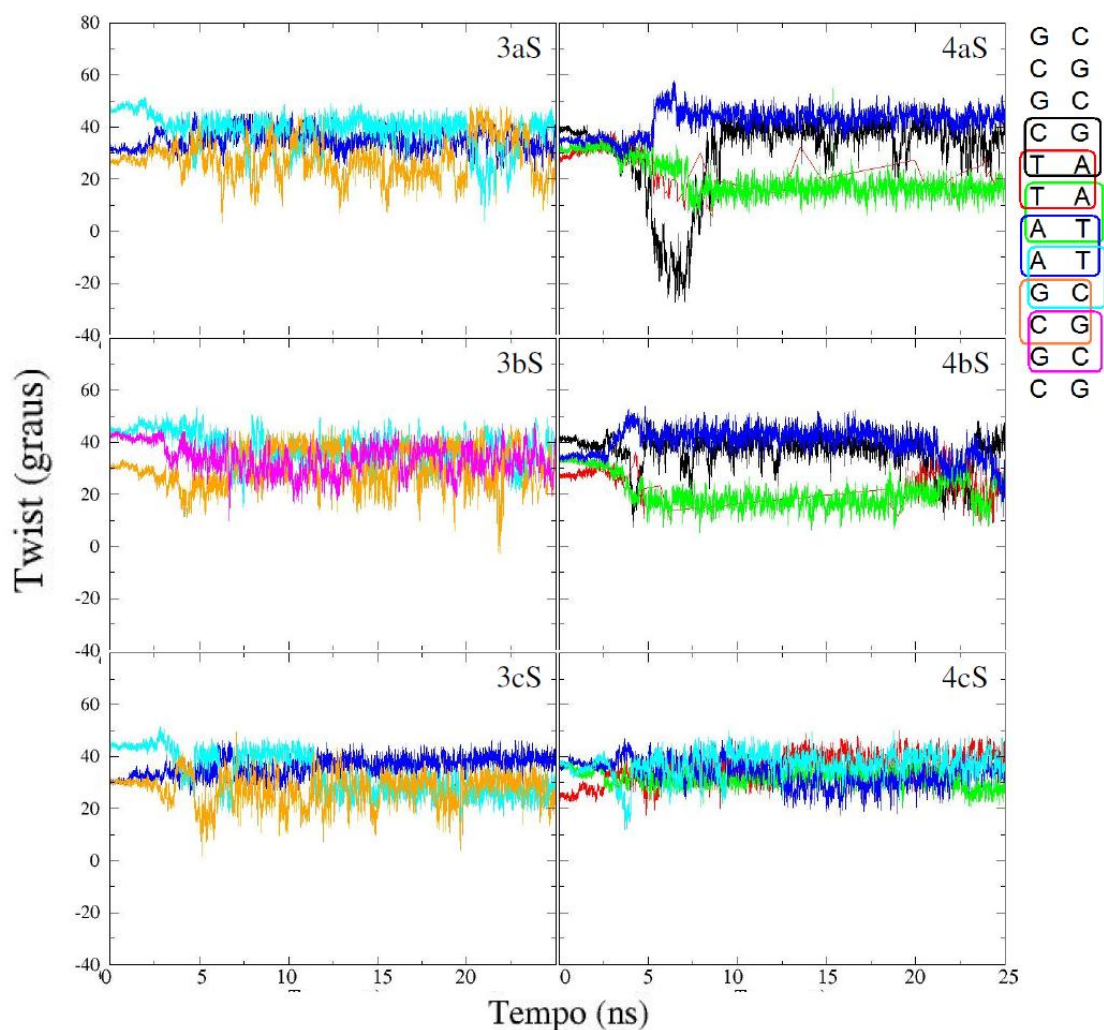


Figura 76: Parâmetro Twist das interações do tipo sulco dos ligantes do Grupo A com o DNA.

Na Tabela 8 estão apresentadas todas as médias de RMSD após a estabilização do sistema com seus respectivos desvios padrões.

Tabela 21: Resultados do parâmetro *Twist* para os conjuntos de pares de bases do DNA próximos ao ligante nas interações do tipo sulco do Grupo B.

CPB	GATC	AATT	ATAT	TTAA	TCGA	CGCG3	GCGC2
Exp. ¹³²	37,70 ± 1,70	37,50 ± 0,90	32,20 ± 2,10	36,00 ± 2,80	41,4 ± 2,1	32,3 ± 1,3	44,7 ± 5,4
B-DNA	35,72 ± 6,36	35,03 ± 4,20	32,64 ± 2,35	34,46 ± 4,53	32,32 ± 7,35	29,44 ± 8,81	36,48 ± 5,33
3aS	-	-	-	35,24 ± 3,81	37,39 ± 6,62	27,29 ± 8,10	-
4aS	29,96 ± 16,77	19,30 ± 5,92	17,08 ± 4,16	44,05 ± 3,39	-	-	-
3bS	-	-	-	-	35,29 ± 5,30	31,25 ± 7,68	32,37 ± 5,25
4bS	36,44 ± 6,28	24,24 ± 6,01	18,59 ± 4,30	40,30 ± 5,67	-	-	-
3cS	-	-	-	37,05 ± 3,40	30,71 ± 7,07	26,77 ± 6,16	-
4cS	-	37,03 ± 4,50	31,26 ± 2,96	32,63 ± 4,68	37,60 ± 4,41	-	-

6 CONCLUSÕES

Foram realizados estudos por *docking* e dinâmica molecular de doze compostos fluorescentes com DNA, sendo os mesmos divididos em dois grupos. O primeiro grupo é composto por 2-(2'-hidroxifenil)benzoxazol e 2-(4'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol e o segundo grupo é composto por outra família de 2-(4'-amino-2'-hidroxifenil)benzazol e as bases de Tröger derivadas deste compostos.

Na análise por *docking* molecular para o grupo A, os ligantes com grupamento amino apresentaram interações mais favoráveis, quando comparados com seus análogos, sendo a única exceção para os ligantes **1a** e **1b**, pois ambos apresentaram a mesma energia média de interação. A interação principal de ligantes deste grupo com o DNA foi do tipo sulco, sendo a única exceção para o ligante **2b**, que apresentou uma preferência por interações do tipo intercalação.

Na análise dos ligantes do grupo B, as bases de Tröger (**4ac**) apresentaram energias de interação mais favoráveis que seus precursores (**3ac**). Para todos os ligantes com exceção do **3b**, a interação principal foi do tipo sulco.

Na análise da estabilidade conformacional do grupo A, os ligantes com grupamento amino apresentaram as maiores barreiras rotacionais no processo de interconversão de *cis* para *trans* e a menor influência do solvente, quando comparados com seus respectivos precursores.

Na análise da estabilidade conformacional do grupo B, as bases de Tröger apresentaram as menores barreiras rotacionais no processo de interconversão de *cis* para *trans* e a maior influência do solvente, quando comparado com seus respectivos precursores. Os derivados benzazólicos foram os ligantes que apresentaram os maiores valores de barreira rotacional.

Na Dinâmica Molecular para o grupo A, a análise de RMSD apresentou uma maior estabilidade estrutural para as interações do tipo sulco do que para as intercalações, tendo para a segunda, flutuações superiores ao do oligonucleotídeo sem ligante.

A migração do ligante ao longo do sulco foi caracterizada pela existência de barreiras energéticas entre um par de bases e outro. Todas as simulações para o grupo A apresentaram boa estabilidade, não sendo observado em nenhum dos casos, o abandono do ligante ou alteração na forma de interação.

Na análise da dinâmica molecular para o grupo B, os ligantes 2-(4'-amino-2'-hidroxifenil)benzazol (precursores das bases de Tröger), apresentaram uma menor indução a alterações estruturais do DNA, quando comparados com as bases de Tröger.

O ligante 2,8-bis-benzoxazol-2-il-6H,12H-5,11-metanodibenzo[b,f][1,5] diazocina-1,7-diol (**4c**) na interação com DNA via sulco menor foi a única base de Tröger que não passou para interação mista (sulco menor mais intercalação). Este ligante interagiu com o formato de “V” para fora do DNA, apresentando as menores alterações estruturas no mesmo, entre as bases de Tröger. As demais bases de Tröger, na interação via sulco menor passaram para interação mista, apresentando uma maior abertura no *gap* (AA\ /TT) do DNA que as demais interações, e uma indução ao fechamento do CPB ATAT.

Na análise geral dos resultados, o ligante **2a** apresentou interações mais favoráveis com o DNA para o grupo A e o ligante **4a** para o grupo B.

A combinação das técnicas de docagem e simulação de dinâmica molecular se mostraram promissoras para a determinação de atividade biológica de ligantes com DNA.

De modo geral, os resultados indicam que todos os ligantes estudados podem interagir com o sulco menor do oligonucleotídeo, mas também são capazes de interagir como um intercalador, tendo uma preferência pelo segundo as BT com anéis benzoxazólicos ou benzimidazólicos.

Devido aos fortes interações, e também das suas propriedades fotofísicas únicas, esta classe de moléculas podem atuar como potenciais sondas biológicas para DNA.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Becker, M. R.; Stefani, V.; Forte, M. M. C.; *Reactive & Functional Polymers* **2006**, *66*, 1664.
- 2 Rodembusch, F. S.; Campo, L. F.; Stefani, V.; Samios, D.; Silveira, N. P. *Polymer* **2005**, *46*, 7185.
- 3 Kober, U. A.; Campo, L. F.; Costa, T. M. H.; Stefani, V.; Ramminger, G. O.; Gallas, M. R. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2007**, *186*, 24.
- 4 Hoffmann, H. S.; Stefani, V.; Benvenuti, E. V.; Costa, T. M. H.; Gallas, M. R. *Materials Chemistry and Physics*, **2011**, *126*, 97.
- 5 Kuplich, M. D.; Grasel, F. S.; Campo, L. F.; Rodembusch, F. S.; Stefani, V. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **2012**, *23* (1), 25.
- 6 Goswami, S.; Maitya, S.; Das, A. K.; Maitya, A. C.; Mandal, T. K.; Samanta, S. *Tetrahedron Letters* **2013**, *54*, 5232.
- 7 Anbuselvan, C.; Jayabharathi, J.; Thanikachalam, V.; Tamilselvi, G. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2012**, *97*, 125.
- 8 Koci, J.; Klimesova, V.; Waisser, K.; Kaustova, J.; Dahsec, H.; Möllmann, U. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2002**, *12*, 3275.
- 9 Zablotskaya, A.; Segala, I.; Geronikaki, A.; Eremkina, T.; Belyakov, S.; Petrova, M.; Shestakova, I.; Zvejniece, L.; Nikolajevac, V. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, (no prelo).
- 10 M. K. Gautam, S. N. Kant, S. Priyanka and K. K. Jha, *International Journal of ChemTech Research*, **2012**, *4*, (2) 640.
- 11 Elzahabi, H. S. A. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *46*, 4025.
- 12 Havrylyuka, D.; Mosula, L.; Zimenkovsky, B.; Vasylenkoc, O.; Gzella, A.; Lesyk, R. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *45*, 5012.
- 13 Yildiz-Oren, I.; Yalcin, I.; Aki-Sener, E.; Ucarturk, N. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *39*, 291.
- 14 Padalkar, V. S.; Gupta, V. D.; Phatangare, K. R.; Patil, V. S.; Umape, P. G.; Sekar, N. *Journal of Saudi Chemical Society* **2013** (no prelo).

-
- 15 Hussein, B. H. M.; Azaba, H. A.; El-Azabb, M. F.; El-Falouji, A. I. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *51*, 99.
- 16 Abella, C.A.M.; Rodembusch, F.S.; Stefani, V. *Tetrahedron Letters*, **2004**, *45*, 5601.
- 17 Oliveira, T. E. *Dissertação de Mestrado*, UFRGS, Programa de Pós-Graduação em Química, UFRGS, Porto Alegre - RS, **2012**.
- 18 Ricci, C. G.; Netz, P. A. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2012**, *23* (7), 1334.
- 19 Butler, J. M. *Forensic DNA Typing - Biology, Technology, and Genetic of STR Markers*; 2^a ed., Elsevier Academic Press, Burlington, 2005.
- 20 Watson, J. D.; Crick, F. H. C.; *Nature* **1953**, *171*, 737.
- 21 Harvey, R. A.; Ferrier, D. R.; *Bioquímica Ilustrada*; 5^a ed., Artmed, Porto Alegre, 2012.
- 22 Voet, D.; Voet, J.G.; Pratt, C.W. *Fundamentos de Bioquímica*; 2^a ed., Artmed, Porto Alegre, 2002.
- 23 Vijg, J.; *Aging of the Genome – The Dual Role of DNA in Life and Death*; Oxford University Press, Oxford, 2007.
- 24 Wing, R.; Drew, H.; Takano, T.; Broka, C.; Tanka, K.; Dickerson, R. E.; *Nature* **1980**, *287*, 755.
- 25 El Hassan, M.A.; Calladine, C.R. *Journal of Molecular Biology* **1998**, *282*, 331.
- 26 Lu, X.-J.; Olson, W.-K. *Nucleic Acids Research*, **2003**, *31*, 5108.
- 27 Ricci, C. G. *Dissertação de Mestrado*, Programa de Pós-Graduação em Química, UFRGS, Porto Alegre - RS, **2010**.
- 28 Ponnuswamy, P. K.; Gromiha, M. M.; *Journal of Theoretical Biology* **1994**, *169*, 419.
- 29 Chalikian, T. V.; Völker, J.; Plum, G. E.; Breslauer, K. J.; *Proceedings of National Academy of Science of the United State of America* **1999**, *96*, 7853.
- 30 Dickerson *et al.* *Nucleic Acids Research*, **1989**, *17*, 1797.
- 31 Benecke, M. *Naturwissenschaften* **1997**, *84*, 181.
- 32 Neto, B. A. D.; Lapis, A. A. M.; Mancilha, F. S.; Batista Jr., E. L.; Netz, P. A.; Rominger, F.; Basso, L. A.; Santos, D. S.; Dupont, J. *Molecular Biosystems* **2010**, *6*, 967.

-
- 33 Collins, A.; Morton, N. E.; *Proceedings of National Academy of Science of the United State of America* **1994**, *91*, 6007.
- 34 Chemello, E. *Química Virtual* **2007**, *1*.
- 35 https://www.ncjrs.gov/pdffiles1/nij/214781_1.pdf (acessado em 28.04.2012).
- 36 <https://www.ncjrs.gov/pdffiles1/nij/214781.pdf> (acessado em 28.04.2012).
- 37 <http://www.newscientist.com/article/dn4908> (acessado em 28.04.2012).
- 38 Campo, L. F. *Dissertação de Mestrado*, UFRGS, Programa de Pós-Graduação em Química, UFRGS, Porto Alegre - RS, **1998**.
- 39 Acuña, A. U.; Costela, A.; Muños, J. M. *Journal of Physical Chemistry* **1986**, *90*, 2807.
- 40 Acuña, A. U.; Amat, F.; Catalán, J.; Costela, A.; Figueira, L. M.; Muños, J. M. *Cheical Physics Letters* **1986**, *132*, 567.
- 41 Costela, A.; Amat, F.; Catalán, J.; Douhal, A.; Figuera, J. M.; Muñoz, J. M.; Acuña, A. U. *Optics Communication* **1987**, *64*, 457.
- 42 Woolfe, G. J.; Melzig, M.; Schneider, S.; Dorr, F. *Chemical Physics* **1983**, *77*, 127.
- 43 Skoog, D. A. *Princípios de Análise Instrumental*, 5ª ed. Bookman, Porto Alegre, **2003**.
- 44 Jäeger, A. *Dissertação de Mestrado*, UFRGS, Programa de Pós-Graduação em Química, UFRGS, Porto Alegre - RS, **2005**.
- 45 Gore, M. G. *Spectrophotometry & Spectrofluorimetry – Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, **2000**.
- 46 Ireland, J.F.; Wyatt, P.A.H. *Advances in Physical Organic Chemistry* **1976**, *12*, 131.
- 47 Täuber, U. W. *Tese de Doutorado*, Instituto de Física, UFF, Niterói – RJ, **2006**.
- 48 Holler, M.G.; Campo, L.P.; Brandelli, A.; Stefani, V. *Journal Photochemical Photobiology A: Chemistry* **2002**, *149*, 217.
- 49 Novais, C.M.; Pires-Alves, M; Silva, F.F. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* **2004**, *33*, 10.
- 50 Krasovitskii, B. M.; Bolotin, B. M. *Organic Luminescent Materials*. VCH: Weinheim, **1988**, 88.

-
- 51 Rodembusch, F. S. *Tese de Doutorado*, Programa de Pós-Graduação em Química, UFRGS, Porto Alegre - RS, **2005**.
- 52 Nagaoka, S.; Itoh, A.; Mukai, K. *The Journal of Physical Chemistry* **1993**, *97*, 11385.
- 53 Das, K.; Sarkar, N.; Gosh, A.K.; Majumdar, D.; Nath, D.N.; Bhattacharyya, K. *The Journal of Physical Chemistry* **1994**, *98*, 9126.
- 54 Grando, S. R.; Santos, F. S.; Gallas, M. R.; Costa, T. M. H.; Benvenuti, E. V.; Rodembusch, F. S. *J. of Sol-Gel Science and Technology* **2012** *63*, (2) 235.
- 55 Dogra, S.K.; Balamurali, M.M. *Journal Photochemical Photobiology A: Chemistry* **2002**, *154*, 81.
- 56 LeGourriérec, D.; Kharlanov, V.A.; Brown, R.G.; Rettig, W. *Journal Photochemical Photobiology A: Chemistry* **2000**, *130*, 101.
- 57 Klymchenko, A.S.; Pivovarenko, V.G.; Demchenko, A.P. *Journal of Physical Chemical A* **2003**, *107*, 4211.
- 58 Santra, S.; Krishnamoorthy, G.; Dogra, S.K. *Chemical Physics Letters* **1999**, *311*, 55.
- 59 Jayabharathi J.; Thanikachalam, V.; Kalaiarasi, V.; Jayamoorthy, K. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2014**, *120*, 389.
- 60 Forés, M.; Duran, M.; Solà, M.; Orozco, M.; Luque, F.J. *Journal of Physical Chemical A* **1999**, *103*, 4525.
- 61 Santra, S.; Dogra, S.K. *Chemical Physics* **1998**, *226*, 285.
- 62 Purkayastha, P.; Chattopadhyay, N. *International Journal of Molecular Science* **2003**, *4*, 335.
- 63 Purkayastha, P.; Chattopadhyay, N. *Chemical Physics* **2000**, *2*, 203.
- 64 Forés, M.; Duran, M.; Solà, M.; Adamowicz, L. *Journal of Physical Chemical A* **1999**, *103*, 4413.
- 65 Padalkar, V.; Ramasami, P.; Sekar, N. *Procedia Computer Science* **2013**, *18*, 797.
- 66 Roohi, H.; Hejazi, F.; Mohtamedifar, N.; Jahantab, M. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2014**, *118*, 228.
- 67 Rodembusch, F. S.; Leusin, F. P.; Campo, L. F.; Stefani, V. *Journal of Luminescence* **2007**, *126*, 728.

-
- 68 Roberts, E.L.; Dey, J.; Warner, I.M. *Journal of Physical Chemistry A* **1997**, *101*, 5296.
- 69 Klymchenko, A.; Shvadchak, V. V.; Yushchenko, D. A.; Jain, N.; Mély, Y. *Journal of Physical Chemistry A* **2008**, *112*, 12050.
- 70 Dupradeau, F.; Case, D. A.; Yu, C.; Jimenez,R.; Romesberg, F. E. *Journal of American Chemical Society* **2005**, *127*, 15612.
- 71 Ogawa, A. K.; Abou-Zied, O. K.; Tsui, V.; Jimenez, R.; Case, D. A.; Romesberg, F. E. *Journal of American Chemical Society* **2000**, *122*, 9917.
- 72 Tröger, J. *Journal für Praktische Chemie* **1887**, *36*, 225.
- 73 Dolenský, B.; Elguero, J.; Král, V.; Prado, C.; Valík, M. *Advances in Heterocyclic Chemistry*, **2007**, *93*, 1.
- 74 Rúnarsson, Ö. V.; Artacho, J.; Wärnmark, K. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, 7015.
- 75 Spielman, M. A. *Journal of American Chemical Society*, **1935**, *57*, 583.
- 76 Wagner, E.; *Journal of American Chemical Society* **1935**, *57*, 1296.
- 77 Abella, C. A. M.; Benassi, M.; Santos, L. S.; Eberlin, M. N.; Coelho, F. *The Journal of Organic Chemistry* **2007**, *72*, 4048.
- 78 Wan, Y.; Yuan, R.; Zhang, W.-C.; Shi, Y.-h.; Lin, W.; Yin, W.; Bo, R.-c.; Shi, J.-j.; Wu, H. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 3405.
- 79 Valik, M.; Strongin, R.M.; Král, V. *Supramolecular Chemistry*, **2005**, *17*, 347.
- 80 Larson, S. B.; Wilcox, C. S. *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications*. **1986**, *42*, 224.
- 81 Wilen, S. H.; Qi, J. Z.; Williard, P. G. *The Journal of Organic Chemistry* **1991**, *56*, 485.
- 82 Hannon, M. J. *Chemical Society Review*, **2007**, *36*, 280.
- 83 Hurley, L. H. *Nature Reviews Cancer*, **2002**, *2*, 188.
- 84 Yashima, E.; Akashi, M.; Miyauchi, N. *Chemistry Letters*, **1991**, 1017.
- 85 Tatibouët, A.; Demeunynck, M.; Andraud, C.; Collet, A.; Lhomme, J. *Chemical Communications*, **1999**, 161.

-
- 86 Bailly, C.; Laine, W.; Demeunynck, M.; Lhomme, J. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2000**, *273*, 681.
- 87 Baldeyrou, B.; Tardy, C.; Bailly, C.; Colson, P.; Houssier, C.; Charmantray, F.; Demeunynck, M. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2002**, *37*, 325.
- 88 Goldberg, Y.; Alper, H.; *Tetrahedron Letters*, **1955**, *36*, 369.
- 89 Harmata, M.; Kahraman, M.; *Tetrahedron Asymmetry*, **2000**, *11*, 2875.
- 90 Johnson, R. A.; Gorman, R. R.; Wnuk, R. J.; Crittenden, N. J.; Aiken, J. W.; *Journal of Medicinal Chemistry*, **1993**, *36*, 3202.
- 91 <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
- 92 Huang, S.; Zou, X, *International Journal of Molecular Science* **2010**, *11*, 3016.
- 93 Krovat, E. M.; Steindl, T.; Langer, T. *Corrent Computer-Aided Drug Design*, **2005**, *1*, 93.
- 94 Kitchen, D.B.; Decornez, H.; Furr, J.R.; Bajorath, J. *Nature Reviews Drug Discovery*, **2004**, *3*, 935.
- 95 van Gunsteren, W.F; Bakowies, D.; Baron, R.; Chandrasekhar, I.; Christen, M.; Daura, X.; Gee, P.; Geerke, D.P.; Glättli, A.; Hünenberger, P.H.; Kastenholtz, M.A.; Oostenbrink, C.; Schenk, M.; Trzesniak, D.; van der Vegt, N.F.A.; Yu, H.B. *Angewandte Chemie International Edition*, **2006**, *45*, 4064.
- 96 Dixon, J. S.; Oshiro, C. M. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **1995**, *9*, 113.
- 97 Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.;Belew, R. K.; Olson, A. J *Journal of Computational Chemistry* **1998**, *19*, 1639.
- 98 Brooijmans, N.; Kuntz, I. D. *Annual Review of Biophysical and Biomolecular Structural* **2003**, *32*, 335.
- 99 Ferrara, P.; Gohlke, H.; Price, D. J.; Brooks, C. L.; Klebe, G. *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *47*, 3032.
- 100 Jain, A. N. *Current Protein and Peptide Science* **2006**, *7*, 407.
- 101 Zoete, V.; Grosdidier, A.; Michielin, O. *Journal of Cellular and Molecular Medicinal* **2009**, *13* (2), 238.

-
- 102 Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Taylor, R. D. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **2003**, 52, 609.
- 103 Holt, P.A.; Chaires, J. B.; Trent, J. O. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **2008**, 48, 1602.
- 104 Ricci, C. G.; Netz, P. A., *Journal of Chemical Information and Modeling* **2009**, 49, 1925.
- 105 Autodock. Vol. version 4 ed. La Jolla, CA: The Scripps Research Institute; 2007.
- 106 Surflex. Vol. version 2.11 ed. St. Louis, MO: Tripos, Inc.; 2007.
- 107 Rungnim, C.; Rungrotmongkol, T.; Hannongbu, S.; Okumurad, H. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **2013**, 39, 183.
- 108 Kalyaanamoorthy, S.; Chen, Y. P. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **2013**, (no prelo).
- 109 Pana, P.; Li, L.; Li, Y., Li, D.; Hou, T. *Antiviral Research* **2013**, 100, 356.
- 110 Namba, A. M.; da Silva, V. B.; da Silva, C. H. T. P. *Eclética Química* **2008**, 33 (4), 13.
- 111 van Gunsteren, W. F.; Berendsen, H. J. C. *Angewandte Chemie International Edition Engl.*, **1990**, 29, 992.
- 112 Brooks, B. R.; Bruccoleri, R. E.; Olafson, B. D.; States, D. J.; Swaminathan, S.; Karplus, M.; *Journal of Computational Chemistry* **1983**, 4, 187.
- 113 MacKerell, A. D.; Bashford, D.; Bellott, M.; Dunbrack, R. L.; Evanseck, J. D.; Field, M. J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph-McCarthy, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F. T. K.; Mattos, C.; Michnick, S.; Ngo, T.; Nguyen, D. T.; Prodhom, B.; Reiher, W. E.; Roux, B.; Schlenkrich, M.; Smith, J. C.; Stote, R.; Straub, J.; Watanabe, M.; Wiorkiewicz-Kuczera, J.; Yin, D.; Karplus, M.; *The Journal of Physical Chemistry B* **1998**, 102, 3586.
- 114 van Gunsteren, W. F.; Billeter, S. R.; Eising, A. A.; Hünenberger, P. H.; Krüger, P.; Mark, A. E.; Scott, P. W. R.; Tironi, I. G.; *The GROMOS96 Manual and User Guide*, Vdf Hochschulverlang, ETH Zurich Switzerland, 1996.
- 115 Weiner, S. J.; Kollman, P. A.; Nguyen, D. T.; Case, D. A. J.; *Journal of Computational Chemistry* **1986**, 7, 230.

-
- 116 Weiner, S. J.; Kollman, K. A.; Case, D. A.; Singh, U. C.; Ghio, C.; Alagona, G.; Profeta, S. Jr.; Weiner, P. K.; *Journal of American Chemical Society* **1984**, *106*, 765.
- 117 Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S.; Tirado-Rives, J.; *Journal of American Chemical Society* **1996**, *118*, 11225.
- 118 Jorgensen, W. L.; Tirado-Rives, J.; *Journal of American Chemical Society* **1988**, *110*, 1657.
- 119 Verlet, L. *Physical Review* **1967**, *165*, 201.
- 120 Beeman, D. *Journal of Computational Physics*, **1976**, *20*, 130.
- 121 Hockney, R. W. *Methods in Computational Physics* **1970**, *9*, 136.
- 122 Hestenes, M. R.; Stiefel, E. *Journal of Research of the National Bureau of Standards* **1952**, *49* (6), 409.
- 123 Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R. *The Journal of Chemical Physics* **1984**, *81*, 3684.
- 124 Hoover, W. G. *Physical Review* **1985**, *31*, 1695.
- 125 Parrinello, M.; Rahman, A. *Journal of Applied Physics* **1981**, *52*, 7182.
- 126 GaussView, Version 4.1, Dennington II, Roy, Keith, Todd; and Millam John; *Semichem, Inc., Shawnee Mission, KS*, **2007**.
- 127 Gaussian 98 (Revision A.1x), Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, Jr., J. A.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Baboul, A. G.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Gonzalez, C.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A. Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2001.
- 128 Tereshko, V.; Minasov, G.; Egli, M. *Journal of the American Chemical Society*, **1999**, *121* (2), 470.

-
- 129 Renciuik, D.; Blacque, O.; Vorlickova, M.; Spingler, B. *Nucleic Acids Research*, **2013**, *41* (21) 9891.
- 130 Isaksson, J.; Plashkevych, O.; Pradeepkumar, P. I.; Chatterjee, S.; Barman, J.; Pathmasiri, W.; Shrivastava, P.; Petit, C.; Chattopadhyaya, J. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, **2005**, *23* (3), 299.
- 131 Dršata, T.; Pérez, A.; Orozco, M.; Morozov, A. V.; Šponer, J.; Lankaš, F. *Journal of Chemical Theory Computation*, **2013**, *9* (1), 707.
- 132 Sanner, M.F. *Journal of Molecular Graphics and Modeling*, **1999**, *17*, 57.
- 133 Wang, J.; Wolf, R.M.; Caldwell, J.W.; Kollman, P.A.; Case, D.A. *Journal of Computational Chemistry* **2004**, *25*, 1157.
- 134 Batista, P.R.; Wilter, A.; Durham, E.H.A.B.; Pascutti, P.G. *Cell Biochemistry and Biophysics*, **2006**, *44*, 395.
- 135 Ricci, C. G.; Andrade, A. S. C, Mottin, M. e Netz, P. A. *The Journal of Physical Chemistry B*, **2010**, *114*, 9882.
- 136 Ghorbani, M.; Mohammad-Rafiee, F. *Nucleic Acids Research*, **2010**, 1.
- 137 Netz, P. A. *International Journal of Quantum Chemistry*, **2012**, *112*, 3296.
- 138 Drew, H. R.; Wing, R. M.; Takano, T.; Broka, C.; Tanaka, S.; Itakura, K.; Dickerson R. E. *Proceedings of the National Academy of Science* **1981**, *78* (4), 2179.