

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

**Desenvolvimento de um Modelo Empírico de Predição da
Atividade de Inibidores da Esterol 14 α -Desmetilase
(CYP51) utilizando o Método Semi-Empírico PM6**

JOSÉ GERALDO ROCHA JÚNIOR

2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO EMPÍRICO DE PREDIÇÃO
DA ATIVIDADE DE INIBIDORES DA ESTEROL 14 α -DESMETILASE
(CYP51) UTILIZANDO O MÉTODO SEMI-EMPÍRICO PM6**

JOSÉ GERALDO ROCHA JÚNIOR

Sob a Orientação do Professor
Dr. Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Orgânica.

Seropédica, RJ
Abril de 2009

540
R672d
T

Rocha Júnior, José Geraldo, 1984-
Desenvolvimento de um modelo
empírico de predição da atividade de
inibidores da Esterol 14 α -
Desmetilase (CYP51) utilizando o
método semi-empírico PM6/ José
Geraldo Rocha Júnior - 2009.
98 f. : il.

Orientador: Carlos Mauricio
Rabello de Sant'Anna.

Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Programa de Pós-
Graduação em Química.

Bibliografia: f. 74-86

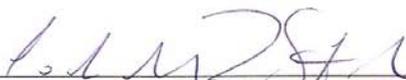
1. Química orgânica - Teses. 2.
Fungos Fitopatogenicos - Teses. 3.
Fungicidas - Teses. 4.
Mycobacterium tuberculosis - Teses.
I. Sant'Anna, Carlos Mauricio
Rabello de, 1965-. II. Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-Graduação em
Química. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JOSÉ GERALDO ROCHA JÚNIOR

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências no Curso de Pós Graduação em Química, Área de Concentração em Química Orgânica.

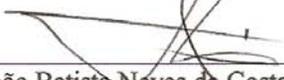
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 13/04/2009



Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna (Dr. Sc.) UFRRJ
(Orientador)



Laurent Emmanuel Dardenne (Dr. Sc.) LNCC



João Batista Neves da Costa (Dr.Sc.) UFRRJ

Nelilma Correa Romeiro (Dr. Sc.) UFRJ

*A glória de Deus é encobrir as coisas,
mas a glória dos reis é esquadrihá-las.*

Bíblia Sagrada (Pv. 25:2)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar uma nova e viva esperança em meu Senhor e Salvador Jesus Cristo. Pelo seu amor e cuidado sempre constantes na minha vida. Pela Universidade Rural. Por trazer a existência este grande momento. Por já ter preparado momentos ainda melhores do que este.

À minha mãe, por renunciar tantas coisas para que eu pudesse ter êxito durante o tempo em que estive fora de casa. Ao meu pai e à Danielle, por sempre me dizer “te amo”. Ao Rodrigo e Oscar pelo encorajamento.

À família Corrêa por ter acreditado e me incentivado desde o princípio.

Aos docentes deste Departamento, pela amizade e incentivo, especialmente aos professores Mário Geraldo e Rosane, pelo carinho demonstrado e pelos aconselhamentos.

Ao professor Carlos Maurício, pela oportunidade de participar de seu grupo de pesquisa, pela compreensão e pela confiança.

Aos amigos do LabMol/UFRRJ pela amizade e apoio prestado durante esta jornada.

Ao Felipe, Isabel, Sheisi e Luíza, pela amizade sincera e incondicional. Por gastarem longos momentos de suas vidas comigo, me ajudando a superar crises e sonhando junto comigo.

Aos irmãos da Célula Peniel e da ABU-Rural, pela “*amizade que dá força, fé que sustenta*”.

Aos amigos Vinícius, Guilherme, Dalton e Márcio, pelos momentos de descontração.

Ao LASSBio/UFRRJ pela doação da licença do Spartan’08.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Ao PPGQ/UFRRJ por proporcionar este acontecimento.

RESUMO

ROCHA Jr., José Geraldo. **Desenvolvimento de um modelo empírico de predição da atividade de inibidores da esterol 14 α -desmetilase (CYP51) utilizando o método semi-empírico PM6**. 2009. 82p. Dissertação (Mestrado em Química, Química Orgânica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

A esterol 14 α -desmetilase (CYP51) é um dos maiores alvos para o desenvolvimento de fungicidas. Seus inibidores (os DMIs) bloqueiam a biossíntese do ergosterol, e conseqüentemente o crescimento de fungos, por se ligarem na cavidade do sítio ativo da enzima fazendo uma ligação coordenativa com o átomo de ferro do heme. Neste trabalho, um modelo de substituição quimérica do sítio da CYP51 de um fungo fitopatogênico *Mycosphaerella graminicola* foi construído baseado na estrutura cristalográfica da CYP51 de *Mycobacterium tuberculosis*. Este fungo pertence ao mesmo gênero do fungo *Mycosphaerella fragariae*, o causador da mancha-de-micosferela em morangos. Utilizando este modelo, foram calculadas as entalpias de interação de uma série de fungicidas triazólicos pelo método do orbital semi-empírico PM6. Foi constatado que fatores como a entalpia de interação, a solubilidade em água e as perdas entrópicas devido a restrições rotacionais destes inibidores são importantes parâmetros a serem considerados na síntese de novos fungicidas DMIs. A quantificação destes parâmetros para os triazóis nos possibilitou o desenvolvimento de um modelo empírico para determinação da atividade de DMIs com boa correlação com dados experimentais ($r=0,94$, $SD=0,63$). Este modelo foi utilizado na predição da atividade relativa de novos compostos, sintetizados pelo grupo de síntese de organofosforados da UFRRJ. Foi possível identificar quais compostos são os mais promissores da série proposta e quais fatores devem ser alterados para otimizar o perfil de inibição da CYP51, como o número de rotações livres perdidas após interação com o sítio ativo da enzima.

Palavras-chave: Fungos fitopatogênicos. Fungicidas. Modelos empíricos de predição de energia livre. CYP51.

ABSTRACT

The enzyme sterol 14 α -demethylase (CYP51) is one of the major targets for the design of new fungicides. The CYP51 inhibitors or demethylase inhibitors (DMIs) act by interruption of ergosterol biosynthesis and, as a consequence, of fungi growth. The DMIs bind to the enzyme active site by means of a coordinative bond to the iron atom of the enzyme heme group. In the present work, a chimeric substitution model of the phytopathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola* CYP51 was constructed based on the crystallographic structure of the *Mycobacterium tuberculosis* CYP51. Based on this model, the interaction enthalpies of a series of triazolic fungicides was obtained with the semiempirical molecular orbital model PM6. It was observed that the interaction enthalpy, the water solubility and the entropic losses associated to the freezing of bonds after the binding of the inhibitors to the enzyme are important parameters for the design of new DMIs. It was possible to obtain a good empirical model for the correlation between experimental activity data and the theoretical parameters of triazolic DMIs ($r=0.94$, $SD=0.63$). The model was employed for the prediction of the relative activity of a series of new proposed fungicides synthesised by the organophosphorous synthesis group of UFRRJ. It was possible to identify which compounds are the most promising and which are the main factors that should be modified in order to optimize the inhibition profile of CYP51, such as the number of rotatable bonds frozen after the binding to the enzyme active site.

Keywords: Phytopathogenic fungi. Fungicides. Empirical models for prediction of free energy. CYP51.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Redução das doses de aplicação de fungicidas e o aumento da segurança com o desenvolvimento de novas substâncias.	6
Tabela 2. Eficiências dos fungicidas estrobilurínicos contra algumas doenças consideradas prejudiciais à produção agrícola.	6
Tabela 3. Classificação dos SBIs, alvos de inibição e seus compostos bioativos.	8
Tabela 4. Compostos utilizados para a construção do modelo de predição da atividade de novos inibidores da CYP51 e suas respectivas atividades experimentais contra <i>C. albicans</i> .	38
Tabela 5. Constituintes do sítio selecionado da CYP51MT, usado nos cálculos.	42
Tabela 6. Constituintes do sítio selecionado da CYP51MG ^H , usado nos cálculos.	43
Tabela 7. Nomenclatura dos aminoácidos presentes no sítio ativo da CYP51MG após a substituição de alguns resíduos da CYP51MT.	45
Tabela 8. Entalpias de interação calculadas na formação do complexo CYP51MT-inibidor (ΔH^{PM6} , kcal/mol) e a atividade inibitória experimental ($\mu\text{mol/L}$).	53
Tabela 9. Entalpias de interação calculadas na formação dos complexos CYP51MG-inibidor (ΔH^{PM6} , kcal/mol), para os diferentes modelos do sítio de interação da CYP51MG, e a atividade inibitória experimental ($\mu\text{mol/L}$).	56
Tabela 10. Valores de IC_{50} medidos experimentalmente ($\mu\text{mol/L}$), energia de interação calculada pelo PM6 (ΔH^{PM6} , kcal/mol), número de ligações rotacionáveis (N_{LR}) “congeladas” durante a ligação e o log da solubilidade estimada em meio aquoso ($\log WS$) dos inibidores triazólicos utilizados neste trabalho.	61
Tabela 11. Contribuição de cada termo variável da equação 27, $\ln IC_{50}$ medido experimentalmente, $\ln IC_{50}$ calculado pela equação 27, e a diferença entre os valores de $\Delta \ln IC_{50}$ experimentais e calculados.	63
Tabela 12. Energia de interação calculada pelo método PM6 (ΔH^{PM6} , kcal/mol), número de ligações rotacionáveis (N_{LR}) congeladas durante a ligação e o log da solubilidade estimada em meio aquoso ($\log WS$) dos compostos organofosforados utilizados neste trabalho.	66
Tabela 13. Contribuição de cada termo variável da equação 27 e o $\ln IC_{50}$ predito pela equação 27 para os compostos organofosforados.	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Venda de defensivos agrícolas no Brasil entre os anos de 2004 e 2008.	4
Figura 2. Alguns DMIs utilizados na agricultura.	7
Figura 3. Participação da CYP51 na biossíntese de esteróis de animais, fungos e plantas.	9
Figura 4. As três etapas da reação de desmetilação no C14 catalisada pela CYP51.	10
Figura 5. Representação do heme ligado ao sítio ativo da CYP51 de <i>M. tuberculosis</i> na ausência de um substrato.	10
Figura 6. Manchas foliares causadas por <i>M. fragariae</i> em morangueiros.	13
Figura 7. As quatro etapas principais da modelagem por homologia.	21
Figura 8. Representação da face distal de uma P450 (CYP2C5).	23
Figura 9. Alinhamento das estruturas primárias da CYP51 de <i>M. graminicola</i> (CYP51MG) e <i>M. tuberculosis</i> (CYP51MT).	44
Figura 10. Sítio de ativo da CYP51MT.	46
Figura 11. Representação da estrutura do heme presente na CYP51.	48
Figura 12. Alinhamento das estruturas primárias da CYP51 de <i>C. albicans</i> (CYP51CA), <i>M. graminicola</i> (CYP51MG) e <i>M. tuberculosis</i> (CYP51MT).	49
Figura 13. Estruturas propostas para avaliação de potencial fungicida, testadas no modelo de CYP51MG.	50
Figura 14. Comparação entre as distâncias, em Å, de algumas ligações do heme da CYP51MT após otimização com o método PM6 e as distâncias de referência obtidas à partir de dados cristalográficos.	52
Figura 15. Sobreposição dos modelos do sítio ativo da CYP51MG ^{SQ} e CYP51MG ^H .	55
Figura 16. Representação das interações específicas encontradas entre os inibidores triazólicos e os modelos da CYP51MG ^{SQ1} e CYP51MT após minimização.	59
Figura 17. Gráfico de correlação entre $\ln IC_{50}$ experimental e calculado.	64
Figura 18. Proposta de estrutura com os melhores termos de energia combinados.	69
Figura 19. Exemplo das interações encontradas entre os organofosforados e o sítio ativo da CYP51MG ^{SQ1} .	70

ÍNDICE DE ABREVIACÕES

AM1	<i>Austin Model 1</i>
AMBER	<i>Assisted Model Building and Energy Refinement</i>
CYP51	Esterol 14 α -desmetilase
CYP51AF	CYP51 de <i>Aspergillus fumigatus</i>
CYP51MG	CYP51 de <i>Mycosphaerella graminicola</i>
CYP51MG ^H	Modelo de CYP51 de <i>M. graminicola</i> feito por homologia
CYP51MG ^{SQ1}	Modelo de CYP51 de <i>M. graminicola</i> construído por substituição quimérica com carga +1
CYP51MG ^{SQ2}	Modelo de CYP51 de <i>M. graminicola</i> construído por substituição quimérica com carga +2
CYP51MT	CYP51 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DMIs	<i>Demethylase Inhibitors</i>
FEP	<i>Free Energy Perturbation</i>
GA	<i>Genetic Algorithm</i>
HF	Hartree-Fock
IT	Integração Termodinâmica
LCAO	<i>Linear Combination of Atomic Orbitals</i>
LIE	<i>Linear Interaction Energy</i>
MM2	<i>Molecular Mechanics 2</i>
MNDO	<i>Modified Neglect of Diatomic Overlap</i>
MNDO/d	<i>Modified Neglect of Diatomic Overlap</i> , incluindo orbitais d
MQ	Mecânica Quântica
NDDO	<i>Neglect of Diatomic Differential Overlap</i>
N _{LR}	Número de Ligações Rotacionáveis
OM	Orbital Molecular
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PM3	<i>Parametric Method 3</i>
PM5	<i>Parametric Method 5</i>
PM6	<i>Parametric Method 6</i>
RM1	<i>Recife Model 2</i>
SBIs	<i>Sterol Biosyntheses Inhibitors</i>
STO	<i>Slater Type Orbitals</i>
WS	<i>Water Solubility</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Controle Químico de Fungos Fitopatogênicos	4
2.2 Fungicidas Inibidores da Desmetilação do Esterol	7
2.3 A Cultura do Morangueiro e a Mancha-de-Micosferela	12
2.4 Interação Enzima-Ligante	14
2.5 Modelos Quantitativos de Interação	16
2.6 Determinação da Estrutura da CYP51	20
2.6.1 Modelagem por homologia	20
2.6.2 Modelagem de proteínas da família citocromo P450	22
2.7 Métodos de Química Computacional	25
2.7.1 Métodos Quanto-mecânicos	25
2.7.2 Métodos de Mecânica Molecular	32
2.8 Modelos de Predição da Solubilidade em Água de Moléculas Orgânicas	34
3 OBJETIVOS	37
4 METODOLOGIA	38
4.1 Modelo Empírico Usado na Predição da Atividade Inibitória da CYP51	38
4.2 Obtenção da Estrutura 3D da CYP51MT e Seleção de seu Sítio de Interação	41
4.3 Modelagem do Sito Ativo da CYP51 de Fungo Fitopatogênico	42
4.3.1 Modelagem por homologia	43
4.3.2 Modelagem por substituição quimérica	44
4.4 Otimização dos Sítios CYP51MT e CYP51MG com o Fluconazol	45
4.5 Substituição dos Inibidores no Sítio Ativo da CYP51	48
4.6 Modelagem dos Inibidores	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 Estudo Semi-empírico no Modelo do Sítio de Ativo da CYP51MT	52
5.2 Construção do Modelo do Sítio Ativo de CYP51MG	54
5.3 Interações dos Triazóis com a CYP51MG	57

5.4 Modelo Empírico de Predição da Atividade de Inibidores da CYP51MG	60
5.5 Predição de Atividade Antifúngica de Compostos Organofosforados Sintetizados pelo Grupo da UFRRJ	64
5.6 Interações Específicas dos Organofosforados com a CYP51MG	69
6 CONCLUSÕES	72
7 CONSIDERAÇÕES GERAIS	73
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1 INTRODUÇÃO

Neste início de milênio, quando a sustentabilidade econômica, técnica e ambiental torna-se um dos objetivos principais da agricultura moderna, o Brasil, um país cuja economia depende em grande parte da atividade agrícola, não poderia fechar os olhos para os problemas causados pela ação de fungos na agricultura.

Se um fungicida possui atividade intrínseca, ou seja, a sua atividade é baseada na afinidade específica e na força de ligação com o seu sítio-alvo, então a atividade da enzima-alvo, a montagem das subunidades bioquímicas ou a tradução dos sinais podem ser inibidas pelo fungicida. Dessa forma, o conhecimento das interações moleculares mais relevantes que um fungicida intrínseco apresenta com o seu alvo bioquímico pode ajudar a prever se novas moléculas serão mais eficientes como fungicidas, com o mesmo alvo de ação.

A Química Computacional é uma ferramenta muito útil para elucidação das estruturas moleculares. Quando métodos de química computacional são utilizados em estudos envolvendo a ligação entre uma enzima com algum ligante, é possível ter informações sobre quais as principais interações moleculares que estão promovendo esta ligação. Quando os resultados previstos por estes métodos para a eficiência da inibição enzimática podem ser de algum modo correlacionados com a atividade inibitória obtida experimentalmente (i.e. K_i , IC_{50}), então o modelo proposto pode ser explorado para se obter alguma previsão se novas moléculas serão mais ou menos ativas como inibidores enzimáticos.

O processo de reconhecimento molecular enzima-ligante é dirigido por uma combinação de efeitos entálpicos e entrópicos. Estes efeitos podem ser estimados através da energia livre de Gibbs da interação enzima-ligante que está diretamente relacionada à constante de inibição K_i , a qual pode ser medida experimentalmente. Diferentes métodos computacionais têm sido desenvolvidos para estimar a energia livre de interação, tais como os métodos de integração termodinâmica (IT) [KOLLMAN, 1993], da perturbação da energia livre (FEP) [VAN GUNSTEREN *et al.*, 1994; BROOKS *et al.*, 1988] e o método da energia de interação linear (LIE) [ASI *et al.*, 2004; AQVIST *et al.*, 2002; HANSSON *et al.*, 1998], embora a obtenção de estimativas muito precisas de ΔG_{int} envolva um custo computacional muitas vezes proibitivo.

Uma maneira encontrada para se solucionar este problema está no desenvolvimento de equações empíricas. Estas equações são ajustadas aos valores experimentais de K_i ou IC_{50} e

associam termos de energia que são mais facilmente calculados, importantes no fenômeno de interação enzima-ligante.

A cultura de morango no Brasil apresenta grande importância econômica, principalmente nos Estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul. Ela tem sido frequentemente atacada pelo fungo *Mycosphaerella fragariae*, causador de uma doença foliar no morangueiro, a mancha-de-micosferela. O controle químico desta doença utilizando compostos inibidores da enzima esterol 14 α -desmetilase (CYP51) tem se demonstrado altamente eficaz [TÖFOLI & DOMINGUES]. Esta enzima atua catalisando uma etapa importante na biossíntese de esteróis e sua inibição pode acarretar a morte de fungos por afetar a integridade das membranas celulares.

Trabalhos realizados anteriormente para a predição da atividade de inibidores da CYP51 utilizaram métodos quânticos *ab initio* e de campo de força clássico para calcular as contribuições de termos de energia envolvidos na interação CYP51-inibidor de *Candida albicans* e *Mycobacterium tuberculosis* [ZAMPIERI *et al.*, 2007; BANFI *et al.*, 2006]. Neste trabalho, buscou-se desenvolver uma equação empírica para a predição da atividade de inibidores de um fungo fitopatogênico relacionado ao fungo *M. fragariae*, baseada na estimativa de termos de energia, incluindo o uso do método do orbital molecular semi-empírico PM6 [STEWART, 2007] para calcular a entalpia envolvida nesta interação.

Este hamiltoniano, desenvolvido recentemente e disponível nos programas Mopac2007 e Mopac2009, dispõe de parâmetros para metais de transição. Esta característica, essencial para a descrição dos aspectos estereo-eletrônicos associados à complexação de fungicidas com o átomo de ferro localizado no sítio ativo da CYP51, soma-se à rapidez dos métodos semi-empíricos, que permite que sejam utilizados para modelar sistemas contendo uma quantidade elevada de átomos. Como a entalpia de interação calculada pelo método semi-empírico corresponde a apenas um dos termos de energia envolvidos na interação enzima-ligante, outras contribuições energéticas baseadas em propostas da literatura foram calculadas e consideradas na tentativa de se obter uma melhor correlação com os dados experimentais.

Na primeira etapa deste trabalho buscou-se fazer uma avaliação sobre o uso do método PM6 para cálculos de entalpia de interação entre a CYP51 e alguns inibidores, utilizando o sítio ativo obtido da estrutura cristalográfica da CYP51 de *M. tuberculosis* e comparando-se os resultados obtidos com dados de atividade antifúngica encontrados na literatura.

Na segunda etapa foi feita a construção de um modelo do sítio ativo da CYP51 de um fungo fitopatogênico que poderia ser utilizado para propor novos inibidores contra *M.*

fragariae. Como ainda não foi obtido a sequência primária da CYP51 desta espécie, este modelo foi construído a partir da sequência da CYP51 de *Mycosphaerella graminicola*, por esta espécie pertencer ao mesmo gênero. Este modelo foi utilizado nos cálculos de entalpia de interação enzima-ligante com o método PM6.

A seguir, buscou-se desenvolver uma equação empírica de predição da atividade de substâncias com potencial inibidor da CYP51, baseado nos dados de atividade inibitória experimentais da literatura. Com esta equação, procurou-se combinar parâmetros teóricos importantes no fenômeno de interação enzima-ligante, como a entalpia de interação calculada na etapa anterior, e utilizá-los na predição da atividade relativa de compostos com potencial antifúngico sintetizados pelo grupo de síntese de organofosforados da UFRRJ.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Controle Químico de Fungos Fitopatogênicos

Através do uso de defensivos agrícolas, muitas perdas nas diversas culturas podem ser evitadas. Os defensivos agrícolas reduzem consideravelmente perdas causadas por insetos, plantas competidoras e fungos patogênicos. Comparando a produção agrícola com e sem o uso de defensivos, o uso de defensivos mostra um resultado muito superior em produtividade e qualidade. Nas culturas de arroz, milho, batata, soja, algodão, café, trigo e cevada, por exemplo, a produção sem o uso de defensivos agrícolas significa perdas de até 70% de produtividade causadas pela incidência de insetos, doenças e plantas competidoras. Essa perda vem sendo significativamente reduzida pelo uso de defensivos agrícolas nas lavouras. Hoje, 16% destas perdas são evitadas apenas com o uso de herbicidas para controle de plantas competidoras. Com o uso de inseticidas é possível reduzir as perdas em mais 7% e com fungicidas mais 4% [© CHEMINOVA BRASIL].

As vendas de defensivos agrícolas no Brasil cresceram nos últimos dois anos, recuperando-se da queda observada até 2006 [CONEXÃO SINDAG, 2008] (figura 1). No ano de 2008, com o aumento de 24% nas vendas de defensivos agrícolas em relação ao ano anterior, o Brasil assumiu a liderança no consumo mundial de agroquímicos, posição que antes era ocupada pelos Estados Unidos [CONEXÃO SINDAG, 2009].

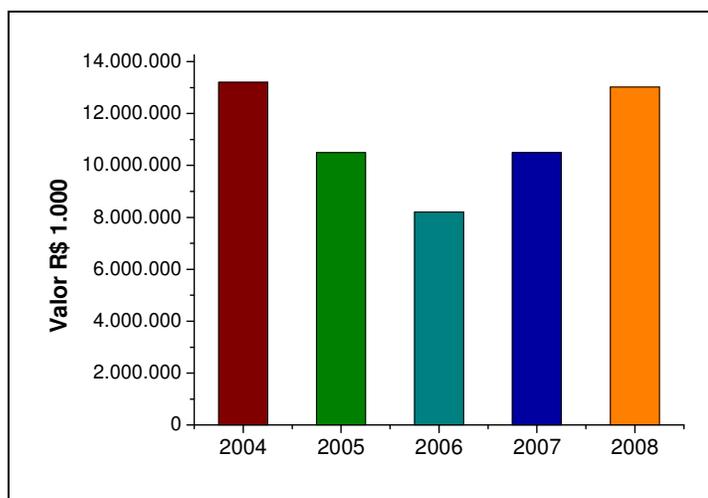


Figura 1. Venda de defensivos agrícolas no Brasil entre os anos de 2004 e 2008.

Os fungicidas são considerados fatores de produção importantes na cadeia produtiva de alimentos. Eles têm sido empregados, por cerca de 200 anos, para proteger as plantas de doenças provocadas por ataques de fungos. Inicialmente seu uso foi voltado principalmente para proteção de sementes de cereais e videiras. Após a segunda guerra mundial, o número de culturas e das doenças tratadas, a variedade de compostos químicos disponíveis, a área e frequência de seu uso e a eficiência dos tratamentos aumentaram extraordinariamente. Porém, somente na última década que a quantidade e a variedade de tratamentos com fungicidas atingiram algum grau de estabilidade e maturidade [RUSSEL, 2005].

Alguns fungicidas muito antigos, formulados à base de cobre e enxofre, ainda são empregados e efetivos. Vários fungicidas de “meia-idade”, como ftalamidas, ditiocarbamatos, dinitrofenólicos e clorofenólicos, têm sido utilizados de modo constante há mais de 30 anos. Um grande número de fungicidas mais potentes, com novas estruturas e, na sua maioria, com atividade sistêmica que não se encontrava nos produtos anteriores, foram introduzidos no final dos anos 1960 e 1970 [BRENT, 1995]. Dentre estes se incluem as 2-amino-pirimidinas, benzimidazóis, carboxanilidas, fosforotiolatos, morfolinás, dicarboximidás, fenilamidás e compostos que atuam como inibidores da desmetilação do esterol (DMIs). As introduções de fungicidas realizadas a partir de 1980 foram basicamente de análogos de fungicidas que já existiam, particularmente DMIs em geral, com propriedades semelhantes mas com algum incremento. No entanto, nos últimos anos, vários compostos realmente novos foram lançados comercialmente ou estão em estágio avançado de desenvolvimento – entre estes se encontram os fenilpirróis, anilino-pirimidinas e análogos da estrobilurina [BRENT, 1995].

Além dos fungicidas mais recentes serem utilizados em quantidades relativamente pequenas devido à sua ação mais potente contra os patógenos de plantas, sua toxicidade para mamíferos tem em geral diminuído, o que tem tornado seu uso mais seguro (tabela 1).

Alguns fungicidas controlam uma ampla gama de doenças fúngicas, enquanto outros apresentam um espectro limitado de atividade contra um ou dois grupos específicos de patógenos de plantas (tabela 2). Embora muitos fungicidas sejam comercializados, qualquer uma das principais doenças de plantas cultivadas seria tipicamente controlada por apenas três ou quatro tipos diferentes de fungicida. Com o aparecimento da resistência, o controle de algumas doenças, como o mofo cinzento em videiras (*Botrytis cinerea*) e a sigatoca negra em bananeiras (*Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*), depende agora muito mais da ação de apenas um ou dois tipos de fungicida [BARTLETT *et al.*, 2002; BRENT, 1995].

Tabela 1. Redução das doses de aplicação de fungicidas e o aumento da segurança com o desenvolvimento de novas substâncias (Adaptado: RUSSEL, 2005).

Fungicida	Ano de introdução	Quantidade aplicada kg i.a. ^a /ha	LD ₅₀ mg oral i.a. ^a /kg (mamíferos)
Sulfato cúprico	1760	10-20	472
Enxofre	1824	10-20	400-500
Ditiocarbamatos	1940s-1960s	1,5-3,5	>8000
Ftalimidas	1950s-1960s	<2,0	>22000
Clorotalonil	1964	0,75-1,25	>10000
Geradores de Carbendazim	1960s	0,25-1,0	>15000
Dicarboxamidas	1970s	0,75	3500-10000
Triazóis (DMI)	1970s	0,125-0,25	>6200
Estrobilurinas	1990s	0,125-0,25	>5000

^ai.a., ingrediente ativo.

Tabela 2. Eficiências dos fungicidas estrobilurínicos contra algumas doenças consideradas prejudiciais à produção agrícola [BARTLETT, 2002].

Doença (fungo)	Eficiência ^a dos fungicidas ^b					
	AZ	MC	MN	TF	PC	PR
Oídio da uva (<i>Uncinula necator</i>)	***	***	NA	***	NA	***
Sigatoca negra da banana (<i>Mycosphaerella fijiensis</i>)	***	NA	NA	***	NA	***
Mancha reticular da cevada (<i>Helminthosporium teres</i>)	***	**	NA	***	***	***
Septoriose do trigo (<i>Mycosphaerella graminicola</i>)	***	**	NA	***	***	***
Ferrugem do trigo (<i>Puccinia recondita</i>)	***	*	NA	**	***	***
Queima-das-bainhas do arroz (<i>Rhizoctonia solani</i>)	***	**	***	***	NA	NA
Pinta-preta do tomateiro (<i>Alternaria solani</i>)	***	**	NA	***	NA	***
Míldio da videira (<i>Plasmopara viticola</i>)	***	**	NA	**	NA	***
Chaga Pythium da relva (<i>Pythium aphanidermatum</i>)	***	**	**	**	NA	***

^a* Pouco eficiente; ** eficiência moderada; ***ótima eficiência; NA, não aplicável;

^bAZ: azoxistrobim; MC: metil-cresoxim; MN: metominostrobin; TF: trifloxistrobin; PC: picoxistrobin; PR: piraclostrobim.

2.2 Fungicidas Inibidores da Desmetilação do Esterol

Os inibidores da biossíntese de esteróis (SBIs) constituem o maior e o mais importante grupo de compostos já desenvolvidos para o controle de doenças fúngicas de plantas e animais, exibindo, frequentemente, altíssima potência antifúngica. Eles controlam um amplo espectro de doenças causadas por ascomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos, não tendo atuação sobre fungos como *Pythium* e *Phytophthora*, que não sintetizam esteróis. A grande vantagem desse grupo de fungicidas sistêmicos é a dificuldade dos patógenos sensíveis se tornarem resistentes. Os SBIs incluem compostos químicos estruturalmente muito diversificados, dentre eles os triazóis, imidazóis, pirimidinas, morfolinas, piperazinas, entre outros (figura 2), classificados em quatro classes distintas de acordo com o alvo-enzimático que eles apresentam (tabela 3). Dentre elas, a classe dos inibidores da desmetilação de esteróis (DMIs) é a que tem apresentado maior destaque. Estes compostos foram utilizados pela primeira vez na década de 1970 e os primeiros representantes foram o triforine, triadimefon e o imazalil. Desde então, mais de 30 DMIs foram utilizados na agricultura [FRAC, 2007; RUSSEL, 2005; BRENDT, 1995], sendo os triazóis os mais importantes.

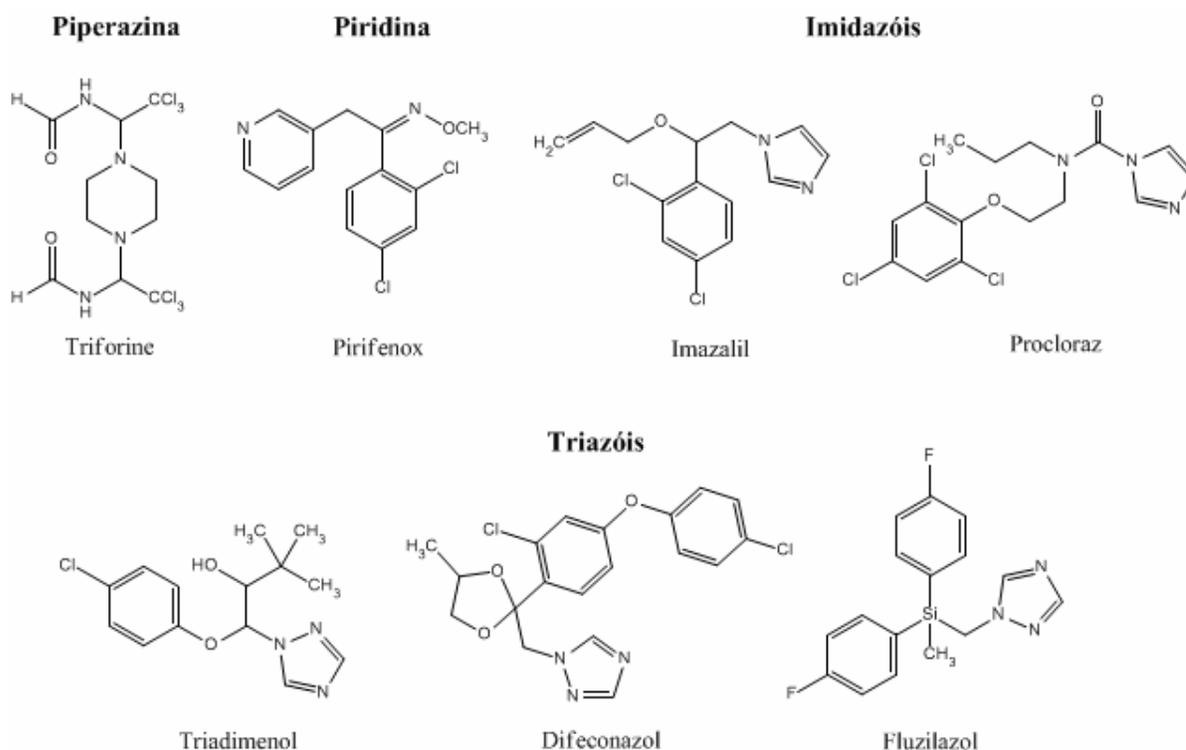


Figura 2. Alguns DMIs utilizados na agricultura.

Tabela 3. Classificação dos SBIs, alvos de inibição e seus compostos bioativos [Adaptado: FRAC, 2007].

Classificação	Enzima Alvo	Grupo Químico	Compostos comercializados
Classe I: DMIs	C14-desmetilase	Piperazinas	Triforine
		Piridinas	Pirifenox
		Pirimidinas	Fenarimol, nuarimol
		Imidazóis	Imazalil, oxpoconazol, pefurazoato, proclorar, triflumizol
		Triazóis	Azaconazol, bitertanol, bromuconazol, ciproconazol, difenoconazol, diniconazol, epoxiconazol, etaconazol, fenbuconazol, fluquinconazol, flusilazol, flutriafol, hexaconazol, imibenconazol, ipconazol, metconazol, miclobutanil, penconazol, propiconazol, protioconazol, simeconazol, tebuconazol, tetraconazol, triadimefon, triadimenol, triticonazol
Classe II: Aminas (“Morfolinas”)	Δ^{14} -redutase e $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -isomerase	Morfolinas	aldimorf dodemorf fenpropimorf tridemorf
		Piperidinas	fenpropidina piperalina
		Espirocetal aminas	espiroxamina
Classe III: Hidroxianilidas	3-ceto reductase	Hidroxianilidas	fenexamida
Classe IV	Esqualeno epoxidase	Tiocarbamato	piributicarbo
		Alilaminas	naftifina terbinafina

Os DMIs atuam interrompendo a atividade de uma enzima do tipo citocromo P450 que participa da desmetilação para biossíntese de esteróis em organismos vivos: a esterol 14 α -desmetilase [WYAND & BROWN, 2005; ALCAZAR-FUOLI *et al*, 2008], também conhecida como CYP51, apesar de que em *Saccharomyces cerevisiae* ela também ser denominada ERG11 [TROCHA *et al*, 1977]. Os genes responsáveis pela codificação da CYP51 são os mais extensamente distribuídos de todos os membros da P450, sendo esta a única família encontrada tanto em eucariotos quanto em procariotos [WATERMAN & LEPESHEVA, 2005].

A CYP51 atua catalisando uma reação limitante que ocorre após a ciclização do esqualeno para formar o lanosterol ou o cicloartenol na biossíntese de esteróis [YOSHIDA *et al.*, 2000] (figura 3). Trata-se de uma remoção oxidativa do grupo 14 α -metil dos intermediários na biossíntese para produzir intermediários insaturados.

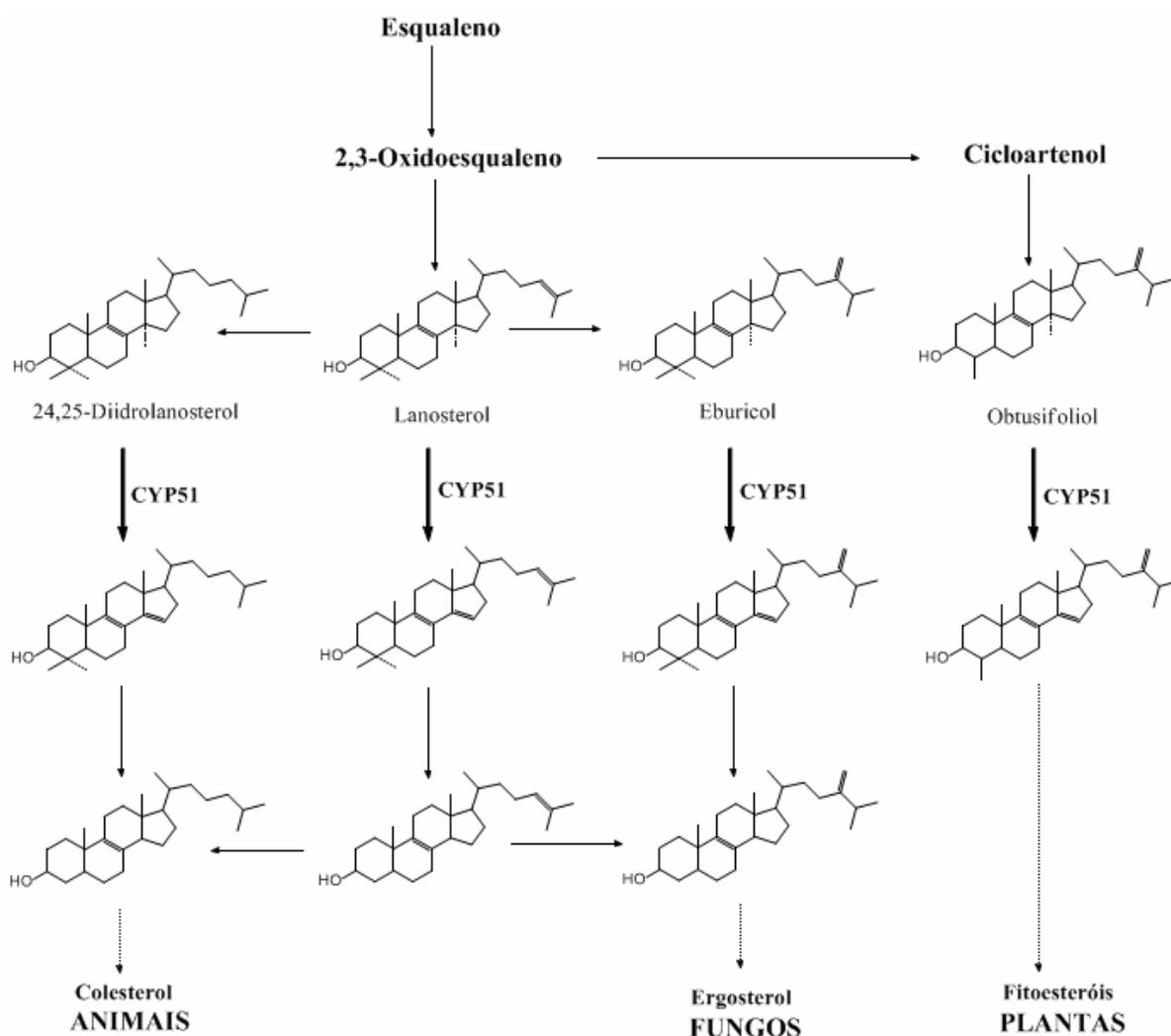


Figura 3. Participação da CYP51 na biossíntese de esteróis de animais, fungos e plantas.

Esta é uma reação que ocorre em três etapas: primeiramente, o grupo 14-metil do substrato é convertido ao 14-hidroxi-metil, depois ao 14-carboxaldeído e, finalmente, ao 14-formil (figura 4), sendo eliminado como ácido fórmico com a concomitante introdução de uma dupla ligação nas posições 14,15 do substrato [SHYADEHI *et al.*, 1996].

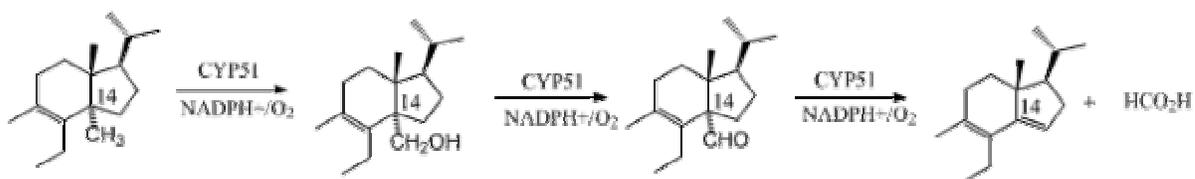


Figura 4. As três etapas da reação de desmetilação no C14 catalisada pela CYP51 [WATERMAN & LEPESHEVA, 2005].

Para que ocorra a desmetilação, o substrato deve se posicionar próximo ao complexo ferro-protoporfirínico IX (heme) presente na CYP51, para que este possa auxiliar as reações redox que irão ocorrer durante a desmetilação [GUENGERICH, 1990; GUENGERICH & MACDONALD, 1991]. Este complexo se encontra ligado à enzima por meio de uma ligação coordenativa entre seu íon de ferro (III) e um resíduo de cisteína (figura 5). No momento em que estas enzimas não estão ligadas a seu substrato, o heme se encontra coordenado com uma molécula de água, com o ferro no estado de oxidação +3. [PODUST *et al.*, 2004; WERCK-REICHHART & FEYEREISEN, 2000].

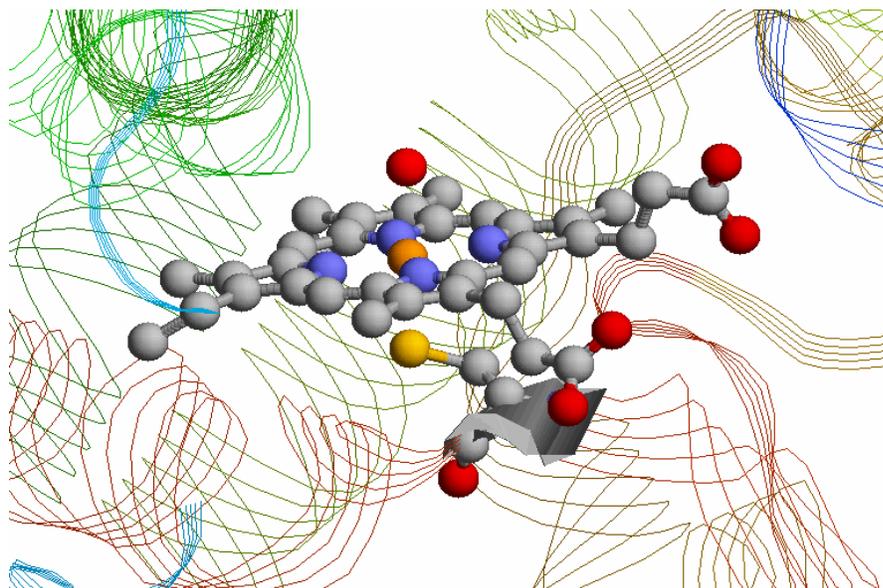


Figura 5. Representação do heme ligado ao sítio ativo da CYP51 de *M. tuberculosis* na ausência de um substrato [PODUST *et al.*, 2004]. As esferas azuis representam os átomos de nitrogênio do heme, que se encontram ligados ao ferro (em laranja). O enxofre do tiolato da cisteína 394 (em amarelo) e uma molécula de água (em vermelho) servem como o quinto e sexto ligantes para o ferro, respectivamente.

A atividade inibitória dos DMIs se deve ao fato de que estes fungicidas apresentam um átomo de nitrogênio heterocíclico capaz de se complexar com o ferro do grupo heme presente na CYP51, impedindo que o substrato se ligue ao sítio ativo da enzima.

Até 2005, eram conhecidas 64 sequências completas da CYP51 e a maioria delas apresentaram atividade desmetilase em apenas quatro substratos: lanosterol, obtusifoliol, eburicol e 24,25-diidrolanosterol [WATERMAN & LEPESHEVA, 2005]. A especificidade da CYP51 por estes substratos é diferente entre os animais, plantas e fungos (figura 3). As CYP51s de plantas apresentam atividade exclusiva em obtusifoliol levando à biossíntese de fitoesteróis. Em animais, a via de esteróis leva ao colesterol, onde o 24,25-diidrolanosterol e o lanosterol são os substratos da CYP51. Em fungos e leveduras, o ergosterol é o produto desta via e os substratos da CYP51 são o eburicol e o lanosterol. Em bactérias, a função da CYP51 ainda é desconhecida na maioria dos casos. O único caso onde a função da CYP51 bacteriana está esclarecida é em *Methylococcus capsulatis* onde múltiplas membranas intracelulares estão presentes e a CYP51 participa na biossíntese de um dos componentes destas membranas, o colesterol [JACKSON *et al.*, 2002].

Em fungos, o ergosterol é o principal esterol da membrana plasmática, sendo responsável pela manutenção da fluidez e da estabilidade da membrana [PARKS & CASEY, 1995]. Quando ocorre a inibição da CYP51, há depleção do ergosterol e o acúmulo do precursor 14 α -metilado, ocasionando mudanças na estrutura da membrana plasmática e tornando-a mais vulnerável a vários danos, além de influenciar a atividade de muitas enzimas de membrana [LUPETTI *et al.*, 2002].

O fato dos DMIs apresentarem um alvo bem definido aliado com o uso intensivo destes fungicidas têm levado ao desenvolvimento de resistência em muitos organismos fitopatogênicos. O primeiro caso registrado foi com *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* em cevada, dois anos após a introdução de triadimefon na Inglaterra, em 1978 [FeSBE]. A partir de então, foi constatado o surgimento de resistência de vários fitopatógenos a estes fungicidas na agricultura [COLLS *et al.*, 2006; CLARK, 2006; PEREZ, *et al.*, 2000; DÈLYE *et al.*, 1997]. Porém, a causa da resistência não parece estar relacionada ao desenvolvimento de mutação no sítio-alvo, uma vez que as únicas espécies de fungos fitopatogênicos que desenvolveram resistência no campo por algum tipo de mutação gênica na CYP51 foram *Uncinula necator* [DÈLYE *et al.*, 1997] e *E. graminis* [DÈLYE *et al.*, 1998], cuja mutação Y136F vem conferindo resistência ao triadimenol, o que sugere que outros mecanismos bioquímicos estão envolvidos na resistência de fungos aos DMIs [GISI *et al.*, 2000].

2.3 A Cultura do Morangueiro e a Mancha-de-Micosferela

O morango é uma fruta apreciada no mundo inteiro pelas qualidades nutritivas e sabor atraente, consumida *in natura*, ou por múltiplas maneiras de processamento industrial [REICHERT, 2003]. Os Estados Unidos é o maior produtor mundial, com cerca de 750 mil toneladas, detendo também a maior produtividade. Países como Espanha, Japão, Polônia e Itália compõem o rol dos maiores produtores mundiais [REICHERT & MADIAL, 2003].

No Brasil, a cultura do morango vem sendo desenvolvida desde o final do século XVIII em jardins e hortas caseiras. A partir de meados do século XIX, a cultura passou a ganhar importância econômica nos Estados de São Paulo e Rio Grande do Sul. A partir dos anos 60, graças aos trabalhos de melhoramento genético surgiram as primeiras cultivares nacionais, adaptadas, produtivas e com frutos de qualidade, dando à atividade um grande impulso [CONTI *et al.*, 2002; SANTOS & MEDEIROS, 2003; RADMANN *et al.*, 2006].

Atualmente, o morango é, entre as pequenas frutas, a que tem maior área cultivada e que está melhor adaptada, encontrando-se em regiões de clima temperado a subtropical. A produção brasileira está estimada em 90 mil toneladas por ano, sendo plantada em uma área aproximada de 3.600 ha. O cultivo está concentrado nos estados de Minas Gerais (41,4%), Rio Grande do Sul (25,6%) e São Paulo (15,4%) [RIGON *et al.*, 2005]. No estado do Rio de Janeiro, a produção de morangos nos anos de 2006-2007 foi estimada em torno de 800 toneladas, representando menos de 1% da produção nacional neste período [MADAIL, 2008]. De acordo com dados da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (Emater), o município de Nova Friburgo é o maior produtor de morangos do estado, responsável por 95% da produção [RJTVGLOBO, 2005]. Normalmente, é plantado em áreas de 0,5 a 1,0 ha, gerando empregos para três pessoas/ha/ano, com faturamento de R\$ 26.000,00 por hectare. Trata-se de uma importante atividade econômica, principalmente em pequenas propriedades rurais que utilizam mão-de-obra familiar [RADMANN *et al.*, 2006; DIAS *et al.*, 2007].

O morangueiro (*Fragaria xananassa* Duch.) é suscetível à várias doenças e a maioria delas é causada por fungos. A mancha-de-micosferela, causada pelo fungo *Mycosphaerella fragariae*, é uma das mais importantes e frequentes doenças foliares do morangueiro nas condições brasileiras de cultivo. A manifestação de sintomas foi observada em 100% dos 23 genótipos de morangueiro inoculados com o patógeno em um teste de suscetibilidade à *M. fragariae*. Nenhuma cultivar de morangueiro apresenta resistência às raças fisiológicas conhecidas deste patógeno [DELHOMEZ *et al.*, 1995; RABELO & BALARDIN, 1997].

Dependendo da suscetibilidade da cultivar e das condições climáticas, este fungo pode causar intensa redução da área fotossintética e sérios prejuízos à qualidade de frutos, com danos na produção da ordem de 10 a 100% [TANAKA *et al.*, 2005].

A doença se expressa inicialmente através de pequenas manchas foliares arredondadas de coloração púrpura escura e com contornos definidos (figura 6). Com o crescimento das lesões formam-se manchas circulares de 3 a 5 mm de diâmetro, centro necrosado, variando do marrom claro ao branco, circundadas por um halo vermelho púrpura. Essas lesões podem coalescer e atingir toda área foliar, culminando com a seca da folha. Os sintomas também podem se manifestar em pecíolos, estolhos, cálices e frutos, porém a sua ocorrência é rara [TANAKA, 2002].



Figura 6. Manchas foliares causadas por *M. fragariae* em morangueiros.

O controle químico constitui-se num importante método de controle da mancha de micosferela. De maneira geral, recomendam-se aplicações de fungicidas protetores como folpet, dodine, mancozeb, fluazinam e oxicloreto de cobre. Os fungicidas cúpricos e os benzimidazóis promovem bom controle da mancha de micosferela, porém os fungicidas cúpricos podem manchar os frutos, causando sua depreciação, enquanto que os benzimidazóis não são efetivos contra algumas raças de *M. fragariae* [TÖFOLI & DOMINGUES].

Fungicidas com atividade específica, como os DMIs triazólicos (tebuconazole, imibenconazole, metconazole e difenoconazole) e piperazínicos (triforine), têm se demonstrado altamente eficazes no controle desta doença [TÖFOLI & DOMINGUES], sendo que, geralmente, estes compostos são aplicados em alternância com fungicidas protetores para que se evitem casos de resistência.

2.4 Interação Enzima-Ligante

Em geral, a ligação de um inibidor com a sua enzima-alvo envolve interações não-covalentes fracas, e conseqüentemente, os efeitos produzidos são reversíveis. Por causa disto, o inibidor se tornará inativo quanto mais rápido a sua concentração no fluido extracelular decrescer. Algumas vezes, entretanto, há formação de uma ligação covalente e o efeito produzido por um inibidor pode persistir e tornar-se irreversível [SILVERMAN, 1992].

Para se propor estruturas de novos inibidores que apresentem maior afinidade com o sítio de sua enzima-alvo é importante ter a compreensão dos tipos de forças de interação que ligarão estes inibidores à enzima. Um grande número de interações intermoleculares estão envolvidas no processo de reconhecimento molecular enzima-ligante. Além da possibilidade de formação de ligações covalentes, as interações típicas entre proteínas e ligantes são: (i) ligações hidrogênio; (ii) forças de dispersão de London; (iii) interações iônicas entre grupamento carregados; (iv) interações hidrofóbicas; (v) interações do tipo cátion- π ; e (vi) interações entre grupamentos aromáticos.

Ligação covalente

As ligações covalentes são de energia elevada, entre 77-88 kcal/mol. Na temperatura usual dos sistemas biológicos (30-40°C), ligações que envolvem uma energia maior que 10 kcal/mol dificilmente são clivadas em processos não enzimáticos. Isso implica que complexos ligante-enzima envolvendo ligações dessa natureza são raramente desfeitos, culminando com uma inibição enzimática irreversível ou inativação do sítio enzimático.

Ligação hidrogênio

A ligação hidrogênio é um tipo de interação dipolo-dipolo formada entre o hidrogênio de um grupo X-H, onde X é um átomo eletronegativo, e um átomo eletronegativo Y contendo um par de elétrons disponível. A ligação hidrogênio só é significativa, em geral, quando ocorre entre moléculas onde X e Y são N, O ou F. X desloca a nuvem eletrônica do hidrogênio fazendo com que ele adquira uma carga parcial positiva, que passa a atrair o par de elétrons disponível em Y. A interação é representada por uma linha pontilhada, X—H---Y, para indicar que a ligação entre X e H é mantida apesar da ligação entre H e Y também ocorrer.

As ligações hidrogênio são as mais importantes interações não-covalentes existentes nos sistemas biológicos, sendo responsáveis pela manutenção das conformações bioativas de macromoléculas nobres como as hélices α e as folhas β de proteínas e interações purinas-pirimidinas dos ácidos nucléicos [BARREIRO & FRAGA, 2001].

Forças de dispersão de London

Ocorrem na aproximação de moléculas polares apresentando dipolos instantâneos e dipolos induzidos. Em geral, essas interações são de fraca energia e ocorrem em função da polarização transitória (dipolo instantâneo) entre as ligações de baixas polaridades ou apolares, como ligações carbono-hidrogênio ou carbono-carbono, respectivamente. Essa polarização se origina do movimento eletrônico que permite concentrações instantâneas de elétrons em uma unidade molecular, que por sua vez induz uma polarização nos elétrons da unidade molecular adjacente (dipolo induzido). A força atrativa resultante entre as unidades é chamada força de dispersão (ou força de dispersão de London). Apesar de envolverem fracas energias de interação, as forças de dispersão são de extrema importância para o processo de reconhecimento molecular do ligante pelo sítio do enzima, uma vez que normalmente se caracterizam por interações múltiplas que, somadas, acarretam contribuições energéticas significativas [SILVERMAN, 1992].

Interações iônicas

Os grupamentos básicos das cadeias laterais da arginina, lisina e, em menor extensão, histidina encontram-se protonados em um pH de 7,4 (pH fisiológico) e, conseqüentemente, produzem sítios catiônicos. Já os aminoácidos com grupamentos ácidos, tais como a cadeia lateral do ácido aspártico e glutâmico, encontram-se desprotonados nesse pH, formando sítios aniônicos [SILVERMAN, 1992].

Nesse meio, os grupamentos dos ligantes e enzimas serão mutuamente atraídos, se houver entre eles cargas opostas. Essa interação iônica pode ser efetiva a distâncias maiores que aquelas requeridas em outros tipos de interação, podendo persistir por mais tempo.

Interações hidrofóbicas

Tal como as forças de dispersão, as interações hidrofóbicas são individualmente fracas e, sendo governadas pelo aumento da entropia das moléculas de água que solvatam as unidades hidrofóbicas. Normalmente, as cadeias hidrofóbicas, presentes tanto no sítio da enzima como no ligante, encontram-se organizadamente solvatadas por camadas de moléculas de água, que são liberadas ao ocorrer a interação entre o sítio e o ligante. Em vista do grande número de subunidades hidrofóbicas presentes nos peptídeos e ligantes, essa interação torna-se importante para o reconhecimento do ligante-enzima.

Interações cátion- π

A interação cátion- π é uma interação não-covalente entre grupamentos ou átomos positivamente carregados e um sistema π [MINOUX & CHIPOT, 1999]. Essa interação,

observada em muitos sistemas biológicos, tais como o sítio de interação da acetilcolinesterase e o da alquilamina desidrogenase [TSUZUKI *et al.*, 2001], parece estar relacionada à presença de um momento de quadrupolo em anéis aromáticos.

Inúmeras investigações experimentais e teóricas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de caracterizar essas interações [FELDER *et al.*, 2001]. Cálculos teóricos de energia de ligação em sistemas cátion-benzeno e cátion-tolueno têm mostrado que, na fase gasosa, o cátion se liga preferencialmente ao composto aromático e não à água. Desta forma, as cadeias laterais dos aminoácidos Trp, Phe e Tyr, no vácuo, podem estabilizar uma carga positiva de forma mais eficiente que a água.

Interações entre sistemas aromáticos

Este tipo de interação é conhecida como interação π - π e ocorre entre grupos aromáticos de ligantes e de alguns aminoácidos. A intensidade desta interação depende da distância e da orientação entre os grupos aromáticos. Quando os grupos estão em uma posição aproximadamente paralela (face-a-face, empilhamento π) ou quando estão perpendiculares entre si (na forma de T, empilhamento T) as intensidades destas interações parecem ser maiores do que em outras orientações [SINNOKROT & SHERRILL, 2003].

2.5 Modelos Quantitativos de Interação

O processo de reconhecimento molecular enzima-ligante é dirigido por uma combinação de efeitos entálpicos e entrópicos [BROOIJMANS & KUNTZ, 2003]. Estes efeitos podem ser estimados através da energia livre de Gibbs da interação enzima-ligante (ΔG_{int}) que, por sua vez, está diretamente relacionada à constante de inibição K_i , a qual pode ser medida experimentalmente,

$$\Delta G_{int} = \Delta H_{int} - T\Delta S_{int} = RT \ln K_i \quad (1)$$

onde ΔH_{int} é a entalpia de interação, T é a temperatura absoluta, ΔS_{int} é a entropia de interação e R é a constante universal dos gases. O sinal positivo na equação (1) se deve ao fato de que a constante medida, K_i , é na realidade a constante de dissociação do complexo enzima-ligante. Esta relação apresenta uma ponte entre o modelo teórico e a resposta biológica. As energias livres de ligação devem ser estimadas se o que se deseja é uma predição quantitativa das

afinidades enzima-ligante, expressas nas medidas experimentais de K_i , como parte do processo de planejamento de ligantes, sejam eles fármacos ou agroquímicos.

A energia livre de interação pode ser obtida através de métodos teóricos, embora a obtenção de estimativas muito precisas de ΔG_{int} envolva um custo computacional muitas vezes proibitivo. Dois métodos, que utilizam simulações de dinâmica molecular utilizando um campo de força molecular clássico, são geralmente utilizados para o cálculo de energia livre: o método de perturbação de energia livre (FEP, *Free Energy Perturbation*) e o método de integração termodinâmica (IT) [VAN GUNSTEREN *et al.*, 1994; KOLLMAN 1993; BROOKS *et al.*, 1988]. Embora estes dois métodos sejam precisos, com erros de aproximadamente 1 kcal/mol, o alto custo computacional envolvido limita esta utilização.

Outra metodologia bastante utilizada para a obtenção de energias livres de interação é a chamada energia de interação linear (LIE, *Linear Interaction Energy*) [HANSSON *et al.*, 1998]. Os cálculos de energia livre com esta metodologia envolvem simulações de dinâmica molecular somente nos estados inicial (ligante em solução) e final (complexo enzima-ligante), podendo reduzir, desta maneira, o custo computacional associado às técnicas FEP e IT. A idéia principal é considerar as contribuições polares em conjunto e não-polares separadamente. A parte polar ou eletrostática pode ser tratada usando aproximação de resposta linear, enquanto que a não-polar é calculada usando uma fórmula empírica calibrada sobre um conjunto de dados experimentais,

$$\Delta G_{int} = \alpha \left(\langle V^{LJ} \rangle_{ligado} - \langle V^{LJ} \rangle_{livre} \right) + \beta \left(\langle V^{el} \rangle_{ligado} - \langle V^{el} \rangle_{livre} \right) \quad (2)$$

onde α é o fator empírico que surge das interações não-polares, β é o correspondente às interações eletrostáticas e $\langle V \rangle$ representa os valores médios da energia de interação entre o ligante e o meio circundante, tanto para o termo eletrostático (*el*) como para o termo de Leonard-Jones (*LJ*). O método LIE tem sido aplicado com sucesso em sistemas complexos, o que o torna um método eficiente e mais rápido para a determinação de energias livres de interação, mas com um custo computacional suficientemente grande para torná-lo praticamente inviável para estudos envolvendo várias dezenas ou centenas de ligantes.

A energia livre de interação de alguns complexos CYP51-inibidor, em água, tem sido calculada de acordo com o método Mecânica Molecular/Superfície Poisson-Boltzmann (MM/PBSA), proposto por Srinivasan e colaboradores [ZAMPIERI *et al.*, 2007; BANFI *et al.*, 2006; SRINIVASAN *et al.*, 1998]. De acordo com este método, o ΔG_{int} é calculado como:

$$\Delta G_{\text{int}} = \Delta E_{MM} + \Delta G_{\text{solv}} - T\Delta S \quad (3)$$

ΔE_{MM} representa a variação da soma das energias de mecânica molecular das moléculas sendo dividida nas contribuições das variações das energias eletrostática (ΔE_{EL}) e van der Waals (ΔE_{VDW}).

$$\Delta E_{MM} = \Delta E_{EL} + \Delta E_{VDW} \quad (4)$$

O termo ΔG_{solv} pode ser subdividido em dois termos de energia:

$$\Delta G_{\text{solv}} = \Delta G_{PB} + \Delta G_{NP} \quad (5)$$

ΔG_{PB} e ΔG_{NP} são as componentes polares e não-polares da variação da energia livre de solvatação, respectivamente.

Uma estratégia que pode ser mais efetiva é a construção de funções empíricas para o cálculo de ΔG_{int} , que são específicas para uma determinada classe de proteínas ou para um determinado alvo molecular específico. Estas funções reproduzem dados experimentais associados à energia livre de ligação, assumindo que ela pode ser decomposta como uma soma de diversos termos de energia independentes [AJAY & MURCKO, 1995], conforme representado na pela equação

$$\ln K_i = \frac{\Delta G_{\text{lig}}}{RT} = \sum c_i \Delta G_i \quad (6)$$

onde ΔG_i representa qualquer termo independente que irá contribuir para a energia livre de ligação do complexo enzima-ligante e c_i são os coeficientes ajustados empiricamente através de um método de regressão múltipla. Apesar das limitações teóricas envolvidas ao se fazer esta aproximação [WILLIAMS & WESTWELL, 1998], este método empírico tem fornecido informações bastante úteis com custo computacional bem menor.

Modelos deste tipo podem conter uma série de fatores entálpicos e entrópicos, que incluem termos que podem ser avaliados separadamente, tais como a entalpia associada a interação do enzima-ligante, dessolvatação do ligante, restrições dos movimentos do ligante após a ligação, incluindo rotações internas, entre outros. Embora muitos termos sejam

necessários para uma descrição completa da energia de interação, um número limitado de termos pode ser suficiente para o caso de conjuntos de moléculas estruturalmente semelhantes. Por exemplo, Oliveira e colaboradores obtiveram a seguinte função empírica de correlação para inibidores da enzima fosfodiesterase 4 (PDE4) [OLIVEIRA *et al.*, 2006],

$$\Delta G_{\text{int}} = 0,012(\Delta G_{\text{solv}} + 44,95)^2 + 0,12\Delta H_{\text{int}} + 1,55N_{\text{RB}} - 42,38 \quad (7)$$

onde ΔG_{solv} está associado ao termo de solvatação do ligante, ΔH_{int} à energia de interação enzima-ligante e N_{RB} ao número de ligações simples do ligante que são “congeladas” no processo de ligação com a enzima; este último termo está associado às perdas entrópicas envolvidas no processo de perda de liberdade conformacional destas ligações causada pela interação enzima-ligante.

Os termos entálpicos envolvidos na interação entre o ligante e a enzima podem ser calculados diretamente por vários métodos. Estes métodos basicamente diferem quanto à natureza do campo de força, ou seja, do conjunto de funções de energia analítica e seus parâmetros numéricos associados. Os campos variam desde totalmente empíricos, como os utilizados pela mecânica molecular, até os puramente teóricos (métodos *ab initio*), passando pelos chamados métodos semi-empíricos [JENSEN, 1999]. Na função empírica representada pela equação 7, o termo ΔH_{int} foi calculado após um processo de otimização utilizando cálculos quânticos semi-empíricos de estrutura eletrônica. Isto é um indicativo da importância de se utilizar campos de forças mais sofisticados, que possam descrever de forma mais acurada as interações intermoleculares enzima-ligante (especialmente do tipo π - π e empilhamento-T entre grupamentos aromáticos, particularmente importantes no sítio ativo específico da PDE4).

Estudos demonstraram que a perda entrópica que ocorre durante a interação enzima-substrato é determinada principalmente pelas restrições impostas à translação e as rotações internas do ligante [SEARLE & WILLIAMS, 1992; SEARLE *et al.*, 1992], o que está de acordo com o ponto de vista qualitativo aceito para o processo. Searle e colaboradores estimaram que, para cada rotação restrita como resultado da interação com a enzima, a perda entrópica ($T\Delta S$ a 300K) está entre -0,38 e -0,86 kcal/mol (-1,59 e -3,60 kJ/mol).

2.6 Determinação da Estrutura da CYP51

O principal método experimental para obter estruturas 3D de proteínas e complexos proteínas-ligantes é a cristalografia de raios-X. Contudo, o uso desta técnica no estudo de proteínas de membrana é complicado, uma vez que estas dificilmente podem ser purificadas e cristalizadas.

Como os outros membros da superfamília P450, formas da CYP51 de eucariotos são ligadas a membranas biológicas, enquanto que as dos procariotos são solúveis. Por esta razão, a maioria das coordenadas de raios-X das P450s disponíveis em bancos de dados são aquelas pertencentes a microorganismos procarióticos. Somente em 2003 foi publicada a primeira estrutura cristalográfica de uma P450 integral de membrana [WILLIAMS *et al.*, 2000]. Entretanto, até hoje nenhuma estrutura cristalográfica de uma CYP51 de membrana foi disponibilizada em bancos de dados de proteínas.

O uso de métodos computacionais comparativos vem sendo bastante explorado na busca de uma solução para resolver o problema da predição da estrutura 3D de enzimas. Com a utilização de informações de estruturas proteicas já existentes, é possível fazer uma previsão de como seriam algumas estruturas desconhecidas.

2.6.1 Modelagem por homologia

Atualmente, a ferramenta mais bem sucedida para a predição de estrutura 3D é a modelagem por homologia, também conhecida como modelagem de proteínas baseada em estruturas conhecidas (*knowledge-based protein modeling*) [BAJORATH *et al.*, 1993; JOHNSON *et al.*, 1994; ROST & SANDER, 1996] ou modelagem comparativa. Esta abordagem baseia-se em algumas conclusões gerais obtidas a partir de observações acumuladas ao longo dos anos sobre a arquitetura de proteínas com estruturas determinadas experimentalmente, dentre elas: [GRANT & RICHARDS, 1995]

- a) Proteínas com sequências de aminoácidos semelhantes geralmente apresentam estruturas tridimensionais semelhantes;
- b) A homologia entre sequências de aminoácidos implica em semelhança estrutural e funcional;
- c) Proteínas de uma mesma família apresentam regiões interiores conservadas (muito semelhantes) e regiões externas (*laços*) variáveis.

A modelagem da estrutura de uma proteína por homologia se baseia na relação evolutiva entre as proteínas alvo e molde. Estruturas moldes em potencial são identificadas ao se buscar por proteínas homólogas em bibliotecas contendo estruturas de proteínas determinadas experimentalmente. De uma série de possíveis candidatos, a estrutura molde é escolhida com base em vários critérios, tais como o nível de similaridade entre a sequência a ser modelada e as sequências molde, a qualidade experimental da estrutura (resolução), a presença de ligantes e cofatores, entre outros. Idealmente, a sequência alvo deveria ser modelada por apenas um único molde de alta qualidade. Porém, em muitos casos as estruturas moldes irão corresponder a somente um ou mais domínios estruturais distintos de uma proteína [BORDOLI *et al.*, 2009].

A modelagem por homologia consiste em quatro etapas principais (figura7): (i) a seleção de estruturas de proteínas determinadas experimentalmente (molde), que apresentem semelhança evolucionária com a proteína que se quer modelar (alvo); (ii) o alinhamento das sequências das proteínas alvo e molde; (iii) construção do modelo; e (iv) avaliação da qualidade do modelo construído [ARNOLD *et al.*, 2008]. Este procedimento pode ser feito iterativamente até ser obtido um modelo satisfatório.

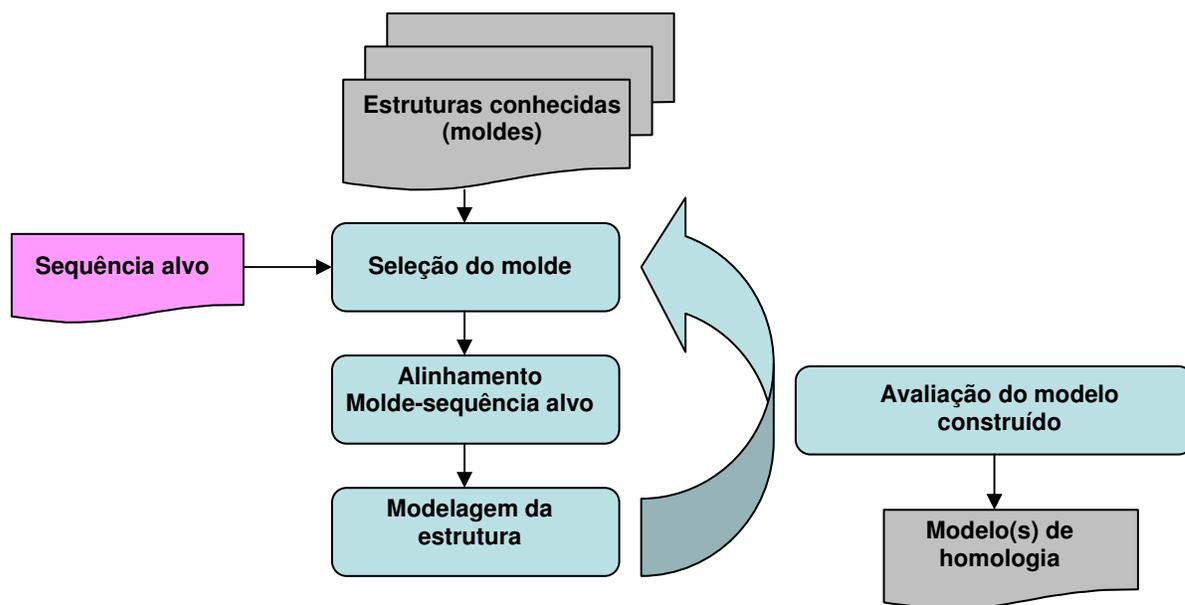


Figura 7. As quatro etapas principais da modelagem por homologia [BORDOLI *et al.*, 2009].

Estimar a exatidão da estrutura de uma proteína modelada é uma etapa crucial em todo o processo, uma vez que ele irá determinar a sua possível aplicação. Como modelos de

homologia resultam de uma extrapolação estrutural guiada pelo alinhamento de sequências, a porcentagem de identidade entre as sequências da proteína a ser modelada e do molde é geralmente admitida como uma primeira avaliação da qualidade do modelo, uma vez que há uma correlação direta entre o nível de identidade das sequências de proteínas e o desvio dos átomos de C α de seu cerne em comum [CHOTHIA & LESK, 1986]. Assim, quando a porcentagem de identidade está abaixo de 30% o modelo obtido não é confiável. Com a diminuição da identidade das sequências, os erros no alinhamento e a modelagem incorreta de grandes fragmentos tornam-se a maior fonte de imprecisão do modelo [ROST, 1999].

A construção de modelos por homologia requer o uso de programas especializados em realizar estas etapas, bem como acesso aos bancos dados de estruturas de proteínas. Dentre os programas desenvolvidos para fazer estas tarefas, tem se destacado os disponíveis pelo servidor *Swiss-Model* [SCHWEDE *et al.*, 2003], que pode ser acessado livremente na rede pelo site <http://swissmodel.expasy.org>. Este servidor facilitou a realização destas tarefas pelo usuário, uma vez que ele foi o primeiro a permitir que elas fossem realizadas de forma automatizada, integrando todas as etapas envolvidas na construção de modelos de proteínas por homologia. No ano de 2002, este servidor efetuou mais de 120.000 pedidos de usuários para modelos 3D de proteínas [SCHWEDE *et al.*, 2003]. Serviços similares têm sido desenvolvidos por outros grupos, tais como ModPipe [ESWAR *et al.*, 2003], 3D-JIGSAW [BATES *et al.*, 2001] e M4T [FERNANDEZ-FUENTES *et al.*, 2007].

2.6.2 Modelagem de proteínas da família citocromo P450

Quando a identidade entre a proteína de estrutura desconhecida e a proteína de estrutura conhecida é baixa, como ocorre entre os membros da família citocromo P450, a construção do modelo se torna uma tarefa difícil e a confiabilidade dos resultados depende criticamente da precisão do alinhamento das sequências [JI *et al.*, 2000].

A identidade da sequência dos aminoácidos das P450 é extremamente baixa, podendo ser menor que 20%, sendo que somente três aminoácidos são absolutamente conservados nestas proteínas. Contudo, a determinação de um crescente número de estruturas cristalográficas tem demonstrado que esta variabilidade não afeta a alta conservação de sua estrutura topográfica [GRAHAM & PETERSON, 1999]. As regiões com a maior conservação estrutural se encontram no cerne da proteína, ao redor do grupo heme. Este cerne é formado por um conjunto de quatro hélices (D, E, I e L), pelas hélices J e K, por dois conjuntos de folhas β , e uma espiral conhecida como *meander*. Estas regiões compreendem (figura 8): primeiro, o laço ligado ao heme, contendo a sequência Phe-X-X-Gly-X-Arg-X-Cys-X-Gly,

localizada na face proximal do heme, pouco antes da hélice L, com uma cisteína que serve como um ligante para o íon ferro do heme absolutamente conservada; segundo, a sequência conservada Gln-X-X-Arg na hélice K, também no lado proximal do heme; e finalmente, a parte central da hélice I, contendo uma outra sequência, considerada como a assinatura da P450: Ala/Gly-Gly-X-Asp/Glu-Thr-Thr/Ser [WERCK-REICHHART & FEYEREISEN, 2000].

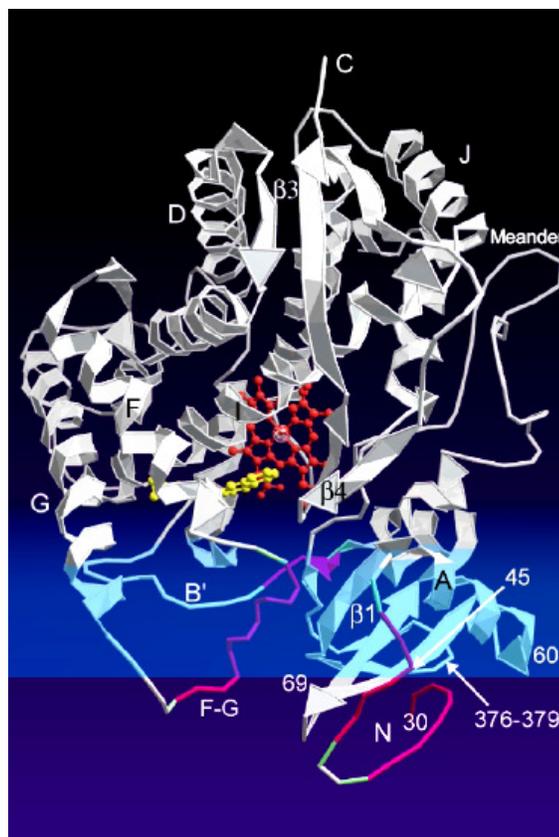


Figura 8. Representação da face distal de uma P450 (CYP2C5). O grupo heme está em laranja e o substrato em amarelo. A hélice I acima do heme está próxima ao sítio de ligação do substrato. O laço de ligação do heme e o conjunto de resíduos conservado Gln-X-X-Arg encontram-se atrás do heme. [REICHHART & FEYEREISEN, 2000]

A primeira estrutura cristalográfica de uma CYP51 solúvel foi obtida recentemente, isolada de *Mycobacterium tuberculosis* [PODUST *et al.*, 2001a]. A partir de então, alguns estudos têm sido realizados para saber se esta estrutura é um bom modelo para formas eucarióticas.

O alinhamento das sequências primárias de um grande número destas enzimas de humanos e de bactérias demonstrou que aproximadamente 35 aminoácidos são conservados [WATERMAN & LEPESHEVA, 2005]. Isto sugere que estes aminoácidos podem representar

o requisito mínimo para a atividade catalítica de uma esteroide 14- α desmetilase e que a CYP51 de *M. tuberculosis* (CYP51MT) é um modelo para formas eucarióticas, porém não em todos os casos [LEPESHEVA *et al.*, 2003].

Gollapudy e colaboradores construíram um modelo da CYP51 de *Aspergillus fumigatus* (CYP51AF) utilizando as coordenadas cristalográficas da cadeia peptídica da CYP51MT como o ponto de partida, sobre a qual as cadeias laterais da CYP51AF foram modeladas, exceto para os resíduos dos laços, que foram extraídos de fragmentos compatíveis de outras enzimas [GOLLAPUDY *et al.*, 2004].

De fato, uma característica de grande importância que faz com que proteínas com seqüências de aminoácidos não muito semelhantes se enquadrem dentro de uma família proteica (como é o caso da CYP51) é que as diferenças mais pronunciadas aparecem geralmente em regiões da superfície da proteína. Já os resíduos localizados no interior das proteínas variam menos frequentemente. Isto significa que geralmente os resíduos constituintes do interior proteico e, conseqüentemente, os elementos de estruturas secundárias correspondentes, permanecem altamente conservados dentro de uma família de proteínas homólogas [SANTOS FILHO, 2000].

O método utilizado por Gollapudy e colaboradores é conhecido como modelagem por substituição quimérica. Neste método, os aminoácidos da estrutura cristalográfica de uma enzima são substituídos pelos aminoácidos da enzima que se pretende modelar sem alterar a estrutura topográfica da enzima, ou seja, os átomos que constituem a cadeia peptídica da enzima modelada terão as mesmas posições relativas que os átomos da cadeia peptídica da enzima molde. Ele pode ser utilizado quando há alta homologia entre a seqüência dos aminoácidos das enzimas envolvidas [ROSSELO *et al.*, 2002] e quando estas pertencem a uma mesma família, cuja conservação da estrutura topográfica é observada.

Apesar de, a princípio, este método não poder ser aplicado na modelagem da CYP51 na sua totalidade, devido à baixa homologia que estas enzimas apresentam entre si, a substituição quimérica pode ser utilizada para construir modelos de algumas regiões conservadas dentro da enzima. Quando o objetivo de se modelar uma enzima é realizar um estudo das interações de seus ligantes com o sítio ativo, apenas algumas alterações na estrutura do sítio se fazem necessárias. Como a região do sítio é a de maior conservação dentro de uma família de proteínas, a modelagem por substituição quimérica pode ser feita apenas nesta região.

Um modelo de CYP51 feito por substituição quimérica na região do sítio ativo foi construído por Rossello e colaboradores para identificar as interações de existentes entre

alguns oxiconazóis sintetizados por seu grupo e a CYP51 de *Candida albicans*, onde apenas 12 aminoácidos foram substituídos nesta enzima [ROSSELLO *et al.*, 2002].

Na modelagem por substituição química, a sequência dos aminoácidos destas enzimas deve ser alinhada utilizando-se algoritmos adequados e a enzima que apresentar maior similaridade na sequência dos aminoácidos é que servirá como molde. Predições das estruturas secundárias podem ser utilizadas para aperfeiçoar o alinhamento destas sequências para que a exatidão do modelo seja aumentada [GOLLAPUDY *et al.*, 2004]. A substituição dos aminoácidos deve ser feita de maneira que a geometria dos resíduos conservados seja preservada, enquanto que os resíduos trocados devem ficar em uma conformação que seja energeticamente favorável.

Uma vez definido o arcabouço geral do modelo desejado, com a substituição dos aminoácidos, parte-se para otimização da geometria do sistema. Interações desfavoráveis entre átomos não ligados por ligações covalentes deverão ser minimizadas por meio de cálculos de mecânica quântica ou dinâmica molecular.

2.7 Métodos de Química Computacional

A Química Computacional é geralmente utilizada quando um método de descrição matemática aplicado à Química é suficientemente bem desenvolvido para que ele possa ser automatizado para a implementação em um computador. Poucos aspectos da Química podem ser computados exatamente, mas quase todos eles têm sido descritos por meio de esquemas computacionais qualitativos ou aproximadamente quantitativos [YOUNG, 2001].

Dado um sistema molecular, ou seja, um conjunto de átomos ligados entre si, podemos realizar sobre ele vários tipos de cálculos, cuja escolha irá depender do tipo de estudo a que estamos nos propondo. Podemos dividi-los em dois grandes grupos genéricos: os métodos clássicos, como a mecânica molecular, e os métodos quanto-mecânicos, como os métodos semi-empíricos e *ab initio*.

2.7.1 Métodos Quanto-mecânicos

A mecânica quântica (MQ) tem como objetivo central a obtenção de soluções da equação de Schrödinger independente do tempo (equação 8), para a determinação precisa de propriedades de sistemas atômicos e moleculares. Na maior parte dos problemas de Química, o que se pretende é calcular os valores possíveis da energia do sistema, E . Teoricamente, a MQ pode prever exatamente qualquer propriedade de um átomo ou molécula individual. Na

prática, as equações da MQ podem ser resolvidas com exatidão para sistemas de apenas um elétron.

$$\left[\frac{-\hbar^2}{2m} \nabla^2 - V(x, y, z) \right] \psi(x, y, z) = E \psi(x, y, z) \quad (8)$$

Nesta equação, ∇^2 é o Laplaciano, \hbar é a constante de Planck dividida por 2π , m é a massa da partícula, $\psi(x,y,z)$ é uma função de onda associada ao movimento da partícula, $V(x,y,z)$ é um operador associado à energia potencial e E é a energia total da partícula. Esta é a equação de Schrödinger nas três dimensões (x,y,z) independente do tempo. A equação independente do tempo é suficiente para resolver os chamados problemas estacionários, que constituem muitos dos problemas de Química [ALCÁCER, 2007]. Todo o termo entre colchetes representa os operadores de energia cinética e potencial e constitui um único operador matemático, chamado hamiltoniano H . Assim temos,

$$H\psi(r) = E\psi(r) \quad (9)$$

em que r representa o conjunto das três coordenadas do espaço.

Uma forma de simplificar a equação de Schrödinger é assumir a imobilidade dos núcleos atômicos. A massa nuclear é varias vezes maior que a massa dos elétrons, fazendo com que os elétrons se ajustem quase que instantaneamente a qualquer mudança de posição nuclear. Esta aproximação é conhecida como aproximação de Born-Oppenheimer, que permite separar a equação de Schrödinger em duas: uma para a parte eletrônica e outra para a nuclear [BORN & OPPENHEIMER, 1927]. A equação eletrônica tem a forma

$$H_{el}\psi_{el}(r) = E_{el}\psi_{el}(r) \quad (10)$$

onde o operador hamiltoniano é

$$H = -\sum_{i=1}^N \frac{\nabla_i^2}{2} - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} \quad (11)$$

Na última equação, Z_A é o número atômico do núcleo A , r_{ij} é a distância entre os elétrons i e j , r_{iA} é a distância entre o núcleo A e o elétron i ; N e M indicam, respectivamente, os números de elétrons e núcleos do sistema. O primeiro termo desta expressão é o termo da energia cinética dos N elétrons, o segundo é o de energia potencial atrativa dos elétrons para os núcleos e o terceiro termo corresponde às interações elétron-elétron. O termo que descreve a energia cinética nuclear é zero e o termo de interação coulombiano entre núcleos é um parâmetro que deve ser adicionado à energia eletrônica E_{el} para produzir a energia total E do sistema.

As soluções da equação de Schrödinger estão sujeitas à restrições importantes. Em primeiro lugar, a função de onda Ψ tem de ser normalizável e, em segundo lugar, tem que ser antissimétrica com respeito à permuta de dois elétrons quaisquer [ALCÁCER, 2007].

A equação de Schrödinger não pode ser resolvida exatamente para sistemas multieletrônicos, mesmo com a aproximação de Born-Oppenheimer [ALCÁCER, 2007]. Uma segunda complicação com espécies multieletrônicas é em relação ao spin. O spin é caracterizado pelo número quântico s , sendo um efeito puramente relativístico. Como a equação de Schrödinger é não relativista, inclusões adicionais que computem tal efeito na forma da função de onda devem ser feitas. A combinação da função de onda espacial do elétron com uma função de spin adequada produz a chamada função spin-orbital.

Método de Hartree-Fock

Diversos métodos têm sido desenvolvidos para a aproximação da solução da equação de Schrödinger para sistemas de muitos elétrons. Dentre estes métodos, o mais popular é o método de Hartree-Fock (HF) [POPLE & NESBET, 1954; ROOHTHAAN, 1951; ROOHTHAAN, 1960]. Além de ser capaz de fornecer uma solução bem aproximada para o problema de muitos elétrons, o método HF tem a vantagem de servir como base para outros métodos: por um lado, os métodos semi-empíricos, onde aproximações adicionais são incluídas com o propósito de reduzir o custo computacional; por outro, métodos onde à solução HF são acrescentadas correções no sentido de aproximar a solução exata.

Se assumirmos que um sistema de N elétrons pode ser descrito como uma soma de N sistemas de um elétron que se move num campo gerado pelos núcleos estacionários e num campo médio resultante da distribuição espacial de todos os outros elétrons, o problema se reduz ao problema de N elétrons independentes. A teoria de HF, nesta aproximação, obriga a construção de funções spin-orbitais χ para cada elétron, que minimizem a energia do estado fundamental do sistema (método variacional) [MORGON & COUTINHO, 2007].

Estas funções spin-orbitais devem fazer parte de uma função determinantal escolhida de forma ótima, uma vez que uma função de onda Ψ_o que descreve um sistema de muitos elétrons deve ser antissimétrica perante a troca de coordenadas de dois destes elétrons e a antissimetria é uma característica dos determinantes. Este determinante é conhecido como determinante de Slater [SLATER, 1929] e é escrito como

$$\psi_o = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \chi_1(x_1) & \chi_2(x_1) & \Lambda & \chi_N(x_1) \\ \chi_1(x_2) & \chi_2(x_2) & \Lambda & \chi_N(x_2) \\ \text{M} & \text{M} & & \text{M} \\ \chi_1(x_N) & \chi_2(x_N) & \Lambda & \chi_N(x_N) \end{vmatrix}$$

onde as funções spin-orbitais moleculares χ_i são funções das coordenadas espaciais e de spin de um único elétron. Admitindo que os χ_i são ortonormais, o fator $1/\sqrt{N!}$ é uma constante de normalização para Ψ_o [MORGON & COUTINHO, 2007]. As dependências com relação às partes espacial e de spin das funções χ_i podem ser separadas escrevendo-se

$$\chi_a(x_1) = \phi_p(r_1)\alpha(1) \quad (12a)$$

ou

$$\chi_a(x_1) = \phi_p(r_1)\beta(1) \quad (12b)$$

onde α e β são funções que representam os dois possíveis estados de spin e os ϕ_i são funções somente das coordenadas espaciais de um elétron, chamadas orbitais moleculares (OM).

A maior diferença entre sistemas multieletrônicos e monoelétrônicos é a presença das interações entre elétrons. O que se deseja é obter uma função de onda de menor energia para um sistema multieletrônico mantendo a formulação spin-orbital individual. O problema é encontrar uma solução que simultaneamente englobe todos os movimentos eletrônicos, bem como o efeito que um elétron de um OM exerce no comportamento de um outro elétron em um outro OM devido a estes movimentos eletrônicos.

A solução para este problema pode ser encontrada na equação de Hartree-Fock.

$$f\chi_a = \varepsilon_a\chi_a \quad (13)$$

Nesta equação, ε_a corresponde a energia orbital e f representa o operador de Fock. Este operador estabelece uma dependência entre a equação de cada orbital com os outros orbitais e também depende das soluções da própria equação, os spin-orbitais moleculares χ_a . Sendo assim, as equações devem ser resolvidas de forma acoplada, através de aproximações sucessivas (solução iterativa). Por isso, diz-se que o método HF é um método autoconsistente, ou seja, no final do processo iterativo cada χ_a que é solução das equações de HF deve ser o mesmo χ_a a partir do qual se obteve o operador de Fock [MORGON & COUTINHO, 2007].

A equação de HF pode ser resolvida numericamente para sistemas atômicos ou moleculares com poucos elétrons, porém para sistemas maiores este tipo de solução não é viável. Uma alternativa proposta por Slater, posteriormente formalizada por Roothaan, é expandir a parte espacial ϕ dos spin-orbitais moleculares em termos de um conjunto de funções de base conhecidas. Isto é feito escrevendo cada orbital molecular ϕ_p como uma combinação linear de um conjunto de funções de base conhecidas [MORGON & COUTINHO, 2007].

$$\phi_p(r) = \sum_{v=1}^k C_{vp} \phi_v(r) \quad (14)$$

Os orbitais ϕ_v são as funções de base e frequentemente correspondem aos orbitais atômicos. No caso da equação 14, existem k funções de base, onde nem todos os orbitais estão ocupados por elétrons. O menor número de funções de base (conjunto de base mínimo) é aquele que acomoda todos os elétrons da molécula. Cálculos acurados devem usar conjuntos de funções de base maiores do que o mínimo. Para um dado conjunto de base e um dado determinante de Slater, o melhor conjunto de coeficientes C_{vp} é aquele para o qual a energia é mínima, ou seja,

$$\frac{\partial E}{\partial C_{vp}} = 0 \quad (15)$$

O objetivo é então determinar o conjunto de coeficientes que resulta na menor energia do sistema.

Quando esta aproximação de combinação linear dos orbitais atômicos (*Linear Combination of Atomic Orbitals*, LCAO) é aplicada na equação de Schrödinger “eletrônica”,

utilizando o método variacional, gera-se um conjunto de equações conhecidas como equações de Hartree-Fock/Roothaan-Hall [MORGON & COUTINHO, 2007], convenientemente escritas como uma equação matricial

$$FC = SCE \quad (16)$$

onde E é a matriz diagonal que representa as energias dos orbitais, S é a matriz de sobreposição (uma forma de representar como cada função de base se sobrepõe na outra), F é a matriz de Fock, que corresponde à aplicação da aproximação orbital da forma de um determinante de Slater ao hamiltoniano da equação de Schrödinger. Nesta última matriz estão incluídas as energias cinética e potencial de cada elétron individual, as interações entre eles e a matriz densidade (somatório dos quadrados dos coeficientes orbitais moleculares nos orbitais moleculares ocupados). A resolução desse conjunto gera a solução das equações de Hartree-Fock para as moléculas, o conhecido método HF.

Métodos semi-empíricos

Os métodos semi-empíricos de estrutura eletrônica moderna surgiram como uma das maneiras encontradas para a redução do tempo computacional gasto, tanto no tratamento de sistemas moleculares contendo uma grande quantidade de átomos quanto na obtenção de propriedades que exigem um maior esforço computacional, tais como: propriedades termodinâmicas, cinéticas, cálculos de superfície de energia potencial, entre outras. Assim, estes métodos foram desenvolvidos com o intuito de serem capazes de tratar problemas químicos, especialmente no que diz respeito a propriedades eletrônicas, e que estão fora, em geral, da capacidade de cálculo se fossem tratados por métodos *ab initio* [MORGON & COUTINHO, 2007].

Em geral, os métodos semi-empíricos limitam-se ao tratamento dos elétrons de valência, não considerando explicitamente os elétrons do cerne, que contribuem muito menos, em geral, para o comportamento das moléculas [ALCÁCER, 2007]. Existe uma grande variedade de métodos semi-empíricos, nos quais se fazem várias aproximações adicionais de modo a reduzir as dificuldades de cálculo e melhorar a precisão.

Estes métodos procuram resolver, de forma autoconsistente, as equações de Hartree-Fock-Roothaan. Para isso, utilizam parâmetros, obtidos por ajuste numérico, ou derivados de resultados experimentais para tornar mais rápida a resolução das equações. Na maioria das vezes, utilizam um conjunto de base mínimo de valência, formado por funções do tipo Slater

(STO – *Slater type orbitals*), e fazem uso da teoria de orbitais moleculares para a construção da função de onda molecular, construindo estes orbitais moleculares a partir do método LCAO [MORGON & COUTINHO, 2007].

Os métodos semi-empíricos paramétricos compreendem uma classe de métodos especialmente adaptados ao cálculo da energia de ligação. Eles se baseiam na escolha de parâmetros empíricos, cuja escolha criteriosa permite compensar, em parte, erros associados à energia de correlação (diferença de energia entre a energia exata – não relativística – de um sistema e a energia de Fock). Apóiam-se nas teorias de Dewar, nas quais a parametrização é feita de modo a dar valores corretos para as entalpias de formação padrão (em fase gasosa). São selecionados conjuntos de átomos que pertencem a conjuntos razoáveis de moléculas, cujas entalpias de formação padrão, geometria molecular e momento dipolar sejam conhecidos experimentalmente. A determinação do melhor conjunto de parâmetros é feita por minimização dos erros nos cálculos de entalpia de formação, geometria e momento dipolar [ALCÁCER, 2007].

Como exemplos de métodos semi-empíricos, têm-se o MNDO (*Modified Neglect of Diatomic Overlap*) [DEWART & THIEL, 1977], AM1 (*Austin Model 1*) [DEWAR *et al.*, 1985], PM3 (*Parametric Method 3*) [STEWART, 1989], o MNDO/d (*Modified Neglect of Diatomic Overlap*, incluindo orbitais d) [THIEL & VOITYYUK, 1992a; THIEL & VOITYYUK, 1992b] e, mas recentemente, os métodos RM1 [ROCHA *et al.*, 2006] e PM6 [STEWART, 2007].

A extensão dos métodos semi-empíricos para metais de transição enfrentou uma série de dificuldades: a escassez de dados de referência; a maioria dos compostos de metais de transição são compostos de camada aberta (em alguns casos de interesse biológico, como pode ocorrer no sistema heme); e é mais difícil resolver as equações do método autoconsistente para metais de transição. Para muitas situações, os métodos para introduzir as aproximações ainda não foram resolvidos satisfatoriamente. Finalmente, estudos preliminares indicam que cálculos *ab initio* de alto nível para metais de transição não são úteis para gerar dados de referência termoquímica, embora sejam úteis para gerar dados de geometrias [MORGON & COUTINHO, 2007].

Dentre os métodos paramétricos que podem ser utilizados para tratar sistemas contendo metais de transição, podemos citar o PM6, desenvolvido recentemente [STEWART, 2007]. Neste método, as entalpias de formação são mais bem representadas e as geometrias apresentam um grande aumento da exatidão, quando comparados com outros métodos paramétricos.

O PM6 introduz muitas modificações no termo de interação NDDO cerne-cerne e no método de otimização paramétrico. Este novo modelo é um pouco melhor que o seu predecessor, RM1. O erro médio entre as entalpias de formação, calculadas por este método, em 1373 moléculas usadas como referência, compreendendo elementos relevantes biologicamente, é apenas de 4,4 kcal/mol. O erro médio equivalente para outros métodos é: RM1, 5,0; B3LYP 6-31G(d), 5,2; PM5, 5,7; PM3, 6,3; HF 6-31G(d), 7,4; e AM1, 10,0 kcal/mol. Estas comparações indicam que o PM6 apresenta melhor desempenho que métodos com maior custo computacional, como o B3LYP [STEWART, 2007]. Além disso, Puzyn e colaboradores aplicaram recentemente os métodos RM1 e PM6 no desenvolvimento de 10 modelos QSPR (correlação quantitativa estrutura-propriedade) e encontraram um desempenho equiparável aos desenvolvidos com o método DFT (funcional B3LYP), utilizando conjuntos de base bem mais sofisticados [PUZYN *et al.*, 2008].

2.7.2 Métodos de Mecânica Molecular

Nos métodos de mecânica molecular, também conhecidos como métodos de campo de força, e energia eletrônica E_e é escrita como função paramétrica das coordenadas nucleares e os parâmetros associados à função são obtidos experimentalmente ou por dados computacionais. Baseiam-se no fato de que as moléculas são compostas de unidades estruturalmente similares e, por esta razão, algumas propriedades podem ser transferidas de uma molécula para a outra, tais como comprimentos de ligação, frequências vibracionais, entalpias de formação, entre outras [JENSEN, 1999].

A energia do campo de força E_{FF} é escrita como a soma de termos, como por exemplo:

$$E_{FF} = E_{est} + E_{ang} + E_{tors} + E_{vdw} + E_{el} + E_{cross} \quad (17)$$

Nesta equação, E_{est} é a função de energia para estiramento de uma ligação entre dois átomos, E_{ang} representa a energia necessária para o dobramento angular, E_{tors} é a energia torsional necessária para a rotação ao redor de uma ligação, E_{vdw} e E_{el} descrevem dois tipos de energias de interação entre átomos não ligados, de van der Waals e eletrostática, respectivamente, e E_{cross} representa acoplamentos entre os três primeiros termos. Assim, dada uma função de energia das coordenadas nucleares, as geometrias e as energias relativas podem ser calculadas. Moléculas estáveis correspondem a um mínimo na superfície de

energia potencial, e eles podem ser localizados pela minimização da E_{FF} em função das coordenadas nucleares [JENSEN, 1999].

Em um campo de força genérico, pode-se descrever a ligação entre dois átomos por um oscilador harmônico simples,

$$E_{est} = \sum_{\text{ligações}} K_R^{(0)} (r - r^{(0)})^2 \quad (18)$$

onde a constante de força $K_R^{(0)}$ e a distância de equilíbrio do oscilador $r^{(0)}$ dependem dos átomos que estão participando da ligação e seus valores são obtidos de um conjunto de moléculas escolhido como padrão. O ângulo θ entre três átomos também pode ser descrito como um oscilador harmônico,

$$E_{ang} = \sum_{\text{ângulos}} K_R^{(0)} (\theta - \theta^{(0)})^2 \quad (19)$$

Os ângulos diedros ω são apropriadamente descritos por séries truncadas de Fourier,

$$E_{tors} = \sum_{n=1} V_n \cos(1 + n\omega) \quad (20)$$

onde n descreve a periodicidade de uma rotação.

A interação eletrostática é dada pela expressão comum de Coulomb

$$E_{el} = \sum_{i < j} \frac{q_i q_j}{\epsilon_0 R_{ij}} \quad (21)$$

onde q_i e q_j são as cargas de cada átomo, R_{ij} a distância entre eles e ϵ_0 é a constante dielétrica. A interação de van der Waals, associada aos impedimentos estéreos, pode ser descrita usando-se potenciais adequados, como o potencial de Lennard-Jones, (equação 22) [HYPERCHEM, 1994].

$$E_{vdw} = \sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}^{(0)}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}^{(0)}}{R_{ij}^6} \right] \quad (22)$$

Um dado campo de força, em associação a um conjunto de parâmetros, define um método específico de mecânica molecular. Muitos métodos estão disponíveis hoje em dia, a maioria deles parametrizados para sistemas orgânicos, fornecendo ótimos resultados qualitativos [ALLINGER, 1977; WEINER *et al.*, 1984; BROOKS *et al.*, 1983; JORGENSEN & TIRADORIVES, 1988]. Os resultados serão tanto melhores quanto mais próxima estiver a estrutura da molécula que está sendo estudada daquelas usadas como padrão.

Um exemplo de campo de força muito difundido é o MM2 [ALLINGER, 1977], desenvolvido com o intuito de descrever pequenos sistemas orgânicos. Um outro exemplo, aplicável principalmente a macromoléculas de interesse biológico, como proteínas e ácidos nucléicos, é o AMBER [WEINER *et al.*, 1984].

A grande vantagem dos métodos de mecânica molecular é que, para sistemas onde bons parâmetros estão disponíveis, é possível ter uma boa predição das geometrias, das energias relativas e barreiras conformacionais de uma grande quantidade de moléculas em um tempo mais curto que os outros métodos computacionais.

2.8 Modelos de Predição da Solubilidade em Água de Moléculas Orgânicas

A solubilidade em água de uma substância é uma propriedade molecular importante que pode afetar profundamente sua atividade biológica. O conhecimento da solubilidade pode ser crucial para o desenvolvimento de substâncias com propriedades de transporte adequadas. A capacidade de se predizer a solubilidade de substâncias auxiliaria grandemente o processo de desenvolvimento de moléculas bioativas. De fato, se a solubilidade pode ser estimada antes de um composto ser sintetizado, a síntese de muitos compostos inadequados pode ser evitada.

Diversos métodos têm sido propostos para a predição da solubilidade. Eles geralmente consistem de uma análise de regressão linear múltipla de vários descritores moleculares. Uma classe de técnicas calcula a solubilidade aquosa utilizando propriedades físico-químicas tais como coeficientes de partição, pontos de ebulição, pontos de fusão, ou volumes molares (derivados da densidade do líquido) [YALKOWSKY, 1993]. Estes métodos requerem uma quantidade suficiente de compostos purificados e resultados experimentais relevantes para serem disponibilizados. Estes métodos não são aplicados a compostos que ainda não foram sintetizados ou isolados e geralmente são utilizados para pequenos grupos de moléculas, o que limita sua aplicação.

Outros métodos são baseados nas propriedades que não podem ser determinadas experimentalmente, mas podem ser calculadas à partir das estruturas moleculares (área de superfície molecular, volume molecular, etc.) [HUIBERS & KATRITZKY, 1998]. A superioridade prática deste método em relação ao primeiro é que ele não requer o conhecimento de qualquer dado experimental do composto cuja solubilidade está sendo predita, pois todas as informações necessárias são calculadas diretamente utilizando os dados da estrutura molecular. Contudo, estas propriedades e a solubilidade em água não estão muito correlacionadas e as equações resultantes sempre requerem a adição de alguns termos de correção.

Métodos de contribuição de grupos são baseados em uma compilação de aspectos estruturais relevantes das moléculas [KLOPMAN, *et al.*, 1998]. Eles se diferenciam do método anterior por estimar a solubilidade a partir de dados obtidos de unidades estruturais da molécula, e não da molécula como um todo. Eles são particularmente adequados, pois, como o método anterior, eles não requerem o conhecimento de qualquer dado experimental dos compostos cuja solubilidade será predita. Em contrapartida eles requerem um grande número de parâmetros. Eles deduzem a solubilidade dos compostos orgânicos pelo cálculo das contribuições das propriedades estruturais relevantes.

Modelos de predição da solubilidade têm empregado a representação de estrutura topológica desenvolvido por Kier e Hall, incluindo conectividade molecular e índices de estado eletrotológico de espécies atômicas (*atom-type E-state*) [ROSE, & HALL, 2002; KIER & HALL, 1999]. Estes descritores estruturais podem ser utilizados isoladamente ou em conjunto com outros descritores, tais como polarizabilidade e cargas atômicas parciais. Para estes conjuntos, a construção de modelos quantitativos de estrutura-propriedade (QSPR) utiliza técnicas de rede neural artificial (ANN) ou por mínimos quadrados parciais (PLS) empregando um algoritmo genético (GA) para a seleção do descritor [CHENG & MERZ JR, 2003; TEKTO *et al.*, 2001].

Vários modelos foram desenvolvidos para serem utilizados como preditores da solubilidade aquosa (expressa como $\log WS$) e encontram-se disponibilizados em servidores e programas [VOTANO, 2004]. Dentre os modelos, temos o programa CSlogWS desenvolvido pela ChemSilico [CHEMSILICO © 2003], que utiliza técnicas de ANN e se baseia em três descritores topológicos: (i) os descritores de *E-state* que codifica a acessibilidade dos elétrons de cada átomo, que é o potencial de interações intermoleculares não covalente, calculados para cada átomo individual e para grupos funcionais em uma molécula; (ii) os índices de

conectividade molecular χ e (iii) os índices formação κ , que representam aspectos globais da forma molecular [CHEMSILICO © 2003].

3 OBJETIVOS

Como parte de um programa que visa o desenvolvimento de novos compostos com aplicação agrícola, incluindo o controle de fungos fitopatogênicos, este trabalho apresentou os seguintes objetivos:

- a) Construir um modelo de sítio ativo de uma CYP51, pertencente a um fungo fitopatogênico, que possa contribuir para os estudos de predição da atividade de compostos com potencial fungicida contra o causador da mancha de micosferela em morangos (*Mycosphaerella fragariae*);
- b) identificar parâmetros teóricos que estejam associados com o processo de inibição enzimática da CYP51 de fungos;
- c) estabelecer uma relação quantitativa entre estes parâmetros com a atividade inibitória de uma série de fungicidas azólicos, com o intuito de se propor um modelo de predição de atividade de outros compostos potencialmente ativos; e
- d) utilizar o modelo proposto para a predição de atividade antifúngica relativa de uma série de novos compostos sintetizados pelo grupo de síntese de organofosforados da UFRRJ.

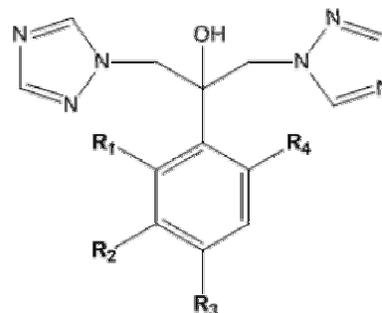
4 METODOLOGIA

4.1 Modelo Empírico Usado na Predição da Atividade Inibitória em CYP51

Dados de IC_{50} estão disponíveis para uma série de inibidores da CYP51 [KLOPMAN E PTCHELINTSEV, 1993]. Esses dados foram usados para a construção de um modelo para a determinação de valores de IC_{50} a partir de dados teóricos, similar às propostas desenvolvidas por Wang e colaboradores no estudo de inibidores de proteína quinase C [WANG *et al.*, 1994] e Oliveira e colaboradores no estudo de inibidores da fosfodiesterase 4 [OLIVEIRA *et al.*, 2006]. Os compostos que foram utilizados para construção do modelo de inibidores da CYP51 estão listados na tabela 4.

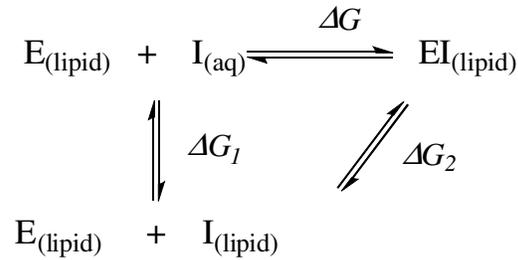
Tabela 4. Compostos utilizados para a construção do modelo de predição da atividade de novos inibidores da CYP51 e suas respectivas atividades experimentais contra *Candida albicans* [KLOPMAN & PTCHELINTSEV, 1993].

Estrutura	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	IC ₅₀ (μmol/L)
E1	CF ₃	H	H	H	103,45
E2	CF ₃	H	F	H	60,05
E3	OCH ₃	H	CF ₃	H	28,50
E4	H	H	CF ₃	H	3,25
E5	F	H	F	H	1,97
E6	CH ₃	H	F	H	100,88
E7	F	H	H	F	107,41
E8	H	H	H	H	103,58
E9	CH ₃	H	H	H	95,29
E10	H	H	SCH ₃	H	90,18
E11	F	H	F	F	35,46
E12	H	H	F	H	26,01
E13	H	F	CF ₃	H	84,19
E14	H	H	OCH ₃	H	268,00
E15	H	H	OCF ₃	H	0,56

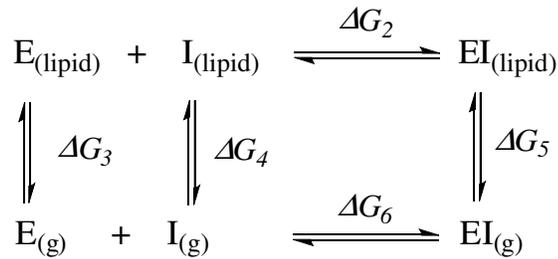


A proteína CYP51 é uma enzima de membrana em fungos [XIAO *et al.*, 2004]. Se ela interage com o inibidor na fase lipídica então o inibidor deve deixar a fase aquosa, dissolver-se na fase lipídica para, a seguir, ligar-se à CYP51. A energia livre envolvida na interação do inibidor com a enzima em fase lipídica é difícil de calcular, mas ela pode ser estimada em fase gasosa. Para se usar os dados em fase gasosa, foram adotados os ciclos termodinâmicos propostos por Wang e colaboradores [WANG *et al.*, 1994], representados pelos esquemas 1 e 2.

Esquema 1



Esquema 2



onde E representa a enzima, I um inibidor, e EI o complexo enzima-inibidor.

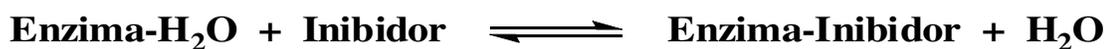
Seguindo as simplificações discutidas por Wang e colaboradores [WANG *et al.*, 1994], se o valor de K_i para o inibidor B é conhecido, o valor de K_i do inibidor A pode ser calculado pela equação:

$$RT \ln K_i^A = \left[\Delta G_1^A + (\Delta H_6^A - T\Delta S_6^A) \right] - \left[\Delta G_1^B + (\Delta H_6^B - T\Delta S_6^B) - RT \ln K_i^B \right] \quad (23)$$

Apesar de valores de K_i não estarem disponíveis, eles podem ser considerados proporcionais aos valores de IC_{50} e, portanto, a equação acima deve se manter válida para os dados de IC_{50} , a menos de um fator multiplicativo.

Os valores do termo ΔG_I correspondem à energia livre associada com o processo de transferência do inibidor da fase aquosa para a fase lipídica, porém estes valores não são calculados diretamente. Assumindo que esta transferência seja um processo passivo, então a eficiência com a qual o inibidor é transferido para a fase lipídica será determinada pela hidrofobicidade do inibidor. A hidrofobicidade é uma função da solubilidade em água (WS) de um composto, que pode ser estimada pelo programa CSlogWS desenvolvido pela ChemSilico, disponível no sítio <<http://www.chemsilico.com>> [ChemSilico © 2003].

Os valores de ΔH_6 correspondem aos valores das entalpias envolvidas para a formação complexo enzima-inibidor, calculadas com base na seguinte reação:



A presença da molécula de água foi usada para se manter o número e o tipo de pares de elétrons de ambos os lados da reação (reação isodêmica), minimizando-se os erros na avaliação da entalpia de reação pelo método semi-empírico. As entalpias de reação entre os inibidores e a CYP51 foram calculadas através da seguinte equação:

$$\Delta H_{\text{int}} = \Delta H_{E-I} + \Delta H_{H_2O} - (\Delta H_{E-H_2O} + \Delta H_I) \quad (24)$$

onde ΔH_{int} é a entalpia envolvida na interação do inibidor com a enzima; ΔH_{E-I} é a entalpia de formação do complexo enzima-inibidor; ΔH_{H_2O} é a entalpia de formação da água; ΔH_{E-H_2O} é a entalpia de formação do complexo enzima-água; e ΔH_I é a entalpia de formação do inibidor. As otimizações das estruturas foram feitas com o programa Mopac2007 [STEWART, 2007], utilizando-se o método semi-empírico PM6, buscando estruturas que fossem otimizadas até a norma de gradiente inferior a 1,0 kcal/(Å ou rad). Todos os cálculos foram feitos em computadores AMD Athlon (TM) XP 2600+ 1,92 GHz com 1GB de RAM.

Assumindo-se uma perda de entropia translacional semelhante para todos os compostos avaliados, que têm estruturas bastante semelhantes, o termo entrópico $T\Delta S_6$ foi considerado como apenas proporcional ao número de ligações rotacionáveis N_{LR} que se tornaram “congeladas” como resultado da interação do inibidor com o sítio ativo. Foram escolhidos 11 compostos da tabela 4 para o desenvolvimento do modelo com uma variação de

IC_{50} de 3 ordens de grandeza, conforme será detalhado nos resultados. Assim, a equação para o cálculo de IC_{50} teria a forma:

$$\ln IC_{50} = c_1 \log WS + c_2 \Delta H_{\text{int}} + c_3 N_{LR} + c_4 \quad (25)$$

na qual os coeficientes c_1 - c_4 podem ser determinados ajustando-se a equação aos valores experimentais do $\ln IC_{50}$ através de uma análise por regressão múltipla; o último coeficiente (c_4) corresponde ao segundo termo entre colchetes da equação (23). Esta equação propõe que haja uma dependência linear entre a atividade e o $\log WS$. Uma dependência quadrática entre estas duas variáveis seria adequada nos casos em que valores intermediários de solubilidade fossem os melhores para a atividade e não valores extremos. Neste caso, a equação para o cálculo do IC_{50} passaria a ter a seguinte forma:

$$\ln IC_{50} = c_1 (\log WS + c_2)^2 + c_3 \Delta H_{\text{int}} + c_4 N_{LR} + c_5 \quad (26)$$

4.2 Obtenção da Estrutura 3D da CYP51MT e Seleção de seu Sítio de Interação

Diversas estruturas cristalográficas de CYP51 de *M. tuberculosis* (CYP51MT) estão disponibilizadas no *Protein Data Bank* (PDB). Foi escolhida a estrutura de código 1EA1 [PODUST *et al.*, 2001a], pois ela se encontra co-cristalizada com o fluconazol, um dos inibidores que será utilizado neste estudo e que mais se assemelha aos inibidores listados na tabela 4. A estrutura da enzima foi obtida no PDB como um arquivo em formato *pdb*, contendo as coordenadas cartesianas para todos os átomos, exceto os hidrogênios.

A seleção do sítio de interação da enzima com o inibidor (fluconazol) foi feita com o programa Rasmol 2.7 [BERNSTEIN *et al.*, 1999]. Os átomos presentes neste sítio foram selecionados dentro de um raio de 4,5 Å ao redor do fluconazol (identificado como *tpf470*), utilizando-se o comando “*select within (4.5, tpf470)*” e gravando-se a seleção no formato *pdb*. Para que as estruturas do heme e todos os resíduos de aminoácidos selecionados estivessem completas, editou-se essa primeira seleção para encontrar seus nomes e numerações. Com essa informação, retornou-se ao programa Rasmol para ser feita a seleção nominal dos constituintes do sítio e do fluconazol (tabela 5). Moléculas de água presentes dentro do raio de seleção e alguns aminoácidos que estavam fora do raio de seleção, mas que

apresentaram algum tipo de interação importante com o heme, também foram considerados. Essa seleção foi gravada em arquivo no formato *pdb*.

Tabela 5. Constituintes do sítio selecionado da CYP51MT, usado nos cálculos.

Gln 72	Leu 100	His 392
Tyr 76	Phe 255	Cys 394
Phe 78	Ala 256	Met 433
Met 79	Gly 257	H ₂ O 88
Phe 83	His 259	H ₂ O 123
Arg 95	Thr 260	H ₂ O 174
Arg 96	Leu 321	H ₂ O 175
Met 99	Arg 326	Hem ^a 460

^aHeme

4.3 Modelagem do Sito Ativo da CYP51 de Fungo Fitopatogênico

Nesta etapa foi modelada a estrutura tridimensional da CYP51 de um fungo fitopatogênico utilizando duas metodologias distintas: uma envolvendo a modelagem por homologia, utilizando o servidor Swiss-Model [SCHWEDE *et al.*, 2003]; e outra envolvendo a substituição quimérica dos resíduos do sítio ativo da CYP51MT.

A busca da sequência primária dos aminoácidos da CYP51 do fungo foi feita no servidor Swiss-Prot, pelo site <http://www.expasy.ch/sprot>, utilizando as palavras-chave “CYP51 *Mycosphaerella*”. A sequência dos aminoácidos da CYP51 do fungo *M. fragariae* ainda não estava disponível. Este fungo será utilizado nos ensaios de atividade biológica dos compostos organofosforados que estão sendo desenvolvidos pelo grupo de síntese de organofosforados da UFRRJ. Por esta razão, foi feita a busca da enzima de um fungo que pertencesse ao mesmo gênero desta espécie. A sequência escolhida tem o código de acesso Q9P471, que corresponde a uma sequência de aminoácidos de uma CYP51 de *Mycosphaerella* não-mutante [GISI *et al.*, 2000]. Esta proteína pertence ao fungo *M. graminicola* (CYP51MG), constituída de 540 aminoácidos e com o peso molecular calculado em 52554 Da.

4.3.1 Modelagem por homologia

A sequência dos aminoácidos correspondentes a CYP51MG, encontrada no Swiss-Prot (código Q9P471), foi enviada ao servidor Swiss-Model, utilizando o “*Swiss-Model workspace*”. Nenhum molde específico foi enviado para a construção do modelo, pois o próprio servidor faz a busca do molde mais adequado para a construção do melhor modelo.

O modelo construído (CYP51MG^H) foi baseado na estrutura cristalográfica da CYP51 de *M. tuberculosis* co-cristalizada com o 4-fenil-imidazol (código de acesso no PDB: 1E9X) [PODUST *et al.*, 2001a], havendo 27% de identidade entre as sequências das duas proteínas.

Como a estrutura modelada é desprovida de ligantes, foi necessário fazer a adição do heme e de um inibidor, a fim de se identificar a região do sítio ativo no modelo. Para isso, as estruturas CYP51MT (contendo o fluconazol) e CYP51MG^H foram abertas no programa Swiss-Pdb Viewer 3.7 [GUEX & PEITSCH, 1997] para sobrepor-las segundo as similaridades das sequências primárias destas enzimas. Desta maneira, o heme e o fluconazol da CYP51MT foram posicionados na região em que eles estariam presentes na CYP51MG^H.

Estas estruturas sobrepostas foram salvas como um único arquivo em formato pbd. Assim, foi possível criar um arquivo contendo as coordenadas cartesianas da CYP51MT, CYP51MG^H, do heme e do fluconazol. Este arquivo foi aberto em um editor de textos para remover as coordenadas da CYP51MT, obtendo-se um modelo de CYP51MG^H contendo o heme e o fluconazol devidamente posicionados em seu sítio ativo.

A seguir, foi feita a seleção do sítio de interação deste modelo. A metodologia utilizada foi idêntica àquela realizada na seleção do sítio da CYP51MT, apresentada no tópico 3.2. Os constituintes selecionados para o sítio de interação estão listados na tabela 6. Moléculas de água foram adicionadas em regiões similares às presentes na CYP51MT.

Tabela 6. Constituintes do sítio selecionado da CYP51MG^H, usado nos cálculos.

Tyr 123	His 310	Phe 519
Phe 131	Ile 377	H ₂ O ^a 88
Glu 146	Ile 380	H ₂ O ^a 123
Gln 147	Arg 382	H ₂ O ^a 175
Met 306	His 476	Hem ^b 460
Ala 307	Cys 478	
Gly 308	Leu 518	

^aÁgua (a numeração foi mantida conforme CYP51MT);

^bHeme

4.3.2 Modelagem por substituição química

O alinhamento das sequências primárias das duas proteínas foi feito no programa NCBI BLASTP 2.2.17 [ALTSCHUL *et al.*, 1997] pela rede de serviços BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), disponível no sítio do Swiss-Prot. Estas sequências apresentam 27% de identidade e 46 % de similaridade entre os aminoácidos, como representado na figura 9.

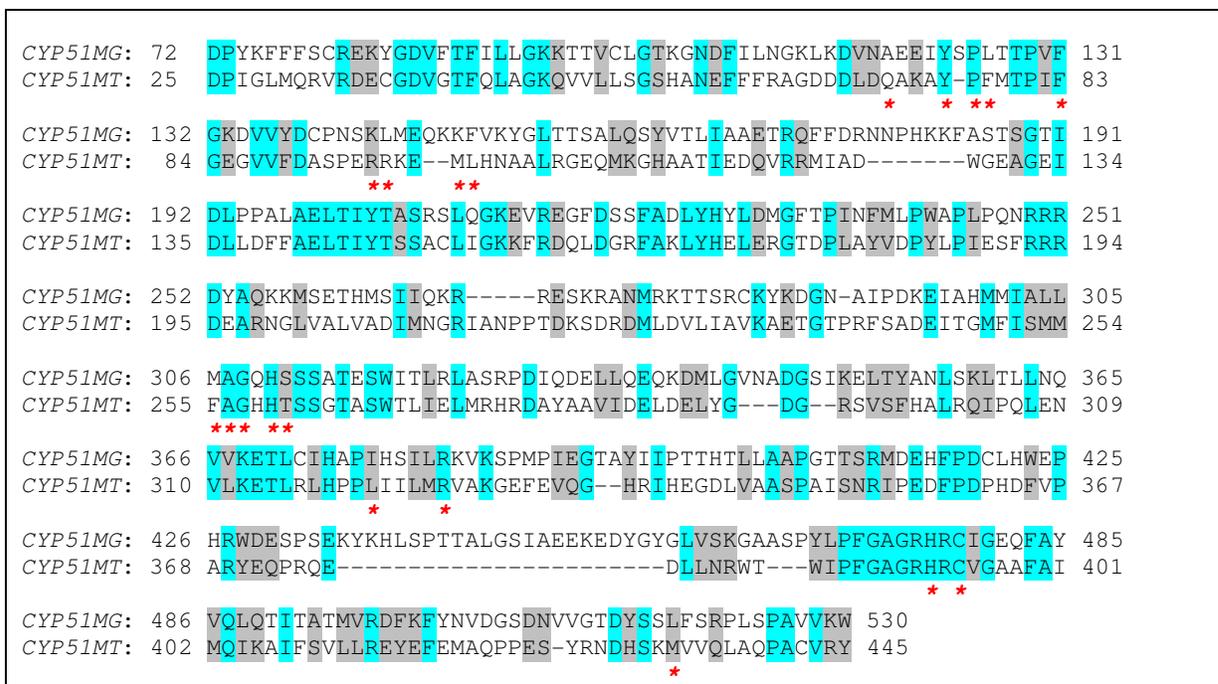


Figura 9. Alinhamento das estruturas primárias da CYP51 de *M. graminicola* (CYP51MG) e *M. tuberculosis* (CYP51MT). Os aminoácidos conservados estão destacados em azul; os que apresentam características semelhantes, em cinza; os asteriscos indicam quais aminoácidos que fazem parte do sítio de interação das duas proteínas, selecionados a partir de 4,5Å do fluconazol, na estrutura CYP51MT.

A substituição dos aminoácidos do sítio ativo da CYP51MT pelos aminoácidos da CYP51MG foi feita no programa Swiss-Pdb Viewer 3.7 [GUEX E PEITSCH, 1997], utilizando-se a ferramenta “mutate”. A escolha da conformação das cadeias laterais dos aminoácidos substituídos foi baseada no “score” fornecido pelo próprio programa. O “score” dá uma pontuação para as possíveis conformações dos aminoácidos dentro da enzima, considerando os efeitos de repulsão de van der Waals e as ligações hidrogênio. Quanto menor o “score” calculado para uma dada conformação de um aminoácido, maior a possibilidade de ser esta a sua conformação dentro da enzima. Neste estágio, não houve modificação na conformação dos aminoácidos que permaneceram conservados entre as duas proteínas.

A seguir, foram feitas as seleções nominais dos aminoácidos, das moléculas de água, do heme e do fluconazol, presentes no sítio ativo da quimera, utilizando o programa Rasmol, tomando como base a nova nomenclatura que os aminoácidos receberam após a mutação (tabela 7).

Tabela 7. Nomenclatura dos aminoácidos presentes no sítio ativo da CYP51MG após a substituição de alguns resíduos da CYP51MT.

CYP51MT	CYP51MG	CYP51MT	CYP51MG	CYP51MT	CYP51MG
Gln 72	Ala 72	Met 99	Lys 99	Leu 321	Ile 321
Tyr 76	Tyr 76	Leu 100	Phe 100	Arg 326	Arg 326
Phe 78	Leu 78	Phe 255	Met 255	His 392	His 392
Met 79	Thr 79	Ala 256	Ala 256	Cys 394	Cys 394
Phe 83	Phe 83	Gly 257	Gly 257	Met 433	Leu 433
Arg 95	Lys 95	His 259	His 259		
Arg 96	Leu 96	Thr 260	Ser 260		

4.4 Otimização dos Sítios CYP51MT e CYP51MG com o Fluconazol

Uma vez definida a estrutura do sítio ativo da CYP51MT e CYP51MG (com o fluconazol) foi feita a otimização de suas geometrias. Uma vez que os arquivos fornecidos pelo PDB contêm apenas as coordenadas cartesianas dos átomos pesados, fez-se necessário inserir os átomos de hidrogênio nestas estruturas e fazer a conversão para coordenadas internas, gerando um arquivo no formato de entrada do Mopac2007. Estas alterações foram feitas pelo programa de conversões de arquivos BABEL [WALTERS & STAHL, 1996], em ambiente DOS. Durante esta alteração, átomos de hidrogênio são inseridos nos átomos (C e N) que tiveram sua ligação peptídica rompida ao serem selecionados para compor o sítio ativo destas enzimas. Isso fez que o número de ligações se mantivesse constantes nestes átomos.

Os resíduos de histidina foram considerados na forma neutra enquanto que os resíduos de arginina foram considerados protonados (forma catiônica), visto que os resíduos Arg95 e Arg326, presentes na CYP51MT, parecem interagir com os carboxilatos do heme por meio de uma interação iônica (figura 10).

Há resíduos de lisina no sítio ativo de CYP51MG; em solução, a lisina estaria normalmente na forma protonada, mas dependendo do microambiente em que o resíduo se localiza no interior da enzima, tanto a forma neutra quanto protonada são possíveis. Na

enzima ácido graxo amida hidrolase, por exemplo, foi demonstrado que um resíduo de lisina do sítio ativo deve estar na forma neutra para iniciar o ciclo catalítico de hidrólise do substrato [MCKINNEY e CRAVATT, 2003]; resíduos de lisina tanto na forma neutra quanto protonada foram identificados por difração de neutrons na enzima D-xilose isomerase [KATZ *et al.*, 2006]. Assim, o resíduo Lys95 foi considerado protonado (com um grupo NH_3^+ -terminal), pois assim também poderia fazer uma interação iônica com um carboxilato do heme, de modo similar ao resíduo Arg95 de CYP51MT, mas o resíduo Lys99 foi avaliado tanto na forma protonada quanto na forma neutra, ou seja, com um grupo NH_2 -terminal. O estado de protonação deste resíduo poderia influenciar bastante os resultados obtidos, visto que esse resíduo faz parte de uma importante região do sítio ativo que vai interagir com o único grupamento dos triazóis que sofrerá modificação estrutural durante os estudos (o grupo fenila). Por esta razão, foram criados dois modelos para a CYP51MG: um modelo com Lys95 protonada e a Lys99 desprotonada, CYP51MG^{SQ1}; e outro com as duas lisinas protonadas, CYP51MG^{SQ2}.

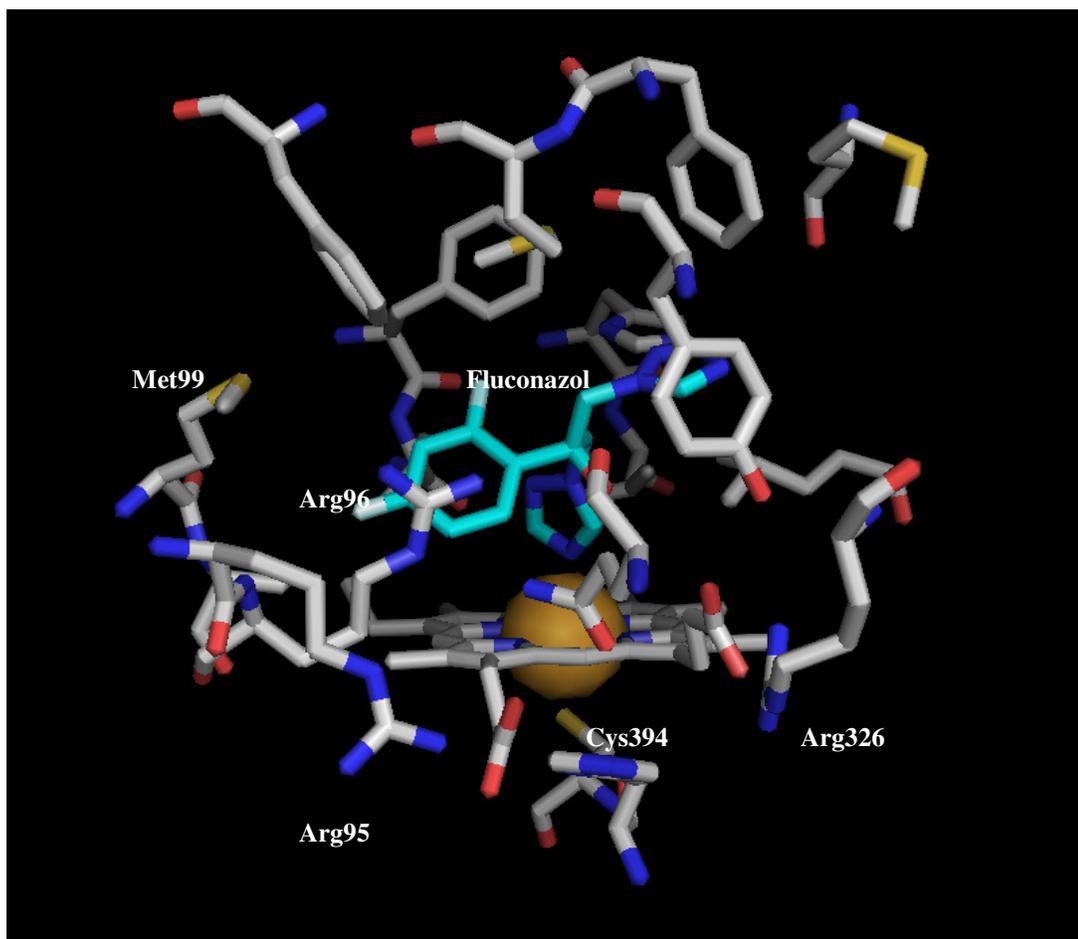


Figura 10. Sítio de ativo da CYP51MT. Moléculas de água e átomos de hidrogênio foram omitidos. As cores representadas para os átomos são: nitrogênio, em azul; oxigênio,

vermelho; carbono, branco; enxofre, amarelo; flúor, azul-claro. O ferro está sendo representado pela esfera amarela. Os carbonos do inibidor (fluconazol) estão em ciano.

Propostas mecanísticas para a oxidação de substratos pela P450 sugerem que a carga do íon ferro do heme antes da ligação dos substratos é de +2 [GUENGERICH, 1991; WERCK-REICHHART & FEYEREISEN, 2000]. Como o resíduo Cys394, que atua como o quinto ligante para o ferro, foi considerado desprotonado (forma aniônica) e o anel protoporfirínico do heme apresenta dois substituintes carboxilato em sua estrutura (Figura 9), a carga eletrônica total atribuída às estruturas CYP51MT, CYP51MG^{SQ1} e CYP51MG^{SQ2} foi de +2, +1 e +2, respectivamente.

A definição do estado de *spin* do átomo de ferro foi baseada na geometria da estrutura cristalográfica do heme da CYP51MT. Mudanças estruturais verificadas por métodos de difração de raios-X demonstram que complexos heme penta-coordenado de Fe (II) sempre apresentam configuração de alto spin ($t_{2g}^4 e_g^2$). Neste caso, o diâmetro do íon Fe (II) é maior que o orifício central do anel porfirínico e, conseqüentemente, o Fe (II) encontra-se fora do plano do anel. Quando o Fe (II) completa a hexa-coordenação e o complexo passa para a configuração de baixo-spin (t_{2g}^6), o íon Fe (II) reduz seu volume, movendo-se para dentro do plano do anel [SHRIVER *et al.*, 1994]. Baseado nestas informações e analisando a geometria do heme na CYP51MT (figura 10), os cálculos de otimização das geometria da CYP51 foram feitos considerando-se o Fe (II) no estado de baixo-spin (neste caso, sem elétrons desemparelhados).

Os átomos que compõe a ligação peptídica dos aminoácidos foram fixados no espaço. Os átomos das cadeias laterais, de cada inibidor, das moléculas de água e todos os hidrogênios foram mantidos livres durante a otimização. Os quatro átomos de carbono do heme responsáveis por unir um anel pirrólico a outro também tiveram suas coordenadas fixadas com o intuito de se evitar um possível deslocamento do heme (figura 11).

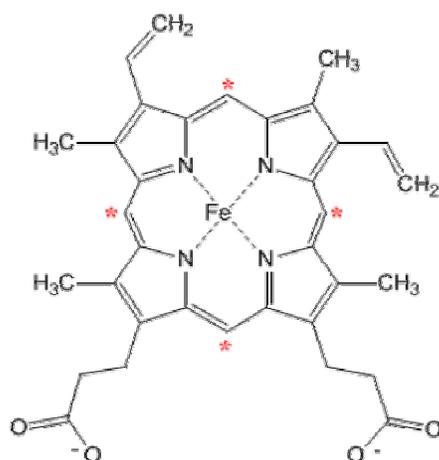


Figura 11. Representação da estrutura do heme presente na CYP51. Os asteriscos indicam quais carbonos tiveram suas posições “congeladas”.

Estas estruturas foram otimizadas com o programa Mopac2007, utilizando-se as palavras-chave: “PM6 GRAD NOINTER NOLOG EF MMOK T=3D CHARGE= n GNORM=1”, onde n corresponde à carga resultante das estruturas.

4.5 Substituição dos Inibidores no Sítio Ativo da CYP51

Nesta etapa do estudo, foram utilizados inibidores estruturalmente semelhantes àquele contido na CYP51MT, o fluconazol (tabela 4) [KLOPMAN E PTCHELINTSEV, 1993]. A substituição foi feita diretamente pela alteração dos substituintes da fenila do composto triazólico original, mantendo-se a conformação do restante da estrutura. Esta alteração foi feita no programa Spartan '08 (Wavefunction Inc.), utilizando-se as coordenadas cartesianas dos modelos da CYP51MT e CYP51MG.

Inicialmente, apenas os cinco primeiros compostos triazólicos da tabela 4 foram modelados nos sítios da CYP51MT, CYP51MG^H, CYP51MG^{SQ1} e CYP51MG^{SQ2}. Após a otimização da geometria destes modelos, foi escolhido um dos três modelos da CYP51MG para dar prosseguimento com a modelagem utilizando os demais compostos triazólicos da tabela 4.

Para estes inibidores, os dados de IC_{50} que estão disponíveis foram determinados em *C. albicans*. Para que estes dados possam também ser aplicados nas espécies que estão sendo estudadas neste trabalho, os inibidores deverão interagir de forma similar com o sítio ativo

destas espécies, ou seja, as diferenças entre sítios das espécies *C. albicans*, *M. tuberculosis* e *M. graminicola* não devem ser muito grandes.

O alinhamento das sequências dos aminoácidos destas espécies, feito no programa NCBI BLASTP 2.2.17 [ALTSCHUL *et al.*, 1997], demonstrou que estas diferenças não são muito grandes, principalmente entre *C. albicans* e *M. graminicola* (figura 12). Ao se fazer a comparação dos aminoácidos pertencentes ao sítio ativo das espécies *M. tuberculosis* e *M. graminicola* (baseado na seleção feita para a construção do modelo de sítio da CYP51MT, tópico 4.2) com a espécie *C. albicans*, os valores de identidade encontrados foram em torno de 58 e 63 %, respectivamente, sendo que, ao se considerar os aminoácidos com características estruturais semelhantes entre *M. graminicola* e *C. albicans*, este valor sobe para aproximadamente 84 %.

CYP51CA: 66	QPYEFFESCRRQKYGDVFSFMLLGKIMTVYLGPKGHEFVFNAKLSDVSAEDAYKHLTTPVF	125
CYP51MG: 72	DPYKFFFSCREKYGDVFTFILLGKKTIVCLGTKGNDFILNGKLDVNAEEIYSPLTTPVF	131
CYP51MT: 25	DIIGLMQRVRDECGDVGTFQLAGKQVLLSGSHANEFFFRAGDDLLDQAKAY-PFMTPIF	83
		* * * *
CYP51CA: 126	GKGVYIDCPNSRLMEQKFAKFAITDTSFKRYVPKIREEILNYFVTDESFKLKEKTHGVA	185
CYP51MG: 132	GKDVVYDCPNKLMQKFKVYGLTTSALQSYVTLIAAETRQFFDRNNPHKKFASTSGTI	191
CYP51MT: 84	GEVVFDASPERRKE--MLHNAALRGEQMKGHAATIEDQVRRMIAD-----WGEAGEI	134
		* * * *
CYP51CA: 186	NVMKTQPEITIFTASRSLFGDEMRRIFDRSFAQLYSDDLKGFTPINFVFNLPPLPHYWRR	245
CYP51MG: 192	DLPPALAEITTYTASRSLQKKEVREGFDSSFADLYHYLDMGFTPIINFMLPWAPLPQNR	251
CYP51MT: 135	DLDDFFAELTIYTSSACLIGKKFRDQLDGRFAKLYHELERGTDPLAYVDFYLPFIESFR	194
CYP51CA: 246	DAAQKISATYMKETKSRRERGDIDPNRDLIDSLTIHSTYKDGVMKTDQEIANLLTIGIL	304
CYP51MG: 252	DYAQKKMSETHMSIIQKRRE-----SKRANMRKTTSRCKYKDGNAIPDKEIAHMMIAL	305
CYP51MT: 195	DEARGLVALVADIMNGRIANPPTDKSDRDMLDVLIAVKAETGTPRFSADEITGMFISMM	254
CYP51CA: 305	MGGQHTSASTSAWFLHLGKPHLQDVTYQEVVELL-KEKGGDLNDLTYEDLQKLPVNN	363
CYP51MG: 306	MAGQHSSTATESWITLRLASRPDIQDELLQEQKMDLGVNADGSIKELTYANLSKLTLLNQ	365
CYP51MT: 255	FAGHTSSGTASWTLIELMRHRDAYAAVIDELDELYG---DG--RSVSFHALRQIPQLEN	309
		* * * *
CYP51CA: 364	TIKETLRMHMPLHSIFRKVTNPLRIPETNYIVPKGHYVIVSPGYAHTSERYFDNPEDFDF	423
CYP51MG: 366	VVKETLCIHAPIHSILRKVKSPMPIEGTAYIIPTHHTLLAAPGTTSRMDEHFPDCLHWEP	425
CYP51MT: 310	VLKETLRLHPPLIILMRVAKGEFEVQG--HRIHEGDLVAASPAISNRIPEDFPDPHDFVF	367
		* *
CYP51CA: 424	TRWDTAAK-----ANSVSFNSSDEVYDYGFGKVSQVSSPYLPFGGRHRCIGEQFAY	476
CYP51MG: 426	HRWDESPSEKYKHLSPPTALGSIAEKEDYGYGLVSKGAASPYLPFGAGRHRRCIGEQFAY	485
CYP51MT: 368	ARYEQPRQE-----DILLNRWT---WIPFGAGRHRRCVGAAFAT	401
		* *
CYP51CA: 477	VQLGTLITTFVYNLR-WTIDGY-KVPDPDYSSMVVLPTEPAEIIW	520
CYP51MG: 486	VQLQITITATMVRDFKFNVDGSDNVVGTDYSSLFSRPLSPAVVVKW	530
CYP51MT: 402	MQIKALFVLLREYEFEMAQPPES-YRNDHSMVQVLAQPAFCVRY	445
		*

Figura 12. Alinhamento das estruturas primárias da CYP51 de *C. albicans* (CYP51CA), *M. graminicola* (CYP51MG) e *M. tuberculosis* (CYP51MT). Os aminoácidos conservados estão destacados em azul; os que apresentam características semelhantes, em cinza; os asteriscos indicam os aminoácidos que fazem parte do sítio de interação das duas proteínas, selecionados a partir de 4,5 Å do fluconazol na estrutura CYP51MT.

Os compostos que estão sendo preparados pelo grupo de síntese de organofosforados da UFRRJ para avaliar o seu potencial fungicida [BARBOZA, 2009] foram modelados na CYP51MG. Estes compostos são estruturalmente diferentes do fluconazol (figura 13) e, por esta razão, foi necessário usar um procedimento para determinar com quais aminoácidos essas estruturas irão interagir mais provavelmente.



Série A

E16: R = *etil*;
E17: R = *isobutil*;
E18: R = *isopropil*;
E19: R = *n-propil*.

Série B

E20: X = O; R = *n-propil*;
E21: X = O; R = *isopropil*;
E22: X = O; R = *n-butil*;
E23: X = O; R = *isobutil*;

Série C

E24: X = S; R = *n-propil*;
E25: X = S; R = *isopropil*;
E26: X = S; R = *n-butil*;
E27: X = S; R = *isobutil*;

Figura 13. Estruturas propostas para avaliação de potencial fungicida, testadas no modelo de CYP51MG [BARBOZA, 2009].

Para isso, removeu-se primeiramente o inibidor que estava presente no modelo CYP51MG. A seguir, desenhou-se no sítio ativo o fragmento das estruturas que compreende os átomos pertencentes ao anel heterocíclico até o nitrogênio ligado ao fósforo, ligando-se o heteroátomo da anel com o ferro do heme. Posteriormente, este modelo foi submetido à otimização da sua geometria utilizando o método de mecânica molecular MMFF, fixando-se todos os átomos pertencentes ao sítio ativo da CYP51MG, de maneira que apenas os átomos do ligante sofressem alterações na sua geometria. Após a otimização da geometria foi desenhado o restante da estrutura, seguindo-se uma reotimização.

O objetivo de se otimizar a geometria destas estruturas desenhando-as em partes é permitir que o programa busque uma posição mais favorável para a interação de cada fragmento da molécula do inibidor no interior do sítio ativo. Todas estas operações e cálculos foram feitos no programa Spartan '08 [WAVEFUNCTION, Inc.]. Os modelos assim obtidos tiveram a sua geometria otimizada no Mopac2007, utilizando o método semi-empírico PM6, com o mesmo procedimento descrito anteriormente.

4.6 Modelagem dos Inibidores

A geometria inicial utilizada para a modelagem dos inibidores foi a mesma obtida após a otimização dos complexos enzima-inibidor. O inibidor foi isolado utilizando o programa Spartan '08 e submetido a otimização de sua geometria pelo programa Mopac2007, utilizando-se o método PM6. As estruturas foram otimizadas até a norma de gradiente inferior a 1 kcal/(Å ou rad).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo Semi-empírico no Modelo do Sítio de Ativo da CYP51MT

O modelo do sítio ativo da CYP51 de *M. tuberculosis*, obtido à partir de seus dados cristalográficos [PODUST *et al.*, 2001a], foi utilizado neste trabalho para avaliar a possibilidade do uso do método do orbital molecular semi-empírico PM6, um método recente e ainda pouco estudado. A geometria de compostos contendo elementos do grupo VIII B (onde o ferro está inserido) foi reproduzida razoavelmente utilizando o método PM6, incluindo a geometria de certo tipo de heme (complexo ferro-porfirina) [STEWART, 2007], onde o ferro se encontra tetracoordenado com o anel porfirínico. Porém, como no complexo cisteína-heme-inibidor o átomo de ferro apresenta-se hexacoordenado, a geometria deste complexo poderia ser mal reproduzida após a otimização.

Após a otimização da estrutura CYP51MT, com o fluconazol (E5) como ligante, foi observado que a geometria do heme não sofreu grandes alterações quando comparada com a geometria de sua estrutura cristalográfica (figura 14). As maiores diferenças são observadas nas distâncias entre o átomo de ferro e o nitrogênio do anel triazólico e o enxofre de Cys394, indicando que essas interações podem estar sendo superestimadas pelo método.

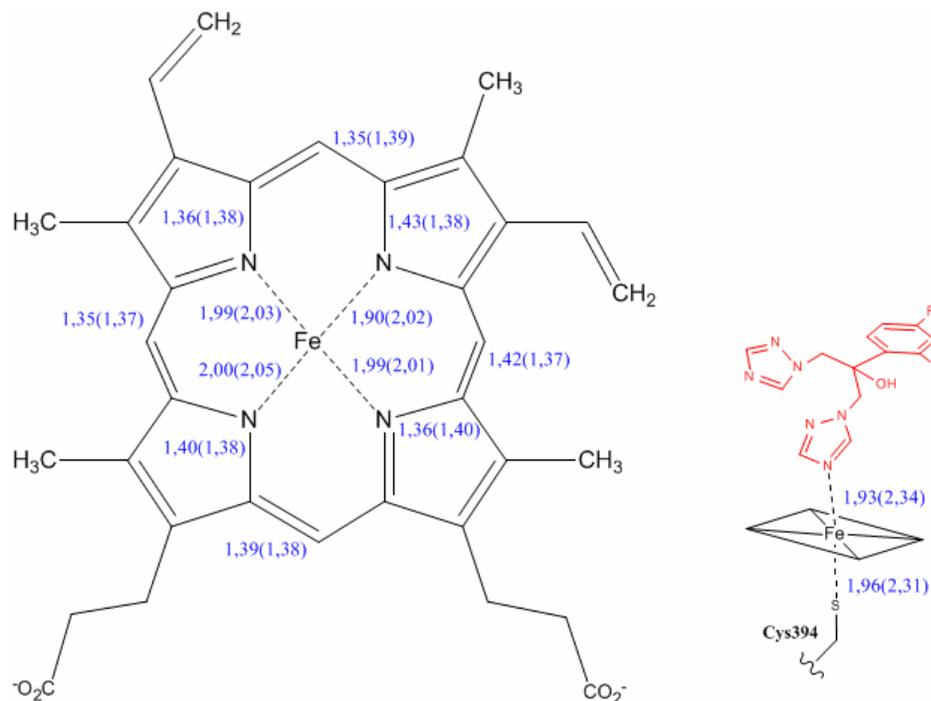


Figura 14. Comparação entre as distâncias, em Å, de algumas ligações do heme da CYP51MT após otimização com o método PM6 e as distâncias de referência (entre parênteses) obtidas à partir de dados cristalográficos.

Como um segundo teste do método PM6, o modelo do sítio ativo da CYP51MT foi utilizado para avaliar se os valores das entalpias calculadas para a interação CYP51MT-inibidor poderiam ter alguma correlação com os valores de atividade inibitória (IC_{50}) sobre uma CYP51, encontrados na literatura [KLOPMAN & PTCHELINTSEV, 1993]. Como neste trabalho o que se pretende é realizar estudos em um modelo de CYP51 de um fungo fitopatogênico, este teste foi feito utilizando-se apenas um grupo de 5 inibidores, mas com boa variação de atividade. Os inibidores utilizados nesta etapa correspondem aos triazóis E1, E2, E3, E4 e E5, listados na tabela 4. Os cálculos de entalpia de interação destes inibidores foram feitos baseados na equação 24 e estão listados na tabela 8.

Tabela 8. Entalpias de interação calculadas na formação do complexo CYP51MT-inibidor (ΔH^{PM6} , kcal/mol) e a atividade inibitória experimental ($\mu\text{mol/L}$).

Estrutura	ΔH^{PM6}	IC_{50}^a
E1	4,60	103,45
E2	-1,66	60,05
E3	-6,88	28,50
E4	-8,68	3,25
E5	-10,44	1,97

^a atividade determinada em *Candida albicans* [KLOPMAN & PTCHELINTSEV, 1993].

Comparando os valores de entalpia de interação dos complexos calculados após as otimizações com os valores de IC_{50} (tabela 8), podemos observar que a entalpia tornou-se mais favorável à medida que a atividade inibitória da CYP51MT pelos triazóis modelados foi se tornando maior. De fato, há uma excelente correlação linear entre os dados experimentais e teóricos ($R= 0,995$; $SD=5,63$).

Apesar de que a energia envolvida na interação entre enzimas e ligantes ser uma combinação de termos entálpicos e entrópicos, nesta etapa apenas a entalpia de interação foi suficiente para estabelecer uma ótima correlação com os valores experimentais. Isso pode estar relacionado com o fato dos inibidores triazólicos utilizados serem estruturalmente semelhantes, fazendo com que as perdas entrópicas decorrentes das restrições impostas

durante a ligação entre a CYP51MT e os inibidores não apresentem grandes diferenças entre um inibidor e outro.

Embora o conjunto de dados usado neste teste seja limitado, a excelente correlação encontrada entre a entalpia de interação teórica e os valores de IC₅₀ experimentais é um indicativo de que o método do orbital molecular semi-empírico PM6 é uma ferramenta adequada para a modelagem da interação de inibidores azólicos com o grupo heme da CYP51.

5.2 Construção do Modelo do Sítio Ativo de CYP51MG

Os modelos do sítio ativo de CYP51MG foram construídos utilizando duas metodologias distintas. Na primeira delas foi modelada uma estrutura por homologia, pelo servidor Swiss-Model, dando origem ao modelo CYP51MG^H. O molde utilizado corresponde à CYP51 de *M. tuberculosis* co-cristalizada com 4-fenil-imidazol (1E9X) [PODUST *et al.*, 2001a].

Geralmente, as P450s de uma mesma família apresentam um pouco mais que 40% de identidade na sequência de seus aminoácidos [NELSON, 1999]. Essa identidade poderia permitir a construção de um modelo com uma qualidade aceitável [ROST, 1999]. Porém, a qualidade dos modelos obtidos por homologia depende também da distância evolucionária entre as proteínas alvo e molde, ou seja, elas devem pertencer a uma mesma família e apresentar semelhança funcional [BORDOLI *et al.*, 2009; GRANT & RICHARDS, 1995].

Contudo, na família CYP51, os níveis de identidade entre os aminoácidos podem cair para valores bem inferiores à 40%, podendo ser menores que 22% [WATERMAN & LEPESHEVA, 2005], o que compromete a qualidade dos modelos criados por homologia. O modelo construído por homologia pelo Swiss-Model apresentou 27% de identidade entre seus aminoácidos. Desta forma, este modelo pode não ser uma boa representação da estrutura 3D desta proteína.

A segunda metodologia para a construção do modelo do sítio de interação da CYP51MG compreendeu a construção do modelo por substituição quimérica. A construção de um modelo de CYP51 de *C. albicans* por esta metodologia já foi realizada uma vez por Rossello e colaboradores para identificar as interações existentes entre o sítio ativo desta enzima e alguns oxiconazóis [ROSSELLO *et al.*, 2002].

A estrutura topográfica do modelo criado por substituição quimérica (CYP51MG^{SQ}) é idêntica à estrutura topográfica da enzima molde (CYP51MT). Isso pode ser uma fonte de aumento da inexatidão do modelo, uma vez que desvios topográficos são provocados

quando há diferenças entre as sequências das proteínas alvo e molde [CHOTHIA & LESK, 1986].

A sobreposição dos modelos criados por homologia e por substituição química demonstrou haver diferenças médias a altas entre estes modelos (figura 15). A diferença que parece chamar mais a atenção é a presença do resíduo Glu146 no modelo criado por homologia, uma vez que este aminoácido se encontra muito próximo ao grupo fenila dos inibidores triazólicos, onde irão ocorrer as modificações estruturais destes inibidores. No modelo feito por substituição química, não há aminoácidos aniônicos nesta posição; há dois resíduos de lisina, um pouco mais distantes (Lys95 e Lys 99). No sítio da CYP51MT, o resíduo Arg95 ocupa essa região, fazendo uma interação do tipo cátion- π com o grupo fenila (figura 10).

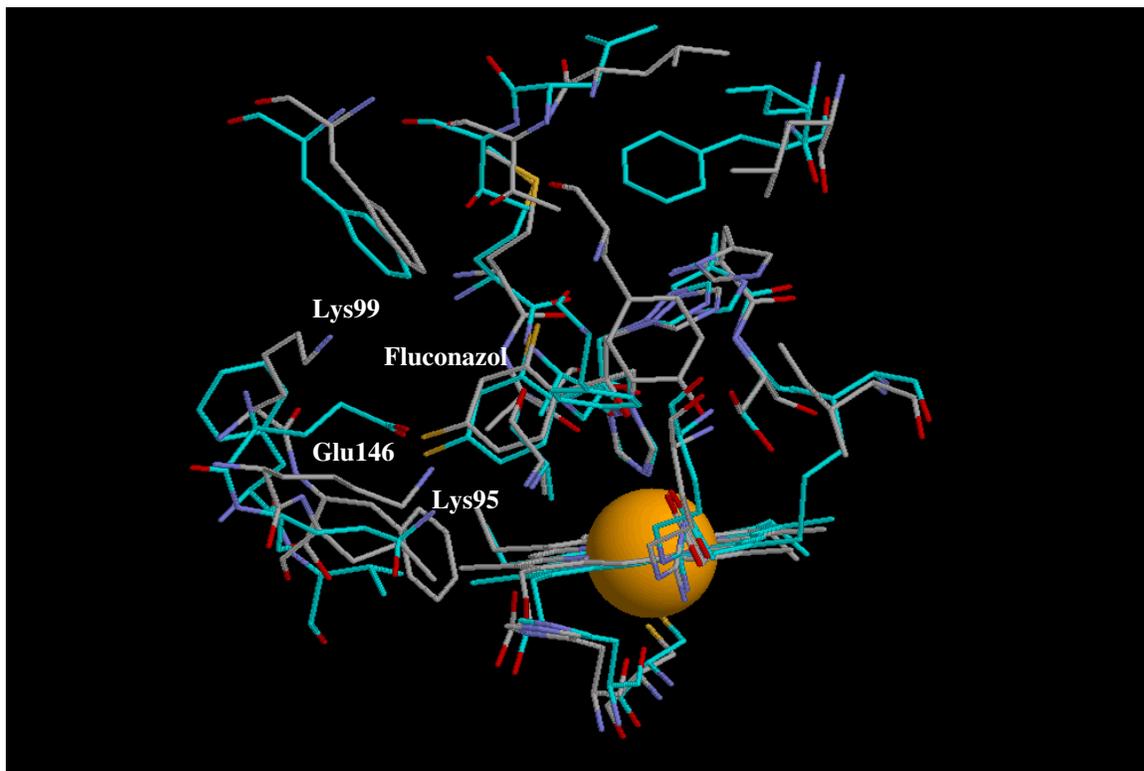


Figura 15. Sobreposição dos modelos do sítio ativo da CYP51MG^{SQ} (carbonos em cinza) e CYP51MG^H (carbonos em ciano).

O modelo construído por substituição química sofreu uma diferenciação em dois modelos: um com o resíduo Lys99 desprotonado, CYP51MG^{SQ1}; e outro com o resíduo Lys99 protonado, CYP51MG^{SQ2}, conforme abordado no tópico 4.4.

Os cálculos de entalpia de interação dos triazóis E1, E2, E3, E4 e E5 (tabela 4) com o sítio ativo dos modelos de CYP51MG, construídos por homologia e por substituição

quimérica, foram determinados com a equação 24 e estão listados na tabela 9. São apresentados também dados correspondentes da inibição da CYP51 disponíveis na literatura, referentes à espécie *C. albicans*. A boa correlação obtida anteriormente entre os dados de atividade contra esta espécie e os dados teóricos referentes à enzima de *M. tuberculosis* eram sugestivos de que o sítio ativo da CYP51 de espécies diferentes interagiria de forma similar com os compostos azólicos, independente da espécie considerada.

Tabela 9. Entalpias de interação calculadas na formação dos complexos CYP51MG-inibidor (ΔH^{PM6} , kcal/mol), para os diferentes modelos do sítio de interação da CYP51MG, e a atividade inibitória experimental ($\mu\text{mol/L}$).

Estrutura	ΔH^{PM6}			IC_{50}^a
	CYP51MG ^H	CYP51MG ^{SQ1}	CYP51MG ^{SQ2}	
E1	-46,39	-23,16	-27,01	103,45
E2	-43,67	-20,51	-29,58	60,05
E3	-49,69	-24,70	-28,51	28,50
E4	-43,88	-28,94	-33,61	3,25
E5	-43,18	-24,15	-23,09	1,97

^a atividade determinada em *C. albicans* [KLOPMAN & PTHELINTSEV, 1993].

Os valores de entalpia de interação CYP51MG-inibidor calculadas nestes modelos não apresentaram uma boa correlação com os valores experimentais de atividade inibitória (IC_{50}). Isso pode ter ocorrido por dois motivos: primeiro, a correlação não seria adequada, talvez pelos sítios da CYP51 de *C. albicans* e de *M. graminicola* não apresentarem semelhança suficiente; outra possível justificativa estaria relacionada com o fato de que a entalpia de interação poderia não ser o único termo importante na predição da atividade inibitória destes compostos contra enzimas de fungos.

Caso a última justificativa seja a principal responsável pela falta de correlação, inclusões de outros termos de energia envolvidos na interação CYP51MG-inibidor poderiam conduzir a uma equação empírica para a predição da atividade de outros compostos com potencial inibitório. Considerações de outros termos de energia foram desenvolvidas por Wang e colaboradores no estudo de inibidores de proteína quinase C [WANG *et al.*, 1994] e Oliveira e colaboradores no estudo de inibidores da fosfodiesterase 4 [OLIVEIRA *et al.*, 2006].

Para desenvolver esta equação foi utilizado um número maior de inibidores. Como demandaria muito tempo para se calcular a entalpia de interação destes inibidores com os três

modelos propostos para a CYP51MG, este estudo foi realizado com apenas um dos três modelos.

A boa correlação existente entre os dados de atividade experimental e os dados teóricos referentes à enzima de *M. tuberculosis* sugere que a entalpia de interação deve ser um termo bastante significativo entre os fenômenos que se encontram associados à inibição da CYP51. Desta forma, a escolha do modelo que seria utilizado para dar continuidade aos estudos se baseou na correlação linear existente entre estas duas variáveis. Para os modelos CYP51MG^H, CYP51MG^{SQ1} e CYP51MG^{SQ2} os coeficientes de correlação linear encontrados foram de -0,26, 0,60 e 0,08, respectivamente. Assim, o modelo CYP51MG^{SQ1} demonstrou ser o mais promissor para ser utilizado no desenvolvimento da equação empírica de predição.

5.3 Interações dos Triazóis com a CYP51MG

As interações dos triazóis com o modelo CYP51MG^{SQ1} foram identificadas após as otimizações da geometria do complexo CYP51MG^{SQ1}-triazol. Os compostos classificados como inibidores da CYP51 são caracterizados pela presença de grupos capazes de formar uma ligação coordenativa com o íon ferroso do heme, o centro catalítico desta enzima. Este tipo de interação é a mais importante para a atividade inibitória destes compostos. O 4-fenil-imidazol, por exemplo, apesar de apresentar uma estrutura relativamente pequena, é capaz de se acomodar prontamente no sítio ativo desta enzima, justamente, por fazer esta ligação [PODUST *et al.*, 2001b]. Porém, a interação de inibidores desta enzima, com outras regiões do sítio ativo pode melhorar suas atividades e, até mesmo, promover uma maior especificidade para o organismo em que eles irão atuar.

As descrições à seguir estão representadas na figura 16.

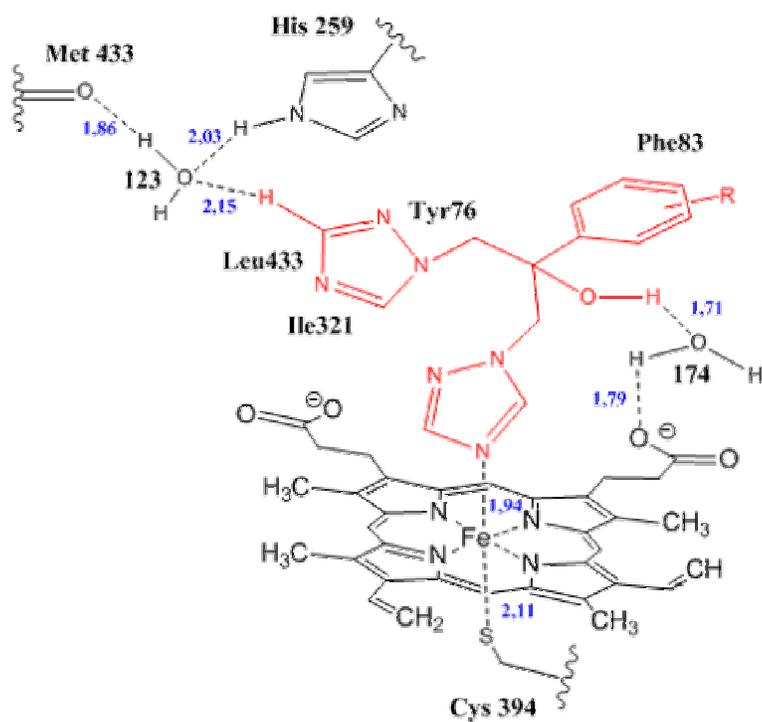
Derivados de triazóis, como os que foram utilizados neste trabalho, apresentam um nitrogênio heterocíclico, no anel triazólico, capaz de formar esta ligação coordenativa. Outros dois “pontos de ligação” foram encontrados entre estes compostos e seu sítio de interação. Uma molécula de água (174) serviu como um elo para promover a ligação entre a hidroxila destes compostos com o carboxilato do heme. No modelo de CYP51MT, esta molécula de água atua de maneira semelhante, porém unindo esta hidroxila com o resíduo Arg96, positivamente carregado.

O outro ponto de ligação identificado também foi intermediado por uma molécula de água (123). Esta molécula encontra-se associada ao oxigênio da cadeia peptídica de Met433 por uma ligação hidrogênio e seu oxigênio interage com um hidrogênio da cadeia lateral de

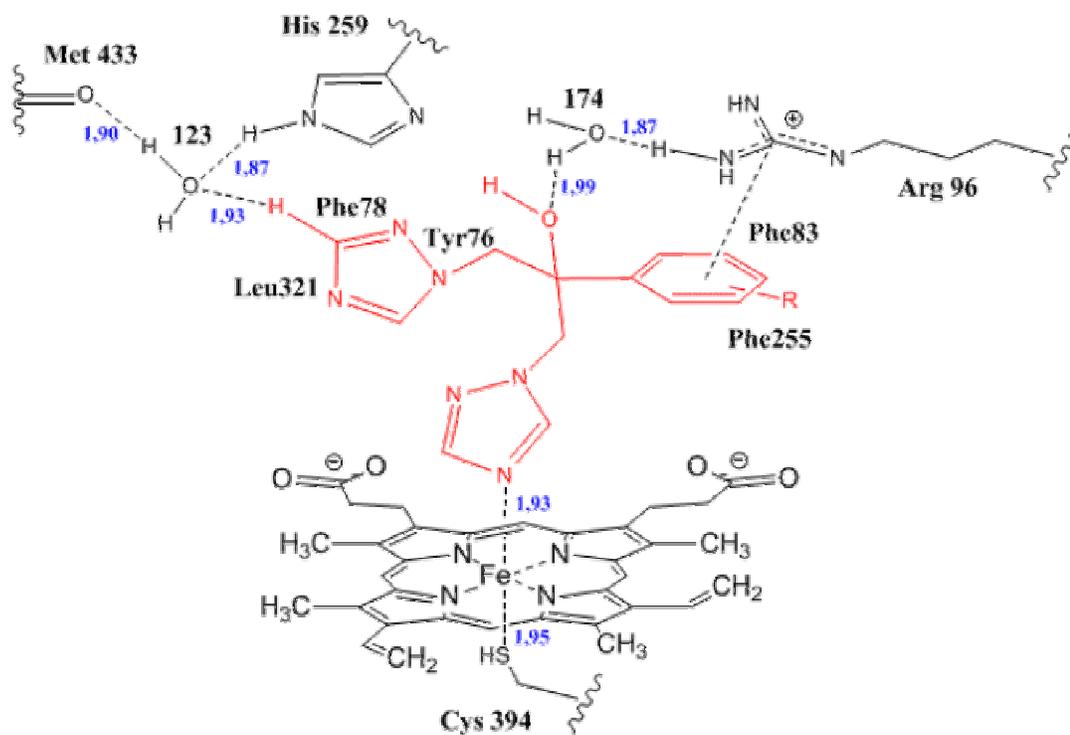
His259 e a um hidrogênio do anel triazólico não ligado ao ferro. O mesmo tipo de interação foi observada no modelo de CYP51MT. Apesar do hidrogênio do anel triazólico estar ligado a um átomo de carbono, a interação que ele faz com o oxigênio da água deve ser razoavelmente forte, como se conclui pela distância entre os átomos. O caráter sp^2 do carbono aliado ao efeito indutivo de seus nitrogênios vizinhos deve aumentar a carga parcial positiva (δ^+) do hidrogênio. De fato, a carga parcial calculada para este hidrogênio, utilizando o método Hartree-Fock com as funções de base do tipo 3-21G(*) com o programa Spartan '08 (considerando apenas o sistema aromático) foi de 0,276, maior que a carga parcial calculada para um sistema aromático onde os nitrogênios sp^2 foram substituídos por átomos de carbono ($\delta^+ = 0,225$) e mais próxima à carga parcial do hidrogênio de uma molécula de NH_3 ($\delta^+ = 0,292$), por exemplo.

Interações entre sistemas aromáticos foram observadas no grupo fenila dos triazóis e no anel imidazol não-ligado ao ferro. O grupo fenila foi encontrado em uma posição perpendicular à Phe83 (empilhamento T). No modelo da CYP51MT as interações parecem ser um pouco mais fortes com este grupo: foram encontrados dois aromáticos interagindo de forma semelhante (Phe83 e Phe255) e foi observada uma interação do tipo cátion- π com a Arg96. No anel imidazol, foram encontradas interações em paralelo e perpendicular com os aromáticos da His259 e Tyr76, respectivamente. A CYP51MT apresentou uma interação a mais com a Phe78 (do tipo T). Interação com cadeias alifáticas próximas (Ile321, Leu433) também foram observadas no modelo CYP51MG^{SQ1}.

Apesar de ter sido observado um maior número de interações específicas entre os inibidores triazólicos e o modelo de sítio da CYP51MT, foi observado que os valores das entalpias de interação calculadas neste modelo foram menos favoráveis que as entalpias calculadas modelo da CYP51MG^{SQ1} (Tabelas 8 e 9). Na realidade, existem outros tipos de forças que estão envolvidas nas interações entre os inibidores e as enzimas que, apesar de envolverem fracas energias de interação, quando somadas acarretam contribuições energéticas significativas, como as forças de dispersão de London [SILVERMAN, 1992].



A



B

Figura 16. Representação das interações específicas encontradas entre os inibidores triazólicos e os modelos da A) CYP51MG^{SQ1} e B) CYP51MT após minimização. As distâncias são dadas em Ångstrons (Å) e correspondem aos valores encontrados para o fluconazol (E5).

5.4 Modelo Empírico de Predição da Atividade de Inibidores da CYP51MG

Apesar dos compostos utilizados nos cálculos de entalpia de interação apresentarem grandes semelhanças estruturais (tabela 4), foi observado que os valores de entalpia calculados e os valores de atividade experimentais não apresentam nenhuma correlação (tabela 10). Mesmo eliminando-se os compostos que apresentam o N_{LR} diferente dos demais (E3, E10, E14 e E15), ainda assim não foi possível a obtenção de uma boa correlação. Nos dois casos, os valores de r^2 foram inferiores à 0,1. Isto sugere que outros fenômenos importantes, além da entalpia de interação, devem estar associados com o processo de inibição da CYP51MG.

Os termos que foram considerados neste processo são os mesmos considerados na equação 25 (ΔH_{int} , N_{LR} e o $\log WS$). Se todos estes termos forem determinados teoricamente com boa precisão e caso as considerações que foram feitas para se chegar a esta equação estejam corretas, então a determinação dos coeficientes c_1-c_4 desta equação pode nos conduzir a um modelo para a predição da atividade de outros compostos. Estes termos foram calculados para os inibidores da tabela 4 e estão listados na tabela 10, juntamente com os dados de atividade experimental.

Tabela 10. Valores de IC_{50} medidos experimentalmente ($\mu\text{mol/L}$), energia de interação calculada pelo PM6 (ΔH^{PM6} , kcal/mol), número de ligações rotacionáveis (N_{LR}) “congeladas” durante a ligação e o log da solubilidade estimada em meio aquoso ($\log WS$) dos inibidores triazólicos utilizados neste trabalho.

Estrutura	IC_{50} ^a	ΔH^{PM6} ^b	N_{LR} ^c	$\log WS$ ^d
1	103,45	-23,16	5	-1,90
2	60,05	-20,51	5	-1,71
3	28,50	-24,70	6	-2,35
4	3,25	-28,94	5	-2,36
5	1,97	-24,15	5	-2,25
6	100,88	-25,49	5	-2,75
7	107,41	-28,17	5	-2,26
8	103,58	-23,82	5	-2,82
9	95,29	-29,69	5	-3,00
10	90,18	-25,41	6	-3,37
11	35,46	-21,18	5	-2,02
12	26,01	-24,90	5	-2,55
13	84,19	-29,31	5	-2,12
14	268,00	-26,70	6	-2,91
15	0,56	-34,99	6	-2,60

^a atividade determinada em *C. albicans* [KLOPMAN & PTCHELINTSEV, 1993].

^b Calculada pela equação 24.

^c Determinado pela análise da estrutura otimizada.

^d Calculado com o programa CSlogWS (Chemsilico).

As perdas entrópicas associados a perdas nas rotações das ligações dos inibidores foram determinados diretamente, pela observação das suas estruturas.

A análise por regressão múltipla dos termos calculados nos conduziu a uma equação com uma correlação muito ruim com os valores do $\ln IC_{50}$ experimentais ($r^2=0,29$; $SD=1,66$). Mesmo considerando a inclusão de um termo quadrático do $\log WS$, como proposto por Wang e colaboradores [WANG *et al.*, 1994] (equação 26), não houve melhoras consideráveis na correlação entre os termos calculados e experimentais ($r^2=0,33$; $SD=1,69$). Após uma análise sistemática da atividade prevista por esta correlação para cada composto, decidiu-se pela eliminação de algumas estruturas na busca de uma melhor correlação. Ao se descartar a

contribuição dos compostos E1, E7, E10 e E13, foi obtida a equação (27), com uma boa correlação ($r^2=0,89$; $SD=0,81$):

$$\ln IC_{50} = 5,439(\log WS + 2,057)^2 + 0,416\Delta H_{\text{int}}^{PM6} + 0,757N_{LR} + 8,220 \quad (27)$$

Apesar deste modelo não ter sido construído utilizando os dados dos termos calculados de todos os inibidores da tabela 4, ele ainda envolveu a participação de compostos com uma boa faixa de atividade (variação de 3 ordens de grandeza). Um ponto importante a se considerar é que os valores de atividade experimentais que foram utilizados neste estudo foram determinados contra *C. albicans*. As pequenas diferenças entre as sequências dos aminoácidos da CYP51 desta espécie com a espécie que foi utilizada neste estudo (figura 12) podem ter alterado a atividade de alguns compostos, em uns mais do que em outros, o que poderia ter provocado uma correlação ruim ao se incluir todos os compostos.

Uma análise das contribuições dos três parâmetros utilizados neste modelo demonstrou que a entalpia de interação é o termo que apresenta a maior influência na atividade biológica dos compostos utilizados, sendo este o único termo que contribui para reduzir o valor de $\ln IC_{50}$, ou seja, para elevar a atividade (tabela 11). A segunda contribuição, na maioria dos compostos, é devido a mudanças de entropia ocorridas durante a interação, representadas pelas variações do N_{LR} .

Tabela 11. Contribuição de cada termo variável da equação 27, $\ln IC_{50}$ medido experimentalmente, $\ln IC_{50}$ calculado pela equação 27, e a diferença entre os valores de $\Delta \ln IC_{50}$ experimentais e calculados.

Estrutura	$[5,439(\log WS+2,057)^2]$	$0,416\Delta H^{PM6}$	$0,757N_{LR}$	$\ln IC_{50 \text{ exp}}$	$\ln IC_{50 \text{ calc}}$	$\Delta \ln IC_{50}$
1 ^a	0,13	-9,63	3,79	4,64	2,50	2,14
2	0,66	-8,53	3,79	4,09	4,13	-0,04
3	0,47	-10,28	4,54	3,35	2,95	0,40
4	0,50	-12,04	3,79	1,18	0,46	0,72
5	0,20	-10,05	3,79	0,68	2,16	-1,48
6	2,61	-10,60	3,79	4,61	4,01	0,60
7 ^a	0,22	-11,72	3,79	4,68	0,51	4,17
8	3,16	-9,91	3,79	4,64	5,26	-0,62
9	4,83	-12,35	3,79	4,56	4,48	0,08
10 ^a	9,37	-10,57	4,54	4,50	11,56	-7,06
11	0,008	-8,81	3,79	3,57	3,20	0,37
12	1,32	-10,36	3,79	3,26	2,97	0,29
13 ^a	0,02	-12,19	3,79	4,43	-0,17	4,60
14	3,95	-11,11	4,54	5,59	5,60	-0,01
15	1,60	-14,56	4,54	-0,58	-0,19	-0,39

^a Estruturas eliminadas para obtenção da correlação final (equação 27).

Apesar de o N_{LR} apresentar uma maior influência na atividade que o $\log WS$, ele é um termo que influencia muito pouco a discriminação dos compostos quanto à atividade, visto que a sua variação entre um inibidor e outro é limitada. Por esta razão, mesmo ao se eliminar este termo, foi obtido um modelo de predição com boa correlação ($r^2=0,87$; $SD=0,84$).

A aplicação desta equação na predição da atividade dos compostos triazólicos que foram utilizados neste estudo reproduziu bem os valores de atividade experimentais, com exceção dos compostos que foram eliminados ($r=0,94$; $SD=0,63$) (tabela 11 e figura 17).

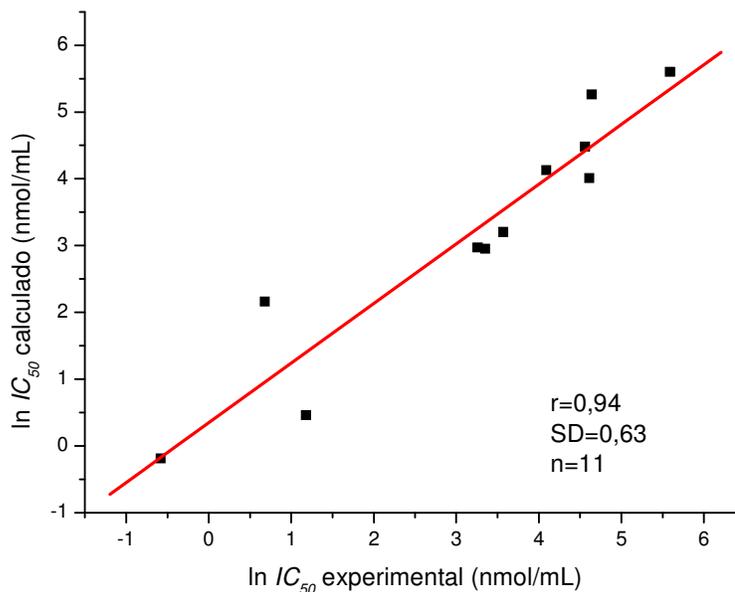


Figura 17. Gráfico de correlação entre $\ln IC_{50}$ experimental e calculado.

Cabe ressaltar que o modelo construído foi baseado numa dependência quadrática entre o $\log WS$ e o $\ln IC_{50}$ experimental. Um modelo de equação baseado na dependência linear entre estas duas variáveis produziu uma equação com uma correlação mais fraca ($r^2=0,71$; $SD=1,24$). Esta dependência quadrática sugere que compostos muito hidrofóbicos ou muito hidrofílicos não são ideais para se alcançar uma boa atividade. Isto está de acordo com a proposta de que o inibidor deveria ser transferido da fase aquosa para a fase lipídica, onde ele se ligaria à enzima. Caso o inibidor seja muito hidrofílico esta transferência seria dificultada. Da mesma forma, se o inibidor for muito hidrofóbico, ele iria interagir fortemente com a membrana lipídica, dificultando a sua transferência para a enzima. Este modelo prediz que a solubilidade em água ideal que os inibidores devem apresentar produz um $\log WS$ equivalente ao coeficiente c_2 , ou seja, aproximadamente $-2,06$ (próxima à solubilidade do composto **11**).

5.5 Predição de Atividade Antifúngica de Compostos Organofosforados Sintetizados pelo Grupo da UFRRJ

Alguns compostos sintetizados pelo grupo de síntese de organofosforados da UFRRJ, coordenado pelo Prof. João Batista Neves da Costa, foram planejados como possíveis inibidores da CYP51 [BARBOZA, 2009]. Estes compostos apresentam um anel heteroaromático de 5 membros com um átomo (N, O ou S) capaz de se formar uma ligação

coordenativa com íon ferroso presente no heme, mas com um padrão molecular novo (figura 13).

Conforme descrito por Wang e colaboradores [WANG *et al.*, 1994], o desenvolvimento da equação 26 (e, portanto da equação 27, obtida neste estudo), baseia-se na suposição de que as moléculas sejam semelhantes, de forma que a energia livre associada à passagem do inibidor da fase lipídica para a fase gasosa (ΔG_4), do complexo enzima/inibidor da fase lipídica para a fase gasosa (ΔG_5) e as perdas entrópicas translacionais e rotacionais do inibidor pela interação com a enzima sejam também semelhantes para todas as moléculas. Como a série de compostos usada na obtenção da equação 27 e a série dos inibidores propostos apresentam diferenças estruturais relevantes, a aplicação da equação aos inibidores propostos não deve levar a resultados quantitativos da atividade prevista. Contudo, como as estruturas propostas são semelhantes entre si, os erros associados com esta aplicação também devem ser semelhantes para toda a série avaliada e, portanto, é razoável assumir que os resultados obtidos devem se manter paralelos aos valores da atividade real dos inibidores propostos. Desse modo, os resultados da aplicação direta da equação 27 aos novos inibidores propostos da CYP51 podem ser considerados como um indicativo semi-quantitativo da atividade inibitória comparativa destas estruturas, útil na discriminação da atividade potencial da série de compostos proposta.

Os três termos calculados para estes compostos estão listados na tabela 12. Como estes compostos podem se apresentar como uma mistura diastereoisomérica, devido à dupla ligação C=N da cadeia lateral do anel, as predições foram feitas para os dois diastereoisômeros.

Tabela 12. Energia de interação calculada pelo método PM6 (ΔH^{PM6} , kcal/mol), número de ligações rotacionáveis (N_{LR}) congeladas durante a ligação e o log da solubilidade estimada em meio aquoso (log WS) dos compostos organofosforados utilizados neste trabalho. (Continua)

Série	Estrutura	log WS ^a	N_{LR} ^b	Isômero <i>Z</i>	Isômero <i>E</i>
				ΔH^{PM6} ^c	ΔH^{PM6} ^c
A	16	-1,22	6	-29,00	-29,11
	17	-2,51	8	-26,23	-30,05
	18	-1,48	6	-28,99	-32,99
	19	-1,74	8	-26,83	-28,48
	20	-2,19	8	3,82	3,49
B	21	-2,02	6	4,88	1,65
	22	-2,79	10	5,81	1,39
	23	-3,08	8	7,55	0,50
	24	-2,43	8	7,36	12,17
C	25	-2,22	6	5,15	13,35
	26	-2,97	10	11,15	15,71
	27	-3,25	8	14,19	15,02

^a Calculado com o programa CSlogWS (ChemSilico)

^b Determinado pela análise da estrutura otimizada.

^c Calculada pela equação 24.

Nos cálculos realizados para a predição do log WS destes compostos com o programa CSlogWS (ChemSilico) não é possível fazer a diferenciação entre um diastereoisômero e outro. Porém, pelo fato da estrutura destes compostos apresentarem uma grande superfície, as diferenças de solubilidade entre os diastereoisômeros não devem ser muito significativas.

Podemos observar pela tabela 12 que as interações entre estes compostos e a CYP51 foram bastante favoráveis para os organofosforados imidazólicos (Série A) e desfavoráveis para os compostos furânicos e tiofênicos (Séries B e C). Na série A, as entalpias de interação calculadas para estes compostos foram até mais favoráveis do que para alguns triazóis que apresentam ótima atividade, como o E5 (fluconazol) e E4.

A principal causa desta redução entre uma série e outra está relacionada com a mudança do átomo doador de elétrons (base de Lewis) para o íon ferroso (ácido de Lewis). Comparando-se os compostos E17, E23 e E27, por exemplo, onde as maiores contribuições das diferenças das entalpias de interação entre um composto e outro devem estar relacionadas

com as alterações no átomo doador do par de elétrons para o metal (as únicas alterações estruturais ocorrem no anel), podemos observar que a entalpia de interação de E17, onde o nitrogênio atua como doador, foram mais favoráveis que E23 (doador: oxigênio), e este mais favorável que E27 (doador: enxofre). Isto está de acordo com a teoria proposta por Pearson para a dureza-macieza de ácidos e bases de Lewis [JOLLY, 1976]. De acordo com esta teoria, ácidos e bases de mesma dureza-macieza devem apresentar interações mais fortes. Nesta proposta, o íon ferroso é classificado como ácido de Lewis do tipo limítrofe (*borderline*) e deve apresentar uma interação mais forte com uma base do mesmo tipo. Apesar de não ter sido encontrada a classificação das bases utilizadas neste sistema, as bases da série A são aquelas que mais se aproximam desta classificação, por apresentarem características semelhantes à piridina, classificada como limítrofe. A alteração do átomo ligante nesta estrutura por oxigênio ou enxofre, deve tornar a dureza e a macieza maiores, respectivamente, diminuindo a força de interação.

Isto é um bom indicativo de que o PM6 é um método semi-empírico adequado para a descrição (pelo menos de forma qualitativa) dos aspectos eletrônicos envolvidos nas complexação destes elementos com o átomo de ferro presente neste tipo de sistema, pois os compostos utilizados neste trabalho até aqui (triazóis) não apresentaram variações estruturais que tivessem alguma influência direta na interação ferro-inibidor.

Os compostos que se apresentaram como bons inibidores em potencial da CYP51MG foram, principalmente, os diastereoisômeros *E*, o que já estava previsto ao se comparar os valores da entalpia de interação dos dois diastereoisômeros, pois este é o único termo que sofre variação entre os dois isômeros (tabela 12). O composto que apresentou maior atividade relativa foi E18_E com IC_{50} equivalente a 2,34 $\mu\text{mol/L}$.

Tabela 13. Contribuição de cada termo variável da equação 27 e o $\ln IC_{50}$ predito pela equação 27 para os compostos organofosforados.

Estrutura	Isômero Z			Isômero E		
	$[5,439(\log WS+2,057)^2]$	$0,757N_{LR}$	$0,416\Delta H^{PM6}$	$\ln IC_{50 \text{ calc}}$	$0,416\Delta H^{PM6}$	$\ln IC_{50 \text{ calc}}$
16	3,81	4,54	-12,06	4,51	-12,11	4,46
17	1,12	6,06	-10,91	4,48	-12,50	2,89
18	1,81	4,54	-12,06	2,51	-13,72	0,85
19	0,55	6,06	-11,16	3,66	-11,85	2,97
20	0,10	6,06	1,59	15,96	1,45	15,82
21	0,007	4,54	2,03	14,80	0,68	13,46
22	2,92	7,57	2,42	21,13	0,58	19,29
23	5,69	6,06	3,14	23,10	0,21	20,17
24	0,76	6,06	3,06	18,10	5,06	20,10
25	0,14	4,54	2,14	15,05	5,55	18,46
26	4,53	7,57	4,64	24,96	6,53	26,86
27	7,74	6,06	5,90	27,92	6,25	28,26

É interessante avaliar como a combinação dos 3 termos da equação determina a atividade. Em função da cadeia pequena dos seus grupos alquila, o composto mais ativo E18 é um dos que apresentam o termo entrópico menos desfavorável, mas que é igual, por exemplo, ao do composto E25, um dos menos ativos. O composto E25 apresenta inclusive um termo de solubilidade mais favorável (mais próximo de zero) do que o do composto E18. É a entalpia de interação muito mais favorável do composto E18, um derivado imidazólico, que determina sua maior atividade prevista em comparação com a do composto E25, um derivado tiofênico.

Para cada série de compostos, a solubilidade dos organofosforados mostrou-se mais favorável para a inibição da CYP51MG nos compostos que apresentaram grupos alquila com três átomos de carbono: iso-propil, em E21 e E25; e n-propil, em E19. Cadeias laterais com maior ou menor número de carbonos, como em E26 e E16, respectivamente, afetam negativamente na atividade destes compostos. Comparando as série B e C, que apresentam os mesmos padrões de substituição para os grupos alquila, observou-se também que a série B apresentou o termo de solubilidade mais favorável devido à presença do oxigênio no anel ligante.

Uma das causas da baixa atividade de alguns destes compostos que poderia ser corrigida é o grande número de rotações livres existentes nestas substâncias e que são “congeladas” durante a interação com a enzima. Propor inibidores que apresentam estruturas

com menor liberdade conformacional, por exemplo, através de estruturas cíclicas, minimizaria os efeitos prejudiciais provocados pelas perdas entrópicas.

Desta forma, combinando-se as características estruturais dos organofosforados que foram favoráveis para os três termos de energia envolvidos no processo de inibição, podemos dizer que compostos contendo anel imidazólico (ΔH_{int} favorável) e com substituinte alquila com três átomos de carbono com pouca liberdade rotacional ($\log WS$ e N_{RL} favoráveis) podem ser uma boa proposta de estrutura com maior atividade. Estruturas que poderiam ser viáveis de serem sintetizadas, combinando as características envolvendo ΔH_{int} favorável e N_{RL} favoráveis, são representadas na figura 18.

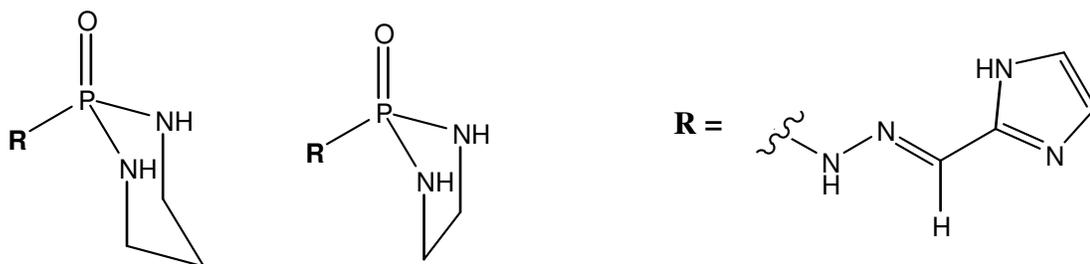


Figura 18. Propostas de estruturas com as melhores características estruturais para a atividade.

5.6 Interações Específicas dos Organofosforados com a CYP51MG

A descrição a seguir diz respeito às interações específicas identificadas entre os organofosforados com o modelo de sítio da CYP51 de *M. graminicola*, após as otimizações da geometria do complexo CYP51MG^{SQ1}-organofosforado. Além da ligação coordenativa existente entre os organofosforados e o íon ferroso, foi identificada uma ligação hidrogênio com o sítio ativo da enzima, intermediada pela molécula de água H₂O174, que se encontra ligada ao carboxilato do heme.

Para os diastereoisômeros *Z*, esta molécula de água interage com o oxigênio do grupo alcoxi do organofosforado (figura 19A), enquanto que para os diastereoisômeros *E* a interação da água é feita com o oxigênio da fosforila (figura 19B).

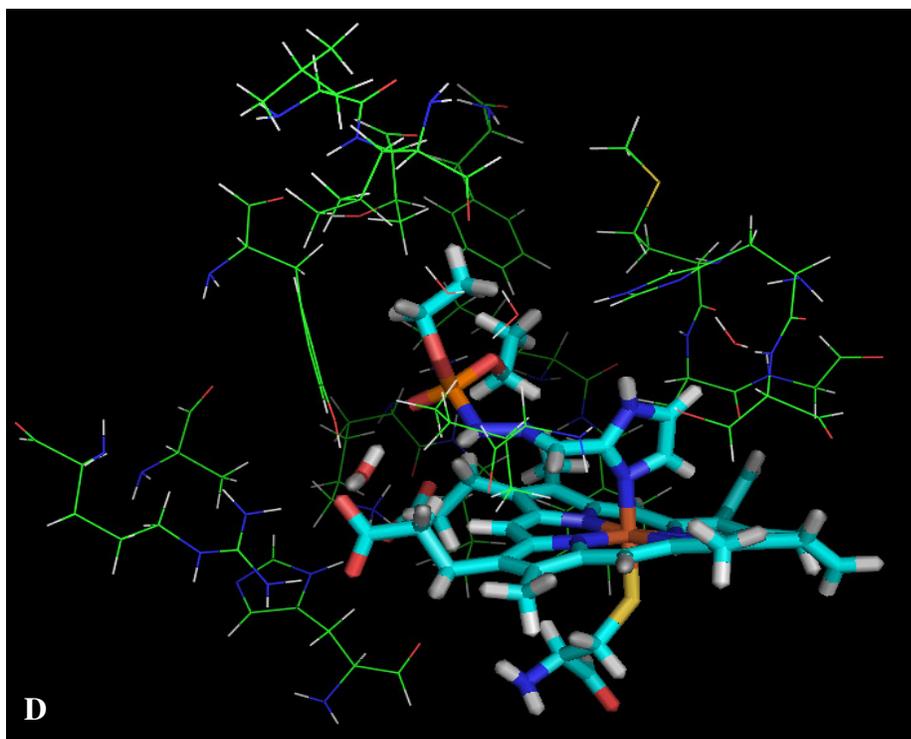


Figura 19. Exemplo das interações encontradas entre os organofosforados e o sítio ativo da CYP51MG^{SQ1}. **A)** Representação esquemática da interação com o diastereoisômero *Z* da estrutura E16 com o sítio, destacando-se as ligações hidrogênio; **B)** representação 3D da interação com o diastereoisômero *Z* da estrutura E16, com o inibidor, o heme e o resíduo de cisteína representados em bastões; demais resíduos e águas em linhas; e **C)** representação esquemática da interação com o diastereoisômero *E* da estrutura E16 com o sítio, destacando-se as ligações hidrogênio e **D)** representação 3D da interação com o diastereoisômero *E* da estrutura E16, com o inibidor, o heme e o resíduo de cisteína representados em bastões; demais resíduos e águas em linhas. As distâncias foram dadas em Å. As cores representadas para os átomos são: nitrogênio, em azul; oxigênio, vermelho; enxofre, amarelo; hidrogênio, branco; carbono, verde; ferro, em laranja. O complexo Cys394-heme-organofosforado estão representados em bastão, com os carbonos em ciano.

As outras interações que ocorrem entre o sítio e os organofosforados ocorrem principalmente entre grupos alifáticos e aromáticos com as cadeias laterais do grupo fosforamidato dos organofosforados.

6 CONCLUSÕES

O método do orbital molecular semi-empírico PM6 demonstrou ser uma ferramenta adequada para a modelagem dos complexos CYP51-inibidor, levando a uma boa descrição dos aspectos estéreo-eletrônicos envolvidos na interação do sistema heme-inibidor, contendo diferentes tipos de átomos ligantes para o íon ferroso.

O estudo mostrou que a entalpia de interação não é o único fenômeno importante a se considerar no planejamento de novos inibidores da CYP51, como observado anteriormente para outros sistemas enzimáticos. A solubilidade em água e as perdas entrópicas devidas às restrições conformacionais dos inibidores também se encontram associados com o processo de inibição, uma vez que, quando estes parâmetros foram considerados em uma única equação foi possível obter um modelo que correlacionou bem os dados de atividades experimentais com aqueles que foram calculados, o que pode funcionar para orientar a síntese de novos inibidores.

A equação de predição proposta neste trabalho pode ser bastante útil para quantificar a atividade de compostos que apresentam semelhanças estruturais com os triazóis que foram utilizados no ajuste de seus coeficientes. Para compostos com diferenças estruturais maiores, como os organofosforados utilizados neste trabalho, ela pode fornecer uma previsão relativa entre quais compostos serão mais ou menos ativos.

Apesar de alguns organofosforados propostos terem apresentado interações favoráveis com o sítio ativo da CYP51, o modelo de predição proposto demonstrou que a sua atividade poderá ser bastante afetada devido às perdas entrópicas relacionadas com a grande quantidade de ligações rotacionáveis que são “congeladas” após a sua interação com a enzima. Além disso, é preciso considerar a solubilidade dos compostos que serão sintetizados, visto que estruturas muito ou pouco solúveis em água poderão prejudicar a atividade destes compostos.

7 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A inserção de dados experimentais de compostos com uma maior diferenciação estrutural ao se fazer ajuste dos coeficientes da equação proposta neste trabalho poderá aumentar sua aplicabilidade, de modo que os valores de atividade estimados sejam mais próximos do valor real para uma maior diversidade de compostos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJAY & MURCKO, M. A. Computational methods to predict binding free Energy in ligand-receptor complexes. **J. Med. Chem.**, v.38, p.4953-4967, 1995.

ALCÁCER, L. **Introdução à Química quântica computacional**. Rio de Janeiro. Editora: IST Press, Lisboa, 2007. 305p. (Ensino da Ciência e da Tecnologia, 20)

ALCAZAR-FUOLI, L. *et al.* Ergosterol biosynthesis pathway in *Aspergillus fumigatus*. **Steroids**, v.73, n.3, p.339-347, 2008.

ALLINGER, N.L. Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms. **J. Am. Chem. Soc.**, v.99, p.8127-8134, 1977.

ALTSCHUL S.F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v.25, p.3389-3402, 1997.

ÅQVIST, J. *et al.* Ligand binding affinities from MD simulations. **Acc. Chem. Res.**, v.35, p.358-365, 2002.

ARNOLD, K. *et al.* The Swiss-model workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. **Struct. Bioinf.**, v.22, n.2, p.195-201, 2006.

ASI, A. M. *et al.* Application of the linear interaction energy method (LIE) to estimate the binding free energy values of *Escherichia coli* wild-type and mutant arginine repressor C-terminal domain (ArgRc)-L-arginine and ArgRc-L-citrulline protein-ligand complexes. **J. Mol. Graphics Model.**, v.22, n.4, p.249-262, 2004.

BAJORATH, J. *et al.* Knowledge-based model building of proteins: concepts and examples. **Protein Science**, v.2, p.1798-1810, 1993.

BANFI, E. *et al.* Antifungal and antimycobacterial activity of new imidazole and triazole derivatives. A combined experimental and computational approach. **J. Antimicrob. Chem.**, v.58, p.76-84, 2006.

BARBOZA, H. T. G. Dissertação (Mestrado em Química, Química Orgânica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009. Em andamento.

BARREIRO, E. J. & FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal**. Porto Alegre. Editora: Artmed, Porto Alegre, 2001.

BARTLETT, D. W. *et al.* The strobilurin fungicides. **Pest Manag. Sci.**, v.58, p.649-662, 2002.

BATES, P.A. *et al.* Enhancement of protein modeling by human intervention in applying the automatic programs 3D-JIGSAW and 3D-PSSM. **Proteins** (Supl.5), p.39-46, 2001.

BERNSTEIN + Sons, P.O. Box 177, Bellport, NY, USA. Copyright © Herbert J. Bernstein, 1998-1999.

BORDOLI, L. *et al.* Protein structure homology modeling using Swiss-model workspace. **Nat. Protoc.**, v.4, n.1, p.1-13, 2009.

BORN, M. & OPPENHEIMER, J. R. Zur Quantentheorie der Molekeln. **Ann. Phys.**, v.84, p.457-484, 1927.

BRENDT, K. J. **Resistência a fungicidas em patógenos de plantas cultivadas: Como maneja-la?** Bruxelas: GCPF, 1995. 51p.

BROOIJMENS N. & KUNTZ I. D. Molecular recognition and docking algorithms. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, v.32, p.335-373, 2003.

BROOKS, C. L. *et al.* **A theoretical perspective of dynamics, structure, and thermodynamics.** Advances in chemical physics; John Wiley: New York, 1988; Vol. LXXI.

BROOKS, B.R. *et al.* CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. **J. Comput. Chem.**, v.4, p.187-217, 1983.

CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia:** doenças das plantas cultivadas. 4. ed. v.2. São Paulo: Ceres, 2005. p.489-500.

CAVALCANTI, M. J. B. *et al.* Distribuição e impacto da sigatoka-negra na bananicultura do Estado do Acre. **Fitopatol. Bras.**, v.29, n.5, p.544-547, 2004.

CHAMBERS, C. C. *et al.* Model for Aqueous Solvation Based on Class IV Atomic Charges and First Solvation Shell Effects. **J. Phys. Chem.**, v.100, n.40, p.16385-16398, 1996.

CHEMINOVA BRASIL LTDA. Defensivos agrícolas dobram a produção. Disponível em: <<http://www.cheminova.com.br/pt/defensivos.htm>>. Acesso em: 06 jan. 2009.

CHEMSILICO LCC. Copyright @ 2003. Disponível em: <<http://www.chemsilico.com>>

CHENG, A. & MERZ JR, K. M. Prediction of Aqueous Solubility of a Diverse Set of Compounds Using Quantitative Structure-Property Relationships, **J. Med. Chem.**, v.46, p.3572-3580, 2003.

CHOTHIA, C. & LESK, A.M. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. **EMBO J.** v.5, p.823–826, 1986.

CLARK, W. S. *Septoria tritici* and azole performance. Fungicide resistance: are we winning the battle but losing the war? **Asp. Appl. Biol.**, v.78, p.127-132, 2006.

CONEXÃO SINDAG. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos de Defensivos Agrícolas. Ano 2, n.5, mar. 2008.

CONEXÃO SINDAG. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos de Defensivos Agrícolas. Ano 3, n.14, 2009.

CONTI, J. H.; MINAMI, K.; TAVARES, F. C. A. Comparação de caracteres morfológicos agronômicos com moleculares em morangueiros cultivados no Brasil. **Hortic. Bras.**, v.20, n.3, p.419-423, 2002.

COOLS, H. J. *et al.* Impact of changes in the target P450 CYP51 enzyme associated with altered triazole-sensitivity in fungal pathogens of cereal crops. **Biochemical Society**, v.34, n.6, p.1219-1222, 2006.

DELHOMEZ, N. *et al.* Susceptibility of strawberry cultivars and advanced selections to leaf caused by *Mycosphaerella fragariae*. **HortScience**, v.30, n.3, p.592-595, 1995.

DÈLYE, C.; BOUSSET, L.; CORIO-COSTET, M.F. PCR cloning and detection of point mutations in the eburicol 14 α -demethylase (*CYP51*) gene from *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*, a “recalcitrant” fungus. **Current Genetics**, v.34, p.399-403, 1998.

DÈLYE, C., LAIGRET, F., CORIO-COSTET, M.F. A mutation in the 14 α -demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. **Applied Environ. Microbiol.**, v.63, p.2966-2970, 1997.

DEWAR, M. J. S. *et al.* Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. **J. Am. Chem. Soc.**, v.107, p.3902-3909, 1985.

DEWAR, M. J. S. & THIEL, W. Ground states of molecules. 38. The MNDO method. Approximations and parameters. **J. Am. Chem. Soc.**, v.99, p.4899-4907, 1977.

DIAS, M. S. C. *et al.* Produção de morangos em regiões não tradicionais. **Inf. Agrop.**, Belo Horizonte, v.28, n.236, p.24-33, 2007.

ESWAR, N. *et al.* Tools for comparative protein structure modeling and analysis. **Nucleic Acids**, v.31, p.3375–3380, 2003.

FERNANDEZ-FUENTES, N. *et al.* M4T: a comparative protein structure modeling server. **Nucleic Acids Res.**, v.35, p.363–368, 2007.

FesBE. Resistência de fungos a fungicidas. Disponível em: <<http://www.fesbe.org.br>>. Acesso em: 09 jan. 2009.

FRAC. FRAC Code List[®]: Fungicides sorted by mode of action, 2007. Disponível em: <<http://www.frac-brasil.org.br>>. Acesso em: 20 dez. 2008.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J.C.R.; TRINDADE, D.R. Situação atual da Sigatoka negra da bananeira. **Fitopatol. Bras.**, Brasília, v. 26 (suplemento), p. 449, 2001.

GISI, U. *et al.* Recent developments in elucidating of resistance to phenylamide, DMI and strobilurin fungicides. **Crop Protection**, v. 19, p.863-872, 2000.

GLAXOSMITHKLINE. DeepView/Swiss-PdbViewer, v.3.7. Copyright © N. Guex, 1995-2001.

GOLLAPUDY, R., AJMANI, S. & KULKARNI, S. A. Modeling and interactions os *Aspergillus fumigatus* lanosterol 14a-demethylase ‘A’ with azole antifungals. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 12, p. 2937-2950, 2004.

GUENGERICH, F. P. Enzymatic oxidation of xenobiotic chemicals **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v.25. n.3, 97-153, 1990.

GUENGERICH, F. P & MACDONALD, T. L. Mechanisms of cytochromeP450 catalysis. **FASEB J.**, v.4, n.8, p.2453-2459, 1990.

GUENGERICH, F. P. Reactions and significance of cytochrome P450 enzymes. **J. Biol. Chem.**, v.266, n.16, p.10019-10022, 1991.

GUEX, N. E PEITSCH, M. C. Swiss-Model and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**. v.18, p.2714 – 2723, 1997.

HANSSON T., MARELIUS, J. & ÅQVIST, J. Ligand binding affinity prediction by linear interaction energy methods. **J. Comput.-Aided Mol. Des.**, v.12, n.1, p. 27-35, 1998.

HYPERCHEM e (TM) **Computational chemistry manual**, 1994, (@c) hypercube inc.

JACKSON, C. J. *et al.* A novel sterol 14 α -demethylase/ferredoxin fusion protein (CYP51FX) from *Methylococcus capsulatus* represents a new class of the cytochrome P450 superfamily. **J. Biol. Chem**, v.277, n.49, p.46959-46965, 2002.

JENSEN, F. **Introduction to computational chemistry**. Chichester: John Wiley & Sons, 1999. 429p.

JOLLY, W. L. **The principles of inorganic chemistry**. London: McGraw-Hill Kogakusha, 1976, 376p.

JORGENSEN, W.L. & TIRADO-RIVES, J. The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. **J. Am. Chem. Soc.**, v.110, p.1657-1666, 1988.

KATZ, A. K. *et al.*. Locating active-site hydrogen atoms in d-xylose isomerase: time-of-flight neutron diffraction. **PNAS**, v.103, n.22, 8342-8347, 2006.

KIER, L. B. & HALL, L.H. **Molecular Structure Description**, Academic Press, 1999.

KOLLMAN P. A. Free energy calculations: applications to chemical and biochemical phenomena. **Chem. Rev.**, v.93, p.2395-23417, 1993.

KLOPMAN, G. E PTCHELINTSEV, D. Antifungal Triazol Alcohols: A Comparative Analysis of Structure-activity, Structure-Teratogenicity and Structure-Therapeutic Index Relationships. **J. Comp.-Aided Mol. Des.**, v.7, p. 349-362, 1993.

KUHNE, R. *et al.* Group Contribution Methods to Estimate Water Solubility of Organic Chemicals. **Chemosphere**, v.30, 2061-2077, 1995.

LUPETTI, A. *et al.* Molecular basis of resistance azole fungicides. **Trends Mol. Méd.**, v.8, p.76 – 81, 2002.

MADAIL, J. C. M. IV Simpósio Nacional do morango. III Encontro de pequenas frutas e frutas nativas do Mercosul. Economia do morango. Realizado pela Embrapa Clima Temperado. Disponível em: http://www.cpact.embrapa.br/eventos/2008/simposio_morango_frutas/apresentacoes_pdf/Madail.pdf. Acesso em: 14 fev. 2009.

MCKINNEY, M. K. & CRAVATT, B. F. Evidence for Distinct Roles in Catalysis for Residues of the Serine-Serine-Lysine Catalytic Triad of Fatty Acid Amide Hydrolase. **J. Biol. Chem.** v. 278, p.37393-37399, 2003.

MINOUX H. & CHIPOT, C. Cation- π Interactions in Proteins: Can Simple Models Provide an Accurate Description?. **J. Am. Chem. Soc.**, v.121, p.10366-10372, 1999.

MOGON, N. H. & COUTINHO, K. **Métodos de Química teórica e modelagem molecular**. 1. ed. São Paulo: Editora e Livraria da Física, 2007. 539p.

NELSON, D. R. *et al.* Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes including nomenclature recommendations for genes pseudogenes and alternative splice variants. **Pharmacogenetics**, v.14, n.1, p.1-18, 2004.

NELSON, D. R. *et al.* Cytochrome P450 and the individuality of species. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.369, p.1-10, 1999.

OLIVEIRA, F. G. *et al.* Molecular docking study and development of an empirical binding free energy model for phosphodiesterase 4 inhibitors. **Bioorg. Med. Chem.**, v.14, p.6001-6011, 2006.

PARKS, L. W. & CASEY, W. M. Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.49, p.95-16, 1995.

PÉREZ, L. *et al.* Evolution of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet populations sensitivity to fungicides in banana in Cuba. Resumos de Artigos apresentados em Acrobat 2000, San Juan, Porto Rico, jul./ago. 2000.

PODUST, L. M. *et al.* Estriol bound and ligand-free structures of sterol 14 α - demethylase. **Structure**, 2004, 12, 1937-1945.

PODUST, L. M., POULOS, T. L. & WATERMAN, M. R. Cytochrome P450 14 alpha-sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with fluconazole. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v.98, p.3068-3073, 2001a.

PODUST, L. M. *et al.* Substrate recognition sites in 14a-sterol demethylase from comparative analysis of amino acid sequences and X-ray structure of *Mycobacterium tuberculosis* CYP51. **J. Inorg. Chem.**, v.87, p.227-235, 2001b.

POPLE, J. A. & NESBET, R. K. Self-consistent orbitals for radicals. **J. Chem. Phys.**, v.22, n.3, p.571-572, 1954.

PUZYN, T. *et al.* Calculation of quantum-mechanical descriptors for QSPR at the DFT level: is it necessary? **J. Chem. Inf. Model.**, v.48, p.1174-1180, 2008.

RABELO, J. A. & BALARDIN, R. S. **A cultura do morangueiro**. Florianópolis: EPAGRI, 1997. 44p. (Boletim Técnico, 46).

RADMANN, E. B. *et al.* Caracterização e diversidade genética de cultivares de morangueiro. **Hortic. Bras.**, v.4, n.1, p.84-87, 2006.

RANGEL, A.; PENTEADO, L.A.C.; TONET, R.M. **Cultura da banana**. 2. ed. Campinas: CATI, 2002. p.91. (Boletim Técnico, 234).

REICHERT, L.J. Comercialização. In: SANTOS, A.M; MEDEIROS, A.R.M. **Morango: produção**. Brasília: Embrapa, 2003. p.75-78.

REICHERT, L.J & MADAIL, J.C.M. Aspectos socioeconômicos. In: SANTOS, A.M; MEDEIROS, A.R.M. **Morango: produção**. Brasília: Embrapa, 2003. p.12-15.

RIGON, L.*et al.* Pequenas frutas. **Anuário Bras. Frutic.**, v.1, n.1, p. 90-97, 2005.

RJTVGLOBO. Morangos lucrativos, Globo comunicações e participações S.A. Disponível em: < <http://rjtv.globo.com/Jornalismo/RJTV/0,,MUL123155-9106-15,00-MORANGOS+LUCRATIVOS.html>>. Acessado em: 14 de fevereiro de 2009.

ROCHA, G. B. *et al.* RM1: A reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I. **J. Compt. Chem.**, v.27, n.10, p.1101-1111, 2006.

ROSE, K.; HALL, L. H. Modeling Blood-Brain Barrier Penetration Using the Electrotopological State. **J. Chem. Inf. Comput. Sci.**, v.42, 651-666, 2002.

ROOTHAAN, C.C.J. New developments in molecular orbital theory. **Rev. Mod. Phys.**, v.23, n.2, p.69-89, 1951.

ROOTHAAN, C.C.J. Self consistent field functions for the atomic configurations 1S², 1S²2S, e 1S²2S²S. **Rev. Mod. Phys.**, v.32, v.2, p.179-185, 1960.

ROSSELLO, A. *et al.* Synthesis, antifungal activity and molecular modeling studies of new inverted oxime ethers of oxiconazole. **J. Med. Chem.**, v. 45, p. 4903-4912, 2002.

ROST, B. Twilight zone of protein sequence alignments. **Protein Eng.**, v.12, p.85–94, 1999.

RUPP, B. *et al.* Molecular design of two sterol 14 α -demethylase homology models and their interactions with the azole antifungals ketoconazole and bifonazole. **J. Comput. Aided Mol. Des.**, v.19, p.149-163, 2005.

RUSSEL, P. E. A Century of fungicides evolution. **J. Agric. Sci.**, v. 143, p.11-25, 2005.

SANTOS, A. M.; MEDEIROS, A. R. M. Introdução. In: SANTOS, A. M.; MEDEIROS, A. R. M. (Ed.) **Morango: produção**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p.24-30.

SCHWEDE, T. *et al.* Swiss-model: an automated protein homology-modeling server. **Nucleic Acids Research**, v.31, n.13, p.3381-3385, 2003.

SEARLE, M. S. *et al.* Partitioning of free energy contributions in the estimations of binding constants: residual motions and consequence for amide-amide hydrogen bond strengths. **J. Am. Chem. Soc.**, v.114, p.10697-10704, 1992.

SEARLE, M. S. & WILLIAMS D. H. The cost of conformational order: entropy changes in molecular associations. **J. Am. Chem. Soc.**, v.114, p.10690-10697, 1992.

SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W.; LANGFORD, C. H. **Inorganic Chemistry**. 2^a Edição. Oxford: Oxford University Press, 2004. 891p.

SHYADEHI, A. Z. *et al.* The mechanism of the acyl-carbon bond cleavage reaction catalyzed by recombinant sterol 14 α -demethylase of *Candida albicans* (other names are: lanosterol 14 α -demethylase, P-45014DM, and CYP51). **J. Biol. Chem.**, v.271, n.21, p.12445-12450, 1996.

SILVERMAN, R. B. **The organic chemistry of drug design na action**. Califórnia. Editora: Academic Press, Inc., 1992.

SINNOKROT, M. O. & SHERRILL, C. D. **J. Am. Chem. Soc.**, v.107, p.8377-8379, 2003.

SLATER, J. C. The theory of complex spectra. **Phys. Rev.**, v.34, p.1293-1322, 1929.

SRINIVASAN, J. *et al.* Continuum solvent studies of the stability of DNA, RNA, and phosphoramidate—DNA helices. **J. Am. Chem. Soc.**, v.120, p.9401-9409, 1998.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method. **J. Comput. Chem.**, v.10, n.2, p.209-220, 1989.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. **J. Mol. Model.**, v.13, p.1173-1213, 2007.

STEWART, J. J. P. MOPAC 2007. Stewart Computational Chemistry, version 7.075W.

TANAKA, M. A. S. *et al.* Doenças do morangueiro (*Fragaria x ananassa*). In: KIMATI, H; AMORIM, L; REZENDE, J.A.M; BERGAMIN FILHO, A; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4 ed. v. 2. São Paulo: Ceres, 2005. p.489-500.

TANAKA, M. A. S. & PASSOS, F. A. Caracterização patogênica de *Colletotrichum acutatum* e *C. fragariae* associados à antracnose do morangueiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, n.5, p.484-488, 2002.

TETKO, I. V. *et al.* Estimation of Aqueous Solubility of Chemical Compounds Using E-State Indices. **J. Chem. Inf. Comput. Sci.**, v.41, p.1488-1493, 2001.

THIEL, W. & VOITYUK, A. A. Extension of the MNDO formalism to d-orbitals - Integral approximations and preliminary numerical results. **Theor. Chim. Acta**, v.81, p.391-404, 1992a.

THIEL, W. & VOITYUK, A. A. Extension of MNDO to d-orbitals - Parameters and results for the halogens. **Int. J. Quantum Chem.**, v. 44, p.807-829, 1992b.

TÖFOLI, J. G. & DOMINGUES, R. J. Morango, controle adequado. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=38>. Acesso em: 12 jan. 2009.

TROCHA, P. J.; JASNE, S. J.; SPRINSON, D. B. Yeast mutants blocked in removing the methyl group of lanosterol at C-14. Separation of sterols by high-pressure liquid chromatography. **Biochemistry**, v.16, p.4721-4726, 1977.

TSUZUKI, *et al.* The origin of the cation/ π interaction: the significant importance of the induction in Li^+ and Na^+ complexes. **J. Phys. Chem. A.**, v.105, n.4, 769-773, 2001.

VENTURA, J. A. & COSTA, H. Sigatoka Negra: uma ameaça para a bananicultura. Vitória: DCM-Incaper, nov. 2004. 4 p.

VOTANO, J. R. *et al.* Prediction of Aqueous Solubility Based on Large Datasets Using Several QSPR Models Utilizing Topological Structure Representation. **J. Chem Info. Comput. Sci.**, v.1, n.11, p.1829-1841, 2004.

WANG, S. *et al.* Protein Kinase C. Modeling of the Binding Site and Prediction of Binding Constants. **J. Med. Chem.**, v.37, p.1326-1338, 1996.

WASHINGTON, J.R. *et al.* M. Infection studies of *Mycosphaerella fijiensis* on banana and the control of black Sigatoka with chlorothalonil. **Plant Disease**, Saint Paul, v.82, n.11, p.1185-1190, 1998.

WATERMAN, M. R. & LEPESHEVA, G. I. Sterol 14 α -desmethylase, an abundant an essential mixed-function oxidase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.338, p.418-422, 2005.

WAVEFUNCTION, INC. Spartan 04. Copyright © 1991-2003.

WALTERS, P. & STAHL, M. Babel conversor de formatos de arquivos. 1996. Disponível em : <[http:// www.eyesopen.com/babel.html](http://www.eyesopen.com/babel.html)>. Acesso em: 02 fev. 2008.

WEINER, S.J; KOLLMAN, P.A. *et al.* A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. **J. Am. Chem. Soc.**, v.106, p.765-784, 1984..

WERCK-REICHHART, D. & FEYEREISEN, R. Cytochrome P450: a success story. **Genome Biology**, v.1, n.6, p.3003.1-3003.9, 2000.

WILLIAMS, D. H. & WESTWELL, M. S. Aspects of weak interactions. **Chem. Soc. Rev.**, v.27, p.57-63, 1998.

WILLIAMS, P. A. *et al.* The crystallographic structure of a mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. **Mol. Cell.**, v.5, p.209-219, 2000.

WYAND, R. A. & BROWN J. K. M. Sequence variation in the CYP51 gene of *Blumeria graminis* associated with resistance to sterol demethylase inhibiting fungicides. **Fungal Genet. Biol.**, v.42, p.726-735, 2005.

XIAO, L. *et al.* Three-dimensional models of wild-type and mutated forms of cytochrome P450 14 α -sterol demethylases from *Aspergillus fumigatus* insights into posaconazole binding. **Antimicrob. Ag. Chem.**, v.48, n.2, p.568-574, 2004.

YOSHIDA, Y. *et al.* Sterol 14 α -demethylase P450 (CYP51) provides a breakthrough for the discussion on the evolution of cytochrome P450 gene superfamily, **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.273, n.3, p.799-804, 2000.

YOUNG, D. C. **Computational Chemistry: A Practical Guide for Applying Techniques to Real-World Problems.** Nova York: John Wiley & Sons, 2001. 370p.

ZAMPIERI D. *et al.* Synthesis, antifungal and antimycobacterial activities of new bis-imidazole derivatives, and prediction of their binding to P45014DM by molecular docking and MM/PBSA method. **Bioorg. Med. Chem.**, v.15, p.7444-7458, 2007.