



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Fábio Filippi Matioli

*Estudos estruturais in silico com um composto  
sintético com propriedades antifúngicas*

Botucatu – SP  
2013



Fábio Filippi Matioli

*Estudos estruturais in silico com um composto  
sintético com propriedades antiofídicas*

Monografia apresentada ao Instituto de  
Biociências da Unesp de Botucatu para a  
obtenção do título de Bacharel em Física  
Médica.

Orientador  
Angelo José Magro

BACHARELADO EM FÍSICA MÉDICA  
DEPARTAMENTO DE FÍSICA E BIOFÍSICA  
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS  
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
CAMPUS DE BOTUCATU

Botucatu – SP  
2013



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Matioli, Fábio Filippi.

Estudos estruturais in silico com um composto sintético com propriedades antiofídicas / Fábio Filippi Matioli. - Botucatu, 2013

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Física Médica) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Angelo José Magro

Coorientador: Marcos Roberto de Mattos Fontes

Coorientador: Ney Lemke

Capes: 20804008

1. Serpente peçonhenta - Veneno. 2. Dinâmica molecular. 3. Fosfolipases. 4. Bioinformática. 5. Física Médica.

Palavras-chave: Bioinformática estrutural; Dinâmica molecular; Fosfolipase; Veneno de serpente.



## **Agradecimentos**

Eu gostaria de agradecer primeiramente a minha família que me deu total apoio moral e financeiro para que eu conquistasse essa etapa de minha vida. Em segundo lugar eu gostaria de agradecer aos meus professores e educadores durante a graduação, em especial ao professor Ney Lemke, professor Marcos Roberto de Mattos Fontes e ao Doutor Angelo José Magro que me orientaram de forma ímpar para o desenvolvimento desse projeto e do meu conhecimento científico. Em terceiro lugar gostaria de agradecer a República Bico do Corvo onde morei durante toda minha graduação e a Bombateria e as bandas das quais eu participei, que foram os meus escapes da correria do dia a dia.



## Resumo

Este trabalho faz parte de um artigo científico realizado em colaboração com outros autores e recentemente enviado para análise do periódico internacional *Journal of Medicinal Chemistry*. Inicialmente, alguns dos autores do trabalho em questão realizaram alguns ensaios experimentais utilizados para avaliar as propriedades antiofídicas de uma série de moléculas sintéticas pertencentes ao grupo das 4-quinolinonas frente a diferentes venenos brutos de serpentes e seus respectivos componentes principais. Estes ensaios mostraram que o composto 2-hidroximetil-6-metóxi-1,4-di-hidro-4-quinolinona (denominado aqui como composto 8) apresentou uma significativa atividade antiofídica, sendo capaz de neutralizar em diferentes graus as atividades proteolíticas, anticoagulantes e anti-hemorrágicas de metaloproteases das classes P-I e P-III isoladas dos venenos brutos de *Bothrops neuwiedi* e *Bothrops jararacussu*. Além disso, este composto também foi capaz de inibir as atividades miotóxicas, edematogênicas de fosfolipases  $A_2$  isoladas a partir dos venenos brutos utilizados nos testes experimentais, além de aumentar a capacidade neutralizante do efeito miotóxico do soro antiofídico produzido contra o veneno da serpente *B. jararacussu*.

Assim, com o intuito de se obter mais informações a respeito das bases estruturais do mecanismo de inibição do composto 8 contra as toxinas de venenos de serpentes, foram realizadas simulações computacionais de *docking* e dinâmica molecular envolvendo esta molécula sintética e um modelo teórico do domínio catalítico de BjussuMP-II, uma metaloprotease de classe P-III presente no veneno de *B. jararacussu*. Os resultados obtidos após estes estudos teóricos revelaram interessantes aspectos relativos às interações do complexo formado entre o composto 8 e a BjussuMP-II, reforçando o potencial desta 4-quinolinona como um possível adjuvante na soroterapia antiofídica.

Palavras-chave: 4-quinolinona; metaloproteases; fosfolipases  $A_2$ ; *docking*; modelagem; dinâmica molecular; veneno de serpente.



## Sumário

|   |    |
|---|----|
| Lista de Figuras .....  | 7  |
| Introdução .....  | 8  |
| Metodologia .....   | 9  |
| Materiais .....   | 9  |
| Metodologia .....   | 9  |
| Modelagem do domínio catalítico da BjussuMP-II .....  | 9  |
| Construção <i>in silico</i> do composto 2-hidroximetil-6-metóxi-1,4-di-hidro-4-quinolinona<br>(composto 8)..... | 10 |
| Simulações de <i>docking</i> molecular .....  | 10 |
| Simulações de dinâmica molecular .....  | 10 |
| Avaliação dos modelos obtidos após as simulações de dinâmica molecular .....                                    | 11 |
| Resultados e Discussão .....  | 11 |
| Bibliografia .....  | 15 |
| Anexos.....   | 21 |
| Trabalhos baseados nos resultados obtidos .....   | 21 |



## Lista de Figuras

1. Representação do ligante, quinolinona, página 8
2. Representação da coordenação da histidina catalítica e do ligante com o Zinco, página 12
3. Ancoragem da quinolinona no sítio catalítico, página 13
4. Gráfico de RMSD do *backbone* da proteína após 50ns de simulação de dinâmica molecular, página 14

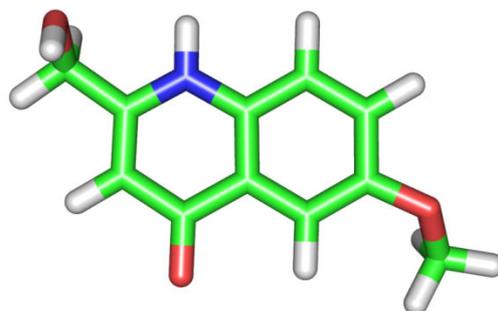


## Introdução

Venenos de serpentes são misturas complexas de proteínas, incluindo fosfolipases A<sub>2</sub>, metaloproteases, componentes coagulantes e anticoagulantes, citotoxinas, cardiotoxinas e outras moléculas. A fisiopatologia do envenenamento ofídico envolve uma série complexa de eventos que dependem da ação combinada destes componentes do veneno, os quais apresentam uma ampla variedade de atividades farmacológicas e biológicas, tais como neurotoxicidade, miotoxicidade, capacidade edematogênica e hemorrágica e várias outras propriedades [1,2-5].

Em muitos países, incluindo o Brasil, os extratos de plantas são tradicionalmente usados para o tratamento do envenenamento ofídico, embora apenas em alguns casos exista validação científica para os efeitos terapêuticos declarados [6 -10]. Por outro lado, vários alcalóides vegetais têm sido descritos como inibidores antiofídicos efetivos tanto *in vitro* com *in vivo* [10-15]. Assim, o estudo de moléculas sintéticas derivadas de alcalóides vegetais adquire uma importante relevância para o desenvolvimento de novas drogas antiofídicas. Com base nesta premissa, vários destes compostos foram testados com sucesso frente a venenos brutos e suas principais toxinas [16-19]. Entre as possíveis moléculas sintéticas que podem ser avaliadas quanto às suas possíveis propriedades antiofídicas estão as quinolinonas. Estes compostos sintéticos têm sido utilizados como fármacos antibacterianos e antimicobacterianos no tratamento de várias doenças infecciosas de forma ampla, eficaz e segura em função da baixa toxicidade decorrente da ação inibitória seletiva destas moléculas contra a PDE-5 e outras fosfodiesterases [20-24].

O presente trabalho envolveu a execução de estudos estruturais computacionais do complexo formado entre o domínio catalítico da B<sub>j</sub>ussuMP-II – uma metaloprotease de classe P-III do veneno de *Bothrops jararacussu* [25] – e o composto 2-hidroximetil-6-metóxi-1,4-di-hidro-4-quinolinona (identificado aqui como composto 8) (Figura 1), cujas propriedades antiofídicas foram identificadas por meio de ensaios experimentais prévios (ver artigo enviado para publicação em anexo). Para tanto, foram realizadas simulações de *docking* e dinâmica molecular que revelaram interessantes características a respeito do complexo estudado e o potencial do composto 8 como um possível fármaco a ser utilizado no tratamento dos efeitos deletérios causados pelas metaloproteases de venenos de serpentes (também denominadas como SVMPs – *snake venom metalloproteases*) nos acidentes ofídicos.



**Figura 1:** Representação em *sticks* do composto 2-hidroximetil-6-metóxi-1,4-di-hidro-4-quinolinona.



## Metodologia

### Materiais

- *HHpred*, programa *on-line* utilizado para gerar os modelos do domínio catalítico da metaloprotease BjussuMP-II de *Bothrops jararacussu* [26].
- *Modeller 9v10*, programa utilizado para gerar os modelos do domínio catalítico da metaloprotease BjussuMP-II de *Bothrops jararacussu* [32].
- *RAMPAGE*, programa *online* utilizado para avaliação dos modelos do domínio catalítico da metaloprotease BjussuMP-II de *Bothrops jararacussu* previamente gerados [28].
- *ProSA-web*, programa *online* utilizado para avaliação dos modelos do domínio catalítico da metaloprotease BjussuMP-II de *Bothrops jararacussu* previamente gerados [29].
- *Avogadro v.0.9.4*, programa utilizado para gerar o modelo estrutural do composto 2-hidroximetil-6-metóxi-1,4-di-hidro-4-quinolinona (composto 8) [30].
- *Gold v.5.0.1*, programa utilizado para realizar as simulações de *docking* molecular entre o domínio catalítico da BjussuMP-II de *Bothrops jararacussu* (dc-BjussuMP-II) e o composto 2-hidroximetil-6-metóxi-1,4-di-hidro-4-quinolinona (composto 8) [31].
- *Gromacs v.4.5.3*, *software* utilizado para executar as simulações de dinâmica molecular (MD – *molecular dynamics*) do complexo dc-BjussuMP-II/composto 8 selecionado a partir das soluções de *docking* molecular geradas pelo *software Gold v.5.0.1* [32,33].

### Metodologia

#### Modelagem do domínio catalítico da BjussuMP-II

De acordo com os dados de alinhamento gerados pelo programa *HHpred* [26] (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>), o modelo cristalográfico com resolução de 1,05 Å do complexo formado entre a metaloprotease BaP1 de *Bothrops asper* [27] e um inibidor peptidomimético (código PDB 2w15) foi utilizado como molde para a construção do modelo teórico do domínio catalítico da BjussuMP-II de *Bothrops jararacussu*. Este molde, selecionado no *Protein Data Bank* (PDB) utilizando o algoritmo BLASTP (parâmetros default), foi selecionado com base na pontuação de alinhamento (337,81) e seu grau de identidade (81%) em relação à BjussuMP-II. O programa *Modeller 9v10* [32] foi então utilizado para gerar dez modelos estruturais baseados no molde selecionado, mantendo-se a posição original do cofator  $Zn^{2+}$  na estrutura. Além disso, o modelo cristalográfico com 1,93 Å de resolução da metaloprotease nativa BaP163 de *Bothrops asper* (código PDB 1nd1) também foi adicionado ao arquivo de entrada do *Modeller 9v10* [32] para definir a posição da molécula de água catalítica coordenada nas SVMs pelo resíduo Glu42 e pelo íon  $Zn^{2+}$ . O método denominado *variable target function method* (VTFM) combinado com



gradientes conjugados (CG – *conjugate gradients*) e a execução de passos de dinâmica molecular (MD – *molecular dynamics*) associados com *simulated annealing* (SA) [34] foram utilizados para refinar os modelos. O cofator  $Zn^{2+}$  de cada modelo foi adicionado com base nas coordenadas desse íon no modelo cristalográfico do complexo dc-BaP1/inibidor peptidomimético. O melhor modelo gerado da BjussuMP-II foi selecionado de acordo com os parâmetros estereoquímicos e energéticos determinados, respectivamente, pelos programas *RAMPAGE* [46] e *ProSA-web* [29].

### **Construção *in silico* do composto 2-hidroxi-6-metóxi-1,4-dihidro-4-quinolinona (composto 8)**

O programa *Avogadro* v.0.9.4 [30] foi utilizado para determinar a estrutura do composto 2-hidroxi-6-metóxi-1,4-dihidro-4-quinolinona (composto 8) quinolinona sintética através de um processo de minimização de energia com base no campo de força MMF94 e no emprego de um algoritmo do tipo *steepest-descent*.

### **Simulações de *docking* molecular**

Todas as simulações de *docking* molecular entre o modelo do domínio catalítico da metaloprotease BjussuMP-II obtido após uma simulação de dinâmica molecular de 20 ns e o composto 2-hidroxi-6-metóxi-1,4-dihidro-4-quinolinona (composto 8) foram executadas pelo programa *Gold* v.5.0.1 (CCDC *Software Limited*, Cambridge, Inglaterra) [31]. O local de *docking* foi definido como aquele compreendido dentro de um raio de 20 Å ao redor do cofator  $Zn^{2+}$  do sítio catalítico da proteína. As simulações foram realizadas com as opções *on/fix*, *on/spin*, *toggle/fix* e *toggle/spin* para avaliar a influência da molécula de água catalítica coordenada pelo resíduo Glu142 e pelo cofator  $Zn^{2+}$ . Pelo menos dez simulações foram executadas para cada combinação, com a produção de vinte soluções de *docking* molecular em cada simulação. Os outros parâmetros de *docking* foram aqueles definidos como padrão pelo programa *Gold* v.5.0.1. As soluções de *docking* entre o composto 8 e o modelo do domínio catalítico da metaloprotease BjussuMP-II (complexos dc-BjussuMP-II/composto 8) foram classificadas conforme a função *GoldScore* [31].

### **Simulações de dinâmica molecular**

O domínio catalítico da metaloprotease BjussuMP-II e o complexo dc-BjussuMP-II/composto 8 com a melhor pontuação definida pela função *Goldscore* foram submetidos a simulações de dinâmica molecular (MD) utilizando-se o programa *Gromacs* v.4.5.4 (*Groningen Machine for Chemical Simulation*) [32, 33] com as seguintes configurações:

- Campo de força GROMOS 96 53a6 [35].
- Os estados de protonação dos grupos carregados foram ajustados para pH 7,0.
- Adição de moléculas de solvente (água) explícitas [36].
- Adição de íons para promover o equilíbrio do sistema.
- A distância mínima permitida entre qualquer átomo dos modelos e a parede da caixa de solvente água foi fixada em 1,0 nm.



Uma minimização de energia (EM – *energy minimization*) realizada com o emprego de um algoritmo do tipo *steepest descent* foi executada para gerar as configurações iniciais dos sistemas. Após este passo, foi realizada uma simulação de dinâmica molecular propriamente dita de 200 ps com restrição de posicionamento (PRMD) com o objetivo de relaxar o sistema de forma gradual. Em seguida, uma nova simulação de dinâmica molecular propriamente dita (20 ns para o domínio catalítico da metaloprotease BjussuMP-II e 50 ns para o complexo dc-BjussuMP-II/composto 8 selecionado) foi executada para avaliar a estabilidade dos modelos.

Todas as simulações de dinâmica molecular foram realizadas em uma caixa periódica cúbica de solvente sob temperatura (298 K) e pressão (1,0 bar) constantes [37]. As distâncias entre os resíduos de histidina catalíticos e o cofator  $Zn^{2+}$  dos modelos foram mantidas de acordo com o trabalho de Andreini et al. [38]. A topologia e os arquivos de coordenadas do composto 8 usados nas simulações de dinâmica molecular foram gerados pelo servidor *Dundee* PRODRG2 (<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/prodrg/>).

### **Avaliação dos modelos obtidos após as simulações de dinâmica molecular**

Os parâmetros estereoquímicos e energéticos dos modelos submetidos às simulações de dinâmica molecular foram analisadas com os programas *RAMPAGE* [28] e *ProSA-web* [29]. Adicionalmente, foi realizada a análise dos gráficos do desvio médio quadrático (RMSD – *root mean square deviation*) dos átomos da cadeia principal dos modelos com base na diferença das médias de dois conjuntos idênticos de pontos (o período transiente das simulações de dinâmica molecular não foi considerado).

### **Resultados e Discussão**

De acordo com os ensaios experimentais mostrados no artigo em anexo, o composto 2-hidroximetil-6-metóxi-1,4-di-hidro-4-quinolinona (composto 8) é particularmente eficaz na inibição das atividades farmacológicas induzidas por metaloproteases de venenos de serpentes (SVMPs) em comparação com os outros compostos testados. Como também demonstrado pelos resultados obtidos nos ensaios de dicroísmo circular (CD – *circular dichroism*), estas propriedades inibitórias não são explicadas pela degradação da proteína. Logo, o composto 8 não é capaz de modificar significativamente a estrutura secundária da metaloprotease BjussuMP-II de *B. jararacussu* e, assim, deve exercer sua atividade necessariamente através de algum mecanismo específico de interação proteína/ligante.

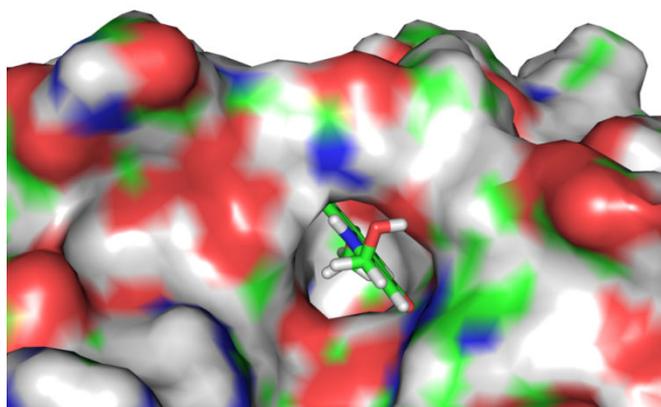
Para verificar esta hipótese, realizamos inicialmente a modelagem e a uma simulação de dinâmica molecular de 25 ns do domínio catalítico da BjussuMP-II (dc-BjussuMP-II). Após estes procedimentos *in silico* o modelo em questão apresentou uma qualidade estereoquímica satisfatória, com 96,1% de seus resíduos de aminoácidos alocados nas regiões permitidas do diagrama de Ramachandran [28] e uma energia potencial da estrutura adequada ( $Z\text{-score} = -6,52$ ) [29]. Com base nestes dados, é possível supor que o modelo obtido após os 25 ns de simulação de dinâmica molecular também é adequado. Além disso, o modelo conservou uma similaridade estrutural em



relação a outros domínios catalíticos de SVMs [39-46], apresentando três pontes de dissulfeto (Cys116-Cys196, Cys156-Cys180 e Cys158-Cys163), dois subdomínios elipsoidais estruturalmente preservados e um posicionamento favorável dos anéis das histidinas catalíticas para a coordenação do cofator  $Zn^{2+}$ .

Em seguida, o sítio ativo do dc-BjussuMP-II e seus arredores foi definido como o local de eleição para o *docking* do composto 8 com base em estudos envolvendo várias estruturas cristalográficas. Estes trabalhos indicam que estes locais são efetivamente as regiões de interação entre diferentes SVMs e inibidores específicos ou ligantes. Em 1994, Zhang *et al.* [41] elucidaram uma série de complexos cristalográficos envolvendo a atrolisina C (forma d), uma SMVP do veneno de *Crotalus atrox*, um tripeptídeo natural (pyroGlu-Asn-Trp) e o ligante sintético SCH47890, demonstrando que as duas últimas moléculas se ligam ao sítio ativo do atrolisina. Da mesma forma, Cirilli *et al.* [47] determinou a estrutura cristalográfica da adamalisina II de *Crotalus adamanteus* ligado a um análogo de POL647, um tripeptídeo sintético natural encontrado em venenos de crotalídeos e viperídeos, e indicou que a interação do ligante com os resíduos do sítio catalítico e o cofator  $Zn^{2+}$  ocorre de forma assimétrica. Além disso, neste complexo, a presença do inibidor desloca a molécula de água catalítica coordenada na proteína nativa pelo  $Zn^{2+}$  e um resíduo de ácido glutâmico. Interações não covalente de outros inibidores peptidomiméticos (POL647 e POL656) com resíduos da região do sítio ativo da adamalisina também foram descritos por Gomis-Ruth *et al.* [40].

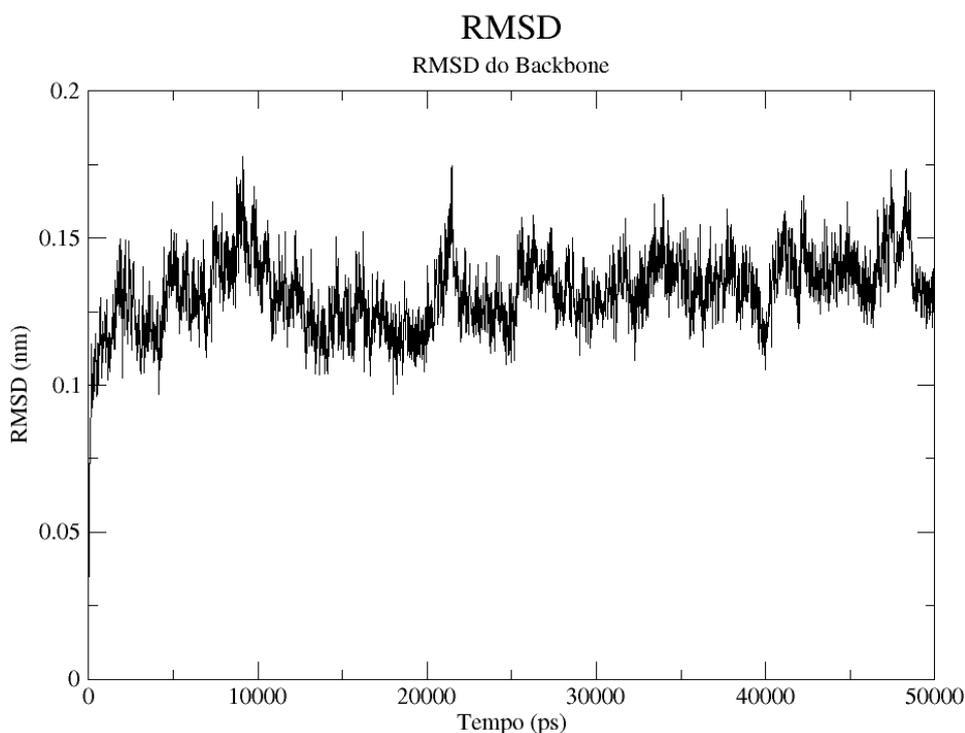
Os resultados obtidos nos ensaios de *docking* molecular mostraram que os complexos dc-BjussuMP-II/composto 8 com as melhores pontuações definidas pela função *GoldScore* não apresentaram um deslocamento da água catalítica, indicando que a atividade inibitória do composto 8 pode não ter relação com esta particularidade estrutural. Portanto, de acordo com os dados, o ligante parece apenas evitar o acesso de moléculas de substrato ao sítio catalítico da BjussuMP-II, não permitindo, assim, a ocorrência de qualquer reação hidrolítica (Figura 2).



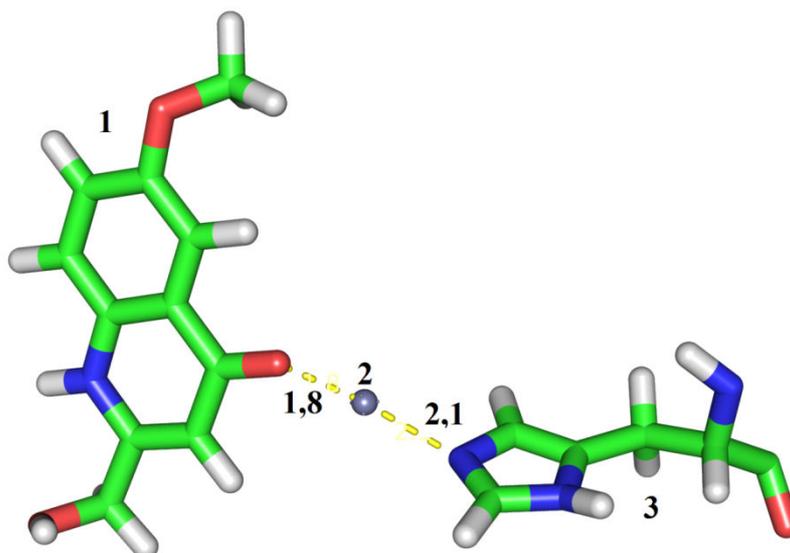
**Figura 2.** Representação da superfície do domínio catalítico da BjussuMP-II destacando a ancoragem do composto 8 (em *sticks*) no canal de acesso ao sítio catalítico da proteína.



Com objetivo de testar este possível mecanismo estrutural de inibição do composto 8 frente à BjussuMP-II, o complexo dc-BjussuMP-II/composto 8 com a melhor pontuação atribuída pela função *GoldScore* foi submetida a uma simulação de dinâmica molecular de 50 ns. O objetivo deste procedimento foi o de verificar a o comportamento deste complexo e o tipo e prevalência das interações entre a proteína e o ligante. A análise dos resultados da simulação mostrou que a amplitude máxima do desvio quadrático médio (RMSD) dos carbonos-alfa do modelo foi da ordem de 0,1 Å (Figura 3), demonstrando, portanto, um pequeno grau de variação estrutural do complexo testado durante o intervalo de tempo calculado. Este resultado denota que a interação do ligante com o domínio catalítico da BjussuMP-II aparentemente não introduz nenhum grau significativo de instabilidade à proteína, o que sugere a possibilidade da real formação de um complexo dc-BjussuMP-II/composto 8. Ainda, uma análise mais acurada da simulação mostrou que um dos átomos de oxigênio do composto 8 mantém durante praticamente toda a simulação uma distância constante (ao redor de 1,8 Å) em relação ao cofator  $Zn^{+2}$  (Figura 4).



**Figura 3.** Gráfico do desvio médio quadrático (RMSD) dos átomos de carbono-alfa da cadeia principal do complexo dc-BjussuMP-II/composto 8 submetido a uma simulação de dinâmica molecular de 50 ns.



**Figura 4.** Distâncias em Å entre o composto 8 (**1**) e o cofator  $Zn^{2+}$  (**2**) do sítio catalítico da BjussuMP-II. Uma das histidinas catalíticas (**3**) também está representada.

Assim, aparentemente, o composto 8 estabelece uma interação importante com o domínio catalítico da BjussuMP-II, mediada, principalmente, pelo cofator  $Zn^{2+}$ . Com base nestes dados estruturais, é possível, portanto, ressaltar o potencial uso da molécula sintética 2-hidroximetil-6-metóxi-1,4-di-hidro-4-quinolinona como um adjuvante na terapia antiofídica, particularmente com o objetivo de diminuir as ações hemorrágicas, fibrinolíticas e miotóxicas das metaloproteases de serpentes do gênero *Bothrops*. Ademais, este trabalho também sugere que outros estudos farmacológicos e estruturais envolvendo o composto 8 e outras quinolinonas sintéticas também podem ser importantes para o futuro desenvolvimento de novas drogas antiofídicas.



## Bibliografia

- [1] Gutiérrez, J. M. Understanding Snake Venoms: 50 Years of Research in Latin America. *Rev. Biol. Trop.* **2002**, *50*, 377-394.
- [2] Gutiérrez, J. M.; Lomonte, B. Phospholipase A<sub>2</sub> Myotoxins from *Bothrops* Snake Venoms. *Toxicon* **1995**, *33*, 1405-1424.
- [3] Ownby, C. L. Structure, Function and Biophysical Aspects of the Myotoxins from Snake Venoms. *J. Toxicol.- Toxin Reviews* **1998**, *17*, 213-238.
- [4] Ownby, C.L.; Selistre-de-Araújo, H. S.; White, S. P.; Fletcher, J. E. Lysine 49 Phospholipase A<sub>2</sub> Proteins. *Toxicon* **1999**, *37*, 411-445.
- [5] Soares, A. M.; Fontes, M. R. M.; Giglio, J. R. Phospholipase A<sub>2</sub> Myotoxins from *Bothrops* Snake Venoms: Structure-Function Relationship. *Curr. Org. Chem.* **2004**, *8*, 1677-1690.
- [6] Phillipson, J. D.; Anderson, L. A. Ethnopharmacology and Western medicine. *J. Ethnopharmacol.* **1989**, *25*, 61-72.
- [7] Martz, W. Plants with a Reputation Against Snakebite. *Toxicon* **1992**, *30*, 1131-1142.
- [8] Mors, W. B.; Nascimento, M. C.; Pereira, B. M.; Pereira, N. A. Plant Natural Products Active Against Snake Bite - The Molecular Approach. *Phytochem.* **2000**, *55*, 627-642.
- [9] Soares, A. M.; Januário, A. H.; Lourenço, M. V.; Pereira, A. M. S.; Pereira, P. S. Neutralizing Effects of Snake Venoms Exhibited by Brazilian Plants. *Drugs Future* **2004**, *29*, 1105-1117.
- [10] Soares, A. M.; Ticli, F. K.; Marcussi, S.; Lourenço, M. V.; Januário, A. H.; Sampaio, S.V.; Lomonte, B.; Pereira, P. S. Medicinal Plants with Inhibitory Properties Against Snake Venoms. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 2625-2641.



- [11] Vishwanath, B. S.; Gowda, T. V. Interaction of Aristolochic Acid with *Vipera russelli* Phospholipase A<sub>2</sub>: Its Effect on Enzymatic and Pharmacological Activities. *Toxicon* **1987**, *25*, 929-937.
- [12] Marcussi, S.; Sant'Ana, C. D.; Oliveira, C. Z.; Rueda, A. Q.; Menaldo, D. L.; Beleboni, R.; Stábeli, R. G.; Giglio, J. R.; Fontes, M. R. M.; Soares, A. M. Snake Venom Phospholipase A<sub>2</sub> Inhibitors: Medicinal Chemistry and Therapeutic Potential. *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7*, 743-756.
- [13] Batina, M. F.; Cintra, A. C.; Veronese, E. L.; Lavrador, M. A.; Giglio, J. R.; Pereira, P. S.; Dias, D. A.; França, S. C.; Sampaio, S. V. Inhibition of the Lethal and Myotoxic Activities of *Crotalus durissus terrificus* Venom by *Tabernaemontana catharinensis*: Identification of One of the Active Components. *Planta Med.* **2000**, *66*, 424-428.
- [14] Li, Q. B.; Pan, R.; Wang, G. F.; Tang, S. X. Anisodamine as an Effective Drug to Treat Snakebites. *J. Nat. Toxins* **1999**, *8*, 327-330.
- [15] Girish, K. S.; Kemparaju, K. Inhibition of *Naja naja* Venom Hyaluronidase by Plant-Derived Bioactive Components and Polysaccharides. *Biochemistry (Moscow)* **2005**, *70*, 948-952.
- [16] Villar, J. A. F. P.; Lima, F. T. D.; Veber, C. L.; Oliveira, A. R. M.; Calgarotto, A. K.; Marangoni, S.; da Silva, S. L. Synthesis and Evaluation of Nitrostyrene Derivative Compounds, New Snake Venom Phospholipase A<sub>2</sub> Inhibitors. *Toxicon* **2008**, *51*, 1467-1478.
- [17] da Silva, A. J. M.; Melo, P. A.; Silva, N. M. V.; Brito, F. V.; Buarque, C. D.; de Souza, D.V.; Rodrigues, V. P.; Poças, E. S. C.; Noël, F.; Albuquerque, E. X.; Costa, P. R. Synthesis and Preliminary Pharmacological Evaluation of



- Coumestans with Different Patterns of Oxygenation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 283-286.
- [18] da Silva, A. J. M.; Buarque, C. D.; Brito, F. V.; Aurelian, L.; Macedo, L. F.; Malkas, L. H.; Hickey, R. J.; Lopes, D. V. S.; Noël, F.; Murakami, Y. L. B.; Silva, N. M. V.; Melo, P. A.; Caruso, R. R. B.; Castro, N. G.; Costa, P. R. R. Synthesis and Preliminary Pharmacological Evaluation of New (+/-) 1,4-Naphthoquinones Structurally Related to Lapachol. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2731-2738.
- [19] da Silva, A. J. M.; Coelho, A. L.; Sima, A. B. C.; Moraes, R. A. M.; Pinheiro, D. A.; Fernandes, F. F. A.; Arruda, E. Z.; Costa, P. R. R.; Melo, P. A. Synthesis and Pharmacological Evaluation of Prenylated and Benzylated Pterocarpanes Against Snake Venom. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 431-435.
- [20] Michael, J. P. Quinoline, Quinazoline and Acridone Alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 650-668.
- [21] Anquetin, G.; Greiner, J.; Vierling, P. Quinolone-Based Drugs Against *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium spp.* *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* **2005**, *5*, 227-45.
- [22] Ko, J. S.; Rho, M-C.; Chung, M. Y.; Song, H. Y.; Kang, J. S.; Kim, K.; Lee, H. S. Quinolone Alkaloids, Diacylglycerol Acyltransferase Inhibitors from the Fruits of *Evodia rutaecarpa*. *Planta Med.* **2002**, *68*, 1131-1133.
- [23] Lanter, C. J.; Sui, Z.; Macielag, M. J.; Fiordeliso, J. J.; Jiang, W.; Qiu, Y.; Bhattacharjee, S.; Kraft, P.; John, T. M.; Haynes-Johnson, D.; Craig, E.; Clancy, J. Structure-Activity Relationships of N-acyl Pyrroloquinolone PDE-5 Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 656-662.



- [24] Viola, G.; Facciolo, L.; Dall'Acqua, S.; Di Lisa, F.; Canton, M.; Vedaldi, D.; Fravolini, A.; Tabarrini, O.; Cechetti, V. 6-Aminoquinolones: Photostability, Cellular Distribution and Phototoxicity. *Toxicol. in vitro* **2004**, *18*, 581-592.
- [25] Marcussi, S.; Bernardes, C. P.; Santos-Filho, N. A.; Mazzi, M. V.; Oliveira, C. Z.; Izidoro, L. F. M.; Fuly, A. L.; Magro, A. J.; Braz, A. S. K.; Fontes, M. R. M.; Giglio, J. R.; Soares, A. M. Molecular and Functional Characterization of a New non-Hemorrhagic Metalloprotease from *Bothrops jararacussu* Snake Venom with Antiplatelet Activity. *Peptides* **2007**, *28*, 2328-2339.
- [26] Söding, J.; Biegert, A.; Lupas, A. N. The HHpred Interactive Server for Protein Homology Detection and Structure Prediction. *Nucl. Acids Res.* **2005**, *33*, 244-248.
- [27] Lingott, T. J.; Schleberger, C.; Gutiérrez, J. M.; Merfort, I. High-Resolution Crystal Structure of the Snake Venom Metalloproteinase BaP1 Complexed with a Peptidomimetic: Insight into Inhibitor Binding. *Biochemistry* **2009**, *48*, 6166-6174.
- [28] Lovell, S. C.; Davis, I. W.; Arendall III, W. B.; de Bakker, P. I. W.; Word, J. M.; Prisant, M. G.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. Structure Validation by Calpha Geometry: Phi, Psi and Cbeta Deviation. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **2003**, *50*, 437-450.
- [29] Wiederstein, M.; Sippl, M. J. ProSA-web: Interactive Web Service for the Recognition of Errors in Three-Dimensional Structures of Proteins. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, W407-W410.
- [30] Hanwell, M. D.; Curtis, D. E.; Lonie, D. C.; Vandermeersch, T.; Zurek, E.; Hutchison, G. R. Avogadro: An Advanced Semantic Chemical Editor, Visualization, and Analysis Platform. *J. Cheminform.* **2012**, *4*, 17.



- [31] Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C. Molecular Recognition of Receptor Sites Using a Genetic Algorithm with a Description of Desolvation. *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 43-53.
- [32] Berendsen, H. J. C.; van der Spoel, D.; Van Drunen, R. GROMACS: A Message-Passing Parallel Molecular Dynamics Implementation. *Comp. Phys. Commun.* **1995**, *91*, 43-56.
- [33] Hess, B.; Kutzner, C.; van der Spoel, D.; Lindahl, E. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4*, 435-447.
- [34] Pereira, M. F.; Novello, J. C.; Cintra, A. C.; Giglio, J. R.; Landucci, E. T.; Oliveira, B.; Marangoni, S. J. The Amino Acid Sequence of Bothropstoxin-II, an Asp-49 Myotoxin from *Bothrops jararacussu* (Jararacucu) Venom with Low Phospholipase A2 Activity. *J. Protein Chem.* **1998**, *17*, 381-386.
- [35] Oostenbrink, C.; Soares, T. A.; van der Vegt, N. F. A.; van Gunsteren, W. F. Validation of the 53A6 GROMOS Force Field. *Eur. Biophys. J.* **2005**, *34*, 273-284.
- [36] Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; Hermans, J. Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration. In *Intermolecular Forces*; Pullman, B., Ed.; D. Reidel Publishing Co.: Dordrecht, 1981; pp 331-342.
- [37] Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R. Molecular Dynamics with Coupling to an External Bath. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 7.
- [38] Andreini, C.; Banci, L.; Bertini, I.; Elmi, S.; Rosato, A. Comparative Analysis of the ADAM and ADAMTS Families. *J. Protein Res.* **2005**, *4*, 881-888



- [39] Gomis-Rüth, F. X.; Kress, L. F.; Bode, W. First Structure of a Snake Venom Metalloproteinase: A Prototype for Matrix Metalloproteinases/Collagenases. *The EMBO Journal* **1993**, *12*, 4151-4157.
- [40] Gomis-Rüth, F. X.; Meyer, E. F.; Kress, L. F.; Politi, V. Structures of Adamalysin II with Peptidic Inhibitors. Implications for the Design of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Convertase Inhibitors. *Protein Science* **1998**, *7*, 283-292.
- [41] Zhang, D.; Botos, I.; Gomis-Rüth, F. X.; Doll, R.; Blood, C.; Njoroge, F. G.; Fox, J. W.; Bode, W.; Meyer, E. F. Structural Interaction of Natural and Synthetic Inhibitors with the Venom Metalloproteinase, Atrolysin C (Form d). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 8447-8451.
- [42] Kumasaka, T.; Yamamoto, M.; Moriyama, H.; Tanaka, N.; Sato, M.; Katsube, Y.; Yamakawa, Y.; Omori-Satoh, T.; Iwanaga, S.; Ueki, T. Crystal Structure of H2-Proteinase from the Venom of *Trimeresurus flavoviridis*. *J. Biochem.* **1996**, *119*, 49-57.
- [43] Gong, W.; Zhu, X.; Liu, S.; Teng, M.; Niu, L. Crystal Structures of Acutolysin A, a Three-disulfide Hemorrhagic Zinc Metalloproteinase from the Snake Venom of *Agkistrodon acutus*. *J. Mol. Biol.* **1998**, *283*, 657-668.
- [44] Zhu, X.; Teng, M.; Niu, L. Structure of Acutolysin-C, a Haemorrhagic Toxin from the Venom of *Agkistrodon acutus*, Providing Further Evidence for the Mechanism of the pH-Dependent Proteolytic Reaction of Zinc Metalloproteinases. *Acta Cryst.* **1999**, *D55*, 1834-1841.
- [45] Huang, K. F.; Chiou, S. H.; Ko, T. P.; Wang, A. H. Determinants of the Inhibition of a Taiwan Habu Venom Metalloproteinase by its Endogenous Inhibitors Revealed by X-Ray Crystallography and Synthetic Inhibitor Analogues. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 3047-3056.



- [46] Muniz, J. R. C.; Ambrósio, A. L. B.; Selistre-de-Araújo, H. S.; Cominetti, M. R.; Moura-da-Silva, A. M.; Oliva, G.; Garratt, R. C.; Souza, D. H. F. The Three-Dimensional Structure of Bothropasin, the Main Hemorrhagic Factor from *Bothrops jararaca* Venom: Insights for a New Classification of Snake Venom Metalloprotease Subgroups. *Toxicon* **2008**, *52*, 807-816.
- [47] Cirilli, M.; Gallina, C.; Gavuzzo, E.; Giordano, C.; Gomis-Rüth, F. X.; Gorini, B.; Kress, L. F.; Mazza, F.; Paradisi, M. P.; Pochetti, G.; Politi, V. 2 Å X-Ray Structure of Adamalysin II Complexed with a Peptide Phosphonate Inhibitor Adopting a Retro-Binding Mode. *FEBS Lett.* **1997**, *418*, 319-322.

## **Anexos**

### **Trabalhos baseados nos resultados obtidos**

- Os resultados obtidos por esse trabalho foram submetidos na revista *Journal of Medicinal Chemistry* com o título “Biochemical/Biological Activities and Structural Insights into the Inhibitory Mechanism of a Novel Synthetic Quinolinone with Anti-Ophidic Properties”. 2013