

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA

LEANDRO SCORSIN

INVESTIGAÇÃO CONFORMACIONAL DA ESTRUTURA COM ATIVIDADE
ANTI-HCV DA RIBAVIRINA E VIRAMIDINA E DOS NUCLEOSÍDEOS NATURAIS
ADENOSINA E GUANOSINA

PONTA GROSSA
2013

LEANDRO SCORSIN

INVESTIGAÇÃO CONFORMACIONAL DA ESTRUTURA COM ATIVIDADE
ANTI-HCV DA RIBAVIRINA E VIRAMIDINA E DOS NUCLEOSÍDEOS NATURAIS
ADENOSINA E GUANOSINA

Dissertação apresentada para a obtenção do título
de Mestre no Programa de Pós-Graduação em
Química Aplicada da Universidade Estadual de
Ponta Grossa.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Barbara Celânia Fiorin.

PONTA GROSSA
2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Scorsin, Leandro

S423 Investigação conformacional da
estrutura com atividade anti-hcv da
ribavirina e viramidina e dos nucleosídeos
naturais adenosina e guanosina/ Leandro
Scorsin. Ponta Grossa, 2013.
112f.

Dissertação (Mestrado em Química
Aplicada - Área de Concentração: Química),
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientadora: Prof^a Dr^a Barbara Cêlania
Fiorin.

1.Cálculos teóricos. 2.Análise
conformacional. 3.Ribavirina. I.Fiorin,
Barbara Cêlania. II. Universidade
Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em
Química Aplicada. III. T.

CDD: 547

TERMO DE APROVAÇÃO

LEANDRO SCORSIN

**“INVESTIGAÇÃO CONFORMACIONAL DA ESTRUTURA COM
ATIVIDADE ANTI-HCV DA RIBAVIRINA E VIRAMIDINA E DOS
NUCLEOSÍDEOS NATURAIS ADENOSINA E GUANOSINA”**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Orientador:


Prof. Dra. Bárbara Celânia Fiorin
UEPG/PR


Prof. Dr. Adriano Gonçalves Viana
UEPG/PR


Prof. Dr. Paulo Roberto de Oliveira
UTFPR /PR

Ponta Grossa, 26 de fevereiro de 2013.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me concedido sabedoria e capacidade suficiente para completar mais essa etapa em minha vida e posteriormente faço do mesmo uma moeda de retribuição ao apoio, incentivo e torcida de meus pais Luiz Leone e Lidia Odete e minha namorada amada, Fran.

Agradeço a minha orientadora Prof^a Dr^a Barbara Celânia Fiorin, que me auxiliou e concedeu novos conhecimentos para meu desenvolvimento.

Agradeço aqueles amigos que sempre estiveram me auxiliando, divertindo-me e, com certeza, dividindo comigo os melhores momentos de minha vida. Elas que estavam nos momentos bons e ruins em minha jornada, porém foram mais os bons que elas ajudaram, pois não tinha como ficar triste ao lado delas. De quem estou falando? Claro que estou falando da Tai e da Carol.

Agradeço a turma do futebol de quarta que não se limitava a uma simples hora de lazer e sim a uma válvula de escape para o stress semanal. Essa era a escalação: Fabio Santana, Rodolfo, Vitor, Rômulo, Filipy, Tufy, Thiago, Rodolfo Bonoto e quando apareciam Renan e Jehomar. Claro não da pra esquecer do Professor Serjão, que sempre estava disposto para um churrasco, lembrar da turma do pós futebol, Tiago Bortolini e Branco e incluir a turma da suplementação, Gustavo e Diego Luan.

Aos meus amigos do laboratório: Larissas (Sens e Schmidt), Danielas (Inglês e Hass) e claro pela gangue do L-13, que garantia umas boas risadas minhas, formada por Duda, Yara, João e Laíz.

Ao professor Ernani Abicht Basso da Universidade Estadual de Maringá, que abriu as portas de seu laboratório para nos receber e aos seus pós-graduandos Thiago Rozada, Ulisses Zonta e Mariane Bagatin que foram muito atenciosos e solícitos quando precisamos de ajuda. Obrigado pelo apoio.

Gentilmente, agradeço pelo PPGQA que sempre forneceu infraestrutura suficiente para concluir as etapas propostas ao meu mestrado e também agradeço ao programa e a CAPES pela concessão do apoio financeiro por todo o período do curso.

A todos aqueles que eu não vos chamo de professores, mas sim mestres que me orientaram e passaram a mim todos os conhecimentos possíveis que consegui assimilar e me fizeram preparado para concluir essa etapa. Especialmente ressalvo aqui os nomes daqueles que serão exemplos de como desejarei ser no futuro como professor. Novamente, agradeço a Professora Barbara Celânia Fiorin e aos Professores Adriano Viana, Jarem Raul Garcia e a Professora Jacqueline Aparecida Marques.

RESUMO

A Ribavirina é um composto análogo a Guanosina e possui larga aplicação em atividades antivirais contra vários DNA ou RNA vírus. Na célula humana, a Ribavirina é fosforilada formando um metabólito que inibe uma enzima envolvida na síntese da Guanosina trifosfato. Essa enzima é necessária para a replicação do RNA viral, afetando diretamente seu crescimento. No estado sólido a Ribavirina cristaliza-se em duas diferentes formas. Existem estudos de RMN na literatura que tratam da Ribavirina em solução. Recentemente, foram efetuados testes para o tratamento do vírus da hepatite com uma nova droga, a Viramidina. Sua estrutura é semelhante a da Ribavirina, porém existe uma mudança no grupo carboxiamida, pois a carbonila é substituída por um grupo C=NH. A Viramidina mostrou um menor efeito colateral no organismo quando comparada a Ribavirina. Com base nestas informações, o objetivo geral do trabalho foi a análise conformacional dos fármacos Ribavirina, de forma teórica e experimental, e Viramidina, apenas de forma teórica. Posteriormente foram efetuados os cálculos dos nucleosídeos naturais Adenosina e Guanosina, visto que estes são semelhantes estruturalmente a ambos os fármacos. Utilizando o conjunto de programas *GAUSSIAN 03*, realizou-se uma sequência de scans analisando dois ângulos diedros de cada estrutura. Sendo assim foram construídas quatro superfícies de energia potencial com nível de teoria *HF/6-311G*. As conformações presentes nos pontos de mínimo de energia foram otimizadas em fase isolada. Em cálculos com rotinas de solvatação realizou-se a execução de *single-point*, segundo o modelo do contínuo polarizável (*PCM*), com nível de teoria *B3LYP/cc-pVDZ*. Para explicar as preferências conformacionais dos mínimos globais de cada fármaco ou de cada nucleosídeo analisado, foram utilizados como ferramentas os mapas de potencial eletrostático e os cálculos de orbitais naturais de ligação. Foi observado que para os fármacos existe uma variação entre a conformação estável em fase isolada e em solvatação. Uma conformação apenas foi a mais estável em fase isolada para ambos os fármacos e como mesma característica entre eles, o hidrogênio da hidroxila ligada ao carbono 5 da ribose está próximo de um átomo de nitrogênio do anel triazólico, justificando uma interação intramolecular do tipo ligação de hidrogênio que estabiliza essas conformações. Em solvatação as conformações com maior momento de dipolo foram as mais estáveis, visto que o meio de solvatação polar favorece essas conformações. Para os nucleosídeos foram encontrados resultados diferentes não seguindo as mesmas relações dos fármacos. Experimentalmente, para a Ribavirina foi elaborado uma rota de extração do fármaco. Ela foi isolada das cápsulas do medicamento, empregando filtração simples seguida de extração líquido-líquido com éter etílico. A fase orgânica foi rotaevaporada obtendo assim a Ribavirina pura. O produto foi caracterizado por espectroscopia na região do infravermelho, em pastilha de KBr e Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , em D_2O e DMSO-d_6 . Os resultados obtidos foram comparados com os resultados teóricos, incluindo as frequências teóricas relacionadas aos números de onda experimentais e as constantes de acoplamento, a duas e três ligações encontradas nos espectros de ressonância e no resultado do cálculo das constantes de acoplamento teóricas.

Palavras-chave: Cálculos teóricos, Análise conformacional, Ribavirina.

ABSTRACT

Ribavirin is a similar compound to Guanosine, and it has wide application in antiviral activity against several DNA and RNA viruses. In human cells, the Ribavirin is phosphorylated forming a metabolite which inhibits an enzyme involved in synthesis of guanosine triphosphate. This enzyme is required for viral RNA replication, directly affecting their growth. In the solid state the Ribavirin crystallizes in two different ways. There NMR studies in the literature that deal with the Ribavirin in solution. Recently, tests were performed to treat hepatitis virus with a new drug, Viramidine. Its structure is similar to that of Ribavirin, but there is a change in group carboxamide, since the carbonyl group is replaced by a C=NH. The Viramidine showed a less harmful and less widespread in the body when compared to Ribavirin. Based on this information, the general objective of the work was the conformational analysis of drug Ribavirin, as theoretical as experimental, and Viramidine just in theoretical calculation. Subsequent calculations were performed to natural nucleosides Adenosine and Guanosine, because they are structurally similar to both drugs. Using the package of programs GAUSSIAN 03 the analysis was performed of a series of scans in two dihedral angles of each structure. Then it was built four potential energy surfaces with HF/6-311G level of theory. The conformations present at the point of minimum energy were optimized in isolated phase. In calculations with solvation routines was performed the execution of single-point, according to the polarizable continuum model (PCM), with level of theory with B3LYP/cc-pVDZ. To explain the conformational preferences of global minimum of each nucleoside or drug analyzed have been used as tools maps of electrostatic potential and natural bonding orbital calculations. It was observed that for drugs there were a variation of stable conformation between the isolated phase and solvation. Only one conformation was the most stable in isolated phase for both drugs and having the same characteristic between them, the hydroxyl's hydrogen connected to carbon 5 of ribose is close to a nitrogen atom of the triazole ring, justifying an intramolecular interaction of the type hydrogen bond that stabilizes these conformations. In medium of polar solvating conformations with greater dipole moment were the most stable since the medium of polar solvating preferred these conformations. For nucleosides were found different results that don't following the same relations of drugs. It was isolated from the drug capsules, employing simple filtration followed by liquid-liquid extraction with ethyl ether. The organic phase was evaporated with a rotary evaporator thus obtaining the pure Ribavirin. The product was characterized by Infrared Spectroscopy on KBr pellets and Nuclear Magnetic Resonance ^1H and ^{13}C NMR in D_2O and DMSO-d_6 . The results obtained were compared with the theoretical results, including theoretical frequencies related to experimental wave numbers and coupling constants for two and three bonds found in the resonance spectra and the results of calculation of the theoretical coupling constants.

Keywords: Theoretical calculations, Conformational analysis, Ribavirin.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Estrutura molecular da Ribavirina..... | 16 |
| Figura 2 – Gráfico de Fluorescência na região do <i>UV</i> indicando a relação da <i>[RTP]</i> com a cadeia proteica do <i>RNA</i> do vírus..... | 17 |
| Figura 3 – Mudança de ângulo da Ribavirina e simulação das estruturas da Adenosina e da Guanosina..... | 18 |
| Figura 4 – Estrutura molecular da Viramidina. | 18 |
| Figura 5 – Rotas sintéticas para a obtenção da Viramidina. | 19 |
| Figura 6 – Fármacos no organismo. | 20 |
| Figura 7 – Conversão entre os fármacos no organismo..... | 20 |
| Figura 8 – Representação da estrutura de um nucleotídeo/nucleosídeo..... | 21 |
| Figura 9 – Nucleosídeos naturais (a) Adenosina e (b) Guanosina..... | 22 |
| Figura 10 – Curva de energia potencial do Butano pelo giro na ligação entre $C_2 - C_3$ | 23 |
| Figura 11 – Superfície de energia potencial tridimensional do ácido fumárico..... | 26 |
| Figura 12 – (a) Formaldeído em meio aquoso e (b) Continuo dielétrico inserido em dipolos pontuais do formaldeído..... | 30 |
| Figura 13 – Estrutura dos quatro metabólitos da dipirona com seus MPEs e a escala de valores relativa as cargas positivas e negativas distribuídas nas moléculas..... | 31 |
| Figura 14 – (A) Espectro de IV, (B) Cálculo de frequência pelo método <i>HF/6-311G(d,p)</i> , (C) frequências pelo método <i>B3LYP/6-31G(d,p)</i> e (D) frequências pelo método <i>B3LYP/6-311G(d,p)</i> da 4-cloro-2-bromoacetofenona..... | 34 |
| Figura 15 – Espectros de RMN de 1H e ^{13}C do 1,4-dimetoxibenzeno..... | 36 |
| Figura 16 – Curva de <i>Karplus</i> | 37 |
| Figura 17 – Espectro de RMN de 1H em D_2O em 60 <i>MHz</i> da (a) 2,6-diaminopiridina e da (b) citosina..... | 38 |
| Figura 18 – Estrutura molecular da Ribavirina e ângulos diedros A (O-C-C-C) e B (O-C-N-N)..... | 40 |
| Figura 19 – Superfície de energia potencial tridimensional (SEP 3D)..... | 41 |

| | |
|--|----|
| Figura 20 – (a) Superfície de energia potencial tridimensional com nível de teoria <i>HF/6-311G</i> e (b) mapa de contorno da Ribavirina com a localização das seis conformações envolvidas no equilíbrio..... | 45 |
| Figura 21 – As conformações mais estáveis da Ribavirina..... | 46 |
| Figura 22 – Mapas de potencial eletrostático da RIBAV 1..... | 47 |
| Figura 23 - Ligações de hidrogênio intramoleculares na RIBAV 1..... | 47 |
| Figura 24 – Conformações majoritárias sob rotinas de solvatação, H ₂ O e DMSO.... | 50 |
| Figura 25 – Projeções de <i>Newman</i> da Ribavirina e valores dos ângulos diedros formados entre os hidrogênios..... | 54 |
| Figura 26 – Espectro de infravermelho da Ribavirina..... | 55 |
| Figura 27 – Espectro de infravermelho da Ribavirina, região entre 2800-3700 cm ⁻¹ | 56 |
| Figura 28 – Espectro de infravermelho da Ribavirina, região entre 1600-1800 cm ⁻¹ | 57 |
| Figura 29 – RMN de ¹³ C em D ₂ O na frequência de 75,457 MHz..... | 58 |
| Figura 30 – Representação da Ribavirina com numeração em seus carbonos e deslocamentos químicos obtidos em D ₂ O na frequência de 75,457 MHz..... | 58 |
| Figura 31 – Espectro de RMN de próton em D ₂ O na frequência de 300,058 MHz.... | 59 |
| Figura 32 – Expansão dos sinais em 3,75 a 3,92 ppm e diagrama de árvore em D ₂ O..... | 61 |
| Figura 33 – Expansão dos sinais em 4,22 a 4,26 ppm e diagrama de árvore em D ₂ O..... | 62 |
| Figura 34 – Expansão dos sinais em 4,52 e 4,67 ppm e diagrama de árvore em D ₂ O..... | 62 |
| Figura 35 – Expansão dos sinais em 4,52 e 4,67 ppm e diagrama de árvore em D ₂ O..... | 63 |
| Figura 36 – RMN de ¹³ C em DMSO-d ₆ na frequência de 75,457MHz..... | 63 |
| Figura 37 – Representação da Ribavirina com numeração em seus carbonos e deslocamentos químicos obtidos em DMSO-d ₆ na frequência de 75,457MHz..... | 64 |
| Figura 38 – Espectro de RMN de próton em DMSO-d ₆ na frequência de 300,058 MHz..... | 64 |
| Figura 39 – Expansão dos sinais em 3,62 ppm e diagrama de árvore em DMSO-d ₆ | 66 |

| | |
|--|----|
| Figura 40 – Expansão dos sinais em 3,94 e 4,13 ppm e diagrama de árvore em DMSO-d ₆ | 67 |
| Figura 41 – Expansão dos sinais em 4,35 ppm e diagrama de árvore em DMSO-d ₆ | 68 |
| Figura 42 – Expansão dos sinais em 5,81 e 8,87 ppm e diagrama de árvore em DMSO-d ₆ | 68 |
| Figura 43 – Expansão dos sinais em 4,35 ppm e diagrama de árvore em DMSO-d ₆ | 70 |
| Figura 44 – Expansão dos sinais em 4,35 ppm e diagrama de árvore em DMSO-d ₆ | 70 |
| Figura 45 – (a) Mapa de contorno e (b) superfície de energia potencial tridimensional da Viramidina com nível de teoria <i>HF/6-311G</i> | 73 |
| Figura 46 – As conformações mais estáveis da Viramidina..... | 74 |
| Figura 47 – As conformações majoritárias em fase isolada da (a) Ribavirina e (b) Viramidina..... | 75 |
| Figura 48 – Mapa de potencial eletrostático da VIRAD 1 com escala de potencial..... | 76 |
| Figura 49 – (a) Mapa de contorno e (b) superfície de energia potencial tridimensional da Adenosina com nível de teoria <i>HF/6-311G</i> | 79 |
| Figura 50 – As conformações mais estáveis da Adenosina..... | 79 |
| Figura 51 – Ligações de hidrogênio nas conformações da Adenosina..... | 80 |
| Figura 52 – Mapa de potencial eletrostático da ADENOS 1 com escala de potencial..... | 81 |
| Figura 53 – (a) Superfície de energia potencial tridimensional e (b) mapa de contorno da Guanosina com nível de teoria <i>HF/6-311G</i> | 84 |
| Figura 54 – As conformações mais estáveis da Guanosina..... | 84 |
| Figura 55 – Ligações de hidrogênio na GUANOS 1..... | 85 |
| Figura 56 – Mapa de potencial eletrostático da GUANOS 1 com escala de potencial..... | 86 |
| Figura 57 – Conformações estáveis da RIBAV, VIRAD, ADENOS e GUANOS..... | 93 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Energias, energias relativas, populações e momento de dipolo em fase isolada da Ribavirina com nível de teoria <i>B3LYP/cc-pVDZ</i> | 46 |
| Tabela 2 – Energia Total, com Deleção e ΔE_{Del} através do cálculo de <i>NBO</i> para Ribavirina com nível de teoria <i>B3LYP/cc-pVDZ</i> | 48 |
| Tabela 3 – Interações Hiperconjugativas e suas energias, Ocupância doador, Ocupância acceptor e Tipo de Interação, obtidas na RIBAV 1 pelo cálculo de <i>NBO</i> , nível de teoria <i>B3LYP/cc-pVDZ</i> | 49 |
| Tabela 4 – Energias, energias relativas e populações em meio aquoso da Ribavirina pelo método <i>PCM</i> , <i>B3LYP/cc-pVDZ</i> | 49 |
| Tabela 5 – Energias, energias relativas e populações em DMSO da Ribavirina pelo método <i>PCM</i> , <i>B3LYP/cc-pVDZ</i> | 50 |
| Tabela 6 – Frequências teóricas obtidas em nível de teoria <i>HF/6-311G(d,p)</i> | 52 |
| Tabela 7 – Constantes de acoplamento teóricas e os respectivos ângulos diedro formado entre os hidrogênios e constantes de acoplamento calculadas para cada solvente..... | 54 |
| Tabela 8 – Número de onda e grupo caracterizado pelo espectro na região do IV...57 | 57 |
| Tabela 9 – Representação da Ribavirina com numeração em seus carbonos, deslocamentos químicos e acoplamentos obtidos em D_2O na frequência de 300,058 MHz..... | 60 |
| Tabela 10 – Representação da Ribavirina com numeração em seus carbonos, deslocamentos químicos e acoplamentos obtidos em $DMSO-d_6$ na frequência de 300,058 MHz..... | 65 |
| Tabela 11 – Constantes de acoplamento teóricas e experimentais para a Ribavirina..... | 71 |
| Tabela 12 – Frequências (ν) teóricas e experimentais relacionadas aos grupos observados..... | 73 |
| Tabela 13 – Energias, energias relativas, populações e momento de dipolo em fase isolada da Viramidina com nível de teoria <i>B3LYP/cc-pVDZ</i> | 74 |
| Tabela 14 – Energia Total, com Deleção e ΔE_{Del} através do cálculo de <i>NBO</i> para Viramidina com nível de teoria <i>B3LYP/cc-pVDZ</i> | 76 |
| Tabela 15 – Interações Hiperconjugativas e suas energias, Ocupância doador, Ocupância acceptor e Tipo de Interação, obtidas na VIRAD 1 pelo cálculo de <i>NBO</i> , nível de teoria <i>B3LYP/cc-pVDZ</i> | 77 |

| | |
|---|----|
| Tabela 16 – Energias, energias relativas e populações em meio aquoso da Viramidina pelo método <i>PCM</i> , <i>B3LYP/cc-pVDZ</i> | 78 |
| Tabela 17 – Energias relativas, populações e momento de dipolo em fase isolada da Adenosina com nível de teoria <i>B3LYP/cc-pVDZ</i> | 79 |
| Tabela 18 – Energia Total, com Deleção e ΔE_{Del} através do cálculo de NBO para Adenosina com nível de teoria <i>B3LYP/cc-pVDZ</i> | 81 |
| Tabela 19 – Interações Hiperconjugativas e suas energias, Ocupância doador, Ocupância acceptor e Tipo de Interação, obtidas na ADENOS 1 e 2 pelo cálculo de NBO, nível de teoria <i>B3LYP/cc-pVDZ</i> | 82 |
| Tabela 20 – Energias e populações em solvatação da Adenosina pelo método <i>PCM</i> , <i>B3LYP/cc-pVDZ</i> | 83 |
| Tabela 21 – Energias relativas, populações e momento de dipolo em fase isolada da Guanosina com nível de teoria <i>B3LYP/cc-pVDZ</i> | 85 |
| Tabela 22 – Energia Total, com Deleção e ΔE_{Del} através do cálculo de NBO para a Guanosina com nível de teoria <i>B3LYP/cc-pVDZ</i> | 87 |
| Tabela 23 – Interações Hiperconjugativas e suas energias, Ocupância doador, Ocupância acceptor e Tipo de Interação, obtidas na GUANOS 1 pelo cálculo de NBO, nível de teoria <i>B3LYP/cc-pVDZ</i> | 87 |
| Tabela 24 – Energias e populações em solvatação da Guanosina pelo modelo <i>PCM</i> , <i>B3LYP/cc-pVDZ</i> | 88 |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|------------|---|
| RMN | Ressonância magnética nuclear. |
| FT-IR | Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de <i>Fourier</i> (do inglês " <i>Fourier Transform Infrared</i> "). |
| DNA | Ácido Desoxirribonucléico (do inglês, " <i>Deoxyribonucleic Acid</i> "). |
| RNA | Ácido Ribonucléico (do inglês, " <i>Ribonucleic Acid</i> "). |
| GTP | Guanosina trifosfato. |
| RTP | Ribavirina trifosfato |
| PEG | Polietilenoglicol. |
| DMSO | Dimetilsulfóxido. |
| DFT | Teoria do Funcional de Densidade (do inglês " <i>Density Functional Theory</i> "). |
| HF | Método de <i>Hartree-Fock</i> . |
| SEP | Superfície de energia potencial. |
| ZPE | Energia do ponto zero (do inglês, " <i>Zero-point Energy</i> "). |
| PCM | Modelo contínuo polarizável (do inglês " <i>Polarizable Continuum Model</i> "). |
| MPE | Mapas de potencial eletrostático. |
| $^1J_{CH}$ | Constante de acoplamento a uma ligação |
| $^2J_{HH}$ | Constante de acoplamento a duas ligações |
| $^3J_{HH}$ | Constante de acoplamento a três ligações |
| $^4J_{HH}$ | Constante de acoplamento a longa distância |
| J_{teo} | Constante de acoplamento teórica |
| J_{cal} | Constante de acoplamento calculada |
| IV | Infravermelho. |
| IA | Interação A. |
| IB | Interação B. |

LISTA DE EQUAÇÕES

| | |
|--|----|
| (Equação 1) – Equação de <i>Schrödinger</i> | 23 |
| (Equação 2) – Equação de Arrhenius..... | 28 |
| (Equação 3) – Constante de equilíbrio da energia livre de Gibbs de ativação..... | 28 |
| (Equação 4) – Constante de equilíbrio da energia relativa..... | 29 |
| (Equação 5) – Energia relativa entre as a e b..... | 29 |
| (Equação 6) – Constante de equilíbrio da energia relativa pela razão entre as frações molares de a e b..... | 29 |
| (Equação 7) – Orbitais ligantes e antiligantes com combinações das valências híbridas..... | 32 |
| (Equação 8) – Constante de acoplamento total e spin-spin pela somatória entre as constantes de contato de <i>Fermi</i> , spin-dipolar e spin-orbital diamagnético e paramagnético..... | 38 |
| (Equação 9) – Constante de acoplamento calculada pela média ponderada entre as constantes teóricas e as populações em determinados solventes..... | 42 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 1.1. RIBAVIRINA..... | 16 |
| 1.2. VIRAMIDINA..... | 18 |
| 1.3. ADENOSINA E GUANOSINA..... | 21 |
| 1.4. ANÁLISE CONFORMACIONAL..... | 22 |
| 1.5. CÁLCULOS TEÓRICOS..... | 23 |
| 1.5.1. TEORIA DO FUNCIONAL DE DENSIDADE..... | 24 |
| 1.5.2. SUPERFÍCIE DE ENERGIA POTENCIAL..... | 26 |
| 1.5.3. OTIMIZAÇÃO E FREQUÊNCIA..... | 27 |
| 1.5.4. DETERMINAÇÃO DAS POPULAÇÕES DOS CONFÔRMEROS..... | 28 |
| 1.5.5. CÁLCULOS COM ROTINA DE SOLVATAÇÃO..... | 29 |
| 1.5.6. MAPAS DE POTENCIAL ELETROSTÁTICO..... | 30 |
| 1.5.7. ORBITAL NATURAL DE LIGAÇÃO..... | 32 |
| 1.6. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS..... | 33 |
| 1.6.1. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO..... | 33 |
| 1.6.2. ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR..... | 35 |
| 2. OBJETIVOS..... | 39 |
| 2.1. OBJETIVOS GERAIS..... | 39 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 39 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 40 |
| 3.1. PARTE COMPUTACIONAL..... | 40 |
| 3.2. PARTE EXPERIMENTAL..... | 42 |
| 3.2.1. EXTRAÇÃO DA RIBAVIRINA..... | 42 |
| 3.2.2. <i>FT-IR</i> | 44 |
| 3.2.3. RMN..... | 44 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 45 |
| 4.1. RIBAVIRINA..... | 45 |
| 4.1.1. RESULTADOS TEÓRICOS..... | 45 |
| 4.1.2. RESULTADOS EXPERIMENTAIS..... | 55 |
| 4.1.2.1. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO..... | 55 |
| 4.1.2.2. ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR..... | 58 |

| | |
|--|------------|
| 4.1.3. COMPARAÇÃO DO RESULTADO EXPERIMENTAIS COM OS TEÓRICOS..... | 71 |
| 4.2. VIRAMIDINA..... | 73 |
| 4.3. NUCLEOSÍDEOS NATURAIS..... | 78 |
| 4.3.1. ADENOSINA..... | 78 |
| 4.3.2 GUANOSINA..... | 83 |
| 5. CONCLUSÃO..... | 89 |
| 6. REFERÊNCIAS..... | 94 |
| ANEXO A – ESPÉCTRO DE INFRAVERMELHO DA RIBAVIRINA..... | 98 |
| ANEXO B – ESPÉCTROS DE RMN DE ¹H EM D₂O DA RIBAVIRINA | 101 |
| ANEXO C – ESPÉCTROS DE RMN DE ¹³C EM D₂O DA RIBAVIRINA..... | 104 |
| ANEXO D – ESPÉCTROS DE RMN DE ¹H EM DMSO-d₆ DA RIBAVIRINA..... | 107 |
| ANEXO E – ESPÉCTROS DE RMN DE ¹³C EM DMSO-d₆ DA RIBAVIRINA..... | 111 |

1. INTRODUÇÃO

O avanço científico dos últimos anos foi possível pelo crescimento tecnológico, em vários ramos. Alguns desses campos são destacados como a microscopia e a modelagem. O desenvolvimento computacional está notoriamente ligado a esses avanços, bem como na elaboração de *softwares* que possam criar interfaces que facilitem a estimativa, visualização e determinação de características químicas, físicas e biológicas das moléculas, que anteriormente eram atribuídas com metodologias empíricas e clássicas (FARIAS, 2005).

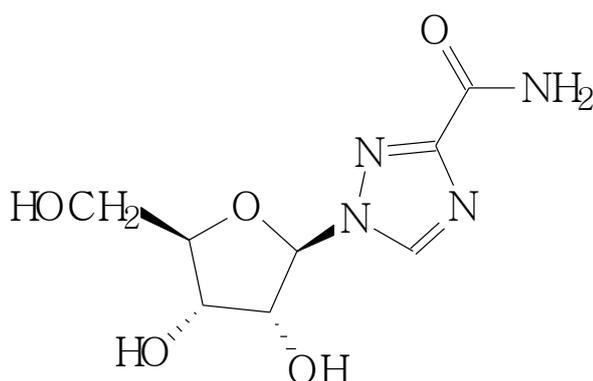
Atualmente a simulação computacional é muito aplicada em quase todas as áreas de pesquisas, sendo usadas metodologias moleculares ou quânticas. Estudos prévios possibilitam obter estruturas e comportamentos conformacionais em determinados compostos como biomoléculas e fármacos, entre outras. Além do isolamento da geometria mais estável ser obtido por essa metodologia, o comportamento em diferentes solventes e parâmetros que podem ser comparados com dados experimentais, na maioria espectroscópicas, também podem ser determinados. Por fim comparações realizadas *in vivo*, *in vitro* e testes microbiológicos também são estimados por cálculos de comportamento molecular simulado, chamado *docking* molecular (OLIVEIRA et al., 2010).

No presente trabalho o foco principal foi a simulação computacional de dois fármacos, Ribavirina e Viramidina, visando a análise conformacional em fase isolada e em cálculos com rotinas de solvatação. Os resultados obtidos teoricamente foram comparados com os dados experimentais, obtidos pelas técnicas espectrais de ressonância magnética nuclear (RMN) e na região do infravermelho com transformada de *Fourier* (FT-IR, do inglês "*Fourier Transform Infrared*"). A sequência do trabalho foi a análise conformacional somente teórica de dois análogos a estes fármacos, Adenosina e Guanosina. As estruturas moleculares estudadas, tanto da Ribavirina quanto da Viramidina são semelhantes a esses nucleosídeos naturais. Assim, semelhanças nos resultados entre todas as estruturas devem ser esperadas.

1.1. RIBAVIRINA

A Ribavirina (1- β -D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida, Figura 1) é um composto análogo a Guanosina, sintetizado a mais de 35 anos e possui larga aplicação em função de sua atividade contra vários *DNA* e *RNA* vírus (HOFMANN et al., 2008).

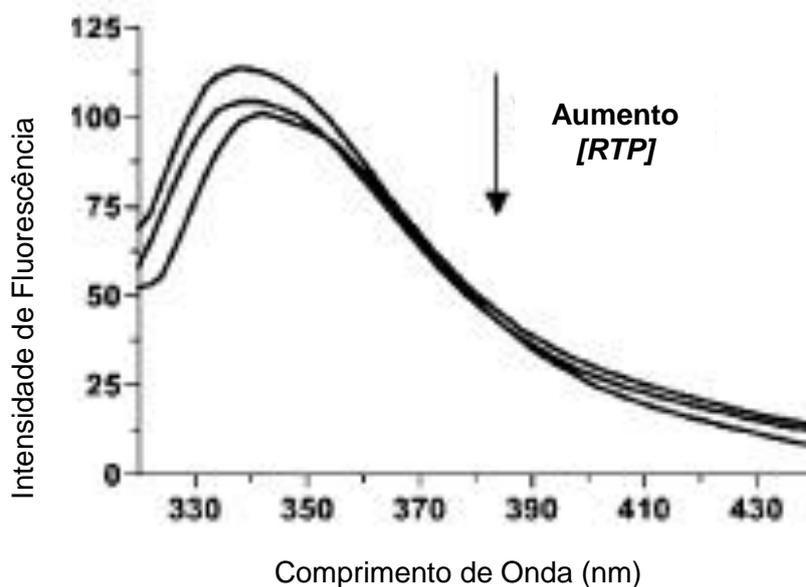
Figura 1 – Estrutura molecular da Ribavirina.



Fonte: O autor.

Na célula humana, a Ribavirina é fosforilada pela cinética celular formando um metabólito trifosfatado. Esse metabólito tem se mostrado como um inibidor da inosina monofosfato desidrogenase da célula hospedeira, porém também está envolvido na síntese da Guanosina trifosfato (*GTP*). Essa enzima, a inosina monofosfato desidrogenase, é necessária para a transcrição do genoma viral, e replicação do *RNA* do vírus, assim a diminuição na concentração dessa enzima afeta diretamente a multiplicação do vírus. Um estudo analisou essa relação inversa entre a presença da Ribavirina trifosfatada, (*RTP*) e a diminuição da ação do vírus, analisando a cadeia protéica do *RNA* do vírus (Figura 2). A técnica associada a essa determinação, envolve a emissão de fluorescência na região do ultravioleta (*UV*). A emissão é maior em pouca adição de *RTP*, e com o aumento da Ribavirina no meio acontece o decréscimo da fluorescência emitida pelos grupos amino ácidos da cadeia protéica do *RNA* do vírus (BOUGIE e BISAILLON, 2003).

Figura 2 – Gráfico de Fluorescência na região do UV indicando a relação da [RTP] com a cadeia protéica do RNA do vírus.

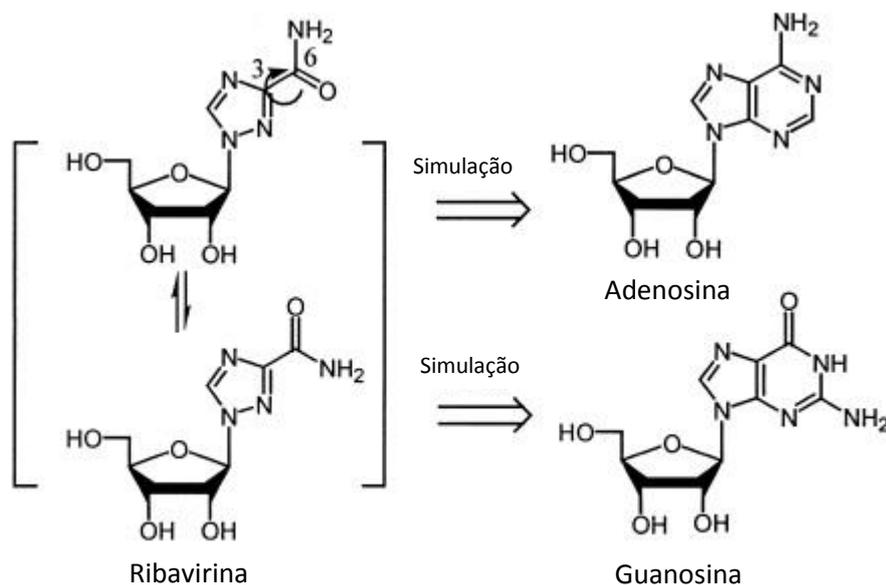


Fonte: BOUGIE e BISAILLON, 2003.

O tratamento com Ribavirina para os casos de hepatites crônicas acontece em conjunto com o Interferon α -2-preguilado ((PEG- I)- α), ou seja, a complexação do reagente PEG (polietilenoglicol) com o *Interferon*[®] (FREIRE et al., 2006). Em solução, as propriedades de derivados da Ribavirina foram investigadas por ressonância magnética nuclear, em variados solventes, já descritas na literatura (GRANCHER et al., 2005). No estado sólido ela cristaliza em duas diferentes formas *anti* e *syn* relacionando as hidroxilas da ribose com os demais substituintes da mesma (PRUSINER e SUNDARALINGAM, 1975 e LIU et al., 2005). Em um estudo teórico, as diferenças dos máximos de energia entre essas conformações foram muito pequenas e formas substituídas da Ribavirina não apresentaram diferenças para valores de energia encontrados, porém não se aprofundou nas conformações do composto que atua como inibidor do crescimento viral (MILES et al., 1976).

Um estudo demonstrou que a posição do grupo carboxiamida (Figura 3) da Ribavirina, seguida de posteriores etapas enzimática do organismo, bem como a ação da Adenosina Desaminase (no item 1.2 será falado mais sobre essa enzima), podem simular as estruturas dos nucleosídeos naturais Adenosina e Guanosina (WU, LIN e HONG, 2003).

Figura 3 – Mudança de ângulo da Ribavirina e simulação das estruturas da Adenosina e da Guanosina.

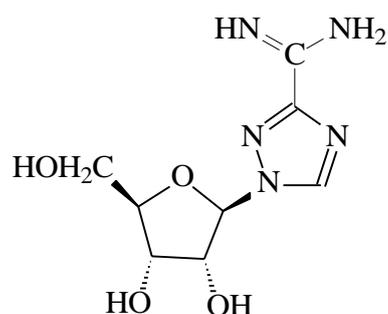


Fonte: WU, LIN e HONG, 2003.

1.2. VIRAMIDINA

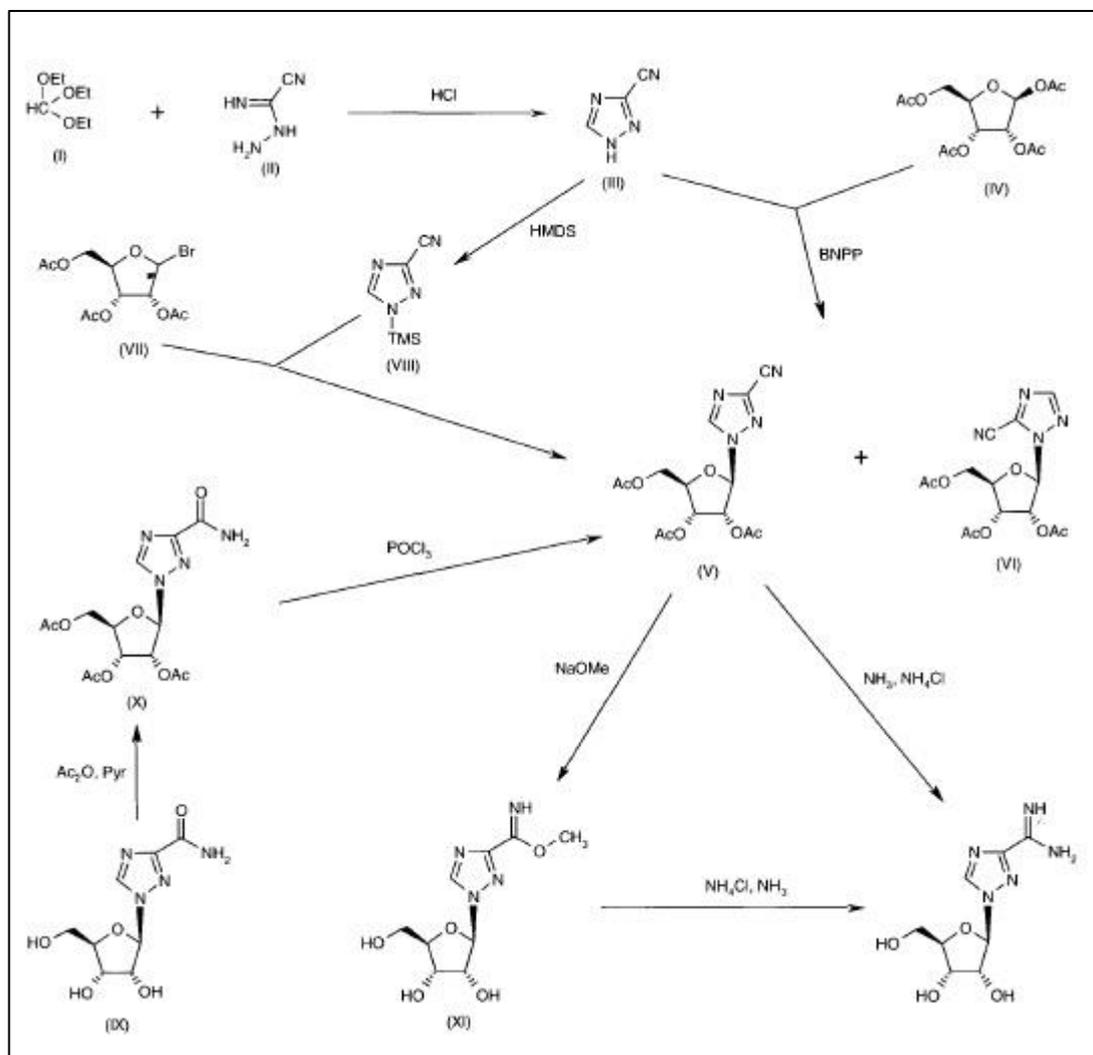
Recentemente foram efetuados testes para o tratamento do vírus da hepatite C com uma nova droga, denominada Viramidina (Figura 4). Sua estrutura molecular é análoga a da Ribavirina, porém existe uma pequena mudança no grupo carboxiamida, deixando de existir uma carbonila e no seu lugar um grupo C=NH. Sua síntese pode ser iniciada com fragmentos de moléculas orgânicas e sucessivas reações com riboses, com variações de solventes, ou a conversão da Ribavirina IX em Viramidina, conforme descrito na Figura 5 (KINI et al., 1989 e COX, 2004).

Figura 4 – Estrutura molecular da Viramidina.



Fonte: O autor.

Figura 5 – Rotas sintéticas para a obtenção da Viramidina.

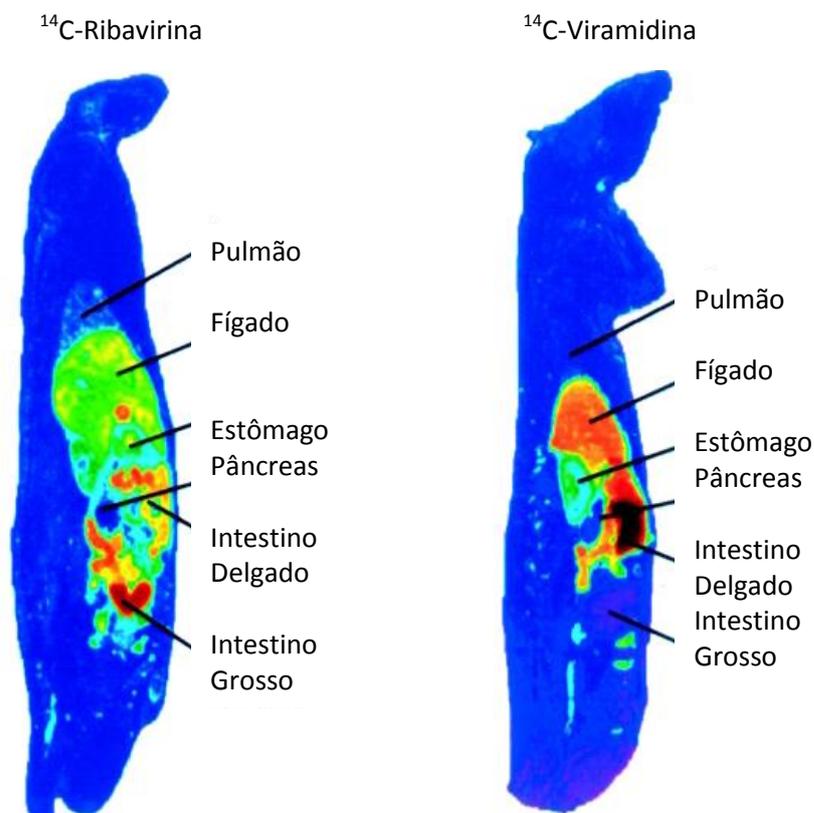


Fonte: COX, 2004.

A Viramidina, em alguns estudos, mostrou uma ação menos danosa no organismo uma vez que a Ribavirina além de inibir a transcrição do *RNA* viral age em cima de um complexo de enzimas normais ao corpo humano, causando dores de cabeça, náuseas, entre outras alterações (TAN et al., 2002).

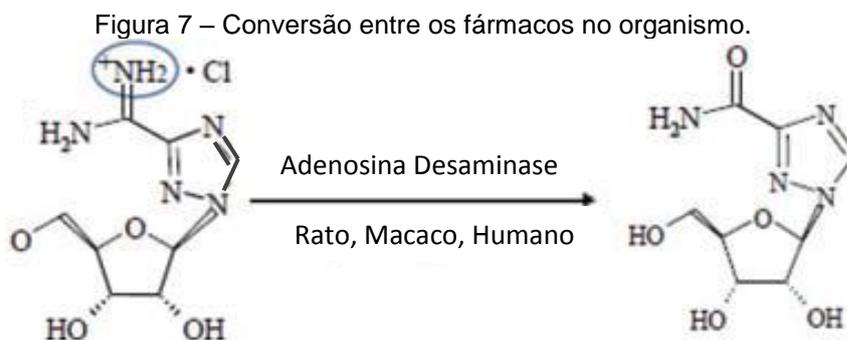
Com técnicas para marcação de biomoléculas com átomos radioativos (^{14}C) testadas em ratos observou-se que a Ribavirina se encontra espalhada no organismo, enquanto a Viramidina se concentra em maior parte nas células hepáticas. A Figura 6 demonstra isso. A coloração vermelha indica onde estão localizados os fármacos no organismo e é possível observar que a Viramidina se encontra em grande quantidade no fígado (WU, LIN e HONG, 2003).

Figura 6 – Fármacos no organismo.



Fonte: WU, LIN e HONG, 2003.

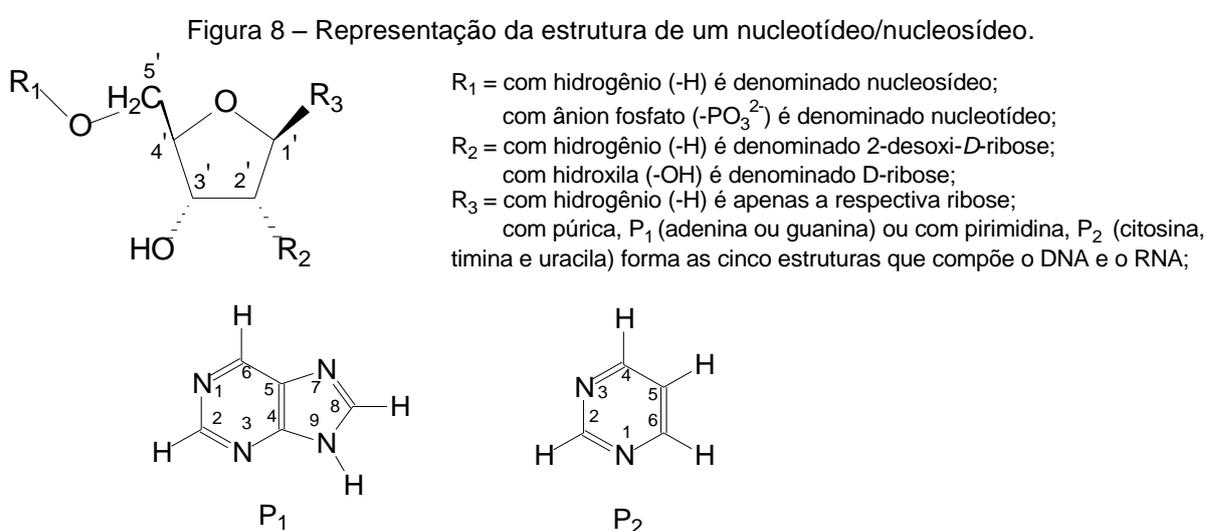
Enquanto a Ribavirina é comercializada como uma molécula neutra, a Viramidina é ministrada na forma hidrocloreto, sendo assim possui uma seletividade maior em determinados sistemas do organismo, modificando a concentração da enzima Adenosina Desaminase do meio em que está inserida, por estar mais disponível. Essa enzima é encontrada no fígado de ratos, macacos e no ser humano, e é responsável por converter a Viramidina em Ribavirina. A reação está demonstrada a seguir na Figura 7 (KWO e VINAYEK, 2010).



Fonte: KWO e VINAYEK, 2010.

1.3. ADENOSINA E GUANOSINA

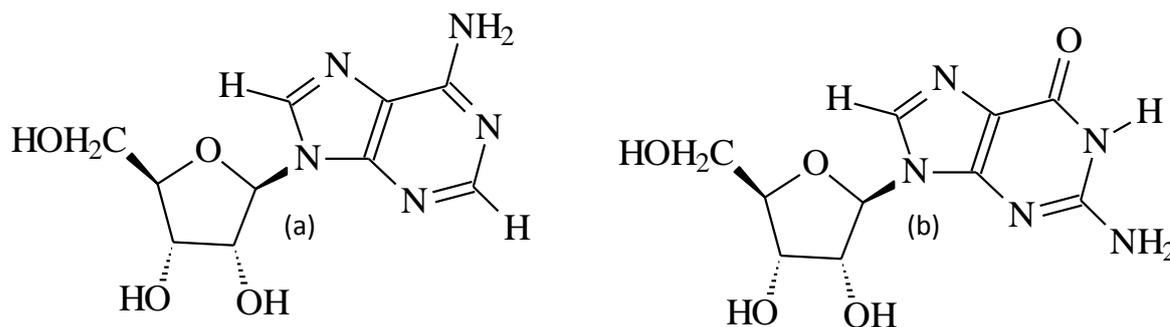
As degradações amenas dos ácidos nucleicos produzem unidades monoméricas chamadas de nucleotídeos. A hidrólise completa de um nucleotídeo fornece: uma base nitrogenada (purina, bi-ciclo formado por nove átomos, ou pirimidina, ciclo formado por seis átomos), um monossacarídeo de cinco carbonos (*D*-ribose ou 2-desoxi-*D*-ribose) e um íon fosfatado, mostrados na Figura 8. Os carbonos do monossacarídeo são indicados com números marcados com apóstrofo, por exemplo, o primeiro carbono da ribose é C1' (NELSON e COX, 2011).



Fonte: O autor.

A parte central do nucleotídeo é a ribose, onde C1' se mostra ligado à base nitrogenada por uma ligação β -*N*-glicosídica. O grupo fosfato de um nucleotídeo está presente como um éster fosfato e pode estar ligado ao C5' ou ao C3'. A remoção do grupo fosfato de um nucleotídeo o converte em um composto conhecido como um nucleosídeo. Os nucleosídeos do *DNA* possuem o monossacarídeo 2-desoxi-*D*-ribose e do *RNA*, a *D*-ribose. Ambos, *DNA* e *RNA* apresentam a base citosina (pirimidina) e as bases adenina e guanina (púricas). Em particular o *DNA* possui a base timina e o *RNA* possui a uracila. As denominações para os nucleosídeos que tem as bases purinas ligadas a *D*-ribose é Adenosina e Guanosina (Figura 9). Elas têm grande relevância quando comparadas aos fármacos Ribavirina e Viramidina, pois as estruturas moleculares são semelhantes (SOLOMONS e FRYHLE, 2000).

Figura 9 – Nucleosídeos naturais (a) Adenosina e (b) Guanosina.

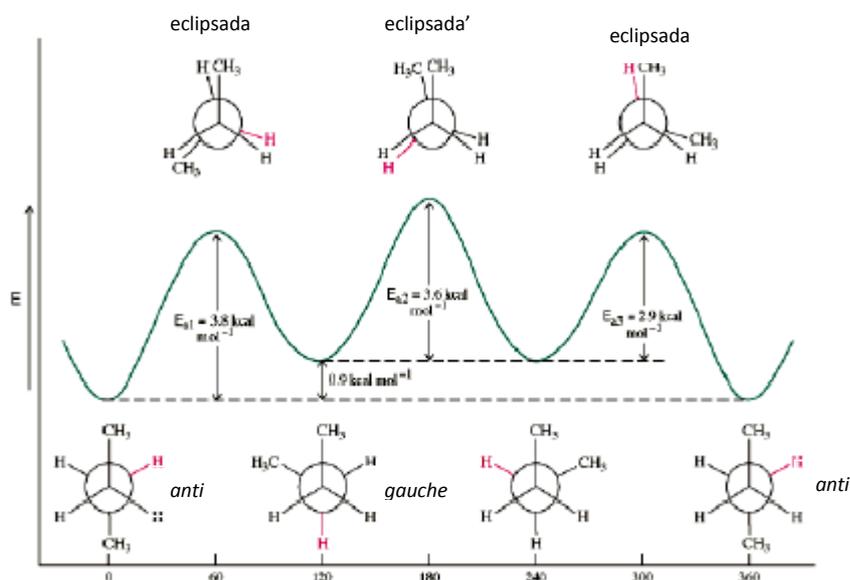


Fonte: O autor.

1.4. ANÁLISE CONFORMACIONAL

O estudo da mudança de energia que ocorre em uma molécula quando os grupos giram em torno de uma ligação simples é chamado de análise conformacional. Quando analisamos uma molécula como o butano, a ligação C₂-C₃, pode ser girada e dar origem a diferentes confôrmeros, como podemos observar na Figura 10. A forma *anti* não tem tensão torsional, pois os grupos metila são alternados e estão distantes um do outro, sendo assim o confôrmero mais estável. O grupo metila nas conformações *gauche* está próximo um do outro de modo que as forças de van der Waals são repulsivas entre si. Por último estão as conformações eclipsadas que representam os valores máximos no diagrama de energia potencial. Duas conformações eclipsadas possuem repulsões adicionais de van der Waals provenientes dos grupos metila eclipsados aos átomos de hidrogênio. A outra conformação eclipsada apresenta o pico mais elevado de energia, pelo fato de apresentar repulsão entre os grupos metila e também tensão torsional. Outro fator que estabiliza as conformações *anti* e *gauche*, é relacionada a hiperconjugação que pode ocorrer entre orbitais ligantes (ocupados) e antiligantes (livres). Essa estabilização energética está envolvida na transferência eletrônica do orbital ligante para o antiligante. A orientação espacial dos orbitais ligantes e antiligantes em conformações eclipsadas não favorece a doação eletrônica, portanto o efeito de hiperconjugação será nulo (SOLOMONS e FRYHLE, 2000).

Figura 10 – Curva de energia potencial do Butano pelo giro na ligação entre C₂ - C₃.



Fonte: SOLOMONS e FRYHLE, 2000.

1.5. CÁLCULOS TEÓRICOS

Nos últimos tempos, o avanço da tecnologia eletrônica e sistemas de informações possibilitou com que a junção de varias implementações matemáticas fossem feitas em *softwares*, resolvendo conjuntos de equações e sequências de algoritmos. Logo, o desenvolvimento de conjuntos que descrevessem processos físicos e características químicas em átomos e moléculas também foram acoplados em alguns *softwares*. Junto com esse desenvolvimento tecnológico, a química na escala atômica passava de uma descrição clássica (mecânica descrita com resoluções físicas) para uma descrição quântica (mecânica descrita com resoluções probabilísticas e estatísticas). O método quântico baseia-se na resolução da equação de *Schrödinger*, Equação 1, a qual é formada por um operador hamiltoniano, H , a função de onda, Ψ (ATKINS, 2002).

$$H \Psi = E \Psi \quad (1)$$

O resultado dessa função é atribuído quando a função de onda é definida e o valor de E tem uma solução real, ou seja, uma autofunção e um autovalor, respectivamente. Como a resolução de átomos ou moléculas deve ser iniciada com uma orientação espacial (xyz), substituem-se as definições de autofunções por autovetores. Assim a resolução de matrizes matemáticas que contém informações vetoriais de sistemas atômicos ou moleculares, apresenta fatores energéticos, termodinâmicos, estruturais, entre outros (ATKINS, 2002).

As resoluções de um cálculo podem partir de métodos semi-empíricos ou *ab initio*, do latim “desde o início”. Os semi-empíricos são formados por aproximações experimentais somadas as resoluções teóricas. Esses métodos têm como principal vantagem o menor tempo de cálculo. As desvantagens estão na garantia do resultado. Cálculos com metodologias *ab initio* não relacionam parâmetros experimentais, portanto levam em consideração apenas resoluções quânticas de sistemas. Este método tem uma demanda de tempo maior, porém o resultado é melhor (FARIAS, 2005).

1.5.1. TEORIA DO FUNCIONAL DE DENSIDADE

Esta teoria é uma alternativa interessante, principalmente no que diz respeito a qualidade dos cálculos. Na *DFT* (do inglês “*density functional theory*”) nenhuma das equações do funcional, de troca e de correlação, ou outro parâmetro necessita ser ajustado previamente, logo, neste sentido, pode-se considerar a *DFT* como uma teoria de natureza *ab initio* e como um método híbrido (FARIAS, 2005).

Os efeitos eletrônicos tornam esse método muito importante e com grande aplicabilidade, quando comparado com outros métodos, como o *Hartree-Fock* (HF), que admite apenas valores médios para interações elétron-elétron. O método *DFT* tem como defeito um tempo elevado de processo, em um cálculo de otimização de estrutura, por exemplo. Porém, é beneficiado com a qualidade computacional e no espaço de memória não elevado no arquivo de saída, ou seja, um ganho de custo computacional (MORGON e CUSTODIO, 1995).

A *DFT* é baseada na distribuição das cargas em uma molécula, a qual elucida a densidade eletrônica do conjunto de átomos, onde se considera que a energia eletrônica é um funcional único da densidade. Esta aproximação separa a energia eletrônica nos chamados funcional de troca e funcional de correlação (LEVINE, 2008).

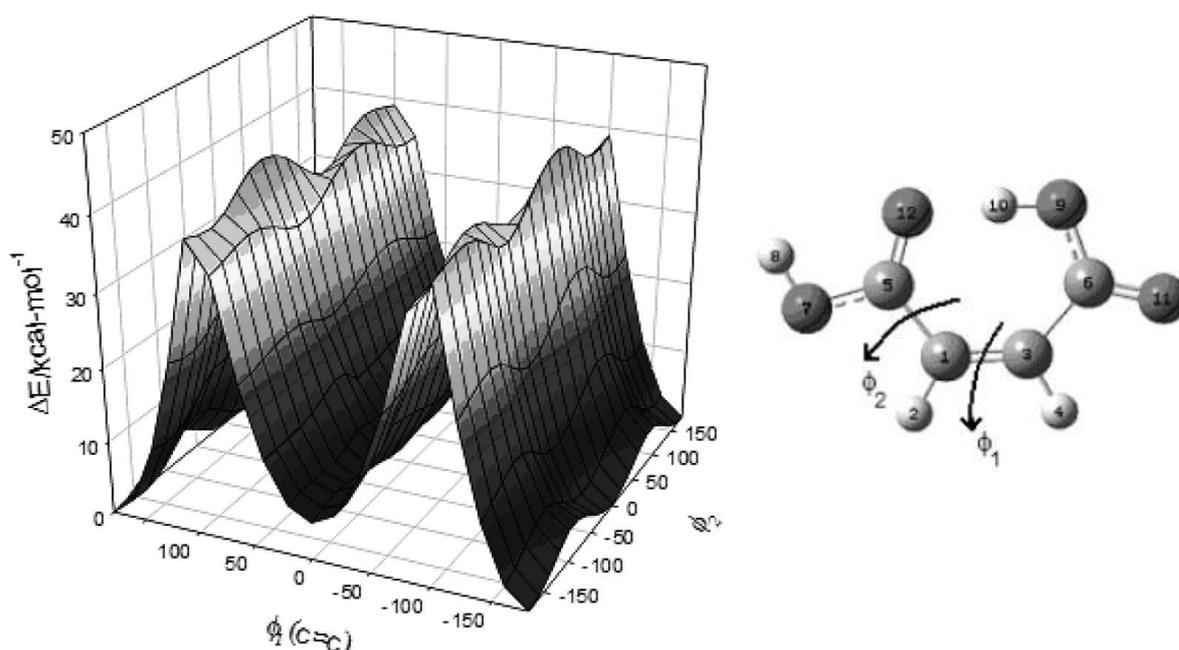
A qualidade dos resultados obtidos é consequência principalmente do tipo de funcional troca-correlação utilizado. Um dos modelos mais utilizados é o de troca híbrido tri-parametrizado por *Becke* (BECKE, 1993) e o de correlação de *Lee-Yang-Parr* (LEE, YANG e PARR, 1988), pois apresentam uma alta qualidade nos resultados principalmente para moléculas orgânicas (SANT'ANNA, 2009).

Para formar um nível de teoria, utiliza-se uma metodologia seguida de um conjunto de funções de base. Um bom nível de teoria é atribuído por ser formado pela associação de um bom método e um bom conjunto de funções de base. Esses conjuntos apresentam uma junção de fatores que o cálculo deverá considerar. Por exemplo, cálculos de scan não demandam um nível de teoria elevado, portanto o método *HF* com as funções de base *6-311G*, formando o nível de teoria *HF/6-311G*, já apresentam um ótimo resultado. Os conjuntos de funções de base de *Pople* (*3-21G*, *6-31G(d,p)*, *6-311G(2d,2p)+*, entre outros) e os de *Dunning* (*cc-pVDZ*, *aug-cc-pVDZ*, *cc-pVTZ*, entre outros) Possuem uma larga aplicação em moléculas, bem como em sistemas orgânicos. Portanto otimizações e cálculos de densidade eletrônica com o nível de teoria *B3LYP/cc-pVDZ*, demonstram uma boa técnica para minimizar energia e atribuir potenciais eletrostáticos, respectivamente (FARIAS, 2005).

1.5.2. SUPERFÍCIE DE ENERGIA POTENCIAL

O cálculo de scan é descrito pela obtenção da superfície de energia potencial (SEP). Quando frente a uma molécula com um ou mais ângulos diedros móveis, é possível executar o giro entre dois átomos ligados entre si, em várias etapas. Esse cálculo constrói uma curva de energia potencial onde os mínimos de energia serão os conformeros mais estáveis. Um estudo que demonstrou muito bem essa ferramenta foi à análise conformacional foi um estudo do ácido fumárico (Figura 11). A representação da SEP obtida neste estudo foi feita a partir da execução do scan em dois ângulos diedros diferentes, uma delas sendo ligação pseudo-dupla, e etapas de 20° representando valores de energia relativa. A partir de desses dados foi possível graficar a superfície de energia potencial tridimensional, SEP 3D (UGARTE et al., 2010).

Figura 11 – Superfície de energia potencial tridimensional do ácido fumárico.



Fonte: UGARTE et al., 2010.

1.5.3. OTIMIZAÇÃO E FREQUÊNCIA

Quando se tem a conformação do mínimo de energia de uma molécula, não podemos aferir que ela esteja no seu menor estado de energia. Os movimentos vibracionais e interações entre os átomos de uma determinada molécula devem ser levados em consideração. O cálculo de otimização tem a finalidade de simular a geometria em que a molécula está no seu menor estado de energia, ou seja, reduzir ao máximo sua energia potencial, usando como correção a energia do ponto zero (ZPE, do inglês, “Zero-point Energy”) diminuindo sua energia ao menor estado possível. O Conformer que tem a menor energia em um equilíbrio é denominado como mínimo global. As demais conformações que mantêm uma diferença discreta de energia para o mínimo global (aproximadamente 2,2 Kcal/mol) são denominadas como mínimos locais (CORMANICH, DUCATI e RITTNER, 2011).

A razão matemática da existência da energia do ponto zero é a impossibilidade de v (nível de energia) ser negativo, pois se o fosse às funções de onda não seriam bem-comportadas. A razão física é semelhante à que se comentou no caso de uma partícula numa caixa. A partícula está confinada e a sua posição não é inteiramente indefinida. Por isso, o seu momento linear e , portanto a sua energia cinética não pode ser exatamente nula. Podemos imaginar o estado do ponto zero como aquele que a partícula flutua incessantemente em torno da posição de equilíbrio. A mecânica clássica admitiria a perfeita imobilidade da partícula (ATKINS, 2002, Vol.2, 34).

Junto ao cálculo de otimização é possível a realização do cálculo de frequência. Portanto é comum que a otimização seja seguida do cálculo de frequência. A polaridade também pode ser apresentada com o cálculo de otimização (momento de dipolo, μ). O valor do momento de dipolo representa a polaridade da molécula isolada ou submetida a um determinado meio. Absorções teóricas na região do infravermelho são calculadas pela frequência, desta forma, podem ser comparadas com valores experimentais (MOREIRA et al., 2012).

1.5.4. DETERMINAÇÃO DAS POPULAÇÕES DOS CONFÔRMEROS

Quando citamos a cinética de uma reação, pode-se aferir que a constante de velocidade (k) correlaciona-se com a temperatura de forma linear. Se obtivermos valores de $1/T$ em função de $\ln k$, o coeficiente linear ($\ln A$) é denominado como fator pré-exponencial (A), e o coeficiente angular ($-E_a/R$) corresponde a energia de ativação (E_a). Esses dois coeficientes são denominados parâmetros de Arrhenius, e a denominação matemática para esse comportamento é demonstrada como a Equação 2 (CASTELAN, 1983).

$$k = Ae^{(-E_a/RT)} \quad (2)$$

Se aceitarmos K^\ddagger como uma constante de equilíbrio, podemos expressá-la em termos de uma energia livre de Gibbs de ativação, $\Delta^\ddagger G$, conforme a Equação 3.

$$K^\ddagger = e^{-\frac{\Delta^\ddagger G}{RT}} \quad (3)$$

Essa expressão tem uma boa aplicabilidade em reações orgânicas. Fazendo análises de correlação em que $\ln K = -\Delta_r G^\ominus/RT$, é lançado contra $\ln k = -\Delta^\ddagger G/RT$. Na maioria dos casos essa correlação é linear, sendo observado o aumento da constante de velocidade, a medida que a reação se torna mais favorável. Esta correlação linear é a origem da denominação da relação linear da energia livre de Gibbs de reação com a temperatura (ATKINS, 2002).

Correlacionando essas equações, pode-se dizer que o logaritmo natural da constante de equilíbrio ($\ln K$) é igual a $-\Delta E_{rel}/RT$ (Equação 4). O parâmetro de energia relativa (ΔE_{rel}) é a variação entre as energias (E_a) com relação à menor (E_b), a qual é referente ao confômero mais estável (Equação 5). Com essa variação de energia, pode-se calcular a constante de equilíbrio populacional (K) entre os confômeros. Em seguida, usando os valores obtidos e tais constantes na Equação 6, pode-se elucidar as populações referentes a cada confômero, a partir de suas frações molares (n_a , menor população e n_b , maior população), lembrando que a constante R tem unidade de energia em caloria e a temperatura é fixada em 25°C (VOLCHAN, 2006).

$$\ln K = -\frac{\Delta E_{rel}}{RT}, \text{ ou } K = e^{-\frac{\Delta E_{rel}}{RT}} \quad (4)$$

$$\Delta E_{rel} = E_b - E_a \quad (5)$$

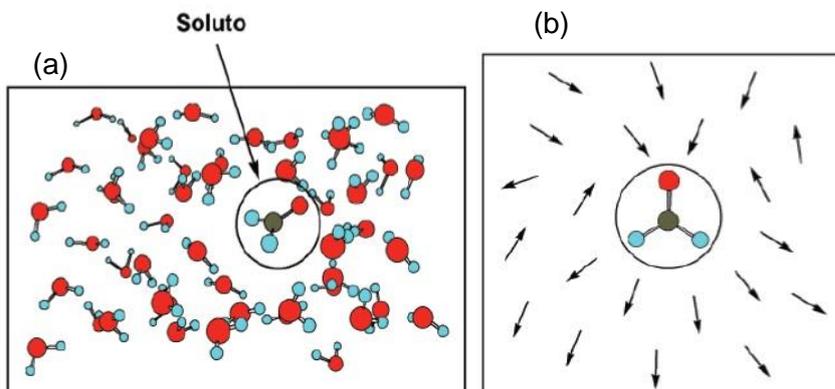
$$K = \frac{n_a}{n_b}, \quad n_a + n_b = 1 \quad (6)$$

$$R = 1,9861 \text{ cal.mol}^{-1}.K^{-1}, T = 298,15 K$$

1.5.5. CÁLCULOS COM ROTINA DE SOLVATAÇÃO

Interações do composto com determinado solvente são expressadas com as otimizações das estruturas mais estáveis em determinado solvente. Existem vários métodos que podem ser usados para este propósito, o escolhido para aplicação neste trabalho foi o *PCM* (do inglês “*Polarizable Continuum Model*”). Esse método representa as moléculas do solvente como dipolos pontuais, e a designação de continuo dielétrico é dada a área esférica que circula a molécula de soluto (nesse caso o composto de interesse). Assim, o momento de dipolo do solvente modifica a polaridade do continuo dielétrico, que por sua vez afeta diretamente a conformação, modificando ou não seu equilíbrio conformacional. A Figura 12 representa a molécula de formaldeído inserida no meio aquoso (Figura 12a), e a demonstração do continuo dielétrico (Figura 12b), quando submetido a dipolos pontuais (PLIEGO, 2006).

Figura 12 – (a) Formaldeído em meio aquoso e
(b) Continuo dielétrico inserido em dipolos pontuais do formaldeído.



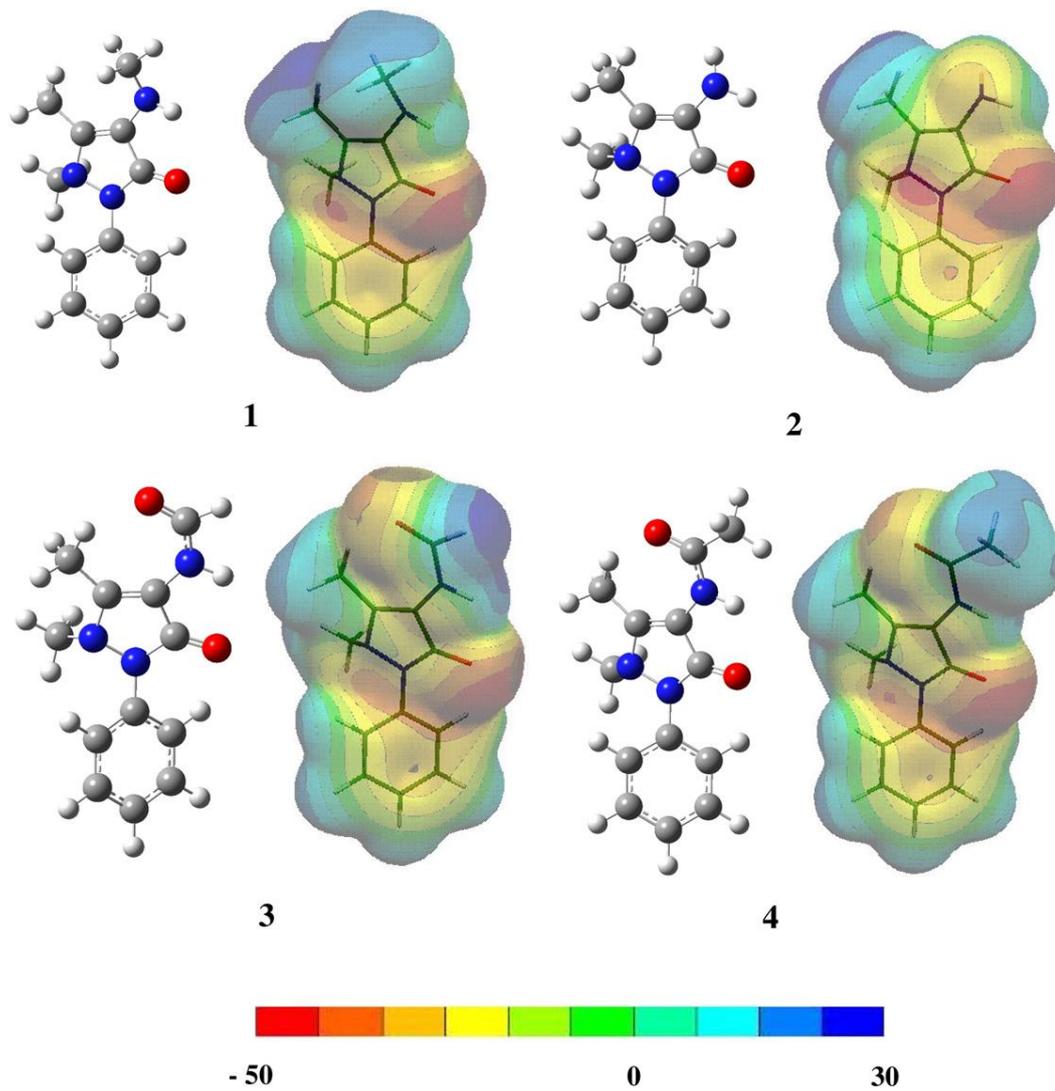
Fonte: PLIEGO, 2006.

1.5.6. MAPAS DE POTENCIAL ELETROSTÁTICO

Na química orgânica, os mapas de potencial eletrostático (MPE), têm como aplicação uma visão dinâmica e abrangente dos muitos sítios reativos e o balanço das cargas entre os átomos. Dipolos permanentes, como uma carbonila, e interações com átomos eletronegativos, por exemplo, uma ligação de hidrogênio fica evidente para explicar o comportamento de estabilidade com a visualização dos diagramas de densidades eletrônica das moléculas (BOCCA, BASSO e MOSQUETTA, 2007).

Um dos trabalhos que demonstra a aplicação de tal ferramenta está descrito na literatura e utiliza como objeto de estudo o fármaco dipirona. A dipirona é um medicamento que forma quatro metabólitos distintos no organismo, as diferenças entre as cargas ficam claras quando se usa os MPE para analisar essa troca estrutural. Na Figura 13 estão apresentados os confôrmeros mais estáveis de cada metabólito e seus respectivos mapas de densidade de carga. A região vermelha apresenta uma alta densidade eletrônica ou potencial negativo e a região azul apresenta uma baixa densidade eletrônica ou potencial positivo (BOCCA, BASSO e MOSQUETTA, 2007).

Figura 13 – Estrutura dos quatro metabólitos da dipirona com seus MPEs e a escala de valores relativa as cargas positivas e negativas distribuídas nas moléculas.



Fonte: BOCCA, BASSO e MOSQUETTA, 2007.

1.5.7. ORBITAL NATURAL DE LIGAÇÃO

O cálculo envolvendo o *NBO* (do inglês, “*Natural Bonding orbital*”) representa uma útil forma para apresentar os efeitos eletrônicos de compensação energética. Quando trabalhamos com sistemas eletrônicos, bem como pares eletrônicos isolados, podemos obter efeitos de doação e aceitação. Os elétrons n , pares isolados, estão ocupando um orbital ligante (σ) esses por sua vez podem doar densidade eletrônica para orbitais desocupados, denominados como antiligantes (σ^*). Quando adotamos dois átomos A e B, sendo A um átomo com um par isolado e B um átomo com orbital antiligante desocupado, podemos ter a situação de aproximação e posição entre eles que transformam a resolução da função de onda com um centro, inicialmente apenas o átomo A com seu par eletrônico, para dois centros, ligação entre A e B. Desta maneira o *NBO* formado se apresenta (Equação 7) como uma combinação (c) híbrida da valência (v) de cada átomo do orbital ligante (σ_{AB}) e a inversão dessa valência no orbital antiligante (σ^*_{AB}) (FOSTER e WEINHOLD, 1980).

$$\begin{aligned}\sigma_{AB} &= c_A v_A + c_B v_B \\ \sigma^*_{AB} &= c_B v_A + c_A v_B\end{aligned}\quad (7)$$

A teoria que apresenta esse efeito doador-acceptor é denominada como perturbação de segunda ordem, onde limita-se a barreira energética e se utiliza apenas valores inferiores a essa barreira. Quando existe o favorecimento dessa magnitude denominam-se a mesma como interação hiperconjugativa. Estruturas que possuem estas interações, geralmente, têm maior estabilidade em fase isolada. Logo uma grande variação de cálculos pode ser feita para se quantificar essas interações. Exemplos de atribuições quantitativas para esses cálculos consistem em diminuir o valor da barreira energética. Assim a sensibilidade das interações aumenta e a detecção de energias hiperconjugativas mais discretas se torna mais evidente. Outra operação é caracterizada pela diferença do cálculo envolvendo os orbitais antiligantes e posteriormente ausentando eles de envolvimento em interações (deleção de orbitais antiligantes). O resultado dessa diferença demonstra conformações que são mais e menos afetadas. As estruturas em que essa diferença é maior caracterizam-se como as geometrias em que as interações têm maior efeito, sendo assim mais estabilizadas (WEINHOLD e LANDIS, 2001).

1.6. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

1.6.1. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

A espectroscopia no infravermelho (*FT-IR*) é uma técnica instrumental que pode evidenciar a presença de vários grupos funcionais. A *FT-IR* depende da interação de moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética. A radiação dessa região causa o aumento da amplitude de vibração das ligações covalentes entre átomos ou grupos funcionais de compostos orgânicos. Como os grupos funcionais das moléculas orgânicas incluem átomos ligados por arranjos específicos, a absorção da energia ocorrerá de modo característico dos tipos de ligações de átomos presentes nos grupos funcionais. Essas vibrações são quantizadas e ocorrem na região infravermelha do espectro (LOPES e FASCIO, 2004).

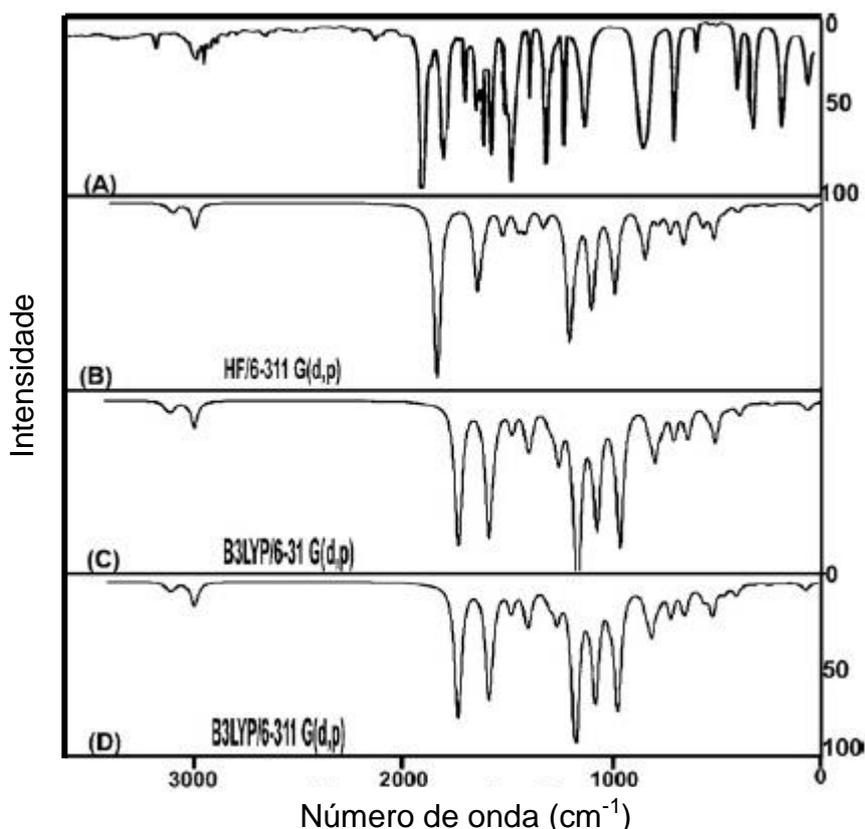
Um espectrômetro de infravermelho (IV) opera passando o feixe de radiação através da amostra e comparando a radiação que é transmitida pela amostra com um feixe de referência. Qualquer frequência absorvida pela amostra será evidenciada pela diferença entre os feixes. O espectrômetro registra os resultados na forma de um gráfico, mostrando absorbância (ou transmitância) versus frequência ou comprimento de onda. Ainda existe outra unidade que facilita a visualização dos resultados que é denominada número de onda. O número de onda é o inverso do comprimento de onda, portanto sua unidade é o cm^{-1} (PAVIA et al., 2010).

As moléculas podem vibrar de várias maneiras. Dois átomos unidos por uma ligação covalente podem sofrer uma vibração de estiramento, onde os átomos se movem para frente e para trás, como se estivessem presos por uma mola. Quando se tem três átomos, eles podem sofrer uma deformação axial, simétrica ou assimétrica, e uma deformação angular, no plano ou fora do plano (SILVERSTAIN, WEBSTER e KIEMLE, 2007).

Um grupo funcional importante que fornece uma intensa absorção nos espectros de IV é o grupo carbonila ($\text{C}=\text{O}$). Este grupo está presente em aldeídos, cetonas, ésteres, ácidos carboxílicos, amidas, entre outros grupos. A frequência da deformação axial carbono-oxigênio de todos os grupos fornece um pico intenso entre 1630 e 1780 cm^{-1} (SOLOMONS e FRYHLE, 2000).

Como exemplo do uso desta técnica, a Figura 14 apresenta espectros da análise do composto 4-cloro-2-bromoacetofenona de forma experimental e teórica. O espectro de IV experimental (Figura 14A) pode ser comparado aos espectros na região do infravermelho do resultado obtido nos cálculos de frequência (RAMALINGAMA, ANBUSRINIVASANB e PERIANDYC, 2011).

Figura 14 – (A) Espectro de IV, (B) Cálculo de frequência pelo método *HF/6-311G(d,p)*, (C) frequências pelo método *B3LYP/6-31G(d,p)* e (D) frequências pelo método *B3LYP/6-311G(d,p)* da 4-cloro-2-bromoacetofenona.



Fonte: RAMALINGAMA, ANBUSRINIVASANB e PERIANDYC, 2011.

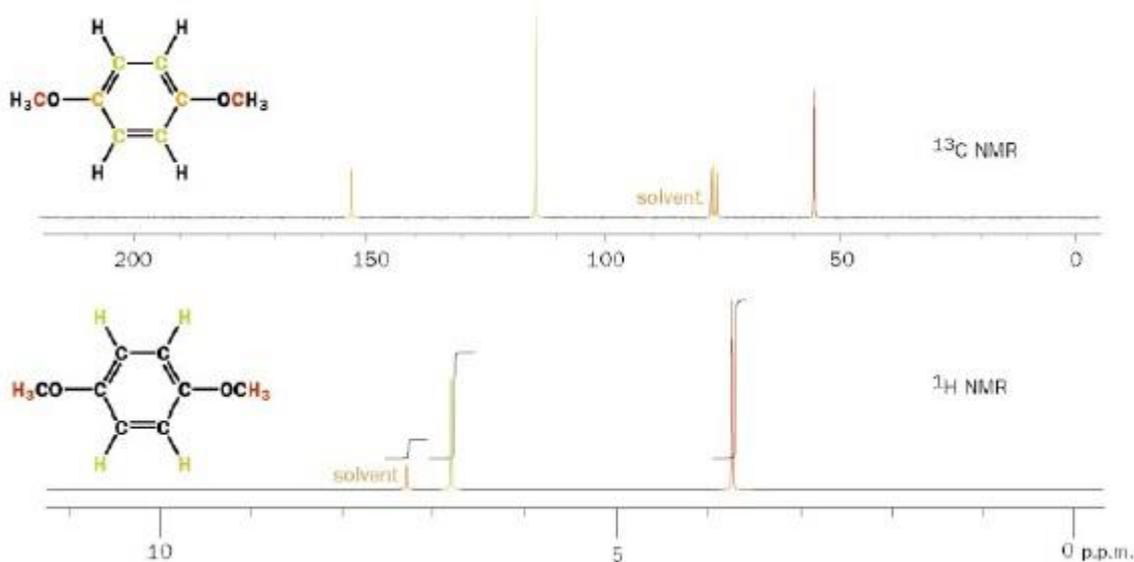
1.6.2. ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os núcleos de certos elementos isótopos se comportam como se fossem magnetos rodando ao redor de um eixo. Os núcleos de hidrogênio (^1H) e de carbono-13 (^{13}C) apresentam esta propriedade. Quando se submete um composto contendo átomos de ^1H ou de ^{13}C a um campo magnético muito forte e simultaneamente, se irradia com energia eletromagnética, os núcleos do composto podem absorver a energia por um processo denominado ressonância magnética. Essa absorção de energia é quantizada e produz um espectro característico para cada composto, diferenciando-se em deslocamentos químicos, integrais e constantes de acoplamento (FIORIN et al., 2009).

Instrumentos conhecidos como espectrômetros de ressonância magnética nuclear (RMN) permitem aos químicos medir a absorção de energia pelos núcleos de ^1H e ^{13}C , entre outros elementos. Apenas elementos que possuem isótopos com número quântico spin diferente de zero ($l = +1/2$ ou $l = -1/2$) são detectados no RMN. Esses instrumentos utilizam magnetos intensos e radiação eletromagnética na região da radiofrequência. Um tipo de espectrômetro de ressonância muito conhecido é o de transformada de *Fourier*, tendo como principal característica o campo magnético constante inserido no sistema. O sinal recebido, na região da radiofrequência, tem um domínio de tempo que posteriormente com um tratamento matemático, e auxílio do computador, passa a um domínio de frequência. Essa transformação é denominada método de *Fourier*, ou seja, a técnica fica denominada como ressonância magnética nuclear com transformada de *Fourier* (PAVIA et al., 2010).

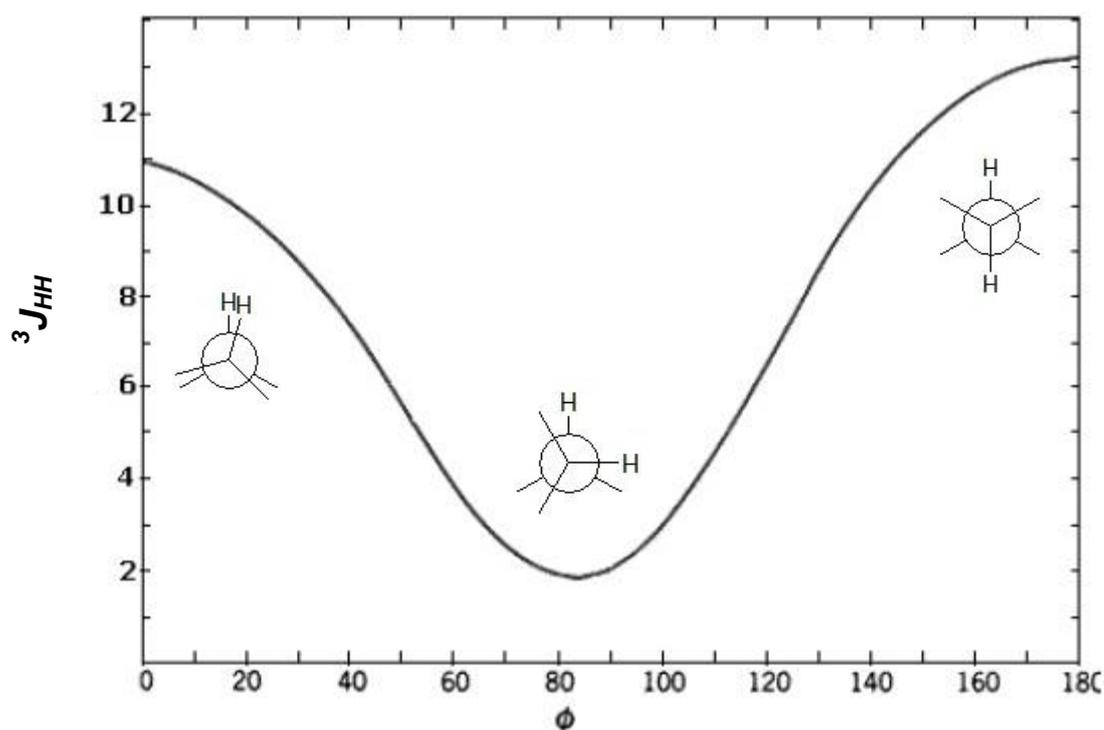
Um exemplo de aplicação da técnica de ressonância magnética nuclear é a análise de ^1H e ^{13}C para o 1,4-dimetoxibenzeno (Figura 15). O espectro de carbono apresenta três sinais e o de hidrogênio apresenta dois sinais, todos diferentes entre si (CLAYDEN et al., 2001).

Figura 15 – Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do 1,4-dimetoxibenzeno.



Fonte: CLAYDEN et al., 2001.

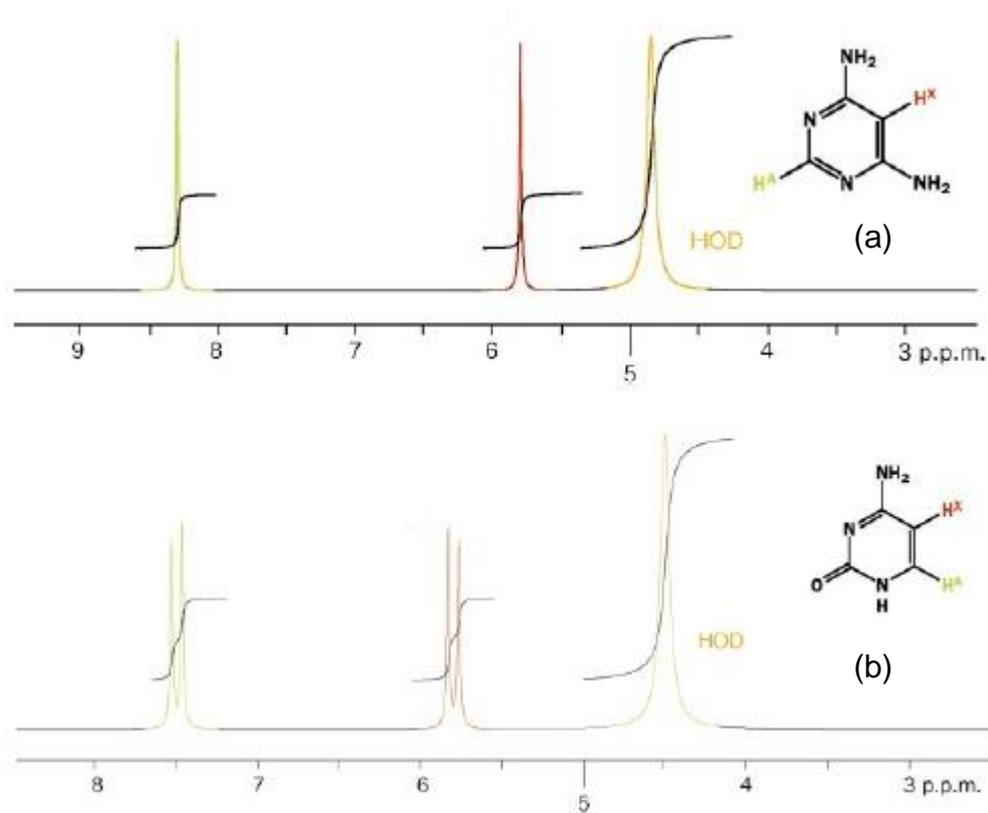
O acoplamento de próton via três ligações, $^3J_{\text{HH}}$, é apresentado como uma boa correlação para admitir ligações entre hidrogênios vicinais a três ligações. Sendo assim, em sistemas rígidos, onde não existe um elevado efeito torsional, a aplicação das atribuições das constantes de acoplamento, medido em *hertz* (Hz), é uma ótima ferramenta. O ângulo diedro formado entre um acoplamento em três ligações de prótons pode variar seu valor. Valores elevados de acoplamento, entre 10 a 12 Hz, são característicos de prótons que formam ângulos diedros em 0 ou 180°. Já valores próximos de zero em constantes de acoplamento são característicos de ângulos diedros próximos a 90°. Essa relação pode ser observada usando a curva de *Karplus* (Figura 16) que teve um grande avanço matemático até chegar nestas conclusões (CONTRERAS e PERALTA, 2000).

Figura 16 – Curva de *Karplus*.

Fonte: CONTRERAS e PERALTA, 2000.

Quando se tomam como exemplos as geometrias da 2,6-diaminopiridina e a citosina, fica evidente o efeito do acoplamento a três ligações, através da análise de RMN de ${}^1\text{H}$ em água deuterada (Figura 17). Neste caso o primeiro espectro mostra os prótons nas posições *para* entre eles. Já o espectro de RMN de ${}^1\text{H}$ para a citosina apresenta dois sinais que se desdobram cada um em dois picos apresentando uma diferença, em *Hz* (CLAYDEN et al., 2001).

Figura 17 – Espectro de RMN de ^1H em D_2O em 60 MHz da (a) 2,6-diaminopiridina e da (b) citosina.



Fonte: CLAYDEN et al., 2001.

Um atual estudo demonstra que as constantes de acoplamento de uma determinada molécula podem ser calculadas pela mecânica quântica. Este cálculo apresenta o valor de constante de acoplamento total (J) entre dois átomos como a somatória (Equação 8) das contribuições do contato de *Fermi* (FC), spin-dipolar (SD), spin-órbita diamagnético (DSO) e paramagnético (PSO). Porém, o contato de *Fermi* geralmente prevalece sobre as outras contribuições, diminuindo o valor da constante de acoplamento com o aumento da distância entre os núcleos acoplados. Portanto, uma alternativa é utilizar o valor das constantes de acoplamento spin-spin (SSCCs) que se apresenta por uma aproximação melhor para comparar a resultados experimentais. Essa constante pode atribuir valores de acoplamento teóricos a uma ligação (entre um núcleo de hidrogênio e um núcleo de carbono, $^1J_{CH}$), duas ligações (entre dois hidrogênios geminais, $^2J_{HH}$), três ligações (hidrogênios vicinais, $^3J_{HH}$) e até a longa distância ($^4J_{HH}$) (RICHTER et al., 2011).

$$J = {}^{FC}J + {}^{SD}J + {}^{DSO}J + {}^{PSO}J \approx {}^{SSCCs}J \quad (8)$$

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho tem como objetivo realizar a análise conformacional da Ribavirina e alguns compostos análogos como, a Viramidina, a Adenosina e a Guanosina através de cálculos teóricos RMN e IV.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir a superfície de energia potencial tridimensional das quatro estruturas, Ribavirina, Viramidina, Adenosina e Guanosina;
- Isolar os mínimos obtidos e efetuar cálculos de otimização e frequência dos mesmos em fase isolada;
- Construir os mapas de potencial eletrostático para visualizar as estruturas e atribuir densidades de carga (positivas ou negativas) na superfície dos átomos que compõe as geometrias;
- Realizar o *single-point* dos mesmos mínimos considerando rotinas de solvatação em meio aquoso para avaliar as diferenças de população;
- Realizar cálculos de orbitais naturais de ligação para explicar as preferências conformacionais;
- Fazer cálculos de frequência e o cálculo de ressonância magnética nuclear teórica para comparar com os dados experimentais;
- Extrair a Ribavirina do medicamento;
- Caracterizar a Ribavirina por técnicas espectroscópicas na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear;

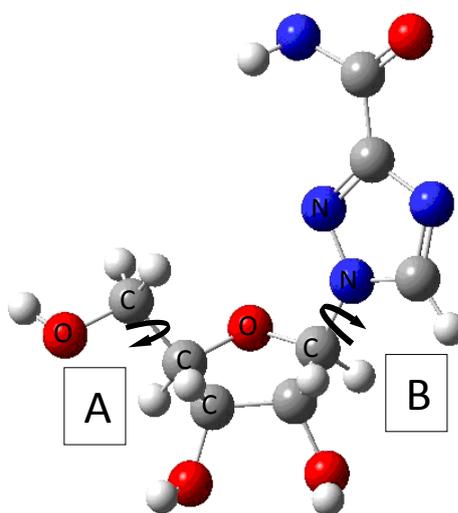
3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. PARTE COMPUTACIONAL

Para o presente trabalho foram utilizados o método *Hartree-Fock* (HF) e a teoria do funcional de densidade (*DFT*), com o método *B3LYP* (BECKE, 1993 e LEE, YANG e PARR, 1988). Com as funções de base de *Pople*, *6-311G*, e o método HF foram realizados 36 scans no total. Para os cálculos de otimização e frequência utilizou-se a *DFT* com conjunto de funções de base de *Dunning*, resultando no nível de teoria *B3LYP/cc-pVDZ*. Utilizou-se as mesmas combinações de métodos e funções de base para as quatro moléculas estudadas, Ribavirina, Viramidina, Adenosina e Guanosina.

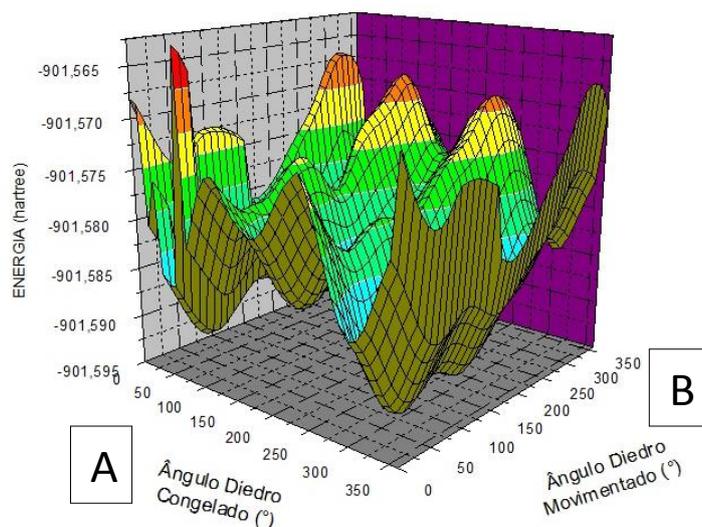
Para a realização dos cálculos de scans inicialmente foi fixado o ângulo diedro C-C-C-O (Diedro A) e foram efetuados sucessivos giros, de 10° em 10° , no diedro O-C-N-N (Diedro B), para obter valores de energia para cada etapa (Figura 18). Com estes valores de energia, e seus respectivos ângulos diedros (A e B) foi construído o gráfico de superfície de energia potencial 3D (SEP 3D, Figura 19).

Figura 18 – Estrutura molecular da Ribavirina e ângulos diedros A (O-C-C-C) e B (O-C-N-N).



Fonte: O autor.

Figura 19 – Superfície de energia potencial tridimensional (SEP 3D).



Fonte: O autor.

Com as geometrias referentes aos pontos de menor energia, geralmente localizados na região azul da superfície de energia potencial, foram efetuados cálculos de otimização e na sequência cálculos de frequência. Os valores obtidos foram corrigidos pela energia do ponto zero (*ZPE*). Com essa correção, os valores de energia foram adequados para posterior obtenção das populações. Foram simulados os mapas de potencial eletrostáticos (MPE) para visualizar as densidades de cargas distribuídas nas moléculas. Utilizou-se o nível de teoria *HF/6-311G* nesta etapa. Realizou-se o cálculo com os orbitais naturais de ligação (*NBO*, na versão 5.0) de duas formas diferentes. O primeiro formato executou o cálculo com uma chave de ativação que limita a energia da perturbação de segunda ordem e o segundo formato de cálculo interpreta as deleções das interações hiperconjugativas. Aplicou-se o mesmo nível de teoria usado nas otimizações (*B3LYP/cc-pVDZ*).

Empregou-se o método *PCM*, como rotina de solvatação, e realizou-se os cálculos de energia (*single-point*) com as geometrias envolvidas no equilíbrio conformacional de cada composto. Para todos os casos empregou-se a água como solvente, exceto para Ribavirina que além do meio aquoso, realizou-se também em dimetilsulfóxido (*DMSO*).

Para comparar as técnicas teóricas e experimentais, simulam-se as frequências e as constantes de acoplamento a duas e três ligações (RMN teórico). Comparam-se as frequências teóricas com as bandas atribuídas ao espectro na região do infravermelho e utiliza-se o nível de teoria *HF/6-311G(d,p)*. Ao RMN teórico, nas constantes de acoplamento (J_{cal}) calculadas, efetua-se uma média ponderada entre as constantes de acoplamento teóricas (J_{teo}) e as populações relativas, tanto em fase isolada quanto em outros solventes (Equação 9). Neste cálculo, adapta-se dois conjuntos de funções de base diferentes. Para átomos com pequeno número atômico, como carbono e hidrogênio, utiliza-se a *cc-pVDZ* e para os demais utilizam-se o conjunto *EPR-iii*.

$$J_{cal} = [J_{teo(1)} \times \%_{o(1)}] + [J_{teo(2)} \times \%_{o(2)}] / 100 \quad (9)$$

Para realização dos cálculos foram utilizados os equipamentos alocados no laboratório 13 da Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, com hardware: Processador *INTEL® Core™ 2 Quad 2.4 GHz* e 4GB de memória *RAM*, software *LINUX* interface *KDE* com sistema operacional *KUBUNTU* 64bits versão 12.04. Realizou-se todos os cálculos nesta máquina com o pacote de programas *GAUSSIAN 03* (FRISCH et al., 2004). Em outra máquina, hardware de 1GB de memória *RAM* e sistema operacional *WINDOWS 7*, realizou-se as demais atividades, sendo manipulada pelos programas *GAUSSVIEW 3.0* (FRISCH et al., 2004), *NBO 5.0* (WEINHOLD e LANDIS, 2001), *ORIGIN 6.1*, *MICROSOFT OFFICE EXCEL 2007* e do programa *MOLEKEL* (FLÜKIGER e LÜTHI, 2002) versão 5.3, este último utilizado para projetar os mapas de potencial eletrostático.

3.2. PARTE EXPERIMENTAL

3.2.1. EXTRAÇÃO DA RIBAVIRINA

A Ribavirina é um composto comercial, encontrada em alguns laboratórios com alto padrão analítico e de elevado valor comercial, também comercializada como medicamento para tratamento da virose Hepatite C. Em seu encapsulamento, alguns excipientes são adicionados ao composto. Neste trabalho estudou-se uma forma de extrair a Ribavirina, isolando-a dos seus excipientes.

O medicamento foi adquirido comercialmente. Sua formulação era de 250 mg de Ribavirina em cada cápsula, e mais seus excipientes que são: estearato de magnésio, celulose microcristalina e polivinilpirrolidona.

Preparou-se uma solução do conteúdo de 12 capsulas (3,720 g) com 50 mL de água destilada. Esta apresentou um sólido branco o qual foi separado e descartado por filtração simples. A solução restante foi extraída com éter etílico (8x10 mL) e a fase orgânica rotoevaporada. Ao final, obteve-se um sólido branco caracterizado como Ribavirina por *FT-IR* e RMN.

FT-IR: ANEXO A - $\nu(\text{O-H}) = 3475\text{-}3408 \text{ cm}^{-1}$; $\nu(\text{N-H, ass}) = 3342 \text{ cm}^{-1}$;
 $\nu(\text{N-H, sim}) = 3271 \text{ cm}^{-1}$; $\nu(\text{C-H, sp}^2) = 3138 \text{ e } 3119 \text{ cm}^{-1}$;
 $\nu(\text{C-H, sp}^3) = 2951\text{-}2928 \text{ cm}^{-1}$; $\nu(\text{C=O}) = 1705 \text{ cm}^{-1}$; $\nu(\text{C=N}) = 1659 \text{ e } 1618 \text{ cm}^{-1}$;

RMN ^1H (D_2O): ANEXO B - $\delta(\text{H-C}_5\text{-H}) = 3,8 \text{ ppm}$; $\delta(\text{C}_4\text{-H}) = 4,2 \text{ ppm}$;
 $\delta(\text{C}_3\text{-H}) = 4,5 \text{ ppm}$; $\delta(\text{C}_2\text{-H}) = 4,7 \text{ ppm}$; $\delta(\text{C}_1\text{-H}) = 6,1 \text{ ppm}$;
 $\delta(\text{C}_5\text{-H, c - sp}^2) = 8,8 \text{ ppm}$;

RMN ^{13}C (D_2O): ANEXO C - $\delta(\text{H-C}_5\text{-H}) = 64,1 \text{ ppm}$; $\delta(\text{C}_3\text{-H}) = 72,9 \text{ ppm}$;
 $\delta(\text{C}_2\text{-H}) = 77,4 \text{ ppm}$; $\delta(\text{C}_4\text{-H}) = 87,9 \text{ ppm}$; $\delta(\text{C}_1\text{-H}) = 94,4 \text{ ppm}$;
 $\delta(\text{C}_5\text{-H, c - sp}^2) = 149,0 \text{ ppm}$; $\delta(\text{C}_3\text{-H, c - sp}^2) = 159,4 \text{ ppm}$;
 $\delta(\text{C}_6\text{-H, c - sp}^2) = 165,7 \text{ ppm}$;

RMN ^1H (DMSO-d_6): ANEXO D - $\delta(\text{H-C}_5\text{-H}) = 3,6 \text{ ppm}$; $\delta(\text{C}_3\text{-H}) = 3,9 \text{ ppm}$;
 $\delta(\text{C}_2\text{-H}) = 4,1 \text{ ppm}$; $\delta(\text{C}_4\text{-H}) = 4,3 \text{ ppm}$; $\delta(\text{C}_5\text{-OH}) = 4,9 \text{ ppm}$;
 $\delta(\text{C}_3\text{-OH}) = 5,2 \text{ ppm}$; $\delta(\text{C}_2\text{-OH}) = 5,6 \text{ ppm}$; $\delta(\text{C}_1\text{-H}) = 5,8 \text{ ppm}$;
 $\delta(\text{C}_6\text{-NH}_2, \text{c - sp}^2, \text{dois picos fracos}) = 7,6 \text{ e } 7,8 \text{ ppm}$;
 $\delta(\text{C}_5\text{-H, c - sp}^2) = 8,8 \text{ ppm}$;

RMN ^{13}C (DMSO-d_6): ANEXO E - $\delta(\text{H-C}_5\text{-H}) = 61,3 \text{ ppm}$; $\delta(\text{C}_3\text{-H}) = 70,0 \text{ ppm}$;
 $\delta(\text{C}_2\text{-H}) = 74,5 \text{ ppm}$; $\delta(\text{C}_4\text{-H}) = 85,5 \text{ ppm}$; $\delta(\text{C}_1\text{-H}) = 91,8 \text{ ppm}$;
 $\delta(\text{C}_5\text{-H, c - sp}^2) = 145,0 \text{ ppm}$; $\delta(\text{C}_3\text{-H, c - sp}^2) = 157,3 \text{ ppm}$;
 $\delta(\text{C}_6\text{-H, c - sp}^2) = 160,4 \text{ ppm}$;

3.2.2. FT-IR

As análises do grupamento da carbonila e de outros grupos funcionais da Ribavirina foram realizados com à espectroscopia de Infravermelho com transformada de *Fourier*. Os espectros foram obtidos em um aparelho espectrômetro *Shimadzu FT-IR Prestige-21*, alocado na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). As análise foram realizadas por imobilização da amostra sólida em pastilha de brometo de potássio (KBr).

3.2.3. RMN

Para caracterização do produto obtido na extração da Ribavirina, foi recorrido a espectroscopia de RMN. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos em um espectrômetro *Varian*, modelo *Mercury Plus BB* operando a 300,058 MHz para o núcleo de hidrogênio e 75,457 MHz para o carbono, alocado na Universidade Estadual de Maringá (UEM). Utilizou-se como solventes a água deuterada (D_2O) e dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6).

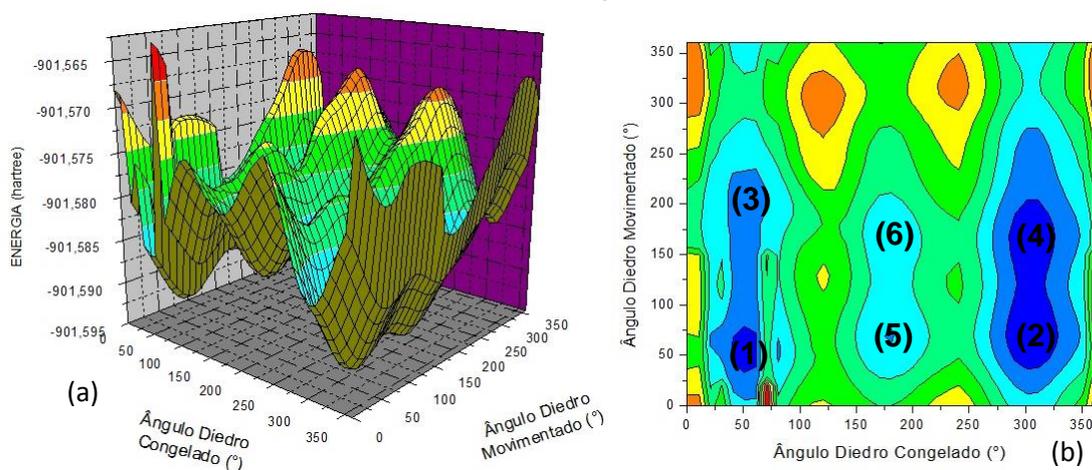
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. RIBAVIRINA

4.1.1. RESULTADOS TEÓRICOS

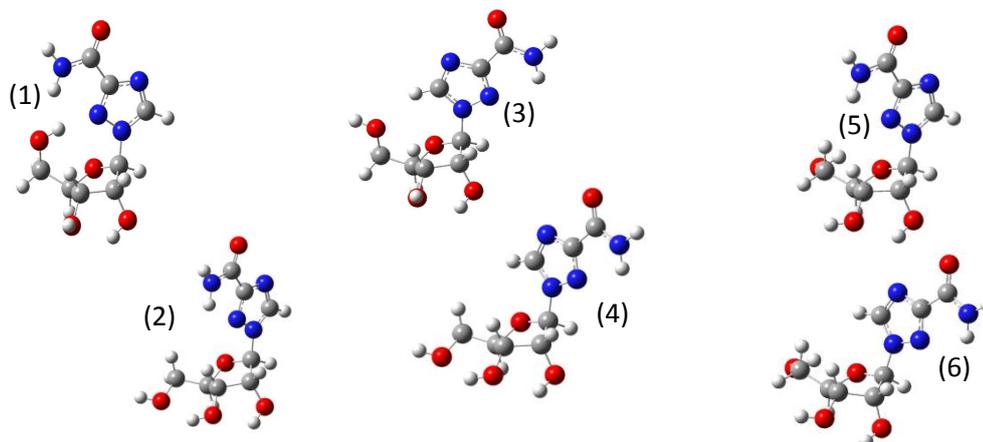
Quando demonstramos graficamente as SEPs (Figura 20), podemos visualizar regiões da superfície com a cor azul, e regiões com a cor vermelha. As azuis caracterizam as regiões de maior probabilidade de encontrar um mínimo de energia. Assim, foram detectados seis confôrmeros com uma variação de energia máxima de 5,45 Kcal/mol. Os dois confôrmeros mais estáveis têm uma diferença de energia de 2,29 Kcal/mol. A população referente ao confôrmero de menor energia compreende 96,6% do equilíbrio conformacional, enquanto os cinco demais totalizam 3,40%. Na Figura 21 estão representadas às seis conformações e na Tabela 1 contém os valores de energia, energia relativa e população, juntamente com o momento de dipolo de cada geometria.

Figura 20 – (a) Superfície de energia potencial tridimensional com nível de teoria HF/6-311G e (b) mapa de contorno da Ribavirina com a localização das seis conformações envolvidas no equilíbrio.



Fonte: O autor.

Figura 21 – As conformações mais estáveis da Ribavirina.



Fonte: O autor.

Tabela 1 – Energias, energias relativas, populações e momento de dipolo em fase isolada da Ribavirina com nível de teoria *B3LYP/cc-pVDZ*.

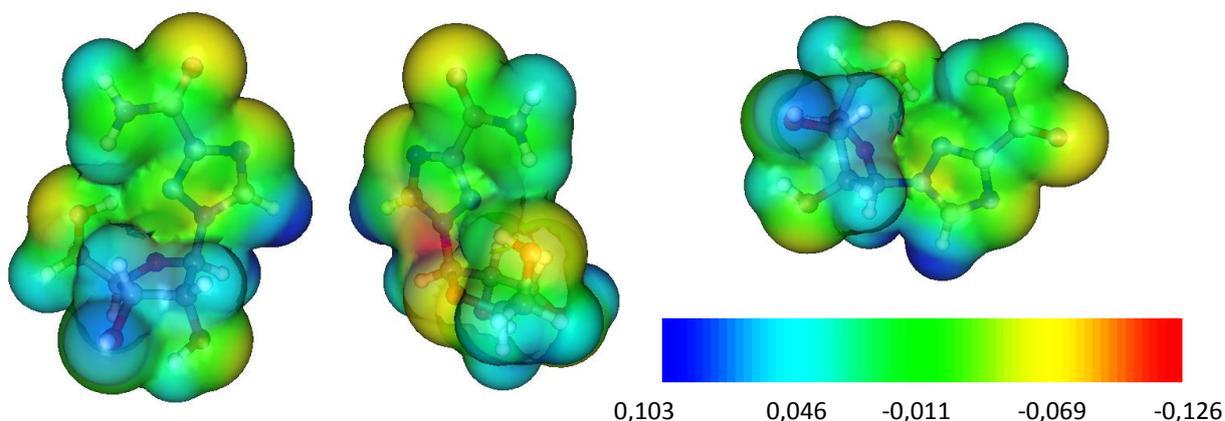
| Confômero | Energia* | ΔE_{rel}^{**} | % | $\mu(D)$ |
|-----------|-------------|-----------------------|--------------|----------|
| RIBAV 1 | -907,010557 | 0,00 | 96,60 | 5,94 |
| RIBAV 2 | -907,006912 | 2,29 | 2,03 | 6,75 |
| RIBAV 3 | -907,006015 | 2,85 | 0,78 | 7,43 |
| RIBAV 4 | -907,005527 | 3,29 | 0,47 | 6,88 |
| RIBAV 5 | -907,004131 | 4,03 | 0,11 | 5,93 |
| RIBAV 6 | -907,001866 | 5,45 | 0,01 | 6,07 |

* em Hartree, **em Kcal.mol⁻¹.

Fonte: O autor.

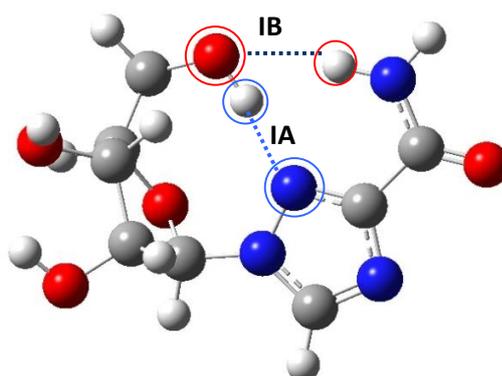
Para explicar o comportamento de apenas um confômero apresentar esse elevado valor de população, utilizou-se os mapas de potencial eletrostático (Figura 22), onde ficou evidente que houve sobreposição das densidades eletrônicas entre alguns átomos. Fica evidenciado que o hidrogênio da hidroxila ligada ao carbono 5 (C5') da pentose, faz uma ligação de hidrogênio com o nitrogênio do anel triazol com uma distância de 1,998 Å (Interação IA, Figura 23). Entre o oxigênio dessa mesma hidroxila, é possível observar mais uma ligação de hidrogênio intramolecular (IB, Figura 23) com o hidrogênio ligado ao nitrogênio do grupo amida a uma distância de 2,656 Å.

Figura 22 – Mapas de potencial eletrostático da RIBAV 1.



Fonte: O autor.

Figura 23 - Ligações de hidrogênio intramoleculares na RIBAV 1.



Fonte: O autor.

Essas ligações de hidrogênio intramoleculares são qualitativamente apresentadas com o valor da distância entre os átomos envolvidos na interação e na sobreposição das nuvens eletrônicas evidenciadas pelos mapas de potencial eletrostático. Quantitativamente, os cálculos de *NBO* demonstraram boa relação com os resultados obtidos. Inicialmente, a diferença entre o cálculo de *NBO* envolvendo os orbitais antiligantes (σ^*) e o cálculo de *NBO* ausentando estes mesmos orbitais, representa uma relação de dependência entre a conformação majoritária e a maior diferença de energia (ΔE_{Del}). Desta forma a RIBAV 1 apresenta a maior variação energética, 1000,54 Kcal/mol, sendo a conformação que utiliza mais os orbitais antiligantes para formar interações hiperconjugativas. Na Tabela 2 estão apresentados os demais valores de energias e variações entre as outras conformações da Ribavirina.

Tabela 2 – Energia Total, com Deleção e ΔE_{Del} através do cálculo de *NBO* para Ribavirina com nível de teoria *B3LYP/cc-pVDZ*.

| Confômero | Energia Total* | Energia com Deleção* | ΔE_{Del} * | ΔE_{Del} ** |
|-----------|----------------|----------------------|--------------------|---------------------|
| RIBAV 1 | -907,235943270 | -905,641479304 | 1,594464 | 1000,54 |
| RIBAV 2 | -907,231762827 | -905,664307037 | 1,567456 | 983,59 |
| RIBAV 3 | -907,230738709 | -905,668203620 | 1,562535 | 980,50 |
| RIBAV 4 | -907,230359717 | -905,670509811 | 1,559850 | 978,82 |
| RIBAV 5 | -907,228027636 | -905,659443805 | 1,568584 | 984,30 |
| RIBAV 6 | -907,226063859 | -905,667203219 | 1,558861 | 978,20 |

* em Hartree, **em Kcal.mol⁻¹.

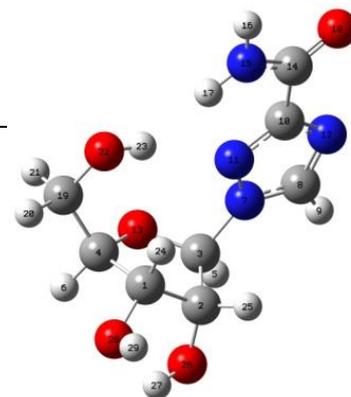
Fonte: O autor.

Outra informação encontrada no cálculo de *NBO* da RIBAV 1 é a observação das interações hiperconjugativas pela teoria da perturbação de segunda ordem. Com o auxílio dessa ferramenta, foi possível quantificar energeticamente as interações mais significativas (Tabela 3). Outro fato relevante fica por conta da interação $n_{N11} \rightarrow \sigma^*_{O22-H23}$, pelo fato da mesma ser formada pelo par eletrônico isolado do átomo N11 doando para o orbital antiligante formado entre a ligação do átomo O22 e H23. A energia dessa doação é 10,49 Kcal/mol e 1,9205 dos elétrons ocupa o par eletrônico (normalmente quando não há interação a ocupância do átomo doador é 2,00 elétrons) deslocalizando 0,03933 dos elétrons para o orbital antiligante acceptor de forma remota. As doações podem acontecer de três tipos: vicinal (mais energética), geminal e remota. A vicinal e a remota acontecem por meio de distâncias inter-atômicas e via doações eletrônicas entre átomos dispostos paralelamente. Já a remota provém de orientações espaciais. Sendo assim, essa interação é atribuída como uma ligação de hidrogênio intramolecular. A afirmação sobre a segunda interação envolvendo a hidroxila ligada ao C5' e o hidrogênio ligado ao nitrogênio do grupo amida não é encontrada, portanto esta hipótese foi descartada. A interação $n_{O22} \rightarrow \sigma^*_{N15-H17}$ foi colocada na tabela para apresentar a pequena energia e baixa ocupância do acceptor. Esta informação evidencia que frente a outra interação existente nesta conformação, mais energética, está de baixa energia estabiliza muito pouco a estrutura.

Tabela 3 – Interações Hiperconjugativas e suas energias, Ocupância doador, Ocupância aceptor e Tipo de Interação, obtidas na RIBAV 1 pelo cálculo de NBO, nível de teoria *B3LYP/cc-pVDZ*.

| Interação Hiperconj. | Energia da Interação (Kcal/mol) | Ocupância Doador | Ocupância aceptor | Tipo de Inter. |
|--|---------------------------------|------------------|-------------------|----------------|
| $n_{N7} \rightarrow \sigma^*_{C8-N12}$ | 48,69 | 1,51719 | 0,35766 | vicinal |
| $n_{N7} \rightarrow \sigma^*_{C10-N11}$ | 26,78 | 1,51719 | 0,40270 | vicinal |
| $n_{N11} \rightarrow \sigma^*_{O22-H23}$ | 10,49 | 1,92050 | 0,03933 | remota |
| $n_{O13} \rightarrow \sigma^*_{C3-N7}$ | 12,52 | 1,89820 | 0,07208 | vicinal |
| $n_{N15} \rightarrow \sigma^*_{C14-O18}$ | 61,35 | 1,73989 | 0,29575 | vicinal |
| $n_{O18} \rightarrow \sigma^*_{C10-C14}$ | 20,85 | 1,85562 | 0,08038 | vicinal |
| $n_{O18} \rightarrow \sigma^*_{C14-N15}$ | 24,17 | 1,85562 | 0,06891 | vicinal |
| $n_{O22} \rightarrow \sigma^*_{N15-H17}$ | 0,30 | 1,97398 | 0,01423 | remota |

Fonte: O autor.



Definindo as populações em fase isolada, foi necessário definir também as preferências conformacionais sob rotinas de solvatações. A seguir, na Tabela 4, estão representados os valores de energia e populações das mesmas conformações em meio aquoso. Pode-se observar que a RIBAV 3 obteve 84,4% do equilíbrio conformacional, e a RIBAV 1, que quando estudado isolado foi o majoritário, compreende 14,3% da população. O método *PCM* é característico por demarcar uma região envolvendo a molécula como um todo. Assim quando um confôrmero otimizado isoladamente possui um momento de dipolo elevado, quando submetido em meio aquoso, seja pelo cálculo de otimização ou em cálculo de *single-point*, esse confôrmero passará a ser o majoritário. Isso explica o fato do confôrmero 3 que tem um momento de dipolo de 7,43D, e 0,78% (Tabela 1) da população estudada isoladamente, quando solvatado compreende 84,4% da população. Nesta etapa foi realizado apenas o *single-point* pelo nível de teoria *B3LYP/cc-pVDZ*.

Tabela 4 – Energias, energias relativas e populações em meio aquoso da Ribavirina pelo método *PCM, B3LYP/cc-pVDZ*.

| Confôrmero | Energia* | ΔE_{rel}^{**} | % |
|------------|--------------|-----------------------|--------------|
| RIBAV 1 | -907,2733573 | 1,05 | 14,30 |
| RIBAV 2 | -907,2696973 | 3,35 | 0,29 |
| RIBAV 3 | -907,2750369 | 0,00 | 84,40 |
| RIBAV 4 | -907,2688870 | 3,86 | 0,10 |
| RIBAV 5 | -907,2705139 | 2,84 | 0,69 |
| RIBAV 6 | -907,2694072 | 3,53 | 0,22 |

* em Hartree, ** em Kcal.mol⁻¹.

Fonte: O autor.

A Tabela 5 apresenta as energias e populações das seis conformações da Ribavirina no solvente dimetilsulfóxido (DMSO) pelo modelo *PCM*. Foram observados valores de populações semelhantes aos cálculos de rotinas de solvatação em meio aquoso, considerando assim que a RIBAV 3 é majoritária com 85,15% da população e a RIBAV 1 consiste em 14,24% do equilíbrio conformacional.

Tabela 5 – Energias, energias relativas e populações em DMSO da Ribavirina pelo método *PCM*, *B3LYP/cc-pVDZ*.

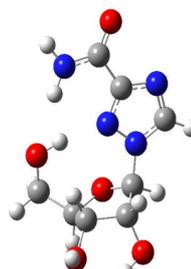
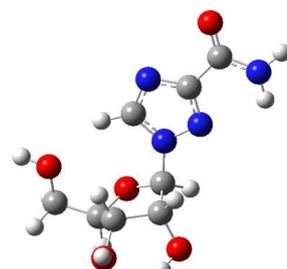
| Confômero | Energia* | ΔE_{rel}^{**} | % |
|-----------|--------------|-----------------------|--------------|
| RIBAV 1 | -907,2717509 | 1,06 | 14,24 |
| RIBAV 2 | -907,2672835 | 3,86 | 0,13 |
| RIBAV 3 | -907,2734388 | 0,00 | 85,15 |
| RIBAV 4 | -907,2667323 | 4,21 | 0,06 |
| RIBAV 5 | -907,2682247 | 3,27 | 0,34 |
| RIBAV 6 | -9072668464 | 4,14 | 0,08 |

* em Hartree, ** em Kcal.mol⁻¹.

Fonte: O autor.

A análise das populações obtidas em água e em DMSO apresentaram uma tendência populacional maior para a RIBAV 3 e uma porcentagem menor para a RIBAV 1. As demais conformações apresentaram quantidades pequenas para esta forma de simulação. A Figura 24 apresenta as duas conformações mais estáveis e o quadro demonstrando suas populações em cada solvente.

Figura 24 – Conformações majoritárias sob rotinas de solvatação, H₂O e DMSO.

| RIBAV 1 | Conformações | % | PCM | RIBAV 3 |
|---|--------------|--------------|------------------|---|
|  | RIBAV 1 | 14,30 | H ₂ O |  |
| | RIBAV 3 | 84,40 | | |
| | RIBAV 1 | 14,24 | DMSO | |
| | RIBAV 3 | 85,15 | | |

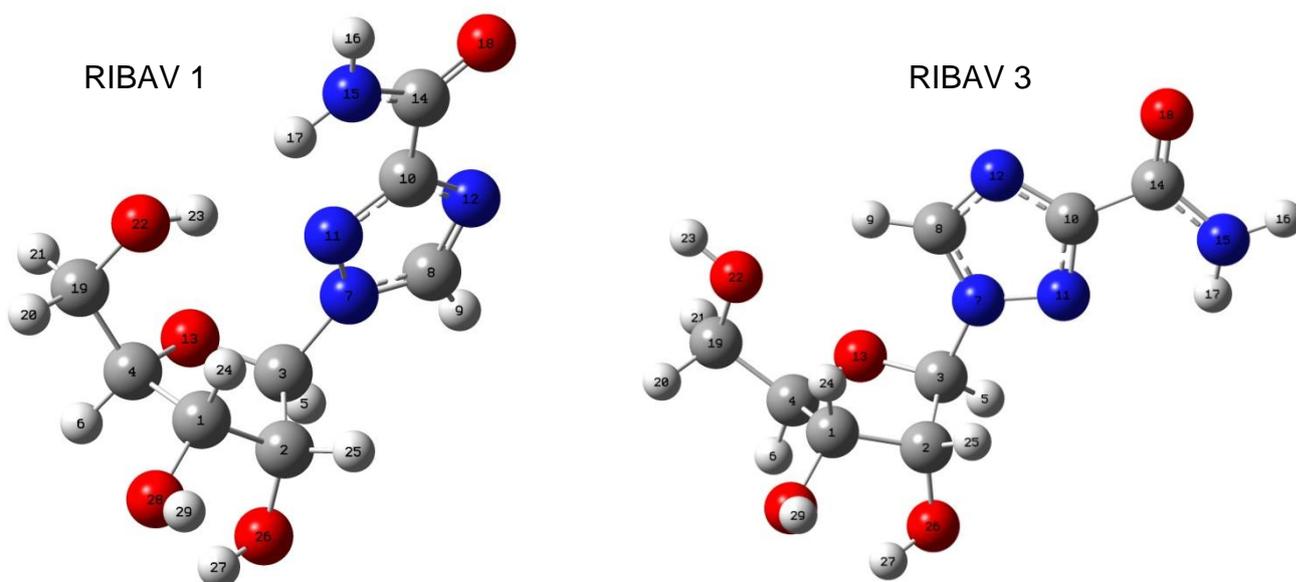
Fonte: O autor.

Houve boa correlação das populações quando submetidas a solvatação pelo método *PCM*. Desta forma seleciona-se apenas estas conformações para executar os cálculos de frequência e RMN teórico. Posteriormente, no final deste capítulo, será feita a comparação entre os métodos teóricos e experimentais.

Inicialmente, no cálculo de frequência, foi relacionada cada deformação angular e axial com os grupos observados das conformações. Todos os valores acima de 1550 cm^{-1} são encontrados na Tabela 6. Foi observado um leve aumento no valor de frequência em alguns grupos da RIBAV 3 com relação a RIBAV 1. Por exemplo, as deformações axiais assimétricas e simétricas do grupo -NH_2 foram 3727 e 3595 cm^{-1} , respectivamente, para a RIBAV 3. Já observando-se a RIBAV 1, a deformação axial assimétrica foi de 3722 cm^{-1} e a deformação axial simétrica foi de 3593 cm^{-1} . Outro grupo observado é caracterizada pela deformação axial da carbonila, $\nu(\text{C14=O18})$, com valores de 1787 e 1785 cm^{-1} para a RIBAV 1 e a RIBAV 3, respectivamente. O nível de teoria, *HF/6-311G(d,p)*, foi citado em estudos anteriores como um bom método e conjunto de funções de base para ser comparado com a técnica experimental de espectroscopia na região do infravermelho (RAMALINGAMA, ANBUSRINIVASANB e PERIANDYC, 2011).

Tabela 6 – Frequências teóricas obtidas em nível de teoria *HF/6-311G(d,p)*.

| RIBAV 1 | | RIBAV 3 | |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Frequência (cm ⁻¹) | Grupo observado | Frequência (cm ⁻¹) | Grupo observado |
| 3800 | ν (O28-H29) | 3813 | ν (O22-H23) |
| 3722 | ν _{ass} (H16-N15-H17) | 3799 | ν (O28-H29) |
| 3681 | ν (O26-H27) | 3727 | ν _{ass} (H16-N15-H17) |
| 3633 | ν (O22-H23) | 3700 | ν (O26-H27) |
| 3593 | ν _{sim} (H16-N15-H17) | 3595 | ν _{sim} (H16-N15-H17) |
| 3259 | ν (C8-H9) | 3279 | ν (C8-H9) |
| 3104 | ν (C1-H24) | 3108 | ν (C3-H5) |
| 3098 | ν (C3-H5) | 3092 | ν (C1-H24) |
| 3064 | ν (C19-H20) | 3040 | ν (C19-H21) |
| 3048 | ν (C4-H6) | 3038 | ν (C4-H6) |
| 3024 | ν (C2-H25) | 3036 | ν (C2-H25) |
| 3002 | ν (C19-H21) | 3001 | ν (C19-H20) |
| 1826 | δ (H16-N15-H17) | 1820 | δ (H16-N15-H17) |
| 1787 | ν (C14=O18) | 1785 | ν (C14=O18) |
| 1665 | δ (C19-O22-H23) | 1651 | δ (H21-C19-H20) |
| 1646 | δ (H21-C19-H20) | 1626 | δ (C19-O22-H23) |
| 1626 | δ (C2-O26-H27) | 1624 | ν (C8=N12) |
| 1623 | ν (C8=N12) | 1619 | δ (C1-O28-H29) |
| 1607 | δ (C1-O28-H29) | 1604 | δ (C2-O26-H27) |
| 1584 | ν (C14-N15) | 1581 | ν (C14-N15) |
| 1577 | δ (N7-C3-H5) | 1563 | δ (N7-C3-H5) |



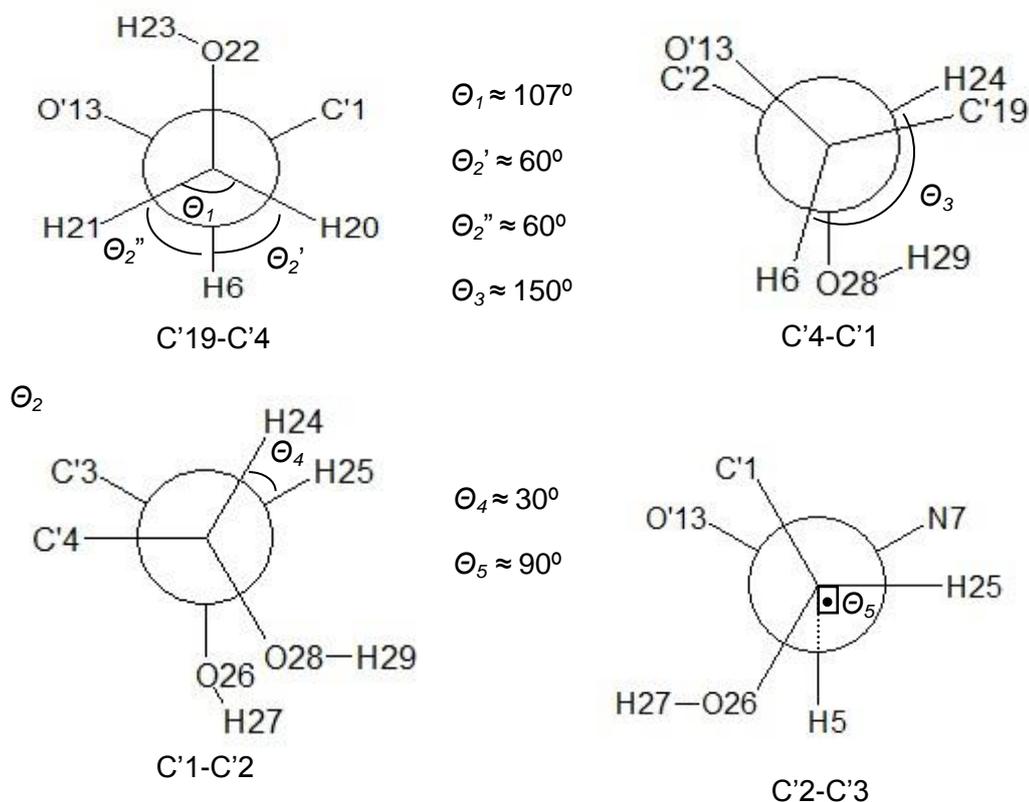
Fonte: O autor.

Para analisar o cálculo de Ressonância magnética ($^{SSCCs}J$) nuclear primeiramente foi realizado uma análise dos ângulos diedros formados entre as ligações do carbono da ribose. Esta análise relaciona o valor do ângulo diedro entre os hidrogênios com a curva de *Karplus* (Figura 16). Ângulos próximos a 0° e 180° apresentam um elevado valor de constante de acoplamento à três ligações. Ângulos próximos a 90° apresentam acoplamentos próximos a zero. Outra relação observada foi para o ângulo formado pelo grupo H21-C19-H20, sendo este acoplamento entre hidrogênios geminais que mostram um acoplamento a duas ligações.

A Figura 25 apresenta as projeções de *Newman* e os ângulos diedros formados entre os hidrogênios. Os valores exatos dos ângulos diedros formados entre os hidrogênios da ribose estão apresentados na Tabela 7, seguido das constantes de acoplamento teóricas (J_{teo}) encontradas para a RIBAV 1 e RIBAV 3. Ainda nesta Tabela, encontram-se as constantes de acoplamento calculadas (J_{cal}) pelo efeito da população conformacional nos mesmos solventes que foi efetuado o *PCM*. Esta constante de acoplamento calculada é obtida pela média ponderada das constantes de acoplamento teóricas, tendo como pesos as populações das conformações nas rotinas de solvatação, conforme a equação 8 citada na metodologia.

Os valores de constante de acoplamento calculados apresentaram uma leve mudança pelo efeito da variação do solvente. Tendo em vista que a água possui uma maior polaridade em relação ao DMSO, houve um leve aumento de valor em alguns acoplamentos. Por exemplo, o acoplamento entre o H24 e o H25 que passou de 5,16 *Hz* em DMSO, para 5,24 *Hz* em água. Pelo contrário, este acoplamento não se manteve tão proporcional a curva de *Karplus*, visto que o baixo valor de ângulo formado entre esse diedro, aproximadamente $35,5^\circ$, deveria apresentar um maior valor de acoplamento. O acoplamento entre H25-H5 foi o menor encontrado, visto que entre os diedros destes hidrogênios é aproximado a um ângulo reto, impossibilitando que aconteça um acoplamento expressivo entre estes prótons. O maior acoplamento, como já era esperado, foi atribuído entre os hidrogênios H21 e H20, 10,6 *Hz*. Este alto valor de J_{cal} está relacionado a um acoplamento a duas ligações, diferente dos demais acoplamentos encontrados na Ribavirina que são formados a três ligações.

Figura 25 – Projeções de *Newman* da Ribavirina e valores dos ângulos diedros formados entre os hidrogênios.



Fonte: O autor.

Tabela 7 – Constantes de acoplamento teóricas (2J e 3J) e os respectivos ângulos diedros formados entre os hidrogênios e constantes de acoplamento calculadas para cada solvente.

| Hidrogênios Acoplados | RIBAV 1 | | RIBAV 3 | | Acoplamento H ₂ O (Hz) | Acoplamento DMSO (Hz) |
|--------------------------|----------------|--------------|----------------|--------------|--------------------------------------|--------------------------|
| | J_{teo} (Hz) | Θ (°) | J_{teo} (Hz) | Θ (°) | J_{cal} (H ₂ O) | J_{cal} (DMSO) |
| H21-H20 (2J) | 13,5 | 107,7 | 10,1 | 108,4 | 10,64 | 10,62 |
| H20-H6 (3J) | 2,0 | 53,7 | 2,2 | 51,1 | 2,19 | 2,20 |
| H21-H6 (3J) | 1,9 | 62,9 | 2,2 | 66,0 | 2,16 | 2,16 |
| H6-H24 (3J) | 7,8 | 149,4 | 8,8 | 156,0 | 8,62 | 8,62 |
| H24-H25 (3J) | 5,7 | 32,8 | 5,2 | 36,0 | 5,24 | 5,16 |
| H25-H5 (3J) | 0,3 | 92,4 | 0,3 | 92,0 | 0,33 | 0,33 |

Fonte: O autor.

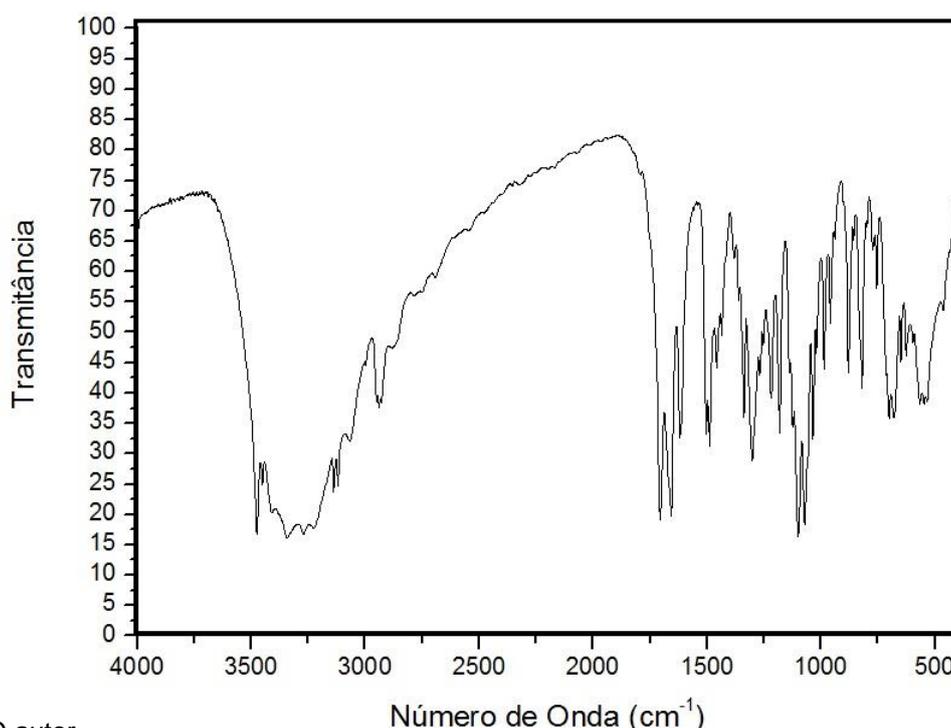
4.1.2. RESULTADOS EXPERIMENTAIS

O processo de filtração reteve o estearato de magnésio que não é solúvel em água. A extração da Ribavirina com solvente orgânico separou ela do restante do excipiente (celulose cristalina e polivinilpirrolidona, solúveis na fase aquosa). A massa final do composto obtido foi de 0,73 g, com rendimento de 27,5 %. Este baixo rendimento, deve-se ao fato do fármaco ter solubilidade tanto em éter etílico quanto em água, portanto parte dele ficou retido na fase aquosa

4.1.2.1. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

Na Figura 26 está apresentado o espectro de IV da Ribavirina usando pastilha de KBr.

Figura 26 – Espectro de infravermelho da Ribavirina.



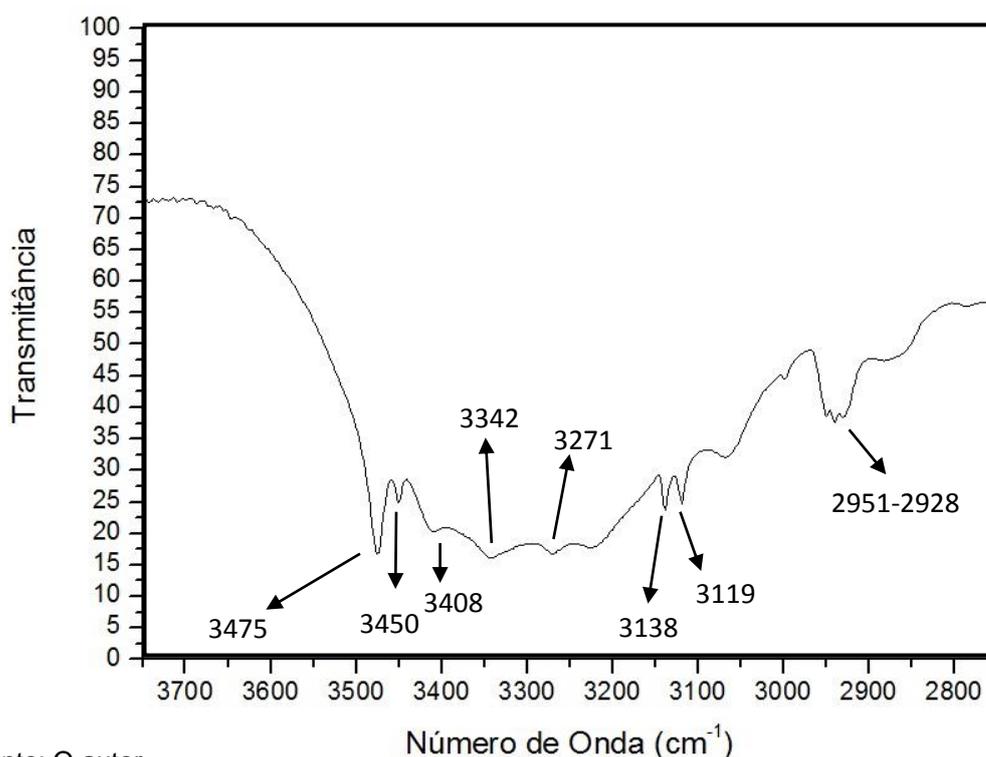
Fonte: O autor.

Na Figura 27 está demonstrada a região entre 2800-3700 cm^{-1} , onde se caracteriza e identifica os movimentos de deformação axial de ligações carbono-hidrogênio (sp^3), carbono-hidrogênio (sp^2), nitrogênio-hidrogênio (amida) e oxigênio-hidrogênio (álcool), respectivamente em ordem crescente de frequência.

A região entre $1600-1800\text{ cm}^{-1}$ está destacada na Figura 28. Essa região é conhecida por apresentar as deformações axiais de grupos carbonila, como por exemplo, carbonilas de cetonas e de aldeídos. O grupo funcional referente à Ribavirina é denominado carboxiamida, ou seja, uma amida terminal ($-\text{CONH}_2$).

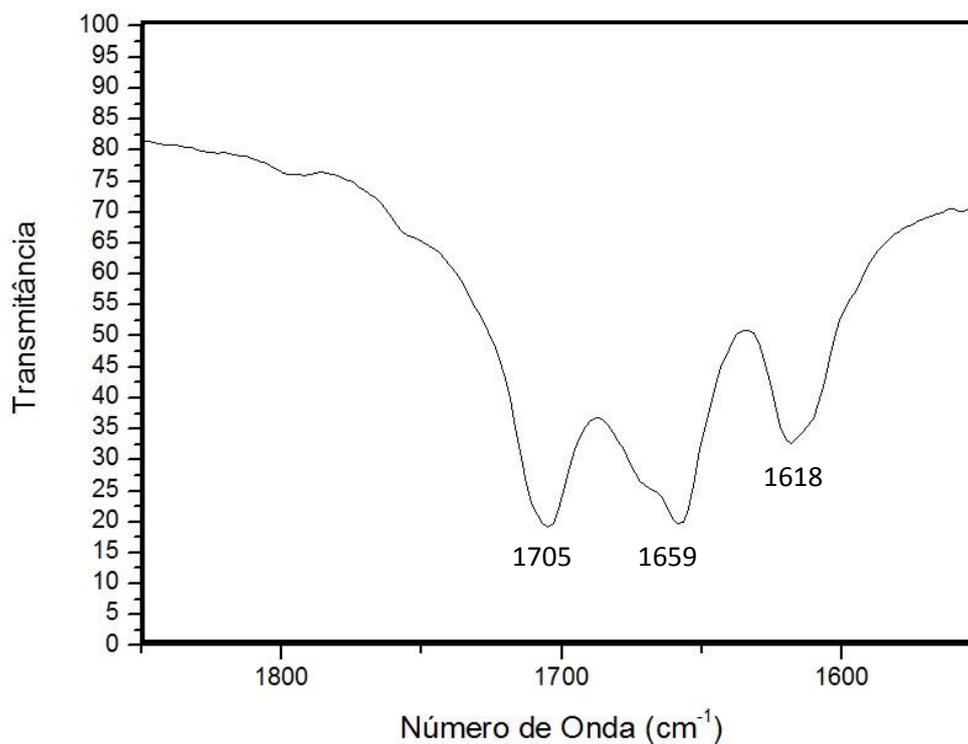
Na região de 2800 à 3700 cm^{-1} foi possível atribuir alguns pontos característicos da Ribavirina. Os primeiros evidenciados são as deformações axiais das três hidroxilas da ribose. A segunda atribuição é a deformação axial assimétrica e simétrica da ligação nitrogênio-hidrogênio do grupo amida. Os demais grupos caracterizados nesta região são estiramentos da ligação de carbono-hidrogênio envolvendo as hibridizações sp^2 e sp^3 . Três bandas da região ($1600-1800\text{ cm}^{-1}$), especificamente em 1705 , 1658 e 1618 cm^{-1} , apresentam forte intensidade. Comparando estes resultados com estudos já mencionados na literatura, os valores entram em concordância para descrever o estiramento da carbonila (1705 cm^{-1}) e da deformação axial da ligação nitrogênio-carbono (sp^2) (1659 e 1618 cm^{-1}) das ligações duplas do interior do anel triazólico. A Tabela 8 trás os principais valores de número de onda (ν) e a relação do grupo caracterizado por esta mesma frequência. Abaixo de 1600 cm^{-1} , denominamos como a região do espectro que apresenta as deformações angulares da molécula.

Figura 27 – Espectro de infravermelho da Ribavirina, região entre $2800-3700\text{ cm}^{-1}$.



Fonte: O autor.

Figura 28 – Espectro de infravermelho da Ribavirina, região entre 1600-1800 cm^{-1} .



Fonte: O autor.

Tabela 8 – Número de onda e grupo caracterizado pelo espectro na região do IV.

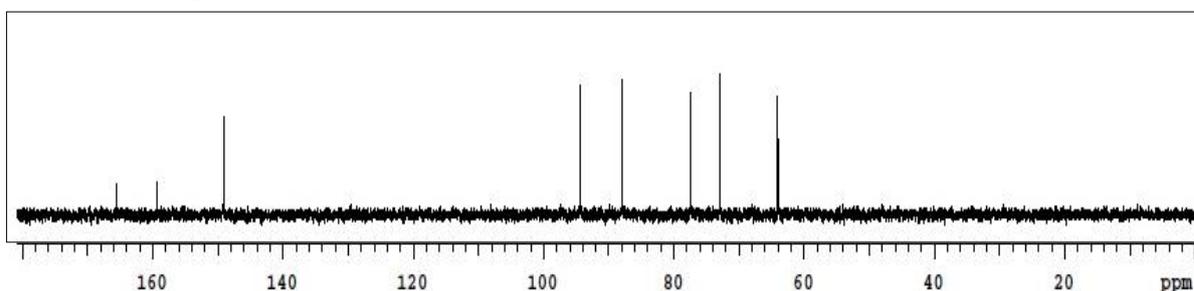
| ν (cm^{-1}) | Grupo observado |
|----------------------------|--|
| 3475, 3450, 3408 | Deformação axial $\nu(\text{O-H})$ - ribose |
| 3342 | Deformação axial assimétrica $\nu(\text{N-H})$ - amida |
| 3271 | Deformação axial simétrica $\nu(\text{N-H})$ - amida |
| 3138, 3119 | Deformação axial $\nu(\text{C-H})$ - sp^2 |
| 2951 - 2928 | Deformação axial $\nu(\text{C-H})$ - sp^3 |
| 1705 | Deformação axial/estiramento $\nu(\text{C=O})$ - amida |
| 1659, 1618 | Deformação axial $\nu(\text{C=N})$ - Triazol |

Fonte: O autor.

4.1.2.2. ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Para a caracterização da Ribavirina foram obtidos espectros de RMN de hidrogênio e de carbono-13 em D₂O. O espectro de RMN de ¹³C (Figura 29) apresentou oito sinais em diferentes deslocamentos químicos. Analisando a estrutura molecular do fármaco, esperou-se encontrar cinco picos referentes aos cinco carbonos da ribose, dois referente aos dois carbonos do anel triazólico e um referente ao carbono da carboxiamida. Comparando com dados da literatura (GRANCHER et al., 2005 e LIU et al., 2005) houve concordância com os valores obtidos. Na sequência, a Figura 30 apresenta os deslocamentos químicos de cada carbono.

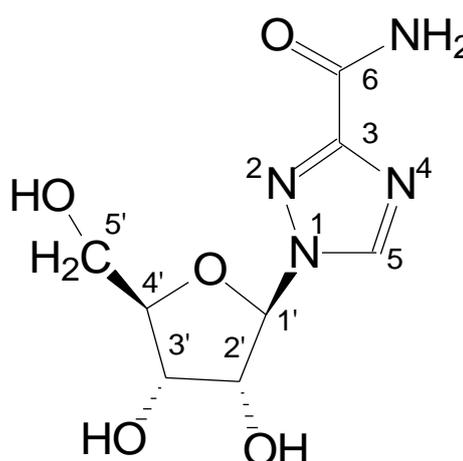
Figura 29 – Espectro de RMN de ¹³C em D₂O na frequência de 75,457MHz.



Fonte: O autor.

Figura 30 – Representação da Ribavirina com numeração em seus carbonos e deslocamentos químicos obtidos em D₂O na frequência de 75,457MHz.

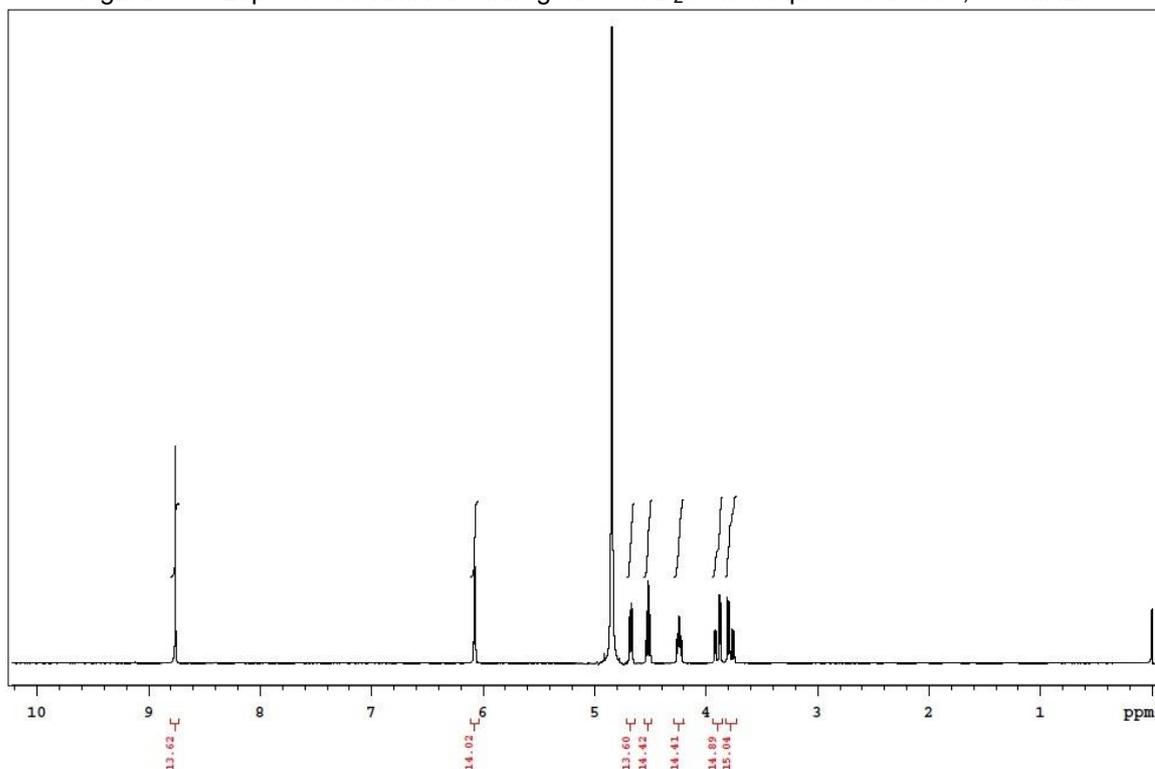
| Carbonos da Ribavirina | Deslocamento químico (em ppm) |
|------------------------|-------------------------------|
| 6 | 165,6 |
| 3 | 159,3 |
| 5 | 149,0 |
| 1' | 94,4 |
| 2' | 77,4 |
| 3' | 72,9 |
| 4' | 87,9 |
| 5' | 64,1 |



Fonte: O autor.

O espectro de RMN de hidrogênio em D₂O (Figura 31) apresentou oito sinais, sendo que um sinal por volta de 4,8 ppm é característico do solvente. Pela integração cada sinal representa um hidrogênio.

Figura 31 – Espectro de RMN de hidrogênio em D₂O na frequência de 300,058 MHz.



Fonte: O autor.

A Tabela 9 apresenta os valores de deslocamento químico e os valores das constantes de acoplamento encontradas na análise do espectro de RMN de hidrogênio. É importante verificar que existe uma constante, $^2J_{21-20} = 12,6 \text{ Hz}$, do acoplamento geminal (grupo diastereotópico). Os demais acoplamentos são vicinais à três ligações com constantes de acoplamento de médio a pequeno valor. Estes valores estão coerentes com os descritos na literatura (PAVIA et al., 2010 e SILVERSTAIN, WEBSTER e KIEMLE, 2007).

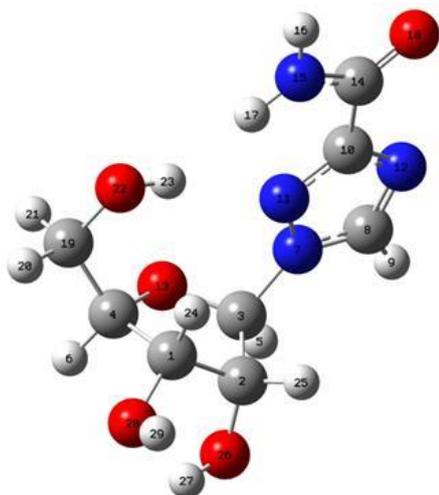


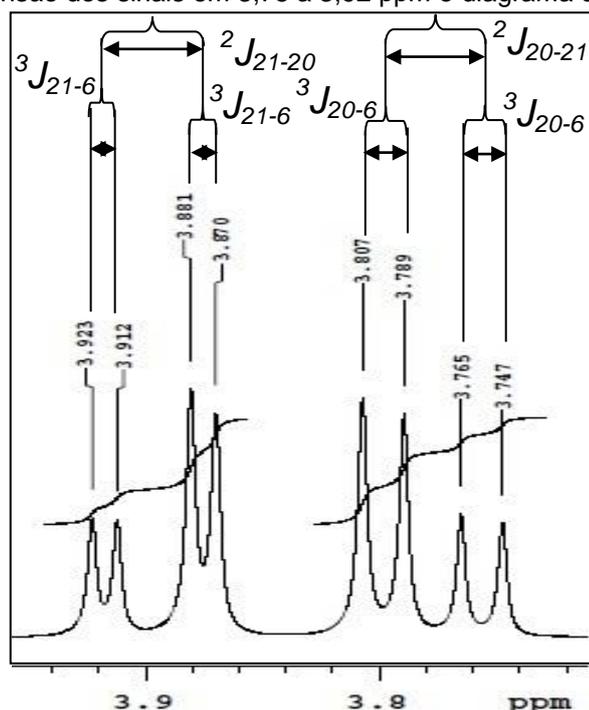
Tabela 9 – Representação da Ribavirina com numeração em seus carbonos, deslocamentos químicos e acoplamentos obtidos em D₂O na frequência de 300,058 MHz.

| Grupo analisado | Deslocamento Químico (ppm) | Constantes de Acoplamento (Hz) |
|---|----------------------------|--|
| H ₂₁ -C ₁₉ -H ₂₀ | 3,838 | ${}^2J_{21-20}=12,6 / {}^3J_{20-6}=5,4 / {}^3J_{21-6}=3,3$ (2dd) |
| C ₄ -H ₆ | 4,240 | ${}^3J_{6-24}$ e ${}^3J_{6-21} = 5,4 / {}^3J_{6-20} = 3,3$ (ddd) |
| C ₁ -H ₂₄ | 4,517 | ${}^3J_{24-6}$ e ${}^3J_{24-25} = 5,4$ (dd) |
| C ₂ -H ₂₅ | 4,675 | ${}^3J_{25-24} = 5,4 / {}^3J_{25-5} = 3,3$ (dd) |
| C ₃ -H ₅ | 6,075 | ${}^3J_{5-25} = 3,3$ (d) |
| C ₈ -H ₉ (sp ²) | 8,761 | (s) |

Fonte: O autor.

A seguir foi realizada uma análise detalhada destes sinais. As primeiras regiões a serem analisadas - Figura 32 - são os dois sinais que integram para um hidrogênio cada e compreendem um conjunto de oito picos entre 3,75 a 3,92 ppm, referente aos hidrogênios ligados ao carbono C₁₀. Calculando as constantes de acoplamento, J , foi observado um valor maior para o sinal mais blindado e um valor menor para o mais desblindado. As constantes ${}^3J_{21-6} = 5,4$ Hz e a ${}^3J_{20-6} = 3,3$ Hz ocupam os extremos e um acoplamento maior de ${}^2J_{21-20} = 12,6$ Hz é encontrado na resultante desse primeiro acoplamento. Estes valores de acoplamentos justificam a presença de duas duplas de dubletos (dd) de um grupo diastereotópico, pois o carbono C₁₉ é ligado a um centro quiral (carbono, C₄). Assim H₆ acopla com H₂₁ e com H₂₀ em deslocamentos químicos diferentes, explicando o fato do sinal se desdobrar em dois conjuntos de picos.

Figura 32 – Expansão dos sinais em 3,75 a 3,92 ppm e diagrama de árvore em D₂O.



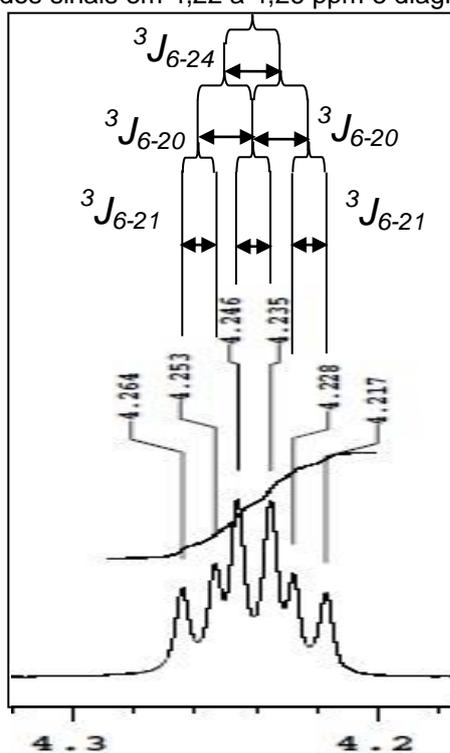
Fonte: O autor.

A segunda região, Figura 33, é formada por seis picos entre 4,22 a 4,26 ppm, referente ao hidrogênio H₆. As constantes de acoplamento encontradas são 3,3 Hz e 5,4 Hz. Com isso concluímos que a multiplicidade dessa região se trata de um duplo duplo (ddd).

A terceira região analisada consiste em dois sinais com três picos cada um, encontrados em 4,52 ppm e 4,67 ppm, referente aos hidrogênios H₂₄ e H₂₅. De forma análoga a segunda análise feita, valores de constante de acoplamento iguais são encontrados em ambos os sinais. Outra afirmação é a multiplicidade dos sinais serem atribuídas como dd, pelas constantes de acoplamento iguais nas extremidades (Figura 34).

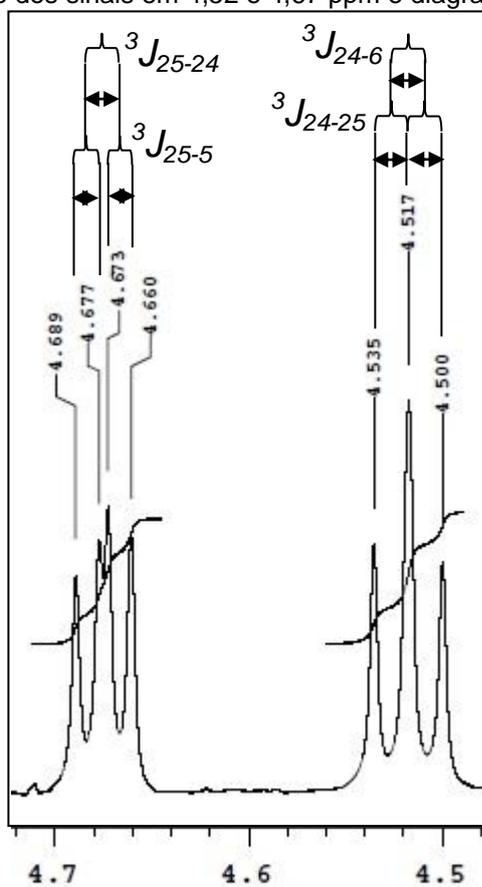
A quarta e última região a ser estudada são os dois sinais mais desblindados (Figura 35). O sinal da direita é um duplete (d) em 6,07 ppm, referente ao hidrogênio H₅, com constante de acoplamento de 3,3 Hz – uma constante $^3J_{25-5}$. O sinal da esquerda é formado por um simpleto (s) em 8,76 ppm e referente ao hidrogênio ligado ao carbono C₈ do anel triazólico com hibridização sp².

Figura 33 – Expansão dos sinais em 4,22 a 4,26 ppm e diagrama de árvore em D₂O.



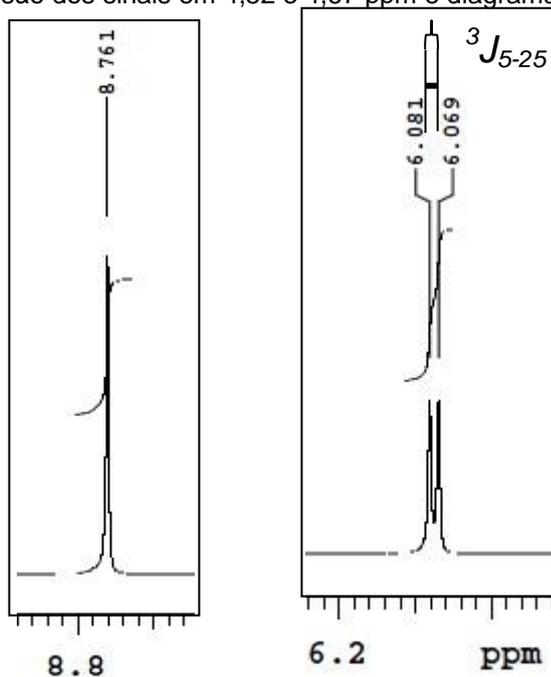
Fonte: O autor.

Figura 34 – Expansão dos sinais em 4,52 e 4,67 ppm e diagrama de árvore em D₂O.



Fonte: O autor.

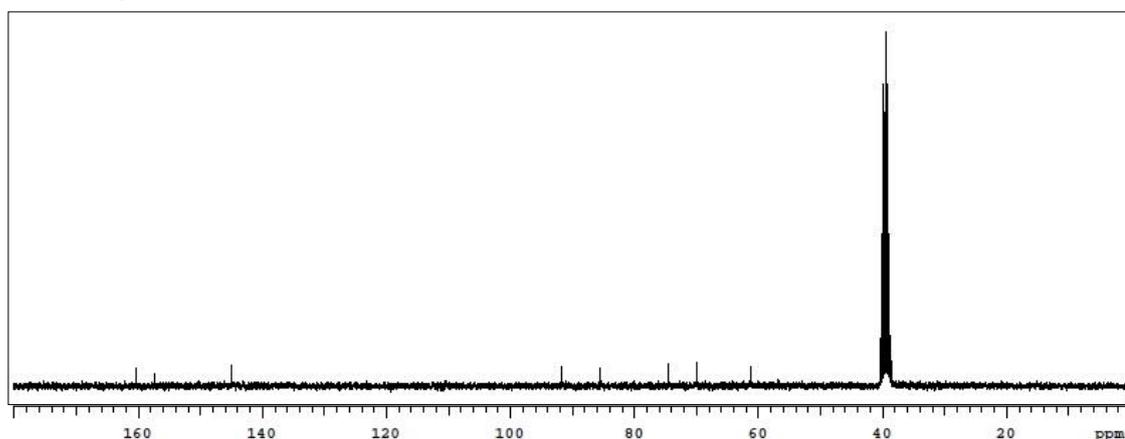
Figura 35 – Expansão dos sinais em 4,52 e 4,67 ppm e diagrama de árvore em D₂O.



Fonte: O autor.

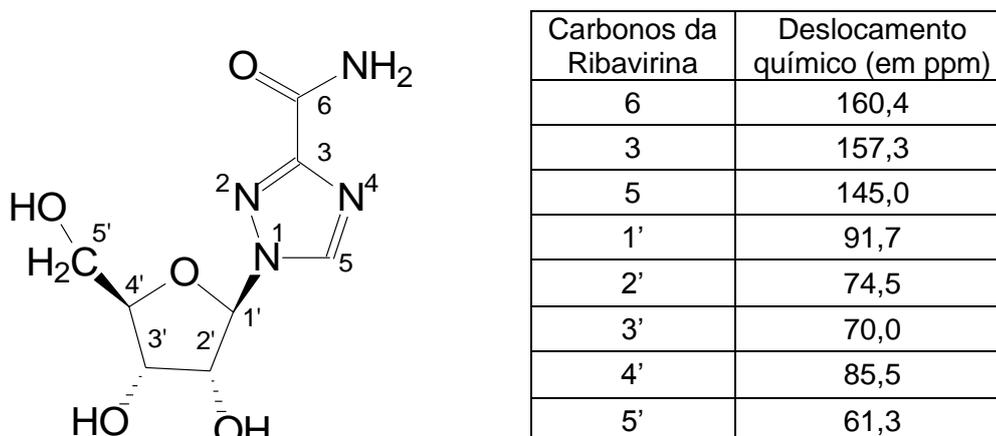
Além dos espectros obtidos em D₂O, os mesmos foram adquiridos também em DMSO-d₆. O espectro de carbono-13 apresentou o mesmo padrão nos dois solventes, havendo pequenas modificações de deslocamentos químicos como é possível observar nas Figuras 36 e 37. Comparando com análises descritas na literatura (GRANCHER et al., 2005 e LIU et al., 2005) houve uma ótima concordância com os valores obtidos.

Figura 36 – Espectro de RMN de ¹³C em DMSO-d₆ na frequência de 75,457MHz.



Fonte: O autor.

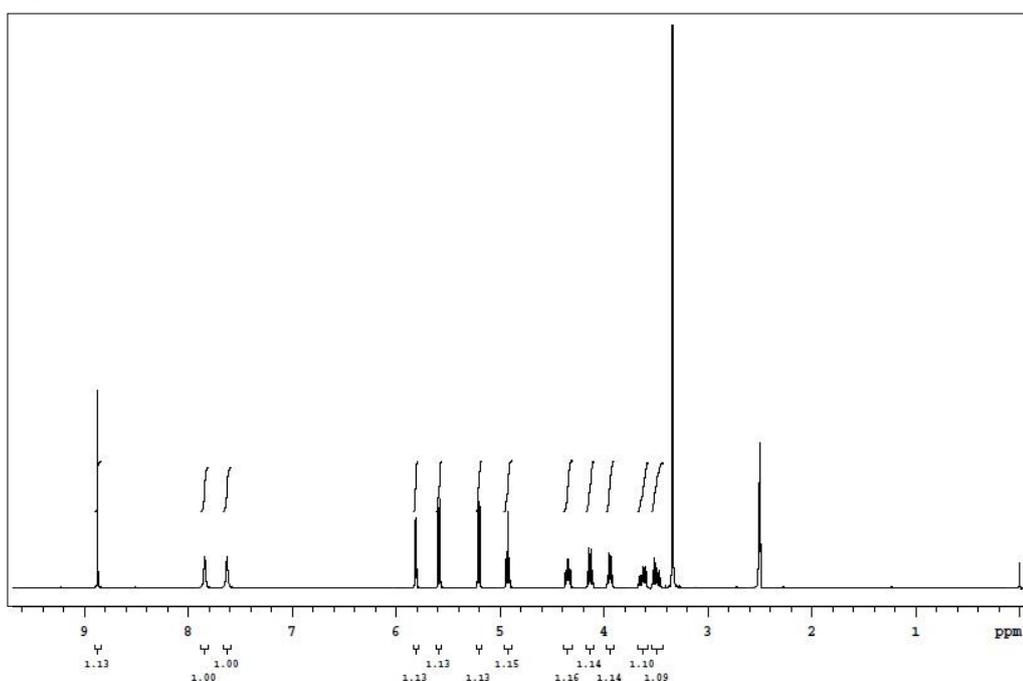
Figura 37 – Representação da Ribavirina com numeração em seus carbonos e deslocamentos químicos obtidos em DMSO-d₆ na frequência de 75,457 MHz.



Fonte: O autor.

O espectro de RMN de ¹H em DMSO-d₆ (Figura 38) apresentou treze sinais, sendo que um sinal por volta de 2,5 e 3,25 ppm é característico dos prótons do solvente. Oito sinais apresentaram deslocamento químico abaixo de 6 ppm e três sinais mais desblindados, acima deste valor. Pela integral, cada sinal representa um hidrogênio.

Figura 38 – Espectro de RMN de próton em DMSO-d₆ na frequência de 300,058 MHz.



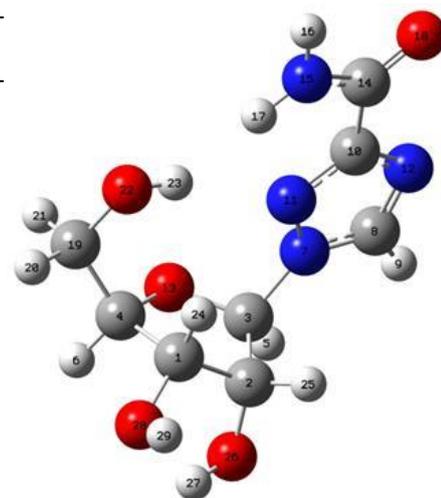
Fonte: O autor.

A Tabela 10 apresenta o grupo analisado, o deslocamento químico e as constantes de acoplamento encontradas. Os valores obtidos no espectro de RMN em DMSO-d₆ apresentam uma boa concordância com os valores encontrados na literatura (PAVIA et al., 2010 e SILVERSTAIN, WEBSTER e KIEMLE, 2007).

Tabela 10 – Representação da Ribavirina com numeração em seus carbonos, deslocamentos químicos e acoplamentos obtidos em DMSO-d₆ na frequência de 300,058 MHz.

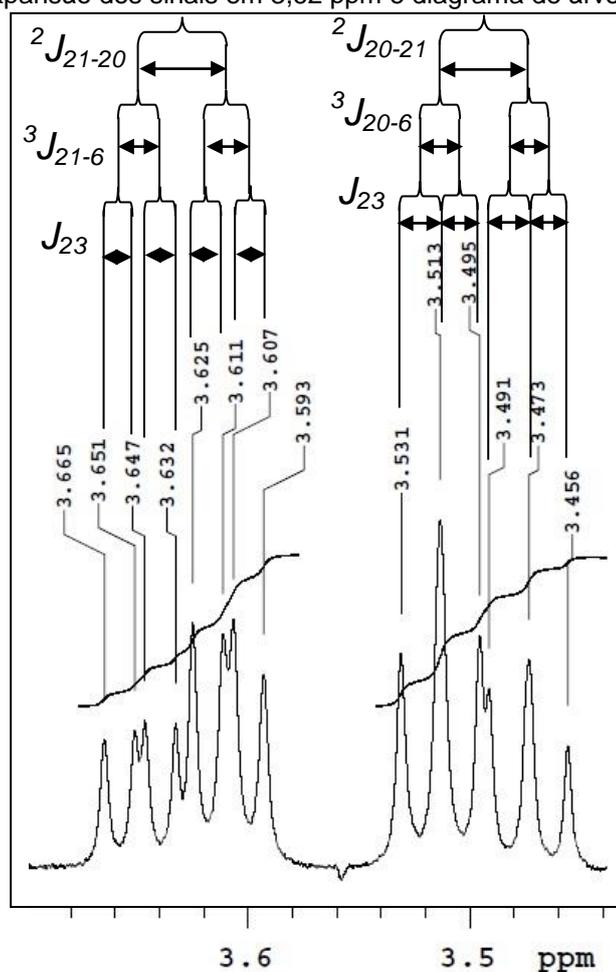
| Grupo analisado | Deslocamento Químico (ppm) | Constantes de Acoplamento (Hz) |
|---|----------------------------|--|
| H ₂₁ -C ₁₉ -H ₂₀ | 3,562 | ² J ₂₁₋₂₀ =12 / ³ J ₂₁₋₆ =5,4 / ³ J ₂₀₋₆ =4,2 (2ddd) |
| C ₄ -H ₆ | 3,943 | ³ J ₆₋₂₄ =5,4 / ³ J ₆₋₂₀ =4,2 (ddd) |
| C ₁ -H ₂₄ | 4,134 | ³ J ₂₄₋₆ =5,4 (ddd) |
| C ₂ -H ₂₅ | 4,348 | ³ J ₂₅₋₂₄ =5,4 / ³ J ₂₅₋₅ =4,2 (ddd) |
| C ₁₉ -O ₂₂ H ₂₃ | 4,927 | J ₂₃ =5,7 (t) |
| C ₁ -O ₂₈ H ₂₉ | 5,205 | J ₂₉ =5,7 (d) |
| C ₂ -O ₂₆ H ₂₇ | 5,585 | J ₂₇ =5,7 (d) |
| C ₃ -H ₅ | 5,811 | ³ J ₅₋₂₅ = 4,2 (d) |
| N ₁₅ -H ₁₆ | 7,627 | (s) |
| N ₁₅ -H ₁₇ | 7,824 | (s) |
| C ₈ -H ₉ (sp ²) | 8,761 | (s) |

Fonte: O autor.



A primeira região a ser analisada (Figura 39) são os sinais que compreendem um conjunto de quatorze picos em 3,62 ppm, referentes aos hidrogênios ligados ao carbono C₁₉. As constantes de acoplamento ³J₂₀₋₆ = 5,4 Hz e a ³J₂₁₋₆ = 4,2 Hz são encontradas e um acoplamento maior de ²J₂₁₋₂₀ = 12 Hz é encontrado na resultante dos primeiros acoplamentos. Estes valores de acoplamentos justificam a presença de dois duplos duplos dubletos (ddd) de um centro diastereotópico, assim como foi visualizado na Figura 32.

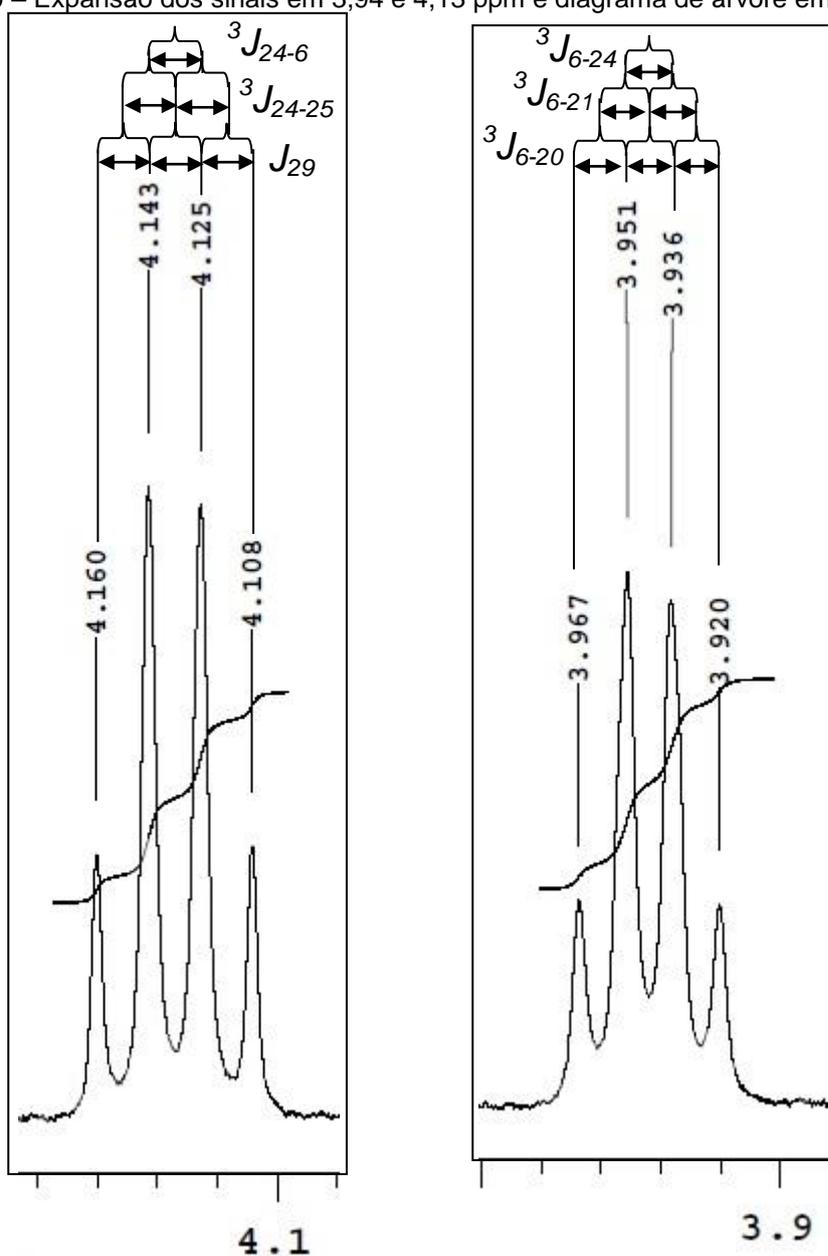
Figura 39 – Expansão dos sinais em 3,62 ppm e diagrama de árvore em DMSO-d₆.



Fonte: O autor.

O segunda região, Figura 40, é formada por quatro picos em 3,94 ppm e mais quatro em 4,13 ppm, referente ao hidrogênio H₆ e H₂₄, respectivamente. As constantes de acoplamento dos dois sinais variam de 4,2 Hz à 5,4 Hz. Com isso concluimos que a multiplicidade desses sinais é atribuída para dois duplo duplo doubletos (ddd).

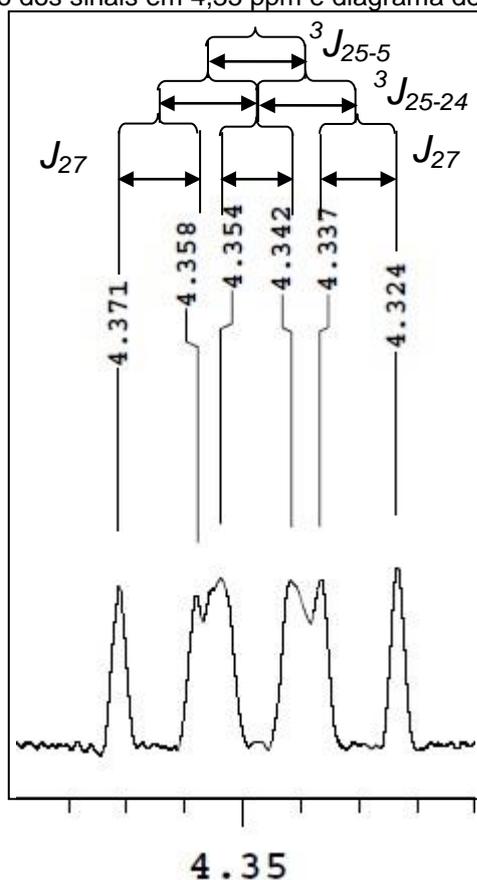
Figura 40 – Expansão dos sinais em 3,94 e 4,13 ppm e diagrama de árvore em DMSO-d₆.



Fonte: O autor.

A terceira região, Figura 41, apresenta um ddd formado por três acoplamentos $^3J_{4-5}$ e dois acoplando em 5,4 Hz. O deslocamento químico desse sinal é 4,35 ppm, referentes ao hidrogênio H4, que está ligado ao carbono C2'.

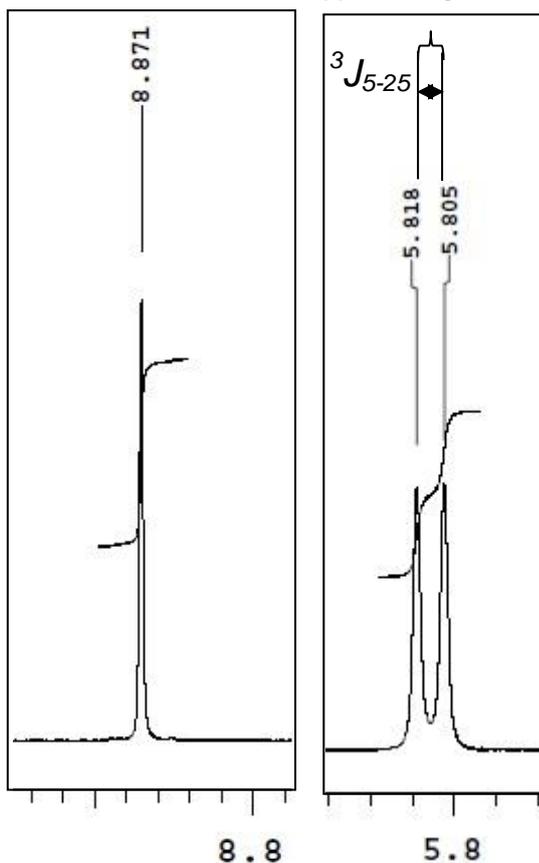
Figura 41 – Expansão dos sinais em 4,35 ppm e diagrama de árvore em DMSO-d₆.



Fonte: O autor.

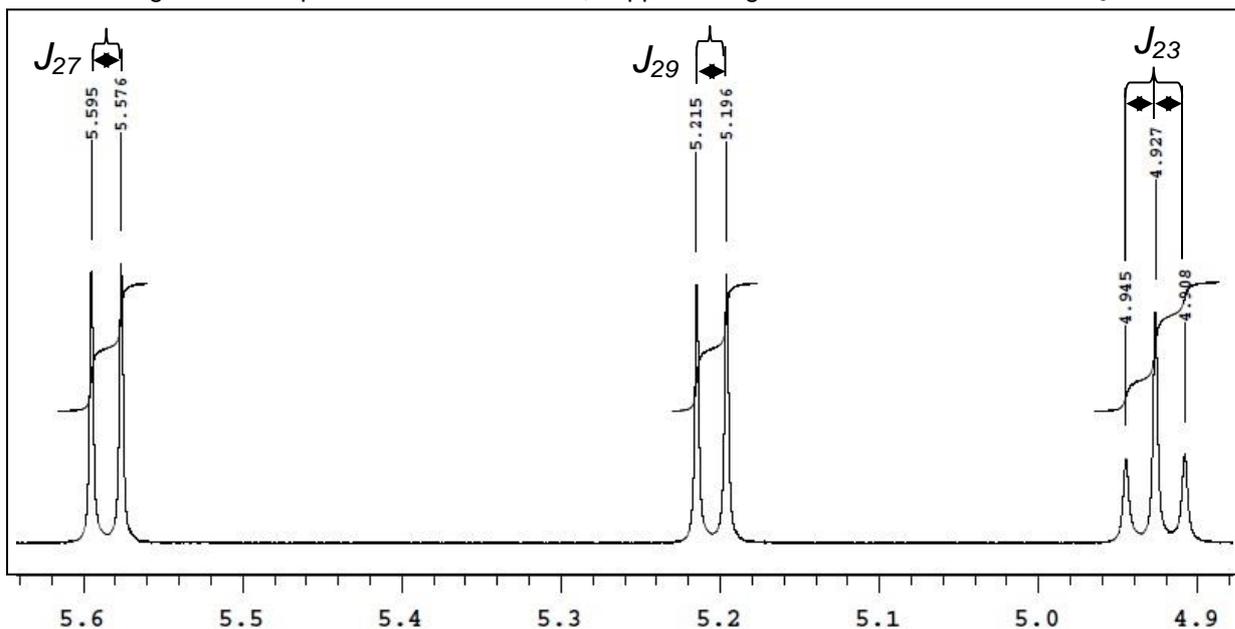
A quarta região a ser estudada são dois sinais desblindados (Figura 42). O primeiro sinal é um duplete, d, em 5,81 ppm, com constante de acoplamento ${}^3J_{5-25} = 4,2 \text{ Hz}$, referente ao hidrogênio H₅ ligado ao carbono C₃. O segundo sinal é formado por um simpleto, s, em 8,87 ppm, atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono C₈ (sp²) do anel triazólico.

Figura 42 – Expansão dos sinais em 5,81 e 8,87 ppm e diagrama de árvore em DMSO-d₆.

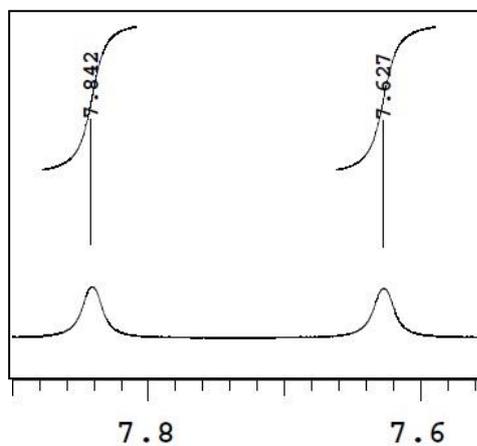


Fonte: O autor.

No estudo do espectro da Ribavirina neste solvente, diferentemente da água, ocorre o aparecimento de três sinais (Figura 43) em 4,93 à 5,58 ppm e dois sinais, Figura 44, em 7,63 e 7,84 ppm. A quinta região analisada é formada por um tripleto (t, em 4,93 ppm, H₂₃), um dubleto (d, em 5,20 ppm, H₂₉) e um último dubleto (d, em 5,58 ppm, H₂₇) todos com um único valor de constante de acoplamento $J = 5,7$ Hz. Esse deslocamento químico e esse acoplamento evidenciam os prótons ligados aos oxigênios (grupos hidroxila). A sexta aproximação é formada por sinais fortemente desblindados com deslocamentos químicos característicos de hidrogênio ligado a nitrogênio, portanto são atribuídos ao grupo amida da Ribavirina (Hidrogênios H₁₆ e H₁₇).

Figura 43 – Expansão dos sinais em 4,35 ppm e diagrama de árvore em DMSO-d₆.

Fonte: O autor.

Figura 44 – Expansão dos sinais em 4,35 ppm e diagrama de árvore em DMSO-d₆.

Fonte: O autor.

4.1.3. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS COM OS TEÓRICOS

Inicialmente o estudo das duas conformações em solução, RIBAV 1 e RIBAV 3, apresentou um comportamento conformacional com aproximadamente 85% da população da RIBAV 3 e 15% da RIBAV 1, independentemente do meio submetido (H₂O e DMSO). Posteriormente, o espectro de RMN em D₂O e DMSO-d₆ apresentou uma leve variação em algumas constantes de acoplamento. Porém, chama-se a atenção para constante de acoplamento a duas ligações ²J₂₁₋₂₀. Houve uma leve variação de 12,6 Hz em D₂O, para 12,0 Hz em dimetilsulfóxido. Isso evidencia a existência de duas ou mais conformações, como observado pelo cálculo teórico. Outra semelhança é a diminuição da constante de acoplamento calculada entre os meios de solvatação. Em água foi observado que a constante *J_{cal}* entre os hidrogênios H21-H20 é 10,64 Hz e em DMSO ela corresponde a 10,62 Hz, portanto a variação observada experimentalmente também acontece, em menor escala, teoricamente. Os demais valores encontram-se alguns em conformidade entre as técnicas e outros não tão equivalentes. Os demais valores teóricos e experimentais estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Constantes de acoplamento teóricas e experimentais para a Ribavirina.

| Hidrogênios Acoplados | Acoplamento Teórico (Hz) <i>J_{cal}</i> (H ₂ O) | Acoplamento Experimental (Hz) ³⁻² J _{H-H} (D ₂ O) | Acoplamento Teórico (Hz) <i>J_{cal}</i> (DMSO) | Acoplamento Experimental (Hz) ³⁻² J _{H-H} (DMSO-d ₆) |
|---------------------------|---|---|---|---|
| H21-H20 (² J) | 10,64 | 12,6 | 10,62 | 12,0 |
| H20-H6 (³ J) | 2,19 | 5,4 | 2,19 | 5,4 |
| H21-H6 (³ J) | 2,16 | 3,3 | 2,16 | 4,2 |
| H6-H24 (³ J) | 8,62 | 5,4 | 8,62 | 5,4 |
| H24-H25 (³ J) | 5,24 | 5,4 | 5,16 | 5,4 |
| H25-H5 (³ J) | 0,33 | 3,3 | 0,33 | 4,2 |

Fonte: O autor.

A outra técnica comparada foi a espectroscopia na região do infravermelho. Levando em consideração apenas os movimentos de deformação axial, pode-se descrever um paralelo entre as frequências teóricas e as experimentais. Quantitativamente, em alguns grupos observou uma discrepância entre os valores de frequência, porém a tendência das deformações axiais ocorrerem para ambas as conformações teóricas e para a técnica experimental foi observada. Por exemplo, a maior frequência observada para os confôrmeros teóricos foi uma deformação axial entre algum grupo O-H da ribose, ao qual também foi observado no espectro de infravermelho. Outra afirmação se procede pela deformação axial assimétrica do grupo N-H apresentar maior frequência que a deformação axial simétrica do mesmo grupo, em todos os casos analisados, inclusive no espectro experimental. Uma importante informação retirada da comparação dos métodos está no valor encontrado para a deformação axial da carbonila nos cálculos e no espectro. A frequência atribuída para este grupo foi abaixo de 1800 cm^{-1} em todos os casos, independente do valor experimental ser, aproximadamente, 80 cm^{-1} menor que os valores calculados. A Tabela 12 apresenta as frequências obtidas para cada confôrmero pelo cálculo teórico relacionadas com os valores obtidos no espectro na região do infravermelho.

A diferença dos valores teóricos e experimentais é plausível quando comparamos alguns métodos, uma vez que o cálculo teórico executa a operação em uma escala unimolecular (em uma molécula apenas) e a técnica experimental não alcança essa escala, mesmo trabalhando com pequenas quantidades (com relação a pequenas massas, volumes e baixas concentrações).

Tabela 12 – Frequências (ν) teóricas e experimentais relacionadas aos grupos observados.

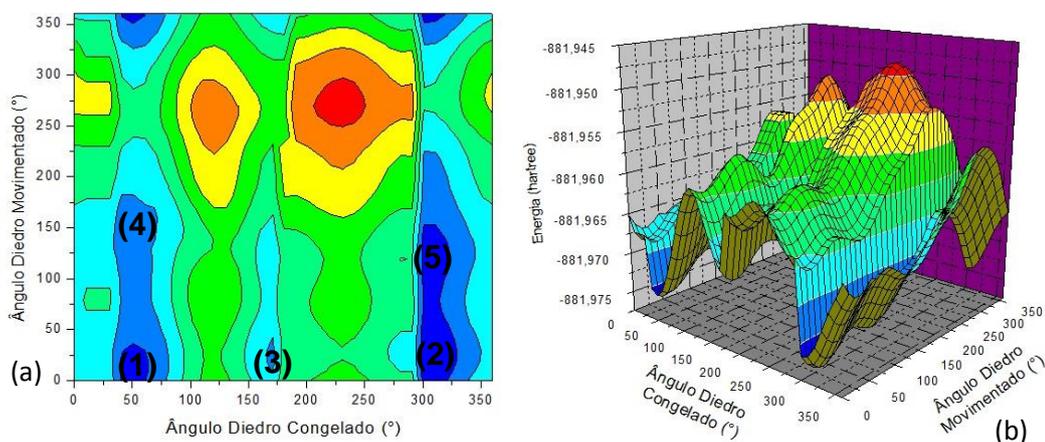
| RIBAV 1- Teórico | | RIBAV 3 - Teórico | | Ribavirina Experimental | |
|----------------------------|----------------------------------|----------------------------|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| ν (cm^{-1}) | Grupo observado | ν (cm^{-1}) | Grupo observado | ν (cm^{-1}) | Grupo observado |
| 3800 | ν (O28-H29) | 3813 | ν (O22-H23) | 3475 | ν (O-H) |
| 3722 | ν_{ass} (H16-N15-H17) | 3799 | ν (O28-H29) | 3450 | |
| 3681 | ν (O26-H27) | 3727 | ν_{ass} (H16-N15-H17) | 3408 | ν_{ass} (N-H) |
| 3633 | ν (O22-H23) | 3700 | ν (O26-H27) | 3342 | |
| 3593 | ν_{sim} (H16-N15-H17) | 3595 | ν_{sim} (H16-N15-H17) | 3271 | ν_{sim} (N-H) |
| 3259 | ν (C8-H9) | 3279 | ν (C8-H9) | 3138 3119 | ν (C-H) _{sp2} |
| 3104 | ν (C1-H24) | 3108 | ν (C3-H5) | 2951 à 2928 | ν (C-H) _{sp3} |
| 3098 | ν (C3-H5) | 3092 | ν (C1-H24) | | |
| 3064 | ν (C19-H20) | 3040 | ν (C19-H21) | | |
| 3048 | ν (C4-H6) | 3038 | ν (C4-H6) | | |
| 3024 | ν (C2-H25) | 3036 | ν (C2-H25) | | |
| 3002 | ν (C19-H21) | 3001 | ν (C19-H20) | | |
| 1787 | ν (C14=O18) | 1785 | ν (C14=O18) | 1705 | ν (C=O) |
| 1623 | ν (C8=N12) | 1624 | ν (C8=N12) | 1659 | ν (C=N) |
| 1584 | ν (C14-N15) | 1581 | ν (C14-N15) | 1618 | |

Fonte: O autor.

4.2. VIRAMIDINA

Para o fármaco Viramidina (VIRAD), as superfícies de energia potencial, Figura 45, possibilitaram visualizar cinco confôrmeros, oriundos das regiões de cor azul das curvas de energia. A maior variação de energia entre as conformações foi de 4,13 Kcal/mol.

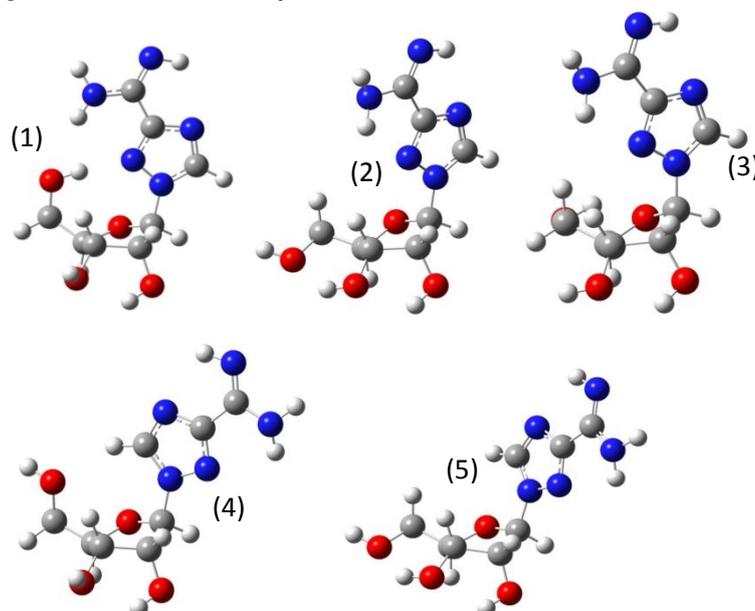
Figura 45 – (a) Mapa de contorno e (b) superfície de energia potencial tridimensional da Viramidina com nível de teoria HF/6-311G.



Fonte: O autor.

Na Figura 46 estão demonstradas as cinco geometrias analisadas para a Viramidina, e na sequência, a Tabela 13 apresenta as energias relativas entre os confôrmeros, as populações e os momentos de dipolo. A VIRAD 1 e a VIRAD 2 foram os que apresentaram a menor variação de energia relativa, 2,13 Kcal/mol. Igualmente ao resultado obtido na em fase isolada da Ribavirina, o confôrmero 1 apresentou 95,5% do equilíbrio conformacional frente aos quatro confôrmeros restantes que somaram 4,50%, sendo que um pouco mais da metade desse percentual foi representado pelo confôrmero 2 (2,62%). É notável também as variações de momento de dipolo entre as conformações. A VIRAD 4 apresenta o maior momento de dipolo (7,49D).

Figura 46 – As conformações mais estáveis da Viramidina.



Fonte: O autor.

Tabela 13 – Energias, energias relativas, populações e momento de dipolo em fase isolada da Viramidina com nível de teoria *B3LYP/cc-pVDZ*.

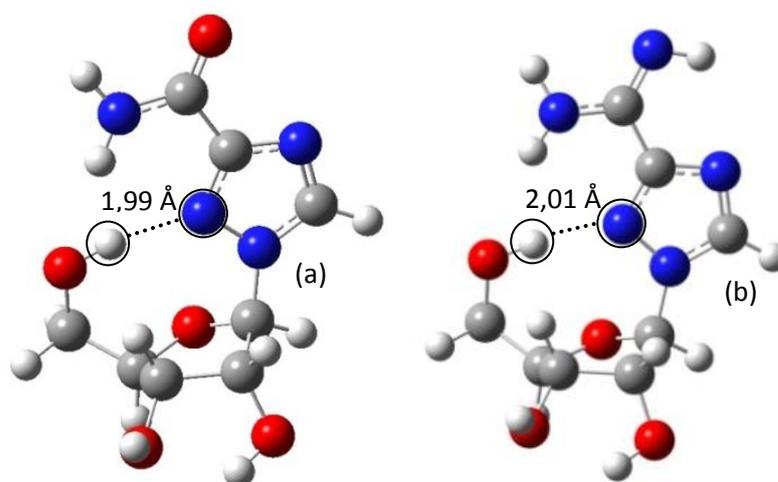
| Confôrmero | Energia* | ΔE_{rel} ** | % | μ (D) |
|------------|-------------|---------------------|--------------|-----------|
| VIRAD 1 | -887,111186 | 0,000 | 95,50 | 4,85 |
| VIRAD 2 | -887,107788 | 2,132 | 2,62 | 5,14 |
| VIRAD 3 | -887,104656 | 4,135 | 0,89 | 4,62 |
| VIRAD 4 | -887,106447 | 2,974 | 0,64 | 7,49 |
| VIRAD 5 | -887,105859 | 3,343 | 0,35 | 6,97 |

* em Hartree, **em Kcal.mol⁻¹.

Fonte: O autor.

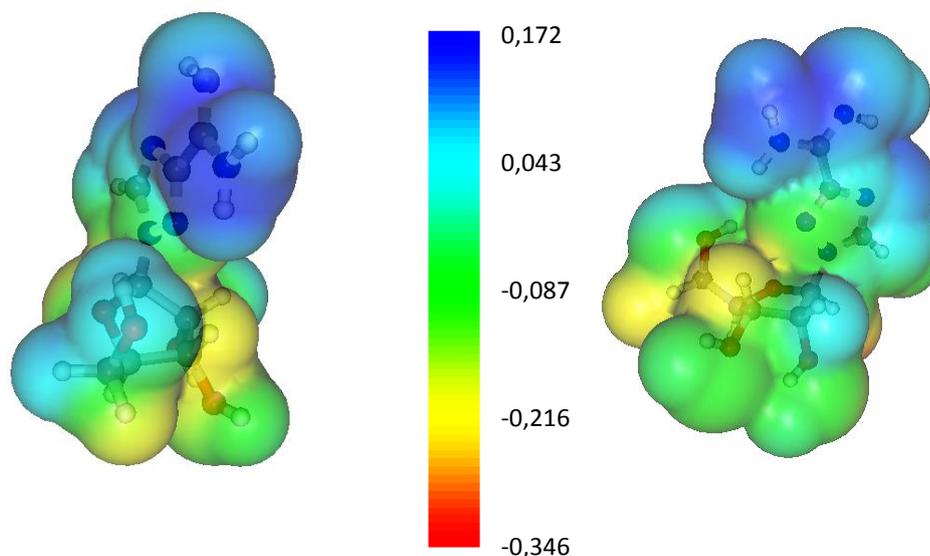
As conformações mais estáveis tanto para a Ribavirina quanto para a Viramidina são muito semelhantes estruturalmente (Figura 47). Mas a ligação de hidrogênio entre o próton da carboxiamida e o oxigênio da ribose não existe na Viramidina. As distâncias entre as interações de hidrogênio presentes na Viramidina são maiores que as encontradas na Ribavirina (2,01 Å). O MPE desta conformação demonstra essa ausência, uma vez que as nuvens eletrônicas, dos grupos que representam essa interação, não se encontram, desta forma, seus potenciais, não foram alterados existindo apenas a sobreposição da nuvem eletrostática do hidrogênio da hidroxila ligada ao C5' da ribose com um nitrogênio do anel triazólico, semelhante à encontrada na Ribavirina. O MPE desta conformação está representado na Figura 48.

Figura 47 – As conformações majoritárias em fase isolada da (a) Ribavirina e (b) Viramidina.



Fonte: O autor.

Figura 48 – Mapa de potencial eletrostático da VIRAD 1 com escala de potencial.



Fonte: O autor.

Para quantificar a estabilidade dessa conformação foram utilizados como ferramenta auxiliar os cálculos de *NBO*. O primeiro deles apontou que a VIRAD 1 possui a maior diferença de energia frente a cálculos de deleção de orbitais antiligantes, isto é, essa conformação obtêm maior ganho energético quando tem disponibilidade destes orbitais, frente as outras estruturas. Os demais valores de energia para esta e as outras geometrias se encontram na Tabela 14.

Tabela 14 – Energia Total, com Deleção e ΔE_{Del} através do cálculo de *NBO* para Viramidina com nível de teoria *B3LYP/cc-pVDZ*.

| Confômero | Energia Total* | Energia com Deleção* | ΔE_{Del} * | ΔE_{Del} ** |
|-----------|----------------|----------------------|--------------------|---------------------|
| VIRAD 1 | -887,349295838 | -885,80848548 | 1,540810 | 966,87 |
| VIRAD 2 | -887,345591731 | -885,83142625 | 1,514165 | 950,15 |
| VIRAD 3 | -887,341910918 | -885,828488975 | 1,513422 | 949,69 |
| VIRAD 4 | -887,344117488 | -885,83481767 | 1,509300 | 947,10 |
| VIRAD 5 | -887,343607674 | -885,83718420 | 1,506423 | 945,29 |

* em Hartree, **em Kcal.mol⁻¹.

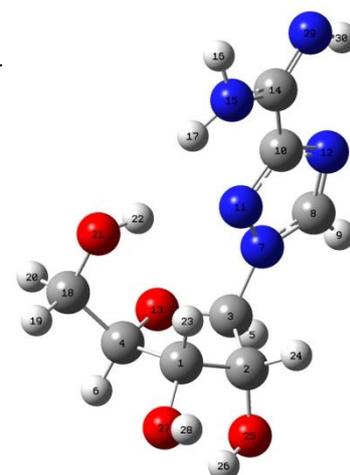
Fonte: O autor.

A Tabela 15 apresenta as interações, energias, ocupâncias e características sobre as ligações hiperconjugativas que estabilizam a conformação 1 da Viramidina. De forma análoga a interação encontrada na RIBAV 1 (Tabela 3) foi possível observar a mesma com a VIRAD 1. A interação $n_{N11} \rightarrow \sigma^*_{O23-H22}$ com energia de 9,68 Kcal/mol apresenta uma interação do tipo remota, quantificando assim a interação de hidrogênio existente nessa conformação. A segunda interação proposta na VIRAD 1, $n_{O21} \rightarrow \sigma^*_{N15-H17}$, não ocorre pois a distância entre os átomos que formam esta interação é muito grande, sendo possível observar a pequena contribuição energética da mesma (0,2 Kcal/mol, Tabela 14).

Tabela 15 – Interações Hiperconjugativas e suas energias, Ocupância doador, Ocupância aceptor e Tipo de Interação, obtidas na VIRAD 1 pelo cálculo de NBO, nível de teoria B3LYP/cc-pVDZ.

| Interação Hiperconj. | Energia da Interação (Kcal/mol) | Ocupância doador | Ocupância aceptor | Tipo de Inter. |
|--|---------------------------------|------------------|-------------------|----------------|
| $n_{N7} \rightarrow \sigma^*_{C8-N12}$ | 51,50 | 1,52035 | 0,37000 | vicinal |
| $n_{N7} \rightarrow \sigma^*_{C10-N11}$ | 25,42 | 1,52035 | 0,39952 | vicinal |
| $n_{N11} \rightarrow \sigma^*_{O23-H22}$ | 9,68 | 1,92122 | 0,03832 | remota |
| $n_{N12} \rightarrow \sigma^*_{N7-C8}$ | 7,59 | 1,92266 | 0,04900 | vicinal |
| $n_{N12} \rightarrow \sigma^*_{C10-N11}$ | 7,91 | 1,92266 | 0,03050 | vicinal |
| $n_{O13} \rightarrow \sigma^*_{C3-N7}$ | 12,41 | 1,89830 | 0,07118 | vicinal |
| $n_{N15} \rightarrow \sigma^*_{C14-N29}$ | 40,83 | 1,80185 | 0,23847 | vicinal |
| $n_{O21} \rightarrow \sigma^*_{C4-C18}$ | 3,81 | 1,94700 | 0,03673 | vicinal |
| $n_{O21} \rightarrow \sigma^*_{C18-H20}$ | 8,56 | 1,94700 | 0,02946 | vicinal |
| $n_{O25} \rightarrow \sigma^*_{C2-C3}$ | 3,83 | 1,94484 | 0,04557 | vicinal |
| $n_{O25} \rightarrow \sigma^*_{C2-H24}$ | 8,78 | 1,94484 | 0,03608 | vicinal |
| $n_{O27} \rightarrow \sigma^*_{C1-C2}$ | 7,58 | 1,93647 | 0,05074 | vicinal |
| $n_{N29} \rightarrow \sigma^*_{C10-C14}$ | 14,05 | 1,92896 | 0,06235 | vicinal |
| $n_{N29} \rightarrow \sigma^*_{C14-N15}$ | 2,65 | 1,92896 | 0,04339 | vicinal |
| $n_{O21} \rightarrow \sigma^*_{N15-H17}$ | 0,20 | 1,97425 | 0,01161 | remota |

Fonte: O autor.



As conformações da Viramidina submetidas em rotinas de solvatação pelo método PCM demonstraram que o efeito do solvente polar, água neste caso, faz com que a VIRAD 4 apresente a maior população em solvatação. Esta conformação apresenta o maior momento de dipolo, 7,49 D, entre as demais estruturas. Sua população passou de 0,64% para 98,37% do equilíbrio conformacional. A Tabela 16 apresenta as energias, absolutas e relativas, e as populações das cinco conformações da Viramidina.

Tabela 16 – Energias, energias relativas e populações em meio aquoso da Viramidina pelo método PCM, B3LYP/cc-pVDZ.

| Confômero | Energia* | ΔE_{rel}^{**} | % |
|-----------|--------------|-----------------------|--------------|
| VIRAD 1 | -887,3493648 | 22,21 | - |
| VIRAD 2 | -887,3796763 | 3,21 | 0,43 |
| VIRAD 3 | -887,3805162 | 2,68 | 1,06 |
| VIRAD 4 | -887,3847917 | 0,00 | 98,37 |
| VIRAD 5 | -887,3785904 | 3,89 | 0,14 |

* em Hartree, ** em Kcal.mol⁻¹.

Fonte: O autor.

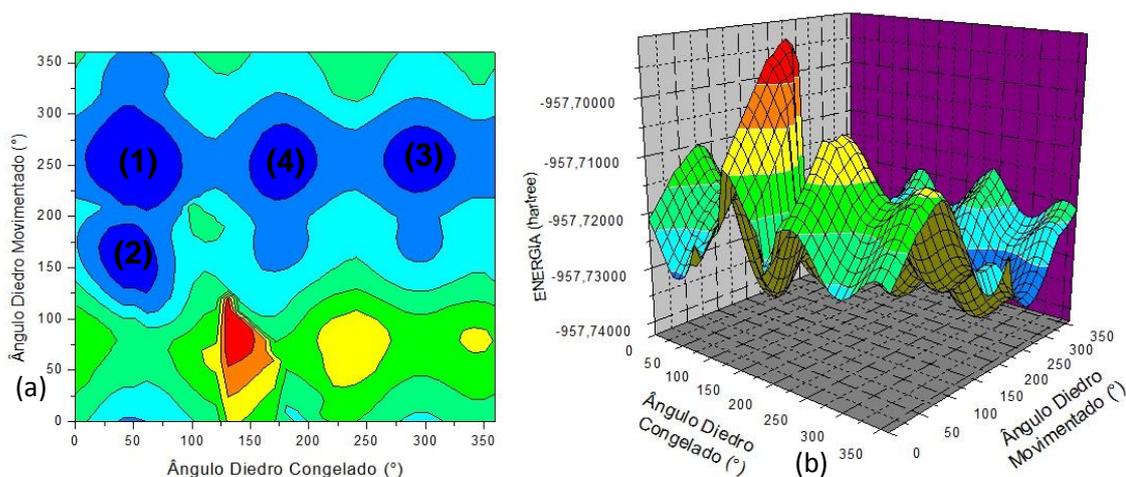
4.3. NUCLEOSÍDEOS NATURAIS

A análise efetuada nos nucleosídeos naturais (Adenosina e Guanosina) foi feita pelo fato de ambos os fármacos apresentarem estruturas semelhantes as biomoléculas encontradas no corpo humano. A análise conformacional resultante pode auxiliar quando levada à comparação com o resultado obtido aos fármacos, apresentando uma tendência entre as estruturas majoritárias. Os próximos itens apresentam uma discussão relativa dos resultados obtidos para os nucleosídeos naturais.

4.3.1. ADENOSINA

A superfície de energia potencial em três dimensões para a Adenosina apresentou quatro regiões de mínimos de energia, as quais representariam quatro conformações envolvidas no equilíbrio. A seguir, na Figura 49 está apresentado o mapa de contorno e a superfície de energia potencial da Adenosina.

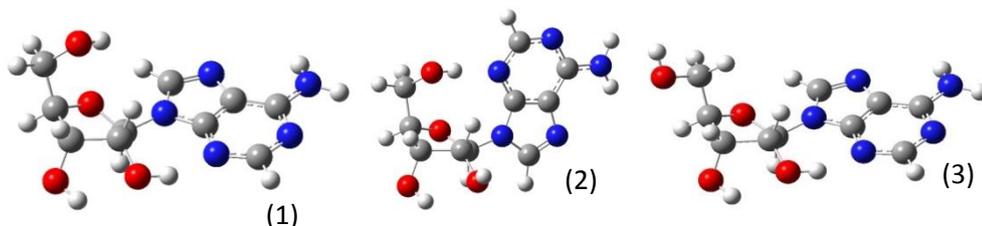
Figura 49 – (a) Mapa de contorno e (b) superfície de energia potencial tridimensional da Adenosina com nível de teoria *HF/6-311G*.



Fonte: O autor

Essas quatro geometrias foram otimizadas, porém uma delas apresentou valor de frequência imaginária, a qual foi descartada. Sendo assim, o cálculo de população para as conformações foi realizado sobre três estruturas (abreviadas como ADENOS). A Figura 50 apresenta as três estruturas e a Tabela 17 mostra os valores de energia relativa, populações e momentos de dipolo das mesmas.

Figura 50 – As conformações mais estáveis da Adenosina.



Fonte: O autor.

Tabela 17 – Energias relativas, populações e momento de dipolo em fase isolada da Adenosina com nível de teoria *B3LYP/cc-pVDZ*.

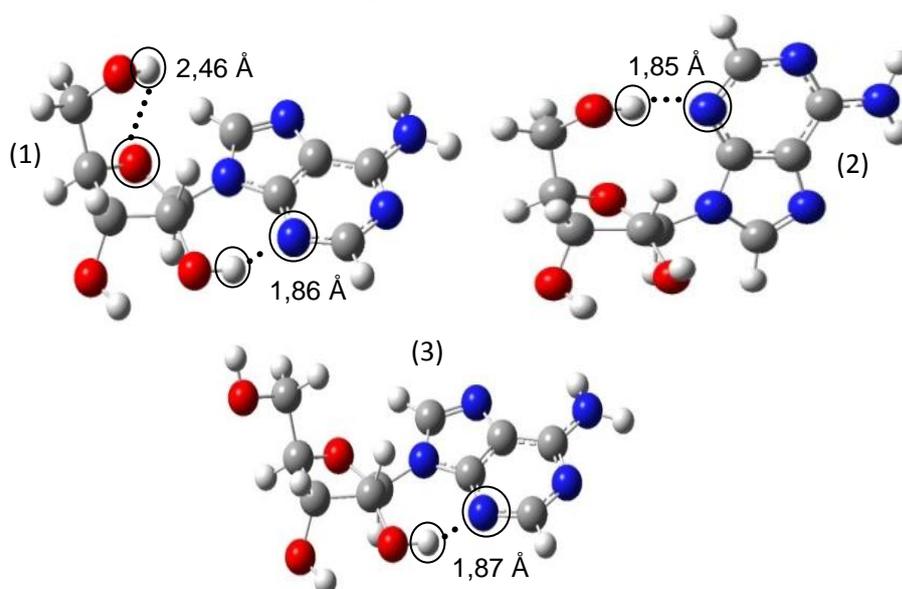
| Confômero | ΔE_{rel}^* | % | $\mu(D)$ |
|-----------|--------------------|--------------|----------|
| ADENOS 1 | 0,000 | 64,19 | 2,71 |
| ADENOS 2 | 0,35 | 35,23 | 2,77 |
| ADENOS 3 | 2,79 | 0,58 | 3,50 |

* em $Kcal.mol^{-1}$.

Fonte: O autor.

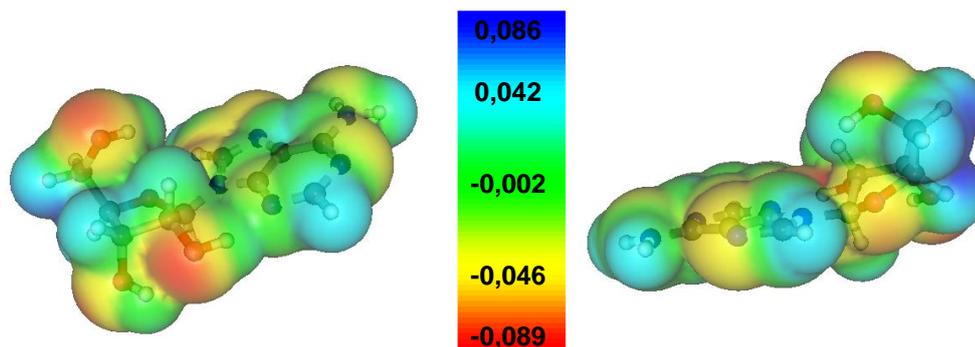
A conformação com maior população para a Adenosina foi a ADENOS 1, com 64,19% do equilíbrio, frente a 35,23% da ADENOS 2. A diferença de energia entre essas conformações foi de apenas 0,355 Kcal/mol. A última geometria compreende pouco mais de meio por cento do equilíbrio não tendo tanta importância para as estruturas isoladas. As três estruturas são caracterizadas por apresentarem interações intramoleculares do tipo ligação de hidrogênio, sendo que todas formam pelo menos uma interação com distância menor que 2,00 Å (Figura 51). Com os mapas de potencial eletrostático foi possível confirmar a maior porcentagem da primeira conformação. Isto ocorre porque além da ligação de hidrogênio presente em todas as conformações, a ADENOS 1 possui uma interação leve entre a hidroxila do carbono C5' da ribose com o próprio oxigênio do interior da ribose. Os MPEs da conformação mais estável estão representados na Figura 52.

Figura 51 – Ligações de hidrogênio nas conformações da Adenosina.



Fonte: O autor.

Figura 52 – Mapa de potencial eletrostático da ADENOS 1 com escala de potencial.



Fonte: O autor.

A análise dos cálculos de *NBO* de deleção de energia aponta uma diferença discreta de energia entre o ADENOS 2 e a ADENOS 1. Quantitativamente, a diferença é de 4,5 Kcal/mol sendo um valor não muito grande em termos de troca eletrônica entre os orbitais naturais (visto que uma diferença desta magnitude na comparação entre as variações de energia relativa é considerada grande). A Tabela 18 demonstra os valores dessas energias em todas as conformações da Adenosina.

Tabela 18 – Energia Total, com Deleção e ΔE_{Del} através do cálculo de *NBO* para Adenosina com nível de teoria *B3LYP/cc-pVDZ*.

| Confômero | Energia Total* | Energia com Deleção* | ΔE_{Del} * | ΔE_{Del} ** |
|-----------|----------------|----------------------|--------------------|---------------------|
| ADENOS 1 | -963,606999709 | -961,421236128 | 2,185764 | 1371,59 |
| ADENOS 2 | -963,606648447 | -961,413726990 | 2,192921 | 1376,08 |
| ADENOS 3 | -963,602081025 | -961,423908367 | 2,178173 | 1366,82 |

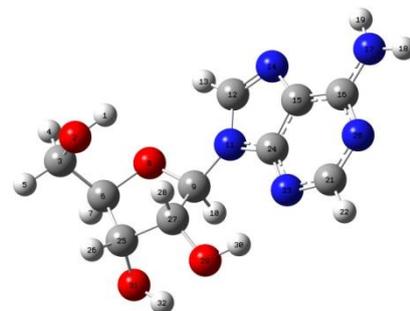
* em Hartree, **em Kcal.mol⁻¹.

Fonte: O autor.

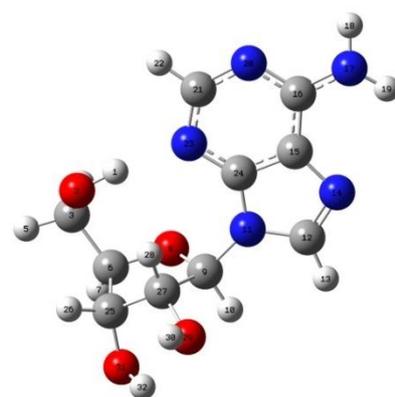
Como a variação energética de deleção é pequena, estudou-se as interações hiperconjugativas mais significativas para as duas conformações mais estáveis da Adenosina (Tabela 19). A interação $n_{N23} \rightarrow \sigma^*_{O29-H30}$ que ocorre na ADENOS 1 com 19,02 Kcal/mol é equivalente a interação $n_{N23} \rightarrow \sigma^*_{H1-O2}$ da ADENOS 2, de 20,44 Kcal/mol de energia. Em ambas conformações o tipo de interação é remota e as ocupâncias de átomos doadores e aceptores encontrados, garantem que é uma interação intramolecular do tipo ligação de hidrogênio. Então, a diferença de população entre estas conformações é atribuída a fatores estéricos que afetam a ADENOS 2 em maior proporção do que a ADENOS 1.

Tabela 19 – Interações Hiperconjugativas e suas energias, Ocupância doador, Ocupância aceptor e Tipo de Interação, obtidas na ADENOS 1 e 2 pelo cálculo de NBO, nível de teoria *B3LYP/cc-pVDZ*.

| Interação ADENOS 1 | Energia da Interação (Kcal/mol) | Ocupância doador | Ocupância aceptor | Tipo de Inter. |
|--|---------------------------------|------------------|-------------------|----------------|
| $n_{O2} \rightarrow \sigma^*_{C3-H4}$ | 6,31 | 1,94952 | 0,02724 | vicinal |
| $n_{O2} \rightarrow \sigma^*_{C3-C6}$ | 6,18 | 1,94952 | 0,03789 | vicinal |
| $n_{O8} \rightarrow \sigma^*_{C6-H7}$ | 4,67 | 1,91728 | 0,01804 | vicinal |
| $n_{O8} \rightarrow \sigma^*_{C9-H10}$ | 8,09 | 1,91728 | 0,04197 | vicinal |
| $n_{N14} \rightarrow \sigma^*_{N11-C12}$ | 9,23 | 1,92465 | 0,04186 | vicinal |
| $n_{N14} \rightarrow \sigma^*_{C15-C24}$ | 7,03 | 1,92465 | 0,04393 | vicinal |
| $n_{N17} \rightarrow \sigma^*_{C16-N20}$ | 56,89 | 1,73502 | 0,47201 | vicinal |
| $n_{N20} \rightarrow \sigma^*_{C15-C16}$ | 10,21 | 1,90396 | 0,04306 | vicinal |
| $n_{N20} \rightarrow \sigma^*_{C21-N23}$ | 12,17 | 1,90396 | 0,03184 | vicinal |
| $n_{N23} \rightarrow \sigma^*_{C15-C24}$ | 9,45 | 1,87820 | 0,04393 | vicinal |
| $n_{N23} \rightarrow \sigma^*_{N20-C21}$ | 9,95 | 1,87820 | 0,02384 | vicinal |
| $n_{N23} \rightarrow \sigma^*_{O29-H30}$ | 19,02 | 1,87820 | 0,05454 | remota |
| $n_{O29} \rightarrow \sigma^*_{C9-C27}$ | 5,96 | 1,94450 | 0,05500 | vicinal |
| $n_{O29} \rightarrow \sigma^*_{C27-H28}$ | 8,91 | 1,94450 | 0,03753 | vicinal |
| $n_{O31} \rightarrow \sigma^*_{C25-H26}$ | 8,67 | 1,94940 | 0,03570 | vicinal |
| $n_{O8} \rightarrow \sigma^*_{H1-O2}$ | 0,59 | 1,91728 | 0,01305 | remota |



| Interação ADENOS 2 | Energia da Interação (Kcal/mol) | Ocupância doador | Ocupância aceptor | Tipo de Inter. |
|--|---------------------------------|------------------|-------------------|----------------|
| $n_{O2} \rightarrow \sigma^*_{C3-H4}$ | 5,75 | 1,94114 | 0,02779 | vicinal |
| $n_{O2} \rightarrow \sigma^*_{C3-C6}$ | 7,54 | 1,94114 | 0,04255 | vicinal |
| $n_{O8} \rightarrow \sigma^*_{C9-H10}$ | 8,36 | 1,90928 | 0,03812 | vicinal |
| $n_{O8} \rightarrow \sigma^*_{C9-N11}$ | 5,74 | 1,90928 | 0,05675 | vicinal |
| $n_{N14} \rightarrow \sigma^*_{N11-C12}$ | 9,22 | 1,92461 | 0,04025 | vicinal |
| $n_{N14} \rightarrow \sigma^*_{C15-C24}$ | 7,01 | 1,92461 | 0,04327 | vicinal |
| $n_{N17} \rightarrow \sigma^*_{C16-N20}$ | 54,39 | 1,74135 | 0,46842 | vicinal |
| $n_{N20} \rightarrow \sigma^*_{C15-C16}$ | 10,20 | 1,90454 | 0,04302 | vicinal |
| $n_{N20} \rightarrow \sigma^*_{C21-N23}$ | 12,09 | 1,90454 | 0,03130 | vicinal |
| $n_{N23} \rightarrow \sigma^*_{H1-O2}$ | 20,44 | 1,87777 | 0,05611 | remota |
| $n_{N23} \rightarrow \sigma^*_{C15-C24}$ | 9,43 | 1,87777 | 0,04327 | vicinal |
| $n_{N23} \rightarrow \sigma^*_{N20-C21}$ | 10,05 | 1,87777 | 0,02447 | vicinal |
| $n_{O29} \rightarrow \sigma^*_{C25-C27}$ | 7,85 | 1,94087 | 0,05015 | vicinal |
| $n_{O31} \rightarrow \sigma^*_{C25-H26}$ | 8,59 | 1,94990 | 0,03586 | vicinal |
| $n_{O8} \rightarrow \sigma^*_{H1-O2}$ | 0,19 | 1,90928 | 0,05611 | remota |



Fonte: O autor.

Quando essas estruturas são submetidas a cálculos com rotinas de solvatação em meio aquoso, pelo modelo *PCM*, era esperado que a estrutura que apresentou o maior momento de dipolo obtivesse um aumento na sua população. Sendo assim, a ADENOS 3 com polaridade de 3,50D, deveria aumentar seu percentual. Porém isto não aconteceu, e a ADENOS 2 que possuía 35,23%, quando submetida em solvatação passou a ter 99,92% do equilíbrio conformacional, ou seja, passou a ser a estrutura majoritária. Esse resultado, diferente ao encontrado nos primeiros fármacos analisados (Ribavirina e Viramidina), é explicado utilizando o resultado do *NBO*. A conformação que tem a maior energia da interação de hidrogênio é a que prevalece, visto que as interações que ocorrem na Adenosina são, praticamente o dobro da energia de interação que é encontrada nos fármacos. Assim o efeito do solvente polar, neste caso a água, não é superior a compensação hiperconjugativa. A Tabela 20 apresenta as energias relativas e as populações submetidas ao modelo contínuo polarizável.

Tabela 20 – Energias e populações em solvatação da Adenosina pelo método *PCM*, *B3LYP/cc-pVDZ*.

| Confômero | ΔE_{rel}^* | % |
|-----------|--------------------|--------------|
| ADENOS 1 | 4,50 | 0,05 |
| ADENOS 2 | 0,00 | 99,92 |
| ADENOS 3 | 4,89 | 0,03 |

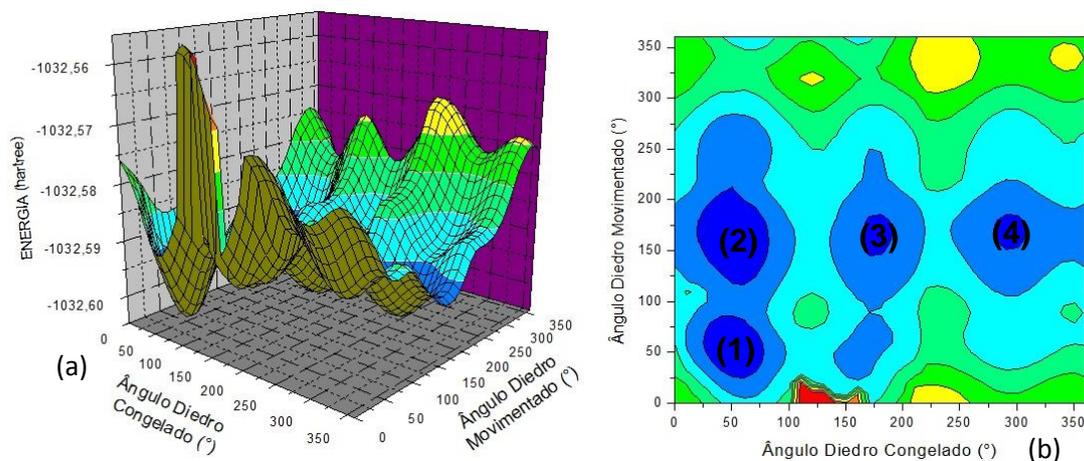
* em Kcal.mol^{-1} .

Fonte: O autor.

4.3.2. GUANOSINA

O resultado da análise conformacional da Guanosina foi obtido com os pontos referentes aos mínimos de energia (região azul) da SEP tridimensional. Nesta SEP foram atribuídos quatro pontos significativos, como é observado na Figura 53.

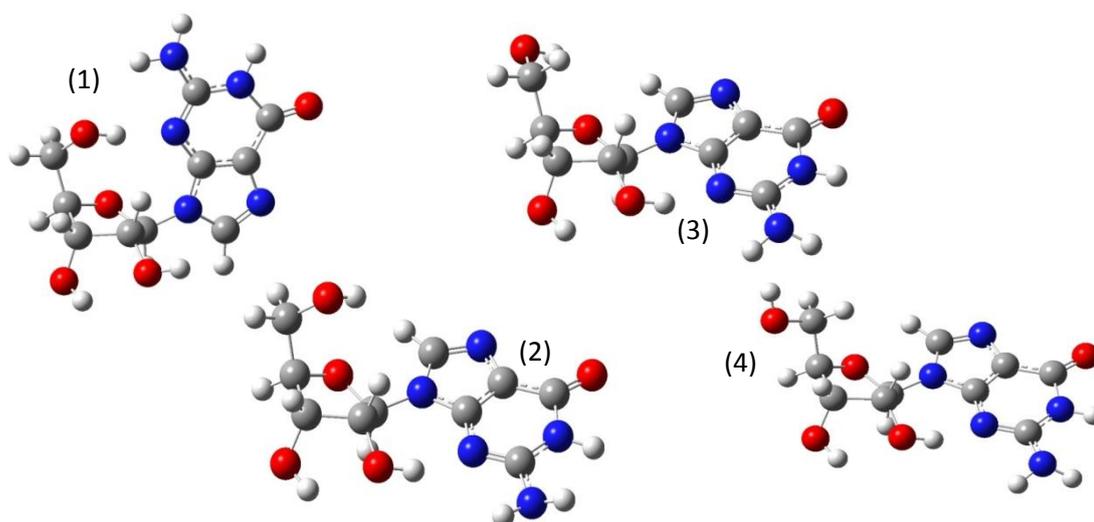
Figura 53 – (a) Superfície de energia potencial tridimensional e (b) mapa de contorno da Guanosina com nível de teoria *HF/6-311G*.



Fonte: O Autor.

Posteriormente ao cálculo de otimização nenhuma geometria foi descartada, porém, estruturalmente, foi observada uma grande mudança entre o grupo da base púrica na conformação 1 com as três demais geometrias envolvidas no equilíbrio conformacional. Os confôrmers da Guanosina (Abreviada GUANOS) estão representados na Figura 54 e na Tabela 21 estão expostos os valores de energia relativa, populações e momentos de dipolo.

Figura 54 – As conformações mais estáveis da Guanosina.



Fonte: O autor.

Tabela 21 – Energias relativas, populações e momento de dipolo em fase isolada da Guanosina com nível de teoria *B3LYP/cc-pVDZ*.

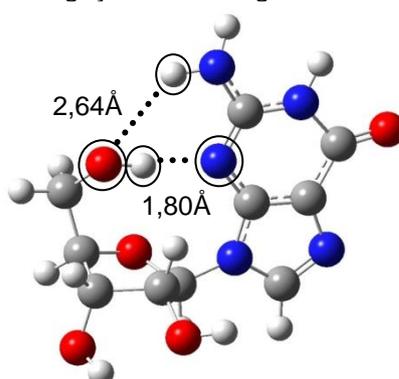
| Confômero | ΔE_{rel}^* | % | $\mu(D)$ |
|-----------|--------------------|--------------|----------|
| GUANOS 1 | 0,00 | 89,81 | 4,53 |
| GUANOS 2 | 1,33 | 9,44 | 5,63 |
| GUANOS 3 | 2,91 | 0,66 | 7,15 |
| GUANOS 4 | 4,11 | 0,09 | 5,12 |

* em $Kcal.mol^{-1}$.

Fonte: O autor.

A conformação GUANOS 1 é a que apresentou maior porcentagem relativa entre os quatro confômeros, compreendendo 89,81% da população. A GUANOS 2 tem uma diferença energética de 1,334 Kcal/mol, quando relacionada à primeira conformação, sendo assim, essa diferença resulta em uma pequena população de 9,44%. As demais conformações juntas não ultrapassam 0,75% do equilíbrio, podendo então consideradas de menos importância para a análise em fase isolada. O motivo pelo qual a GUANOS 1 é mais estável em fase isolada é garantido pelo mesmo motivo que a RIBAV 1 é mais estável. Em ambas conformações podem ser encontradas duas ligações de hidrogênio intramoleculares, sendo que para a Guanosina a distância de uma delas é ainda menor, visando uma estabilidade ainda maior. A Figura 55 demonstra essas interações.

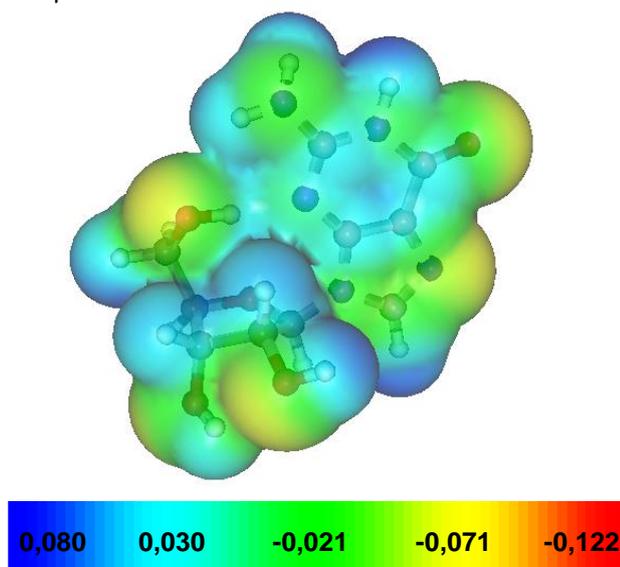
Figura 55 – Ligações de hidrogênio na GUANOS 1.



Fonte: O autor.

Outra evidência envolvendo essas interações são confirmadas pela sobreposição das nuvens eletrônicas observadas com o MPE (Figura 56). A densidade eletrônica do nitrogênio, do anel da base púrica, fica distorcida para o hidrogênio da hidroxila ligada ao C5' da ribose e o oxigênio, desta mesma hidroxila, demonstra uma leve distorção ao hidrogênio ligado no nitrogênio do grupo amida.

Figura 56 – Mapa de potencial eletrostático da GUANOS 1 com escala de potencial.



Fonte: O autor.

Para poder quantificar está interação intramolecular proposta anteriormente, foram executados cálculos de *NBO*. Inicialmente o cálculo da deleção de interação hiperconjugativa demonstrou que a conformação GUANOS 1 prevalece como a mais estável, uma vez que a variação de energia de deleção é maior nesta geometria em relação as outras – aproximadamente 14 Kcal/mol maior que as demais. Outro fator importante que demonstra a grande estabilidade dessa conformação é a interação remota $n_{N24} \rightarrow \sigma^*_{H1-O2}$. A mesma apresentou uma energia hiperconjugativa de 24,39 kcal/mol (a maior entre todas as moléculas relacionadas neste estudo) e valores de ocupância baixa do doador e alta do aceptor, caracterizando uma forte interação de hidrogênio intramolecular. A Tabela 22 apresenta os valores das energias com deleções para todas as conformações da Guanosina e a Tabela 23 demonstra algumas das mais importantes interações hiperconjugativas do confômero mais estável, a GUANOS 1.

Tabela 22 – Energia Total, com Deleção e ΔE_{Del} através do cálculo de *NBO* para a Guanosina com nível de teoria *B3LYP/cc-pVDZ*.

| Confômero | Energia Total* | Energia com Deleção* | ΔE_{Del} * | ΔE_{Del} ** |
|-----------|----------------|----------------------|--------------------|---------------------|
| GUANOS 1 | -1038,84671812 | -1036,77114791 | 2,075570 | 1302,44 |
| GUANOS 2 | -1038,84489926 | -1036,79197396 | 2,052925 | 1288,23 |
| GUANOS 3 | -1038,84203314 | -1036,78838261 | 2,053651 | 1288,68 |
| GUANOS 4 | -1038,83982694 | -1036,79418912 | 2,045638 | 1283,66 |

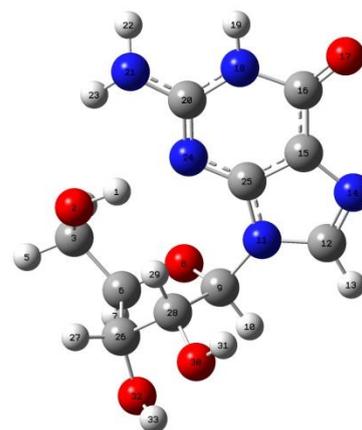
* em Hartree, **em Kcal.mol⁻¹.

Fonte: O autor.

Tabela 23 – Interações Hiperconjugativas e suas energias, Ocupância doador, Ocupância aceptor e Tipo de Interação, obtidas na GUANOS 1 pelo cálculo de *NBO*, nível de teoria *B3LYP/cc-pVDZ*.

| Interação Hiperconj. | Energia da Interação (Kcal/mol) | Ocupância doador | Ocupância aceptor | Tipo de Inter. |
|--|---------------------------------|------------------|-------------------|----------------|
| $n_{O2} \rightarrow \sigma^*_{C3-H4}$ | 6,64 | 1,94076 | 0,02925 | vicinal |
| $n_{O2} \rightarrow \sigma^*_{C3-H6}$ | 6,55 | 1,94076 | 0,03944 | vicinal |
| $n_{O8} \rightarrow \sigma^*_{C3-H6}$ | 4,00 | 1,90971 | 0,03944 | vicinal |
| $n_{O8} \rightarrow \sigma^*_{C6-H7}$ | 4,37 | 1,90971 | 0,02626 | vicinal |
| $n_{O8} \rightarrow \sigma^*_{C9-H10}$ | 8,30 | 1,90971 | 0,03715 | vicinal |
| $n_{O8} \rightarrow \sigma^*_{C9-N11}$ | 4,85 | 1,90971 | 0,05464 | vicinal |
| $n_{N11} \rightarrow \sigma^*_{O8-C9}$ | 8,40 | 1,57366 | 0,04028 | vicinal |
| $n_{N11} \rightarrow \sigma^*_{C12-N14}$ | 39,79 | 1,57366 | 0,31381 | vicinal |
| $n_{N11} \rightarrow \sigma^*_{C15-C25}$ | 40,54 | 1,57366 | 0,41802 | vicinal |
| $n_{N14} \rightarrow \sigma^*_{N11-C12}$ | 9,78 | 1,92227 | 0,04256 | vicinal |
| $n_{N14} \rightarrow \sigma^*_{C15-C25}$ | 6,94 | 1,92227 | 0,04074 | vicinal |
| $n_{O17} \rightarrow \sigma^*_{C15-C16}$ | 16,92 | 1,97434 | 0,06377 | vicinal |
| $n_{O17} \rightarrow \sigma^*_{C16-N18}$ | 32,93 | 1,97434 | 0,10609 | vicinal |
| $n_{N18} \rightarrow \sigma^*_{C16-O17}$ | 39,34 | 1,64111 | 0,32050 | vicinal |
| $n_{N18} \rightarrow \sigma^*_{C20-N24}$ | 66,52 | 1,64111 | 0,43838 | vicinal |
| $n_{N21} \rightarrow \sigma^*_{C20-N24}$ | 41,77 | 1,79871 | 0,43838 | vicinal |
| $n_{N24} \rightarrow \sigma^*_{H1-O2}$ | 24,39 | 1,85622 | 0,06605 | remota |
| $n_{N24} \rightarrow \sigma^*_{C15-C25}$ | 8,81 | 1,85622 | 0,04074 | vicinal |
| $n_{N24} \rightarrow \sigma^*_{N18-C20}$ | 12,57 | 1,85622 | 0,04725 | vicinal |
| $n_{O30} \rightarrow \sigma^*_{C9-C28}$ | 9,52 | 1,95430 | 0,05819 | vicinal |
| $n_{O32} \rightarrow \sigma^*_{C26-H27}$ | 7,98 | 1,95066 | 0,03506 | vicinal |
| $n_{O32} \rightarrow \sigma^*_{C26-C28}$ | 4,16 | 1,95066 | 0,04189 | vicinal |
| $n_{O2} \rightarrow \sigma^*_{N21-H23}$ | 0,57 | 1,94076 | 0,01101 | remota |
| $n_{O8} \rightarrow \sigma^*_{H1-H2}$ | 0,51 | 1,90971 | 0,06605 | remota |

Fonte: O autor.



Com o modelo *PCM* era esperado que a conformação com maior polaridade, a GUANOS 3 neste caso, obtiria a maior população devido ao efeito do solvente polar favorecer a estrutura com maior momento de dipolo – essa conformação possui 7,15D em fase isolada. Porém observa-se que a GUANOS 1 continua sendo a majoritária e ainda aumenta sua população de 89,81% no vácuo para 99,21% em meio aquoso. A explicação deste comportamento se encontra na interação de hidrogênio ser tão forte que o efeito da polaridade do meio não supera essa barreira, em termos energéticos, semelhante ao ocorrido na ADENOS 2. A Tabela 24 apresenta os valores de população da Guanosina em meio aquoso.

Tabela 24 – Energias e populações em solvatação da Guanosina pelo modelo *PCM*, *B3LYP/cc-pVDZ*.

| Confômero | ΔE_{rel}^* | % |
|-----------|--------------------|--------------|
| GUANOS 1 | 0,00 | 99,21 |
| GUANOS 2 | 3,29 | 0,38 |
| GUANOS 3 | 3,82 | 0,16 |
| GUANOS 4 | 3,54 | 0,25 |

* em Kcal.mol^{-1} .

Fonte: O autor.

5. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos neste trabalho, foi possível concluir inicialmente que o uso da técnica teórica como ferramenta de simulação à metodologia experimental é de grande valia, uma vez que os valores obtidos apresentaram uma exatidão e precisão aos experimentais ou então uma relação de tendência, sendo que, essa relação foi obtida no estudo com a Ribavirina e para os demais fármacos e nucleosídeos naturais foram obtidos somente os resultados teóricos.

A análise conformacional da Ribavirina demonstrou a presença de seis confôrmeros estáveis, porém a variação energética deles foi acentuada, então apenas um, RIBAV 1, foi o mais estável quando estudado em fase isolada – representando 96,6% do equilíbrio conformacional. Para qualificar a característica que fez desta conformação a mais estável foi encontrada nos mapas de potencial eletrostático a sobreposição de duas nuvens eletrônicas envolvendo em ambas a densidade eletrônica de um átomo eletronegativo com a ausência de densidade eletrônica de um próton ligado a outro átomo eletronegativo, sendo característico de ligações de hidrogênio intramoleculares. Posteriormente para quantificar o quanto mais estável é essa conformação, foram analisados os cálculos de orbitais naturais de ligação. O cálculo de *NBOs* de deleção de interação hiperconjugativa demonstrou a maior variação de energia total para energia de deleção para a RIBAV 1, isto é, esta conformação tem uma maior dependência de doação entre ligantes e antiligantes, sendo o fator que mede estabilidade a esta geometria e não as outras. Estudando mais detalhadamente os *NBO* da RIBAV 1, foi possível atribuir os valores das interações visualizadas nos MPEs, sendo que apenas um deles apresentou uma energia de interação alta.

No modelo de solvatação foi observado uma população de aproximadamente 15% para a RIBAV 1 e 85% para RIBAV 3. Esse aumento de população da terceira conformação é atribuído a polaridade da mesma ser maior e o efeito do solvente polar, em alguns casos, favorecer a estrutura que possui alto valor de momento de dipolo – visto que neste trabalho foi utilizado o modelo *PCM* com os solventes água e DMSO. Estas conformações foram submetidas ao cálculo de frequência e foi possível atribuir alguns estiramentos específicos em ambas as conformações. O outro cálculo foi realizado para medir as constantes de acoplamento teóricas e relacionar as mesmas com os ângulos diedros formados entre os hidrogênios acoplados. Nesta relação, houve uma boa concordância com a curva de *Karplus*, onde ângulos próximos de 0 e 180° admitiram grandes valores de acoplamento e ângulos próximos a 90° apresentam valores de constantes praticamente nulos ou muito pequenos.

Para a parte experimental do estudo, a extração da Ribavirina apresentou um baixo rendimento (27,49 %), devido ao fármaco ser solúvel tanto na água quanto no éter, assim uma quantidade do produto da extração fica na fase aquosa.

Foi possível concluir que os métodos de caracterização obtiveram bons resultados. Inicialmente, a técnica de espectroscopia na região do infravermelho demonstrou algumas deformações axiais que caracterizaram grupos importantes encontrados na Ribavirina, por exemplo, as deformações axiais das hidroxilas, ligações N-H e carbonila.

Com a técnica de ressonância magnética nuclear foi possível atribuir os deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio, em dois solventes (D_2O e $DMSO-d_6$). Para os espectros de hidrogênio, foi possível admitir alguns valores de constante de acoplamento a duas e três ligações, tal como a multiplicidade dos mesmos. A região analisada sob maior importância, foi o grupo metilênico ligado ao carbono C4'. Esse grupo corresponde aos hidrogênios diastereotópicos, ou seja, vizinhos a um grupo quiral. O acoplamento atribuído a esse grupo teve boa concordância com a literatura.

A comparação entre o método teórico e o experimental foi relacionada entre a variação das constantes de acoplamentos calculadas e as experimentais. Foi observado que houve aumento ou diminuição em alguns valores de acoplamentos, sejam eles experimentais ou teóricos, evidenciando a existência de duas conformações. Algumas constantes obtiveram valores próximos entre o calculado e o experimental, bem como a relação entre o acoplamento a duas ligações do grupo diastereotópico (aproximadamente 10,6 *Hz* no cálculo e 12,3 *Hz* no RMN). Outra técnica comparada foi o cálculo de frequência com os números de onda obtidos no infravermelho. As deformações axiais observadas mantiveram uma relação, por exemplo, os maiores valores de frequências foram atribuídos as deformações axiais das ligações N-H e O-H tanto para o calculado, quanto no espectro experimental. Os valores dos estiramentos não foram tão parecidos pelo fato do cálculo ser executado em apenas uma molécula e o experimento, por mais que se utilize uma quantidade pequena, ainda não podemos admitir valores relacionados a apenas uma molécula.

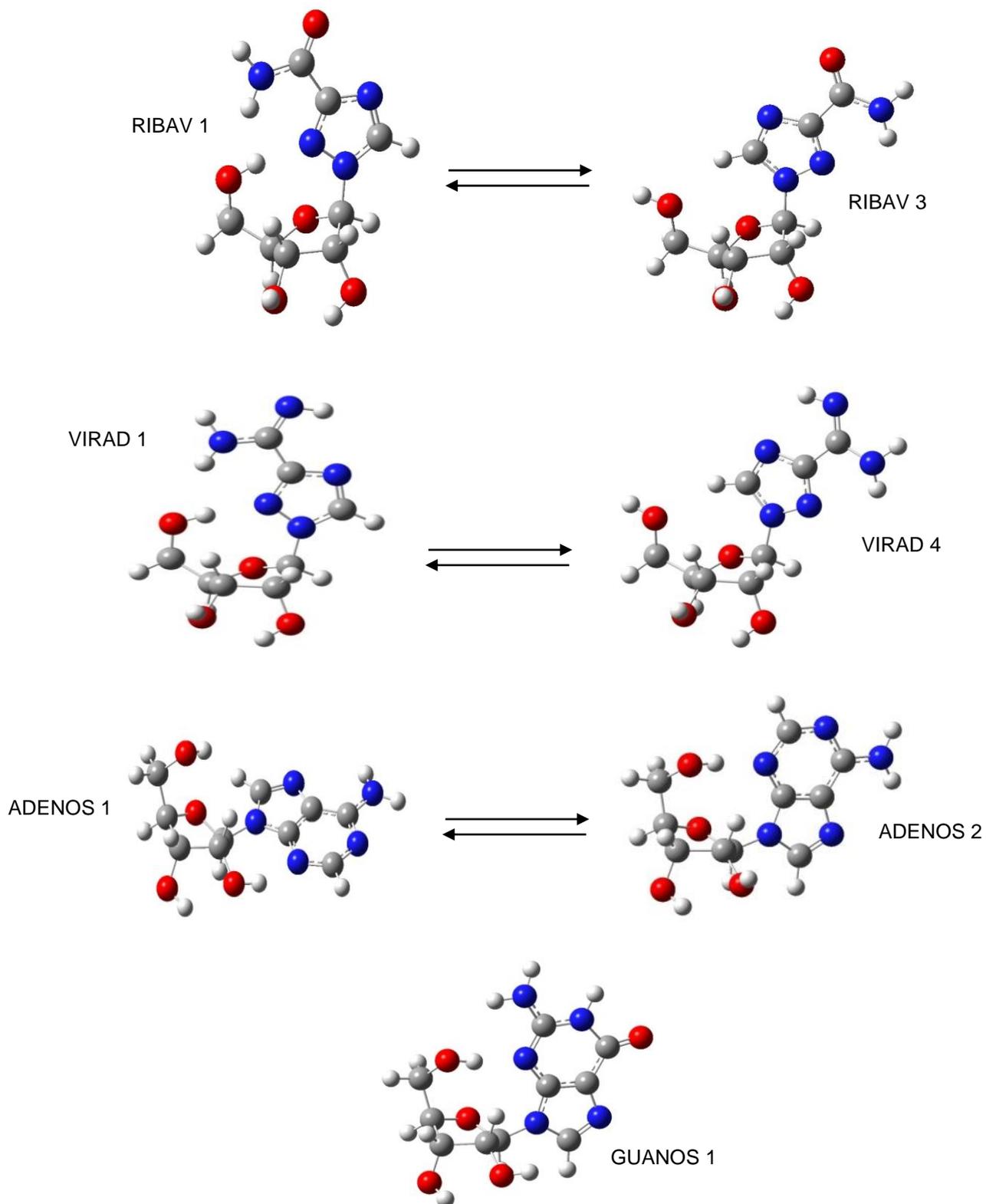
Para o composto Viramidina, foi concluído que em fase isolada apenas a VIRAD 1 é estável e possui um grande valor de população. De maneira análoga a Ribavirina, seu MPE apresenta a ligação de hidrogênio intramolecular entre o hidrogênio da hidroxila ligada ao C5' da ribose com o nitrogênio do anel triazólico. Energeticamente, pelos cálculos de *NBO*, essa conformação foi a que teve maior variação de energia de deleção e também foi a geometria que apresentou uma energia relativamente alta da interação de hidrogênio já descrita. Em solução segundo o modelo *PCM*, a conformação VIRAD 4 foi a majoritária do equilíbrio conformacional, uma vez que sua polaridade foi a maior entre as demais conformações, sendo portanto afetada pelo efeito do solvente (água).

Entre os nucleosídeos naturais, houve uma diferença entre os resultados obtidos nos fármacos. Para a Adenosina, duas conformações compreenderam a maior porcentagem do equilíbrio (ADENOS 1, 64,19% e ADENOS 2, 35,23%). Os Mapas de potencial eletrostático das duas conformações apresentaram a sobreposição das nuvens em que estão localizadas as interações de hidrogênio. Já os cálculos de NBO apresentaram uma leve preferência da conformação ADENOS 2 pela variação de deleções de interação hiperconjugativa. Essa pequena variação foi observada também em relação a interação de hidrogênio intramolecular da ADENOS 2 ser um pouco mais energética que a encontrada na ADENOS 1. A explicação portanto da população da ADENOS 1 ser maior está relacionada em algum fator estérico da segunda conformação desfavorecer sua população, visto que as energias de deleção e quantificação da interação de hidrogênio são próximas. Para a Guanosina apenas uma conformação, dentre as quatro encontradas na superfície de energia potencial, foi a majoritária com 89,81% da população – GUANOS 1. Com auxílio do MPE e encontrando a distância entre os átomos que formam as interações intramoleculares do tipo ligação de hidrogênio, foi atribuído a essa conformação a maior sobreposição de densidade eletrônica e também a menor distância entre os átomos. Ainda justificando esse fator, com os *NBOs* foi possível caracterizar que essa conformação teve a maior energia de deleção dos orbitais antiligantes relacionada as três restantes da Guanosina e a energia da interação hiperconjugativa encontrada nesta conformação foi a mais forte dentre todas as outras conformações demonstradas neste estudo.

Quando essas conformações da Adenosina e Guanosina foram submetidas em solvatação, em meio aquoso, o resultado obtido foi 99,92% para ADENOS 2 e 99,21% para a GUANOS 1. Esse elevado valor de população dos confôrmeros sobre os demais de cada equilíbrio, são relacionados a interação intramolecular ser tão forte que afeta o efeito do solvente, em que a conformação com maior momento de dipolo seria favorecida pelo solvente polar. Outra afirmação que faz com que essas conformações sejam as mais estáveis em solvatação é observada pela semelhança que estas moléculas têm entre si.

As conformações mais estáveis de todas as moléculas analisadas neste estudo estão apresentadas a seguir na Figura 57.

Figura 57 - As conformações mais estáveis da Ribavirina, Viramidina, Adenosina e Guanosina.



Fonte: O autor.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATKINS, P. **Físico-Química**. Rio de Janeiro, 2002, Vol. 2, 34, e Vol. 3, 66, 146.

BECKE, A. D. **J. Chem. Phys.** 1993, 98, 5648.

BOCCA, C. C.; BASSO, E. A.; MOSQUETTA, R. Conformational Study of the Four Main Dipyrone Metabolites Through Theoretical Methods: Electrostatic Potential Maps and NBO Calculations. **Journal of Molecular Structure**. 2007, 815, 75–81.

BOUGIE I.; BISAILLON, M. Initial Binding of the Broad Spectrum Antiviral Nucleoside Ribavirin to the Hepatitis C Virus RNA polymerase. **The Journal of Biological Chemistry**. 2003, 278, 52471.

CASTELLAN, G. W. **Physical Chemistry**. Third edition, 1983, 813.

CLAYDEN, J. et al. **Organic Chemistry**. Publisher: OUP Oxford, 2001, 243-258.

CONTRERAS, R. H.; PERALTA, J. E. **Program of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**. 37, 2000, 321-425.

CORMANICH A. R.; DUCATI, L. C.; RITTNER, R. “Are Hydrogen Bonds Responsible for Glycine Conformational Preferences?”. **Chemical Physics**. 387, 2011, 85–91.

COX, S. Viramidine Hydrochloride. **Drugs of the Future**. 2004, 29(7), 687-692.

FARIAS, R. F. **Química de Coordenação, Fundamentos e Atualidades**, Campinas, 2005, 19-39, 287-298.

FIORIN, B. C. et al. Theoretical and Experimental Investigation on the Rotational Isomerism in α -fluoroacetophenones. **J. Phys. Chem.** 2009, Vol. 113, 2906-2913.

FLÜKIGER, S.; LÜTHI, J. **MOLEKEL 5.3. P.H.P.** Portmann, Weber, Swiss Center for Scientific Computing, Manno, Switzerland, 2000–2002.

FOSTER, J. P.; WEINHOLD, F. Natural Bond Orbitals. **J. Am. Chem. Soc.** 1980, Vol. 102, 7211-7218.

FREIRE, R. et al. Interferon[®] Peguilado e Ribavirina em Doentes com Hepatite C Crónica sem Resposta Sustentada ao Interferon[®] Standard e Ribavirina. **J. Port. Gastrenterol**. 2006, 13 (66-74).

FRISCH, M. J. et al. **GAUSSIAN 03, Revision C**. Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2004.

GRANCHER, N. et al. Physicochemical Study of Ribavirin Complexes with α -, β - and γ -Cyclodextrins. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**. 2005, 51, 149–157.

HOFMANN, W. P. et al. Ribavirin Mode Ofactionin Chronic Hepatitis C: From Clinical Use Back to Molecular Mechanisms. **Liver International**. 2008, 1332.

LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. **Phys. Rev. B**. 1988, 37, 785.

LEVINE, I. N. **Physical Chemistry**. Sixth edition. Editora McGraw Hill, 2008, 715-716.

LIU, B. et al. Regioselective Enzymatic Acylation of Ribavirin to Give Potential Multifunctional Derivatives. **Biotechnology Letters**. 2005, 27, 717–720.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema Para Interpretação de Espectros de Substâncias Orgânicas na Região do Infravermelho. **Quim, Nova**. 2004, Vol. 27, n, 4, 670-673.

MILES, D. L. et al. Theoretical Studies of the Conformational Properties of Ribavirin. **Proc. Natl. Acad. Sci**. 1976, 73, 4257-4260.

MOREIRA, M. A. et al. Theoretical and Infrared Studies on the Conformations of Monofluorophenols. **Journal of Molecular Structure**. 1009, 2012, 11–15.

MORGON, N. H.;CUSTODIO, R. Teoria do Funcional de Densidade. **Química Nova**. 1995, 18, 44-55.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger** Sarvier Artmed, 5ª Ed. São Paulo, 2011, 271.

OLIVEIRA, A. N. et al. New Substituted 4-Arylaminoquinazolines as Potent Inhibitors of Breast Tumor Cell Lines: *In Vitro* and Docking Experiments. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 45, 2010, 4339-4342.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à Espectroscopia**. Cengage Learning, 4ª Ed., São Paulo, 2010, 15-26 e 101-132.

PLIEGO, J. R. Modelos Contínuos do Solvente: Fundamentos. **Química Nova**, 2006, 29(3), 535-542.

PRUSINER, P.; SUNDARALINGAM, M. The Crystal and Molecular Structures of Two Polymorphic Crystalline Forms of Virazole (1- β -D-Ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide). A New Synthetic Broad Spectrum Antiviral Agent. **Acta Cryst.** 1976, B32, 419.

RAMALINGAMA, S.; ANBUSRINIVASANB, P.; PERIANDYC, S. FT-IR and FT-Raman Spectral Investigation, Computed IR Intensity and Raman Activity Analysis and Frequency Estimation Analysis on 4-Chloro-2-Bromoacetophenone Using HF and DFT Calculations. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.** 2011, Vol. 78, n. 2, 826-834.

RICHTER, W. E. et al. Levels of theory modifications and their effects on $^1J_{CH}$ SSCCs calculations: A factorial design analysis. **Computational and Theoretical Chemistry.** 2011, Vol. 964, 116–120.

SANT'ANNA, C. M. R. Métodos de Modelagem Molecular para Estudo e Planejamento de Compostos Bioativos: Uma introdução. **Revista Virtual de Química.** 1, 2009, 49-57.

SILVERSTAIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, Editora LTC, 7ª Ed., Rio De Janeiro, 2007, 73-77.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química orgânica.** 7ª Ed. 1 e 2, Rio de Janeiro: LTC editora, 2000, 128.

TAN, S. et al. Hepatitis C Therapeutics: Current Status and Emerging Strategies, **Nature Reviews Publishing Group.** 2002, 1, 867-881.

UGARTE, R. et al. Estudio Teórico de La Isomerización del Ácido Maleico en Ácido Fumárico: Un Enfoque Basado em el Concepto de Superficie De Energía Potencial. **Quim. Nova.** 2010, Vol. 33, n. 3, 750-754.

VOLCHAN, S. B. A Probabilidade na Mecânica Estatística Clássica. **Revista Brasileira de Ensino de Física.** 2006, Vol. 28, n. 3, 313-318.

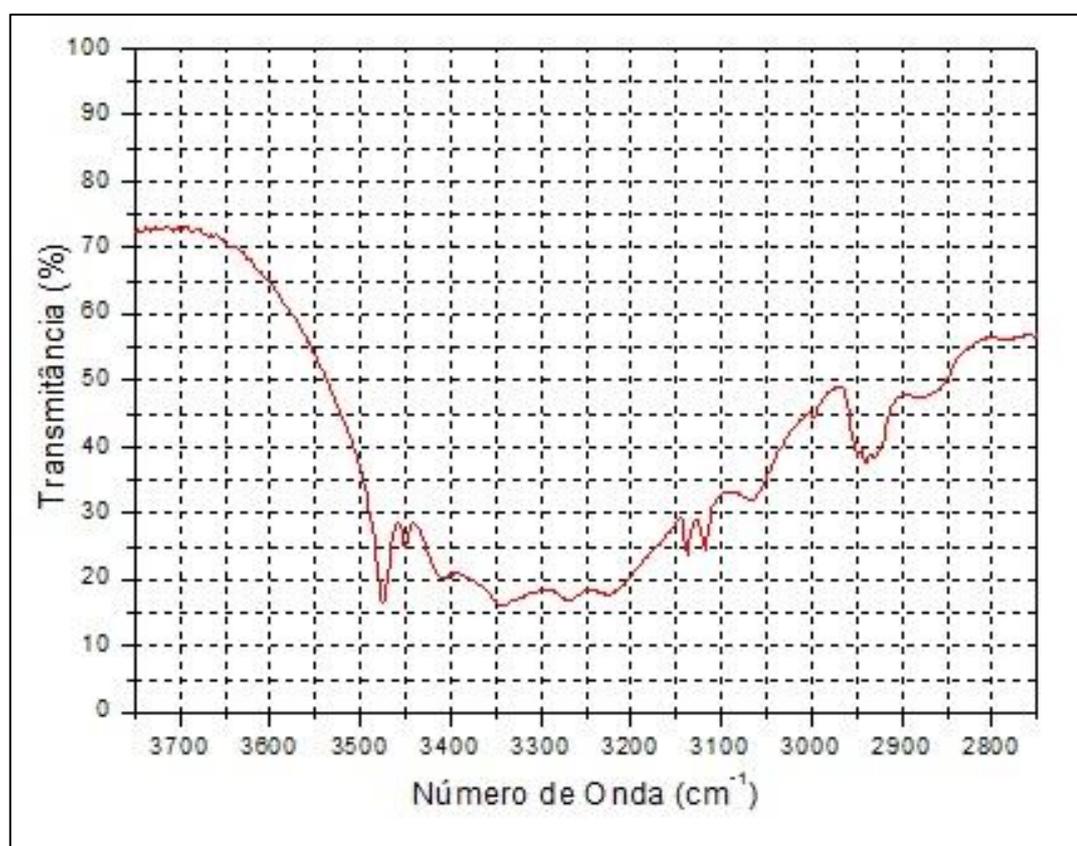
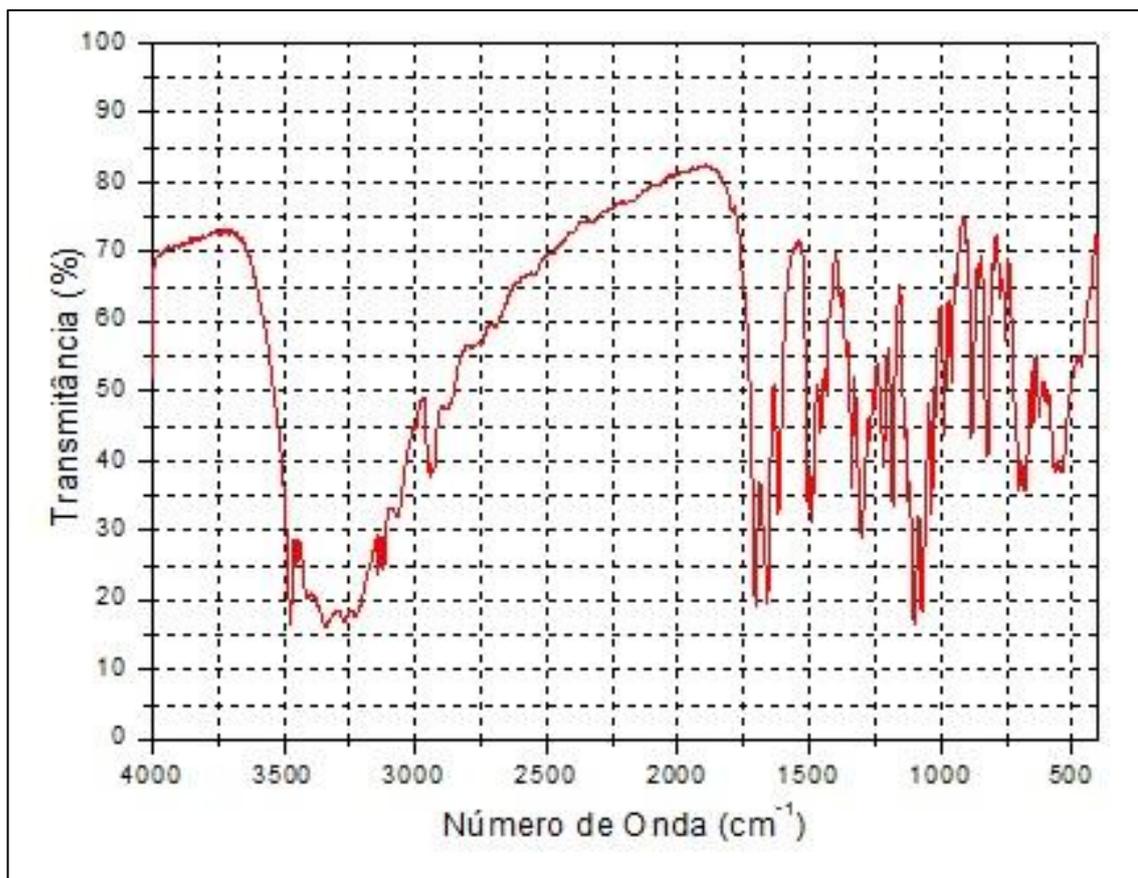
WEINHOLD, F.; LANDIS, C. R. Natural Bond Orbitals and Extensions of Localized Bonding Concepts. **Chem. Educ. Res. Pract. Eur.** 2001, Vol. 2, 91-104.

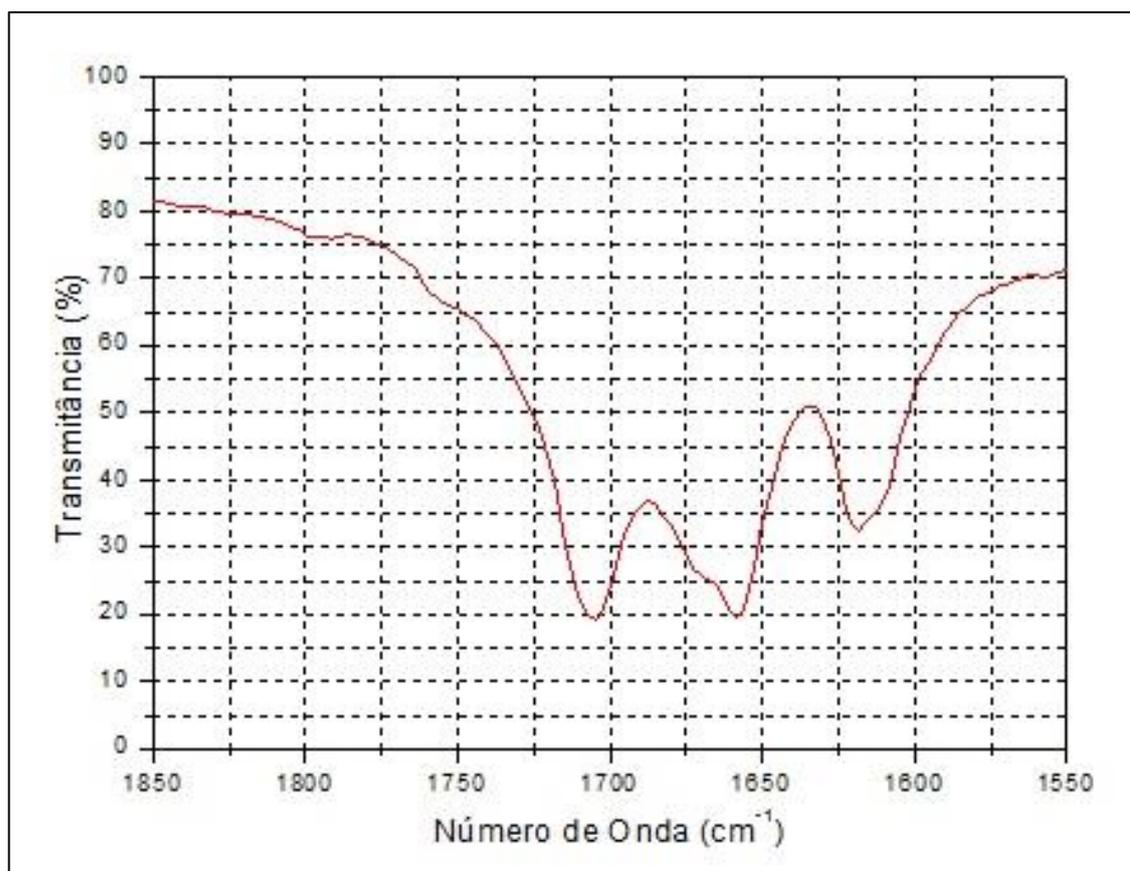
WU, J. Z.; LIN, C.; HONG, Z. Ribavirin, Viramidine and Adenosine-deaminase-Catalysed Drug Activation: Implication for Nucleoside Prodrug Design. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** 2003, 52, 543–546.

KINI, G. D.; ROBINS, R. K.; AVERY, T. L. Synthesis and Antitumor Activity of Ribavirin Imidates. A New Facile Synthesis of Ribavirin Amidine (1- β -D-Ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide Hydrochloride). **J. Med. Chem.** 1989, 32, 1447-1449.

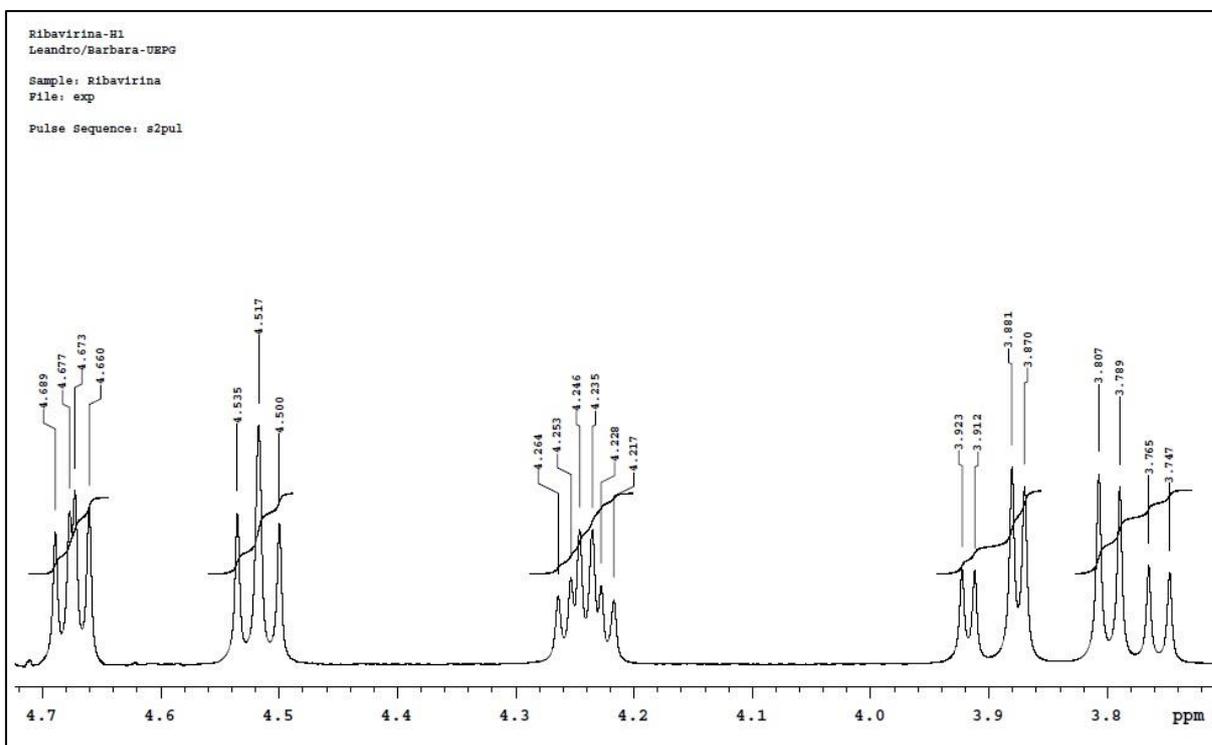
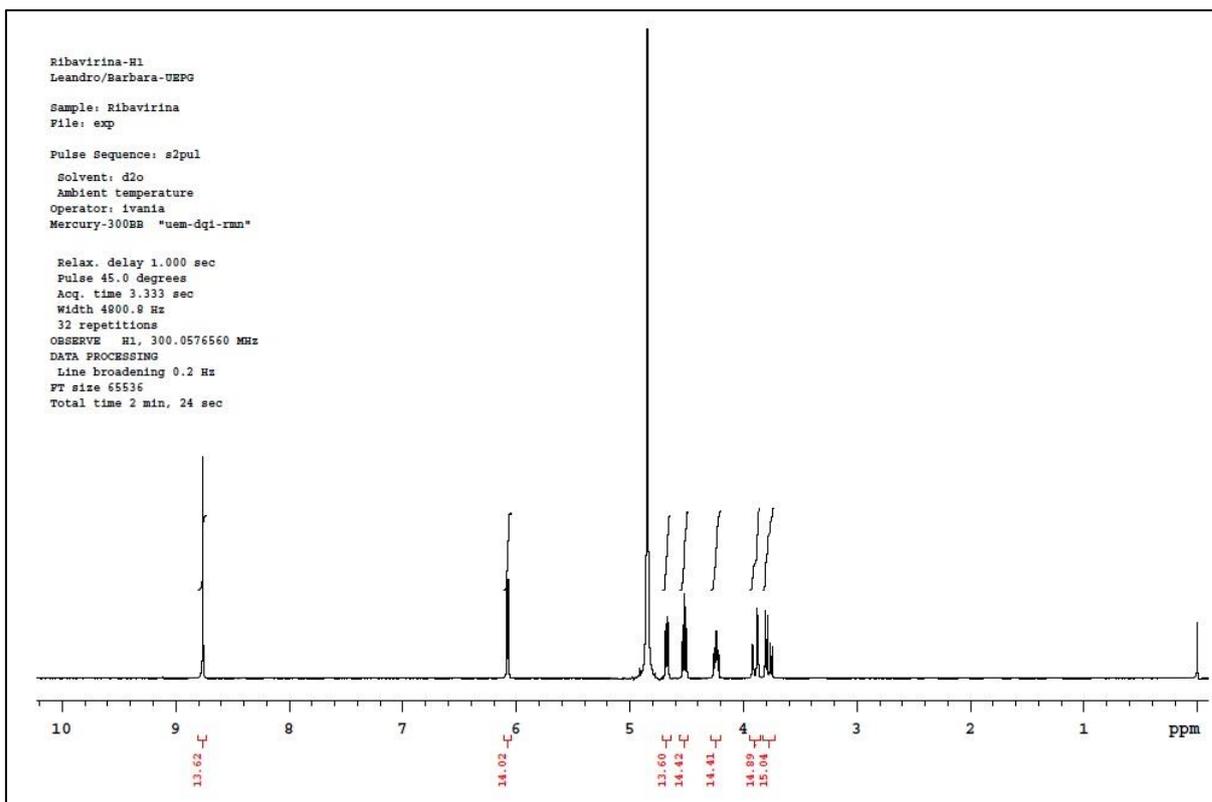
KWO, P. Y.; VINAYEK, R. The Next Step for Taribavirin. **American Association for the Study of Liver Diseases.** Hepatology, 2010, 52(4), 1185-1188.

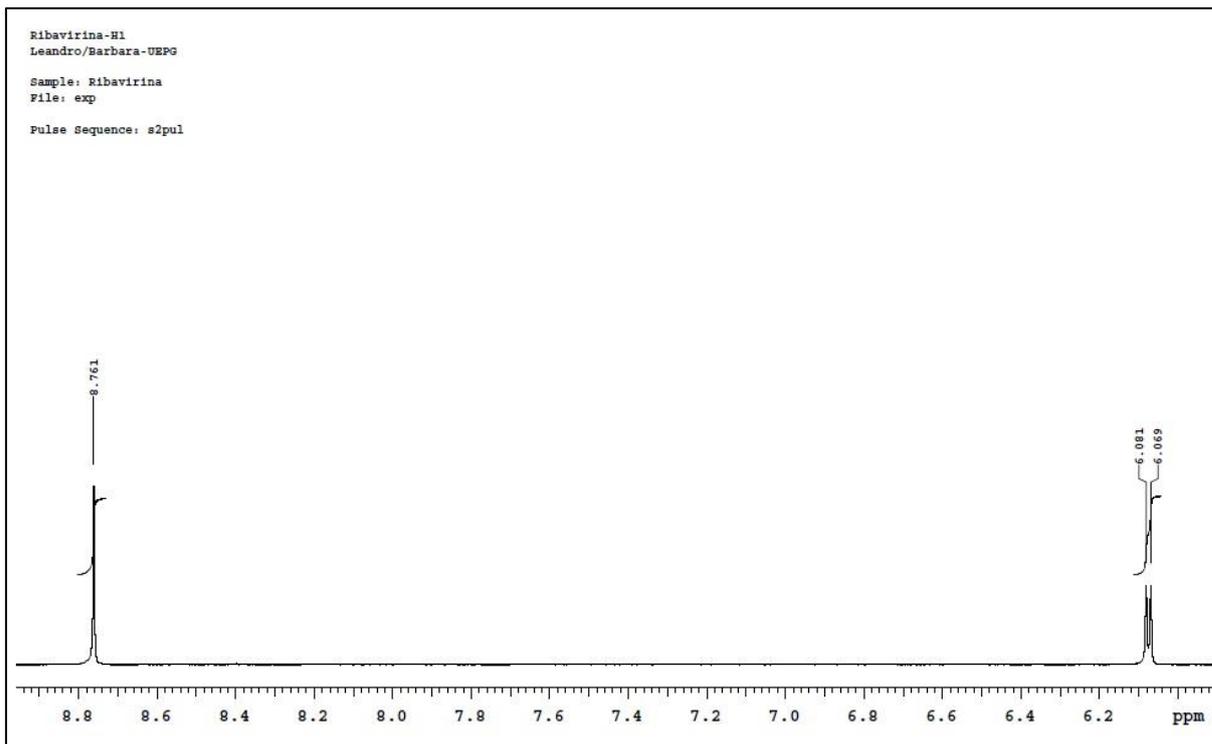
ANEXO A – ESPÉCTRO DE INFRAVERMELHO DA RIBAVIRINA



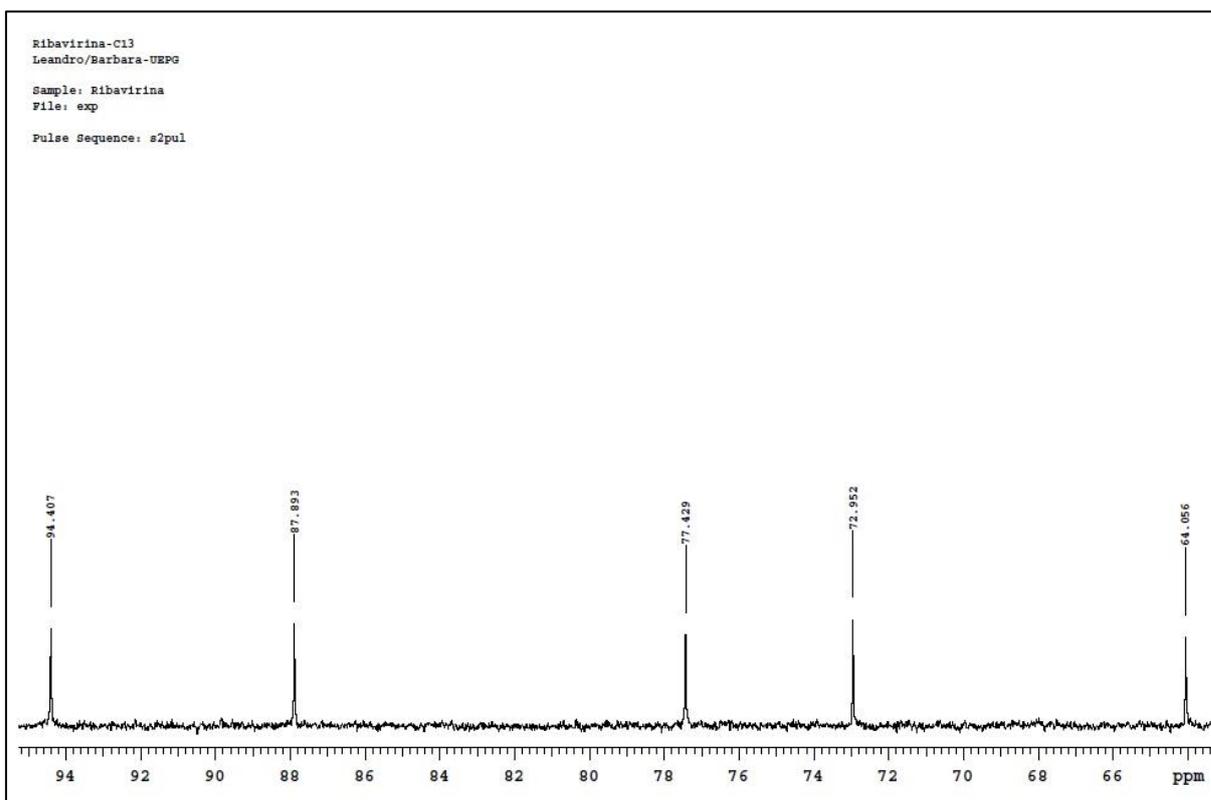
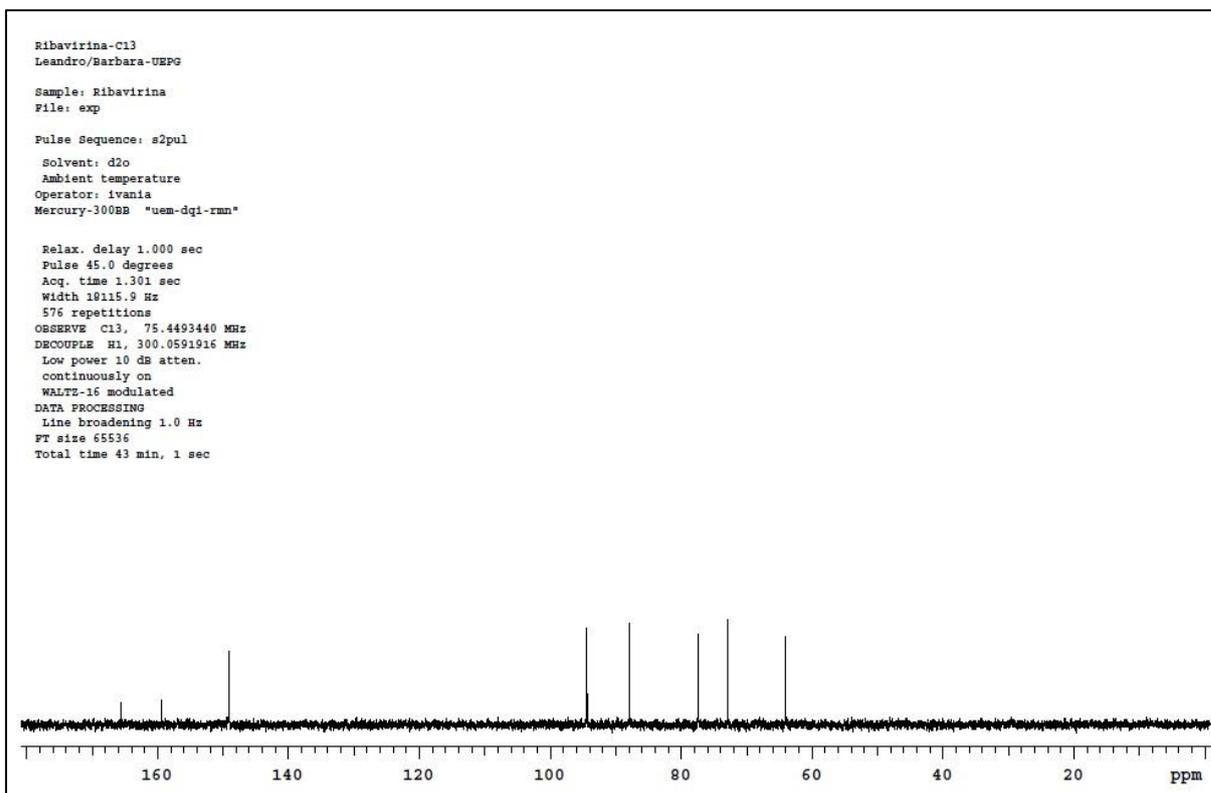


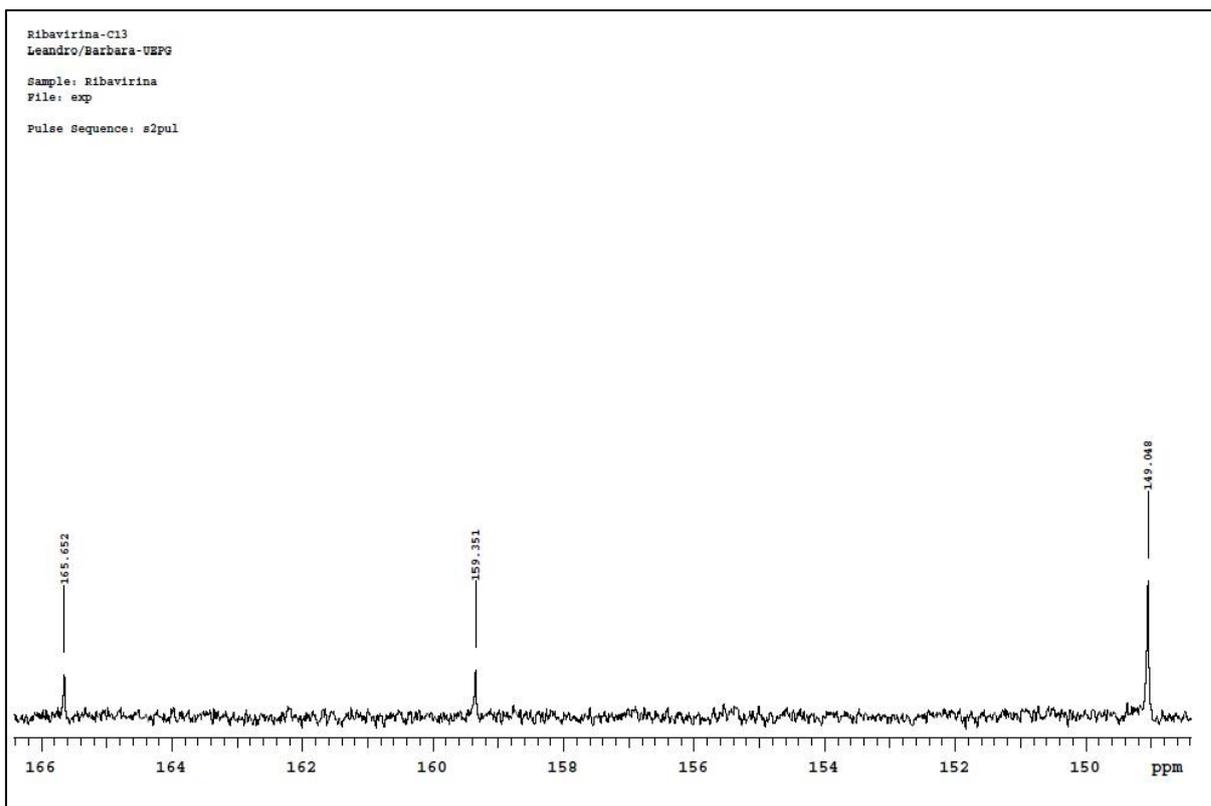
ANEXO B – ESPÉCTROS DE RMN DE ^1H EM D_2O DA RIBAVIRINA



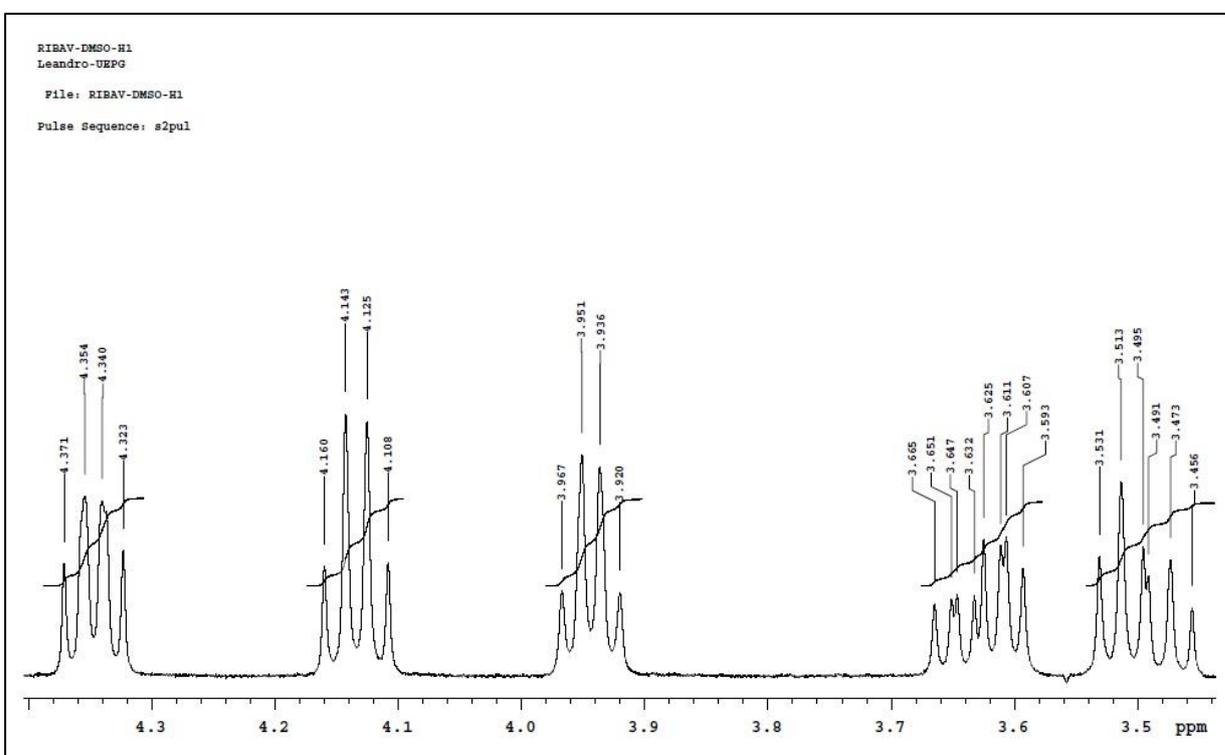
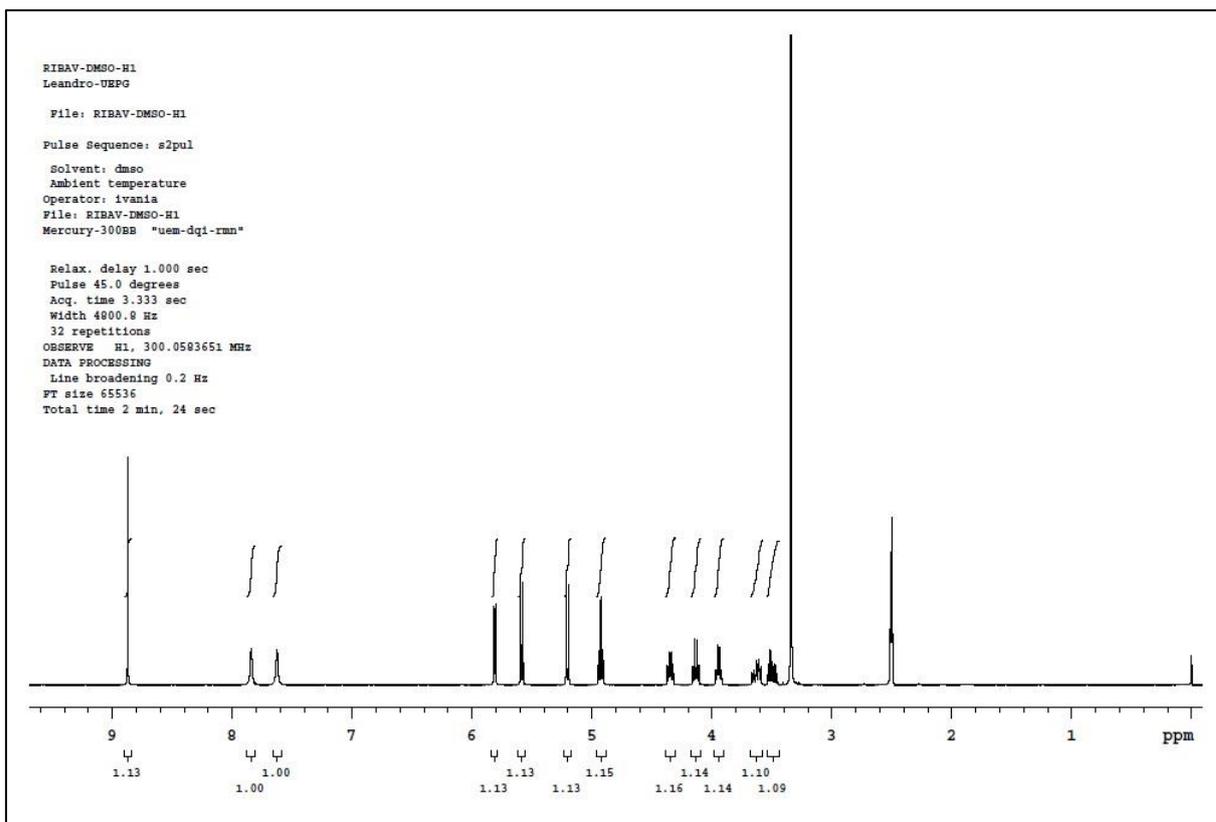


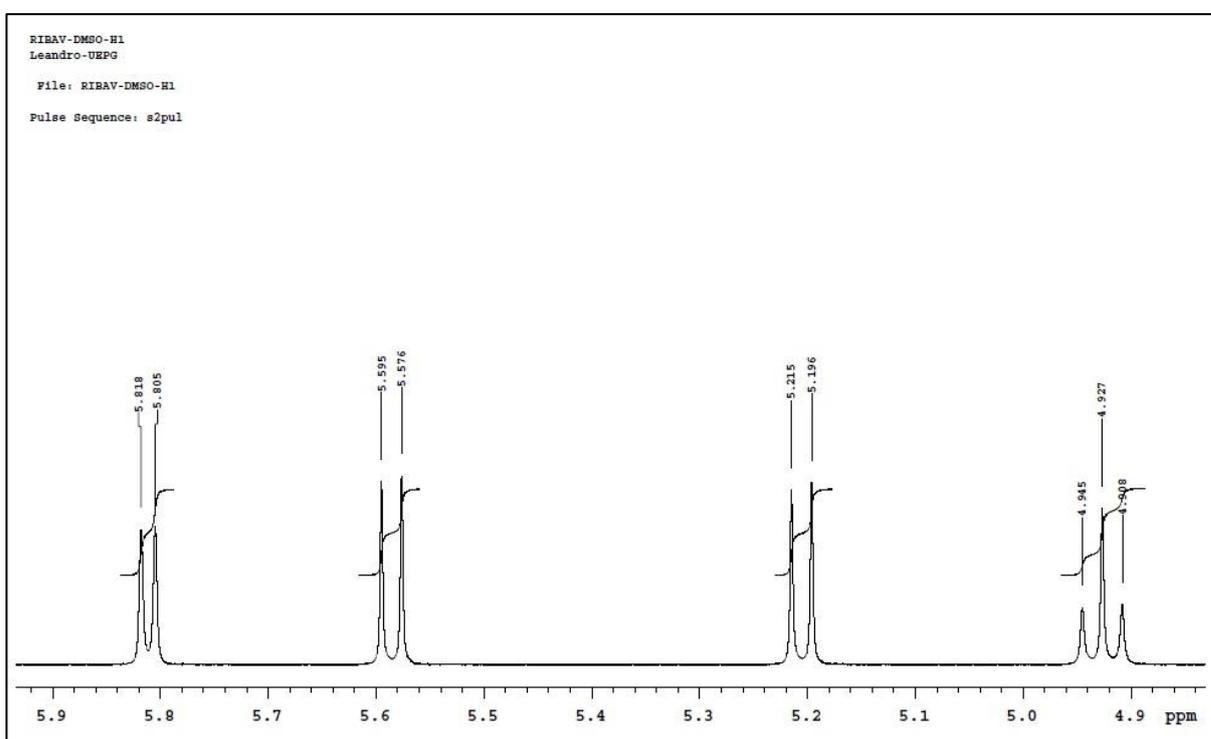
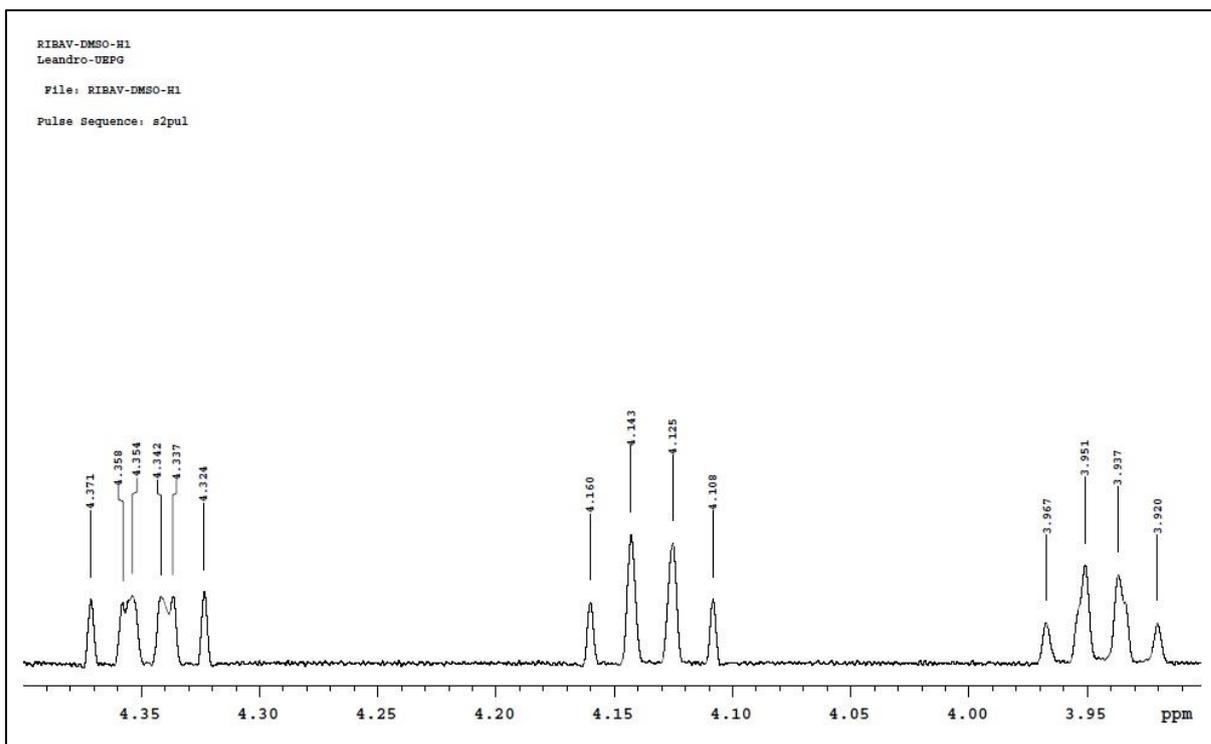
ANEXO C – ESPÉCTROS DE RMN DE ^{13}C EM D_2O DA RIBAVIRINA

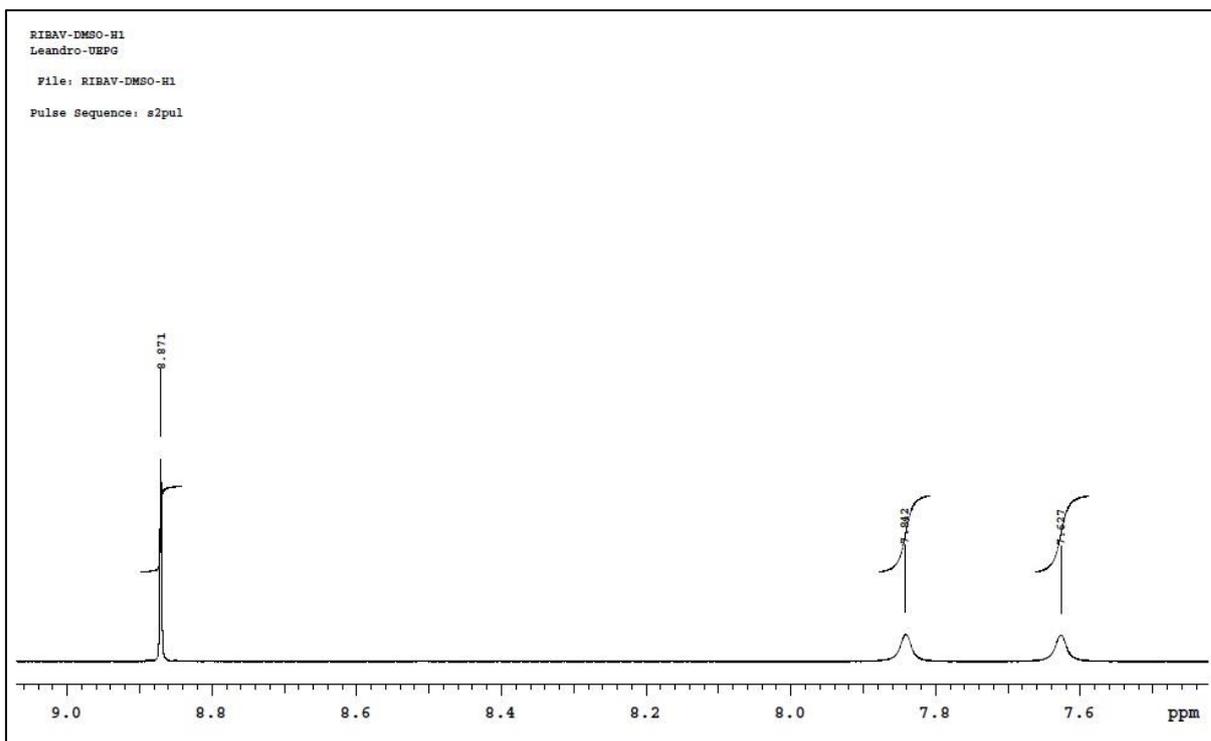




ANEXO D – ESPÉCTROS DE RMN DE ^1H EM DMSO- d_6 DA RIBAVIRINA







ANEXO E – ESPÉCTROS DE RMN DE ^{13}C EM DMSO- d_6 DA RIBAVIRINA

