



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
MESTRADO

VIVIANE APARECIDA DA SILVA

**Estudo, por modelagem molecular, da
inibição da enzima acetohidroxiácido sintase
utilizando diferentes derivados
pirimidinilsalicilatos**

Uberlândia

2017

VIVIANE APARECIDA DA SILVA

**Estudo, por modelagem molecular, da
inibição da enzima acetohidroxiácido sintase
utilizando diferentes derivados
pirimidinilsalicilatos**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Química,
como requisito parcial para a obtenção do
Título de Mestre em Química.

Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Eduardo de Faria
Franca.

Uberlândia

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S586e Silva, Viviane Aparecida da, 1986-
2017 Estudo por modelagem molecular da inibição da enzima
Acetohidroxiácido sintase utilizando diferentes derivados
pirimidinilsalicilatos / Viviane Aparecida da Silva. - 2017.
67 f. : il.

Orientador: Eduardo de Faria Franca.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Química.
Inclui bibliografia.

1. Química - Teses. 2. Herbicidas - Teses. 3. Enzimas - Teses. 4.
Físico-química - Teses. I. Franca, Eduardo de Faria. II. Universidade
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. III.
Título.

CDU: 66.0



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 255/PPQUI.

DATA: 31/03/2017

DISCENTE: Viviane Aparecida da Silva

MATRÍCULA: 11512QMI015

TÍTULO DO TRABALHO: Estudo, por modelagem molecular, da inibição da enzima acetohidroxiácido sintase utilizando diferentes derivados pirimidinilsalicilatos.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Físico-Química de Macromoléculas e Colóides

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Controle molecular no desenvolvimento de nanobiossensores.

Às quatorze horas do dia trinta e um de março do ano dois mil e dezessete, no Auditório Prof. Dr. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, Bloco 5I, no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Osmair Vital de Oliveira, do Instituto Federal de São Paulo, Silvana Guilardi e Eduardo de Faria Franca, da Universidade Federal de Uberlândia, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Interna nº 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e A provou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será O MESMO

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 60 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 18 horas e 15 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Osmair Vital de Oliveira

IFET-SP

Profª Dra. Silvana Guilardi – UFU

Orientador(a): Prof Dr. Eduardo de Faria Franca – IQUFU

Aos meus pais Emidio Cunha e Ilizabete pela
força e apoio em todos os momentos de minha
vida, ao meu namorado Jefferson pelo apoio
carinho e compreensão, aos meus irmãos, aos
meus familiares e amigos.

Agradeço ao Professor Eduardo pela paciência apoio e dedicação durante a orientação deste trabalho. Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade da realização do curso. A todos do laboratório de Cristalografia e Química Computacional e aos professores pelos conhecimentos ensinados.

“Só é lutador quem sabe lutar consigo mesmo”.

Carlos Drummond de Andrade

Resumo

Os herbicidas inibidores da enzima acetohidroxiácido sintase (AHAS) apresentam alta eficiência na atividade inibitória com baixas doses de aplicação com baixa toxicidade para o homem e o meio ambiente. No entanto, várias ervas daninhas estão obtendo resistência a algumas classes de herbicidas, principalmente no caso do grupo AHAS. Portanto, um planejamento computacional adequado de novos compostos bioativos é área crucial para modelar novos herbicidas. Neste estudo, as interações enzima-herbicida foram analisadas a partir do derivado análogo do grupo pirimidinilsalicilato (PSA) que são inibidores de AHAS usando cálculos mecânico-quânticos e de docking molecular. As propriedades moleculares obtidas mostraram que o volume e a área molecular podem influenciar a capacidade de inibição do ligante, mesmo que o grupo substituinte tenha mais influência sobre este parâmetro. As propriedades eletrônicas dos orbitais HOMO podem certamente influenciar a atividade biológica devido à sua capacidade de doação de elétrons. As energias livres de ligação do ligante na enzima após o cálculo de docking variaram de -1,88 a - 4,50 kcal mol⁻¹, enquanto que H, CH₃, COCH₃, OH, NO₂ e NH₂ apresentaram as melhores energias de ligação pontuadas como grupos substituintes. Estas energias livres de ligação favoráveis podem ser justificadas pelas interações intermoleculares entre ligantes de PSAs e resíduos de sítio ativo de AHAS. Em termos de eficiência, a formação de ligações de hidrogênio pode ser explicada pelo grupo carboxilato a partir dos ligantes e do grupo ARG-377 de AHAS.

Palavras-chave: herbicidas, pirimidinilsalicilatos (PSA) , enzima AHAS, docking molecular, interações moleculares.

Abstract

Herbicides inhibitors of the enzyme acetohydroxyacid synthase (AHAS) present high efficiency in the inhibitory activity with low doses of application and low toxicity for man and the environment. However, several weeds are getting resistance to some classes of herbicides, mainly in the case of AHAS group. Therefore, a proper computational planning of new bioactive compounds is crucial area to model new herbicides. In this study, the enzyme-herbicide interactions were analyzed from the analogous derivated of the pyrimidinylsalicylates group (PSA) which are AHAS inhibitors using quantum-mechanical and molecular docking calculations. The molecular properties obtained after running computer calculation shown that the volume and molecular area can make influence on the inhibition capacity of the ligand, nevertheless, the substituent group has more influence on this parameter. Electronical properties from the HOMO orbitals can certainly make influence on the biological activity due its electron donor capability. The binding free energies of the ligand on the enzyme after docking calculation ranged from -1.88 to 4.50 kcal mol⁻¹, whereas, H, CH₃, COCH₃, OH, NO₂ and NH₂ had the best scored binding energies as substituent groups. Those favorable binding free energies can be justified by the intermolecular interactions between PSAs ligands and AHAS active site residues. In terms of efficiency, hydrogen bonds formation can be explained by carboxylate group from the ligands and ARG-377 group from AHAS.

Keywords: herbicides, pyrimidinylsalicylates (PSA), AHAS enzyme, molecular docking, molecular interactions

Lista de Figuras

Figura 1 Estrutura geral dos aminoácidos encontrados em proteínas	3
Figura 2 - Os 20 aminoácidos primário das proteínas, mostrando o seu estado de ionização onde predomina o pH 7. As partes sombreadas mostram os grupos R, que mudam em cada um dos aminoácidos.	4
Figura 3- Formação de uma ligação peptídica por condensação.....	5
Figura 4- Cadeia peptídica, em amarelo a cadeia principal e em rosa as cadeias laterais.	5
Figura 5- Representação da estrutura química das moléculas TPP (A) e FAD (B).	7
Figura 6- Estrutura cristalina da enzima Acetohidroxiácido sintase no complexo com os cofatores FAD e TPP.....	8
Figura 7- Estrutura do Imidazol.....	9
Figura 8- Estruturas químicas do grupo das Imidazolinonas: a) Imidazolinona quinolina; b) Imidazolinona piridina e c) Imidazolinona benzeno	9
Figura 9- Estruturas gerais de salicilatos de O- (4,6-dimetoxipirimidin-2-il) e tio salicilatos.	11
Figura 10- Deformação no comprimento de ligação.....	14
Figura 11- Deformação no ângulo de ligação.	15
Figura 12- Ângulo de torção (θ) com um valor de 180°	16
Figura 13- Aplicação da metodologia de docking molecular do modo ligante ao seu sítio de ligação na enzima.....	22
Figura 14- Esquema de um acoplamento mostrando os possíveis modos de ligação e a pontuação (energia de ligação em kcal/mol) de cada orientação do ligante.	23
Figura 15- Esquema de um mapa de grid.	24
Figura 16- Esquema de funcionamento do algoritmo genético utilizado no programa AutoDock 4.0.	25
Figura 17- Mutação em um ponto do cromossomo.....	26
Figura 18- Protótipos dos quais os herbicidas são formados de acordo com cada substituinte diferente. A- protótipo pirimidinilsalicilatos. B- protótipo pirimidinil(tio)salicilatos.	27
Figura 19- Estruturas dos 14 herbicidas (análogos) derivados dos pirimidinilsalicilatos e pirimidinil (tio) salicilatos.	28
Figura 20- Arquivo gpf gerado no programa AutoDock 4.0.....	32

Figura 21- Caixa de grade de 64x60x126, localizado no sítio ativo da AHAS.....	33
Figura 22- Análise das conformações.	35
Figura 23- Estruturas otimizadas.....	36
Figura 24- Estruturas dos PSAs mostrando os orbitais HOMO (programa jmol).....	42
Figura 25- Mapas de potencial eletrostático dos PSAs.	43
Figura 26- Estruturas dos PSAs com o grupo substituinte OC ₆ H ₅ em diferentes posições.	45
Figura 27- Ilustração do PSA 01 e PSA 07 ancorados no sítio ativo da enzima Acetohidroxiácido Sintase (AHAS). Representação da enzima em superfície.	46
Figura 28- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligando PSA01 e os principais aminoácidos interagindo do local de ligação da enzima AHAS.....	46
Figura 29- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligando PSA02 e os principais aminoácidos interagindo do local de ligação da enzima AHAS.....	47
Figura 30- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligando PSA03 e os principais aminoácidos interagindo do local de ligação da enzima AHAS.....	47
Figura 31- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligando PSA04 e os principais aminoácidos interagindo do local de ligação da enzima AHAS.....	48
Figura 32- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligando PSA05 e os principais aminoácidos interagindo do local de ligação da enzima AHAS.....	49
Figura 33- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligando PSA06 e os principais aminoácidos interagindo do local de ligação da enzima AHAS.....	49
Figura 34- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligando PSA07 e os principais aminoácidos interagindo do local de ligação da enzima AHAS.....	50
Figura 35- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligando PSA08 e os principais aminoácidos interagindo do local de ligação da enzima AHAS.....	51

Figura 36- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligando PSA09 e os principais aminoácidos interagindo do local de ligação da enzima AHAS.....	51
Figura 37- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligando PSA10 e os principais aminoácidos interagindo do local de ligação da enzima AHAS.....	52
Figura 38- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligando PSA11 e os principais aminoácidos interagindo do local de ligação da enzima AHAS.....	53
Figura 39- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligando PSA12 e os principais aminoácidos interagindo do local de ligação da enzima AHAS.....	53
Figura 40- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligando PSA13 e os principais aminoácidos interagindo do local de ligação da enzima AHAS.....	54
Figura 41- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligando PSA14 e os principais aminoácidos interagindo do local de ligação da enzima AHAS.....	54
Figura 42- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligando PSA15(comparação) e os principais aminoácidos interagindo do local de ligação da enzima AHAS.	55

Lista de Tabelas

Tabela 1- Derivados análogos dos PSAs e seus respectivos substituintes	27
Tabela 2- Parâmetros geométricos calculados pelo programa MOPAC, 2016.	38
Tabela 3- Resultados dos cálculos de energia dos orbitais HOMO e LUMO em (eV) e seus respectivos valores de pIC ₅₀	40
Tabela 4- Resultados de docking para a enzima AHAS.....	44

Lista de Abreviaturas e Siglas

AffinDB: Base de Dados de Afinidade para Complexos de Proteína-Ligante.

AHAS: Acetohidroxiácido Sintase

ALS : Acetolactato Sintase

AM1: *Austin Model 1*

CP: *Conformation Player*

DFT: Teoria do Funcional de Densidade

Dpf: Arquivo de parâmetro de ancoragem (*docking parameter file*)

FAO: Órgão das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura

GA: Algoritmos Genéticos

Gpf: Arquivo de parâmetro de grade (*grid parameter file*)

HF: *Hartree-Fock*

HOMO: Ultimo Orbital Molecular Ocupado (*High Occupied Molecular Orbital*)

Ile: Isoleucina

Leu: Leucina

LGA: Algoritmo Genético Lamarckiano (*Lamarckian Genetic Algorithm*)

LUMO: Primeiro Orbital Molecular Desocupado (*Lower Unoccupied Molecular Orbital*)

MM: Modelagem molecular

MO: Orbital Molecular

MC: Monte Carlo

ONU: Organização das Nações Unidas

PDB: *Protein Data Bank*

PLD: Dispositivos de Logica Programável

PM3: *Parametric Method 3*

PM6: *Parametric Method 6 Hamiltonian*

PM7: *Parameterized Model number 7*

PSA: Pirmidinilsalicilato

RMSD: *Root Mean Square Devitation*

SCF : *Self-Consistent-Field*

SINDIVEG: Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal

Val: Valina

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Agrotóxicos.....	1
1.2 Aminoácidos e proteínas	3
1.3 Enzimas	5
1.4 Herbicidas inibidores da enzima Acetohidroxiácido Sintase (AHAS)	8
1.5 Pirimidinilsalicilatos e pirimidinil (tio) salicilatos	10
2.OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral:	12
2.2 Objetivos específicos:	12
3.FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	13
3.1 Modelagem molecular (MM).....	13
3.2 Mecânica Molecular	13
3.2.1 Potencial de ligação	14
3.2.2 Potencial angular.....	15
3.2.3 Potencial Torcional	16
3.2.4 Potencial de Leonnard-Jones (ou de van der Waals).....	17
3.2.5 Potencial de Coulomb	17
3.3 Mecânica quântica.....	17
3.4 Docking Molecular	21
4. METODOLOGIA.....	27
4.1- Cálculos semi-empíricos	27
4.2 Docking Molecular	31

4.2.1 Preparação dos arquivos do AutoDock.....	31
4.2.2 Análise dos resultados.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
5.1 Otimização das estruturas	36
5.2 Docking molecular.....	43
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
7. TRABALHOS FUTUROS.....	57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1. INTRODUÇÃO

1.1 Agrotóxicos

O crescimento da população mundial alterou significativamente a produção agrícola, pois houve um grande aumento na demanda da quantidade de alimentos produzidos, provocando assim cada vez mais o uso de produtos químicos para controlar pragas e doenças que prejudicam as plantações (BEDOR, 2008). O uso de pesticidas se iniciou durante a segunda guerra Mundial, onde os venenos que eram fabricados como armas químicas se tornaram grandes aliados para os agricultores no combate de pragas (LONDRES, 2011). Inovações tecnológicas modificaram bastante a agricultura nos últimos anos, o implemento de maquinários geraram grandes mudanças nos processos de trabalho aumentando a produtividade (JACOBSON et al., 2009).

O presente modelo agrário brasileiro baseia-se em cultivos para exportação, fazendo uso de tecnologias avançadas e ampla utilização de agrotóxicos (PORTO e SOARES, 2012). Diante disso, a produção agrícola brasileira cresceu muito nos últimos anos, levando o Brasil no ano de 2008 a alcançar a posição de maior consumidor mundial de agrotóxicos, chegando a US\$ 7 bilhões em vendas desses produtos químicos (LONDRES, 2011). De acordo com o SINDIVEG, em 2015 houve um decréscimo nas vendas de agrotóxicos em relação ao ano de 2014, atingindo US\$ 9,6 bilhões de dólares sendo um número ainda bastante elevado.

A ampla utilização dos agrotóxicos trouxe consigo um grave problema, pois a exposição pelo uso desses produtos químicos pode trazer sérios danos à saúde. Além das intoxicações, podem ocorrer também vários distúrbios crônicos, como efeitos neurológicos e câncer. Várias são as informações sobre pessoas que desenvolveram doenças provocadas pelos agrotóxicos, muitas vezes ocasionando sérias consequências e em casos mais graves levando a morte (LONDRES, 2011). Em varias regiões do Brasil são encontrados excessivos níveis de contaminação por agrotóxicos, humana e ambiental e fatores como o descumprimento das normas de segurança e a fácil comercialização, contribuem para que isso ocorra (CASSAL et al., 2014). Outra situação preocupante é com os aviões pulverizadores, que em geral contaminam o ar, atingindo varias áreas através da dispersão de produtos químicos, podendo afetar também os rios e o solo (JACOBSON, 2009).

Segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO), programa da Organização das Nações Unidas (ONU) responsável pelas áreas de agricultura e

alimentação, os agrotóxicos, também conhecidos como pesticidas, são definidos como quaisquer substâncias ou misturas de substâncias usadas para prevenir ou combater qualquer praga. Isto inclui vetores de doenças humanas e também em animais, espécies indesejáveis de plantas e animais que podem provocar danos durante a produção agrícola, processamento, armazenamento, transporte e distribuição dos alimentos (FAO, 2003).

Segundo Taylor, Holley e Kirk (2007) existem vários tipos de pesticidas, os mais comuns são:

- Fungicidas - utilizados para o combate de fungos;
- Herbicidas - atuam no combate de ervas daninhas;
- Inseticidas - empregado no combate de insetos e outros artrópodes;
- Algicidas - aplicado no controle de algas;
- Acaricidas - utilizados no combate de ácaros;

Dentre a classe dos agrotóxicos os herbicidas são os mais vendidos no país, eles representam cerca de 60% das vendas (SINDIVEG, 2015), e são utilizados para controlar e matar plantas daninhas que podem afetar áreas de cultivos agrícolas e outros locais (RODRIGUES e ALMEIDA, 1998). O aumento na utilização dos herbicidas pode estar relacionado também com o fato de que esses pesticidas são bastante utilizados principalmente em culturas de soja e milho que são tipos de produções que vem crescendo bastante nos últimos anos (VELASCO, 2006). As plantas daninhas são aquelas plantas indesejáveis, que infestam áreas de cultivos agrícolas, causando interferência no desenvolvimento e produtividade das plantações e trazendo prejuízos para os agricultores. A competição é umas das formas mais notáveis de interferência nas plantações agrícolas, pois ocorre uma concorrência por água, nutrientes, luz, e espaço (PITELLI, 1987).

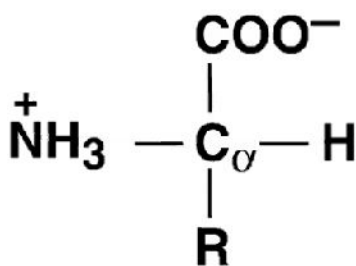
Os herbicidas podem ser classificados como seletivos e não seletivos, dependendo da sua capacidade de matar determinadas plantas daninhas. Os seletivos matam apenas a planta daninha sem causar efeitos prejudiciais nas plantações, já os não seletivos além de matar a planta daninha podem afetar também a cultura agrícola podendo trazer sérios prejuízos. A classificação para os herbicidas com base no seu mecanismo de ação pode ser dividida em dois grupos: enzimático, que é quando o herbicida exerce sua ação sobre alguma enzima do metabolismo da planta e não

enzimático que é quando não ocorre ligação com nenhuma enzima específica (CARVALHO, 2013).

1.2 Aminoácidos e proteínas

As proteínas são macromoléculas orgânicas que têm grande diversidade de funções biológicas. Suas subunidades monoméricas basicamente simples são essenciais para a formação de estruturas de milhares de proteínas diferentes, e são constituídas por um conjunto de 20 aminoácidos e cada um deles apresenta uma cadeia lateral diferente. (NELSON e COX, 2014).

Figura 1 Estrutura geral dos aminoácidos encontrados em proteínas

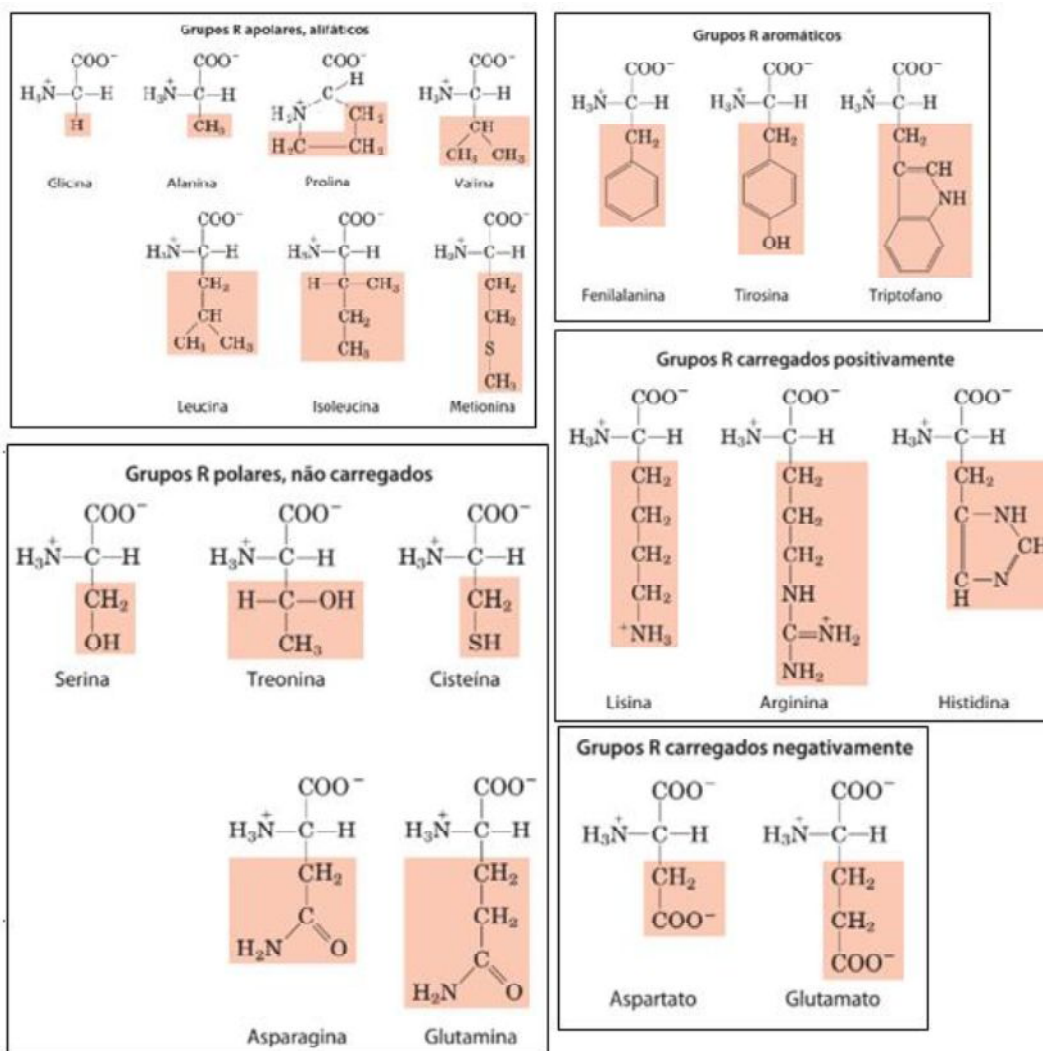


(Adaptado: NELSON e COX, 2014).

Todos os 20 aminoácidos encontrados nas proteínas são α – aminoácidos. Eles apresentam um grupo carboxila, grupo amino e um átomo de hidrogênio ligados no mesmo átomo de carbono (carbono α) como mostrado na Figura 1, diferenciando-se uns dos outros pela cadeia lateral ou R, diversificando a estrutura, carga elétrica e tamanho, exercendo influencia na solubilidade desses aminoácidos em água. O átomo de carbono é, portanto, um centro quiral, com exceção da Glicina, pois seu carbono alfa não é assimétrico (NELSON e COX, 2014).

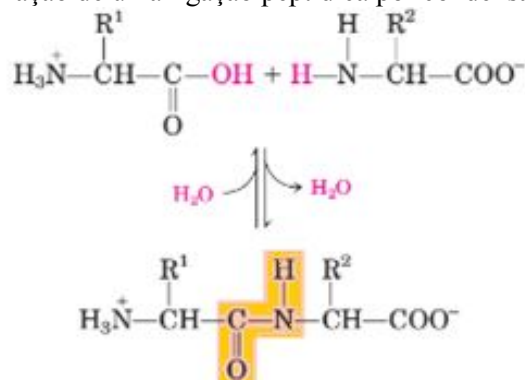
Existem além desses 20 aminoácidos principais outros menos comuns. Várias proteínas contêm aminoácidos incomuns constituídos por modificação de resíduos existentes após a sua síntese (NELSON e COX, 2014). Na Figura 2 estão presentes os 20 aminoácidos primários das proteínas.

Figura 2 - Os 20 aminoácidos primário das proteínas, mostrando o seu estado de ionização onde predomina o pH 7. As partes sombreadas mostram os grupos R, que mudam em cada um dos aminoácidos.



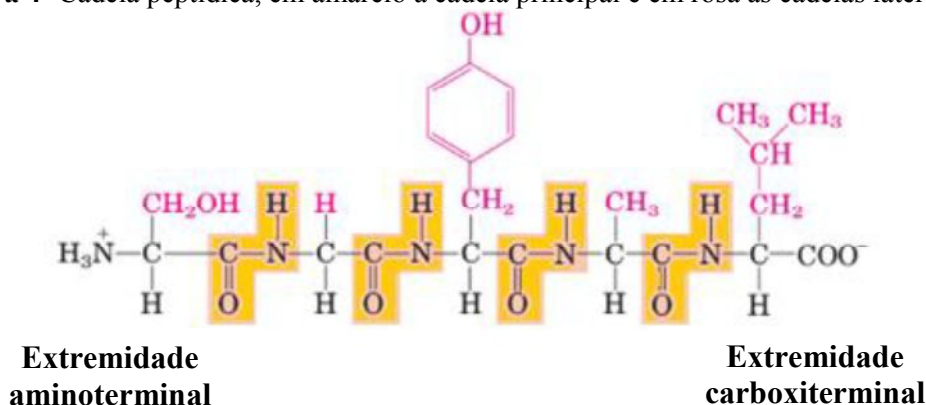
Fonte: NELSON e COX, 2014.

As propriedades das cadeias laterais são de grande importância para a conformação das proteínas, deste modo também para sua função. Quando há a união de dois aminoácidos a ligação formada é chamada peptídica, que se trata de uma reação de condensação, e ocorre por desidratação de um grupo α carboxila de um aminoácido e de um grupo α amino do outro como mostrado na Figura 3, (NELSON e COX, 2014).

Figura 3- Formação de uma ligação peptídica por condensação

(Adaptado NELSON e COX, 2014).

A união de três aminoácidos por ligações peptídicas formam um tripeptídeo, já quando muitos desses aminoácidos se ligam, formam-se cadeias polipeptídicas sendo esta cadeia formada por uma parte que se repete regularmente denominada cadeia principal. Existe uma parte variável chamada cadeias laterais como mostrado na Figura 4. (NELSON e COX, 2014).

Figura 4- Cadeia peptídica, em amarelo a cadeia principal e em rosa as cadeias laterais.

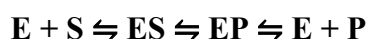
Fonte: (Adaptado NELSON e COX, 2014)

1.3 Enzimas

A maioria das enzimas é de natureza proteica, com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA catalíticas. Algumas enzimas não requerem nenhum outro grupo químico além dos seus resíduos de aminoácidos, mas existem aquelas que necessitam de um componente adicional denominado cofator. A reação de catalisação mediada pelas enzimas ocorre em uma região específica chamada sítio ativo e as forças não covalentes que ligam o substrato ao sítio ativo são as mesmas forças que respondem

a conformação das próprias proteínas como forças de Van der Waals, interações de hidrogênio, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas. Os aminoácidos que se localizam no sítio ativo são arranjados de tal forma que podem interagir com o substrato (NELSON e COX, 2014., SOLOMONS, 2009).

Toda enzima é específica para um substrato e o complexo enzima substrato é de fundamental importância para a ação enzimática. A interação íntima entre uma enzima e seus substratos ocorre através do reconhecimento molecular baseado na complementaridade estrutural (NELSON e COX, 2014).



E, S e P estão representando a enzima, o substrato e o produto, ES e EP são complexos formados durante a reação enzimática. As enzimas são catalizadores intensamente eficientes, que em geral aumentam a velocidade das reações por um fator de 10^5 a 10^{17} . A energia derivada das interações entre a enzima e o substrato é chamada de energia de ligação. A atividade das enzimas pode ser interrompida ou inibida por um vasto número de substâncias chamadas de inibidores (NELSON e COX, 2014).

O presente trabalho está relacionado diretamente com a enzima Acetohidroxiácido Sintase (AHAS) e os seus inibidores derivados do grupo dos pirimidinilsalicilatos (PSA).

A enzima Acetohidroxiácido Sintase (AHAS) atua na rota biossintética dos aminoácidos de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina, porém em alguns microrganismos tem a função de formação do butanodiol e compostos relacionados através da fermentação. As nomenclaturas acetohidroxiácido sintase e acetolactato sintase são encontradas das duas formas na literatura, entretanto ALS seria para a forma catabólica da enzima, que é responsável pela fermentação do 2,3-butanodiol e compostos relacionados. Enquanto que AHAS para a forma anabólica, ou seja, ela está compreendida na síntese dos aminoácidos supracitados (DUGGLEBY e PANG, 2000).

A enzima AHAS necessita de três cofatores para exercer sua ação, o íon inorgânico Mg^{2+} , a Tiamina Difosfato (TPP, do inglês Thiamin Diphosphate) e o Dinucleotídeo de Flavina e Adenina (FAD, do inglês Flavin Adenine Dinucleotide).

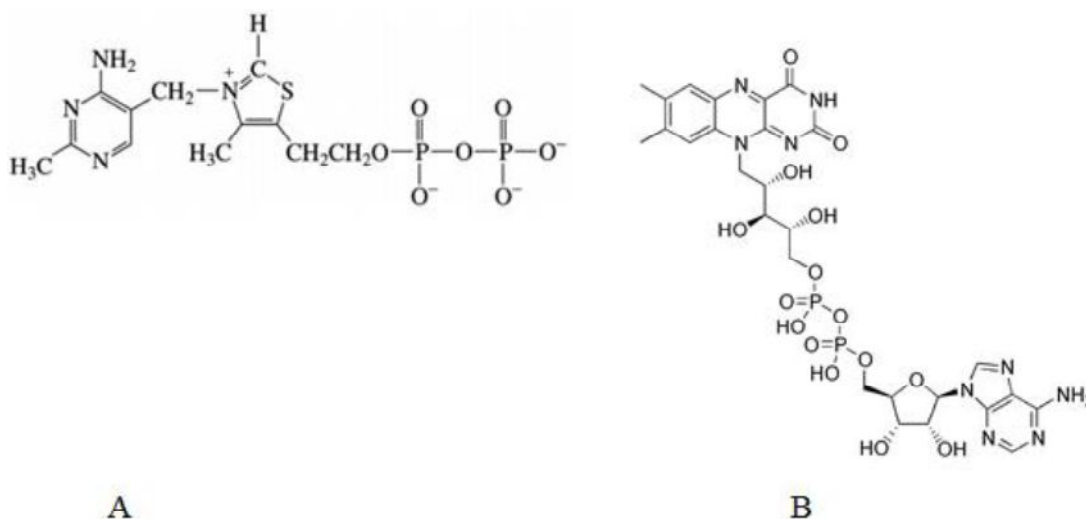
- Tiamina Difosfato (TPP): Este cofator é encontrado no sítio ativo da enzima, interagindo com o íon metálico Mg^{2+} por interações de hidrogênio e interações de Van der Waals (PANG; DUGGLEBY;

GUDDAT, 2002). Íon metálico divalente: a enzima AHAS depende do íon Mg^{2+} que tem como função ancorar a TPP na estrutura da enzima coordenando-se a dois dos átomos de oxigênio fosfato e duas cadeias laterais de aminoácidos (CHANG; DUGGLEBY, 1998).

- Dinucleotídeo de Flavina e Adenina (FAD): A presença do FAD como cofator na enzima AHAS ainda não é bem compreendida, apesar disso sabe-se que a enzima AHAS depende da presença desse cofator para exercer sua atividade (CHANG; DUGGLEBY, 1998).

A Figura 5 ilustra a representação estrutural das moléculas de TPP e FAD.

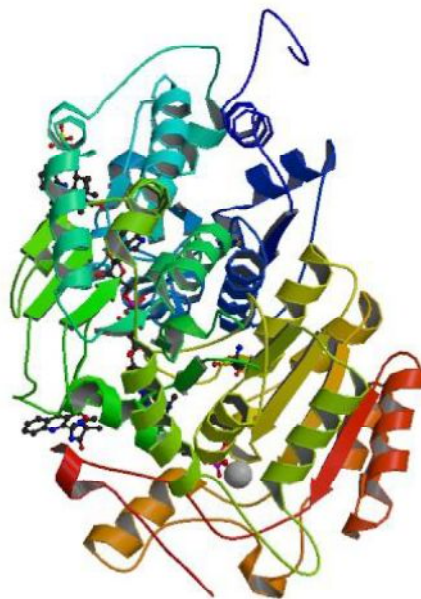
Figura 5- Representação da estrutura química das moléculas TPP (A) e FAD (B).



Fonte: o autor (programa ChemSketh).

Inúmeras estruturas tridimensionais de macromoléculas biológicas podem ser encontradas na base de dados RCBS PDB (Protein Data Bank). A estrutura da enzima AHAS utilizada neste trabalho é encontrada na base de dados registrada sob o código PDB 1Z8N (MCCOURT et al., 2006)

Figura 6- Estrutura cristalina da enzima Acetohidroxiácido sintase no complexo com os cofatores FAD e TPP. (Representação tipo new cartoon).



Fonte: (Protein Data Bank).

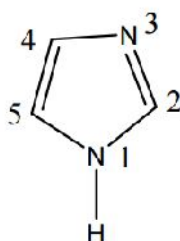
1.4 Herbicidas inibidores da enzima Acetohidroxiácido Sintase (AHAS)

Inibidores são substâncias que diminuem a atividade enzimática, eles atuam como reguladores das vias metabólicas. As inibições enzimáticas podem ser do tipo reversível, onde a enzima retoma a sua atividade após se dissociar do inibidor ou então irreversível onde ocorre uma inativação permanente e envolve alterações químicas na molécula da enzima (MOTTA, 2011).

Um dos vários grupos de herbicidas utilizados são aqueles chamados inibidores da enzima acetohidroxiácido sintase (AHAS), que atua na rota biossintética dos aminoácidos de cadeia ramificada, valina, leucina e isoleucina. O mecanismo de ação desses herbicidas se baseia na interrupção da síntese proteica, prejudicando o crescimento celular. As plantas morrem cerca de 7 a 14 dias após a aplicação do herbicida (DUGDLEBY e PANG, 2000). Diferentes grupos químicos de herbicidas apresentam esse mecanismo de ação, como as sulfoniluréias, imidazolinonas, sulfonamidas, pirimidinilsalicilatos, entre outros. Esses quatro grupos citados destacam-se em alguns aspectos, como baixa toxicidade em mamíferos, baixas taxas de aplicação, e apresentam uma boa seletividade das culturas. Entretanto muitas plantas daninhas tem apresentado resistência a certos tipos de herbicidas, levando ao desenvolvimento e a inserção de novos produtos no mercado (DÍAZ e DELGADO, 2009).

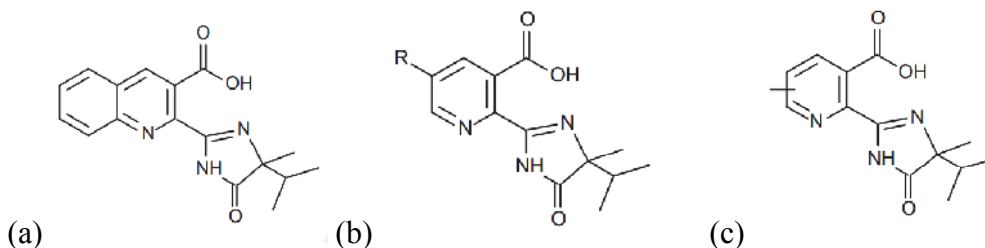
As Imidazolinonas são uma classe de herbicidas bastante utilizadas em culturas agrícolas, destacando-se o Imazaquim que é muito aplicado em culturas de soja para controlar ervas daninhas (SILVA et al., 1999). Os herbicidas são absorvidos pelas folhas e raízes das plantas ficando concentrados nos pontos de crescimento fazendo com que as plantas daninhas parem de se desenvolver. Os herbicidas que compõem a classe das Imidazolinonas incluem o imazaquim, imazapyr, imazapic, imazamox, imazethapyr, e todas essas moléculas apresentam a estrutura do imidazol (Figura 6) em comum diferenciando-se uns dos outros pela segunda estrutura cíclica (KRAEMER et al., 2009).

Figura 7- Estrutura do Imidazol.



Fonte: o autor (programa ChemSketch)

Figura 8- Estruturas químicas do grupo das Imidazolinonas: a) Imidazolinona quinolina; b) Imidazolinona piridina e c) Imidazolinona benzeno



Fonte: KRAEMER, 2009.

Esse três grupos mostrados na Figura 7 apresentam diferenças na capacidade de inibição da enzima AHAS, indicando a importância desses substituintes no processo de inibição enzimática (KRAEMER, 2009).

Os herbicidas do grupo das sulfoniluréias também são bastante utilizados, pois com pequenas doses de aplicação apresentam uma elevada atividade biológica. Essa classe de herbicidas é absorvida através do solo e também pelas folhas, e sua degradação no solo se dá, tanto por degradação microbiana, quanto por hidrólise e os

herbicidas desse grupo são ácidos fracos apresentando um pK_a entre 3 e 5. Outra característica das sulfoniluréias é apresentar baixa pressão de vapor, fazendo com que perdas por volatilização sejam mínimas (BRIGHENTI e OLIVEIRA, 2011).

O uso de herbicidas inibidores da enzima AHAS vem crescendo bastante nos últimos anos, devido suas características favoráveis como baixa toxicidade e boa seletividade, porém já foram registrados em todo o mundo 365 biótipos resistentes aos herbicidas, e dentre eles 31% são de plantas daninhas resistentes aos herbicidas inibidores da enzima AHAS (ROSO e VIDAL, 2011).

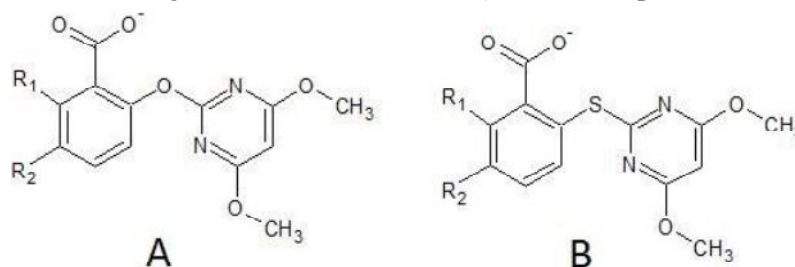
Algumas formas de explicar o motivo pelo qual as plantas daninhas se tornam resistentes aos herbicidas se baseiam no fato de que pode haver uma diminuição da concentração do herbicida no sítio ativo da enzima, e também a perda de afinidade do herbicida pelo sítio ativo, fazendo com que a inibição não ocorra. A resistência das plantas daninhas aos herbicidas inibidores da enzima AHAS, é provocada por uma alteração no gene que é responsável pela codificação da enzima AHAS, afetando a sequência de aminoácidos fazendo com que estes herbicidas não consigam mais inibir a enzima (CHRISTOFFOLET, 2008).

1.5 Pirimidinilsalicilatos e pirimidinil (tio) salicilatos

Os compostos à base de ácido pirimidinilsalicílico (PSA) possuem uma potente atividade herbicida. Esta atividade foi detectada como um resultado da inibição da enzima Acetohidroxiácido sintase (AHAS). Infelizmente, este grupo de compostos ainda é mal caracterizado partindo do ponto de vista físico-químico. A ausência de informação tem bloqueado a avaliação do seu impacto no ambiente. A complexidade de se obter valores experimentais precisos resulta principalmente das limitações das técnicas analíticas, dos custos, da segurança e do tempo. Por esse motivo prever estas propriedades é muito útil antes da realização da síntese (DELGADO, 2011; DÍAZ e DELGADO, 2009).

O grupo dos pirimidinilsalicilatos e tio salicilatos são uma classe de herbicidas inibidores da enzima AHAS, apresentando alta capacidade de inibição. Esse grupo de herbicidas possui o mecanismo de ação das sulfonilureias, sulfonamidas e imidazolinonas. A estrutura desses compostos se baseia em análogos derivados das estruturas gerais de O- (4,6-dimetoxipirimidin-2-il) salicilatos e tio salicilatos (DÍAZ e DELGADO, 2009).

Figura 9- Estruturas gerais de salicilatos de O- (4,6-dimetoxipirimidin-2-il) e tio salicilatos.



Fonte: (Adaptado Díaz e Delgado, 2009).

O efeito dos substituintes R introduzidos em várias posições do anel benzeno é bastante interessante, tornando importante compreender quais as características estruturais dos herbicidas são responsáveis pela inibição da enzima sendo essencial para a criação de novos herbicidas. Evidências empíricas indicam que o grupo carboxilato dos pirimidinilsalicilatos é importante para inibição da enzima AHAS, sendo também responsável pela ligação da molécula inibidora a enzima (DÍAZ e DELGADO, 2009; NEZU et al ., 1998).

As enzimas são proteínas que são ativas sob condições de reações relativamente amenas com temperatura abaixo de 100°C, pressão atmosférica e pH basicamente neutro. Consequentemente os herbicidas do grupo pirimidinilsalicilatos nestas condições de pH se encontram na forma aniônica onde seus valores de pka ficam em torno de 3,5 a 5 (DÍAZ e DELGADO, 2009).

O planejamento e descoberta de novos compostos bioativos geram bastante expectativa para pesquisas nesta área, principalmente com o auxílio de ferramentas computacionais que estão sendo muito utilizadas atualmente. Portanto, a compreensão sobre as propriedades destas estruturas antes da síntese pode ser de suma importância para alcançar a estrutura desejada.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Analisar por meio da modelagem molecular a capacidade de inibição de uma série de análogos pirimidinilsalicilatos inibidores da enzima AHAS mediante cálculos quânticos e *docking* molecular.

2.2 Objetivos específicos:

- Comparar a energia de interação ligante (herbicida)- biomacromolécula (enzima) com a atividade biológica de uma série de análogos derivados de pirimidinilsalicilatos (PSA);
- Calcular propriedades físico-químicas e parâmetros estruturais com intuito de correlaciona-los à atividade biológica inibitória dos herbicidas;
- Analisar a energia de interação entre a enzima AHAS e os herbicidas derivados dos PSAs via cálculos de *docking* molecular;
- Avaliar as interações existentes entre os aminoácidos da enzima constituintes do sítio ativo com o ligante;

3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1 Modelagem molecular (MM)

A utilização de métodos computacionais tem se tornado bastante ampla atualmente, principalmente no estudo e planejamento de novos compostos bioativos. A ação das moléculas bioativas é bastante complexa, e envolve interações de fundamental importância para seu efeito biológico ou farmacológico. As interações podem ser essenciais para determinar a ação da molécula bioativa (SANT'ANNA, 2009).

As técnicas de modelagem molecular possibilitam uma maneira de explorar sistematicamente os padrões estruturais, dinâmicos e termodinâmicos, buscando interpretar e aprimorar dados experimentais. Baseia-se também na compreensão das leis que estão relacionadas com a flexibilidade, a função e a estrutura da molécula (COMBA, 2009).

Duas aproximações que têm sido usadas principalmente em estudos de modelagem molecular são a aproximação clássica, que engloba os métodos da mecânica molecular e da dinâmica molecular, e a aproximação quântica, que compreende os métodos *ab initio* e semi-empíricos. De maneira geral, a escolha entre estas aproximações necessita das propriedades que se pretende avaliar, da precisão desejada e da capacidade computacional acessível para o procedimento de realização dos cálculos (BARREIRO et al., 1997; SANT'ANNA, 2009).

Em resumo, a finalidade da modelagem molecular é o uso de modelos teóricos, em escala atômica, que permitam a manipulação de estruturas moleculares e a análise do comportamento químico objetivando relatar ou interpretar as propriedades macroscópicas utilizando uma série de técnicas computacionais que viabilizam a construção, a visualização, a manipulação e a estocagem de modelos moleculares tridimensionais (LEACH, 2001).

3.2 Mecânica Molecular

A Mecânica Molecular é uma estratégia eficiente utilizada para a aplicação da mecânica clássica na determinação de estruturas moleculares em equilíbrio. A metodologia da Mecânica Molecular esta baseada na aproximação de Born-Oppenheimer, onde os movimentos dos núcleos e dos elétrons são tratados separadamente, diferentemente dos métodos quânticos de orbitais moleculares, que

considera a população eletrônica em seus cálculos, para uma posição fixa do núcleo. A superfície de Born-Oppenheimer, que é chamada na mecânica molecular de superfície de energia potencial, é multidimensional e representa a energia de uma molécula em termos das posições nucleares (COELHO et al., 1999).

Na mecânica molecular considera-se que a densidade eletrônica pode ajustar-se instantaneamente a qualquer variação na configuração geométrica dos núcleos, admitindo que os núcleos possuam movimento livre e que todas as interações nucleares são aditivas (COELHO et al., 1999).

Na Mecânica Molecular as moléculas são consideradas como um conjunto de átomos ligados entre si por forças harmônicas ou elásticas (forças newtonianas). Estas forças são descritas pelas funções de energia potencial das contribuições estruturais, e.g. comprimentos de ligação (r), ângulos de ligação (θ), ângulos diedros (ϕ) e interações não ligadas: como o potencial de Leonard-Jones (d) ou Van der Waals e o potencial Coulomb (c). Essas forças quando somadas formam o campo de força (Equação. 1), que contem parâmetros ajustáveis que são otimizados para encontrar o melhor conjunto de propriedades da molécula avaliando os movimentos nucleares e dos elétrons (BARREIRO e FRAGA, 2015; COELHO et al., 1999).

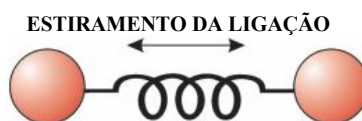
$$U = U(r) + U(\theta) + U(\phi) + U(d) + U(c) \quad \textbf{Equação 1}$$

A hipótese fundamental do método da Mecânica Molecular é a transferência dos parâmetros. A descrição dos termos da equação 1 são descritas a seguir.

3.2.1 Potencial de ligação

Termo associado ao estiramento da ligação entre dois átomos diretamente ligados, como mostrado na Figura 10, ou seja, é a contribuição de energia potencial necessária para comprimir ou alongar uma ligação em relação ao seu comprimento original.

Figura 10- Deformação no comprimento de ligação.



Fonte: (Adaptado, RODRIGUES, 2001).

É utilizada a lei de Hooke, que contribui para a energia potencial total da molécula da equação abaixo:

$$U_r = \frac{1}{2} \sum k_r (r_n - r_o)^2 \quad \text{Equação 2}$$

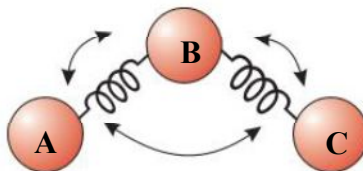
onde, k_r representa a constante de força, r_n o comprimento de ligação e r_o o comprimento de ligação em equilíbrio, sendo r_n e r_o parâmetros do campo de força (BARREIRO e FRAGA, 2015; COELHO et al., 1999).

3.2.2 Potencial angular

$U(\theta)$ é o potencial harmonico que representa a deformação angular entre três átomos A, B e C, onde ha uma ligação entre A e B e entre B e C como apresentado na Figura 11.

Figura 11- Deformação no ângulo de ligação.

DEFORMAÇÃO ANGULAR ENTRE OS ATOMOS



Fonte: (Adaptado, RODRIGUES, 2001).

A aproximação harmônica se dá frequentemente por meio da serie de Taylor expandida ate a segunda ordem sobre o ângulo de ligação.

$$U(\theta_{ABC}) = \frac{1}{2} K_{ABC} (\theta_{ABC} - \theta_{ABC,eq})^2 \quad \text{Equação 3}$$

onde, K_{ABC} é a constante de força, θ_{ABC} o ângulo de ligação instantâneo e o $\theta_{ABC,eq}$ o ângulo de ligação em equilíbrio (BARREIRO e FRAGA, 2015; COELHO et al., 1999; CRAMER, 2004).

3.2.3 Potencial Torcional

Termo associado às rotações internas das ligações simples, Figura 12, ou seja, é a contribuição da energia potencial de torção em torno da ligação A2-A3, em um seguimento de quatro átomos, A1-A2-A3-A4, onde A1-A2, A2-A3 e A3-A4 estão conectados entre si. Estes ângulos diedrais, que apresentam liberdade periódica de torção, são formados por quatros átomos em sequência onde os três primeiros formam um plano que faz um ângulo com o plano formado pelos três últimos.

Figura 12- Ângulo de torsão (θ) com um valor de 180° .



Fonte: (Adaptado, RODRIGUES, 2001).

Muitos campos de força são empregados para modelar moléculas flexíveis nas quais as principais modificações conformacionais são devidas a rotações em torno de ligações. A grande maioria dos campos de força para moléculas orgânicas emprega o uso de potenciais torcionais explícitos, também chamados de potenciais próprios, com uma contribuição de cada quarteto de átomos A1-A2-A3-A4 conectados sequencialmente no sistema. O potencial torcional é normalmente definido por:

$$U(\varphi) = k_{\varphi}(1 + \cos(n\varphi - \delta)) \quad \text{Equação 4}$$

onde, k_{φ} é a constante que define a extensão da barreira energética para torsão, n é o número de mínimos na curva de energia potencial versus ângulo de torsão, φ é o ângulo diedral da ligação central em relação a quatro átomos e δ é a diferença de fase do ângulo φ podendo o mesmo ser 0° ou 180° correspondendo, respectivamente, a um ponto de máximo ou de mínimo da curva (CRAMER, 2004; COELHO et al., 1999).

Os campos de forças mais usuais são: CHARMM (BROOKS et al., 1983), AMBER (WEINER et al., 1984) e outros.

3.2.4 Potencial de Leonard-Jones (ou de van der Waals)

O potencial de Leonard-Jones descreve as interações de van der Waals entre pares de átomos não - ligados covalentemente (i,j), (Equação 5). Quando a distancia entre os átomos não - ligados for ligeiramente menor que a soma dos raios de van der Waals destes, as forças de repulsão serão dominantes.

$$U_{LJ} = 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad \text{Equação 5}$$

onde, ε_{ij} é a profundidade do potencial entre a barreira repulsiva e atrativa, e σ_{ij} é a distância finita na qual o potencial inter-partícula é igual à zero, e r_{ij} é distância entre dois átomos. O termo elevado a 12 descreve as interações repulsivas e o termo elevado a 6 descreve as interações atrativas de van der Waals. Ambos parâmetros (σ_{ij} e ε_{ij}) são ajustados experimentalmente ou por cálculos teóricos (CRAMER, 2004; COELHO et al., 1999).

3.2.5 Potencial de Coulomb

Este associado às interações eletrostáticas entre átomos não-ligados, ou seja é a contribuição de energia potencial elétrica derivada da carga dos átomos não ligantes. Esse tipo de interação elétrica é dada pelo potencial de Coulomb (Equação 6).

$$U(c) = \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 \varepsilon r_{ij}} \quad \text{Equação 6}$$

onde, r_{ij} é a distancia entre os átomos não ligantes (ij), q_i e q_j são as cargas pontuais de átomos não ligantes. ε_0 é a constante dielétrica em um determinado meio (CRAMER, 2004; COELHO et al., 1999; BARREIRO e FRAGA, 2015).

3.3 Mecânica quântica

Os métodos quânticos descrevem as moléculas analisando as interações entre o núcleo e os elétrons, e a geometria molecular em termos de arranjos de mínimos de energia dos núcleos. Qualquer sistema complexo pode ter suas propriedades macroscópicas descritas pela mecânica quântica. Por esse motivo, é tratada como a parte da ciência que se interessa em estudar a origem microscópica das propriedades físicas da matéria. Fundamentalmente, os métodos da mecânica quântica remontam a equação descrita por Erwin Schrödinger (1887-1961) que constatou que era necessária a inclusão do comportamento ondulatório dos elétrons proposto por Broglie, para a determinação da energia total de um sistema atômico. Este comportamento inclui todas as partículas do sistema (elétrons e núcleos). A equação de Schrödinger para sistemas complexos é representada na Equação 7 (LEVINE, 2000; SANT'ANNA, 2009).

$$H\Psi=E\Psi$$

Equação 7

Sendo Ψ , a função de onda para vários elétrons, E é a energia eletrônica em unidades atômicas. H é o operador hamiltoniano que fornece as energias cinéticas e potenciais dos núcleos e dos elétrons em certo sistema na qual as unidades atômicas, e pode ser descrito como:

$$H = -\frac{1}{2} \sum_i^{\text{elétron}} \nabla_i^2 - \frac{1}{2} \sum_A^{\text{núcleo}} \frac{1}{M_A} \nabla_A^2 - \sum_i^{\text{elétron}} \sum_A^{\text{núcleo}} \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i<j}^{\text{elétron}} \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A<B}^{\text{núcleo}} \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}}$$

Equação 8

onde, ∇^2 descreve a energia cinética do núcleo, Z é a carga nuclear, M_A é a razão da massa do núcleo A para a massa de um elétron, R_{AB} é a distância entre os núcleos A e B , r_{ij} é a distância entre os elétrons i e j e r_{iA} é a distância entre elétron i e núcleo A (LEVINE, 2000; HEHRE, 2003).

Portanto, ao resolver a Equação de Schrödinger obtém-se uma função (ψ) que apresenta todas as informações referentes ao sistema, tornando possível serem calculadas varias propriedades da molécula. Na prática a Equação de Schrödinger não pode ser resolvida exatamente, resultando no desenvolvimento de varias aproximações, o que resulta na proposição de várias metodologias (LEVINE, 2000; HEHRE, 2003).

Uma forma de simplificar a Equação de Schrödinger para sistemas moleculares é admitir que o núcleo se move muito lentamente quando comparado à velocidade que os elétrons se movem. O movimento dos elétrons e dos núcleos é estudado separadamente, levando em consideração que a massa do núcleo é bem maior que a do elétron. Em uma primeira aproximação os núcleos são fixados e a Equação de Schrödinger é resolvida apenas para os elétrons. Isso é denominado de aproximação de Born-Oppenheimer (CRAMER, 2004; HEHRE, 2003).

A aproximação de Hartree-Fock é empregada para determinação de funções de onda e energia no estado fundamental de sistemas quânticos de vários corpos. Esse método é à base da teoria orbital molecular (MO), que postula que o movimento de cada elétron pode ser descrito por uma função de uma única partícula (orbital) que não depende explicitamente dos movimentos instantâneos dos outros elétrons (HEHRE, 2003; LEVINE, 2000).

A função de onda eletrônica depende das coordenadas espaciais e de spin de todos os átomos e essas funções são antissimétricas em relação ao intercâmbio de dois elétrons. Este requisito é satisfeito pelo determinante de Slater construído a partir das funções de onda de um elétron para todos os N elétrons (Equação 9) (HEHRE, 2003; LEVINE, 2000).

$$\Psi = \frac{1}{N^{1/2}} \begin{vmatrix} X_1(X_1) & X_2(X_1) & \dots & X_N(X_1) \\ X_1(X_2) & X_2(X_2) & \dots & X_N(X_2) \\ \cdot & \cdot & & \cdot \\ \cdot & \cdot & & \cdot \\ \cdot & \cdot & & \cdot \\ X_1(X_N) & X_2(X_N) & \dots & X_N(X_N) \end{vmatrix} \quad \text{Equação 9}$$

Onde, os X 's são funções das coordenadas espaciais e do spin de um único elétron que são denominadas de funções spin-orbitais moleculares. Considerando que eles são ortonormais, o fator $\frac{1}{N^{1/2}}$ onde N é o numero de elétrons do sistema, é uma constante de normalização para Ψ (HEHRE, 2003; LEVINE, 2000).

Estas funções de onda de um elétron satisfazem as equações de Hartree-Fock:

$$\hat{F}(i)\Psi_k(r_i) = \epsilon_k \Psi_k(r_i) \quad \text{Equação 10}$$

Cada uma dessas funções é chamada orbitais moleculares de Hartree-Fock e seus autovalores são energias de orbitais. Uma das consequências do método Hartree-Fock consiste no determinante de Slater não permitir que mais de um elétron possa ocupar um orbital spin. Este princípio é conhecido como Princípio da Exclusão de Pauli (HEHRE, 2003; CRAMER, 2004). O método de Hartree-Fock assume duas formas (LEVINE, 1991):

- **Hartree-Fock Restrito (RHF):** Se os elétrons de um sistema estão emparelhados, então os elétrons estão restritos a se movimentarem em pares.
- **Hartree-Fock Não Restrito (UHF):** Quando existem elétrons desemparelhados. Essa forma permite que os elétrons ocupem diferentes orbitais e tenham energias diferentes.

O método SCF (do inglês Self-Consistent-Field) é um processo pelo qual é obtido um conjunto de orbitais que levam a menor energia, e é capaz de obter soluções para funções de onda do sistema a partir de uma função tentativa. Basicamente, a ideia deste método é simples. Fazendo um chute inicial do spin-orbitais, pode-se calcular o campo médio experimentado por cada elétron e resolver a equação de Hartree-Fock para um novo conjunto de spin-orbitais. Usando estes novos spin-orbitais, obtêm-se novos campos. Repete-se esse procedimento até que os campos não mudem mais. O método de Hartree-Fock é o ponto de partida para todos os outros métodos quânticos *ab initio* (HEHRE, 2003).

Os métodos *ab initio* buscam solucionar problemas quânticos diretamente dos postulados da mecânica quântica, não incluindo dados experimentais ou parâmetros empíricos, e não utiliza aproximações. Existem vários métodos de aproximação para resolver a Equação de Schrödinger sendo uma das aproximações características do método *ab initio* a introdução de um conjunto de bases, que se trata de um conjunto de funções matemáticas a partir do qual a função de onda é construída; portanto, ela é usada para descrever a forma dos orbitais num átomo (CRAMER, 2004; LASCHUK, 2005).

O método *ab initio* mais simples é o Hartree-Fock o qual é, em geral, usado como ponto de partida para métodos mais adequados: os métodos pós-Hartree-Fock. Estes favorecem a exatidão com a inclusão da correlação eletrônica; entretanto, o custo computacional aumenta exponencialmente com a exatidão (CRAMER, 2004). Já o

método semi-empírico é baseado em parâmetros de dados experimentais, facilitando assim os cálculos e permitindo que os gastos computacionais sejam menores (ARROIO et al., 2010).

Nem sempre os métodos *ab initio* são suficientes em relação à reprodução de dados experimentais, e, além disso, demandam um maior tempo computacional. Existem vários métodos semi-empíricos nos quais varias aproximações são utilizadas a fim de aumentar a precisão e diminuir a dificuldade nos cálculos. Esses métodos são parametrizados para reproduzir vários resultados e são baseados na aproximação de Hartree-Fock. Os métodos semi-empíricos considera apenas os elétrons de valência já que os elétrons da ligação química a serem investigados, estão na camada de valência (ALCÁCER, 2007; LEACH, 2001).

Os métodos AM1 (DEWAR et al.,1995) PM3 (GALVÃO, 1993), PM6 (STEWART, 2007) e PM7 (STEWART, 2013) são exemplos de métodos semi-empíricos e todos eles utilizam um conjunto de bases pré-definidos incluindo aproximações similares, porem com diferentes parametrizações, que foram elaboradas para reproduzir dados experimentais como calor de formação, momentos de dipolo geometrias de equilíbrio e energia de ionização (BARREIRO; FRAGA, 2015).

A teoria do funcional de densidade (DFT, do inglês, Density Functional Theory) foi desenvolvida por Kohn e Sham em 1965 e surgiu como uma possível alternativa aos clássicos métodos *ab initio* e semi-empíricos no estudo de propriedades do estado fundamental de sistemas moleculares. A teoria é baseada na ideia de que existe uma relação entre energia total de um sistema e a densidade eletrônica em geral. Nesses modelos a energia de um conjunto de elétrons que esta sobre interferência de um campo externo é um funcional único da função densidade eletrônica. Uma grande vantagem do método DFT em relação a esses dois métodos citados esta no ganho em velocidade computacional e capacidade de memoria interna (MORGON e CUSTODIO 1995).

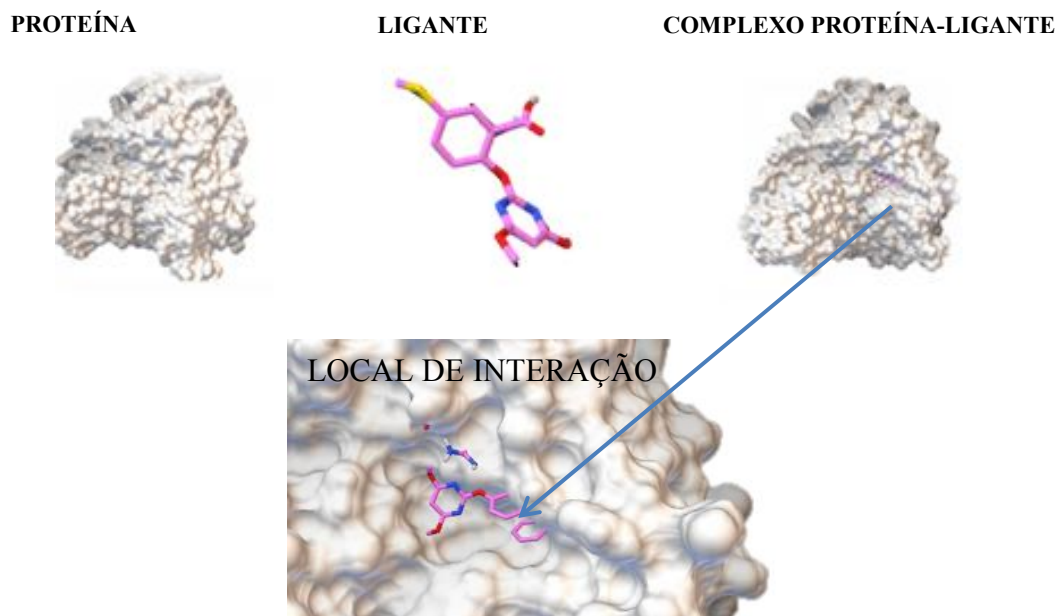
3.4 Docking Molecular

Nos últimos anos dados disponíveis relacionados à atividade biológica, estruturas e inibição de proteínas aumentaram consideravelmente. Bases de dados estruturais, como *Protein Data Bank* (PDB) apresentam uma enorme quantidade de estruturas proteicas. Também estão disponíveis dados específicos de estruturas de

complexos, como afinidade de ligações, encontrados em PDB-bind, PLD, AffinDB e BindDB (DIAS e AZEVEDO, 2008).

O *docking* molecular é um dos métodos da modelagem molecular que busca a predição das estruturas dos complexos receptor-ligante. Esse método é de grande importância no planejamento de novos fármacos, pois através do docking é possível encontrar as conformações mais favoráveis de um ligante ancorado em um determinado alvo de interesse. Este método visa prever a afinidade e o modo de ligação entre o ligante e a macromolécula, e deve ser capaz de mostrar corretamente o posicionamento do ligante no sítio ativo, como mostrado na Figura 13, e a partir de cada conformação espacial, são obtidas diferentes energias de ligação (ALONSO et al., 2006).

Figura 13- Aplicação da metodologia de docking molecular do modo ligante ao seu sítio de ligação na enzima.

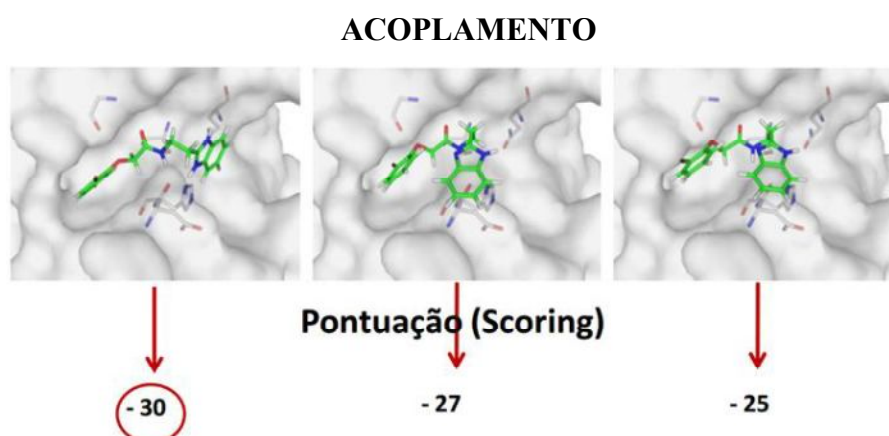


Fonte: o autor (programa AutoDock 4.0).

As principais ferramentas para a realização de *docking* molecular são o algoritmo de busca e uma função de pontuação de energia (*scoring*) (ALONSO et al., 2006). O *scoring* avalia a energia de ligação de interação entre o ligante e o receptor-alvo, como mostrado na Figura 14, classificando os melhores modos de ligação (CHENG et al., 2012). Atualmente os procedimentos de amostragem realizados através dos programas de *docking* molecular são baseados em algoritmos genéticos, *simulate annealing*, simulação por Monte Carlo (MC), distância geométrica, entre outros (WANG et al., 2003).

O método de simulações por Monte Carlo inicialmente foi inserido em dinâmica molecular para ser usado como procedimento de minimização, e mais tarde foi adaptado para algoritmos de encaixes flexíveis. Além de que as simulações de MC revelaram ser apropriadas para determinar constantes de ligação para sistemas proteicos. Porém esse método não é favorável para analisar processos que são dependentes do tempo. Esse tipo de algoritmo de procura quando utilizado para encaixes flexíveis busca inserir o ligante no sítio ativo do receptor-alvo através de diferentes conformações e rotações da estrutura, onde o número de prováveis orientações no local de ligação do receptor é fundamentado em métodos estocásticos (DIAS e AZEVEDO, 2008).

Figura 14- Esquema de um acoplamento mostrando os possíveis modos de ligação e a pontuação (energia de ligação em kcal/mol) de cada orientação do ligante.



Fonte: FERREIRA, 2014.

O processo de ligação entre um ligante e seu alvo receptor não é simples, fatores entálpicos e entrópicos influenciam na interação entre eles. Os programas de *docking* mais conhecidos são autodock 4.0, GOLD, flexX, DOCK, entre outros (ALONSO et al., 2006).

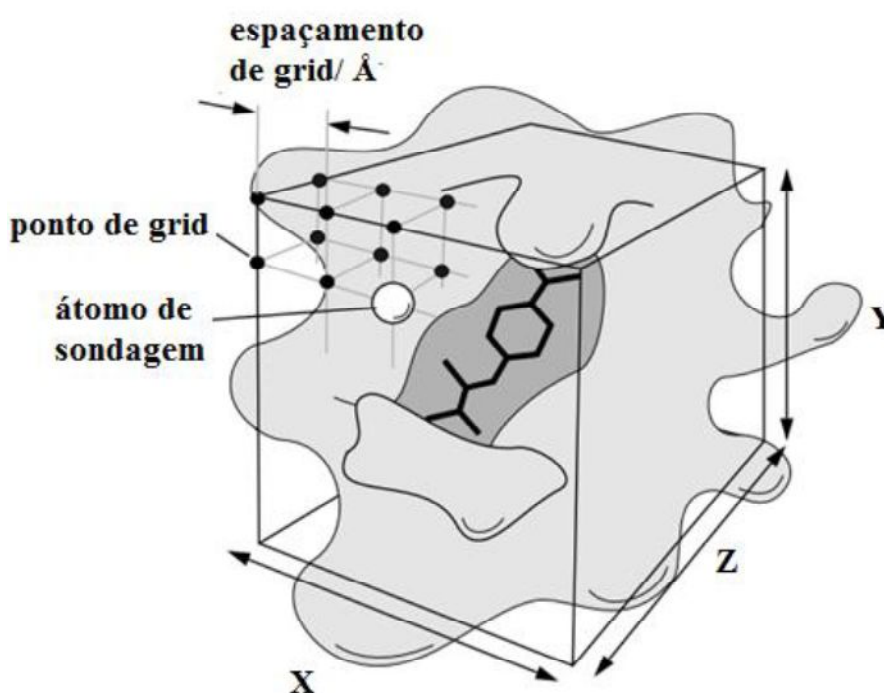
Quando são realizadas simulações de docking molecular deve ser levada em consideração a flexibilidade do ligante, onde são utilizados três métodos para o tratamento desta flexibilidade, sendo estes: método randômico ou estocástico onde um único ligante ou uma população de ligantes são submetidos a mudanças randômicas com utilização de algoritmos. O método sistemático que utiliza algoritmos para analisar os graus de liberdade presentes em toda a molécula. (KITCHEN et al., 2004). A metodologia de *docking* permite também simulações com ligante rígido e proteína

flexível, ligante rígido e proteína rígida, e ligante flexível e proteína flexível (SOUZA, 2015).

Simulações de *docking* onde tanto o ligante quanto a macromolécula são tratados como corpos rígidos podem ser inadequadas, pois seria impossível a simulação de mudanças conformacionais em ambas as moléculas. Já o *docking* molecular onde o ligante é flexível torna possível analisar todos os graus de liberdade do ligante (TOTROV e ABAGYAN, 2008). Quando o receptor-alvo é parcialmente ou totalmente flexível todos os graus de liberdade podem ser investigados, porém por esse tipo de simulação ser mais complicado, devido à grande quantidade de graus de liberdade, o receptor geralmente é tratado como parcialmente flexível (BIAZUS, 2015).

O Software AutoDock 4.0 apresenta dois programas chaves que devem ser executados durante as simulações, são eles o *autodock* e o *autogrid*, onde o *autogrid* prepara mapas de *grid*, sendo um para cada tipo de átomo presente no ligante e esses mapas são utilizados posteriormente pelo software *autodock*. Um mapa de *grid* constitui-se de um conjunto tridimensional de pontos regularmente espaçados, centrados no local do sítio ativo da enzima em estudo (Figura 15) onde cada ponto dentro do mapa de *grid* armazena a energia potencial de um átomo de sonda ou grupo funcional naquela posição particular (HUEY et al., 1996;).

Figura 15- Esquema de um mapa de grid.



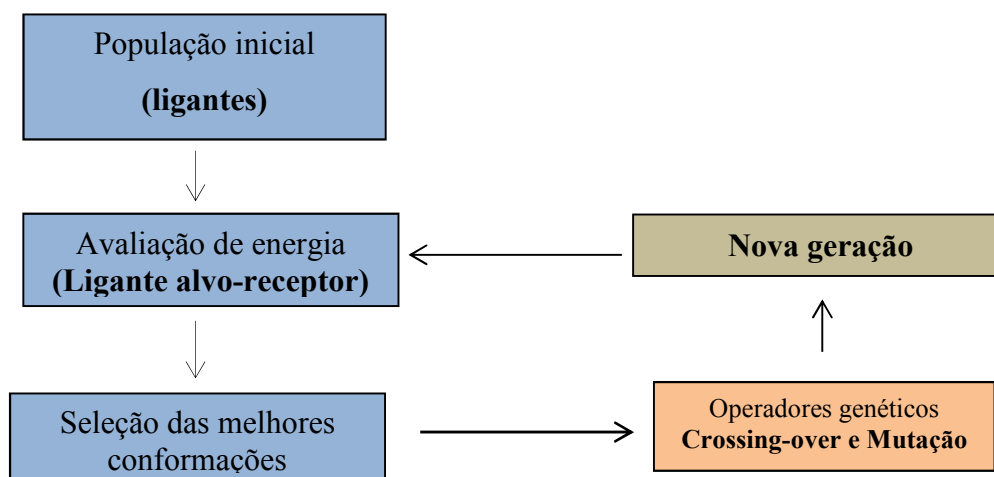
Fonte: (Adaptado HUEY et al., 1996).

O *autogrid* é importante, pois ele define a região da proteína a ser analisada quando ocorrer à interação entre o ligante e a macromolécula. O *autodock* é responsável pelos cálculos das interações entre o ligante e a macromolécula prevendo as energias livre de ligação (LOKESH e KRISHNAN, 2016).

Os algoritmos genéticos (GA) são utilizados para explorar a energia livre entre o ligante e o receptor alvo para encontrar as melhores conformações. Eles são ferramentas utilizadas em simulações de *docking* molecular, que buscam possíveis maneiras diferentes de ligações explorando os graus de liberdade da molécula. Os algoritmos funcionam da seguinte maneira: primeiro são gerados vários ligantes dispostos no espaço de forma randômica. Em seguida, é calculada a energia de ligação da interação do ligante e seu alvo-receptor onde são selecionadas as melhores conformações para a aplicação do algoritmo genético. São apresentados então vários ciclos de geração até que o número máximo de gerações chegue a seu limite, como apresentado na Figura 16.

O algoritmo genético utilizado neste programa é o Algoritmo Genético Lamarckiano (GLA) que é baseado na teoria da evolução de Lamarck, onde são passadas aos descendentes as mudanças adquiridas durante a vida de seus antecessores. (MORRIS et al., 1998). No decorrer do processo de busca das soluções são aplicados operadores genéticos como Crossing-over e Mutação (MORRIS et al., 1998).

Figura 16- Esquema de funcionamento do algoritmo genético utilizado no programa AutoDock 4.0.

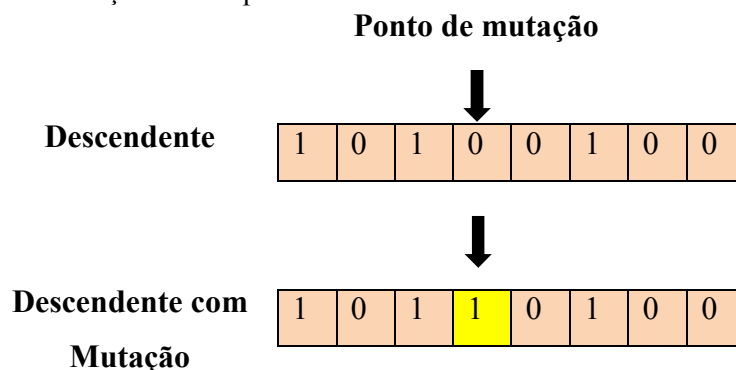


Fonte: (Adaptado, MORRIS, 1998)

A mutação é uma modificação aleatória e eventual do valor de qualquer posição do cromossomo (Figura 17). Esta alteração ocorre segundo uma probabilidade pré-

fixada onde esta probabilidade de mutação, a probabilidade de cruzamento, e o tamanho da população, são elementos muito significativos nos algoritmos genéticos. Elas monitoram todo o procedimento de busca, e influenciam diretamente a velocidade de convergência, impedindo que aconteça a prevalência de uma determinada subpopulação, o que acarretaria no chamado elitismo (MAGALHÃES, 2006).

Figura 17- Mutação em um ponto do cromossomo.



Fonte: (Adaptado LIMA, 2010).

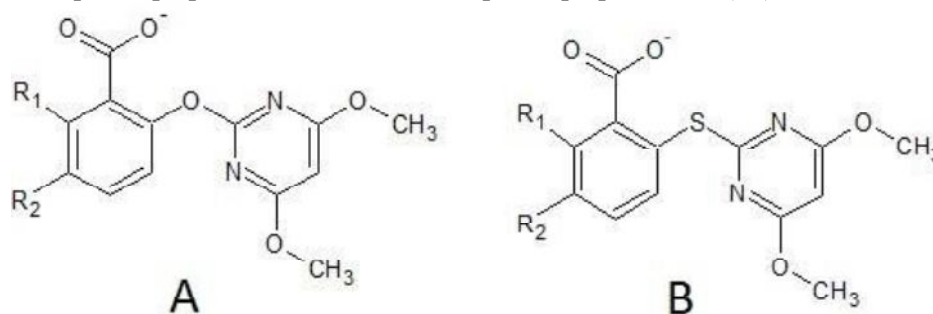
A taxa de crossing- over é fundamentada no fenômeno de mesmo nome na genética, em que dois cromossomos, quando emparelhados, são capazes de trocar material genético. Dois cromossomos pais são definidos e, através do cruzamento, originam os cromossomos filhos, propiciando para que a população se desenvolva com as características dos indivíduos mais aptos (MAGALHÃES, 2006).

4. METODOLOGIA

4.1- Cálculos semi-empíricos

Durante a realização do trabalho, algumas propriedades foram calculadas utilizando métodos quânticos. Os parâmetros físico-químicos calculados são de natureza eletrônica e geométrica. Estes cálculos foram realizados para 14 derivados pirimidinilsacilatos (PSA) inibidores da enzima Acetohidroxiácido Sintase (AHAS). Estas estruturas são baseadas em dois protótipos, como mostrado na Figura 18, onde cada estrutura apresenta um substituinte diferente, podendo estar ligados nos carbonos 5 ou 6 do anel.

Figura 18- Protótipos dos quais os herbicidas são formados de acordo com cada substituinte diferente. A- protótipo pirimidinilsacilatos. B- protótipo pirimidinil(tio)sacilatos.



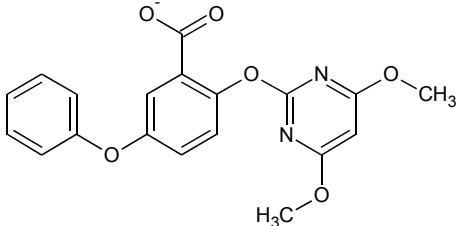
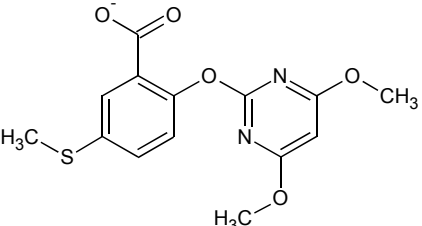
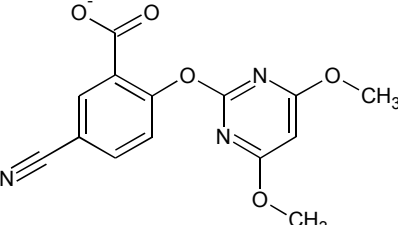
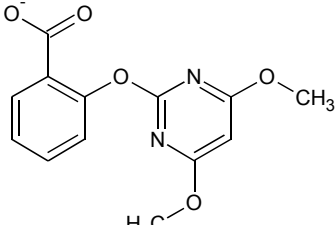
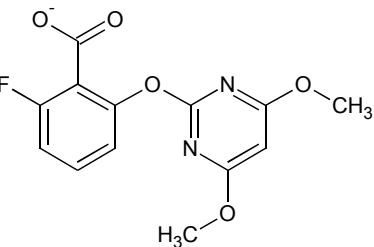
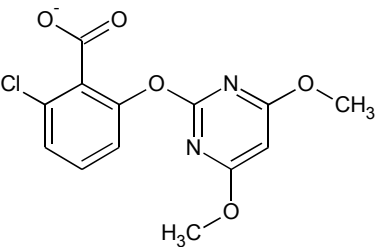
Fonte: (Adaptado DÍAZ e DELGADO 2009. Programa Chemscketch).

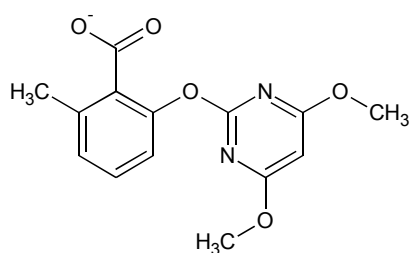
Tabela 1- Derivados análogos dos PSAs e seus respectivos substituintes

Estruturas derivadas dos pirimidinilsacilatos e pirimidinil (tio) salicilatos							
PSA		Substituinte		PSA		Substituinte	
PSA 01	A	OC ₆ H ₅	R2	PSA 08	A	NO ₂	R1
PSA 02	A	SCH ₃	R2	PSA 09	A	NH ₂	R1
PSA 03	A	CN	R2	PSA 10	B	I	R1
PSA 04	A	H	R1	PSA 11	B	COCH ₃	R1
PSA 05	A	F	R1	PSA 12	A	OH	R2
PSA 06	A	Cl	R1	PSA 13	B	CF ₃	R1
PSA 07	A	CH ₃	R1	PSA 14	B	Br	R1

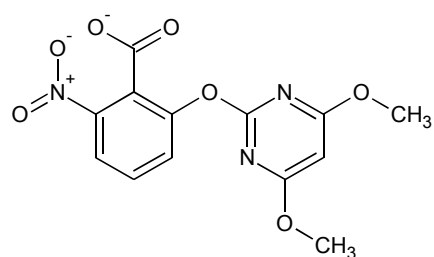
Primeiramente foi realizada uma otimização geométrica de energia de todas as estruturas análogas derivadas dos pirimidinilsalicilatos (PSAs) para encontrar a estrutura de menor energia. Todas as estruturas se encontram na forma aniônica (Figura 19) com valores de pKa que variam de 3,5 a 5. Nesse processo foi utilizado o programa MOPAC 2016 (STEWART, 2016), empregando o método semi-empírico PM7 (*Parametric Method 7 Halmitonian*).

Figura 19- Estruturas dos 14 herbicidas (análogos) derivados dos pirimidinilsalicilatos e pirimidinil (tio) salicilatos.

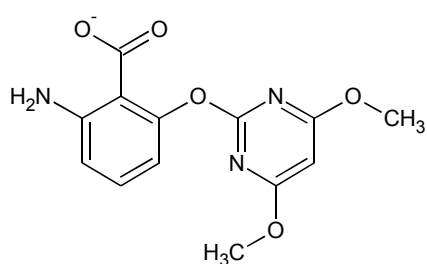
PSA 01  2-[(4,6-dimetoxipirimidin-2-il)oxi]-5-fenoxibenzoato]	PSA 02  2-[(4,6-dimetoxipirimidin-2-il)oxi]-5-(metilsulfanil)benzoato
PSA 03  5-ciano-2-[(4,6-dimetoxipirimidin-2-il)oxi]benzoato	PSA 04  2-[(4,6-dimetoxipirimidin-2-il)oxi]benzoato
PSA 05  2-[(4,6-dimetoxipirimidin-2-il)oxi]-6-fluorobenzoato	PSA 06  2-cloro-6-[(4,6-dimetoxipirimidin-2-il)oxi]benzoato

PAS 07

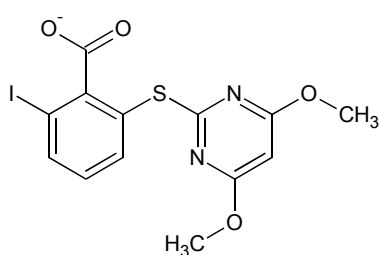
2-[(4,6-dimetoxipirimidin-2-il)oksi]-6-metilbenzoato

PAS 08

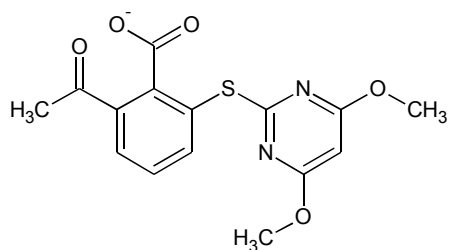
2-[(4,6-dimetoxipirimidin-2-il)oksi]-6-nitrobenzoato

PAS 09

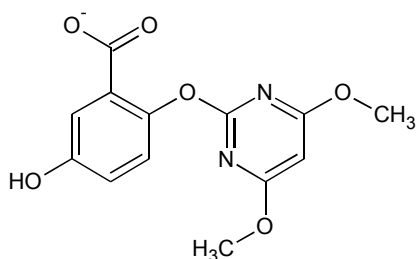
2-amino-6-[(4,6-dimetoxipirimidin-2-il)oksi]benzoato

PAS 10

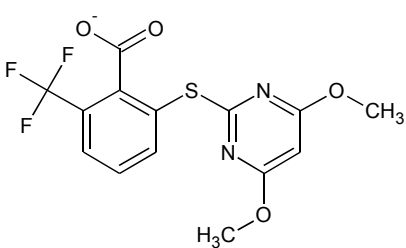
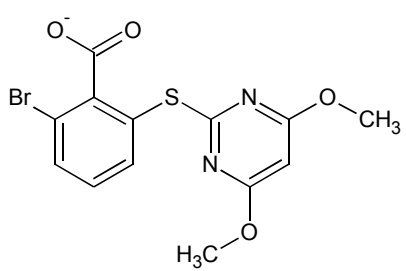
2-[(4,6-dimetoxipirimidin-2-il)sulfanil]-6-iodobenzoato

PAS 11

2-acetil-6-[(4,6-dimetoxipirimidin-2-il)sulfanil]benzoato

PAS 12

2-[(4,6-dimetoxipirimidin-2-il)oksi]-5-hidroksibenzoato

PAS 13  2-[(4,6-dimetoxipirimidin-2-il)sulfanil]-6-(trifluorometil)benzoato	PAS 14  2-bromo-6-[(4,6-dimetoxipirimidin-2-il)sulfanil]benzoato
---	---

Fonte: o autor, programa ChemSketch.

O programa MOPAC 2016 permitiu obter estruturas com geometrias de menor energia. Os arquivos de entrada (inputs) foram preparados com base nas palavras-chave disponíveis no manual do programa. Assim, a primeira parte do arquivo de entrada esta exemplifica a baixo e apresenta a seguinte forma:

```
PM7 PDBOUT VECTORS ALLVECS GRAPHF EIGEN POTWRT LOCALIZE
PRTINT DISP prtchar precise CHARGE= -1.
PAS( ).pdb

GEOMETRIA OTIMIZADA UTILIZANDO EIGENVECTOR (EF). O CAMPO SCF
FOI ALCANÇADO.
```

Onde “**PM7**” especifica o hamiltoniano do método semiempirico que foi utilizado no calculo. A palavra **PDBOUT** fará com que a geometria seja impressa no formato PDB. Um conjunto de n autovetores em torno do intervalo HOMO-LUMO pode ser impresso usando **VECTORS**. **ALLVECS** é usada quando se deseja que todos os M.O.s sejam impressos após os cálculos. A palavra **GRAPHF** foi utilizada para gravar as informações necessárias ao programa jmol em um arquivo gerado de formato mgf. Para permitir que os orbitais moleculares canônicos, ou autovetores, sejam exibidos, a palavra **EIGEN** deve ser usada. A palavra **PRTINT** e usada para obter as distancias Interatômicas. Utiliza-se a palavra **DISP** para obter as contribuições de ligação de hidrogênio e dispersão ao calor de formação. Quando a palavra **prtchar** está presente, as cargas atômicas parciais são impressas no arquivo arc. A utilização da palavra **precise** é utilizada para obter resultados mais precisos e a palavra **CHARGE= -**

1 indica que a carga do sistema é menos um. O **EIGENVECTOR** é o método padrão de otimização de geometria.

Foram calculados parâmetros geométricos que incluem área de van der Waals e volume molecular, que são importantes no estudo entre relação estrutura-atividade, e dependem do arranjo espacial dos átomos.

Em relação aos parâmetros eletrônicos foram calculadas as energias dos orbitais HOMO que se trata do ultimo orbital molecular ocupado e representa a energia necessária para arrancar um elétron da camada de valência da molécula e está diretamente relacionada à capacidade de realizar ataques nucleofílicos e LUMO que é o primeiro orbital molecular desocupado e tem relação com a afinidade eletrônica sendo susceptível a ataque por nucleófilos (ATKINS e JONES, 2012).

4.2 Docking Molecular

O estudo do docking molecular foi realizado utilizando o programa AutoDock4.0 (HUEY et al., 2007) que possui um conjunto de ferramentas o qual permite a predição da melhor conformação de um ligante de menor energia de interação. Neste trabalho o docking molecular foi realizado para analisar a interação entre a enzima (AHAS) e os 14 herbicidas (análogos) mostrados na Figura 16.

Nas simulações de docking realizadas neste trabalho os ligantes foram considerados flexíveis e a enzima AHAS como rígida, no entanto, ela foi utilizada apresentando algumas regiões consideradas como flexíveis. Neste procedimento, seis resíduos foram considerados totalmente flexíveis para simular a mobilidade dos aminoácidos responsáveis pela interação enzima-substrato: Metionina (MET-351) Asparagina (ASP-375), Arginina (ARG-377), Triptofano (TRP-574), Serina (SER-653) e Lisina (LYS-381). Esses seis resíduos utilizados para a realização de docking molecular já haviam sido utilizados anteriormente com a enzima AHAS e eles promovem maior interação no sitio ativo (MCCOURT, 2006; GUERRA, 2016). O algoritmo de busca utilizado foi o Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA) (MORRIS, 1998).

4.2.1 Preparação dos arquivos do AutoDock

A enzima AHAS que esta na forma cristalina e é encontrada na base de dados (PDB) Protein Data Bank (BERNSTEIN et al., 1978) registrada sob o código PDB: 1Z8N. A mesma foi tratada no programa AutoDock4.0 para gerar o input PDBQT que inclui as cargas parciais Gasteiger (GASTEIGER e MARSILI, 1978; GASTEIGER e MARSILI, 1980) e adiciona os hidrogênios polares, com todas as coordenadas necessárias para a execução do *autogrid* e *autodock*, macromolécula e ligante estavam anteriormente no formato PDB.

Algumas regiões da enzima foram consideradas como flexíveis, foram então gerados dois arquivos PDBQT para a enzima, um para a parte rígida e outro para a parte flexível. Neste procedimento, seis resíduos foram considerados totalmente flexíveis para simular a mobilidade dos aminoácidos responsáveis pela interação enzima-substrato.

Posteriormente, foi utilizado o programa *autogrid* que esta incluso no AutoDock4.0, e que ira definir a região da proteína que será analisada, quando ocorrer a interação enzima-herbicida. A partir do arquivo de entrada grid foram criados os mapas de grid que são calculados considerando os diferentes átomos dos ligantes, e para esse procedimento durante a simulação foi criado um arquivo de formato GPF (*gpf*, da sigla em inglês *Grid Parameter File*) que é reconhecido pelo *autogrid* e fornece as informações definidas como parâmetros (e.g., tipos de átomos do ligante e receptor extraído dos arquivos PDBQT) e executa o *autogrid* para a geração dos mapas do receptor.

O *gpf* pode ser editado antes de executar o *autogrid*. A Figura 20 exemplifica o conteúdo que faz parte de um arquivo *gpf* (HUEY et al., 2007).

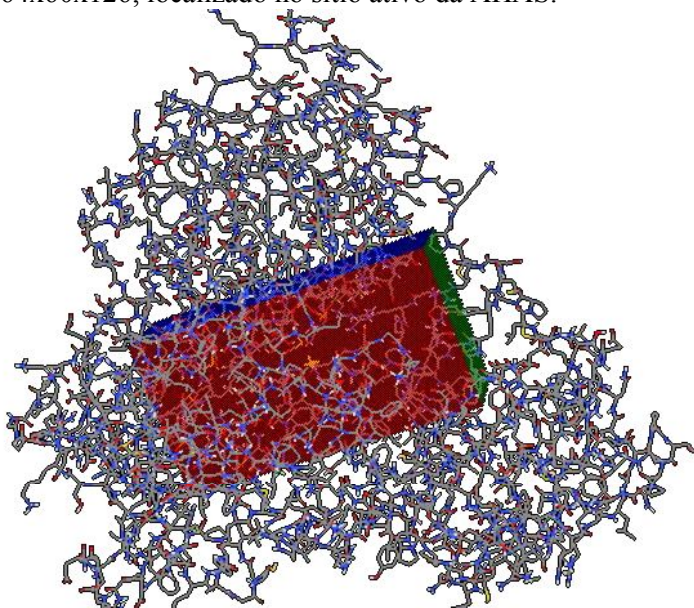
Figura 20- Arquivo *gpf* gerado no programa AutoDock 4.0.

```
npts 40 40 46          # num.grid points in xyz
gridfld hsgl_rigid.maps.fld  # grid_data_file
spacing 0.375          # spacing(A)
receptor_types A C HD N OA SA  # receptor atom types
ligand_types C HD N A NA OA  # ligand atom types
receptor hsgl_rigid.pdbqt  # macromolecule
gridcenter 2.5 6.5 -7.5  # xyz-coordinates or auto
smooth 0.5             # store minimum energy w/in rad(A)
map hsgl_rigid.C.map    # atom-specific affinity map
map hsgl_rigid.HD.map   # atom-specific affinity map
map hsgl_rigid.N.map    # atom-specific affinity map
map hsgl_rigid.A.map    # atom-specific affinity map
map hsgl_rigid.NA.map   # atom-specific affinity map
map hsgl_rigid.OA.map   # atom-specific affinity map
elecmap hsgl_rigid.e.map # electrostatic potential map
dsolvmap hsgl_rigid.d.map # desolvation potential map
dielectric -0.1465      # <0, AD4 distance-dep.diel;>0, constant
```

Fonte: HUEY et al., 2007

Os mapas de grid são baseados também nas interações eletrostáticas. Em seguida foi feita uma caixa de grade de tamanho 64x60x126 que foi inserida na região do sítio ativo como mostrado na Figura 21 e o espaçamento foi de 0,375 Å. O GridBox pode ser ajustado para cobrir o local de ligação. Para cada ponto deste grid foram calculados diversos parâmetros especialmente a tendência a ser doador ou acceptor de hidrogênio.

Figura 21- Caixa de grade de 64x60x126, localizado no sítio ativo da AHAS.



Fonte: autor (programa AutoDock4.0).

Quando não existe informação sobre os possíveis sítios de ligação do receptor, pode ser construído um volume de caixa de grade o suficientemente grande para cobrir toda a proteína, usando um espaçamento de grade maior que o valor padrão de 0,375 Å, e mais pontos de grade em cada dimensão. Então, podem ser realizadas simulações de ancoragem no AutoDock para constatar se existem regiões específicas da proteína que são preferidas pelo ligante. Isso às vezes é chamado de “blind docking” ou “docking cego” (HUEY et al., 1996).

Os arquivos de entrada para a execução do *autodock* foram gerados no formato dpf, (*docking parameter file*), e foi utilizado o Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA) para busca das melhores conformações. Cada busca conformacional baseia-se na geração de uma população de indivíduos. Este algoritmo emprega, para avaliação das conformações, uma função empírica que estabelece a interação por meio da energia

livre de ligação receptor- ligante. A Equação 11 representa esta função executada no programa AutoDock 4.0.

$$\Delta G = \Delta G_{\text{vdw}} + \Delta G_{\text{hbond}} + \Delta G_{\text{ele}} + \Delta G_{\text{conf}} + \Delta G_{\text{solv}} \quad \text{Equação 11}$$

onde, ΔG_{vdw} representa a contribuição de van der Waals, ΔG_{hbond} é o termo que se refere a contribuição das ligações hidrogênio, ΔG_{ele} caracteriza as contribuições do potencial eletrostático, ΔG_{conf} descreve a contribuição entre os ângulos dos átomos (termo torcional) e ΔG_{solv} a contribuição de solvatação (HAMMES, 2012). A saída da execução do *autodock* será o arquivo com extensão. *dlg*, que contém os resultados de docking molecular. Neste trabalho foram obtidos 20 conformêros para cada ligante, e em seguida analisados aqueles com menores valores de energia de ligação. As conformações podem ser vistas em ordem de energia de ligação.

A população utilizada para todas as simulações de docking foi de 1500, o número máximo de avaliações foi de 2500000 e o numero máximo de gerações foi 27000; a taxa de mutação foi de 0,02 e a taxa de crossover: 0,8.

4.2.2 Analise dos resultados

Para as análises dos resultados da interação entre o ligante e a enzima, primeiramente é necessário escolher o arquivo de registro do AutoDock que ira ser analisado:

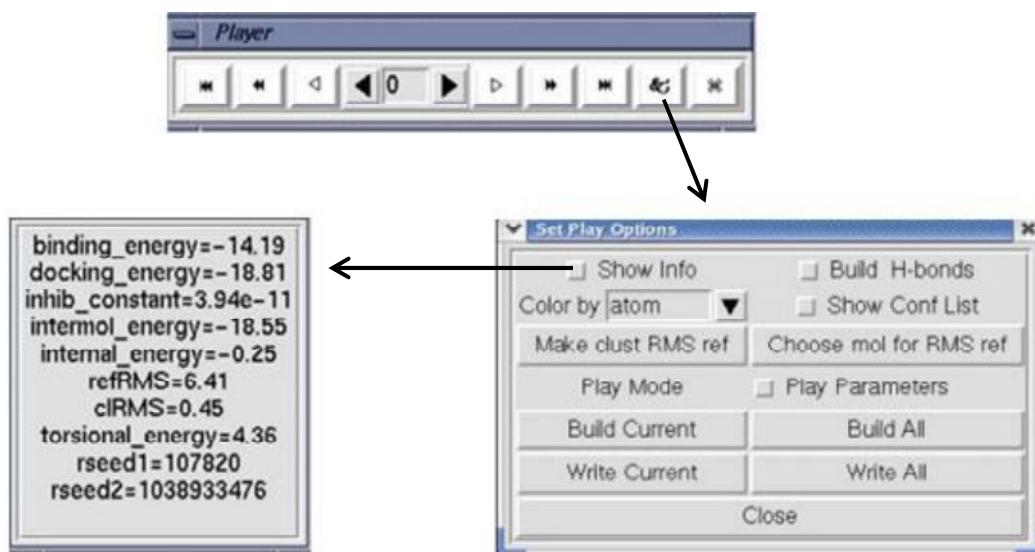


Esse comando abre um navegador de arquivos que permite escolher um arquivo com a extensão. **dlg**. O resultado será dado com as vinte melhores conformações. Estes podem ser vistos nas opções de análise utilizando o comando mostrado abaixo, onde as conformações podem ser visualizadas na ordem de sua energia livre, escolhendo a opção "Play, classificado por energia".



onde, podem ser examinadas todas as conformações.

Figura 22- Visualização dos resultados das análises das conformações ligante-enzima.



Fonte: HUEY et al.,1996.

Na Figura 22, os botões de seta pretos ao lado da entrada servem para mudar para a próxima conformação ou anterior na lista. Já os botões de seta brancos iniciam a reprodução. O botão **Show Info** abre e fecha um painel que exibe informações adicionais sobre a conformação atual.

- **binding energy:** Energia livre de ligação.
- **docking energy:** É a soma da energia intermolecular e energia interna do ligante.
- **inhib_constant:** É calculado no AutoDock da seguinte maneira:

$$\Delta G_{lig} = RT \ln K_i$$

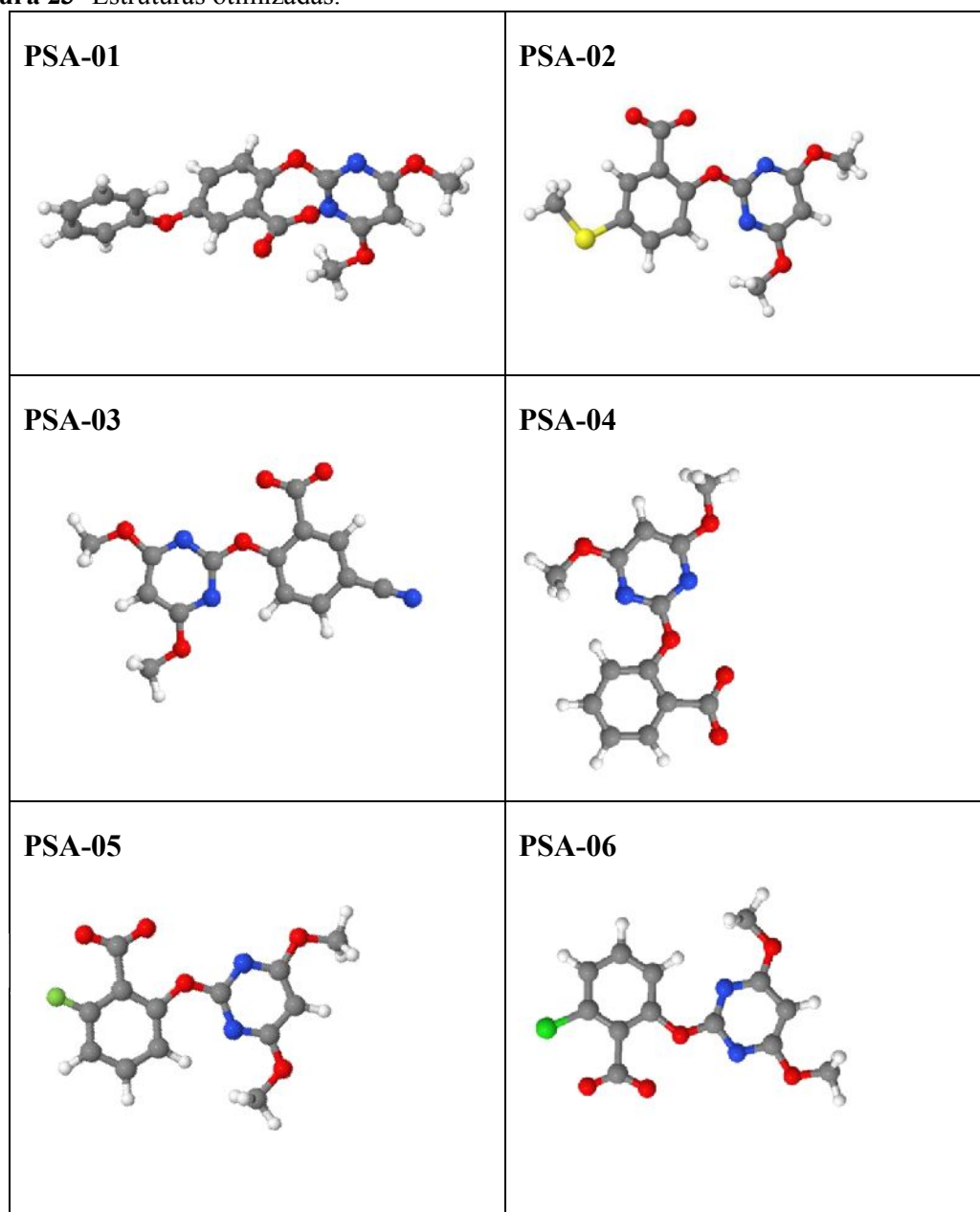
onde, ΔG é a energia de ligação, R é constante universal dos gases, T é a temperatura em Kelvin (298,15) e K_i a constante de inibição. A análise da energia de ligação e distâncias entre o ponto inicial do docking possibilita apontar em qual das conformações o ligante esteve mais próximo do sítio ativo da macromolécula (HUEY et al., 1996;).

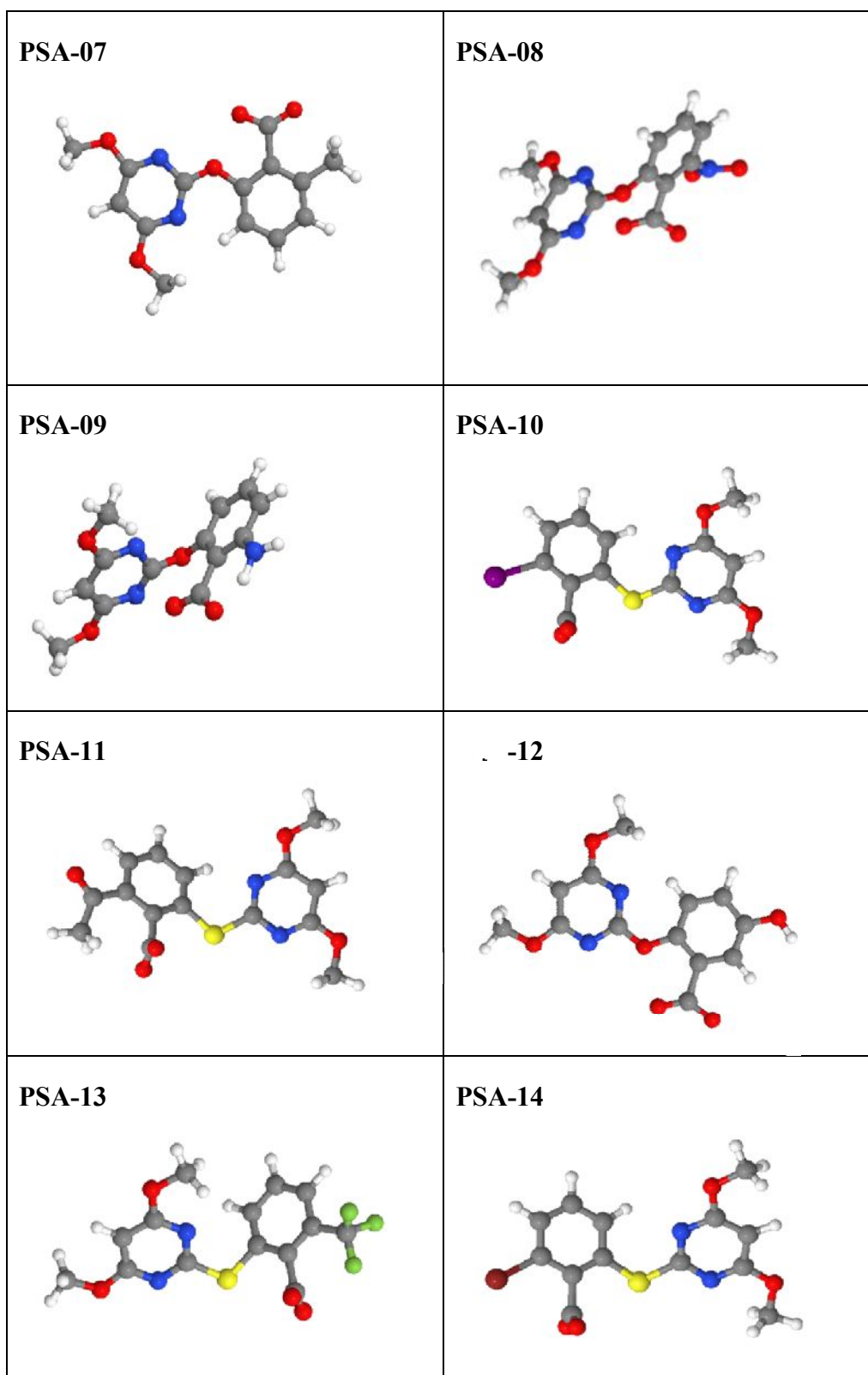
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Otimização das estruturas

A primeira etapa fundamentou-se em otimizar a estrutura de todas os compostos análogos derivadas dos pirimidinilsalicilatos e pirimidinil (tio) salicilatos utilizando mecânica quântica, através do programa MOPAC2016. As estruturas otimizadas podem ser observadas na Figura 23.

Figura 23- Estruturas otimizadas.





Fonte: o autor (programa jmol).

Os parâmetros geométricos dos 14 análogos derivados dos pirimidinilsalicilatos (PSA) foram obtidos com o intuito de relacioná-los com a atividade biológica dos

PSAs. Os parâmetros geométricos volume molecular e área estão apresentados na Tabela 2, que também exhibe os valores de pIC_{50} que tem relação com os valores de IC_{50} que se referem a concentração necessária do composto para inibir em 50% a atividade da enzima, onde: $pIC_{50} = -\log IC_{50}$. Quanto maior os valores de pIC_{50} mais potente é o inibidor (DÍAZ e DELGADO, 2009).

Tabela 2- Parâmetros geométricos calculados pelo programa MOPAC, 2016.

PSAs			Substituinte	pIC_{50}^*	$V (\text{\AA}^3)^*$	$A (\text{\AA}^2)^*$
PSA 01	O	R ₂	OC ₆ H ₅	3,58	407,29	360,22
PSA 02	O	R ₂	SCH ₃	4,32	348,24	319,55
PSA 03	O	R ₂	CN	3,71	326,80	309,60
PSA 04	O	R ₁	H	6,64	300,26	280,31
PSA 05	O	R ₁	F	7,30	307,74	285,83
PSA 06	O	R ₁	Cl	7,62	320,47	294,87
PSA 07	O	R ₁	CH ₃	6,89	319,37	294,25
PSA 08	O	R ₁	NO ₂	6,64	330,21	300,62
PSA 09	O	R ₁	NH ₂	7,00	311,82	279,37
PSA 10	S	R ₁	I	6,99	358,11	326,97
PSA 11	S	R ₁	COCH ₃	7,14	361,44	330,31
PSA 12	O	R ₂	OH	7,20	312,40	290,74
PSA 13	S	R ₁	CF ₃	6,02	366,46	318,03
PSA 14	S	R ₁	Br	7,40	347,72	320,24

*Valores pIC_{50} (DÍAZ e DELGADO) *V- volume molecular A*- área

De acordo com resultados encontrados de área e volume molecular (Tabela 2) pode-se verificar que os parâmetros geométricos podem influenciar na interação entre o ligante e o alvo-receptor devido ao efeito estérico que ocorre quando existem

substituintes muito volumosos, como é o caso do PSA01 com o grupo substituinte OC_6H_5 . Porém nem sempre são determinantes para compreender a atividade do ligante, pois nota-se pela Tabela 2 que, em geral, os substituintes com menores volumes e áreas possuem maiores valores de pIC_{50} , significando maior atividade, mas em algumas estruturas como os PSAs 10, 11, 13 e 14 com altos valores de área e volume, apresentaram valores maiores de pIC_{50} . Entretanto essas quatro estruturas citadas são do grupo dos pirimidinil (tio) salicilatos, ou seja, no lugar do átomo oxigênio possuem o átomo de enxofre (Figura 18 B).

Segundo Díaz e Delgado (2009), para entrar no sítio ativo da enzima os inibidores devem ter a conformação adequada para favorecer a interação com as cadeias laterais de aminoácidos. Assim, as conformações de maior importância são aquelas onde o anel benzeno e o anel pirimidinil estão no mesmo plano, e esta conformação é observada nos compostos derivados dos pirimidinil (tio) salicilatos.

Outro fator que está relacionado com a atividade dos ligantes é a posição do grupo substituinte no anel do grupo salicilato, pois como mostrado na Figura 19 das 14 estruturas apresentadas dez compostos tem grupos substituintes na posição 6 do anel e quatro na posição 5, dentre os quais três delas apresentaram os menores valores de pIC_{50} .

A estrutura do PSA06, por exemplo, que apresenta como substituinte o átomo de cloro na posição 6 do anel aromático possui um valor de pIC_{50} de 7,62 (Tabela 2), já a mesma estrutura porém com o substituinte na posição 5 que de acordo com valores apresentados no artigo de Díaz e Delgado tem pIC_{50} de 5,35, mostrando que no caso do átomo de cloro a posição do grupo substituinte pode influenciar na capacidade de inibição. Portanto, além da mudança do substituinte, a mudança de posição no anel também pode afetar a atividade do ligante por causa do efeito estérico, fazendo com que as interações com o sítio ativo sejam alteradas. Mais adiante no trabalho será discutido a posição do grupo substituinte juntamente com o valor de energia de ligação.

Através da realização dos cálculos mecânicos-quânticos foram obtidas também as energias dos orbitais HOMO e LUMO dos derivados (Tabela 3).

Tabela 3- Resultados dos cálculos de energia dos orbitais HOMO e LUMO em (eV) e seus respectivos valores de pIC₅₀.

PSAs			Substituinte	pIC ₅₀ *	E HOMO (eV)	E LUMO (eV)
PSA 01	O	R ₂	OC ₆ H ₅	3,58	- 5,67	2,24
PSA 02	O	R ₂	SCH ₃	4,32	- 5,62	2,45
PSA 03	O	R ₂	CN	3,71	- 5,51	1,88
PSA 04	O	R ₁	H	6,64	- 5,02	2,12
PSA 05	O	R ₁	F	7,30	- 5,11	2,21
PSA 06	O	R ₁	Cl	7,62	- 5,18	2,21
PSA 07	O	R ₁	CH ₃	6,89	- 5,13	2,40
PSA 08	O	R ₁	NO ₂	6,64	- 5,15	2,32
PSA 09	O	R ₁	NH ₂	7,00	- 5,24	3,24
PSA 10	S	R ₁	I	6,99	- 5,11	1,94
PSA 11	S	R ₁	COCH ₃	7,14	- 4,43	1,93
PSA 12	O	R ₂	OH	7,20	- 4,87	2,32
PSA 13	S	R ₁	CF ₃	6,02	- 4,79	1,89
PSA 14	S	R ₁	Br	7,40	- 5,08	1,94

*Valores de pIC₅₀ (DÍAZ; DELGADO, 2009)

Através da Tabela 3 pode-se verificar que em geral maiores energias dos orbitais HOMO apresentam valores maiores de pIC₅₀, devido o aumento do potencial das regiões que podem realizar ataques nucleofílicos, sendo os PSAs 11,12 e 13 que apresentaram maiores valores de energia de HOMO. Com isso, ocorre aumento na afinidade por seu alvo-receptor, constatando que o orbital HOMO é muito importante para a atividade inibitória. Portanto, espera-se que os orbitais HOMO estejam envolvidos em ligações de hidrogênio entre o ligante e a enzima, que contribuem para

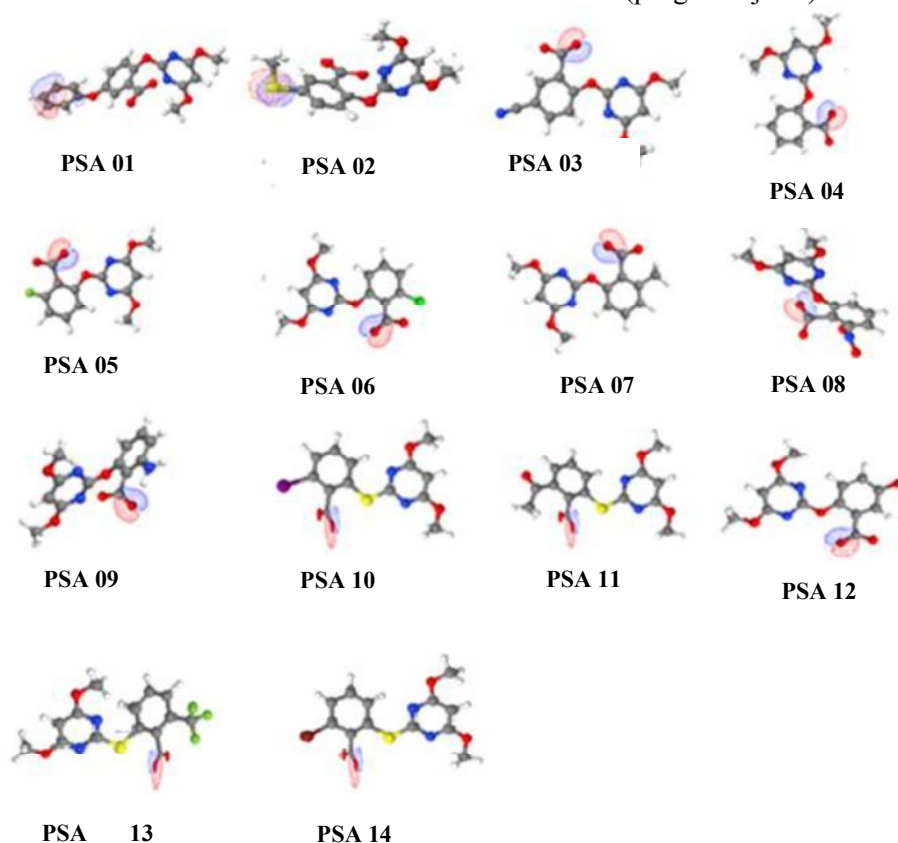
uma melhor interação enzima-herbicida. Já os orbitais LUMO estão relacionados com a facilidade com que uma molécula pode aceitar um elétron. Quanto menor a energia do orbital LUMO menor será o impedimento para aceitar elétrons.

Dessa forma os valores de HOMO e das moléculas podem indicar quais as estruturas serão mais eficientes no sítio ativo. De acordo com o Teorema de Koopmans, a Energia de Ionização, ou Potencial de Ionização, de uma molécula, dentro da aproximação de orbital molecular é dada simplesmente como a energia do HOMO, onde o Potencial de Ionização é a energia mínima necessária para retirar o primeiro elétron da camada de valência de um átomo, ou seja, o elétron mais distante do núcleo. Já a Afinidade Eletrônica de uma molécula neutra é dada pela energia de LUMO e está diretamente relacionada à suscetibilidade ao ataque por nucleófilos. A Afinidade eletrônica se trata da energia de um processo em que um elétron é adquirido (ANGELOTTI et al., 2016; ATKINS e JONES, 2012).

Comparando os valores de energias da Tabela 3, observa-se que o PSA11 possui a maior energia do orbital HOMO, ou seja, ele apresenta o menor potencial de ionização dentre as estruturas. Em relação ao orbital LUMO nota-se pela Tabela 3 que o PSA02 possui o maior valor de energia tendo então uma menor Afinidade Eletrônica.

A Figura 24 apresenta os orbitais HOMO sobre o íon carboxilato da maior parte das estruturas dos PSAs com exceção do PSA 01 onde o orbital HOMO está presente no anel do grupo substituinte e no PSA 02 no átomo de enxofre que faz parte do grupo substituinte SCH₃.

Figura 24- Estruturas dos PSAs mostrando os orbitais HOMO (programa jmol).

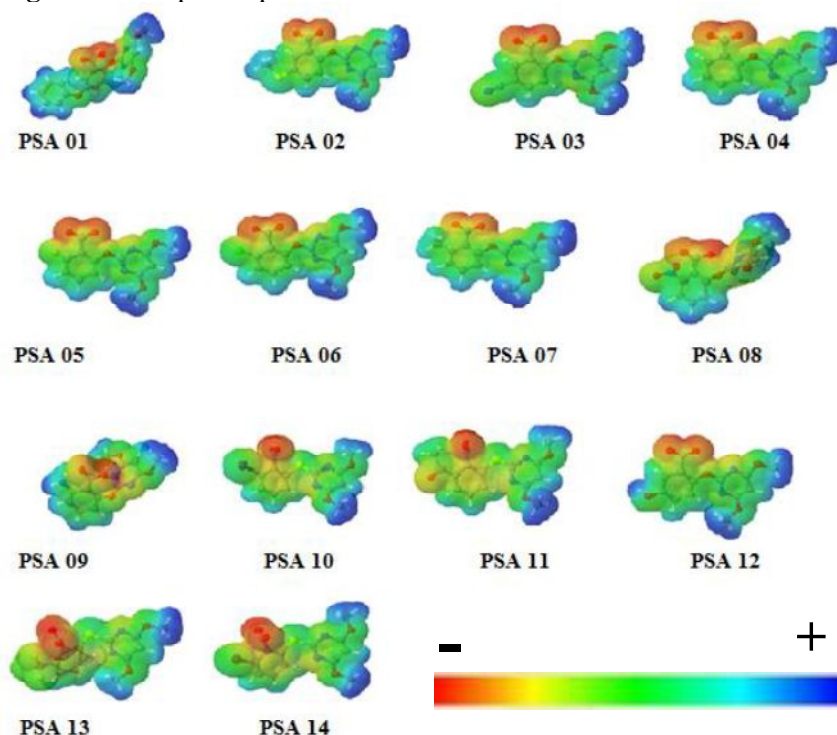


O grupo carboxilato é o mais relevante para as interações entre o ligante e seu alvo-receptor devido seu comportamento como aceptor de hidrogênios, pois ele apresenta uma alta densidade eletrônica nos oxigênios presentes nesse grupo. Isto pode ser evidenciado pela análise dos orbitais HOMO, que revelou uma maior densidade de elétrons sobre o grupo carboxilato, sugerindo que essa região pode ser susceptível a uma interação importante com o sítio receptor.

As contribuições eletrostáticas para o processo de interação entre o ligante e seu alvo-receptor podem ser evidenciadas pela Figura 25, que mostra os mapas de potencial eletrostático das estruturas dos ligantes. As regiões que apresentam potencial eletrostático negativo na molécula mostram os possíveis locais de interação com partes positivas da molécula do receptor. Esta representação é caracterizada por diferentes cores, onde a cor vermelha indica alta densidade de carga negativa e cor azul indica baixa densidade de carga positiva e as cores laranja, verde e amarelo são de valores intermediários de potencial (HEHRE, 2003). Nota-se na Figura 25 que a coloração avermelhada predominou nos grupos carboxilatos presente em todas as estruturas dos

PSAs. Os mapas do potencial eletrostático possibilitam identificar várias regiões em uma molécula como rica ou pobre em elétrons.

Figura 25- Mapas de potencial eletrostático dos PSAs.



Fonte: o autor (programa jmol).

5.2 Docking molecular

A partir da realização de simulações de docking molecular foram obtidas 20 conformações para cada ligante (herbicida) análogo derivado dos pirimidinilsalicilatos e os valores das suas respectivas energias livres de ligação da interação enzima-herbicida. A conformação selecionada foi aquela que apresentou valor de energia de interação mais favorável (ΔG mais negativo) e menor valor de RMSD (*root-mean-square deviation*), isso torna possível analisar o nível de confiabilidade das previsões do método escolhido, onde valores de RMSD menor que 2,0 Å são considerados adequados. A Tabela 4 mostra os valores das constantes de inibição (K_i) e as energias de ligação obtidas através das simulações de docking molecular realizadas no programa AutoDock 4.0 para a enzima AHAS e os 14 derivados análogos dos pirimidinilsalicilatos. Os valores de RMSD das melhores conformações ficaram entre

0,0 e 0,2 Å. A maior parte das conformações dos análogos apresentaram valores de RMSD igual à zero.

Tabela 4- Resultados de docking para a enzima AHAS.

PSAs			Substituinte	pIC ₅₀ *	Energia livre de ligação (kcal/mol)	Constante de inibição K _i (μm)
PSA 01	O	R ₂	OC ₆ H ₅	3,58	- 2,5	9,74 x 10 ³
PSA 02	O	R ₂	SCH ₃	4,32	- 1,88	4,22 x 10 ⁴
PSA 03	O	R ₂	CN	3,71	- 1,88	4,22 x 10 ⁴
PSA 04	O	R ₁	H	6,64	- 3,62	2,20 x 10 ³
PSA 05	O	R ₁	F	7,30	- 2,88	7,81 x 10 ³
PSA 06	O	R ₁	Cl	7,62	- 2,75	9,64 x 10 ³
PSA 07	O	R ₁	CH ₃	6,89	- 4,25	7,66 x 10 ²
PSA 08	O	R ₁	NO ₂	6,64	- 3,00	6,83 x 10 ³
PSA 09	O	R ₁	NH ₂	7,00	- 3,25	4,15 x 10 ³
PSA 10	S	R ₁	I	6,99	- 2,75	9,64 x 10 ³
PSA 11	S	R ₁	COCH ₃	7,14	- 4,5	9,64
PSA 12	O	R ₂	OH	7,20	- 3,5	2,75 x 10 ³
PSA 13	S	R ₁	CF ₃	6,02	- 2,25	2,24 x 10 ⁴
PSA 14	S	R ₁	Br	7,40	- 2,75	9,64 x 10 ³
PAS 15	S	R ₁	OC ₆ H ₅	5,60	-3,38	3,36x 10 ³

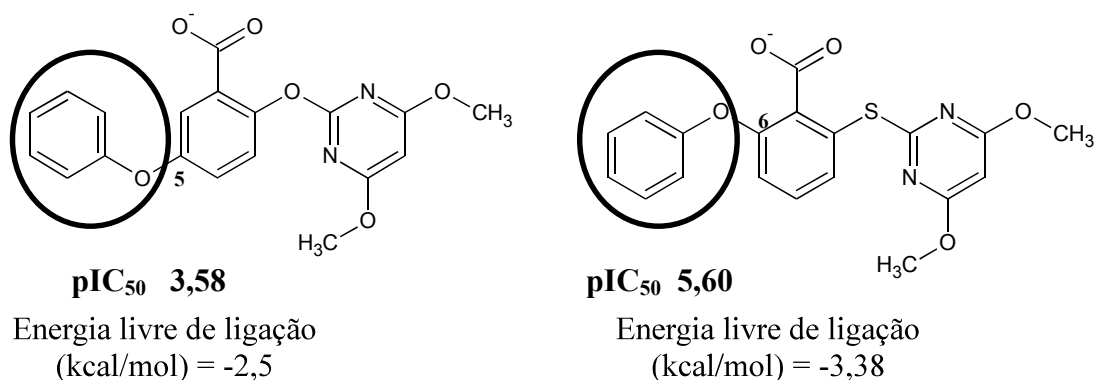
*Valores de pIC₅₀ (DÍAZ; DELGADO, 2009)

A Tabela 4 mostra que os PSAs com os grupos substituintes H (PSA04), CH₃ (PSA07), NO₂ (PSA08), NH₂ (PSA09), COCH₃ (PSA11) e OH (PSA12) exibiram as energias de ligação mais favoráveis. Isto ocorre porque estes grupos se encaixam melhor no local do sitio ativo da enzima AHAS, facilitando a interação com os

aminoácidos presentes no sítio ativo do receptor. Dessa forma, os PSAs 07 e 11 apresentaram os menores valores de constantes de inibição (k_i), pois este está relacionado com a energia livre de ligação (ΔG_{lig}), onde menores energias de ligação possuem valores mais baixos de k_i , o que está de acordo com a Tabela 4.

Além disso, foi realizado o docking molecular do PSA 01 com o grupo substituinte OC_6H_5 em outra posição no anel salicilato (posição 6), Figura 26, que está representado na Tabela 4 como PSA 15.

Figura 26- Estruturas dos PSAs com o grupo substituinte OC_6H_5 em diferentes posições.

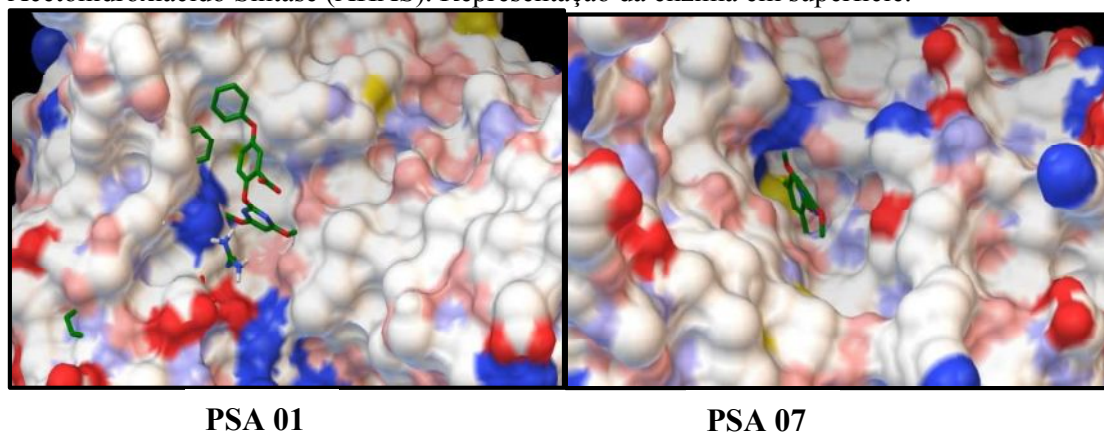


Fonte: o autor (programa ChemSketch).

De acordo com as informações da Figura 26 a posição do grupo substituinte pode afetar a atividade do ligante, pois ao alterar a posição do grupo substituinte OC_6H_5 houve uma mudança no valor de energia de ligação o que está de acordo com seu valor de pIC₅₀ mostrando que a posição 6 é mais favorável para esse grupo substituinte.

A Figura 27 mostra o encaixe dos compostos PSAs 01 e 07 após a realização de simulações de *docking* molecular no sítio ativo da enzima, mostrando que o efeito estérico pode influenciar significativamente na interação enzima-ligante, como pode ser observado na Figura 28, que mostra as interações que ocorrem entre o ligante e os aminoácidos que o cercam.

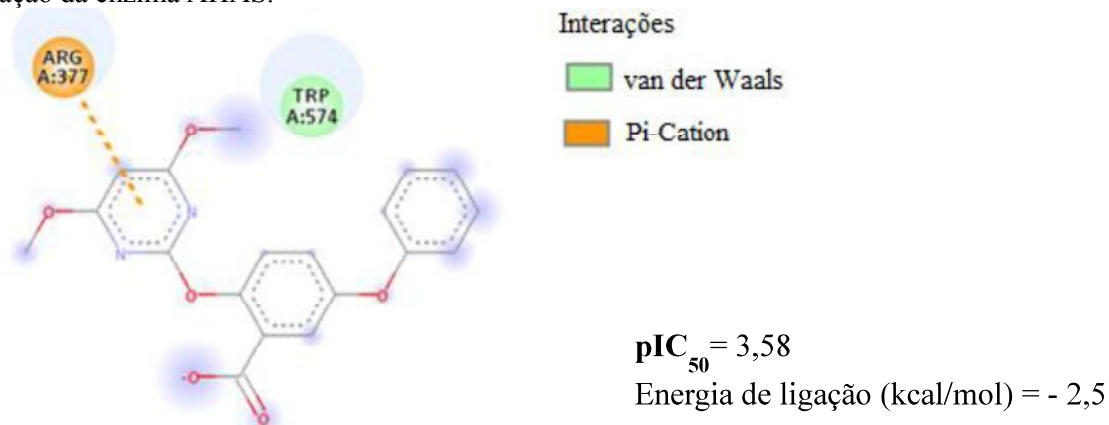
Figura 27- Ilustração do PSA 01 e PSA 07 ancorados no sítio ativo da enzima Acetohidroxiácido Sintase (AHAS). Representação da enzima em superfície.



Fonte: o autor (programa AutoDock 4.0).

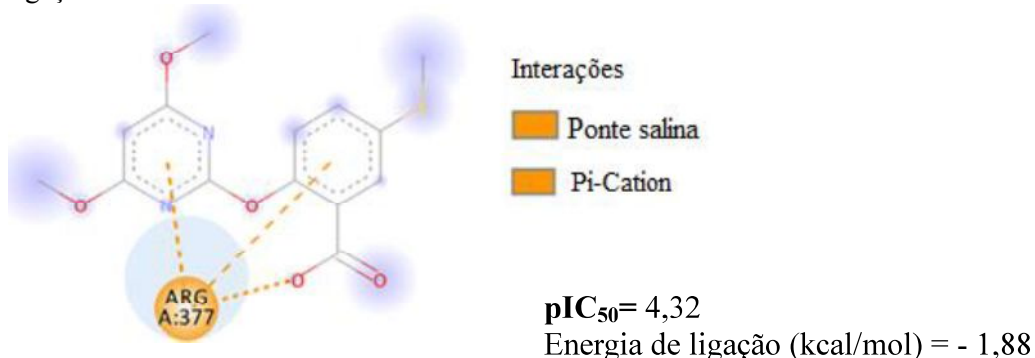
Para explicar melhor a seletividade e a diferença de energia entre estes ligantes, os contatos próximos ao redor dos ligantes foram avaliadas utilizando o programa DS Visualizer (SANNER, 1999).

Figura 28- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligando PSA01 e os principais aminoácidos interagindo do local de ligação da enzima AHAS.



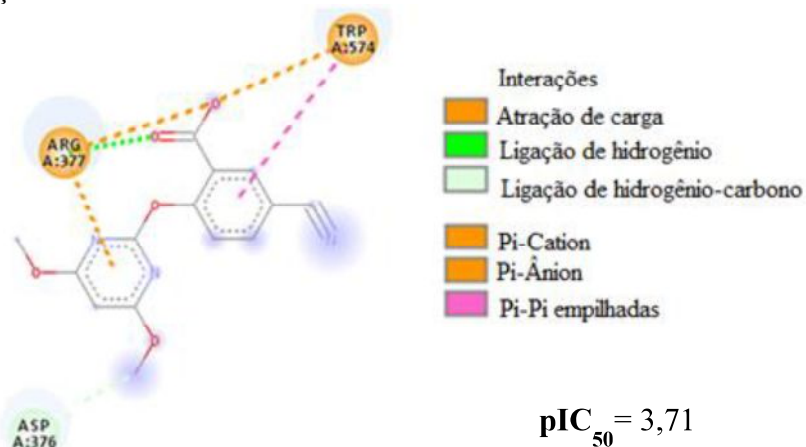
O docking do PSA01(substituinte: OC_6H_5) no local ativo de AHAS (Figura 28) apresentou uma interação do tipo π -cátion entre o anel pirimidina e o resíduo ARG-377. O resíduo TRP-574 exibiu contatos próximos com o ligante PAS01 através de interações de Van der Waals. A pequena quantidade de interações presentes está relacionada ao modo de encaixe com a enzima que não apresentou uma conformação favorável devido ao efeito estérico.

Figura 29- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligando PSA02 e os principais aminoácidos interagindo do local de ligação da enzima AHAS.



O docking do PSA02 (substituinte: CH_3) no local ativo de AHAS (Figura 29) apresentou três interações envolvendo o resíduo ARG-377, sendo duas interações do tipo π -cátion com o anel pirimidina e o anel salicilato, e realizou também uma ponte salina com o átomo de oxigênio doador de elétrons presente no grupo carboxilato. As pontes salinas são interações devido à atração entre porções carregadas de sinais opostos.

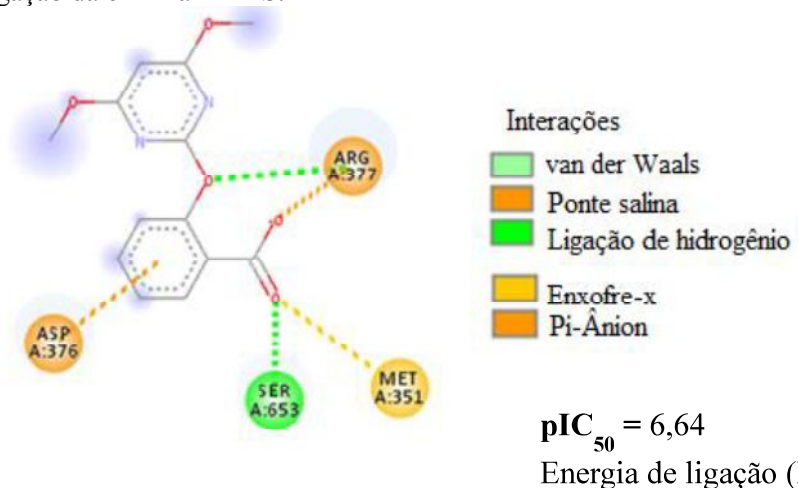
Figura 30- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligando PSA03 e os principais aminoácidos interagindo do local de ligação da enzima AHAS.



O docking do PSA03 (substituinte: CN) no sítio ativo da enzima AHAS (Figura 30) apresentou uma ligação de hidrogênio entre o resíduo ARG-377 e o átomo de oxigênio do grupo carboxilato com 2,00 Å de comprimento. O resíduo ARG 377 também exibiu interação do tipo π -cátion com o grupo pirimidina. Ocorreu ainda uma interação do tipo π - π entre o anel salicilato e o resíduo TRP-574. O resíduo ASP-376

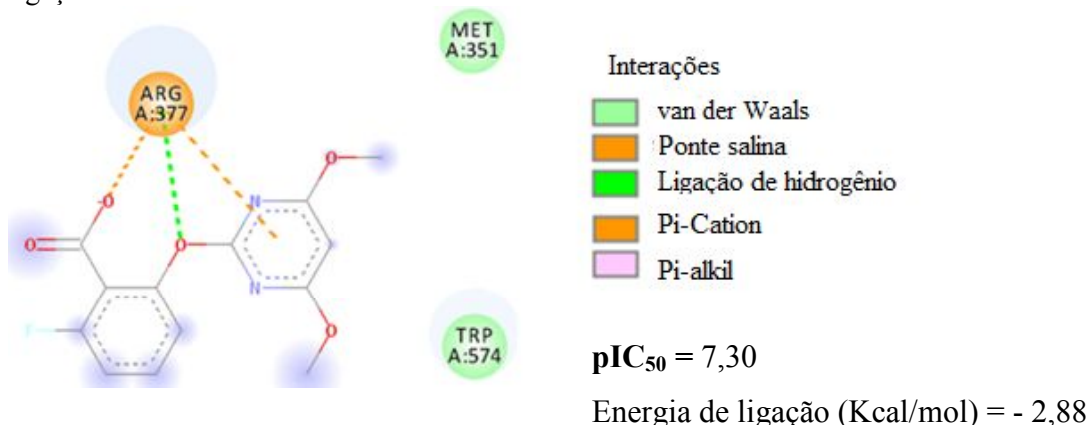
realizou uma ligação de hidrogênio carbono (C-H... O) com os grupos presentes no anel pirimidina.

Figura 31- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligando PSA04 e os principais aminoácidos interagindo do local de ligação da enzima AHAS.



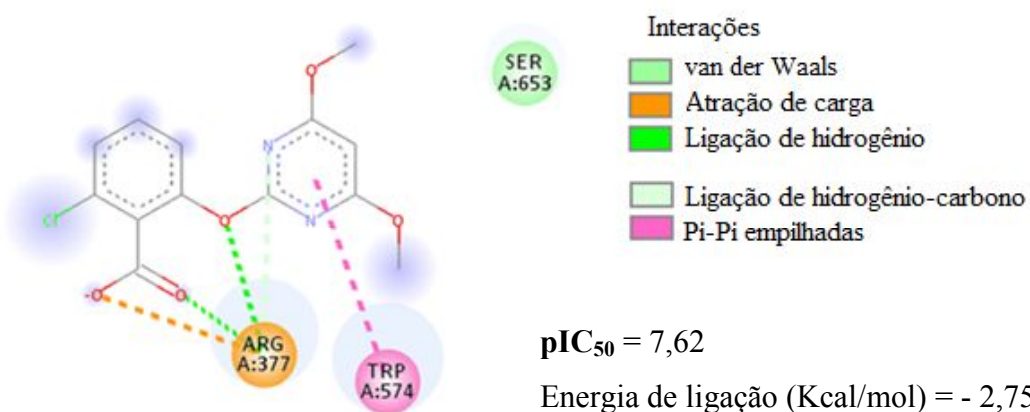
O *docking* do PSA04 (substituinte: H) no sítio ativo da enzima AHAS (Figura 31) apresentou duas interações de hidrogênio, uma entre o resíduo SER-653 e o oxigênio do grupo carboxilato com 1,75 Å de comprimento, e outra entre o átomo de oxigênio e o resíduo ARG-377 com 3,09 Å de comprimento. Ademais, foi observada uma interação de enxofre entre o oxigênio do grupo carboxilato do ligante e o resíduo MET-351. Além disso, o resíduo ARG-377 fez uma ponte salina com o oxigênio do grupo carboxilato. Foi exibida também uma interação do tipo π -ânion entre o resíduo ASP-376 e o anel salicilato. O resíduo TRP-574 apresentou contatos próximos (interações de Van der Waals) com o ligante PAS04 através de interações de Van der Waals.

Figura 32- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligando PSA05 e os principais aminoácidos interagindo do local de ligação da enzima AHAS.



O *docking* do PSA05 (substituinte: F) no sítio ativo da enzima AHAS (Figura 32) apresentou uma interação de hidrogênio entre o oxigênio do ligante e o resíduo ARG-377 com 3,05 Å de comprimento e também exibiu uma interação do tipo π -cátion com o anel pirimidínico. Os resíduos TRP-574 e MET-351 apresentaram contatos próximos com o ligante PAS05 através de interações de Van der Waals.

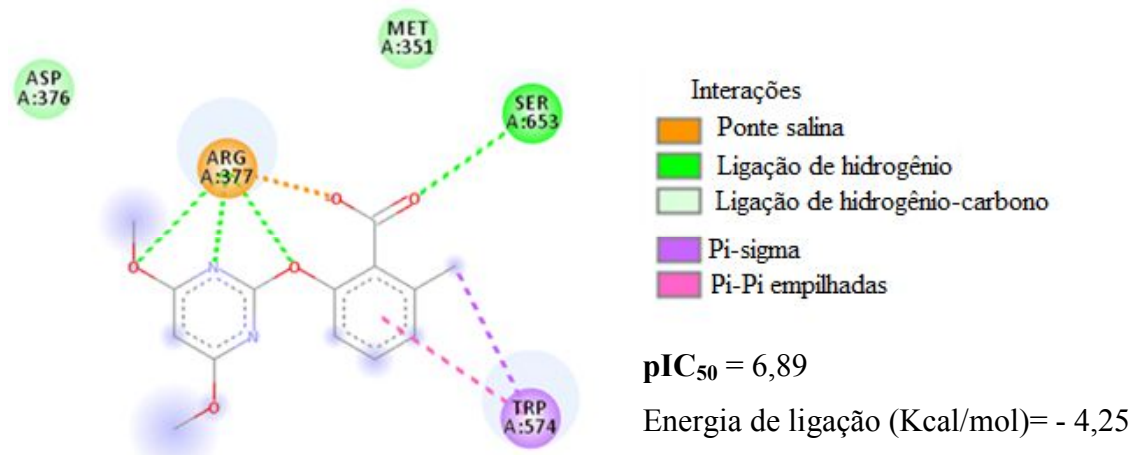
Figura 33- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligando PSA06 e os principais aminoácidos interagindo do local de ligação da enzima AHAS.



O *docking* do PSA06 (substituinte: Cl) no sítio ativo da enzima AHAS (Figura 33) apresentou uma ligação de hidrogênio entre resíduo ARG-377 e átomo de oxigênio presente no grupo carboxilato com 2,16 Å de comprimento, e outra ligação de hidrogênio entre o oxigênio do ligante e o resíduo ARG-377 com 2,15 Å de comprimento. Foi exibida também uma atração carga-carga entre o átomo de oxigênio

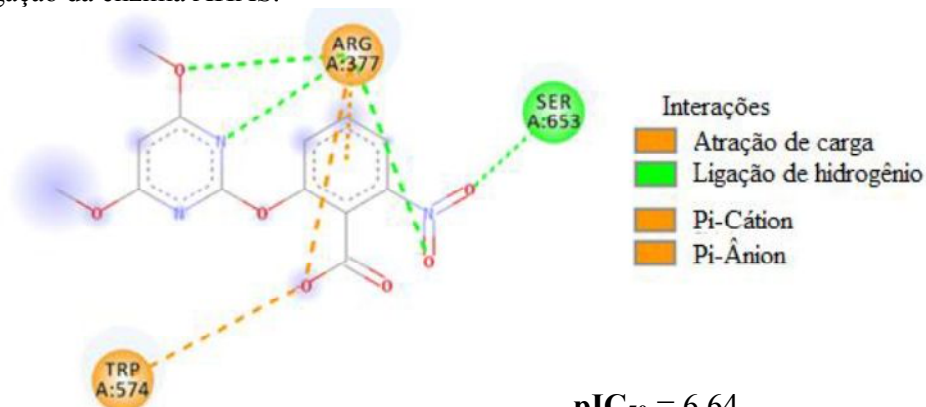
do grupo carboxilato e o resíduo ARG-377. O resíduo TRP-574 apresentou uma interação do tipo $\pi - \pi$ com o anel pirimidínico. O resíduo SER-653 apresentou contatos próximos com o ligante PAS06 através de interações de Van der Waals.

Figura 34- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligando PSA07 e os principais aminoácidos interagindo do local de ligação da enzima AHAS.



O *docking* do PSA07 (substituinte: CH₃) no sítio ativo da enzima AHAS (Figura 34) exibiu uma ligação de hidrogênio entre o átomo de oxigênio presente no grupo carboxilato e o resíduo SER-653 com 2,87 Å de comprimento e também duas ligações de hidrogênio entre a porção pirimidina e o resíduo ARG-377 sendo uma com o átomo de nitrogênio que apresentou 2,14 Å de comprimento e outra com o átomo de oxigênio que exibiu 2,07 Å de comprimento. O resíduo ARG-377 ainda apresentou uma ligação de hidrogênio com o átomo de oxigênio do ligante entre as estruturas aromáticas com 1,93 Å de comprimento. Além disso, o anel salicilato também fez interação do tipo $\pi - \pi$ com o resíduo TRP-574. Os resíduos ASP-376 e MET-351 apresentaram contatos próximos com o ligante PAS07 através de interações de Van der Waals.

Figura 35- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligando PSA08 e os principais aminoácidos interagindo do local de ligação da enzima AHAS.

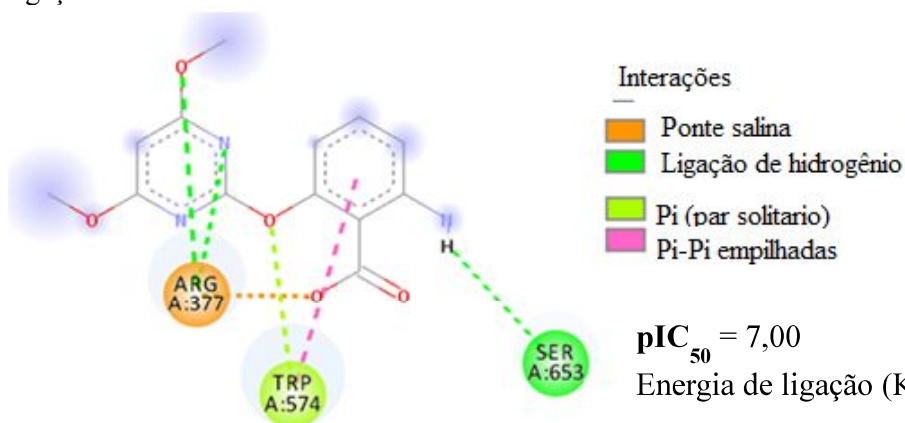


$$pIC_{50} = 6,64$$

$$\text{Energia de ligação (Kcal/mol)} = - 3,00$$

O *docking* do PSA08 (substituinte: NO₂) no sítio ativo da enzima AHAS (Figura 35) exibiu uma ligação de hidrogênio entre o átomo de oxigênio do grupo carboxilato e o resíduo SER-653 com 1,84 Å de comprimento. Além disso, três ligações de hidrogênio entre o resíduo ARG-377 sendo uma com o oxigênio do grupo substituinte NO₂ apresentando um comprimento 2,17 Å, uma com o átomo de nitrogênio da porção pirimidina tendo 2,51 Å de comprimento e outra com o átomo de oxigênio também da porção pirimidina com 2,29 Å de comprimento. Também ocorreram interações do tipo π -cátion e π -ânion entre o resíduo ARG-377 com átomo de oxigênio o anel salicilato. Observou-se também uma atração carga-carga entre o resíduo TRP-574 e o átomo de oxigênio do grupo carboxilato.

Figura 36- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligando PSA09 e os principais aminoácidos interagindo do local de ligação da enzima AHAS.

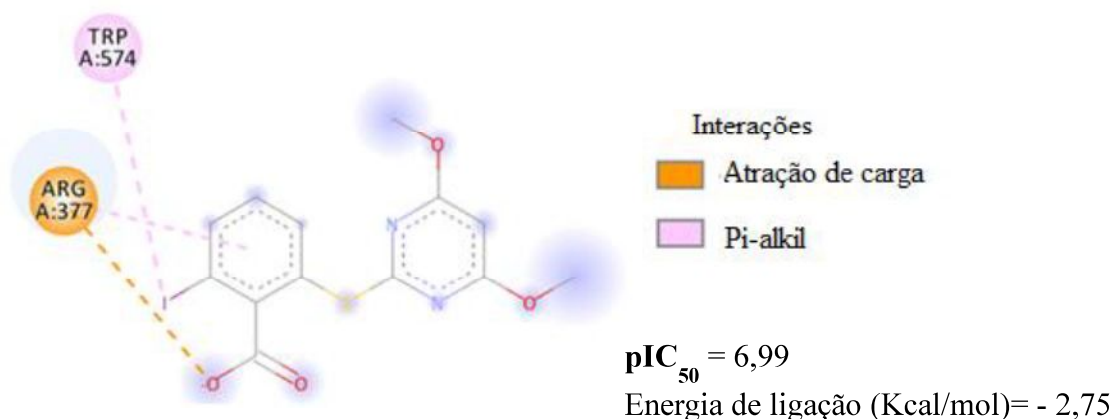


$$pIC_{50} = 7,00$$

$$\text{Energia de ligação (Kcal/mol)} = - 3,25$$

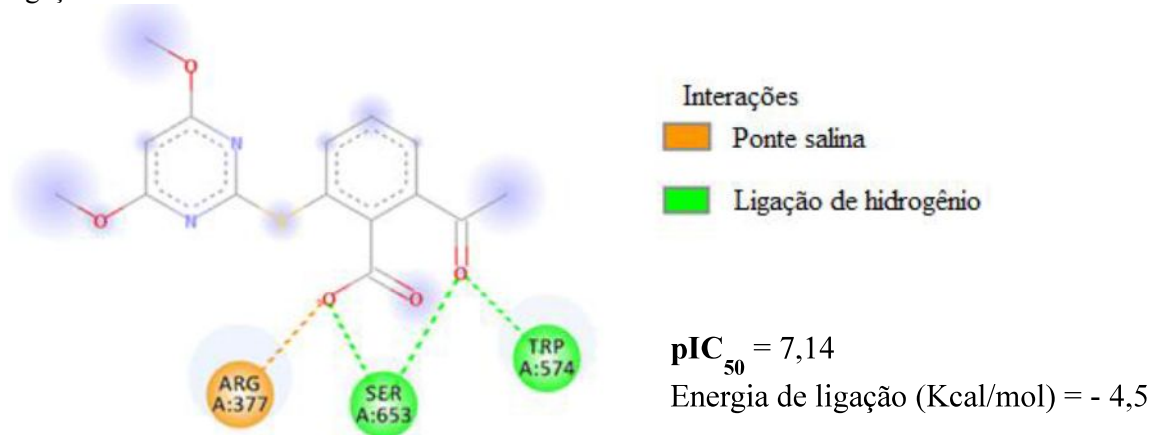
Após o *docking* do PSA09 (substituinte: NH_2) no sítio ativo da enzima AHAS (Figura 36) foram observadas duas ligações de hidrogênio envolvendo o resíduo ARG-377 sendo uma com o átomo de oxigênio da porção pirimidina com um comprimento de 2,20 Å, e outra com o átomo de nitrogênio também da porção pirimidina apresento um comprimento de ligação de 2,57 Å. Foi exibida também uma ligação de hidrogênio entre o resíduo SER-653 e o átomo de hidrogênio do grupo substituinte NH_2 com 2,80 Å de comprimento. Ocorreram duas interações envolvendo o resíduo TRP-574 sendo uma do tipo π - π com o anel salicilato e uma do tipo π com o átomo de oxigênio do ligante. Além de uma ponte salina entre o resíduo ARG-377 e o átomo de oxigênio do grupo carboxilato.

Figura 37- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligando PSA10 e os principais aminoácidos interagindo do local de ligação da enzima AHAS.



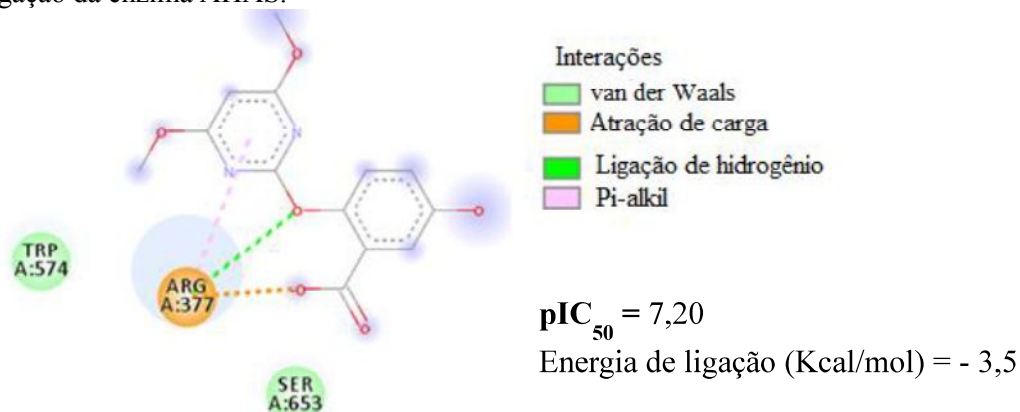
Após o *docking* do PSA10 (substituinte: I) no sítio ativo da enzima AHAS (Figura 37) foi exibida uma atração carga-carga entre o resíduo ARG-377 e o oxigênio do grupo carboxilato. Ocorreu também uma interação do tipo π -alquila entre o resíduo TRP-574 e o átomo de iodo do grupo substituinte.

Figura 38- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligando PSA11 e os principais aminoácidos interagindo do local de ligação da enzima AHAS.



Após o *docking* do PSA11 (substituinte: $COCH_3$) no sítio ativo da enzima AHAS (Figura 38) ocorreram três ligações de hidrogênio sendo duas envolvendo o oxigênio do grupo substituinte $COCH_3$ e os resíduos TRP-574 com 1,75 Å de comprimento e SER-653 com 2,16 Å de comprimento. Ocorreu também uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio do grupo carboxilato e o resíduo SER-653 com 1,67 Å de comprimento. Além disso, existe uma ponte salina entre o resíduo ARG-377 e o grupo carboxilato.

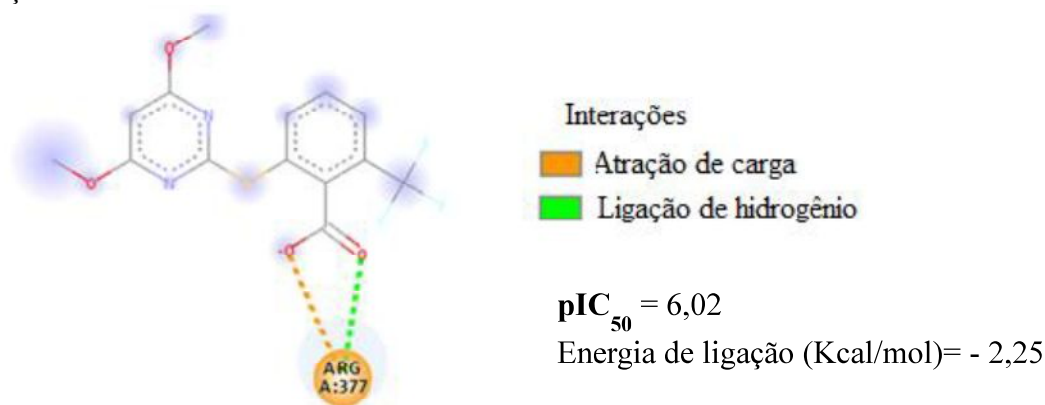
Figura 39- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligando PSA12 e os principais aminoácidos interagindo do local de ligação da enzima AHAS.



O *docking* do PAS12 (substituinte: OH) no sítio ativo da enzima AHAS apresentado na Figura 39 exibiu uma ligação de hidrogênio entre o resíduo ARG-377 e o átomo de oxigênio do ligante com 2,21 Å de comprimento. Ocorreram também duas outras interações envolvendo o resíduo ARG-377 sendo uma delas do tipo π -alquil com o anel pirimidínico e uma atração carga-carga com o átomo de oxigênio do grupo

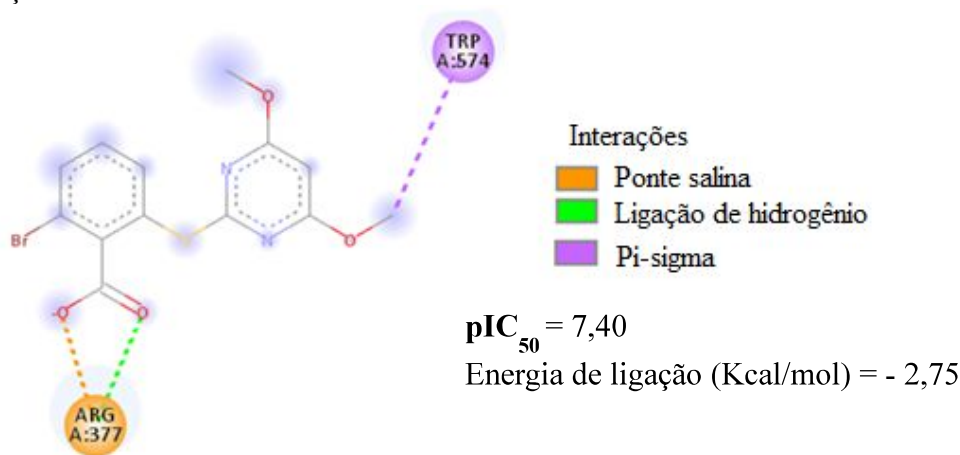
carboxilato. Os resíduos SER-653 e TRP-574 apresentaram contatos próximos com o ligante PAS12 através de interações de Van der Waals.

Figura 40- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligando PSA13 e os principais aminoácidos interagindo do local de ligação da enzima AHAS.



O acoplamento PAS13 (substituinte: CF_3) apresentado na Figura 40, exibiu uma ligação de hidrogênio entre o resíduo ARG-377 e o átomo de oxigênio do grupo carboxilato, com 2,43 Å de comprimento. Ocorreu ainda uma atração carga-carga entre o resíduo AGR-377 e o átomo de oxigênio com carga negativa presente no grupo carboxilato.

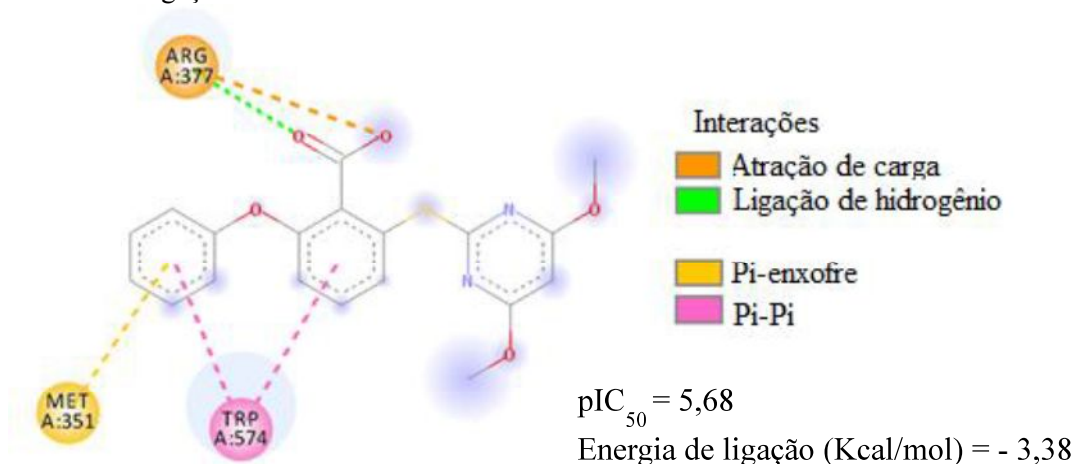
Figura 41- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligando PSA14 e os principais aminoácidos interagindo do local de ligação da enzima AHAS.



Após o *docking* do PSA14 (substituinte: Br) no sítio ativo da enzima AHAS (Figura 41) foram exibidas duas interações envolvendo o grupo carboxilato e o resíduo ARG-377 sendo uma ligação de hidrogênio com 2,14 Å de comprimento, e uma ponte

salina. O resíduo TRP-574 realizou uma interação do tipo π - σ com o átomo de Bromo do grupo substituinte.

Figura 42- Representação 2D do programa DS Visualiser (SANNER, 1999), das interações intermoleculares entre o ligando PSA15(comparação) e os principais aminoácidos interagindo do local de ligação da enzima AHAS.



Após o *docking* do PSA15 (substituinte: OC_6H_5) porem na posição 6 do anel salicilato observou-se que esta posição apresentou um maior números de interações se comparado com o PSA 01, o que esta de acordo com seu valor de energia de ligação. Ocorreu uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio do grupo carboxilato e o resíduo ARG-377 que mostrou uma atração de carga com o outro oxigênio do caboxilato. O resíduo MET-351 apresentou uma interação do tipo π com o enxofre presente neste resíduo. O TRP-574 exibiu duas interações do tipo π - π com os anéis salicilato e pirimidina.

A atividade biológica de um ligante está relacionada com sua afinidade ao receptor-alvo. Determinados modos de conformação no encaixe do sitio ativo da enzima ocorrem para maximizar os contatos com resíduos específicos da enzima, o que aumenta as contribuições eletrostáticas, hidrofóbicas, e de Van der Waals na formação do complexo. De acordo com a análise de interação, é possível observar que o grupo carboxilato presente em todas as estruturas dos ligantes, sempre realizaram interações com resíduos enzimáticos, sugerindo que eles são importantes para a atividade dos PSAs como citado anteriormente. Além disso, observou-se que o resíduo ARG-377 é o principal resíduo de interação com os PSAs. O átomo de oxigênio dos ligantes é o principal doador nas interações de ligações de hidrogênio. Por outro lado, o átomo de enxofre presente nos PSAs 10, 11,13 e 14 não contribuiu indiretamente nas interações.

Foi constatado também que os PSAs que apresentam energias de ligação mais favoráveis exibiram varias ligações de hidrogênio.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os cálculos das propriedades físico-químicas através de modelagem molecular permitiu compreender a interação entre um ligante e seu alvo-receptor. Assim, os fatores estéricos, que foram calculados a partir do volume molecular e área de Van der Waals, podem influenciar na inibição enzimática, porém nem sempre são determinantes para compreender a atividade do ligante. Através dos resultados foi possível observar que a posição do grupo substituinte pode influenciar na atividade do ligante, mostrando que a maioria dos substituintes na posição 5 no anel salicilato apresentaram baixa atividade como os PSAs 01, 02 e 03. Os parâmetros eletrônicos que foram calculados como a energia dos orbitais moleculares HOMO e LUMO influenciam na atividade dos ligantes e são propriedades bastante importantes, pois medem a capacidade doadora e receptora de elétrons. Os orbitais HOMO estão envolvidos em interações de hidrogênio entre o ligante e a enzima, que são de grande relevância para a interação entre o ligante e seu alvo-receptor. O grupo carboxilato presente em todas as 14 estruturas dos PSAs está relacionado com a interação enzima-ligante, devido ao seu comportamento como aceptor de hidrogênio.

A realização de simulações de docking molecular permitiu a análise das energias de ligação entre os análogos derivados dos PSAs e a enzima Acetohidroxiácido Sintase (AHAS). Os valores de energia se mostraram satisfatórios, apresentando bons valores de energia de ligação, destacando-se os PSAs com os grupos substituintes H, CH₃, NO₂, NH₂, COCH₃ e OH, que também interagiram bem com os aminoácidos que ficam próximos ao sítio ativo da enzima, exibindo várias ligações de hidrogênio. De acordo com a análise das interações foi possível observar que o grupo carboxilato presente em todas as estruturas dos ligantes, é muito importantes para realizar interações com resíduos enzimáticos.

De acordo com os resultados apresentados neste trabalho alguns análogos pirimidinilsalicilatos (PSAs) se mostraram bons candidatos a novos herbicidas. Porém, uma série de outros testes e análises devem ser realizados até que o objetivo final seja concluído, mas com uma pré-seleção das melhores estruturas para otimizar tempo e custo apresenta grandes vantagens. Dessa forma, levando em consideração todos os resultados obtidos no trabalho, os PSAs 07 e 11 são os melhores candidatos a herbicidas

7. TRABALHOS FUTUROS

- Analisar como a posição dos grupos substituintes afeta a atividade dos ligantes através de cálculos quânticos e docking molecular;
- Estudar qual é o papel do enxofre nas estruturas dos ligantes;
- Realizar simulações de dinâmica molecular da enzima, dos ligantes mais ativos, e do complexo enzima-ligante;

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCÁCER, L.; Introdução à Química Quântica Computacional, IST Press: Lisboa, 2007.

ALONSO, H; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, E. JILL. Combining Docking and Molecular Dynamic Simulations in Drug Design. **Medicinal Research Reviews**, v. 26, n. 5, p. 531-568, 2006. <https://doi.org/10.1002/med.20067>

ANGELOTTI, W.F.D.; BATISTA, V.H.S.; GRANATO, A.C. Comparação entre Funcionais de Densidade no Estudo de Propriedades Eletrônicas de derivados da Artemisinina. **Química Nova**, v.39 n.3, 2016.

ARROIO, A.; HONÓRIO, K. M.; SILVA, A. B. F. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p.694-699, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000300037>

ATKINS, P.; JONES, L; **Princípios de Química -Questionando a Vida Moderna**. 5 ed, Porto Alegre: Bookman, 2012.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. **Química Medicinal, As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed Editora, p.608, 2015.

BARREIRO, E. J.; RODRIGUES, C. R.; ALBUQUERQUE, M. G.; SANT'ANNA, C. M. R. D.; ALENCASTRO, R. B. D. Modelagem Molecular: Uma Ferramenta para o Planejamento Racional de Fármacos em Química Medicinal. **Química Nova**, v. 20, p. 300-310, 1997. <https://doi.org/10.1590/S0100-40421997000300011>

BEDOR, C. N. G. Estudo do potencial carcinogênico dos agrotóxicos empregados na fruticultura e sua implicação para a vigilância da saúde. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisa Ageu Magalhães, Recife, 2008.

BERNSTEIN, F. C.; KOETZLE, T.F.; GRAHEME, J.B.; EDGAR, F. M. The protein data bank: A computer-based archival file for macromolecular structures. **Archives of**

Biochemistry and Biophysics, v. 185, n. 2, p. 584–591, 1978. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(78\)90204-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(78)90204-7)

BLAZUS, M. Modelagem e Análise de Conformidade do Processo Presente em Estratégias Computacionais de Atracamento Molecular. Monografia. Instituto de Informatica Universidade Federal do Rio Grande do Sul 2015.

BRIGHENTI, A. M.; OLIVEIRA, M. F. **Biologia de Plantas Daninha**. Cap. 1, p.66, 2011. Disponível em: <http://omnipax.com.br/livros/2011/BMPD/BMPD-cap1.pdf>

BROOKS, B.R.; BRUCCOLERI, R.E.; OLAFSON, B.D.; STATES,D.J.; SWAMINATHAN, S.; KARPLUS, M.CHARM. A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations, **Jornal of Computational Chemistry**, v.4, p.187-217, 1983. <https://doi.org/10.1002/jcc.540040211>

CARVALHO, L. B. **Herbicidas**. Lages: [S.n.], 2013. Disponível em: <https://leonardobcarvalho.files.wordpress.com/2013/02/livroherbicidas.pdf>

CASSAL, V.B. et al. Agrotóxicos: Uma Revisão de suas Consequências para a Saúde Pública. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental – REGET**, v. 18 , n. 1 p.437-445, 2014.

CHANG, A. K.; DUGGLEBY, R. G. Herbicide-resistant forms of Arabidopsis thaliana acetohydroxyacid synthase: characterization of the catalytic properties and sensitivity to inhibitors of four defined mutants. **Biochemical Journal**, v. 333, p. 765–777, 1998. <https://doi.org/10.1042/bj3330765>

CHENG, T.; LI, Q.; ZHOU, Z. Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: a Problem-Centric Review. **The AAPS Journal**, vol. 14, n. 1, p 137, 2012. <https://doi.org/10.1208/s12248-012-9322-0>

CHRISTOFFOLETI, P. J. Aspectos de Resistência de Plantas Daninhas a Herbicidas. **Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas aos Herbicidas (HRAC-BR)** v.3, p.120, 2008.

COELHO, L. W. JUNQUEIRA, G.M.A. HERRERA, J.O.M. MACHADO, S.P. Aplicação de mecânica molecular em química inorgânica. **Química Nova**, v. 22, n.3, p. 396-404, 1999. <https://doi.org/10.1590/S0100-40421999000300018>

COMBA, P; HAMBLEY ,T.W;. MARTIN, B. **Molecular Modeling of Inorganic Compounds**, 3 ed, Wiley-VCH, 2009. <https://doi.org/10.1002/9783527628124>

CRAMER, C.J. **Essentials of Computational Chemistry** Theories and Models , 2 ed, John Wiley e Sons, Ltd, 2004.

DELGADO, E.J. Pyrimidinylsalicylic Based Herbicides: Modeling and Prediction, **Herbicides and Environment**, p. 682- 702, 2011.

DEWAR, M.J.S.; ZOEBISCH, E.G.; HEALY, E.F.; STEWART, J.J.P. Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. **J Am Chem Soc.** v.107, n.13, p.3902–3909, 1985. <https://doi.org/10.1021/ja00299a024>

DIAS, R.; AZEVEDO. W. F. Molecular Docking Algorithms. **Current Drug Targets**, n. 9, p. 1040-1047, 2008. <https://doi.org/10.2174/138945008786949432>

DÍAZ, G. A.; DELGADO, E. J. Quantitative prediction of AHAS inhibition by pyrimidinylsalicylate based herbicides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, n.95, p.33-37, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.06.001>

DUGGLEBY, R. G.; PANG, S. S. Acetohydroxyacid Synthase. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, n. 1, p. 1–36, 2000.

FAO (Food and Agriculture Organization). Agricultural database, 2003. Disponível em: <http://www.fao.org.br>

FERREIRA, R. Docking (ou atracamento) Molecular . (slides). Dept. de Bioquímica e Imunologia da UFMG. 2014.

GALV O, .S.; SOOS, . .; RA ASES A, S.; ETE A , S. A parametric method 3 (PM3) study of trans-stilbene. **The Journal of Chemical Physics**; v.98, n.4, p. 30163021, 1993.

GASTEIGER, J.; MARSILI, M. A new model for calculating atomic charges in molecules. **Tetrahedron Letters**, v.19, n.34, p.3181-3184, 1978. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)94977-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)94977-9)

GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity-a rapid access to atomic charges, **Tetrahedron**, v.36, n.22, p.32193228, 1980. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(80\)80168-2](https://doi.org/10.1016/0040-4020(80)80168-2)

GUERRA, R. F. Modelagem Molecular Voltada para a Construção de um Nanobiossensor Para Detecção do Herbicida Imazaquim. (Dissertação) Universidade Federal De Uberlândia, 2016.

HAMES, A.S.O. Mestrado em Biologia Computacional e Sistemas. (Dissertação) Modelagem Molecular de Inibidores de Aspartil Protease: Potenciais Novos Compostos Antimalariais, Ministério da Saúde Fundação Oswaldo Cruz , Rio de Janeiro 2012.

HEHRE, W. J. A Guide to Molecular Mechanics and Quantum Chemical Calculations. Irvine: WaveFunction, 2003.

HUEY, R.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J.; GOODSELL, D. S. A Semiempirical Free Energy Force Field with Charge-Based Desolvation **J. Computational Chemistry**, v.28, p. 1145-1152, 2007. <https://doi.org/10.1002/jcc.20634>

HUEY, R.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J.; GOODSSELL, D. S. AutoDock Automated Docking of Flexible Ligands to Receptors Version 2.4 , 1996.

JACOBSON, L. S. V; HACON, S.S; ALVARENGA, L; GOLDSTEIN, R.A; GUMS, C; BUSS, D.F; LEDA, L.R. Comunidade Pomerana e Uso de Agrotóxicos: Uma Realidade Pouco Conhecida; Departamento de Endemias, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, v 14, n.6, p.2239-2249, 2009.

KITCHEN, D; DECORNEZ H; FURR, J.R; BAJORATH, J. Docking and SC.Oring in Virtual Screening for Drug Dircovery: Methods and Apllications. **Drug Discovery Reviews**, v.3, p.935, 2004. <https://doi.org/10.1038/nrd1549>

KRAEMER, A. F. Destino Ambiental dos Herbicidas do Grupo das Imidazolinonas. **Revisão, Planta Daninha**, v. 27, n. 3, p. 629-639, 2009. <https://doi.org/10.1590/S010083582009000300025>

LASCHUK, E.F. Novo Formalismo Semi- Empírico para Cálculos Quânticos. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

LEACH, A. R. **Molecular Modelling: Principles and Applications**. 2. ed. New York: Pearson Prentice Hall, 2001.

LEVINE, I. N. **Quantum Chemistry**. 5. ed. New York: Pearson Prentice Hall, 2000.

LEVINE, I. N. **Quantum Chemistry**. 4. ed. New York: Pearson Prentice Hall, 1991.

LIMA, A.N. Universidade Federal do abc. (Dissertação) Desenvolvimento de uma abordagem para docking Proteína Ligante por meio de Algoritmos Genéticos e Modos Normais, 2010.

LOKESH, R.; KRISHNAN, K. A Handbook on Protein-Ligand Docking, Tool: AutoDock4. Department of Bio-Medical Sciences, School of Biosciences and Technology, VIT University, **Inovare Journal of Medical Sciences**, v.4, Issue 3, p.632-014, India. 2016.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil**: um guia para ação em defesa da vida. – Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, p.190, 2011.

MAGALHÃES, C. Algoritmos genéticos para o problema de Docking Proteína-Ligante. Tese (Doutorado em Modelagem Computacional) – Laboratório Nacional de Computação Científica, Rio de Janeiro, 2006.

MCCOURT, J. A.; DUGGLEBY, R. G. Acetohydroxyacid synthase and its role in the biosynthetic pathway for branched-chain amino acids. *Amino Acids*, v. 31, n. 2, p. 173–210, 2006. <https://doi.org/10.1007/s00726-005-0297-3>

MORGON, N.H; CUSTODIO, R. Teoria do Funcional de Densidade. **Química Nova**, v.18, n.1, p.44-55, 1995.

MORRIS, G. M. et al. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, p. 1639-1662, 1998. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19981115\)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B)

MOTTA, V.T. **Bioquímica Básica**. 2 ed, Med Book, p.488, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NEZU, Y.; WADA, N.; YOSHIDA, F.; MIYAZAWA, T.; SHIMIZU, T.; FUJITA, T. Dimethoxypyrimidines as novel herbicides. Part 4. Quantitative structure- activity

relationships of dimethoxypyrimidinyl(thio)salicylic acids, **Pestic. Sci.** 52, P. 343–353, 1998. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199804\)52:4<343::AID-PS726>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199804)52:4<343::AID-PS726>3.0.CO;2-G)

PANG, S. S.; GUDDAT, L. W.; DUGGLEBY, R. G. Molecular basis of sulfonylurea herbicide inhibition of acetohydroxyacid synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 9, p. 7639–7644, 2002. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211648200>

PITELLI, A.R. Competição e Controle das Plantas daninhas em áreas agrícolas. **Série Técnica IPEF**, v.4, n.12, p.1 – 24, 1987.

PORTO, M. F.; SOARES, W. L. Modelo de desenvolvimento, agrotóxicos e saúde: um panorama da realidade agrícola brasileira e propostas para uma agenda de pesquisa inovadora. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 37, n. 125, p. 17–31, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0303-76572012000100004>

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. de. **Guia de herbicidas**, v.4, p.648, Londrina: IAPAR, 1998.

RODRIGUES, C.R. Modelagem Molecular, Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola. Nº 3, 2001.

ROSO, A. C.; VIDAL, R. A. Culturas Resistentes aos Herbicidas Inibidores da Enzima ALS: Revisão de Literatura. **Pesticidas: R. Ecotoxicol e Meio Ambiente**, v. 21, p. 1324, 2011. <https://doi.org/10.5380/pes.v21i0.25849>

SANNER, M.F. Python: a programming language for software integration and development.v.17, n.1, p.57-61, 1999.

SANT'ANNA, C. . Métodos de modelagem molecular para Estudo e Planejamento de Compostos Bioativos: Uma Introdução. **Artigo- Revista Virtual de Química**, v.1, n.1, p.49-57, 2009.

SILVA, A.A. OLIVEIRA, R.S. COSTA, E.R. FERREIRA, L.R. CONSTANTIN, J.APOLONI, D.K.M. OLIVEIRA, M.F. Persistência de herbicidas do grupo das imidazolinonas e efeitos sobre as culturas sucessoras de milho e sorgo. **Acta Scientiarum** v.21, n.3, p.459-465, 1999.

SINDIVEG: Sindicato Nacional da Indústria de produtos para Defesa Vegetal. Balanço 2015. Disponível em (<http://www.sindiveg.org.br/docs/balanco-2015.pdf>)

SOLOMONS, T. W. Graham; Fryhle, Craig B. **Química Orgânica**, vol. 1, 9 ed. LTC, 2009.

SOUZA, R. L. Aplicação da Técnica de Ancoragem Molecular na Otimização do Fármaco Hipoglicemiante (Monografia). Curso em Ciências Farmacêuticas. Centro Universitário Luterano de Palmas, 2015.

STEWART, J.J.P. Optimization for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. **Journal of Molecular Modeling**. v.13, n.12, 1173-1213, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00894-007-0233-4>

STEWART, J.J.P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: Modification of NDDO approximations and re-optimization of parameters. **Journal of Molecular Modeling**. v.19, n.1, p.1-32, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00894-012-1667x>

STEWART, J.J.P. **MOPAC2016**. Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, 2016.

TAYLOR, Eric L.; HOLLEY, A. Gordon; KIRK, Melanie. Pesticide Development a Brief Look at the History. **Sref - Southern Regional Extension Forestry**, v. 1, n. 10, p.1-7, mar. 2007.

TOTROV, M.; ABAGYAN, R. Flexible Ligand Docking to Multiple Receptor Conformations: a Practical Alternative. **Current Opinion in Structural Biology**, n. 18, p.178–184, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.01.004>

VELASCO, L. O. M. O Setor de Agroquímicos. **BNDES Setorial**, n. 24, p. 69-96, 2006. Disponível em: https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/4643/1/BS%2024%20O%20Setor%20de%20Agroqu%C3%ADmicos_P.pdf

WANG, R.; LU, Y.; WANG, S. Comparative Evaluation of 11 Scoring Functions for Molecular Docking. Department of Internal Medicine and Comprehensive Cancer Center, University of Michigan Medical School and Department of Medicinal Chemistry, University of Michigan. **Journal of Medicinal Chemistry**, n.46, p. 2287- 2303, 2003.

WEINER,S.J.; KOLLMAN,P.A.; CASE,D.A.; SINGH,U.C.; GHIO,C.; ALAGONA,G.; PROFETA,S. and WEINER,P.J. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. **J. Am. Chem. Soc**, v.106, p. 765–776, 1984. <https://doi.org/10.1021/ja00315a051>