



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

ALESSANDRA GOMES MARQUES PACHECO

**MODELAGEM MOLECULAR COMPARATIVA E ESTUDOS
DE ACOPLAMENTO MOLECULAR DA ENZIMA
LANOSTEROL 14 α -DESMETILASE DO *Moniliophthora
perniciosa***

Feira de Santana
2009

ALESSANDRA GOMES MARQUES PACHECO

**MODELAGEM MOLECULAR COMPARATIVA E ESTUDOS DE
ACOPLAMENTO MOLECULAR DA ENZIMA LANOSTEROL
14 α -DESMETILASE DO *Moniliophthora perniciosa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito ao título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Santos Castilho
Co-orientador: Prof. Dr. Alex Gutterres Taranto

Feira de Santana
2009

“Esta dissertação não poderia ser concluída sem o apoio e a paciência do meu esposo Edson e meus filhos João Vítor e Ana Clara, pessoas queridas que dão sentido especial à minha vida”

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por ter me guiado durante toda esta jornada. Nada seria possível sem Ti. Obrigada pelo seu amor e cuidados constantes na minha vida.

Aos meus filhos João Vítor e Ana Clara, que suportaram minha ausência em um momento tão especial de suas vidas. E ao meu esposo Edson, que caminha comigo, nessa existência, a mais de 20 anos e sempre acreditou que na vida tudo é possível aos olhos daquele que crê.

Ao meu orientador Marcelo Santos Castilho, pela oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional e pessoal, pelos esclarecimentos, compreensão e presteza.

Ao meu co-orientador Alex Gutterres Taranto, organizador dos meus pensamentos desconexos, um estímulo para ver na Academia um caminho para a vida.

Ao Grupo de Pesquisa do Laboratório de Modelagem Molecular – LMM/UEFS, que me acompanhou durante esses dois anos e me ajudou a tentar decifrar os mistérios da modelagem molecular e em especial os mistérios do grupamento heme. Citar nomes, aqui, me levaria a uma obrigatória omissão ou esquecimento, portanto fica a mensagem: obrigada por terem crescido comigo.

Ao Dr. Marcelo Falsarella Carazzolle, pesquisador da Universidade Estadual de Campinas, pela concessão da seqüência primária da enzima lanosterol 14 α -desmetilase do *Moniliophthora perniciosa*.

Ao Prof. Dr. Aristóteles Góes Neto, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais Renováveis – UEFS por me proporcionar a oportunidade de acreditar que posso aprender a aprender...

À todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa Dissertação de Mestrado.

E mais uma vez, **Obrigada Senhor!!!!** Tu és minha fonte de inspiração, luz para o meu caminho e lâmpada para os meus pés. (Salmo 119: 105)

RESUMO

A cultura do cacau foi extremamente significativa para a economia Brasileira e foi prejudicada pela doença vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*. A falta de medidas de controle eficientes resultou, nos últimos anos, em menor produção, mudanças no uso da terra, venda de propriedades, diminuição de empregos e danos ao meio ambiente. Uma importante estratégia para desenvolver formas de controle para a vassoura-de-bruxa consiste no estudo das interações da enzima lanosterol 14 α -desmetilase do *M. perniciosa*, com fungicidas conhecidos, visando assim o planejamento de novas moléculas bioativas que bloqueiam a biossíntese do ergosterol e, conseqüentemente, induzem à morte do fungo. Compostos azólicos são ativos tanto *in vitro* quanto *in loco* contra *M. perniciosa*, contudo não existe um estudo sistemático sobre a interação destes compostos frente a enzima lanosterol 14 α -desmetilase desse fitopatógeno. Neste estudo, foi criado um modelo para a enzima lanosterol 14 α -desmetilase do *M. perniciosa* através de técnicas da modelagem molecular comparativa. Posteriormente foi caracterizado o sítio catalítico em termos de propriedade físico-química e realizados estudos de acoplamento molecular. A partir dos resultados encontrados é apresentada uma proposta de modelo farmacofórico que auxilia na compreensão das interações dos compostos azólicos com o seu alvo molecular. Entretanto, somente a avaliação biológica de novos compostos selecionados com auxílio do modelo farmacofórico permitirá identificar um modelo convergente que esclareça, de forma categórica, quais as propriedades químicas essenciais para inibição da lanosterol 14 α -desmetilase do fungo *M. perniciosa*.

Palavras-chave: Lanosterol 14 α -desmetilase. Modelagem molecular. Compostos azólicos.

ABSTRACT

The cultivation of cocoa was extremely important for the Brazilian economy but it has been hampered by the witches' broom disease, caused by the *Moniliophthora perniciosa*. The lack of efficient control measures resulted in lower production, changes in land use, property sales, reduction of jobs and damage to the environment. An important strategy to develop control methods the is broom disease witch is to study the interactions of lanosterol 14 α -desmethylase of *M. perniciosa* enzyme with known fungicides, thereby aiming at the design of new bioactive molecules that block the biosynthesis of ergosterol and consequently, induce the death of the fungus. Azole compounds are active both *in vitro* and *in situ* against *M. perniciosa*, yet there is no systematic study on the interaction of these compounds against the enzyme lanosterol 14- α demethylase this pathogen. It's study created a model for the lanosterol 14 α -demethylase enzyme of *M. perniciosa* using comparative molecular modeling. Subsequently the catalytic site was characterized in terms of physico-chemical and molecular docking studies. From the results we present a proposal of pharmacophore model that helps to understand the interactions of the azole compound with its molecular target. However, only the biological evaluation of new compounds will identify a consensus model that accounts for the chemical properties essential for inhibition of *M. perniciosa*.

Keywords: Lanosterol 14 α -demethylase. Molecular modeling. Azole compounds.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Exportação/Importação Brasileira de cacau em Milhões US\$ no período de 1989-2007 sem incluir os custos de transporte como frete e seguro. Adaptado a partir do site Alice Web (<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>). 14
- Figura 2** - Quantidade (mil toneladas métricas de amêndoas) exportadas e importadas de 1961 a 2008 Adaptado a partir do site Embrapa Web (http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2008/doc-72.pdf) 17
- Figura 3** - Biossíntese comparativa de isoprenóides estruturais de membrana nos cinco reinos. Adaptado a partir de Brown (1998). 21
- Figura 4** - Estrutura da protoporfirina. Em rosa encontra-se o átomo de ferro. Em azul, os átomos de nitrogênio, em vermelho, os átomos de oxigênio e, em cinza, os átomos de carbono. 24
- Figura 5** - Estrutura química dos imidazóis e triazóis (a) anel imidazólico em roxo, (b) anel triazólico em roxo, CG (grupo de substituição). 25
- Figura 6** - Mecanismo de ação dos fungicidas azólicos. 26
- Figura 7** - Representação do comprimento de ligação (d21 e d32) e ângulo de ligação (a321) definidos pelos átomos At1, At2 e At3. 31
- Figura 8** - Movimentos atômicos de estiramento de ligação, de deformação angular, de torção e interação entre átomos não ligados. 33
- Figura 9** - Superfície de Energia Potencial para simulação de Dinâmica molecular. 38
- Figura 10** -Trajetória da molécula durante a DM, objetivando melhor conformação. Os círculos em verde representam a molécula e kT representam respectivamente temperatura e tempo determinados previamente para a realização da Dinâmica Molecular. 40
- Figura 11** – Etapas o acoplamento molecular. Em **A** observa-se a macromolécula, em **B** o sítio ativo da macromolécula e o ligante e em **C** o modelo de interação entre o sítio ativo da macromolécula e o ligante. 41
- Figura 12** – Gráfico da energia em função da conformação mostra que a mínima energia também resulta no melhor resultado receptor-ligante em um caso de *docking* rígido. Citado por (REIS, 2008). 42
- Figura 13** - Seqüência protéica da lanosterol 14 α -desmetilase com 555 aminoácidos traduzida a partir da junção dos exons. 43
- Figura 14** - Etapas da modelagem comparativa para a construção de modelos 3D e estudos de *docking* molecular; a direita de cada etapa, em azul, se encontram-se os programas que foram utilizados. 44

- Figura 15** – Sequência primária da enzima 14 α DM do *Moniliophthora perniciosa* no formato PIR. 46
- Figura 16** - Representação estrutural dos compostos azólicos ativos identificados por MOTA (2009) através de ensaio *in vitro* contra *Moniliophthora perniciosa*. 50
- Figura 17** - Alinhamento múltiplo realizado no programa Clustal W com a sequência de aminoácidos da 14 α DM do *Moniliophthora perniciosa* e as seqüências de aminoácido das estruturas com código pdb 2W0B, 2VKU e 1E9X. Destaque em verde para as regiões sítio ativo e em vermelho para a cisteína que se liga ao grupo heme. 55
- Figura 18** - Validação representada pelo gráfico de Ramachandran (Procheck 3.0) dos resíduos que compõem a enzima 14 α DM do *Moniliophthora perniciosa*. Em **A** modelo 2LMP construído com o programa MODELLER, em **B** modelo 3LMP construído com o programa SWISS MODEL. 57
- Figura 19** - Modelo 2LMP construído com a metodologia de restrições espaciais implementada no programa MODELLER 9v6. A estrutura mostra os aminoácidos TRP 27, VAL 107, LIS 150, GLN 235, SER 369, na superfície da estrutura. O aminoácido Asp 305 está implícito na figura, representado pelos pontos rosa (destaque em preto) por estar localizado na superfície do lado oposto da estrutura. 58
- Figura 20** - Gráfico do ANOLEA (energia potencial de cada átomo na cadeia de proteína). As projeções em vermelho referem-se a valores positivos (desfavorável) de energia potencial para cada resíduo e as projeções em verde identificam os valores de energia que são satisfatórios, (valores negativos) (Fonte: Swiss Model). 59
- Figura 21** - Representação estrutural da enzima 14 α DM do fungo *Moniliophthora perniciosa* construído com o programa Swiss Model 61
- Figuras 22** - Sobreposição do modelo 3LMP à duas estruturas homólogas usadas como moldes (2W0B e 1E9X), utilizando os C α como referência Em **A** e **B** mostra o alinhamento estrutural com C α entre 3LMP (vermelho), 2W0B (verde) e 1E9X (azul), em **B** mostra as alças como regiões mais variáveis. 62
- Figura 23** - Aminoácidos que fazem parte do sítio ativo do modelo 3D da lanosterol 14 α desmetilase *Moniliophthora perniciosa*. Em **A** estrutura do modelo (destaque em amarelo para o inibidor experimental e em vermelho para o grupamente heme, em azul para região do sítio catalítico da enzima. Em **B** representação estrutural da região do sítio catalítico da enzima lanosterol 14 α desmetilase do *Moniliophthora perniciosa*. 62
- Figura 24** - Em **A** é possível observar o inibidor experimental (3-{{(4-metilfenil)sulfonil}amino}propilpiridina-4-ilcarbamate), o grupo prostético e o resíduo CYS407 ambos presentes no sítio ativo do modelo 3LMP da lanosterol 14 α -desmetilase do *Moniliophthora perniciosa*. Em **B** é possível observar o inibidor experimental (3-{{(4-metilfenil)sulfonil}amino}propilpiridina-4-ilcarbamate) e o

- resíduo CYS394 e grupo prostético presentes no sítio ativo da estrutura pdb 2W0B elucidada experimentalmente. 63
- Figura 25** - Comparação entre as distâncias, em Å, de algumas ligações do heme da lanosterol 14 α -desmetilase do *Moniliophthora perniciosa*, após otimização e as distâncias de referência (entre parênteses) obtidas à partir de dados cristalográficos. 64
- Figura 26** - Gráfico do ANOLEA (energia potencial de cada átomo na cadeia de proteína). Após a otimização do modelo com valor total de energia (-1641/kT). As projeções em vermelho referem-se a um valor positivo de energia potencial para cada resíduo, e as projeções em verde identificam os valores de energia que são satisfatórios, ou seja, os valores negativos. (Fonte: Swiss Model). 65
- Figura 27** – Análise da qualidade esteoquímica do modelo 3LMP A, segundo Gráfico de Ramachandran (Procheck 3.0). 66
- Figura 28** - Análise da cadeia principal do modelo 3LMP: A - avaliação do gráfico de Ramachandran; B - planaridade da ligação peptídica; C - interações ruins entre os átomos não-ligados; D - distorção dos ângulos tetraedricos dos carbonos alfa; E - energia das ligações de hidrogênio.(Fonte: Procheck 3.0). 67
- Figura 29** - Análise da cadeia lateral do modelo 3LMP A: A - Conformação gauche menos; B - Conformação trans; C - Conformação gauche mais; D - Somatório de todos os desvios padrões para Chi1; E - Conformação trans para o ângulo torcional Chi2. O eixo das coordenadas está descrito em Å (Fonte: Procheck 3.0). 68
- Figura 30** - Análise do ambiente químico de cada resíduo do modelo 3LMP A, segundo o programa Verify 3D. 69
- Figura 31** - Resultados do acoplamento molecular realizado no programa Gold entre o modelo 3LMP A da enzima 14 α DM do fungo *Moniliophthora perniciosa* e o composto cetoconazol. Soluções 2. 72
- Figura 32** - Resultados do acoplamento molecular realizado no programa Gold entre o modelo 3LMP A da enzima 14 α DM do fungo *Moniliophthora perniciosa* e o composto Econazol. Solução 3. 72
- Figura 33** - Resultado do acoplamento molecular segundo o programa GOLD 3.11 para os compostos destacados na tabela 10. Em destaque, à direita, hipótese farmacofórica formulada a partir do resultado de acoplamento molecular (duas regiões apolares (esferas amarelas) e dois nitrogênios do anel azólico (esferas azuis). 72
- Figura 34** - Comparação da conformação cristalográfica dos ligantes encontrados em 2W0A, 2W0B e 2CIB com o modelo farmacofórico criado a partir do acoplamento molecular. 72

Figura 35 - Ajuste das conformações obtidas por acoplamento molecular ao modelo farmacofórico descrito na figura 33 para os compostos: A) Proticonazol; B) Sulconazol. Note que Sulconazol não apresenta o grupo doador/aceptor de ligações de H. 73

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Redução das doses de aplicação de fungicidas e o aumento da segurança com o desenvolvimento de novas substâncias (RUSSEL, 2005). 19
- Tabela 2** - Classificação dos Inibidores de Biossíntese de Esteróides, alvos de inibição e seus compostos bioativos. Adaptado de FRAC, 2007. 22
- Tabela 3**- Resultado da busca por possíveis moldes no programa BLASTp para a seqüência de aminoácidos da 14 α -desmetilase do *Moniliophthora perniciosa*, que mostra em **A** o código PDB das possíveis proteínas a serem usadas como; em **B** a pontuação de identidade com proteína de estudo; em **C** o número dos resíduos da proteína. 52
- Tabela 4**- Resultado da busca por possíveis moldes no programa MODELLER 9v6, para a seqüência de aminoácidos da 14 α -desmetilase do *Moniliophthora perniciosa*, que mostra em **A** o código PDB das possíveis proteínas a serem usadas como; em **B** o escore de identidade com proteína de estudo; em **C** o número dos resíduos da proteína. 53
- Tabela 5**- Resultado da busca por possíveis moldes no programa MPI TOOLKIT para a seqüência de aminoácidos da 14 α -desmetilase do *Moniliophthora perniciosa*, que mostra em **A** o código PDB das possíveis proteínas a serem usadas como; em **B** o escore de identidade com proteína de estudo; em **C** o número dos resíduos da proteína. 53
- Tabela 6** – Moldes selecionados com auxílio do programa MPI TOOLKIT e com o servidor BLASTp. 54
- Tabela 7** – Coordenadas atômicas da CYS407, presente no sítio ativo da lanosterol 14 α -desmetilase do *Moniliophthora perniciosa*. 63
- Tabela 8** – Distância entre o átomo de Fe do grupamento heme das 14 α DM e o átomo de nitrogênio dos inibidores, das enzimas 2W0B, 2W0A, 2W09, 1EA1, 1E9X, 2CIB e 2CIO, elucidadas por métodos experimentais que estão complexadas e depositadas no PDB. 70
- Tabela 9** – Resultado do acoplamento molecular da estrutura 3D da lanosterol 14 α -desmetilase do fungo *Moniliophthora perniciosa* com inibidores azólicos. 71

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 A CULTURA CACAUEIRA E O CONTROLE DA VASSOURA-DE-BRUXA	13
1.2 OBJETIVOS	16
1.2.1 Objetivo geral	16
1.2.2 Objetivos específicos	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 FUNGO <i>Moniliophthora perniciosa</i>	17
2.2 CONTROLE QUÍMICO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS	20
2.2.1 Fungicidas sistêmicos	20
2.2.2 Fungicidas inibidores da desmetilação do esterol	19
2.3 LANOSTEROL 14 α -DESMETILASE	23
2.4 COMPOSTOS AZÓLICOS	25
2.4.1 Mecanismo de ação dos compostos azólicos	26
2.5 BIOINFORMÁTICA ESTRUTURAL APLICADA AO ESTUDO DE PROTEÍNAS ALVO	26
2.6 MODELAGEM MOLECULAR DE PROTEÍNAS POR HOMOLOGIA	28
2.7 LIMITAÇÕES DO MÉTODO E POSSÍVEIS SOLUÇÕES	30
2.8 MÉTODOS DE CÁLCULOS COM POTENCIAL DE APLICAÇÃO AO SISTEMA PROPOSTO	31
2.8.1 Modelos de mecânica molecular	32
2.8.2 Métodos quânticos	34
2.8.3 Método mecânico quântico/mecânica molecular	37
2.9 OTIMIZAÇÃO E DINÂMICA MOLECULAR	38
2.10 DOCKING OU ACOPLAMENTO MOLECULAR	40
3 MATERIAIS E MÉTODO	44
3.1 IDENTIFICAÇÃO, ALINHAMENTO PAREADO E SELEÇÃO DAS PROTEÍNAS MOLDE	44
3.2 ALINHAMENTO MÚLTIPLO	45
3.3 CONSTRUÇÃO DOS MODELOS	46
3.4 AVALIAÇÃO DOS MODELOS	47
3.5 OTIMIZAÇÃO DO MODELO	49
3.6 PARÂMETROS DO ACOPLAMENTO MOLECULAR	49

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	52
4.1 SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS MOLDES	52
4.2 ALINHAMENTO MÚLTIPLO ENTRE ESTRUTURAS HOMÓLOGAS	54
4.3 CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO INICIAL DOS MODELOS	56
4.4 OTIMIZAÇÃO DO MODELO 3LMP	60
4.5 DESCRIÇÃO E VALIDAÇÃO DO MODELO 3LMP A	61
4.6 ACOPLAMENTO MOLECULAR COM DERIVADOS AZÓLICOS	69
5 – CONCLUSÃO	75
6 – REFERÊNCIAS	77
ANEXOS	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 A CULTURA CACAUEIRA E O CONTROLE DA VASSOURA-DE-BRUXA

O cacauieiro (*Theobroma cacao*) é uma espécie arbórea da família Sterculiaceae, originária das regiões tropicais da América Central; seu fruto foi utilizado como moeda pelos pipiles, povo indígena pré-colombiano de El Salvador, que com ele pagava tributos e compravam todo tipo de mercadoria (ALVARENGA et al, 1941). De acordo com os historiadores, o cacauieiro era considerado sagrado, pois suas sementes possibilitavam a produção do chacoatlera (chocolate), uma bebida oferecida aos deuses em cerimônias religiosas solenes. Esse significado místico provavelmente influenciou o botânico sueco Carolus Linneu (1707 – 1778), que denominou a planta de *Theobroma cacao*, chamando-a assim de “alimento dos deuses”.

A cultura do cacau permaneceu restrita à América Central até o século XVI, entretanto a partir do século XVII houve uma ampla expansão comercial do produto e seus derivados no sul da América Central, África, Europa e Ásia. Essa expansão se deve ao alto valor industrial e alimentício de suas sementes (amêndoas), que são usadas na produção de chocolate, polpas e manteiga de cacau (PURDY; SCHIMIDT, 1996; CHAVES; GIANFAGNA, 2007).

No Brasil, a produção de cacau surge em meados do século XVIII como alternativa, em termos de produtos exportáveis, para a economia canavieira que se encontrava em crise. Apesar do aumento na produção e do crescimento das exportações nas décadas de 30 e 40 do século XIX, o Brasil permanecia em posição secundária em comparação com outras regiões produtoras de cacau. Entretanto, no final do século XIX, mais precisamente em 1890, quando a produção chegou a 3.500 toneladas de cacau, o Brasil passou a ocupar lugar de destaque na exportação desse produto no mercado mundial (MARINHO, 2001).

O desempenho na produção de amêndoas do cacau encontrou seu ápice na década de 70, e a alta lucratividade, nesse período, caracterizou a cultura cacauieira como cultura de “ouro” (MENEZES; CARMO-NETO, 1993), sendo considerada uma das principais fontes geradoras de renda do Brasil, com cerca de 90% da produção destinada à exportação (BASTOS, 1987). Deste total, 80% era produzido no sul Bahia, região de maior plantio, que nos anos 80 chegou a produzir cerca de 400.000 toneladas (MARINHO, 2001).

Entretanto, a partir de 1989 adveio uma queda na produção de cacau e, conseqüentemente, na exportação do fruto. Em parte, a queda abrupta da produção pode ser explicada pelo surgimento e desenvolvimento do fungo basidiomiceto *Moniliophthora*

perniciosa (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005), causador de uma doença conhecida como vassoura-de-bruxa, a qual se constituiu no maior problema fitopatológico das regiões produtoras de cacau do continente americano (GARCIA et al, 2007; PEREIRA et al, 2005; PURDY; SCHIMIDT, 1996). A doença é originária da bacia amazônica e foi detectada, inicialmente, no sul da Bahia (PEREIRA, et al. 1996), local com condições bio-climáticas adequadas ao plantio, mas que favorecem a disseminação do fungo.

A cacaicultura brasileira, até então altamente produtiva, sofreu prejuízos de grande escala devido à propagação deste patógeno. No ano 2000, a produção baiana foi reduzida em cerca de 50% , retirando o Brasil do grupo dos países exportadores de cacau e trazendo complexos problemas econômicos para as regiões produtoras (FAO, 2002). As exportações do cacau e seus derivados caíram de 400 mil toneladas em 1990, para um volume de 32 mil toneladas em 2002, acarretando uma redução na receita de US\$ 336 milhões para US\$ 82 milhões, nesse período (AGRIANUAL, 2004). O comportamento do comércio exterior brasileiro referente à amêndoa do cacau é mostrado na **Figura 1**. Nela são apresentadas as médias anuais de exportação durante as décadas de 60, 70 e 80, assim como as exportações e importações anuais de 1990 a 2008.

Exportação/Importação brasileira

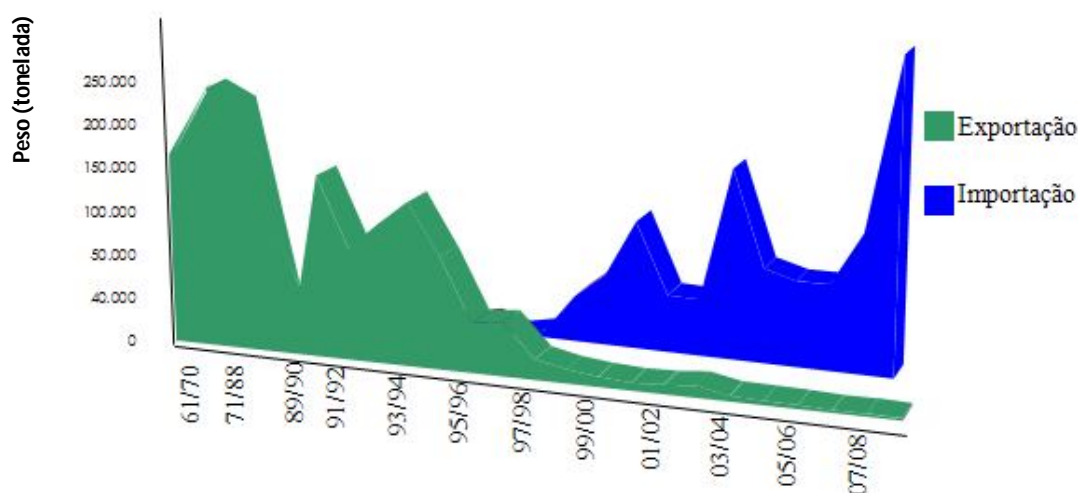


Figura 1 - Quantidade (mil toneladas métricas de amêndoas) exportadas e importadas de 1961 a 2008 Adaptado a partir do site Embrapa Web (http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2008/doc-72.pdf)

Os números não deixam dúvidas sobre os impactos econômicos e sociais oriundos da queda na produção de amêndoa. A cultura do cacau era considerada fator fundamental no processo de desenvolvimento econômico, pois propiciava a expansão não apenas nos locais de plantio, como também das atividades industriais correlatas, conduzindo ao desenvolvimento do bem-estar social da população, ao gerar empregos diretos e indiretos. Contudo, após a disseminação da doença vassoura-de-bruxa, as lavouras passaram a um estado de semi-abandono, ocorrendo até mesmo a erradicação de algumas áreas de cacau, o que provocou a demissão de muitos trabalhadores rurais, que migraram do campo para as cidades em busca de alternativas de renda, ampliando ainda mais as favelas e o desemprego nas grandes cidades (MOTA, 2009).

Com base nessas implicações e em função dos grandes prejuízos econômicos causados na produção do cacau, muitos estudos que tem como objetivo controlar a doença, foram desenvolvidos (PEREIRA et al, 1996; PURDY; SCHIMIDT, 1996; RINCONES et al, 2006). Entre as iniciativas tomadas, merecerem destaque a estruturação da Rede de Genômica do Estado da Bahia e a implantação do Projeto Genoma do *Moniliophthora perniciosa*.

Uma das recomendações da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), na tentativa de minimizar a proliferação da vassoura-de-bruxa é o uso de variedades clonais resistentes, por meio da enxertia. No entanto, esta metodologia não mostra resultados satisfatórios, pois a seleção de cultivares clonais resistentes é baseada em informações limitadas sobre a variabilidade genética do patógeno e do hospedeiro (RINCONES et al, 2006; SILVA et al, 2007).

Além das variedades clonais, outras estratégias desenvolvidas até o momento como técnicas de manejo integrado com podas fitossanitárias e controle biológico, permitem controlar apenas parcialmente a doença (OLIVEIRA; LUZ, 2005).

As podas fitossanitárias, que têm como objetivo remover plantas infectadas, possuem um custo elevado e baixa eficácia (SHAW et al, 2007). Por outro lado o controle biológico, utilizando principalmente fungos endofíticos do gênero *Trichoderma ssp.*, ainda não apresenta eficácia suficiente no controle das partes afetadas (ANEJA et al, 2005; LANA, 2004; MEJÍA et al, 2008; SILVA, 2007).

Nesse contexto, uma alternativa para o combate à vassoura de bruxa é a utilização de agro-químicos. Entretanto, o uso de fungicidas tópicos tem eficácia limitada contra o *Moniliophthora perniciosa*, fato relacionado com a própria ação dos fungicidas protetores que, geralmente, são fitotóxicos às células da planta, devendo permanecer em sua superfície.

Contudo, o crescimento acelerado das partes infectadas e a estação chuvosa, requerem constantes aplicações do fungicida, tornando esse procedimento economicamente inviável. Uma opção para o combate a vassoura-de-bruxa é a utilização de agroquímicos sistêmicos. Contudo, a maioria dos agentes testados até o momento tem eficiência somente nos testes *in vitro*, não apresentando esta reprodutibilidade no campo (MOTA, 2009).

Os antifúngicos da classe dos azóis constituem uma exceção: Tebuconazol, Hexaconazol e Triadimol, derivados da classe dos triazóis, são ativos tanto *in vitro* quanto *in loco* contra *M. pernicioso* (OLIVEIRA; LUZ, 2005). Esse resultado demonstra que a lanosterol 14 α -desmetilase, alvo desses compostos, pode ser considerada um alvo potencial para o desenvolvimento de fungicidas contra *M. pernicioso*.

Contudo, é necessário ressaltar que apesar dos efeitos biológicos observados com a utilização desses compostos, eles foram sintetizados para o tratamento de infecções fúngicas em seres humanos, como por exemplo, aquelas causadas por *Candida albicans*. Portanto a atividade desses antifúngicos contra fitopatógenos, como *M. pernicioso*, podem resultar em uma ação inibitória limitada. Fato este, relacionado com diferenças evolutivas e moleculares entre esses organismos. Portanto conhecer a estrutura tridimensional da lanosterol 14 α -desmetilase de *M. pernicioso* pode fornecer informações cruciais para entender as exigências estéricas e eletrônicas para inibição da enzima de *M. pernicioso*. Considerando que essa enzima ainda não teve sua estrutura tridimensional resolvida, fica clara a importância de se criar um modelo 3D por modelagem comparativa da enzima lanosterol 14 α -desmetilase do fungo *Moniliophthora pernicioso* para se poder, num segundo momento, realizar estudos de acoplamento molecular que auxiliem no desenvolvimento de novos antifúngicos contra o *Moniliophthora pernicioso*.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Desenvolver um modelo 3D da enzima lanosterol 14 α -desmetilase do fungo *Moniliophthora pernicioso* por modelagem comparativa, visando realizar estudos de acoplamento molecular.

1.2.2 Objetivos específicos

1. Realizar experimentos de acoplamento molecular com derivados imidazóis e triazóis ativos contra *Moniliophthora pernicioso*.
2. Elucidar as interações moleculares entre os compostos azólicos e o sito ativo da enzima em estudo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FUNGO *MONILIOPHTHORA PERNICIOSA*

A Vassoura-de-Bruxa foi observada inicialmente em 1700, mas a investigação científica sobre a devastação que esta doença causa em plantações iniciou-se em 1890 por Gregor Stahe que isolou e nomeou o fungo causador, *Marasmius perniciosa*. Atualmente, como resultado de estudos de filogenia molecular com representantes da família *Marasmiaceae*, realizados por AIME, PHILLIPS-MORA (2005), o fungo é denominado como *Moniliophthora perniciosa*.

Pertencente ao reino fungi, filo Basidimycotatina, ordem agaricales e família *Tricholomataceae* (MONDEGO, 2008), o *Moniliophthora perniciosa* apresenta um período de vida hemibiotrófico, ou seja, realiza uma parte do seu ciclo sobre o tecido morto do hospedeiro, constando-se uma fase saprofítica (SUÁREZ; DELGADO, 1993) e uma fase biotrófica ou parasítica que se desenvolve paralelamente aos sintomas na planta (RINCONES et al, 2008), como demonstrado na **figura 02**.



Figura 2 - Sintomas da vassoura-de-bruxa do cacauero. Em verde representado a fase biotrófica da doença e em marrom a fase necrotrófica, demonstrando as principais características da doença nos órgãos vegetais.

O fungo, em sua fase biotrófica de colonização, infecta os tecidos meristemáticos em crescimento, como brotos, botões florais e frutos. Os basidiósporos (estruturas infectantes) que germinam e se dispersam através do vento e da chuva, penetram nos tecidos dando início a infecção.

A penetração dos basidiósporos no hospedeiro se dá por meio de estômatos e ferimentos nas bases de tricomas lesados (SREENIVASAN, DABYDEEN, 1989). Eles germinam sobre a cutícula, emitindo tubos germinativos monocarióticos que penetram nos tecidos meristemáticos de folhas e do tronco, desenvolvendo hifas espessas, não-fibuladas, localizadas no meio intercelular, causando, inicialmente, reações em forma entumescimento a partir do ponto inoculado, caracterizando o micélio primário ou biotrófico. Posteriormente surgem inchaços, que provocam superbrotações e anomalias nos frutos e almofadas florais, tornando os ramos visivelmente mais espessos que o ramo original, que por sua aparência são denominados “vassouras-de-bruxa” (SUÁREZ, 1993; SUÁREZ; DELGADO, 1993).

O patógeno causa uma desordem fisiológica na planta, provavelmente alterando o seu balanço hormonal, o que resulta na hipertrofia e hiperplasia das células dos tecidos infectados. E como resultado ocorre a perda da dominância apical, aparecimento de frutos partenocárpicos e subsequente necrose e morte dos tecidos infectados (CHAVES; GIANFAGNA, 2007; KILARU et al, 2007; RINCONES et al, 2008; MONDEGO et al, 2008).

Com a necrose, que avança progressivamente desde as folhas até os talos, ocorre a dicarionização do micélio após um período que varia de três a nove semanas, ocorrendo a formação de um micélio secundário, com hifas mais delgadas (1-3 μm de diâmetro) e apresentando grampos de conexão (CEITA et al, 2007; MEINHARDT et al, 2006), que invadem as células do tecido hospedeiro, levando à morte dos ramos. Esta é a fase saprofítica da doença denominada “vassoura seca”.

Durante a transição de vassouras verdes a secas, estão presentes tanto o micélio biotrófico como o saprofítico dentro do tecido atacado (PURDY; SCHMIDT, 1996). O tecido morto permanece na árvore de maneira indefinida, enquanto o fungo vive sua fase saprofítica. O micélio do fungo no interior da vassoura seca forma massas sob condições de alta umidade relativa (menor que 80%), precipitação de 1000 a 2000 mm e temperaturas entre 22 a 28 °C, desenvolvendo, desta maneira, os basidiocarpos (PURDY; SCHMIDT, 1996). Os basidiocarpos são de cor púrpura intenso, cujo píleo apresenta um diâmetro de 5 a 30 mm com sucus radiais convexos e deprimidos no centro, a lamela é esbranquiçada. A liberação dos basidiósporos, processo reprodutivo do *M. pernicioso*, ocorre preferencialmente

à noite, estando associada à queda de temperatura e ao aumento da umidade relativa do ar, sendo disseminados pela corrente dos ventos e pela chuva. Os basidiósporos são liberados através de um mecanismo explosivo. Os mesmos têm vida curta e têm sensibilidade à luz. Em condições naturais não sobrevivem mais que uma hora.

2.2 CONTROLE QUÍMICO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

O uso de agroquímicos em diferentes culturas tem a capacidade de reduzir, de forma significativa, as perdas causadas por diferentes microorganismos e plantas competidoras. Comparando a produção agrícola com e sem o uso de defensivos agrícolas, sua utilização tem mostrado resultados muito superiores em qualidade e conseqüentemente em produtividade.

Os agroquímicos com ação antifúngica têm sido usados há muitos anos na proteção de plantas. Entretanto seu uso inicial era voltado, prioritariamente, para proteção de sementes e cereais e foi somente na década de 90 que a quantidade e a variedade de tratamentos com fungicidas atingiram algum grau de estabilidade e maturidade (RUSSEL, 2005). Por esse motivo, fungicidas mais recentes vêm sendo utilizados em quantidades relativamente pequenas devido à sua ação mais potente contra os patógenos de plantas e sua toxicidade para mamíferos tem, em geral, diminuído, tornando seu uso mais seguro (**Tabela 1**).

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

Fungicida	Ano de introdução no mercado agrícola	Quantidade aplicada kg /há	LD₅₀ mg oral /kg (mamíferos)
Sulfato cúprico	1760	10-20	472
Enxofre	1824	10-20	400-500
Ditiocarbamatos	1940s-1960s	1,5-3,5	>8000
Ftalimidas	1950s-1960s	< 2,0	>22000
Clorotalonil	1964	0,75-1,25	>10000
Geradores de carbendazim	1960s	0,25-1,0	>15000
Dicarboxamidas	1970s	0,75 -0,25	3500-10000
Triazóis (DMI)	1970s		>6200
Estrobilurinas	1990s	0,125-0,25	>5000

2.2.1 FUNGICIDAS SISTÊMICOS

O controle das doenças fitopatogênicas, causadas por fungos, pode ser realizado por diferentes métodos, em particular com aplicações de fungicidas tópicos ou sistêmicos. Os fungicidas tópicos geralmente são fitotóxicos à algumas células das plantas e por esse motivo devem permanecer em sua superfície. Quando penetram na cutícula podem causar malefícios não só ao patógeno, como também ao vegetal (ROBBS, 1991). Outra característica peculiar, que pode ser atribuída aos fungicidas tópicos, é a possibilidade de contaminação dos recursos hídricos, pois tem sido demonstrado que esses resíduos podem ser arrastados pela água de enxurrada, bem como pela água que escorre pelo solo (lixiviação). Embora os casos de contaminação de recursos hídricos com resíduos desses produtos tenham sido associados com maior frequência ao transporte dos compostos, relatos da contaminação da água de poços e minas, em decorrência da lixiviação dos resíduos, são abundantes na literatura.

Os fungicidas sistêmicos, por outro lado, devem co-existir com as células do hospedeiro, ou seja, devem discriminar entre as células do hospedeiro e do patógeno e interferir diretamente em funções essenciais à sobrevivência dos fungos tais como respiração, divisão celular e biossíntese de esteróides (JOLY; LEMARIÉ, 2002; LEROUX, 2003).

2.2.2 FUNGICIDAS INIBIDORES DA DESMETILAÇÃO DO ESTEROL

No que se refere à aplicação de agroquímicos em vegetais acometidos por infecções fúngicas, muitos deles pertencem a classe dos inibidores que interferem na biossíntese de esteróides (derivados de isoprenóides), que exercem funções essenciais não só em fungos, mas também em todos os seres eucariotos, pois desempenham um papel fundamental na integridade da membrana celular, onde estão inseridos, regulando sua fluidez, permeabilidade e, indiretamente, modulando a atividade e distribuição de proteínas associadas à membrana, incluindo, enzimas e canais iônicos (DEMEL; DE-KRUFF, 1976; LEPESHEVA; WATERMAN, 2007).

Nos cinco reinos existentes, a biossíntese e estrutura dos esteróides diferem de forma significativa (**Figura 3**). No animal o principal esteróide sintetizado é o colesterol, enquanto em plantas superiores encontra-se o sitosterol (BENVENISTE, 2004). Os fungos apresentam como principal esterol o ergosterol, um componente não polar encontrado na membrana plasmática que é responsável pela sua integridade estrutural, modulação da

fluidez, e possivelmente controla outros eventos fisiológicos responsáveis pela manutenção do ciclo de vida do fungo.

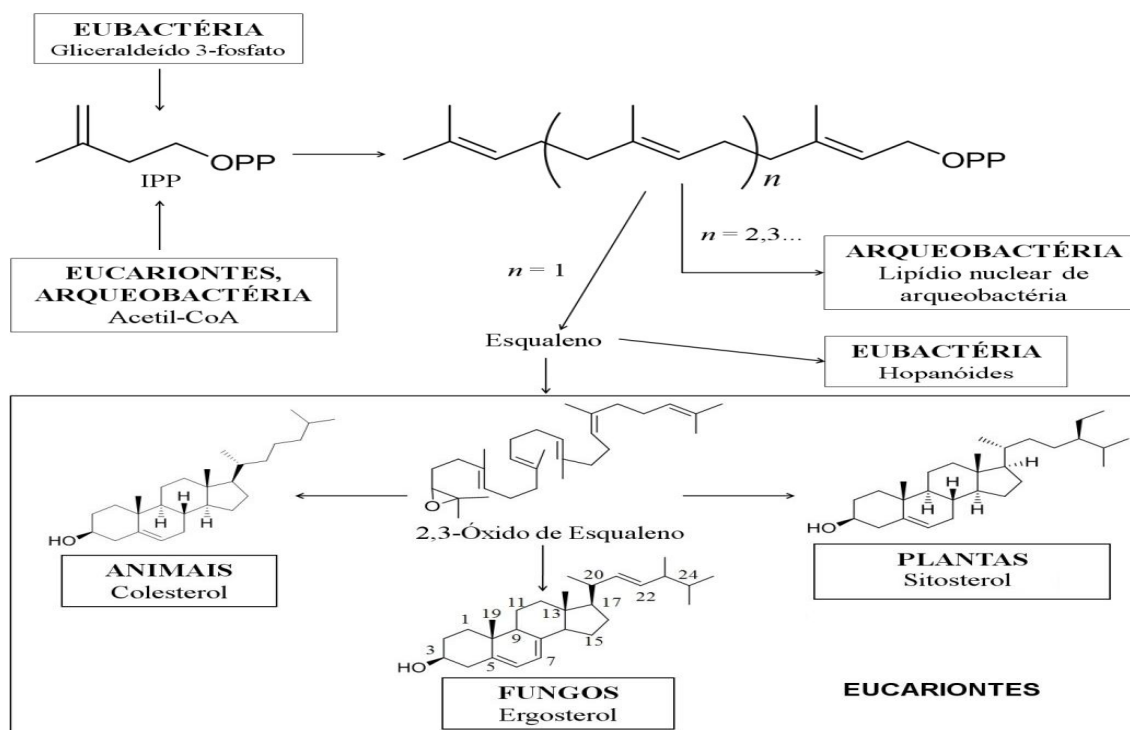
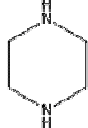

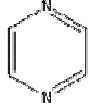
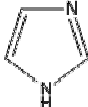
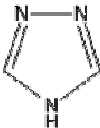
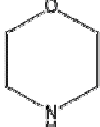
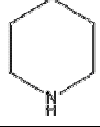
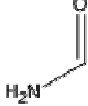
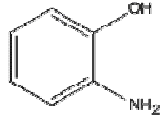
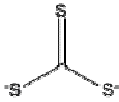



Figura 3 - Biossíntese comparativa de isoprenóides estruturais de membrana nos cinco reinos. BROWN (1998)

Inibidores de biossíntese de esteróis (IBEs) são classificados em quatro classes, de acordo com o alvo-enzimático de cada um deles (**tabela 2**). Dentre elas, a classe dos inibidores da desmetilação de esteróis (IDEs) é considerada a mais importante para o controle de doenças fúngicas de plantas e animais, devido sua alta potência antifúngica e possibilidade de controlar um amplo espectro de doenças causadas por ascomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos (BARLETT, et al. 2002). A grande vantagem dessa classe de fungicidas sistêmicos é a dificuldade dos fitopatógenos sensíveis tornarem-se resistentes. (ROCHA JÚNIOR, 2009). Essas substâncias foram usadas pela primeira vez na década de 70 e os primeiros representantes são triforine, triadimefon e o imazalil. Desde então, mais de 30 DMIs foram utilizados na agricultura (FRAC, 2007; RUSSEL, 2005; BRENDT, 1995). Esse grupo de fungicidas é extremamente eficaz na depleção do ergosterol endógeno acarretando o acúmulo de intermediários tóxicos (URBINA et al. 1997). O ergosterol é uma substância fundamental para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência dos fungos, além de ser importante para sua proliferação *in vitro*. Por essa razão, enzimas que participam da sua biossíntese são alvos potenciais para desenvolvimento de fungicidas. Entre elas destaca-se a lanosterol 14a-desmetilase, alvo dos derivados azólicos.

Tabela 2 - Classificação dos Inibidores de Biossíntese de Esteróis, alvos de inibição e seus compostos bioativos.
Adaptado de FRAC, 2007.

Classificação	Enzima alvo	Grupo Químico	Compostos comercializados
CLASSE I: DMI _s	Lanosterol 14 α -demetilase	Piperazinas 	Triforine
		Piridinas 	Pirifenoax
		Pirimidinas 	Fenarimol, nuarimol
		Imidazóis 	Imazalil, Oxpoconazol, Pefurazoato, Proclorar, Triflumizol
		Triazóis 	Azaconazol, Bitertazol, bromuconazol, Ciproconazol, difenoconazol, diniconazol, epoxiconazol, etaconazol, fenbuconazol, fluquinconazol, fluzilazol, flutriafol, hexaconazol, imibenconazol, ipconazol, metconazol, miclobutanil, penconazol, propiconazol, protioconazol, simeconazol, tebuconazol, tetraconazol, triadimefon, triadimenol, triticonazol.
CLASSE II: AMINAS (MORFOLINAS)	Δ^{14} redutase $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ isomerase	Morfolinas 	Aldimorf, Dodemorf, Fenpropimorf, Tridemorf
		Piperidinas 	Fenpropidina, piperalina
		Espirocetal aminas 	Espiroxamina

Classificação	Enzima alvo	Grupo Químico	Compostos comercializados
CLASSE III HIDROXIANILIDAS	3 cetoreductase	Hidroxianilidas 	Fenexamida
CLASSE IV	Esqualeno epoxidase	Tiocarbonato 	Piributicarbo
		Alilaminas 	Nafitifina, terbinafina

2.3 LANOSTEROL 14 α -DESMETILASE

A enzima lanosterol 14 α -desmetilase (14 α DM), cataliza reações de oxidação e redução, pertence a família CYP51 e faz parte das enzimas do citocromo P450. Essa designação se originou de suas propriedades espectrais, antes que suas funções catalíticas fossem conhecidas, pois esse grupo de proteínas tem um espectro de absorvância peculiar, com pico em aproximadamente 450 nm; o que lhe confere o nome de sistema enzimático P450 (OMURA; SATO 1962). Esse sistema refere-se a um amplo conjunto de hemoproteínas, presentes em bactérias, fungos, insetos, plantas, peixes e mamíferos (OMURA, 1999).

Embora todas as P450 tenham o interior hidrofóbico da sua estrutura semelhantes, cada isoforma apresenta substratos específicos e mecanismos únicos de reconhecimento (RAUCY; ALLEN, 2001). Todas apresentam várias hélices conservadas nomeadas de A - L, sendo que as hélices I e L são as regiões de ligação ao grupamento heme e resíduos de aminoácidos presentes nas hélices B e L são responsáveis pelo reconhecimento do substrato (GUENGERICH, 1991; RAUCY; ALLEN, 2001). Existem também duas fitas β conservadas responsáveis pelo ancoramento da proteína na membrana do retículo endoplasmático e da mitocôndria (RAUCY; ALLEN, 2001). De forma geral, uma proteína pertencente a família P450 é formada pelas α -hélices e fitas β rodeando o grupo heme (grupo prostético) da enzima. O sítio ativo consiste em um domínio hidrofóbico de ligação ao substrato, no qual se encontra o grupo prostético constituído por um átomo de ferro ligado à quatro anéis pirrólicos (grupo heme) (**Figura 4**). O grupo tiol do aminoácido cisteína, também presente no sítio

ativo, funciona como quinto ligante enquanto uma molécula de água é considerada o sexto ligante do grupo heme (WILLIANS, LEMKE, FOYE, 1995; DONATO, 2005).

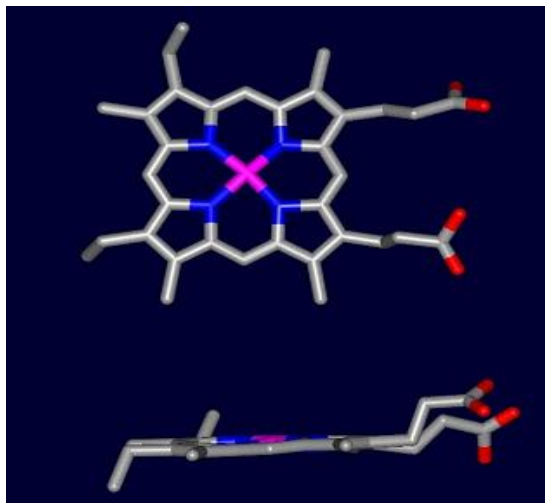


Figura 4 - Estrutura da protoporfirina. Em rosa encontra-se o átomo de ferro. Em azul, os átomos de nitrogênio, em vermelho, os átomos de oxigênio e, em cinza, os átomos de carbono.

A CYP51 catalisa a remoção oxidativa do grupo 14 α -metil para produzir intermediários insaturados. Em vias de regra, para que ocorram as reações redox durante a desmetilação, o substrato deve se posicionar próximo ao grupamento ferro-protoporfirínico presente na CYP51. [GUENGERICH, 1990; GUENGERICH; MACDONALD, 1991].

A enzima 14 α DM de levedura foi a primeira monooxigenase do citocromo P450 de eucariotos a ter sua estrutura primária determinada (KALB et al., 1986), sendo então classificada como pertencente a família CPY51. Nesse sentido, foi de extrema importância a resolução da estrutura cristalográfica da lanosterol 14 α -desmetilase da *Mycobacterium tuberculosis* em complexo com diferentes derivados de azol (PODUST et al, 2001). A partir das interações que os derivados de azol realizam no sítio ativo foi possível compreender de forma mais detalhada o mecanismo de ação desses agentes antifúngicos e construir modelos tridimensionais através de técnicas de modelagem por homologia que auxiliaram no entendimento do mecanismo de ação e de desenvolvimento de resistência dos derivados de azol (XIAO et al., 2004).

Por essa razão e pelo papel fundamental que essa enzima desempenha na biossíntese de ergosterol, ela é considerada um bom alvo para o desenvolvimento de antifúngicos. (BARTROLI et al., 1998; DI SANTO et al., 2005; SHENG et al., 2006; TAFI et al., 1996; TAFI et al. 2002).

2.4 COMPOSTOS AZÓLICOS

Desde que Wooley, em 1944, descobriu que o benzimidazol apresentava propriedades antimicóticas, foram realizadas pesquisas visando a obtenção de derivados azólicos (VIÇOSA, 2003). Entretanto, apesar da boa atividade antimicótica “*in vitro*” dos derivados de imidazol, sua atividade *in vivo* permaneceu limitada até a década de 70.

A partir dessa época, houve a descoberta de novos derivados imidazólicos (WINGARD; LEATHER 2004), o que resultou em uma nova era no tratamento de infecções fúngicas. Estes antifúngicos rapidamente ganharam grande importância para a proteção de várias lavouras, pois representaram um progresso significativo no controle químico de fitopatologias causadas por fungos (ARNOLDI et al. 2007).

Compostos azólicos são substâncias sintéticas que, em geral, contém em sua estrutura um anel heterocíclico de cinco membros com o átomo N1 ligado a outro anel aromático ou mais átomos de carbono alifáticos. Em função do número de nitrogênios no anel imidazólico, eles se dividem em imidazóis (ex: miconazol, cetoconazol) e triazóis (ex: fluconazol, itraconazol, voriconazol), conforme demonstrados na **figura 5**.

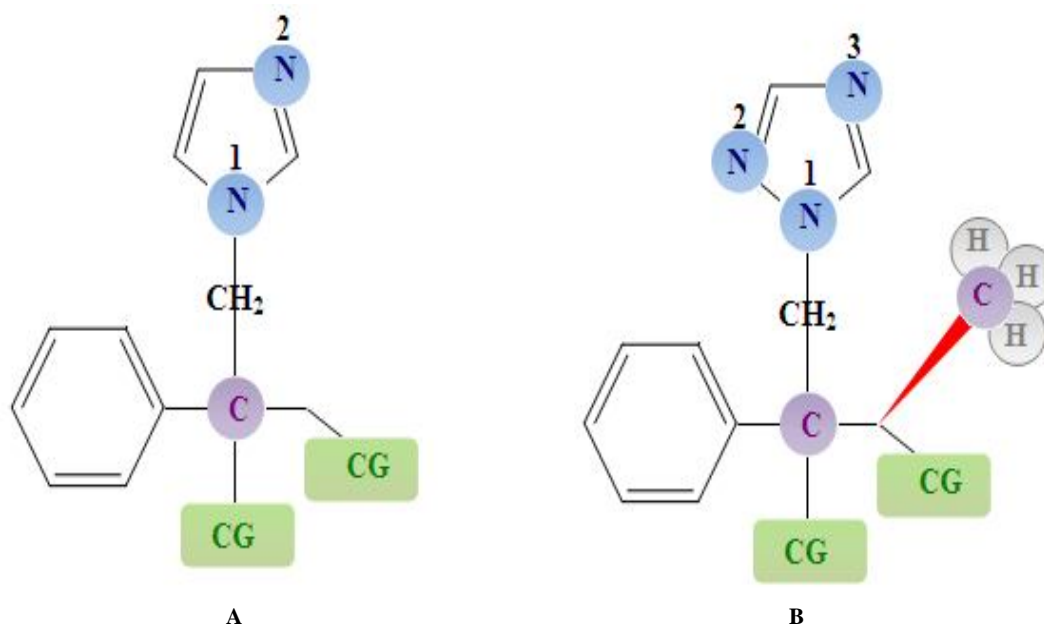


Figura 5 – Estrutura química dos imidazóis (A) e triazóis (B). CG (grupo de substituição).

2.4.1 MECANISMO DE AÇÃO DOS COMPOSTOS AZÓLICOS.

O mecanismo de ação desses compostos (**Figura 6**) baseia-se na inibição da enzima lanosterol 14 α - desmetilase. Quando um átomo de nitrogênio heterocíclico, presente nesses fungicidas, se complexa com o ferro do grupo heme presente na enzima, o substrato não pode se ligar ao sítio ativo da mesma, prejudicando a síntese do ergosterol e levando ao acúmulo do metilesteróis. Por não possuírem a mesma forma e propriedades físicas que o ergosterol, os metilesteróis alteram as propriedades da membrana, impedindo que o fungo desempenhe funções básicas necessárias ao seu desenvolvimento. Além disso, os triazóis são capazes de produzir acúmulo de peróxido de hidrogênio e assim lesionar as estruturas intracelulares dos fungos (ANDRIOLE, 2000; CATALÁN; MONTEJO, 2006).

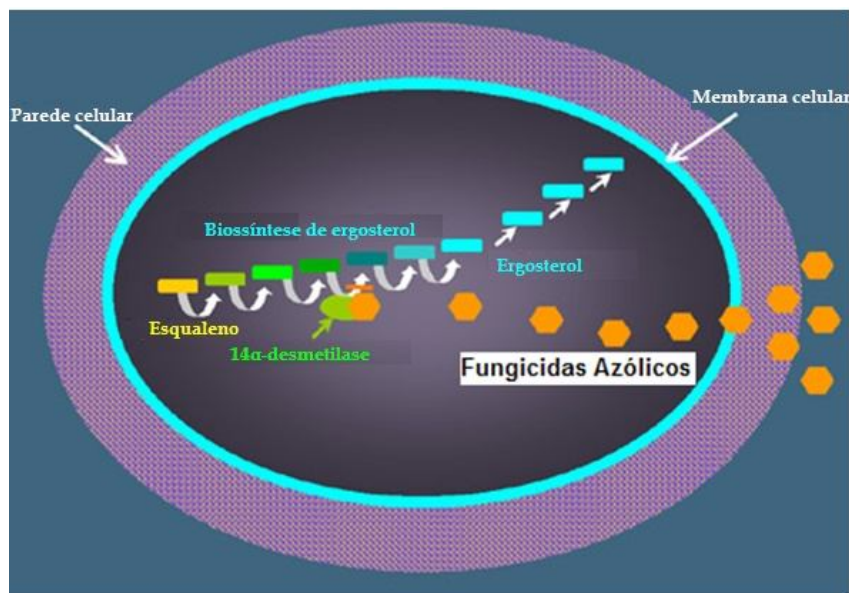


Figura 6 - Mecanismo de ação dos fungicidas azólicos

2.5 BIOINFORMÁTICA ESTRUTURAL APLICADA AO ESTUDO DE PROTEÍNAS ALVO

A Bioinformática vem sendo utilizada há algum tempo e seu uso antecede os grandes projetos genomas e as tecnologias, que a tornaram uma área tão importante. O termo foi lançado como uma nova área do conhecimento científico, para designar o emprego de computadores como ferramentas importantes para o armazenamento de informações ligadas à

descobertas no campo científico biológico, representando a interação da biologia com a informática. Atualmente, é possível dizer que a bioinformática é uma área interdisciplinar que absorve a ciência da computação, estatística, matemática, biologia molecular, física e química.

Um dos grandes objetivos da bioinformática na era pós genômica é auxiliar no entendimento estrutural e funcional de proteínas e enzimas. Estudar a função, estrutura e modo de ação das proteínas em processos celulares é passo primordial da biotecnologia (SÁNCHEZ, ŠALI, 1998; KUNDROTAS, ALEXOV. 2006), que usa métodos computacionais para criar modelos de sistemas químicos reais, baseados na estrutura de proteínas alvo. Esse tipo de pesquisa utiliza anotações de estruturas 3D de proteínas depositadas em bancos de dados para prever estruturas de outras proteínas.

O aumento no número de estruturas 3D disponíveis em bancos de dados como o PDB (*Protein Data Bank*) (BERMAN et al., 2000) levou à criação de uma sub-área da bioinformática: a bioinformática estrutural, cujo principal objetivo é a representação, armazenamento, recuperação, análise e visualização da informação estrutural em níveis atômicos.

A compreensão molecular de estruturas têm função cada vez mais significativa nos avanços de diagnósticos e tratamentos de doenças. (SANTOS FILHO, ALENCASTRO, 2003). Os projetos proteômicos visam estudar a função bioquímica de uma determinada proteína, a qual pode ser definida por suas interações moleculares, sendo a função biológica consequência dessas interações. Dessa forma, é possível dizer que a função de uma proteína é, em regra geral, determinada por sua estrutura 3D. Por esta razão, é útil conhecer a estrutura 3D de seqüências de proteínas. (SÁNCHEZ, ŠALI, 1998; KUNDROTAS, ALEXOV, 2006).

A utilização de métodos computacionais no estudo de proteínas tem se tornado uma prática rotineira nos dias atuais. Entretanto, é necessário enfatizar que o uso de modelagem molecular não é uma tarefa simples. O processo de modelagem dessas moléculas, devido à sua complexidade, envolve necessariamente o trabalho de uma equipe multidisciplinar, que emprega um grande conjunto de métodos computacionais de modo sistemático de forma a facilitar e otimizar o processo.

Diante desse contexto, inúmeros esforços têm sido feitos com o objetivo de elucidar o maior número possível de estruturas tridimensionais (estruturas terciárias e quaternárias) de proteínas (SANTOS FILHO; ALENCASTRO 2003). Entretanto, mesmo com as inúmeras inovações relacionadas à métodos experimentais, sobretudo nas áreas de cristalografia de

raios-X e Ressonância Magnética nuclear (RMN), muitos problemas persistem e a determinação da estrutura da proteína nem sempre é bem sucedida. Entre as limitações experimentais pode-se citar: amostras em quantidade insuficiente para os ensaios biológicos, cristais obtidos sem qualidade necessária para o trabalho experimental. Além disso, em certas classes de proteínas, como por exemplo, as proteínas de membrana celular raramente cristalizam e dificilmente podem ser tratadas de modo satisfatório por RMN. (SANTOS FILHO, ALENCASTRO, 2003).

Sendo a elucidação das seqüências primárias de proteínas, um processo relativamente fácil, é possível dizer que há uma enorme discrepância entre o número de seqüências primárias disponíveis, quando comparado ao número de estruturas tridimensionais. Assim, o número de proteínas estruturalmente caracterizadas (68.364 estruturas depositadas no PDB, até 23 de dezembro de 2009) é baixo, em comparação com o número de proteínas com seqüências conhecidas (513.877) (SWISS-PROT 2009). Desta forma, a utilização de métodos computacionais com o objetivo de ampliar o conhecimento estrutural de proteínas cuja estrutura 3D ainda não é conhecida, ganhou especial interesse nos últimos anos (SCHWEDE et al, 2003).

2.6 MODELAGEM MOLECULAR DE PROTEÍNAS POR HOMOLOGIA

A ferramenta mais bem sucedida de predição de estruturas tridimensionais de proteínas é a modelagem por homologia, também conhecida como modelagem comparativa. (DEANE, BLUNDELL, 2003). Esta abordagem baseia-se em alguns padrões gerais que têm sido observados, em nível molecular, no processo de evolução biológica (BRANDEN; TOOZE 1991).

Um modelo construído por modelagem comparativa necessita que, pelo menos, uma estrutura 3D da família em questão, tenha sido elucidada por técnicas experimentais e que a seqüência de aminoácidos da proteína que se quer modelar tenha sido elucidada. Entretanto, é necessário que entre ambas as seqüências (problema-molde), haja certo grau de identidade. Geralmente se considera como significativo um valor acima de 25 % para a identidade seqüencial entre a(s) proteína(s)-molde e a proteína-alvo (D'ALFONSO; VITKUP, 2001).

O método de comparação baseia-se principalmente no processo de evolução biológica, obedecendo aos seguintes padrões: (a) homologia entre seqüência de aminoácidos implica em semelhança estrutural e funcional; (b) proteínas homólogas apresentam regiões internas conservadas (principalmente constituídas de elementos de estrutura secundária: α -hélices e folhas- β); (c) as principais diferenças estruturais entre proteínas homólogas ocorrem nas

regiões externas (loops) que ligam os elementos de estrutura secundária (SANTOS FILHO; ALENCASTRO 2003). Outro fator de extrema relevância é que as proteínas agrupam-se em um número limitado de famílias e quando se conhece pelo menos a estrutura de um representante de uma família é possível modelar, na maioria dos casos, os demais membros da família (SANTOS FILHOS; ALENCASTRO, 2003).

Modelos comparativos podem ser úteis na identificação do sítio ativo e de interações moleculares (RING *et al.*, 1993), em desenhos para testes de hipótese sobre função de proteínas mutantes (BOISSEL *et al.*, 1993; WU *et al.*, 1999), em simulações de acoplamento molecular entre proteína-proteína ou proteína-ligante (VAKSER, 1997), para refinar modelos baseados em restrições de RMN (MODI *et al.*, 1996) e para confirmar uma relação estrutural remota (GUENTHER *et al.*, 1997).

A construção de uma proteína com estrutura tridimensional desconhecida através da modelagem por homologia está fundamentada na idéia de que a conformação da estrutura-molde pode ser transferida à estrutura-problema, existindo para esse fim diferentes métodos de modelagem. Dentre os mais utilizados estão: o método de modelagem pela satisfação de restrições espaciais ("modeling by satisfaction of spatial restraints") implementado no programa MODELLER 9v6 (SALI; BLUNDELL, 1993) e o método de modelagem pela união de corpos rígidos ("modeling by rigid-body assembly"), implementado no programa SWISS MODEL (GUEX; PEITSCH, 1997).

A modelagem de proteínas através do método de restrição espacial é realizada mediante a geração de um conjunto de restrições espaciais que são aplicadas à seqüência alvo. Dentre as restrições utilizadas pelo programa, estão as aplicadas nas ligações angulares (entre três átomos) e nos ângulos diedrais (entre quatro átomos). Além destas restrições, um campo de força controla as propriedades estereoquímicas entre os átomos, aplicando restrições químicas (RÖSSLE, 2004). Todas as restrições químicas e espaciais aplicadas ao modelo são combinadas em uma função, que é minimizada durante o processo de construção do modelo (FISER, SALI, 2003).

As restrições espaciais podem vir de diferentes tipos de fontes, como: estruturas homólogas, refinamento por RMN, regras de empacotamento de estruturas secundárias, reconstrução por imagem em microscopia eletrônica, potenciais de campos de força de átomo-átomo e resíduo-resíduo, etc. O MODELLER obtém restrições espaciais apenas de estruturas conhecidas homólogas, ou seja, estruturas que estejam armazenadas na biblioteca do programa.

A metodologia através da união dos corpos rígidos também pode ser empregada na modelagem comparativa. Nesta metodologia, a construção da proteína-problema ocorre por meio das transferências de coordenadas atômicas dos moldes utilizados. Após o alinhamento entre as seqüências molde e problema, os resíduos são sobrepostos e trocados, mas as coordenadas espaciais são mantidas (GOLDSMITH-FISCHMAN; HONIG, 2003). Essa técnica baseia-se na divisão das estruturas das proteínas em três conjuntos: cadeias laterais, alças e as regiões centrais conservadas. Dessa forma, cada região da molécula participa separadamente na construção do modelo, no entanto a geometria molecular é preservada considerando-se um conjunto de ligações ou distâncias entre os sítios da molécula, cujos cumprimentos são fixos (COUTINHO, MORGAN, 2007).

2.7 LIMITAÇÕES DO MÉTODO E POSSÍVEIS SOLUÇÕES

A probabilidade de ocorrer erros em modelos de proteínas construídos através do método de homologia é inversamente proporcional ao grau de identidade entre as seqüências da proteína-problema e o molde utilizado. Na maioria das vezes os erros não ocorrem igualmente em toda a estrutura o que permite a criação de um modelo satisfatório, desde que certos critérios e procedimentos sejam utilizados. A seguir estão elencados os tipos de erros mais comuns e as medidas que podem ser empregadas para corrigi-los:

- **Erros em regiões do alinhamento.** Diferenças entre as seqüências molde e problema podem dar origem a alinhamentos subjetivos que resultam em estruturas distorcidas ao nível da localização dos resíduos da cadeia principal, mesmo que o enovelamento global do modelo seja satisfatório. A utilização de várias proteínas-molde (alinhamento múltiplo) pode reduzir este tipo de erro.
- **Erros de modelagem das cadeias laterais.** Proteínas são estruturas naturalmente flexíveis, portanto é de se esperar que os resíduos da proteína problema não apresentem a mesma conformação encontrada para os resíduos equivalentes na proteína molde. Esse tipo de problema é minimizado na medida em que os moldes tenham maior identidade seqüencial possível com a proteína problema. Alternativamente, pode-se modelar apenas os átomos da cadeia principal, quando não se tem informações confiáveis acerca da conformação das cadeias laterais em uma determinada região da proteína.
- **Erros em regiões sem molde.** Este tipo de erro pode ocorrer em segmentos da estrutura-problema que não têm equivalentes na estrutura-molde, principalmente em

regiões de alças grandes. A utilização de mais de um molde e a observação criteriosa do alinhamento proposto e do ambiente em que a alça está localizada pode levar à superação deste tipo de erro.

- **Utilização de moldes incorretos.** Este tipo de erro é mais provável quando o grau de identidade é inferior a 25%, pois nesse caso é possível que haja uma relação de evolução convergente e não uma relação de homologia entre a proteína molde e a proteína problema. Nestes casos, deve-se buscar parâmetros experimentais que comprovem a relação de homologia e modificar com atenção o alinhamento de forma a alinhar regiões conservadas identificadas através de alinhamento múltiplo.

2.8 MÉTODOS DE CÁLCULOS COM POTENCIAL DE APLICAÇÃO AO SISTEMA PROPOSTO

As estruturas construídas, através da Modelagem Comparativa podem não estar na conformação mais estável, pois na construção de uma determinada estrutura, podem ocorrer distorções nos comprimentos, nos ângulos de ligações e ângulos diédricos. Átomos não-ligados também podem se chocar em uma mesma região do espaço e provocarem repulsão estérica e eletrostática. Estas distorções ou interações não previsíveis, relacionadas à sobreposição de orbital molecular, distribuição de densidade eletrônica ou interferências estéricas podem ser solucionadas por métodos de cálculos computacionais. Sendo assim, quando uma estrutura 3D é construída, ela geralmente precisa ser refinada e induzida à uma conformação estável e estericamente aceitável. O procedimento de refinamento é conhecido como otimização geométrica por minimização de energia potencial. Nesse processo as coordenadas dos átomos são modificadas de forma a alterar a energia da estrutura para um valor mínimo, através da modificação de parâmetros geométricos, como comprimentos e ângulos de ligação (**Figura 7**), a fim de aproximá-los de valores determinados experimentalmente. A estrutura de mais baixa energia é considerada como o arranjo mais estável, e, por definição, de geometria otimizada (Insight II *User Guide*, 1995).

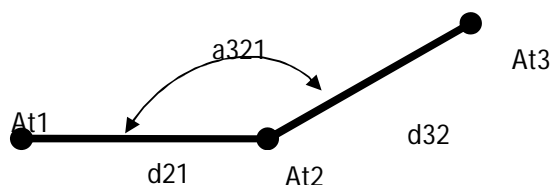


Figura 7 - Representação do comprimento de ligação (d_{21} e d_{32}) e ângulo de ligação (a_{321}) definidos pelos átomos At_1 , At_2 e At_3

Existem muitas opções quanto ao método de cálculo a ser utilizado para definir a energia de uma molécula, mas de uma maneira geral, todas elas derivam de dois métodos principais: métodos empíricos (também chamados de mecânica molecular) e métodos com base na teoria de orbital molecular, sendo que este se divide em métodos mecânico quântico DFT (Teoria do funcional de densidade), *ab initio* e semi-empíricos (FORESMAN; FRISCH, 1996). Todos os métodos citados possuem limitações, tendo cada um sua aplicação dentro da modelagem molecular.

2.8.1 Modelos de mecânica molecular

Mecânica molecular (MM) é um método empírico que calcula a energia das moléculas da estrutura, baseado nas distâncias e ângulos padrão dos núcleos. Os métodos empíricos baseiam-se na mecânica clássica, onde a energia do sistema é descrita pelo somatório das contribuições das energias de ligação, angular, torsional e por interações não ligadas. Esses valores são previamente obtidos a partir de dados experimentais ou através de cálculos, conforme equação 1 (FORESMAN; FRISCH, 1996).

$$E_{\text{total}} = \sum E_{\text{ligação}} + \sum E_{\text{angular}} + \sum E_{\text{torcional}} + \sum E_{\text{int. não ligadas}}$$

(Equação 1)

Neste método, os elétrons não são considerados de forma explícita, no entanto é presumível que eles encontrarão uma distribuição estável uma vez que os arranjos dos núcleos são conhecidos. Esta idéia é baseada na aproximação de Born-Oppenheimer, que estabelece que os núcleos são mais pesados e, portanto, movem-se mais vagarosamente do que os elétrons. Sendo assim, os movimentos nucleares, as vibrações e as rotações podem ser estudadas separadamente, admitindo que os elétrons movem-se rapidamente e ajustam-se aos movimentos do núcleo (RODRIGUES, 2001). Portanto, pode-se admitir que a mecânica molecular trata a molécula como uma coleção de esferas conectadas por molas, onde as esferas representam os núcleos e as molas representam as ligações (**Figura 8**). As equações matemáticas relacionadas à contração e expansão das molas, podem ser empregadas para propor os movimentos (estiramentos, deformações e torções) e para calcular a energia potencial associada, de modo a prever a energia de uma dada conformação molecular (FORESMAN, FRISCH, 1996).

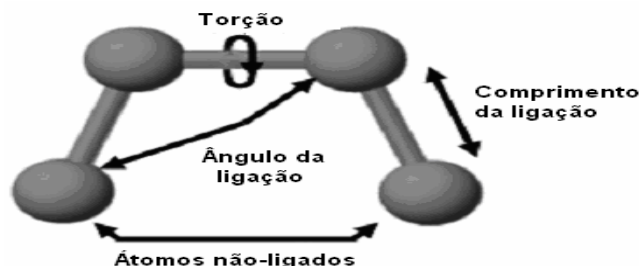


Figura 8 - Movimentos atômicos de estiramento de ligação, de deformação angular, de torção e interação entre átomos não ligados.

O termo campo de força descreve um conjunto de equações que determinam como a energia potencial de um sistema modifica com a posição de seus átomos, ou seja, é a fórmula analítica que descreve a superfície de energia potencial de uma molécula. As equações usadas são relativamente simples e são desenvolvidas a partir de dados experimentais para uma determinada classe de compostos (FRISCH, FRISCH, TRUCKS, 2003). MMX, MM2, MM3, MM4, AMBER, CHARMM, GROMOS, CSFF, OPLS são campos de força que se destacam na mecânica molecular e estão disponíveis nos programas Spartan, Titan HyperChem, Quanta, Alchemy, Pmodel, e diversos outros.

Historicamente, os primeiros campos de força da mecânica molecular MM1 (ALLINGER 1973), EAS (SCHLEYER 1973) e Mub-2 (BARTELL, 1976), foram desenvolvidos para realizarem cálculos em composto orgânicos. Em 1978 Allinger os denominou como Campos de Força de “primeira geração”, por possuírem algumas deficiências, e desenvolveu o campo de força MM2 para hidrocarbonetos, no qual incluiu os termos de torção e o aprimorou gerando os campos de força MM3 para compostos orgânicos oxigenados. Posteriormente foram desenvolvidos campos de força para compostos inorgânicos. Desde então a mecânica molecular vem sendo utilizada no estudo de sistemas contendo íons metálicos (BRUBAKER, 1984; HANCOCK, 1989; HAMBLEY, 1992; HAY, 1993; COMBA, 1994)

Os cálculos em mecânica molecular são computacionalmente rápidos e permitem seu uso em sistemas grandes, tais como proteínas, polímeros e DNA, etc. Entretanto, essa metodologia é restrita, devido à falta de parametrização para alguns sistemas e por não considerar os elétrons. Dessa forma, não se pode tratar de problemas químicos onde o efeito eletrônico seja importante, por exemplo, quebra e formação de ligação química (FORESMAN; FRISCH, 1996; BYSTROFF, et al., 2004; YUAN, BYSTROFF, 2005). Além disto, cada campo de força permite que se alcance bons resultados somente para a classe de átomos incluídos na parametrização do campo de força.

2.8.2 Métodos quânticos

Os métodos quânticos (com base na teoria de orbital molecular), considerados como uma das maiores realizações intelectuais do século XX, estão baseados em um conjunto de leis chamado de mecânica quântica, que fornece uma descrição matemática da estrutura molecular em termos dos núcleos atômicos e da distribuição eletrônica em torno deles. Para descrever o estado de um sistema, em mecânica quântica, foi postulada a existência de uma função de coordenadas chamada função de onda molecular ou função de estado $H\Psi = E\Psi$, que é a solução da equação de Schrödinger; onde o H é o hamiltoniano, uma expressão matemática dos termos energéticos da molécula englobando a energia cinética dos elétrons e potencial das partículas do sistema, e Ψ é uma função de onda molecular descrita em termos das coordenadas espaciais das partículas que constituem o sistema em um determinado estado. (HEHRE et al. 1986, FORESMAN; FRISCH 1996).

Nos cálculos quânticos a equação de Schrödinger é solucionada e a função de onda associada para os elétrons e núcleos. A função de onda contém todas as informações sobre o sistema e a partir dela podem ser calculadas todas as propriedades eletrônicas da molécula. A energia da estrutura, calculada pelo método quântico, pode ser usada na análise conformacional.

Os métodos quânticos dividem-se em, *ab initio*, DFT e semi-empíricos. O método *ab initio* é útil na determinação de estruturas complexas em termos das interações entre os núcleos e os elétrons e a geometria molecular em termos da energia mínima do arranjo dos núcleos. Entretanto, apesar de ser amplamente usado, é inviável a realização de cálculos precisos para moléculas contendo mais de 100 átomos. (COUTINHO, MORGAN, 2007).

Dentre os vários métodos quânticos, destaca-se a teoria do funcional de densidade (DFT), desenvolvido por Kohn e colaboradores (1965). Com este método, as propriedades de um sistema podem ser determinadas usando-se funcionais, ou seja, funções de outra função, as quais neste caso são dependentes de densidade eletrônica. Os custos computacionais do método DFT são relativamente baixos quando comparados a outros métodos quânticos tradicionais. Entretanto, existem dificuldades em usar a teoria do funcional da densidade para descrever interações intermoleculares adequadamente, especialmente nas forças de dispersão de van der Waals; excitações de transferência de cargas; estados de transição e energia potencial global de superfícies (BURKE et al 2005).

Tanto os métodos semi-empíricos, como os métodos *ab initio* usam, dentre outras, a aproximação NDDO (*neglect of diatomic differential overlap*) (FORESMAN; FRISCH, 1996) considerando que não há sobreposição de orbitais atômicos de diferentes átomos. Esses métodos aplicam parâmetros empíricos restringindo-se a uma base mínima, utilizando os conjuntos de bases de valência, formadas somente pelos orbitais mais externos dos átomos que participam das ligações químicas. Geralmente, utilizam-se bases de valência em cálculos semi-empíricos de moléculas grandes; dessa forma os cálculos são simplificados e o custo computacional (memória e tempo) reduzido.

Devido às dificuldades encontradas na aplicação de métodos *ab initio*, vários métodos semi-empíricos foram desenvolvidos. Os métodos semi-empíricos são mais rápidos e permitem aplicações rotineiras em sistemas moleculares médios e grandes. O alvo fundamental dos métodos semi-empíricos é o desenvolvimento de um tratamento quantitativo de propriedades moleculares com precisão, confiabilidade e custo computacional satisfatório. (SILVA, 2006)

Uma descrição detalhada sobre o desenvolvimento de métodos computacionais, em química quântica, assim como a dimensão dos sistemas para cada método, pode ser encontrada em Coutinho (2007). A seguir, será dado um breve enfoque à evolução dos métodos semi-empíricos mais triviais: MNDO (*Modified Neglect Diatomic Overlap*), AM1 (*Austin Model 1*) e PM3 (*Parametric Method 3*) (FORESMAN; FRISCH, 1996), disponíveis nos programas MOPAC, AMPAC, HyperChem e Gaussian (HEHRE, 1986).

- Método MNDO:

Método semi-empírico desenvolvido por Dewar e Thiel em 1977. Foi avaliado em diversas propriedades moleculares e atualmente é disponível para os elementos H, He, Bi, Be, B, C, N, O, F, Al, Si, P, S, Cl, Zn, Ge, Br, Sn, I, Hg e Pb. O método MNDO foi alterado, dando origem aos métodos MNDO, onde foram adicionados efeitos de correlação eletrônica e MNDO/d ao qual foi adicionado orbitais d, permitindo cálculo de sistemas com metais de transição (YOUNG, 2001; CRAMER, 2003).

- Método AM1:

Em 1985, Dewar, um pesquisador da Universidade do Texas, inseriu funções Gaussianas no método MNDO; essa alteração originou método AM1, possibilitando principalmente parametrização para ligações de hidrogênio e calor de formação com melhor desempenho do que o antigo método. (YOUNG 2001; CRAMER, 2003). O método AM1

está parametrizados para os elementos C, H, O, N, B, F, Al, Si, P, S, Cl, Zn, Ge, Br, I e Hg. Neste método foi adicionado funções do tipo Gaussianas dando origem ao método *Semi-ab initio* model 1 (SAM1 ou SAM1D quando os orbitais d são incluídos) que detém parâmetros para estimar efeitos de correlação. O SAM1 fornece melhores resultados do que o AM1 e inclui em sua parametrização, além dos elementos citados acima, Li, Fe e Cu (CRAMER, 2003).

▪ Método PM3:

Um dos autores do método AM1, J. P. Stewart, deixou o laboratório de Dewar para trabalhar como pesquisador independente e aperfeiçoou o método AM1 do ponto de vista estatístico. Assim, Stewart adotou a mesma aproximação NDDO do AM1, se limitando a duas funções Gaussianas por átomo e empregou um amplo conjunto de dados na parametrização (CRAMER, 2003).

Deste modo, Stewart considerou o seu método como o terceiro método parametrizado (PM3). O método PM3 também foi ampliado, incluindo-se orbitais d para o uso em sistemas com metais de transição, sendo denominado de PM3(tm). O diferencial desse método está na possibilidade de se empregar resultados de cristalografia de raio-X em sua parametrização, diferentemente dos demais métodos semi-empíricos com orbitais d (TITAN 1999, YOUNG 2001, CRAMER 2003). O método PM3 possui parâmetros para H, C, N, O, F, Al, Si, P, S, Cl, Br e I, divulgados em 1989, e parâmetros para alguns metais de transição no caso do PM3(tm) (CRAMER, 2003).

▪ Método PM6:

Dentre os métodos paramétricos que podem ser utilizados para tratar sistemas contendo metais de transição, está o método PM6, desenvolvido por Stewart (2007). Neste método as entalpias de formação estão melhores representadas e as geometrias apresentam grande aumento da exatidão. (STEWART, 2007). O erro médio entre as entalpias de formação, calculadas por este método, em 1373 moléculas usadas como referência, compreendendo elementos biologicamente relevantes, é apenas de 4,4 kcal/mol, enquanto para os métodos PM3 e AM1 os erros médios são de 6,3 kcal/mol e 10,0 kcal/mol, respectivamente. Estas comparações indicam que o PM6 apresenta melhor desempenho com menor custo computacional, quando comparados a outros métodos paramétricos (STEWART, 2007).

Os benefícios dos cálculos semi-empíricos quando comparados aos métodos *ab initio*, estão relacionados a velocidade do processamento, além de fornecerem bons resultados para moléculas orgânicas na predição de geometrias, energias, módulos vibracionais e estruturas de transição. Entretanto, os resultados podem se distanciar dos resultados experimentais se o sistema analisado não estiver englobado na parametrização do método.

2.8.3 Método híbrido (mecânico quântico/mecânica molecular)

O desenvolvimento tecnológico possibilitou construção de computadores com maior capacidade de armazenamento de dados e processamento, permitindo a análise de cálculos teóricos em sistemas químicos maiores. Porém, quando as propriedades de interesse dependem de técnicas que permitam analisar correlações eletrônicas, o custo e o tempo computacional podem tornar o processo inviável. A melhor alternativa para contornar essas limitações é a utilização de métodos híbridos (SVENSSON et al., 1996; DAPPRICH, 1999).

O método híbrido emprega a combinação de duas ou mais técnicas em uma simulação para investigar processos químicos de sistemas grandes, como proteínas. Entretanto, esse método representa uma nova estratégia de cálculos, em decorrência do entrelaçamento entre métodos de Química Quântica (estrutura eletrônica) e Mecânica/Dinâmica Molecular, conhecida por: *Quantum Mechanics/Molecular Mechanics* - QM/MM (DAPPRICH, 1999; VREVEN, 2006;).

A aproximação QM/MM envolve a separação do sistema em regiões QM e MM, O desenvolvimento de algoritmos eficientes tem ajudado na rotina de cálculos mecânico-quântico. Quando um tratamento mais refinado é requerido, a geometria otimizada pela MM pode ser usada como ponto de partida para cálculos quanto-mecânicos de orbitais moleculares. Esta separação ocorre em razão de vários fatores: tamanho dos fragmentos e natureza dos átomos/moléculas presentes no sistema onde existam átomos não parametrizados, enquanto o restante da molécula, constituída por átomos parametrizados e interações consideradas simples, é tratado por métodos rápidos, baseados na mecânica molecular (MASERAS, 1995; WOO, 1998; ATAUALPA, 2006).

2. 9 OTIMIZAÇÃO E DINÂMICA MOLECULAR

Ambos os métodos descritos anteriormente calculam a energia do sistema (arranjo espacial de átomos ou núcleos e elétrons) e propriedades relacionadas à energia (**Figura 9**), gerando assim a superfície de energia potencial (SEP) (FORESMAN, FRISCH, 1996).

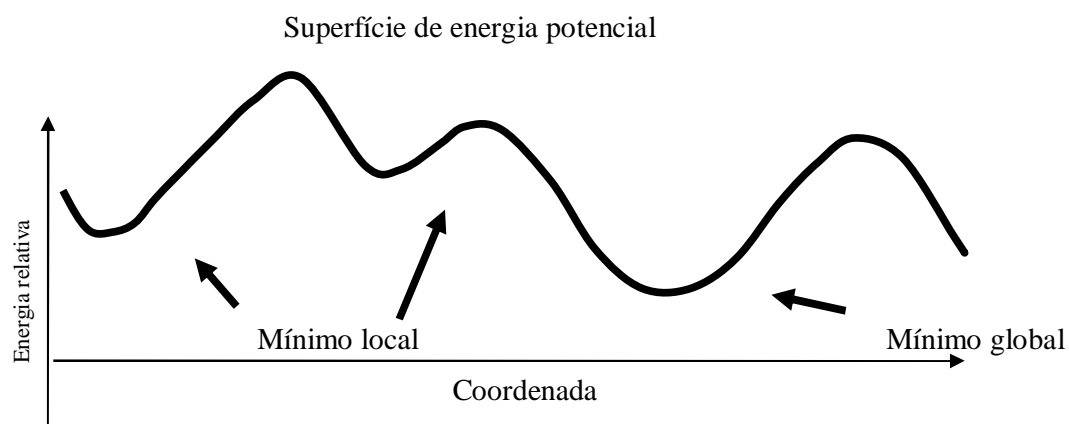


Figura 9 – Superfície de Energia Potencial para simulação de Dinâmica molecular.

Proteínas obtidas por modelagem comparativa necessitam de refinamento (HOLTJE, et al., 2003), pois durante a construção dos modelos gerados por homologia, as conformações da cadeia lateral e os loops podem ser criados aleatoriamente. Sendo assim, pode haver necessidade de ajustes para corrigir comprimentos de ligação muito extensos e interações atômicas desfavoráveis (átomos muito próximos entre si). O processo para se estabelecer uma condição energeticamente favorável consiste em “relaxar” o modelo através da otimização da geometria.

Entre os algoritmos mais utilizados para se identificar a conformação de menor energia, estão os algoritmos *Steepest Descent* e Gradiente Conjugado, que utilizam técnicas que calculam a primeira derivada da energia (LIPKOWITZ, BOYD, 1990).

Steepest Descent é o algoritmo que calcula a energia da geometria inicial do modelo e subseqüentemente aplica pequenas alterações na posição dos átomos, conforme parametrizado pelo campo de força que está sendo utilizado, gerando assim uma nova geometria. Este procedimento é repetido, sempre buscando uma região de mínimo na superfície potencial. O processo total é interrompido somente quando condições pré-determinadas, como número de interações é alcançado. Por ser um método lento, próximo às regiões de mínimo, é utilizado para originar uma geometria mais adequada para um outro algoritmo de minimização de

energia mais sofisticado, como o Gradiente Conjugado (LIPKOWITZ, BOYD, 1990).

O Gradiente Conjugado acrescenta a informação da função do *Steepest Descent* e a emprega para a determinação do passo seguinte, ou seja, durante a minimização, utiliza o valor do gradiente no ponto atual e o valor do gradiente obtido no passo anterior na busca pelo mínimo. Este método permite rápida convergência quando comparado ao método “steepest-descent”, que emprega somente a informação do gradiente na coordenada atualizada. Outra vantagem na utilização do gradiente conjugado está relacionado ao fato de que a direção do gradiente no novo ponto será sempre ortogonal ao gradiente do ponto anterior e conseqüentemente a todos os anteriores, dessa forma a direção será “conjugada” a todas as direções anteriores, evitando o retorno sobre caminhos já percorridos.

Na prática, é possível empregar os dois métodos utilizando inicialmente o “steepest-descent” com um critério de convergência relativamente baixo e na seqüência o método dos gradientes, gerando uma nova estrutura que será sucessivamente refinada. O custo computacional deste método é maior do que *Steepest Descent*. No entanto, isso é compensado pela eficiente convergência na região próxima do mínimo energético (LIPKOWITZ, BOYD, 1990).

Quando uma estrutura é gerada, utilizando somente técnicas de modelagem molecular comparativa, este novo modelo pode precisar de uma técnica mais apurada do que a minimização mencionada, se os valores de energia correspondentes estiverem distante do mínimo global da energia potencial. Isto se deve ao fato que a geometria obtida pelo processo de otimização pode representar uma provável adaptação encontrada pelo algoritmo na região de mínimo local. Dessa forma é necessário investigar o comportamento conformacional através da SEP, para que se possa aproximar o modelo o máximo possível da região de mínimo global, encontrando a estrutura 3D mais favorável energeticamente. Esse procedimento pode ser realizado através da Dinâmica Molecular (DM), uma ferramenta bastante útil para se encontrar várias regiões de mínimo da SEP (HOLTJE et al., 2003).

As simulações de DM usam a geometria da estrutura recém refinada e equações clássicas de movimento para descrever o comportamento da molécula durante um período de tempo, em uma determinada temperatura. Dessa forma, é possível encontrar outras regiões de mínimo, além da região encontrada no processo de minimização. No entanto, se estas barreiras forem muito altas ou a estrutura possuir muitos de graus de liberdade, possíveis conformêros podem não ser encontrados devido ao tempo utilizado pela simulação. Uma tática para contornar este problema é utilizar temperaturas elevadas. Os protocolos de DM geralmente usam as temperaturas de 300 K, 400 K e 600 K, fornecendo energia cinética

suficiente para que as barreiras rotacionais de energia entre diferentes conformêros possam ser “ultrapassadas”, explorando melhor a SEP (HOLTJE, et al., 2003). A trajetória resultante pode ser utilizada para se observar o comportamento da molécula durante este período de tempo, sendo este o objetivo desta metodologia (**Figura 10**).

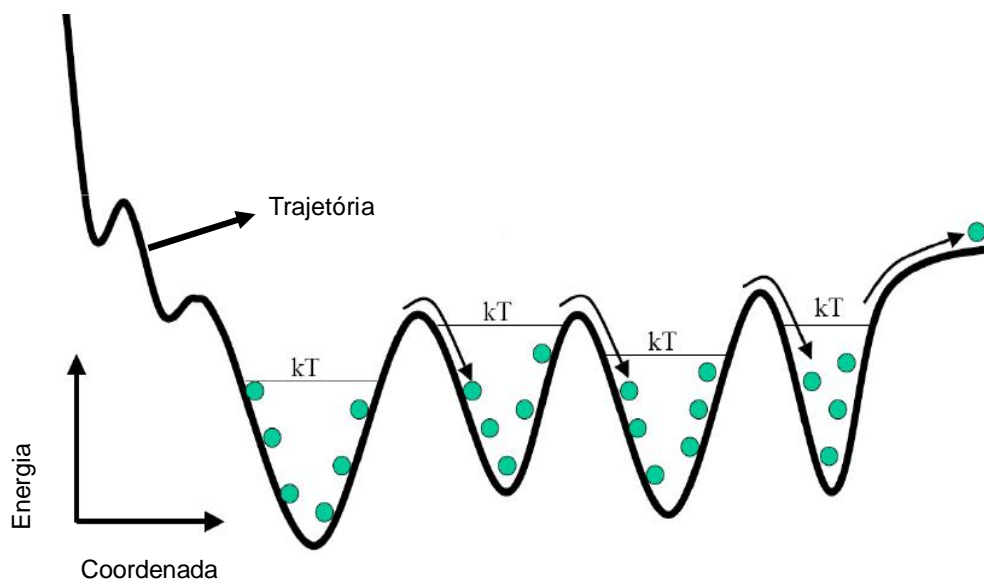


Figura 10 – Trajetória da molécula durante a Dinâmica Molecular, objetivando melhor conformação. Os círculos em verde representam a molécula e kT representam respectivamente temperatura e tempo determinados previamente para a realização da Dinâmica Molecular.

2.10 DOCKING OU ACOPLAMENTO MOLECULAR

Uma vez obtido um modelo 3D de uma proteína problema, cuja energia foi minimizada, pode-se empregar esse modelo para estudar as interações que um ligante realiza no sítio ativo da enzima. Tal procedimento é denominado acoplamento molecular (**Figura 11**), e visa prever o modo de interação de um ligante com seu alvo macromolecular, possibilitando assim prever se ligantes ainda não testados experimentalmente podem interagir com a macromolécula. Esta técnica tem grande destaque no planejamento de fármacos dirigidos a alvos específicos (EKINS, 2004; HILLISCH, et al., 2004).

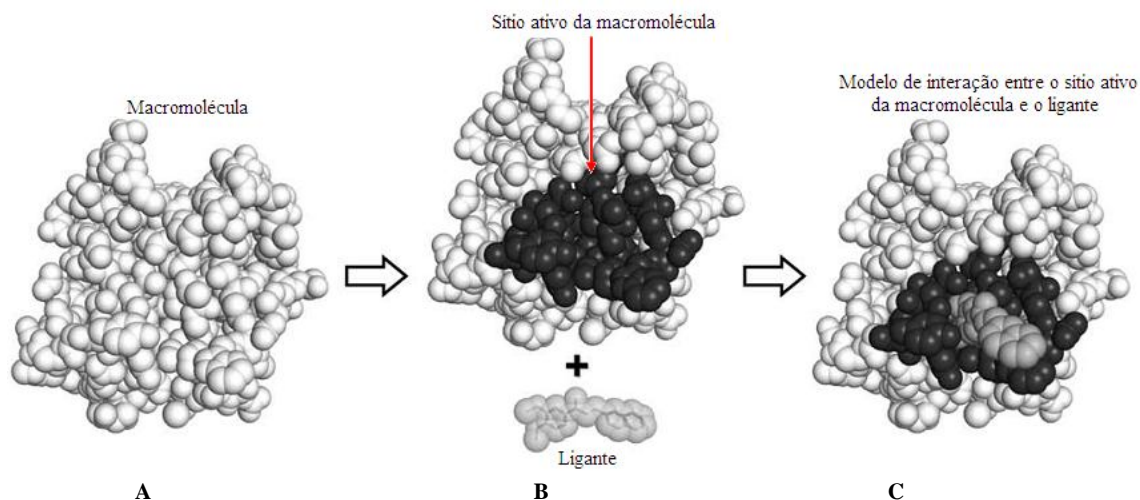


Figura 11 – Etapas do acoplamento molecular. Em **A** observa-se a macromolécula, em **B** o sítio ativo da macromolécula e o ligante e em **C** o modelo de interação entre o sítio ativo da macromolécula e o ligante.

O acoplamento molecular pode ser descrito como um problema de otimização de ajuste de formas moleculares. Nesse sentido ele pode ser dividido em duas partes: determinar qual a conformação do ligante no sítio de interação e avaliar entre todas as conformações possíveis qual a correta. Essa última etapa pode ser realizada através de cálculos de energia potencial, obtidos através de funções de pontuações, que correspondem às interações (posicionamentos) intermoleculares.

As funções de pontuação podem ser divididas em três classes: funções baseadas em campo de força, funções empíricas e funções baseadas em conhecimento (KITCHEN, et al 2004).

- Funções baseadas em Campos de Força utilizam métodos de mecânica molecular para quantificar a energia proveniente das interações entre o ligante e receptor, assim como a energia interna do ligante. As funções G-score e D-score, implementadas no pacote de programas SYBYL e a função GOLDScore, implementada no programa GOLD, são exemplos de funções baseadas em Campo de força.

- Funções Empíricas - são funções baseadas no ajuste de equações provenientes de campos de força, a partir de dados experimentais, visando calcular com maior exatidão a energia livre de interação do ligante com seu alvo macromolecular. F-Score, ChemScore e X-score, são exemplos de funções empíricas.

- Funções baseadas no Conhecimento utilizam dados estatísticos dos potenciais de pares atômicos de interação, os quais são derivados de conjuntos de dados proveniente de

complexos cristalográficos entre proteínas e ligantes para descrever as interações entre ligante e proteína.

Apesar das simplificações empregadas, as funções de pontuação implementadas nos programas de acoplamento molecular são extremamente úteis nos processos de descoberta de novos compostos com atividade biológica e na elucidação dos prováveis modos de interação entre compostos já existentes e macromoléculas.

No que se refere a identificação da conformação bioativa, o acoplamento molecular pode ser classificado quanto aos graus de liberdade (conformacional, rotacional e translacional) assumidos pelo ligante:

No acoplamento rígido (**Figura 12**), o algoritmo busca explorar diferentes posições para o ligante no sítio ativo do receptor, usando apenas o grau de liberdade rotacional e translacional, mantendo-se todos os ângulos diédricos do ligante fixos em uma posição de referência obtida previamente. (COUTINHO; MORGON 2007). Essa abordagem depende da obtenção, prévia, de um banco multiconformeros dos ligantes em estudo. Contudo, durante o acoplamento molecular, as moléculas podem sofrer alterações conformacionais, alterando sua forma para que haja melhor encaixe, dessa forma considerar a flexibilidade do ligante durante o encaixe parece ser um procedimento mais apropriado para encontrar a solução correta para o problema do acoplamento molecular.

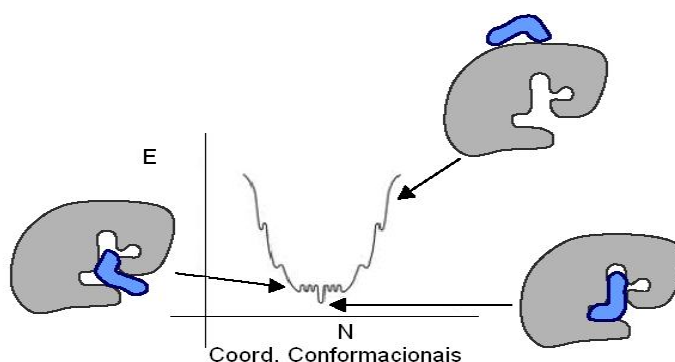


Figura 12 – Gráfico da energia em função da conformação mostra que a mínima energia também resulta no melhor resultado receptor-ligante em um caso de *docking* rígido. Citado por (REIS, 2008)

O Acoplamento flexível explora os graus de liberdade rotacional e translacional, bem como a variação dos ângulos diédricos. Embora a flexibilidade molecular seja uma característica importante para a representação da realidade, muitas vezes torna-se difícil a utilização de algoritmos que represente todos os graus de liberdade da macromolécula, razão pela qual ela é considerada como rígida durante o acoplamento molecular. Entre os diversos

métodos utilizados para explorar o espaço conformacional do ligante, os que têm obtido maior sucesso são aqueles baseados em algoritmos genéticos.

Algoritmo Genético (AG) é um exemplo de método estocástico utilizado para solucionar problemas de otimização, fundamentado nos conceitos e princípios da seleção natural e evolução, baseados na teoria de Darwin. A sistemática dos AGs consiste inicialmente na geração aleatória de uma população de possíveis soluções para o problema. Posteriormente, esta população é submetida a sucessivas evoluções através de um processo iterativo, de acordo com os operadores genéticos. Essa técnica imita o processo de evolução onde cada uma dessas estruturas codifica uma possível solução isto é, uma possível orientação do ligante dentro do sítio da macromolécula. Boas soluções, ou “indivíduos” encaixados com energia mais baixa, sofrerão mutação e recombinação para a geração de um novo grupo de soluções. Este ciclo se repete até que a variação de energia entre diversas conformações esteja dentro de valor de energia mínima.

O resultado final desse processo é um conjunto de conformações do ligante no sítio ativo da macromolécula, que se aproximam da conformação bioativa dos mesmos. Essa técnica pode fornecer informações valiosas sobre o modo de interação e sobre características físico-químicas que afetam a afinidade do ligante pela macromolécula.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A sequência protéica utilizada para a construção das estruturas tridimensionais da lanosterol 14 α -desmetilase do *Moniliophthora perniciosa* por modelagem comparativa, (**Figura 13**), foi cedida gentilmente pelo pesquisador Dr. Marcelo Falsarella Carazzolle do Laboratório de Genômica e Expressão Gênica -UNICAMP.

```
MSHVENLNGSTIPIVKDLWSGYVAQAQELSTTRLLLLAAINLPVIAIVLNVLRQVLI PRNKSEPPVVFHWLPI IGSAV
SYGNPINFFFKCREKYGNVFTF ILFGRRVTVALGAQGNNF ILGGKSTVFSAAEAYTHLTPVFGKDVVYDVPNEVFM
EQKFVKVGLSTENLRAYVGMIEDEVVEFIENDPTFKVYQDND INEWGSFDVLKILAEITILTASRTLQGGDVRSNLD
KKFAQLYNDLDGGFTPINFLFNLPLENYRKRDV AQKKMSEFFQSFIEQRRQGHSDYDQDMIEALMEQKYRSGKGLKD
HEIAHIMIALLMAGQHTSSATGSWALLHLADNPDIAEALYQEQVKHFSNPDGSRMSYEEELRELPLVLDVIRETLRV
HPIHSIMRYVRDDVPVPPTLSAPSEDRTYIVPKGHYVLASPAVSQMDPLIWRNPEKWDPARWSDPEGIAAQALKTYV
DENGEKIDYGFVAVSKGTESPYQPFAGKHCIGEQFAYLQLGTLTLLSTFVRRMELRIPTGVPAQNYHTMITMPKTPRR
IHYRRRKAN
```

Figura 13 - Sequência protéica da lanosterol 14 α -desmetilase com 555 aminoácidos traduzida a partir da junção dos exons.

3.1 IDENTIFICAÇÃO, ALINHAMENTO PAREADO E SELEÇÃO DAS PROTEÍNAS MOLDE

Após a obtenção da sequência protéica da lanosterol 14 α -desmetilase do *Moniliophthora perniciosa*, foram empregados métodos computacionais, conforme ilustra a **figura 14**, para a construção da estrutura 3D do sistema proposto e análises das interações com do sítio ativo do com derivados azólicos.

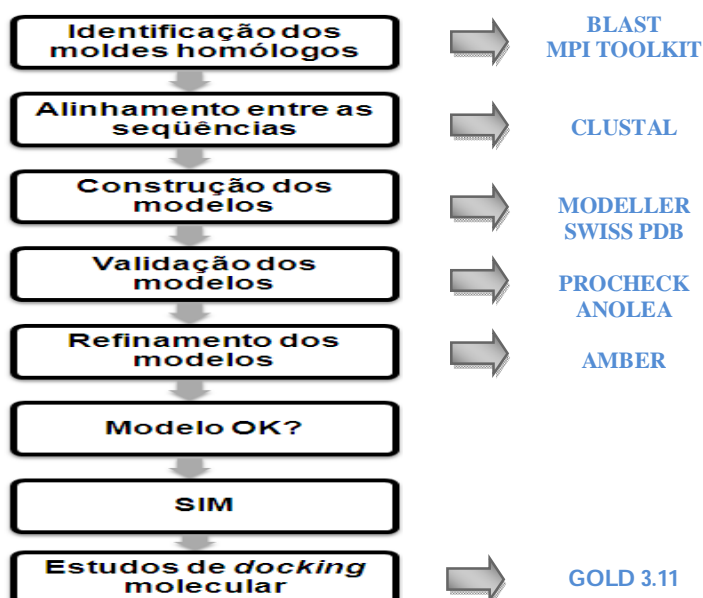


Figura 14 - Etapas da modelagem comparativa para a construção de modelos 3D e estudos de *docking* molecular; a direita de cada etapa, em azul, se encontram-se os programas que foram utilizados.

Para a identificação dos moldes homólogos (templates) a sequência de aminoácidos foi submetida a três programas para busca:

1 - BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), disponível no site do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), que emprega o algoritmo de busca *Programs Search Protein Databases Using a Protein Query* - BLASTp, uma ferramenta que realiza busca contra as proteínas presentes no *Protein Data Bank* (PDB) (ALTSCHUL, 1990; RSCB, 2005).

2 - MPI TOOLKIT (BIEGERT et al., 2006), programa disponível em <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/>, que emprega ferramentas contidas no HHpred (SÖDING et al., 2005), e utiliza o método estatístico “modelo oculto” de Markov (HMM do inglês Hidden Markov Models) na comparação de pares de sequências. Esse tipo de comparação atribui pontuações desfavoráveis para “falsos positivos”, descartando as sequências que não pertençam à mesma família da proteína em estudo (SÖDING et al., 2005).

3 - MODELLER 9v6 – O programa realiza busca entre as proteínas presentes no arquivo *pdb_95.pir*, que tem em sua biblioteca estruturas elucidadas experimentalmente.

Foram selecionadas estruturas de proteínas com estrutura 3D conhecidas que apresentaram grau de identidade sequencial igual ou superior a 25% como molde (GOLDSMITH-FISCHMAN, HONIG, 2003).

3.2 ALINHAMENTO MÚLTIPLO

Após a busca nos programas Blastp e MPI TOOLKIT, por sequências similares à alvo, o programa Clustal W (THONPSON et al., 1994) foi utilizado para realização do alinhamento múltiplo das sequências de 14 α DM com as demais sequências de enzimas pertencentes à família CYP51, visando a identificação de resíduos similares e conservados.

O alinhamento entre a sequência da proteína alvo e seus respectivos moldes é conhecido como Global. Nessa etapa, as sequências envolvidas são alinhadas de um extremo ao outro, dando origem a apenas um resultado, diferente do que ocorre com o alinhamento local, onde se procura alinhar apenas as regiões mais conservadas, independente da localização relativa de cada região em sua sequência. Além dessa característica, o alinhamento global realizado com mais de uma sequência homóloga (alinhamento múltiplo) é frequentemente utilizado para determinar regiões mais conservadas de sequências homólogas.

Para a escolha dos melhores moldes, foram avaliados os seguintes parâmetros: identidade sequencial, valor de E-value, número de gaps (regiões de inserções ou deleções) e pontuações.

3.3 CONSTRUÇÃO DOS MODELOS

Após escolha dos melhores moldes, foram utilizados os programas MODELLER 9v6, (SALI; BLUNDELL, 1993) e SWISS MODEL (GUEX; PEITSCH, 1997) para a construção dos modelos. É importante ressaltar que a etapa de busca por moldes para construção dos modelos só se aplica a utilização do SWISS MODEL, pois o programa MODELLER realiza quase todos os estágios da modelagem molecular, desde a busca por melhores moldes até a construção dos modelos propriamente ditos.

▪ Construção do modelo com programa MODELLER 9v6

Para a busca de melhores moldes o programa MODELLER 9v6 recebeu como entrada um arquivo da seqüência alvo no formato PIR (**Figura 15**). Este arquivo contém parâmetros necessários à busca por possíveis proteínas homólogas na biblioteca do próprio programa. O arquivo de saída refere-se aos alinhamentos e respectivas pontuações; neste arquivo cada uma das seqüências similares à proteína alvo, está associada a uma lista com estruturas PDBs semelhantes.

```
>P1;lanos
sequence:lanos:::::0.00: 0.00
VIAIVLNVLRQVLI PRNKSEPPVVFHWLP IIGSAVSYGNDPINFFFKCREKYGNVFTFIL
FGRRVTVALGAQGNNFILGGKSTVFSAAEAYTHLTT PVFGKDVVYDVFNEVFMEQKKFVK
VGLSTENLRAVYVGMIEDEVVEFIENDPTFKVYQDNDINWGSFDVLKILAEITILTASRT
LQQGDVRSNLDKKFAQLYNDLDGGFTPINFLFPNLPLENYRKRDDVAQKKMSEFFQSFIEQ
RRQGHSDYDQDMIEALMEQKYRSGLKDHETIAHIMIALLMAGQHTS SATGSWALLHLAD
NPDIAEALYQEQVKHFSNPDGSRMSYEELRELPVLDVIRETLRVHPPPIHSIMRYVRD
DVPVPTLSAPSEDRTYIVPKGHYVLASPAVSQMDPLIWRNPEKWDFARWSDPEGIAAQA
LKTYVDENGEKIDYGFQAVSKGTESPYQPFQAGKHRCIGEQFAYLQLGTLLSTFVRMEL
RIPTGVPAQNYHTMITMPKTPRRIH YRRKAN*
```

Figura 15 – Sequência primária da enzima 14aDM do *Moniliophthora perniciosa* no formato PIR

Uma vez realizado o alinhamento entre a seqüência alvo e a seqüência dos moldes 2W0B, 2VKU, 1E9X, trinta modelos foram construídos seguindo o protocolo baseado no uso de vários moldes. Posteriormente, baseado no valor do escore de energia fornecido pelo programa MODELLER 9v6, um modelo foi escolhido como representante do grupo e identificado como 2LMP.

- Construção do modelo com o programa SWISS MODEL

Com a utilização dos moldes 2W0B, 2VKU, 1E9X, o modelo 3LMP foi construído por meio da técnica de corpos rígidos, implementada no programa SWISS MODEL. A primeira etapa da obtenção do modelo por corpos rígidos constituiu-se na sobreposição dos aminoácidos da sequência alvo sobre os moldes utilizados para construção do arcabouço formado pelas coordenadas dos C α 's das regiões conservadas dos moldes. Em seguida, o modelo da cadeia principal da região central da sequência alvo foi gerado pela superposição da moldura com os segmentos de regiões centrais dos moldes cuja sequência é semelhante à alvo. As alças foram construídas a partir de bancos de dados e de acordo com a região central, e as cadeias laterais com base nas conformações das cadeias laterais presentes nos moldes e com o auxílio de bancos de dados de rotâmeros, derivados de estruturas terciárias com alta resolução depositadas no PDB. As bibliotecas de rotâmeros são conjuntos de ângulos diedros usados especificamente para a otimização das posições dos ângulos diedros das cadeias laterais.

3.4 AVALIAÇÃO DOS MODELOS

Após a construção dos modelos 2LMP e 3LMP, a qualidade estrutural foi avaliada por meio dos programas PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1994), ANOLEA (MELO; FEYTMANS 1998) e VERIFY 3D (LÜTHY et al., 1992).

O programa PROCHECK avalia tanto a exatidão estereoquímica global da estrutura quanto de cada resíduo individualmente, tendo como parâmetros informações derivadas de 118 estruturas de resolução até pelo menos 2.0Å de resolução (LASKOWSKI et al., 1994). As informações estereoquímicas avaliadas com auxílio desse programa são: ângulos torcionais das cadeias laterais, ângulos torcionais da cadeia principal, más interações entre átomos não ligados (impedimentos estéricos), planaridade das ligações peptídicas, energias das ligações de hidrogênio, entre outros. Neste programa é possível gerar o gráfico Ramachandran, que indica a distribuição dos ângulos de torção ψ (Phi) e ϕ (Psi) dos resíduos da estrutura. Uma estrutura de boa qualidade deve possuir 90% ou mais dos seus resíduos nas regiões permitidas ou generosamente permitidas do gráfico.

O Fator-G, calculado com auxílio do programa PROCHECK, fornece uma média dos desvios de uma dada propriedade estereoquímica (ângulos torcionais, distância de ligações covalentes e ângulos da cadeia principal, por exemplo), baseada nas distribuições observadas

destes parâmetros estereoquímicos em sua base de dados. Para um dado resíduo, um valor baixo do Fator-G representa uma baixa probabilidade de ocorrência do parâmetro que se observa. Por exemplo, os resíduos que caem nas regiões não permitidas do diagrama de Ramachandran terão um Fator-G baixo (ou muito negativo), indicando que algo pode estar errado com a geometria total da estrutura avaliada.

O programa calcula o Fator-G global que abrange os vários Fator-Gs para toda a estrutura em um único número. O Fator-G global é tido como uma excelente avaliação da qualidade total estereoquímica de uma estrutura molecular.

Outra opção de validação utilizada para avaliar o modelo gerado foi o programa ANOLEA (Atomic Non-Local Environment Assessment), também disponível pelo Swiss Model. Segundo MELO e FEYTMANS (1998) através desse método calcula-se o somatório da interação dos átomos, dentro de um raio de 7 \AA , para cada um dos aminoácidos obtendo-se o perfil de energia potencial da estrutura de uma proteína, o qual demonstra quanto o ambiente químico ao redor do átomo contribui para a sua estabilidade. Este cálculo gera uma pontuação para cada aminoácido que é analisado graficamente.

O VERIFY-3D mede a compatibilidade entre a sequência de aminoácidos de uma proteína e o modelo da sua estrutura 3D, utilizando a seguinte metodologia: a) reduz a estrutura 3D a uma sequência de ambientes químicos (sendo um ambiente para cada resíduo); b) utiliza a matriz 3D-1D (BOWIE, et al., 1991), que descreve a probabilidade de se encontrar cada um dos 20 aminoácidos em diferentes ambientes químicos, levando em consideração o tipo do aminoácido e a natureza do ambiente químico calculado no passo anterior. A matriz 3D-1D é derivada de estruturas conhecidas de excelente qualidade. O resultado é uma medida de compatibilidade entre a sequência e sua estrutura. Lüthy e colaboradores determinaram empiricamente o índice global esperado para a confiabilidade da compatibilidade sequência/estrutura e sugerem um limite inferior de 0,45. Dessa forma, valores abaixo ou próximo desse limiar indicam que a estrutura pode estar correta, mas possui qualidade questionável.

3.5 OTIMIZAÇÃO DO MODELO

Com o objetivo de realizar a minimização da energia no modelo 3D da lanosterol 14 α -desmetilase, optou-se por separar o grupamento heme do restante da proteína e átomos de hidrogênios foram adicionados com o auxílio do programa SWISS MODEL. Dessa forma, a molécula pode ser refinada pelo programa AMBER 9.0 de acordo com os parâmetros metodológicos de Case et al (2006).

A neutralização da molécula (adição de íons), foi realizada com o programa tLeap e com o campo de força ff03. Após a neutralização, a estrutura resultante foi otimizada através de ciclos de otimização *Steepest Descent* e Gradiente Conjugado, através das palavras-chave: imin=1, realiza uma otimização na estrutura; maxcyc=1000, número máximo de ciclos; ntb=1, interação molecular padrão para átomos de hidrogênio; cut=14, valor de cutoff para a especificação da distância em angstrom (Å) das interações de Van der Walls para átomos não ligados; ntb=0, manter volume constante; igb=1, incluir modelo de solvatação e rgbmax=12 distância máxima entre pares de átomos (PEARLMAN, 1995; CASE, 2006). Após a otimização, as coordenadas atômicas do modelo 3D 3LMP foram reagrupadas e o modelo resultante analisado utilizando os programas já descritos na seção 3.4.

3.6 PARÂMETROS DO ACOPLAMENTO MOLECULAR

A simulação de acoplamento molecular tem por objetivo prever o modo de interação de uma pequena molécula na região de ligação de um alvo molecular, a fim de identificar interações moleculares importantes para atividade biológica. Nesse sentido, 14 (quatorze) derivados azólicos (**Figura 16**) tiveram seu acoplamento simulado no sítio ativo da lanosterol 14 α -desmetilase do *Moniliophthora perniciosa*.

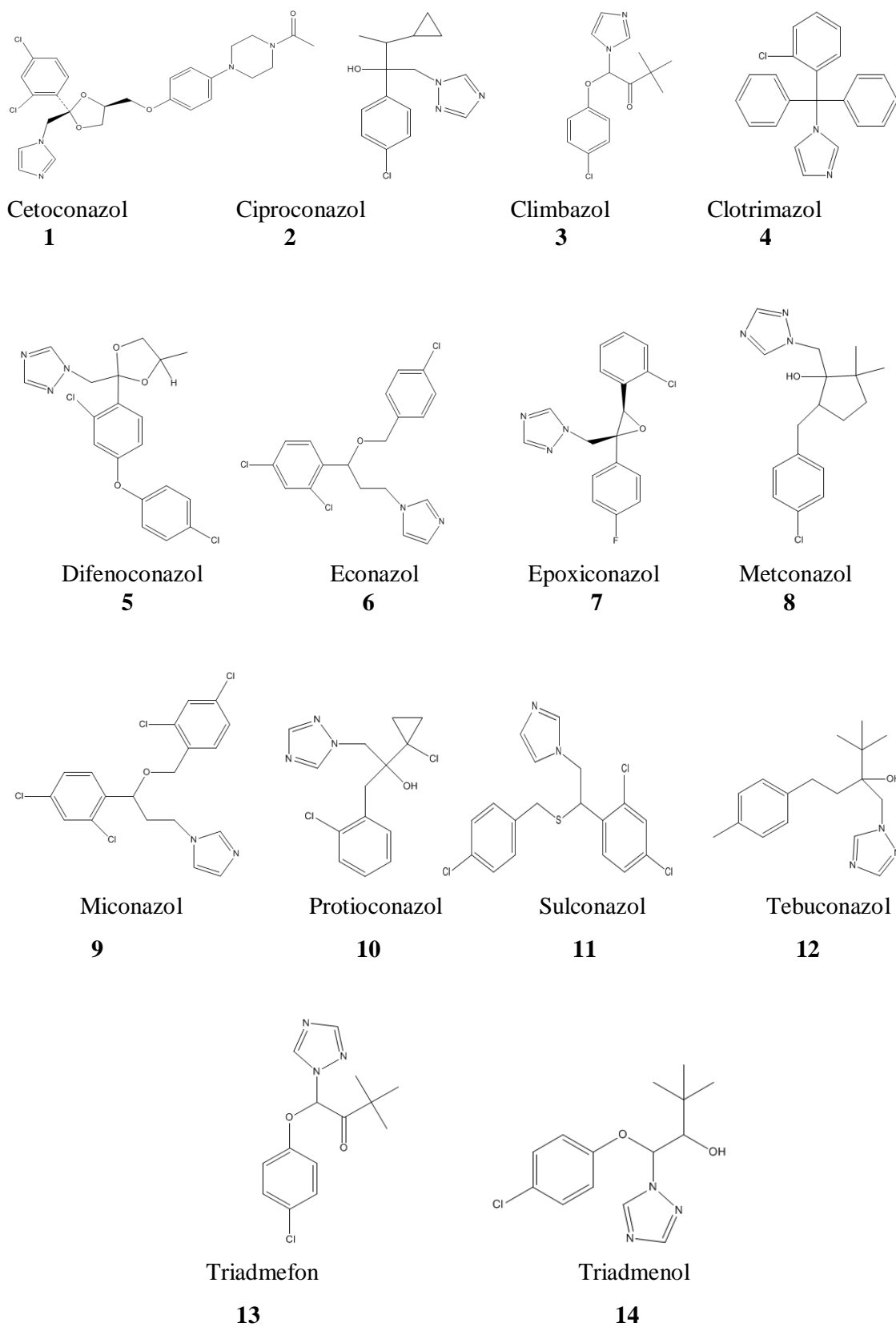


Figura 16 - Representação estrutural dos compostos azólicos ativos identificados por MOTA (2009) através de ensaio in vitro contra *Monilophthora perniciosa*.

As simulações de acoplamento foram realizadas com o programa GOLD 3.11 (Genetic Optimization for Ligand Docking) (JONES et al. 1997), que utiliza um algoritmo genético para fazer a busca conformacional que identificará possíveis soluções para o acoplamento. Durante a busca, o ligante tem liberdade rotacional, enquanto que a macromolécula é considerada como rígida, exceto pela orientação de hidrogênios dos resíduos que podem realizar ligações de hidrogênio (GOLD SUPORTE, 2010).

A orientação de melhor pontuação para cada composto foi selecionada através da função GoldScore, que quantifica a contribuição de ligações de hidrogênio e de interações de van der Waals. Com base nessa função, o programa realizou 30 acoplamentos e classificou as 03 (três) melhores orientações de acordo com um padrão de afinidade (score) para cada um dos ligantes. Foi utilizada a inclusão de uma restrição espacial, segundo a qual o átomo de Fe do grupamento heme deve interagir com o átomo de nitrogênio N3/N4 presente no anel imidazólico/triazólico dos compostos.

As etapas que precederam a simulação de acoplamento são (a) preparo da enzima em estudo, descrita anteriormente; (b) identificação estrutural do sítio ativo; e (c) preparo dos inibidores.

Os resíduos que compõem o sítio ativo foram identificados dentro de um raio de 4,5Å determinado a partir da seleção do inibidor experimental (3-[[[4-metilfenil]sulfonil]amino]propilpiridina-4-ilcarbamato) da estrutura 2W0B, utilizada como um dos moldes para construção do modelo da enzima em estudo.

As estruturas selecionadas como inibidores foram otimizadas com cálculos quânticos no programa Gaussian 03W, utilizando o campo de força AM1.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS MOLDES

Na busca por um controle efetivo da doença vassoura de bruxa, a identificação de novos alvos moleculares e inibidores seletivos são de importância fundamental. Esse objetivo pode ser facilitado a partir de informações estruturais de 14 α DM, o alvo terapêutico de derivados azólicos, uma vez que tais informações podem contribuir para identificação de compostos antifúngicos com características físico-químicas complementares ao sítio ativo de 14 α DM.

A ausência de dados experimentais sobre a estrutura tridimensional de 14 α DM de *M. perniciosa* nos levou a empregar a técnica de modelagem molecular comparativa, utilizando como molde seqüências de proteínas cujas estruturas tridimensionais foram resolvidas experimentalmente e que possuem no mínimo 25% de identidade com a molécula de interesse. A seleção e determinação do(s) molde(s) para modelagem comparativa constituem uma etapa fundamental para a construção de um bom modelo. Ao submeter à seqüência primária da 14 α desmetilase do *Moniliophthora perniciosa* ao servidor BLASTp, MODELLER e ao MPI TOOLKIT, foi possível identificar um número significativo de seqüências homólogas com diferentes graus de identidade.

Os resultados do BLASTp, MODELLER e MPI TOOLKIT, observados nas **tabelas 3, 4 e 5** respectivamente, indicam as estruturas que apresentam maiores valores de identidade com a seqüência alvo. É importante ressaltar que as escalas referentes ao valor do escore diferem entre os programas. No BLASTp e no MODELLER a escala varia entre 0 e 100 e no MPI TOOLKIT, a escala varia entre 0 e 1000.

Tabela 3- Resultado da busca por possíveis moldes no programa BLASTp para a seqüência de aminoácidos da 14 α -desmetilase do *Moniliophthora perniciosa*, que mostra em **A** o código PDB das possíveis proteínas a serem usadas como; em **B** a pontuação de identidade com proteína de estudo; em **C** o número dos resíduos da proteína.

A CÓDIGO PDB	B SCORE	C NÚMERO DE RESÍDUOS
1U13	29.00	448
1X8V	29.00	448
2VKU	29.00	448
2W0B	29.00	448
2W0A	29.00	448
1EA1	29.00	448
1E9X	29.00	448
2VE3	30.00	433
3DAX	29.00	455

Tabela 4- Resultado da busca por possíveis moldes no programa MODELLER 9v6, para a seqüência de aminoácidos da 14 α -desmetilase do *Moniliophthora perniciosa*, que mostra em **A** o código PDB das possíveis proteínas a serem usadas como; em **B** o escore de identidade com proteína de estudo; em **C** o número dos resíduos da proteína.

A CÓDIGO PDB	B ESCORE	C NÚMERO DE RESÍDUOS
1BU7	22.69	442
1JFB	21.21	404
1CPT	22.80	398
1NR6	24.95	430
1N97	23.73	359
1P05	25.52	440
1UE8	22.83	341
1R90	21.18	442
1PQ2	21.05	432
1TQN	24.42	421

Tabela 5- Resultado da busca por possíveis moldes no programa MPI TOOLKIT para a seqüência de aminoácidos da 14 α -desmetilase do *Moniliophthora perniciosa*, que mostra em **A** o código PDB das possíveis proteínas a serem usadas como; em **B** o escore de identidade com proteína de estudo; em **C** o número dos resíduos da proteína.

A CÓDIGO PDB	B ESCORE	C NÚMERO DE RESÍDUOS
3I3K	609.7	454
2CIB	580.7	441
3DAX	590.8	464
3B6H	576.2	471
3EQM	563.3	483
3QW9	558.0	438
2IJ2	551.1	441
2VE3	546.2	439
3CZH	546.4	453

Através da análise das proteínas obtidas foi possível identificar que algumas estruturas possuem seqüências idênticas, sendo elucidadas por métodos experimentais diferentes e/ou diferentes resoluções. Do mesmo modo, foi possível identificar proteínas com domínios estruturais similares aos da proteína em estudo. A existência das semelhanças entre as seqüências de aminoácidos sugere que é possível construir um modelo por homologia da lanosterol 14 α -desmetilase de *M. perniciosa*. Por essa razão, as estruturas molde fornecidas pelo servidor BLASTp e MPI TOOLKIT foram analisadas quanto ao grau de identidade,

número de *gaps*, valores de *E-value* e *score*, quantidade de resíduos e resolução em que a proteína foi determinada. (**Tabela 6**). As estruturas fornecidas pelo MODELLER 9v6 possuem grau de identidade inferior a 25% e por esse motivo não foram selecionadas.

Tabela 6 – Moldes selecionados com auxílio do programa MPI TOOLKIT e com o servidor BLASTp.

Estrutura PDB	Identidade	Gaps	Score	E-value	Resíduos	Resolução
2W0B* (Chen et al. 2009)	29%	11%	219	2e-57	455	1.60
2VKU* (Podust et al. 2004)	29%	11%	217	8e-57	448	1.95
1E9X* (Podust et al. 2001)	29%	11%	217	9e-57	455	2.10
2VE3◀ (kuhnl et al. 2007)	30%	14%	105	4e-23	444	2.10
3DAX◀ (Strushkevich et al. 2008)	29%	11%	103	2e-22	491	2.10

* Estruturas identificadas através do servidor BLASTp

◀ Estruturas identificadas através do programa MPI TOOLKIT

Porém, ao analisar a estrutura referente a cada alinhamento, foi constatado que muitas das seqüências homólogas não pertencem à família CYP51, o que implica geralmente em diferenças estruturais e conseqüentemente funcionais de uma proteína, visto que a função de uma proteína está intimamente ligada a sua estrutura. Por exemplo, foi constatado que tanto a *Synechocystis sp* (pdb 2VE3) quanto a *Homo sapiens* (pdb 3DAX), identificadas como homólogas, são oxirredutases pertencentes à P450, entretanto essas proteínas não pertencem à família CPY51, e sim às famílias CYP120A1 e CYP7A1 respectivamente, sendo por isso descartadas. Como resultado, apenas as proteínas destacadas na **tabela 6**, (2W0B, 2VKU e 1E9X) foram selecionadas para construção do modelo da 14 α DM do *Moniliophthora perniciososa*.

4.2 ALINHAMENTO MÚLTIPLO ENTRE ESTRUTURAS HOMÓLOGAS

Uma vez identificadas como homólogas, é possível comparar as seqüências de duas ou mais proteínas em busca de regiões conservadas em suas estruturas.

Os resultados dos alinhamentos múltiplos, entre a seqüência em estudo e as seqüências primárias das estruturas cristalográficas 2W0B, 2VKU e 1E9X, realizados com os programas ClustalW (**Figura 17**), demonstram que as três seqüência são idênticas. Entretanto, como

foram obtidas em condições experimentais diferentes e apresentam inibidores diferentes, suas estruturas puderam contribuir para uma melhor construção do modelo 3D da 14αDM *Moniliophthora perniciosa*.

A partir do alinhamento múltiplo foi possível constatar que a hélice de inserção na membrana, localizada na porção N-terminal da seqüência não está presente nos moldes sendo, por essa razão, desconsiderada durante a construção dos modelos.

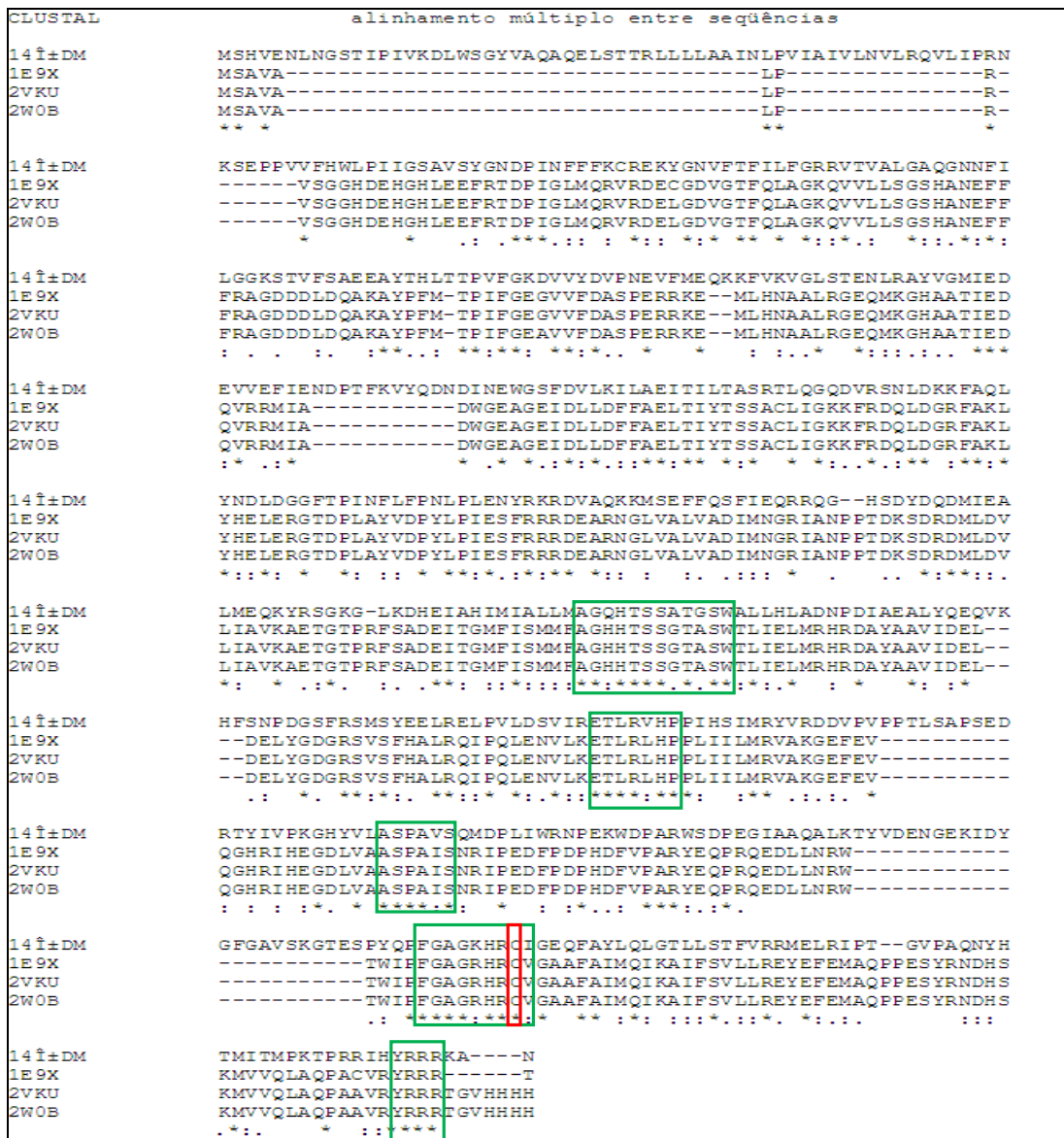


Figura 17. Alinhamento múltiplo realizado no programa Clustal W com a seqüência de aminoácidos da 14αDM do *Moniliophthora perniciosa* e as seqüências de aminoácido das estruturas com código pdb 2WOB , 2VKU e 1E9X . Destaque em verde para as regiões sítio ativo e em vermelho para a cisteína que se liga ao grupo heme.

4.3 CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO INICIAL DOS MODELOS

Após a identificação das seqüências homólogas à lanosterol 14 α -desmetilase do *Moniliophthora perniciosa* e suas respectivas estruturas 3D, foram criados modelos utilizando duas metodologias distintas.

Através da metodologia de corpos rígidos, implementada no programa SWISS MODEL, foi criada a estrutura 3LMP, determinada por substituição molecular, utilizando as coordenadas atômicas dos moldes. A construção do modelo 2LMP foi realizada com o programa MODELLER 9v6 que faz uso da metodologia de restrições espaciais. A qualidade de um modelo criado por modelagem comparativa depende de um grande número de fatores como exatidão estereoquímica. Tal qualidade pode ser avaliada através da validação, etapa crucial no processo de modelagem molecular comparativa e que pode ser realizada em diferentes momentos a fim de se selecionar o melhor modelo.

A validação realizada no PROCHECK 3.0 gerou os gráficos de Ramachandran mostrados na **figura 18**. Considera-se um modelo satisfatório quando este possui pelo menos 90% dos resíduos dentro das regiões energeticamente favoráveis (LASKOWSKI et al., 1994).

Um estudo comparativo dos modelos 2LMP e 3LMP mostra que esses modelos apresentam algumas diferenças na qualidade estereoquímica. O modelo 2LMP apresentou 96,5% de aminoácidos em regiões energeticamente favoráveis, sendo que 86,6% dos resíduos encontram-se distribuídos em regiões favoráveis, 9,9% em regiões permitidas e 2,2% em regiões aceitáveis e 1,3% em regiões desfavoráveis (**Figura 18a**). O modelo 3LMP apresentou 97,6% de aminoácidos em regiões energeticamente favoráveis, sendo que 87,7% dos resíduos encontram-se distribuídos em regiões favoráveis, 9,9% em regiões permitidas e 2,1% em regiões aceitáveis e 0,3% em regiões desfavoráveis (**Figura 18b**). Nas regiões permitidas e aceitáveis, não houve diferença expressiva, entretanto a diferença de 1,0% devido à localização de resíduos em regiões desfavoráveis foi relativa aos aminoácidos Trp 27, Lys 150, Val 107, Gln 235, Asp 305 e Ser 369.

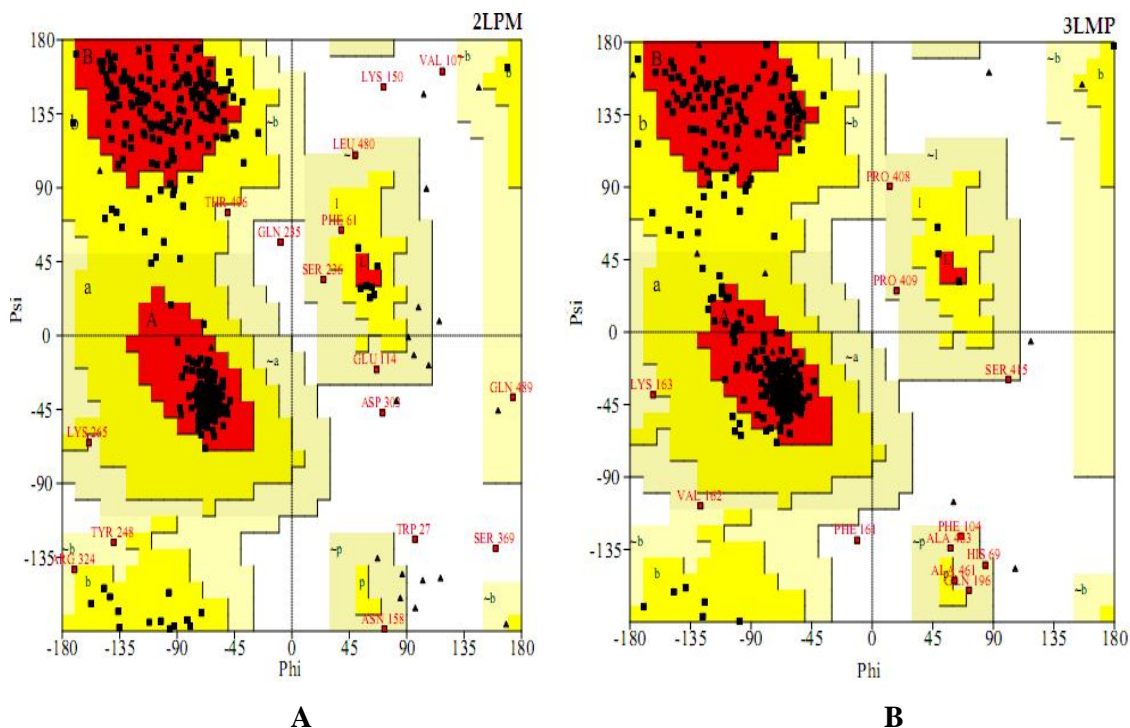


Figura 18: Validação representada pelo gráfico de Ramachandran (Procheck 3.0) dos resíduos que compõem a enzima 14aDM do *Moniliophthora perniciosa*. Em **A** – modelo 2LMP construído com o programa MODELLER. Em **B** – modelo 3LMP construído com o programa SWISS MODEL.

As cadeias laterais dos aminoácidos alifáticos apresentam propriedades hidrofóbicas; essa característica influencia na localização desses resíduos, devendo os mesmos permanecerem no interior da proteína, enquanto os resíduos polares ou carregados situam-se na superfície. A hidrofobicidade é um fator muito importante, relacionado à estabilidade de uma proteína; sendo atribuído um papel relevante ao efeito hidrofóbico no enovelamento de uma proteína. Considerando a posição dos aminoácidos Trp 27, Val 107, Lys 150, Gln 235, Asp 305 e Ser 369 estarem em local desfavorável, segundo o gráfico de Ramachandran, o modelo 2LMP (**Figura 18**), foi desconsiderado, e optou-se em dar seguimento à modelagem molecular do sistema em estudo com o modelo 3LMP.

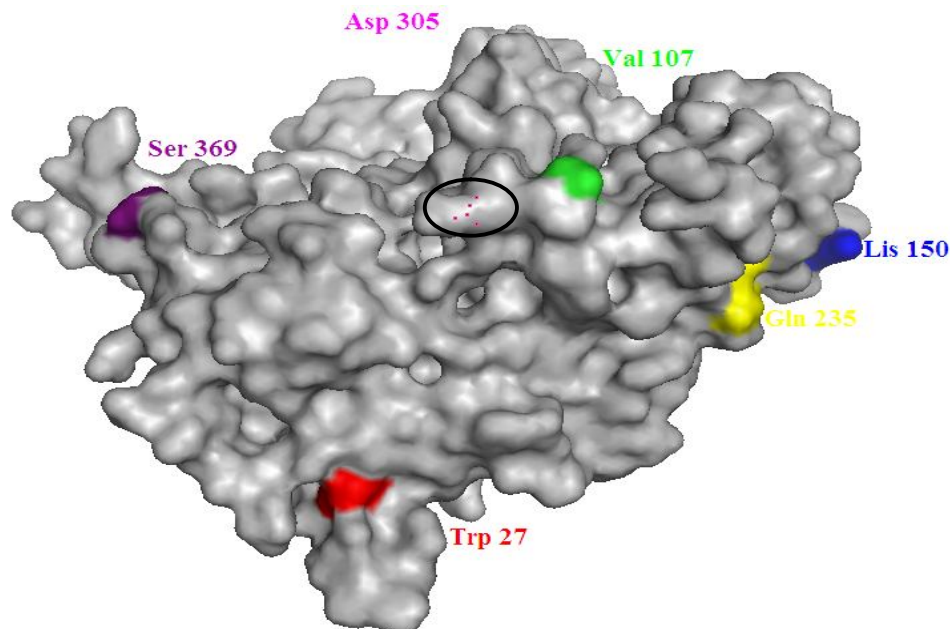


Figura 19 – Modelo 2LMP construído com a metodologia de restrições espaciais implementada no programa MODELLER 9v6. A estrutura mostra os aminoácidos Trp 27, Val 107, Lis 150, Gln 235, Ser 369, na superfície da estrutura. O aminoácido Asp 305 está implícito na figura, representado pelos pontos rosa (destaque em preto) por estar localizado na superfície do lado oposto da estrutura.

Outra opção de validação utilizada para avaliar a qualidade do modelo 3LMP, é o ANOLEA (Atomic Non-Local Environment Assessment), também disponível pelo Swiss Model. Segundo Melo e Feytmans (1998), através desse método calcula-se o somatório da interação dos átomos, dentro de um raio de 7 \AA , para cada um dos aminoácidos, obtendo-se, assim, o perfil de energia potencial da estrutura de uma proteína. Nesse sentido o programa ANOLEA é uma ferramenta aplicada para avaliar a estrutura de acordo com a energia de interação das cadeias laterais dos átomos. Como resultado, é gerado um perfil gráfico de energia, onde os resíduos com valores positivos correspondem à choques entre os átomos e à prováveis erros na modelagem. O modelo apresentou um valor total de energia de 1320 E/kT. A energia do gráfico do ANOLEA é dada pela razão entre a energia (E) e a constante e Boltzmann ($k = 0,582 \text{ kcal/mol}$) pela temperatura (MELO, FEYTMANS, 1998). A função aplicada no cálculo da energia derivada é resultante do trabalho desenvolvido por Sippl (1995).

A análise de energia calculada no programa ANOLEA para o modelo 3LMP (**Figura 20**) indica que 65.8% dos resíduos apresentam energia positiva (representados em vermelho), ou seja, que as cadeias laterais de 304 resíduos estão se chocando. A estratégia para melhorar a qualidade do modelo 3LMP tornando-o energeticamente aceitável/viável consistiu em submeter o modelo gerado ao processo de otimização molecular.

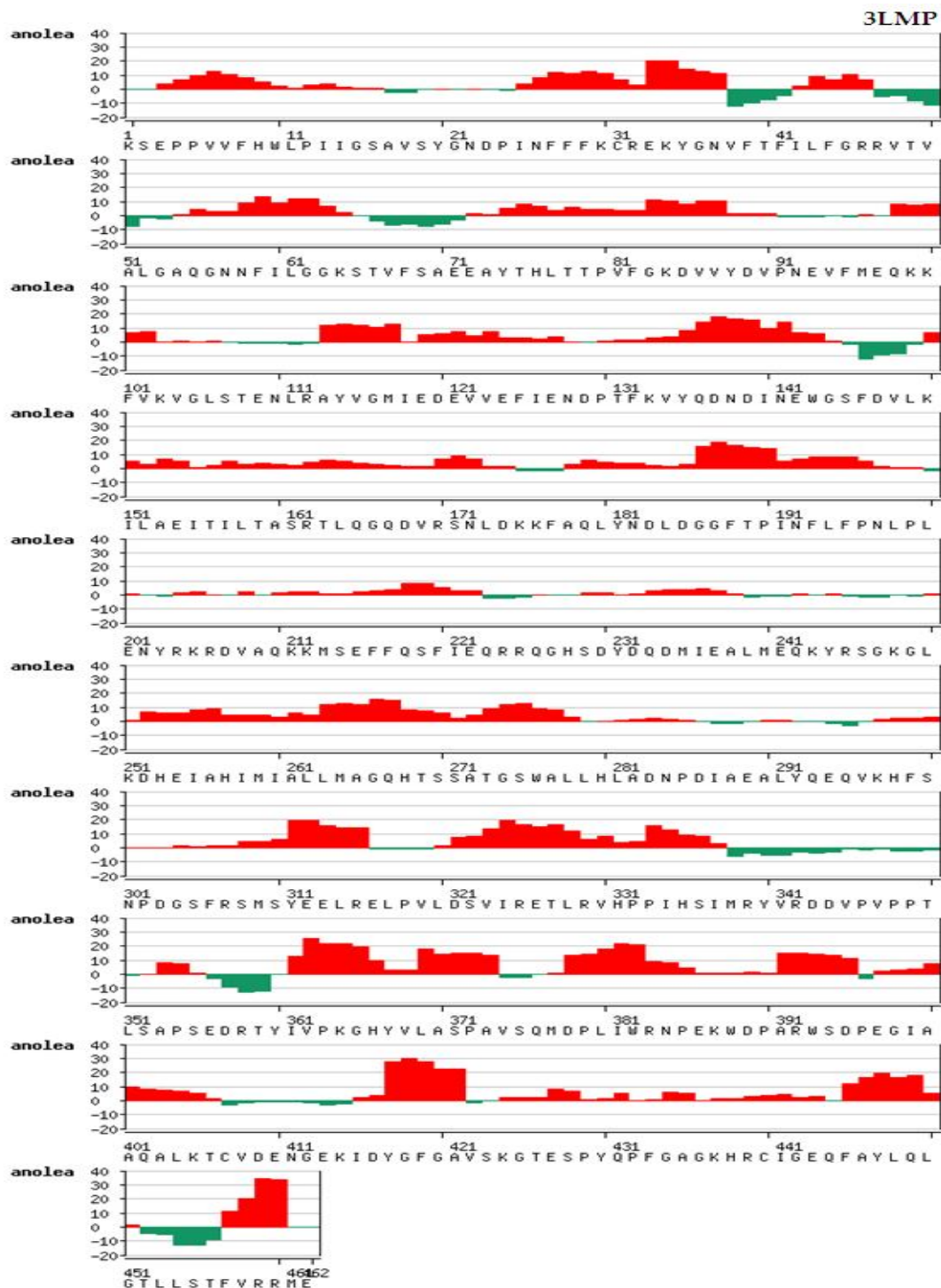


Figura 20: Gráfico do ANOLEA (energia potencial de cada resíduo na cadeia de proteína). As projeções em vermelho referem-se a 65,8% dos resíduos que se encontram com valor positivo (desfavorável) de energia potencial e as projeções em verde identificam os valores de energia que são satisfatórios, ou seja, os valores negativos para 34,2% dos resíduos. O modelo apresentou um valor total de energia de 1320 E/kT (Fonte: Swiss Model).

4.4 OTIMIZAÇÃO DO MODELO 3LMP

A primeira etapa do processo de otimização consiste no cálculo dos arquivos de topologia e de coordenadas do sistema, o que foi realizado primeiramente com o programa tLeap, utilizando o campo de força ff03. O arquivo de coordenadas fornece a descrição de como os átomos do sistema estão organizados no espaço enquanto o arquivo de topologia compreende informações sobre a conectividade dos átomos. Normalmente, o arquivo topológico é gerado a partir das coordenadas. Entretanto não se logrou sucesso nessa etapa, uma vez que o programa AMBER 9.0 não está parametrizado para o grupamento heme existente nas CPY51_s, ou mais precisamente, para o Fe(III) (estado férrico) presente no grupamento heme.

Na tentativa de se introduzir parâmetros aceitáveis para o átomo de Fe(III), foram utilizados inúmeros recursos. Inicialmente, foram utilizados parâmetros para criação dos arquivos topológicos e de coordenadas disponíveis no *AMBER parameter database* (<http://www.pharmacy.manchester.ac.uk/bryce/amber#cof>) específicos para o grupamento heme. (“frcmod” e “prep” vide anexos A e B). No entanto, novamente não se obteve sucesso, pois a parametrização para os átomos de nitrogênios existentes no grupamento heme, não pode ser determinada.

Na busca por informações que levassem a parametrização de campos de força para o grupamento heme no estado férrico, foi utilizado o CCL.net (*Computational Chemistry List*) (<http://www.ccl.net/chemistry/index.shtml>), um fórum eletrônico independente criado no início da década de 90 com o objetivo de disponibilizar informações sobre todos os aspectos da química computacional. Porém, todas as postagens relacionadas com o sistema em estudo, durante nosso trabalho, remetem a falta de parametrização do Fe(III) para os cálculos de mecânica molecular.

Dados da literatura (ODA, 2004), sugerem que métodos computacionais da química quântica, como o semi empírico AM1 definido para o ferro e outras bases diferentes para os átomos constituintes do grupo prostético podem ser utilizados para o cálculo dos parâmetros necessários na mecânica molecular. Dessa forma, a partir dos resultados de ODA e colaboradores foi possível definir as cargas atômicas para o Fe(III) e, conseqüentemente, estabelecer os parâmetros necessários para otimizar a estrutura do grupo heme por mecânica molecular.

Com o objetivo de realizar os cálculos, valores de energia para cada átomo do sistema ferro-porfirina, foram transferidos para estrutura em estudo. Porém, ainda assim não foi

possível realizar a otimização para o sistema proposto, pois os parâmetros para os átomos de nitrogênios contido no grupamento heme não foram criados.

Diante dos problemas encontrados decidiu-se por realizar a otimização de cada seguimento separadamente: a) estrutura molecular 3LMP sem o grupamento heme, mas com o inibidor experimental inserido no sítio ativo; b) grupamento heme. Após a otimização, o complexo contendo a estrutura molecular composta com os aminoácidos e o inibidor, foi reagrupada ao grupamento heme e identificado como **3LMP A**.

4.5 DESCRIÇÃO E VALIDAÇÃO DA ESTRUTURA 3LMP A

A análise visual do modelo 3LMP A, realizada no VMD (Visual Molecular Dynamics - Versão 1.8.6) (HUMPHREY, 1996) mostra que a estrutura apresenta 22 α -hélices, 16 folhas- β e 16 alças.



Figura 21 – Representação estrutural da enzima 14aDM do fungo *Moniliophthora perniciosa* construído com o programa Swiss Model

A molécula construída possui características estruturais similares à de outras CYP51s. A sobreposição do modelo 3LMP A à duas estruturas homólogas usadas como moldes (2W0B e 1E9X), utilizando os $C\alpha$ como referência é mostrada na **figura 22a** e apresenta desvio quadrático médio (RMSD) de 2.22Å e 2.41Å, respectivamente. As estruturas das alças podem ser visualizadas na **figura 22b**, onde fica evidente que algumas dessas regiões são as mais variáveis.

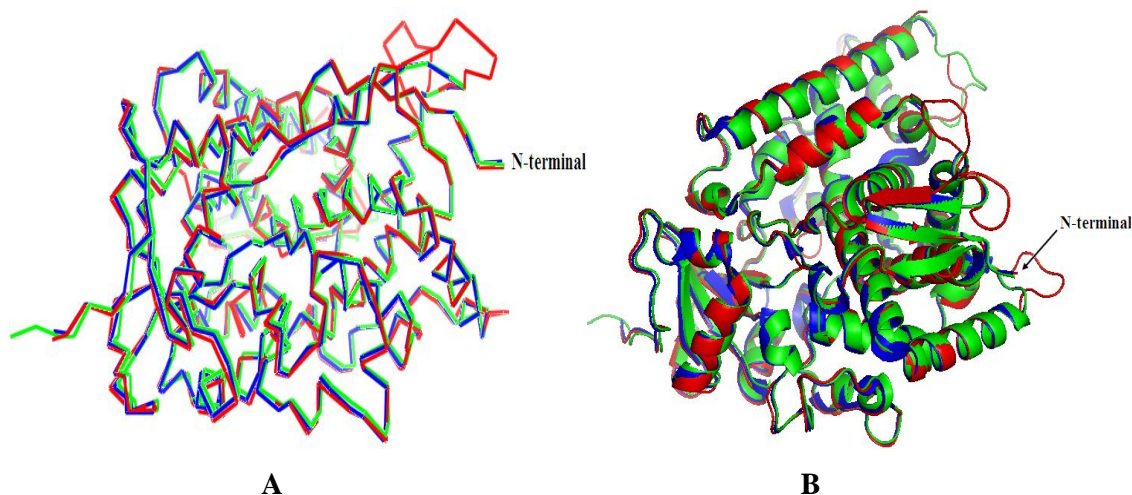


Figura 22 – Sobreposição do modelo 3LMP A às duas estruturas homólogas usadas como moldes (2W0B e 1E9X), utilizando os C α como referência. Em **A** e **B** mostra o alinhamento estrutural com C α entre 3LMP A (vermelho), 2W0B (verde) e 1E9X (azul), em **B** mostra as alças como regiões mais variáveis.

Os aminoácidos que fazem parte do sítio ativo da enzima foram identificados a partir de 4.5Å do inibidor. Uma vez definida a composição do sítio (**Figura 23a**), foi possível identificar a orientação espacial dos resíduos que compõem esta região no modelo 3LMP A, e que correspondem à His76, Leu77, Met96, Gln98, Lys99, Lys100, Phe101, Ala 261, Met264 Ala 265, His268, Thr 269, Ile 334, Cys 407, Tyr 447, Hem470. (**Figura 23b**).

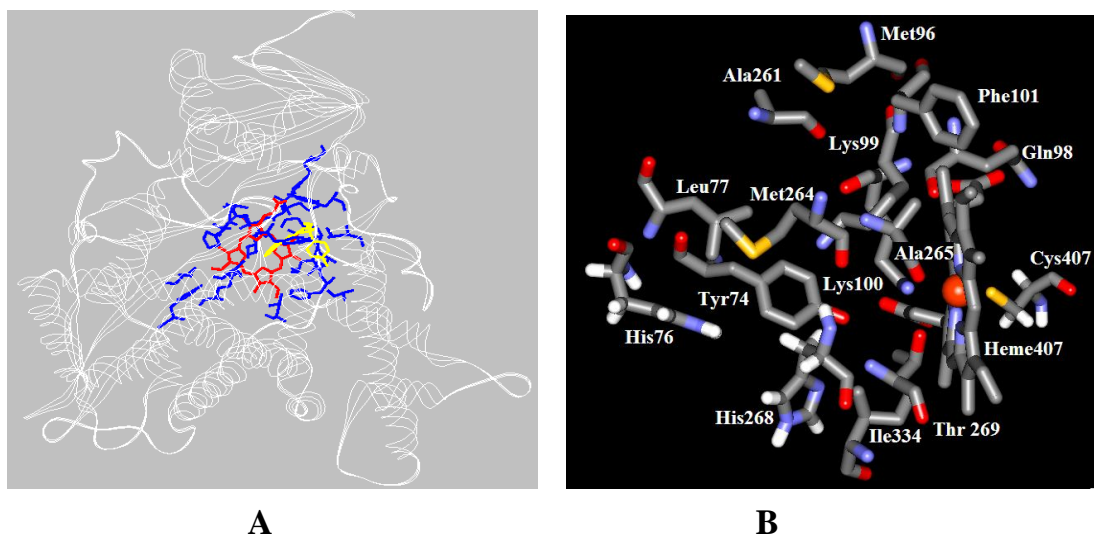


Figura 23 - Aminoácidos que fazem parte do sítio ativo do modelo 3D da lanosterol 14 α desmetilase *Moniliophthora perniciosa*. Em **A** estrutura do modelo (destaque em amarelo para o inibidor experimental e em vermelho para o grupamento heme, em azul para região do sítio catalítico da enzima). Em **B** representação estrutural da região do sítio catalítico da enzima lanosterol 14 α desmetilase do *Moniliophthora perniciosa*.

Ao analisar a estrutura do modelo 3LMP A e compará-la aos modelos de lanosterol 14 α - desmetilase, elucidados experimentalmente, foi observado que a posição do resíduo

CYS407 (**Figura 24a**) que se liga ao átomo de ferro do grupamento heme estava incorreta. Tanto o grupo prostético, quanto a cisteína fazem parte dos poucos resíduos conservados no sítio ativo das CYP_s51. A posição dos resíduos equivalentes na estrutura pdb 2W0B, utilizada como molde, é mostrado na **figura 24b**. O procedimento realizado para melhorar a posição do resíduo no modelo 3LMP, consistiu em ajustar as coordenadas dos átomos da CYS407 manualmente, utilizando como referência os valores mostrados na **tabela 7**.

Tabela 7 – Coordenadas atômicas da CYS407, presente no sítio ativo da lanosterol 14 α -desmetilase do *Moniliophthora perniciosa*.

átomos	X	y	Z
S	11,588	8,833	62,114
Cb	17,463	10,349	63,106
Ca	18,811	10,726	63,719
C	19,782	10,986	62,566
O	19,567	-11,887	61,752

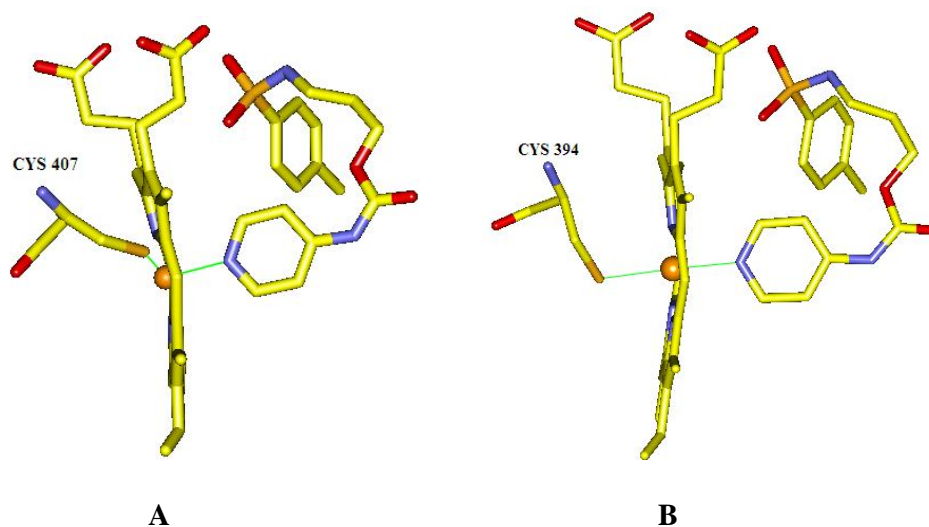


Figura 24 - Em **A** é possível observar o inibidor experimental (3-[[4-metilfenil]sulfonil]amino}propilpiridina-4-ilcarbamate), o grupo prostético e o resíduo CYS407 ambos presentes no sítio ativo do modelo 3LMP da lanosterol 14 α -desmetilase do *Moniliophthora perniciosa*. Em **B** é possível observar o inibidor experimental (3-[[4-metilfenil]sulfonil]amino}propilpiridina-4-ilcarbamate) e o resíduo CYS394 e grupo prostético presentes no sítio ativo da estrutura pdb 2W0B elucidada experimentalmente.

Foi observado que após a otimização, a geometria do heme não sofreu alterações significativas quando comparada com a geometria da estrutura obtida à partir de dados cristalográficos (distâncias de referência entre parênteses) (**Figura 25**).

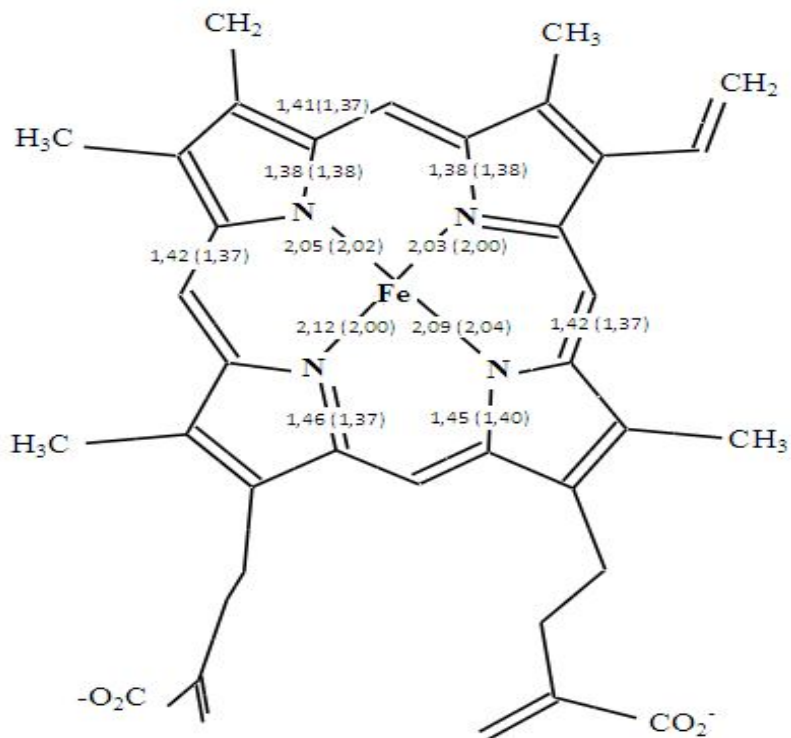


Figura 25 - Comparação entre as distâncias, em Å, de algumas ligações do heme da lanosterol 14 α -desmetilase do *Moniliophthora pernicioso*, após otimização e as distâncias de referência (entre parênteses) obtidas à partir de dados cristalográficos.

Após a otimização, o modelo 3LMP A foi novamente submetido à validações. Considerando os valores mostrados no gráfico do ANOLEA (**Figura 26**), onde 64.8 % dos resíduos, entre eles: Met 96, Ala 265, Ile 334 e Tyr 447 presentes no sítio ativo da enzima, encontravam-se com energia positiva, os resultados após a otimização foram satisfatórios, por apresentar valor total de energia (-1641/kT), onde somente 14% dos resíduos mantiveram valores positivos de energia, dentre os quais permanecem os resíduos Lys99 e His268, presentes no sítio ativo.

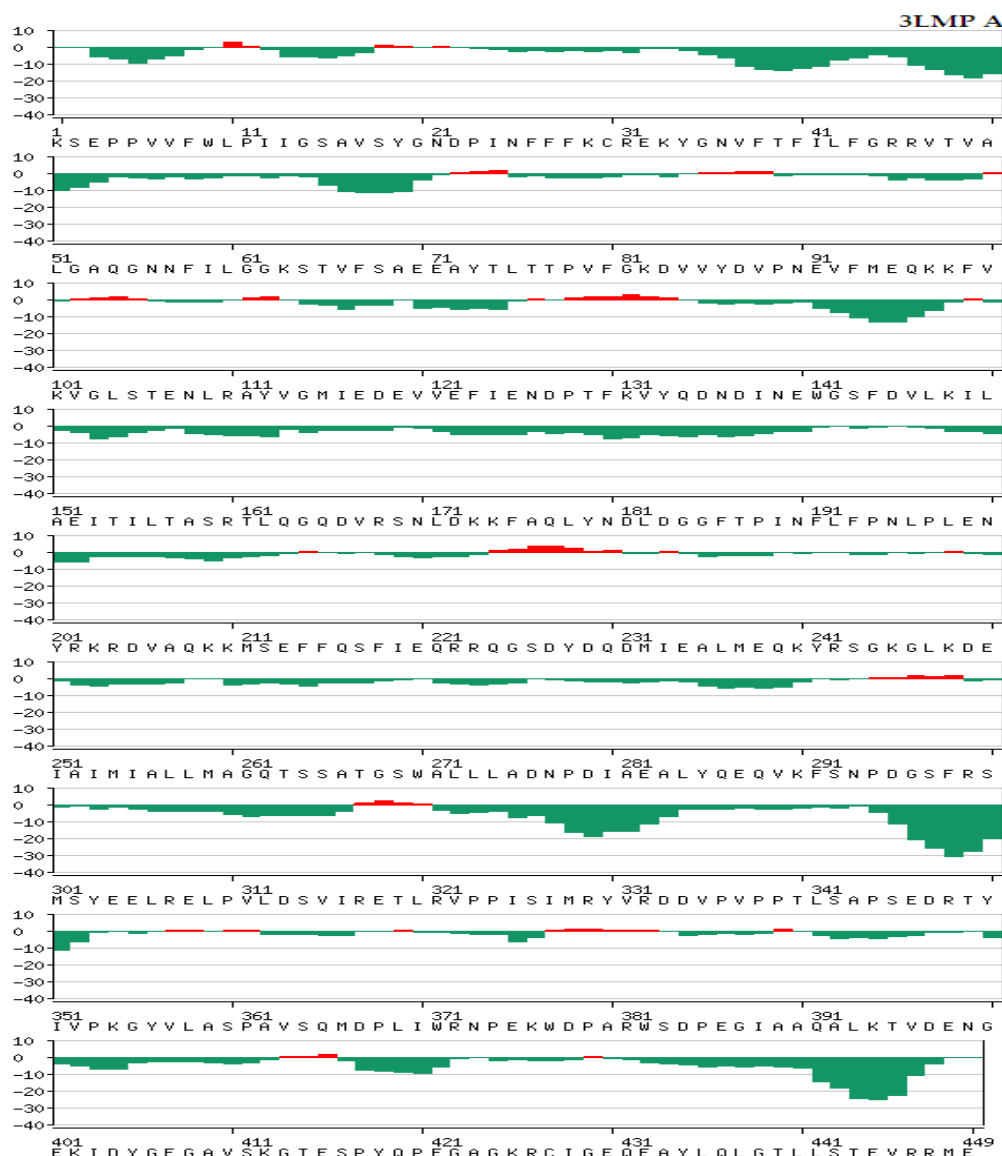


Figura 26 - Gráfico do ANOLEA (energia potencial de cada átomo na cadeia de proteína). Após a otimização do modelo com valor total de energia (-1641/kT). As projeções em vermelho referem-se a 14% dos resíduos que se encontram com valor positivo (desfavorável) de energia potencial e as projeções em verde identificam os valores de energia que são satisfatórios para 86% dos resíduos.

A qualidade estereoquímica do modelo 3LMP A, foi avaliada pelo programa Procheck (Versão 3.0). Por meio do Gráfico de Ramachandran (**Figura 27**) foi verificado que 98,1% dos aminoácidos encontram-se em regiões energeticamente favoráveis (regiões favoráveis e permitidas), sendo que na região aceitável encontram-se 1,4% dos aminoácidos e apenas 0,5% estão na região desfavorável e correspondem aos resíduos Gln136, Pro348, Pro349, Ala403. Esses resíduos não estão presentes no sítio ativo do modelo e estão localizados nas alças, que são regiões flexíveis em proteínas.

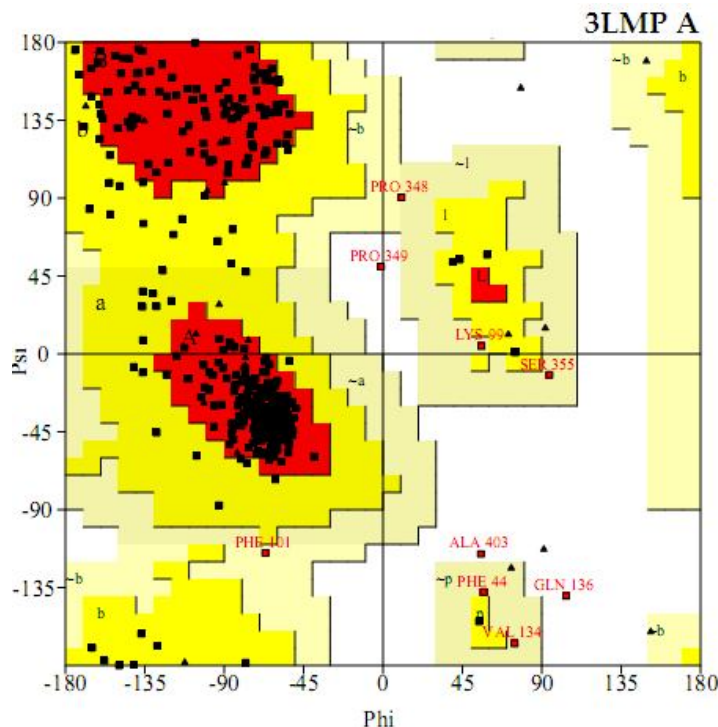


Figura 27 - Análise da qualidade esteoquímica do modelo 3LMP A, segundo o Gráfico de Ramachandran (Procheck 3.0).

As **figuras 28 e 29** mostram a planaridade das ligações peptídicas, interações desfavoráveis entre os átomos não-ligados e energia de ligação de hidrogênios na cadeia principal. A ligação peptídica apresenta uma característica que inibe a rotação em torno de si mesma e dos quatro átomos (O, C, N e H) que definem um plano, o plano peptídico. Assim, o esqueleto covalente de uma proteína, representado pela seqüência linear dos átomos apresenta restrições de mobilidade que são importantes determinantes do enovelamento da molécula. As interações desfavoráveis entre os átomos não ligados estão relacionadas aos impedimentos provocados pela interação repulsiva, quando um átomo está muito próximo de outro. As ligações de hidrogênio contribuem para maior efeito de estabilização da proteína.

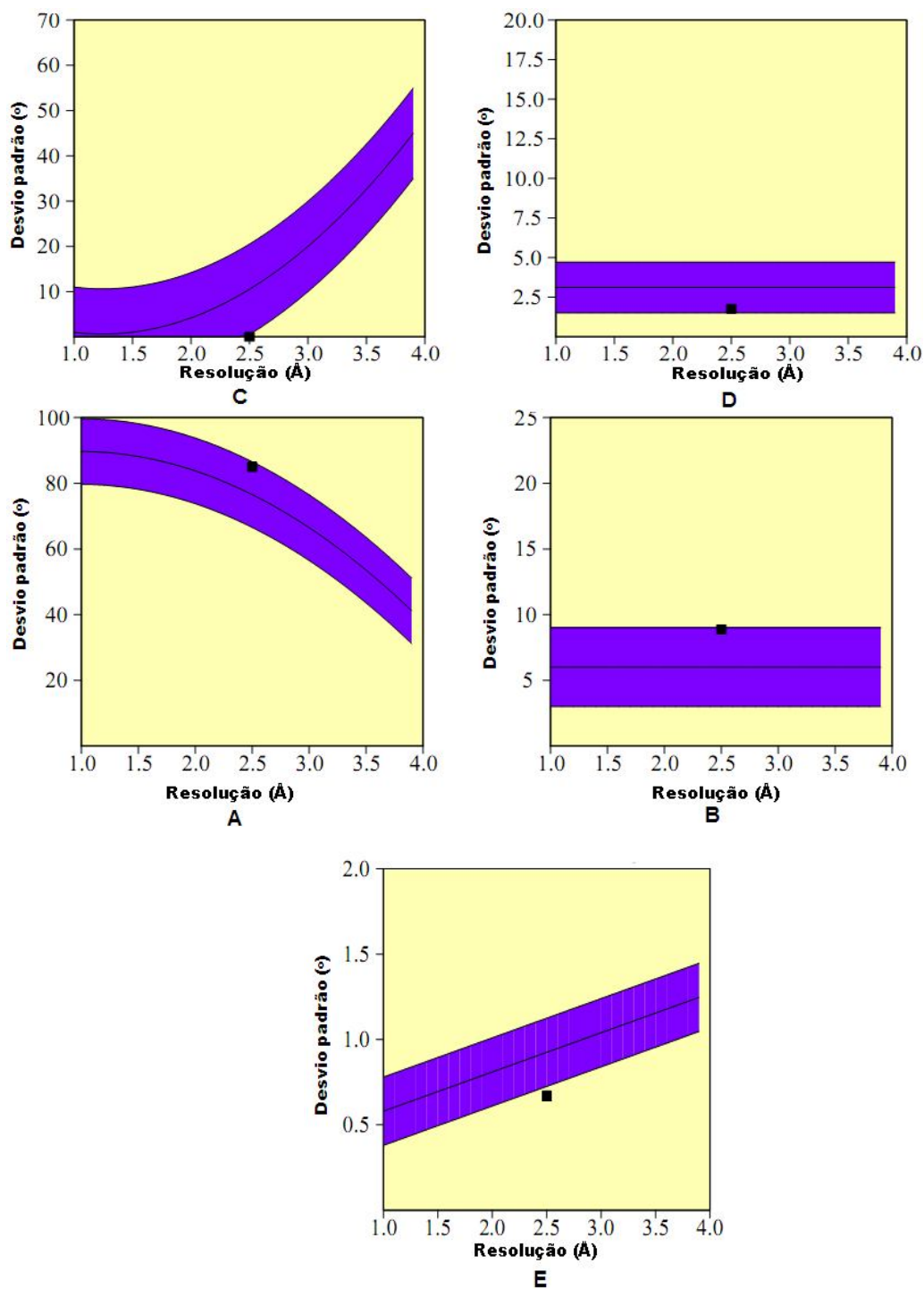


Figura 28 - Análise da cadeia principal do modelo 3LMP: A - avaliação do gráfico de Ramachandran; B - planaridade da ligação peptídica; C - interações ruins entre os átomos não-ligados; D - distorção dos ângulos tetraedricos dos carbonos alfa; E - energia das ligações de hidrogênio.(Fonte: Procheck 3.0).

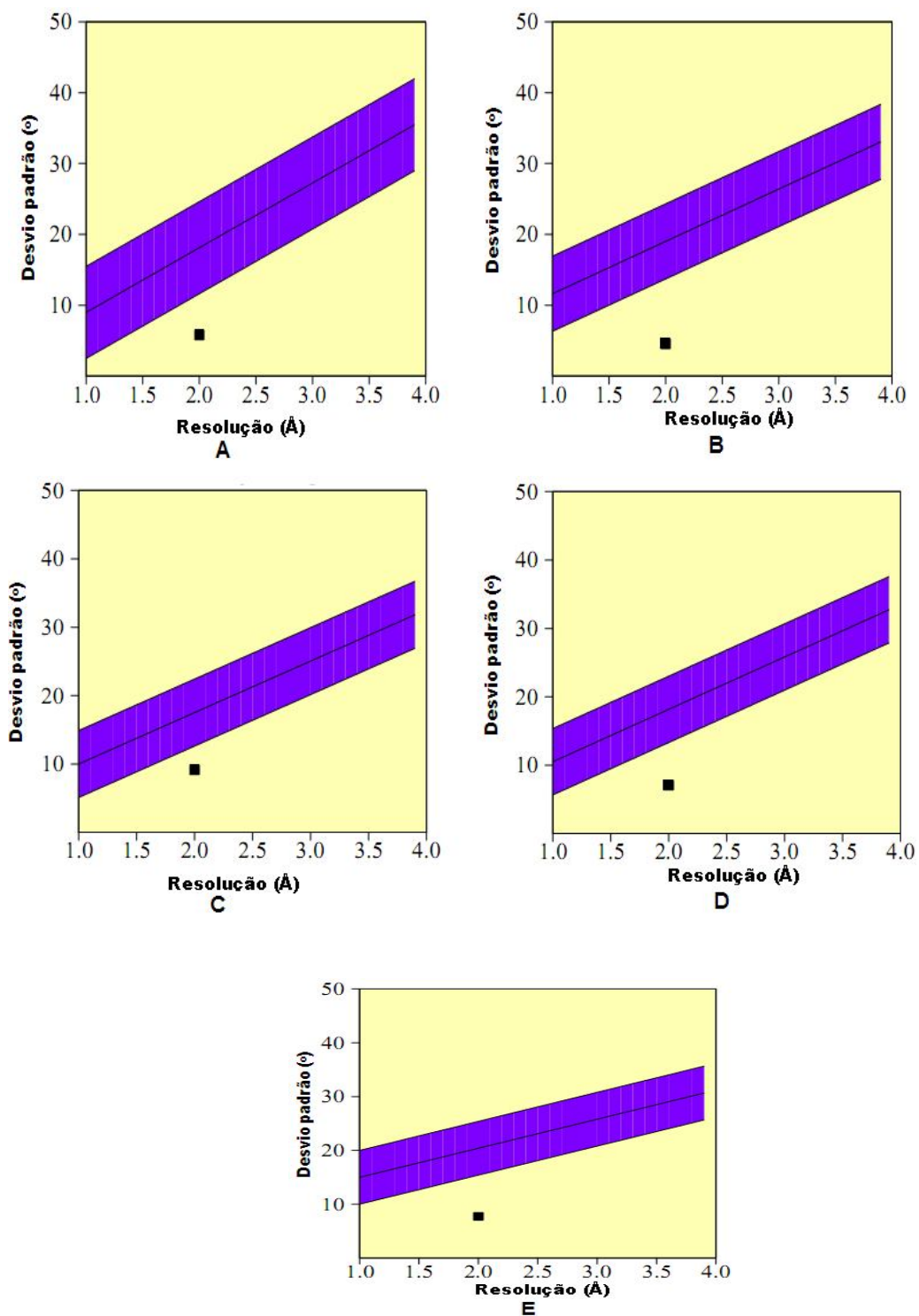


Figura 29 - Análise da cadeia lateral do modelo 3LMP A - Conformação gauche menos; B - Conformação trans; C - Conformação gauche mais; D - Somatório de todos os desvios padrões para Chi1; E - Conformação trans para o ângulo torcional Chi2. O eixo das coordenadas está descrito em Å (Fonte: Procheck 3.0).

No gráfico VERIFY 3D apresentado na **figura 30** é possível observar regiões que se encontram abaixo 0, indicando problemas de incompatibilidade entre a seqüência e a estrutura para 3,1% dos resíduos. Porém, após identificar os resíduos que se encontram nessa região (Val87, Tyr88, Asn92, Val94, Phe95, Met96, Gln295, Val296, Lys297, His298, Pro349, Ala353, Glu356), foi observado que eles não estão presentes no sítio ativo do modelo.

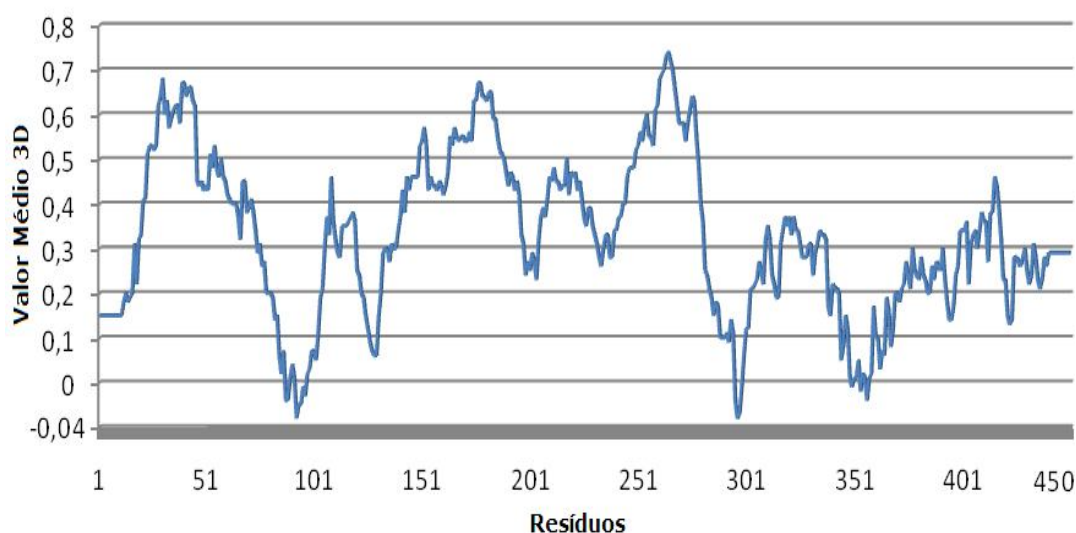


Figura 30 – Análise do ambiente químico de cada resíduo do modelo 3LMP A, segundo o programa Verify 3D.

É necessário salientar que na avaliação realizada com auxílio do programa PROCHECK, o modelo submetido à otimização não possui melhor qualidade na cadeia principal, em relação ao modelo 3LMP. Porém, como o modelo 3LMP A apresentou queda de energia, melhora nas análises da cadeia lateral, apresentou melhor desempenho na avaliação do gráfico do Ramachandram e perfil VERIFY 3D com somente 3,1% dos resíduos incompatíveis com o modelo, o mesmo foi utilizado para o estudo subsequente de acoplamento molecular com inibidores azólicos.

4.6 ACOPLAMENTO MOLECULAR COM DERIVADOS AZÓLICOS

O acoplamento molecular desempenha um papel importante na descoberta de moléculas biologicamente ativas, pois os resultados provenientes do acoplamento permitem analisar diferentes modos de ligação de um mesmo ligante ou de ligantes distintos, além de identificar aqueles com maior probabilidade de interação com a molécula receptora (COUTINHO, MORGAN, 2007).

As análises de acoplamento molecular realizadas nesse estudo têm por objetivo compreender o modo de interação de 14 inibidores azólicos no centro ativo do modelo da enzima lanosterol 14 α -desmetilase do fungo *Moniliophthora perniciosa* construída por modelagem comparativa. Os inibidores foram avaliados em teste de difusão em disco frente ao fungo, por Mota (2009), permitindo a identificação entre de 14 derivados de azol que são ativos na concentração de 0,6 μ M/disco contra *M. perniciosa*.

A fim de restringir o espaço de busca e considerando que os derivados azólicos devem interagir com o átomo de Fe do grupo Heme, foi realizada a inserção de uma restrição espacial, segundo a qual o átomo de Fe do grupamento heme presente no sítio ativo da enzima deve interagir com o átomo de nitrogênio N3/N4 presente no anel imidazólico/triazólico dos compostos. A fim de determinar a distância mínima e máxima para interação, foi realizada uma análise de estruturas de lanosterol 14 α -desmetilase que estão complexadas com inibidores e depositadas no PDB (**Tabela 8**).

Tabela 8 – Distância entre o átomo de Fe do grupamento heme das 14 α DM e o átomo de nitrogênio dos inibidores, das enzimas 2W0B, 2W0A, 2W09, 1EA1, 1E9X, 2CIB e 2CIO, elucidadas por métodos experimentais que estão complexadas e depositadas no PDB.

Estrutura PDB	DFN*	Inibidores
2W0B	2.11	3-[(4-metilfenil)sulfonil]amino} propil piridina-4-ilcarbamato
2W0A	2.17	n-[(1s)-2-metil-1-(piridina-4- ilcarbamoil)propil]ciclohexanecarboxamida
2W09	2.19	cis-4-metil-n-[(1s)-3-(metilsulfanil)-1- (piridina-4-ilcarbamoil)propil] nocarboxamida
1EA1	2.34	Fluconazol
1E9X	2.40	Fenilimidazol
2CIB	2.48	(2s)-2-[(2,1,3-benzotiadiazol-4-ilsulfonil)amino]- 2-fenil-n-piridina-4 –ilacetamida
2CIO	2.68	(2r)-2-fenil-n-piridina-4-ilbutanamida

DFN* - Distância em Å medida entre o átomo de Fe do grupamento heme e o nitrogênio do inibidor das 14 α DM depositadas no PDB.

Essa análise demonstrou que a distância entre o átomo de Fe do grupamento heme e o nitrogênio do inibidor varia entre 2,11 Å e 2,68 Å. Portanto o limite mínimo para interação foi fixado em 2,0 Å e o máximo em 3,0 Å.

Para cada um dos compostos foram analisadas visualmente as 3 (três) melhores soluções, obtidas em um universo de 30 (trinta) acoplamentos distintos para cada composto. Entretanto, somente a melhor solução encontrada pelo programa GOLD foi considerada; exceto nos casos onde foi detectada alguma inconsistência no modo de interação sugerido pelo programa GOLD.

Segundo a função de pontuação GOLDScore, 10 compostos apresentam valores acima de 49.65, enquanto os demais apresentam valores inferiores a 43.71. (**Tabela 9**)

Tabela 9 – Resultado do acoplamento molecular da estrutura 3D da lanosterol 14 α -desmetilase do fungo *Moniliophthora perniciosa* com inibidores azólicos.

Inibidores	Fitness	Inibidores	Fitness
Cetoconazol	65.66	Metconazol	30.76
Ciproconazol	52.18	Miconazol	66.13
Climbazol	53.31	Protioconazol	60.88
Clotrimazol	5.29	Sulconazol	72.77
Difenoconazol	61.84	Tebuconazol	29.25
Econazol	70.03	Triadimefon	53.99
Epoxiconazol	49.65	Triadimenol	43.71

Considerando que valores baixos na função GOLDScore estão associados com soluções incorretas para o problema de acoplamento molecular, somente os 6 compostos com maiores pontuações (em negrito na tabela 9) foram considerados nas etapas subsequentes de análise.

As ligações de hidrogênio entre o receptor e o inibidor foram tidas como indicativas para estabilização do complexo, por serem importantes interações não-covalentes existentes nos sistemas biológicos, sendo responsáveis pela estabilidade das conformações bioativas. A análise do composto Cetoconazol (**Figura 31**) indicou que a solução 03 apresentou três ligações de hidrogênio, sendo duas ligações de hidrogênio entre a Lys 99 presente no sítio ativo da proteína com O19 e O21 do ligante e a terceira entre a Lys 100 e o O16 do ligante. A solução 3 do composto e Econazol (**Figura 32**) apresenta uma ligação de hidrogênio entre o átomo Cl 7 do inibidor com a His 76. Nos compostos Difenoconazol, Miconazol, Protioconazol, e Sulconazol nenhuma ligação de hidrogênio foi identificada.

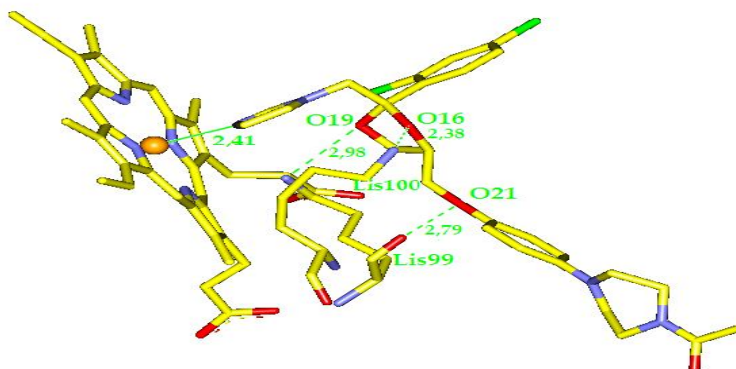


Figura 31 - Resultados do acoplamento molecular realizado no programa Gold entre o modelo 3LMP A da enzima 14 α DM do fungo *Moniliophthora perniciosa* e o composto cetoconazol. Soluções 3

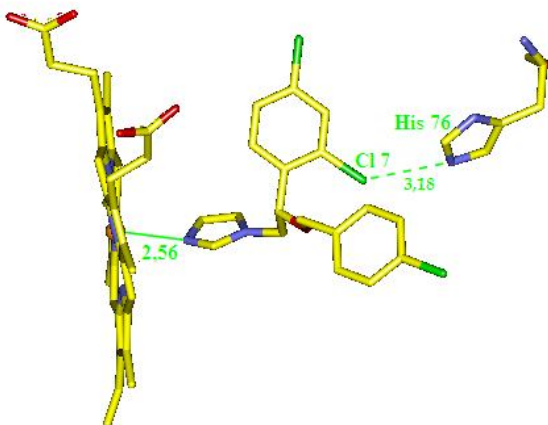


Figura 32 - Resultados do acoplamento molecular realizado no programa Gold entre o modelo 3LMPa da enzima 14 α DM do fungo *Moniliophthora perniciosa* e o composto Econazol. Solução 3.

Com base na análise visual foi possível identificar que todos os compostos ativos, identificados em negrito na **tabela 10**, apresentam duas regiões hidrofóbicas e os dois nitrogênios do anel azólico em locais próximos do espaço, como destacado na **figura 33**.

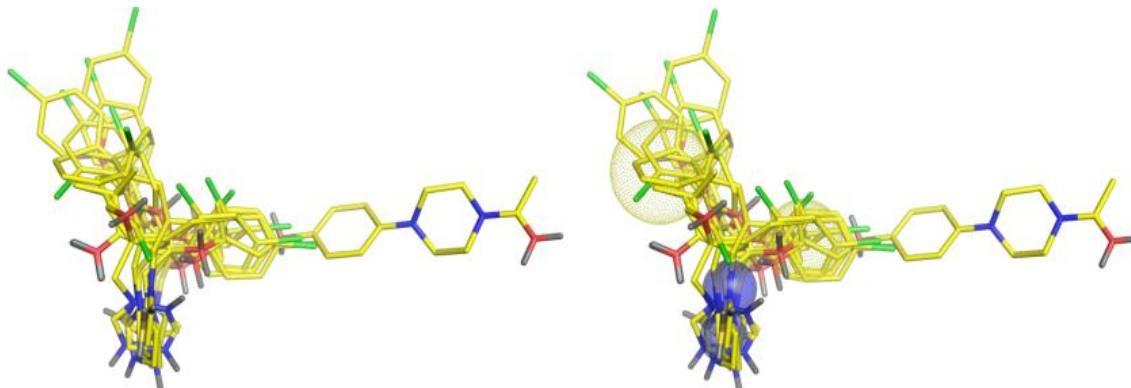


Figura 33 - Resultado do acoplamento molecular segundo o programa GOLD 3.11 para os compostos destacados na tabela 10. Em destaque, à direita, hipótese farmacofórica formulada a partir do resultado de acoplamento molecular (duas regiões apolares (esferas amarelas) e dois nitrogênios do anel azólico (esferas azuis)).

Com o objetivo de comprovar que esse padrão de interação está presente também em outras lanosterol 14 α -desmetilase, procedemos a comparação do atual modelo farmacofórico com as seguintes estruturas cristalográficas: 2W0A, 2W0B e 2CIB (**Figura 34**). Mesmo considerando que alguns dos inibidores presentes nesses complexos cristalográficos não pertencem a classes dos derivados azólicos, pode-se perceber que o padrão de interação, proposto a partir do acoplamento molecular, coincide com aquele observado nessas estruturas cristalográficas.

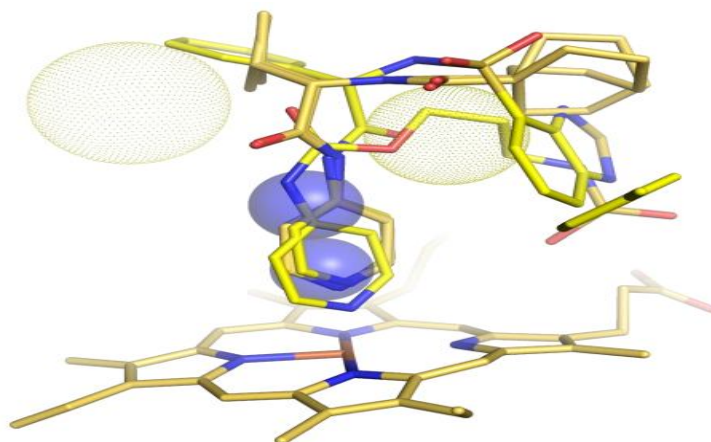


Figura 34 - Comparação da conformação cristalográfica dos ligantes encontrados em 2W0A, 2W0B e 2CIB com o modelo farmacofórico criado a partir do acoplamento molecular.

De acordo com esse modelo farmacofórico, a presença de um grupo doador/aceptor de ligações de H não seria essencial para a atividade fungicida dos derivados azólicos estudados (**Figura 35**).

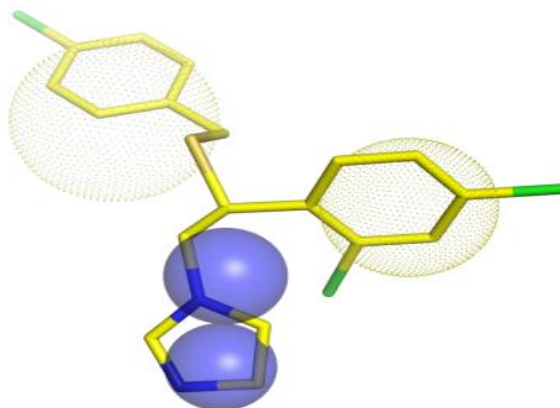


Figura 35 - Ajuste das conformações obtidas por acoplamento molecular ao modelo farmacofórico descrito na figura 33 para o composto Sulconazol. Note não há presença do grupo doador/aceptor de ligações de H.

Esse dado está em concordância com os resultados obtidos com os compostos Difenoconazol, Miconazol, Proticonazol e Sulconazol, onde nenhuma ligação de hidrogênio foi identificada, entretanto divergem dos dados obtidos com os compostos Cetoconazol e Econazol, sugerindo que somente a aquisição e avaliação de novos compostos nos permitirá chegar a um modelo convergente que esclareça, de forma categorica, quais as propriedades químicas essenciais para inibição de lanosterol 14- α desmetilase de *M. perniciosa*.

5 CONCLUSÃO

A criação de um modelo 3D da enzima lanosterol 14 α -desmetilase do *Moniliophthora perniciosa* por Modelagem Comparativa possibilitou a compreensão do modo de interação dos compostos azólicos Cetoconazol, Econazol, Difenoconazol, Miconazol, Protioconazol e Sulconazol no sítio ativo do modelo.

Durante o desenvolvimento do modelo, ficou evidente que há uma grande lacuna no meio científico, no que tange a parametrização de programas computacionais para avaliação do comportamento de hemoproteínas que contenha em sua estrutura o Fe(III). Os programas existentes indicam falta de parâmetros para avaliar a ligação entre o Fe(III) e os átomos de nitrogênio contidos no anel porfirínico. Esse hiato impossibilitou a obtenção de dados mais conclusivos sobre aspectos moleculares envolvidos na construção do modelo 3D da enzima em estudo.

No entanto, foi possível realizar a otimização molecular, o que permitiu a obtenção de um modelo com características satisfatórias. As validações realizadas pelos programas PROCHECK, ANOLEA e VERIFY 3D sugerem que o modelo final possui qualidade estereoquímica superior ao modelo que precede a otimização. O êxito nesse procedimento pode ser considerado um avanço na química computacional, pois possibilitou cálculos de mecânica molecular para um sistema que possui em sua constituição um átomo de Fe(III).

O alinhamento múltiplo entre a seqüência de aminoácidos e as seqüências das proteínas utilizadas como moldes possibilitou identificar os resíduos que fazem parte do sítio ativo da enzima. Uma vez definida a composição do sítio ativo foi possível identificar a orientação espacial dos resíduos que compõem esta região no modelo e realizar experimentos de acoplamento molecular com compostos azólicos.

Os resultados obtidos com acoplamento molecular demonstram um modelo farmacofórico em concordância com a conformação cristalográfica dos ligantes encontrados em 2W0A, 2W0B e 2CIB (CYP₅₁ depositadas no PDB) e possibilidade de interação entre os compostos testados e o sítio ativo da lanosterol 14 α -desmetilase do *M. perniciosa*. Porém, esses resultados não são conclusivos e como perspectivas futuras, sugerem-se: (i) realização cálculos quânticos utilizando o método PM6 implementado no programa GAUSSIAN, com um sistema que contenha somente os resíduos que compõe o sítio ativo da proteína e o grupo prostético, (ii) realização de otimização molecular com o sistema descrito, (iii) realização de novos experimentos de acoplamento molecular com inibidores azólicos ativos frente ao *M. perniciosa* e iv) realização de otimização molecular com cada inibidor acoplado ao centro

ativo do modelo. A continuação dos estudos *in silico*, é uma estratégia essencial para a identificação e o desenvolvimento de inibidores específicos para lanosterol 14- α desmetilase de *M. perniciosus*.

7 REFERÊNCIAS

AGRIANUAL 2004: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2004.

AIME M. C., PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) from a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*, v 97, n5, p1012-1022, 2005.

ALLINGER, N. L.; Sprage, J. T.; *J. Am. Chem. Soc.* 1973, 95, 3893.

ALLINGER, N. L.; LII, J. H. The MM3 force field for amides, polypeptides and proteins. *Journal of Computational Chemistry*, v. 12, p. 186 – 199, 2004.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPAMAN, D.J. Basic local alignment search tool. *Journal Molecular Biology*. v. 215, p. 403, 1990.

ALVARENGA, P.; AMAROLI, P.; CÁCERES, J.; EGUIZÁBAL, C.; FERNÁNDEZ, J. A.; FOWLER, W.; LAURIA, A.; FUENTES, H. L.; MELHADO, O. E.; PANAMENO E WALTER, K. História de El Salvador. El Salvador: Ministério de Educación; Centro América, n. 249, p. 49-52, 1941.

ANDRIOLE, V.T. Current and future antifungal therapy new targets antifungal therapy: new targets for antifungal therapy. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 16: 317-321, 2000.

ANEJA, M.; GIANFAGNA, T. J.; HEBBAR, P. K. *Trichoderma harzianum* produces nonanoic acid, an inhibitor of spore germination and mycelial growth of two cacao pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 67, p. 304-307, 2005.

ARNOLDI, A. et al. Synthesis and Antifungal Activity of a Series of *N*-Substituted [2-(2,4-Dichlorophenyl)-3-(1,2,4-triazol-1-yl)] propylamines. *J. Agric. Food. Chem.*, v.55, p. 8187-8192, 2007.

ATAUALPA A.C.; BRAGA H.M.; MORGON, N.H. Cálculos teóricos de afinidades por próton de *n*-alquilaminas usando o método ONIOM. *Química Nova*, v. 29, n. 2, p. 187-193, 2006.

BARREIRO, FRAGA, C. A. M. *Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos*. 243p. Artmed. Porto Alegre, 2001.

BARLETT, D. W.; CLOUGH, J. M.; GODWIN, J. R.; HALL. A. A.; HAMER, M.; PARR-DO-BRZANSKI, B. The strobilurin fungicides. *Pest Management, Oak St.*, v.58, p.649-662, 2002.

BARTELL, L. S.; FITZWATER, S.; *J. Am. Chem. Soc.* 1976, 98, 5107.

BARTROLI, J. et al. New azole antifungals. 2. Synthesis and antifungal activity of heterocyclecarboxamide derivatives of 3-amino-2-aryl-1-azolyl-2-butanol. *J. Med. Chem.*, v. 41, p. 1855-1868, 1998a.

- BASTOS, E. Cacau: a riqueza agrícola da América. São Paulo: Ícone, 1987. 130p.
- BENVENISTE, P. Biosynthesis and Accumulation of Sterols. *Annu. Rev. Plant Biol.*, v. 55. p. 429-457, 2004
- BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. The protein data bank. *Nucleic Acids Research*, v. 28, p. 235-242, 2000.
- BIEGERT, A.; MAYER, C.; REMMERT, M.; SÖDING J LUPAS A. The MPI Toolkit for protein sequence analysis *Nucleic Acids Research*. v34, W335-339. 2006. Disponível em <<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/>> Acesso em: 20 mar 2009.
- BOISSEL, J.P., LEE, W.R., PRESNELL, S.R., COHEN, F.E. & BUNN, H.F. (1993) Erythropoietin structure-function relationships. Mutant proteins that test a model of tertiary structure. *J. Biol. Chem.*, 268:15983-15993.
- BOWIE, J.U., LUTHY, R. EISENBERG, D. A method to identify protein sequence that fold into known tree-dimensional structure. *Science*, 12:164-170, 1991.
- Branden, C.; Tooze, J.; *Introduction to Protein Structure*, Gerland: New York, 1991. In SANTOS-FILHO, O. A., ALENCASTRO, R. B. Modelagem de proteínas por homologia. *Química Nova*. v26, n2, p253-259, 2003.
- BRENDET, K. J. Resistência a fungicidas em patógenos de plantas cultivadas: Como maneja-la? Bruxelas: GCPF, p51, 1995.
- BROWN, G. D. The biosynthesis of steroids and triterpenoids. *Natural Product Reports*, v. 15, p. 653-696, 1998.
- BRUBAKER, G. R.; JOHNSON, D. W.; *Coord. Chem. Rev.* 1984, 53, 1.
- BURKE, K.; Werschnik J.; Gross E. K. U., Time-dependent density functional theory: Past, present, and future. *The Journal of Chemical Physics*. American Institute of Physics. p1236, 2005.
- BYSTROFF, C., SHAO, Y., YUAN, X. Five hierarchical levels of sequence-structure correlation in proteins. *Appl Bioinformatics*. v3(2-3), p97-104, 2004.
- CARVALHO, H.A.S. Análise Bioquímica e molecular de proteases na interação *Theobroma cacao* - *Moniliophthora perniciosa*. 2007. Universidade Estadual de Santa Cruz (Dissertação) mestrado - Programa de pós graduação em Biologia Molecular, Ilhéus, Bahia 2007
- CASE, D.A.; DARDEN, T. A.; CHEATHAM, T.E.; SIMMERLING, C.L.; WANG, J.; DUKE, R.E. LUO, R.; MERZ, K.M.; WANG, B.; PEARLMAN, D.A.; CROWLEY, M.; BROZELL, S.; TSUI, V.; GOHLKE, H.; MONGAN, J.; HORNAK, V.; CUI, G.; BEROZA, P.; SCHAFMEISTER, C.; CALDWELL, J.W.; ROSS, W.S.; KOLLMAN, P.A. AMBER 9: User manual. University of California, San Francisco, p320, 2006.
- CATALAN, M., MONTEJO, J.C. Antifúngicos sistêmicos farmacodinâmica y farmacocinética. *Rev. Iberoan. Micol.* 23: 39-49, 2006.

CEITA, G. O. et al. Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. *Plant Science*, v. 173, p. 106-117, 2007.

CHAVES, F. C.; GIANFAGNA, T. J. Cacao leaf procyanidins increase locally and systemically in response to infection by *Moniliophthora perniciosa* basidiospores. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 70, p. 174-179, 2007.

COMBA, P.; *Comm. Inorg. Chem.* 1994, 16, 133.

COUTINHO, K.; MORGON, N. H. Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular. 1ª ed. São Paulo: Da Física, 2007. p.423-450

CRAMER, C. J. Essentials of Computational Chemistry Theories and Models. England: John Wiley & Sons, Inc, 2003.

D'ALFONSO, G.; TRAMONTANO, A.; LAHM, A. Structural conservation in single-domain proteins: implications for homology modeling. *Journal of Structural Biology*. v. 134, p. 246-256, 2001.

DAPPRICH, S.; KOMÁROMI, I.; BYUN, K.S.; MOROKUMA, K.; FRISCH, M.J.; *Journal Molecular Structure. (THEOCHEM)*, v. 1, n. 461, 1999.

DEANE, C. M.; BLUNDELL, T. L. Protein comparative modelling and drug discovery. In WERMUTH, C.G. *The Practice of Medicinal Chemistry*. London, Elsevier Academic Press, 2003.

DELANEY, J. et al. Modern Agrochemical Research: a missed opportunity for drug discovery? *Drug Discovery Today*, v. 11, n. 17/19, p. 839-845, 2006.

DEMEL, R. A.; DE-KRUYFF, B. The function of sterols in membranes. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 457, p. 109-32, 1976.

DI-SANTO, R. et al. Antifungal agents. 11. N-substituted derivatives of 1-[(aryl)(4-aryl-1H-pyrrol-3-yl)methyl]-1H-imidazole: synthesis, anti-Candida activity, and QSAR studies. *J. Med. Chem.*, v. 48, p. 5140-5153, 2005

EKINS, S. Predicting undesirable drug interactions with promiscuous proteins in silico. *Drug Discovery Today*. v. 09, p. 276-285, 2004.

FAO. Foundation Agricultural Organization. *Production Yearbook*, v54. Rome, 2002. Disponível: <<http://apps.fao.org>>. Acesso em: 30 set. 2009

FISER, A.; SALI, A. MODELLER: generation and refinement of homology based protein structure models. In *Methods in Enzymology*, C.W. Carter and R.M. Sweet, eds. Academic Press, San Diego, 374, p.463-493, 2003.

FORESMAN, J. B.; FRISCH, M. J., *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods* 2. ed. Pittsburgh, Gaussian, Inc. 1996.

FRAGA, C. A. M. Razões da atividade Biológica: interações micro e biomacro-moléculas. 2001. Disponível em <<http://qnesc.sbq.org.br/online/cadernos/03/atividde.pdf>> Acesso em

10 out 2009.

FRAC Code List©: Fungicides sorted by mode of action, 2007. Disponível em: <<http://www.frac-brasil.org.br>>. Acesso em: 20 out. 2009.

FRISCH, Æ.; FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W. Gaussian 03: User's Reference. Gaussian Inc: Carnegie, 2003, 327p.

GARCIA, O. et al. Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*. *Micological Research*. v. III, p. 443-455, 2007.

GOLDSMITH-FSCHMAN, S.; HONIG, B. Structural genomics: computacional methods for structure analyses. *Protein Science*. v. 12, p. 1813-1821, 2003.

GOLD SUPORTE 2010. Disponível em <http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/> Acesso em: 15 mar 2010.

GUENGERICH, F. P.; MACDONALD, T. L. Mechanisms of cytochromeP450 catalysis. *FASEB J.*, v.4, n.8, p.2453-2459, 1991.

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

GUENGERICH FP, PARIKH A, YUN CH, KIM D, NAKAMURA K, NOTLEY LM, GILLAM EM., 2000. What makes P450s work? Searches for answers with known and new P450s. *Drug Metab Rev.*, 32, 267-81.

GUENTHER, B., ONRUST, R., ŠALI, A., O'DONNELL, M. & KURIYAN, J. (1997) Crystal structure of the delta' subunit of the clamp-loader complex of E. coli DNA polymerase III. *Cell* 91:335-345.

GUEX, N.; PEITSCH, M. C. Swiss-Model And The Swiss-Pdb viewer: An Environment For Comparative Protein Modeling. *Electrophoresis*, n.18, p. 2714-2723, 1997.

HAMBLEY, T. W.; *Comm. Inorg. Chem.* 1992, 14, 1.

HANCOCK, R. D.; *Prog. Inorg. Chem.* 1989, 37, 187.

HAY, B. P.; *Coord. Chem. Rev.*, v126, 177, 1993.

HEHRE, W. J.; et al. *Ab Initio Molecular Orbital Theory*. New York: Wiley, 1986.

HILLISCH, A. ; PINEDA, L. F. ; HILGENFELD, R. Utility of homology models in the drug discovery process. *Drug Discovery Today*. v. 09, p. 659-669, 2004.

HÖLTJE, H. D, SIPPL, W., ROGNAN, D., FOLKERS, G. *Molecular Modeling: Basic principles and applications*. 2ed. Wiley-VCH, Germany, 2003.

HUMPHREY, W; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual Molecular Dynamics, J. *Molecular Graphics*. v. 14.1, p. 33-38, 1996.

- INSIGHT II USER GUIDE, San Diego: Biosym/MSI, 1995 In SILVA J. G.; Desenvolvimento e automatização de um método teórico para a avaliação quantitativa da seletividade de proteínas do MHC por diferentes antígenos. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- JOLY, P-B.; LEMARIÉ, S. The technological trajectories of the agrochemical industry: change and continuity. *Science and Public Policy*. v. 29, n. 4, p. 259-266, 2002.
- JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. J. *Mol. Biol.* 1997, 267, 727.
- KALB, V. F. et al. Isolation of a cytochrome P-450 structural gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, v. 45, p. 237-245, 1986.
- KILARU, A.; BAILEY, B. A.; HASENSTEIN, K. H. *Moniliophthora perniciosa* produces hormones and alters endogenous auxin and salicylic acid in infected cocoa leaves. *FEMS Microbiol Lett.*, v. 274, p. 238-244, 2007.
- KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J., Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery* . 2004, 3, (11), 935-949.
- KOHN, W.; SHAM, L.J. Self-consistent equations including exchange and correlation effects. *Physical Review*. v. 140, p. 1133, 1965.
- KUNDROTAS, P. J.; ALEXOV, E. Predicting 3D structures of transient protein-protein complexes by homology. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006.
- LANA, T. G. Caracterização genética e fisiológica de *Crinipellis perniciosa*. 2004. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, São Paulo.
- LASKOWSKI, R. A., MAC-ARTHUR, M.W., SMITH, D. K., JONES, D.T., HUTCHINSON, E. G., MORRIS, A. L., NAYLOR, D., Moss, D., THORNTON, J. M. Manual Procheck v.3.0: Programs to check the Stereochemical Quality of Protein Structures. Australia, 1994.
- LEPESHEVA, G. I.; WATERMAN, M. R. Sterol 14 α -demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in al biological kingdoms. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1770, p. 467-477, 2007.
- LEROUX, P. Mode of action of agrochemical towards plant pathogens. *C.R. Biologies*, v. 326, p. 9-21, 2003.
- LIPKOWITZ, K. B., BOYD, D. Reviews in computational chemistry. VCH Publishes, New York, 1990.
- LÜTHY, R.; BOWIE, J. U.; EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*. v.356, p. 83-85, 1992.

MASERAS, F.; MOROKUMA, K.; On the application of the IMOMO (integrated molecular orbital + molecular orbital) method. *Journal of Computational Chemistry*. v. 16, p, 1170, 1995.

MARINHO, Pedro Lopes. O Estado e a Economia Cacaueira da Bahia. *Anais eletrônico... Congresso Brasileiro de História Econômica*, 3. São Paulo, 2001.

MEINHARDT, L. W. et al. In vitro production of biotrophic-like cultures of *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Current Microbiology*, v. 52, p. 191-196, 2006.

MEJÍA, L. C. et al. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control*, D.O.I 10.1016/j.biocontrol.2008.01.012, 2008

MELO, F., FEYTMANS, E. Assessing Protein Structures with a Non-local Atomic Interaction Energy. *Journal of Molecular Biology*. v277, p1141-1152, 1998.

MENEZES, S.; CARMO NETO, D. A Modernização do agrusiness do cacau. Salvador: CARGILL, 1993, 180 p.

MODI, S., PAINE, M.F., SUTCLIFFE, M.J., LIAN, L.Y., PRIMROSE, W.U., WOLF, C.R. & ROBERTS, G.C. (1996) A model for human cytochrome P450 2D6 based on homology modeling and NMR studies of substrate binding. *Biochemistry* 35:4540-4550.

MONDEGO JMC, CARAZZOLLE M F, COSTA GGL, FORMIGHIERI EF, PARIZZI LP, RINCONES J, COTOMACCI C, CARRARO DM, CUNHA AF, CARRER H, VIDAL RO, ESTRELA RC, GARCÍA O, THOMAZELLA DPT, OLIVEIRA BV, PIRES ABL, RIO MCS, ARAÚJO MRR, MORAES MH, CASTRO LAB, GRAMACHO KP, GONÇALVES MS, MOURA NETO JP, NETO AG, BARBOSA LV, GUILTINAN MJ, BAILEY BA, MEINHARDT LW, CASCARDO JCM, PEREIRA GAG. A genome survey of *Moniliophthora Perrniciosa* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. *BMC Genomics* 2008.

MOTA, S. G. R.; Ensaio in vitro e análise quimiométrica de inibidores da enzima lanosterol 14 α -desmetilase de *Moniliophthora perniciosa*, 2009. Dissertação (mestrado) Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - Universidade Estadual de Feira de Santana.

ODA, A.; YAMAOTSU, N.; HIRONO S. New AMBER force field parameters of heme iron for cytochrome P450s determined by quantum chemical calculations of simplified models. *Journal of Computational Chemistry*. V.26, n.4, p 818-826, 2004.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M. N. Identificação e manejo das principais doenças do cacaueiro no Brasil. Ilhéus: CEPLAC/ CEPEC/SEFIT, 2005. p. 132.

OMURA, T; SATO, R. A new cytochrome in liver microsomes. *J. Bio. Chem.*, v 237, n.4, p. 1375-1376, 1962.

OMURA, T. Forty years of cytochrome P450. *Biochem Biophys Res. Commun.* 1999; 266: 690-698.

PEARLMAN, D. A. et al. Amber, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to

simulate the structural and energetic properties of molecules. Computer Physics Communications. n. 91, p. 1- 41, 1995.

PEREIRA G. A. G. et al. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Moniliophthora perniciosa*. Journal of Experimental Botany, v. 56, n. 413, p. 865–877, 2005.

PEREIRA, J. L.; DE ALMEIDA, L. C.; SANTOS, S. M.; Witches' broom disease of cocoa in Bahia: Attempts at eradication and containment. Crop Prot., v. 15, p. 743-752, 1996.

PODUST, L. M.; POULOS, T. L.; WATERMAN, M. R. Crystal structure of cytochrome P450 14 α -sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA, v. 98, p. 3068-3073, 2001

PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. Status of cacao witches' broom: Biology, Epidemiology, and Management. Annu. Rev. Phytopathol., v. 34, p. 573-594, 1996.

RAUCY, J. L., ALLEN, S.W., 2001. Recent advances in P450 research. Pharmacogenetics J. 1, 178-186.

REIS, E. C.; Docking e análise do modo de ligação de três moléculas pequenas, um benzimidazol e dois compostos de cromo, nos sulcos do dna 5'-cgcgaaattcgcg-3'. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho". São Paulo, São Paulo, 2008.

RINCONES, J. et al. Differential gene expression between the biotrophic-like and saprotrophic mycelia of the witches' broom pathogen *Moniliophthora perniciosa*. MPMI, v. 2, n. 7, p. 891-908, 2008.

_____. Genetic variability and chromosome-length polymorphisms of the witches' broom pathogen *Crinipellis perniciosa* from various plant hosts in South America. Mycological Research, v. II, p. 821-832, 2006.

RING, C.S., SUN, E., MCKERROW, J.H., LEE, G.K., ROSENTHAL, P.J., KUNTZ, I.D. & COHEN, F.E. (1993) Structure-based inhibitor design by using protein models for the development of antiparasitic agents. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3583-3587.

ROBBS, C.E Bactérias como agentes de controle biológico de fitopatógenos. In: Bettiol, W. Controle Biológico de Doenças de Plantas, Campinas: EMBRAPA/CNPDA, 1991. p.121-133.

ROCHA JUNIOR, J.G., Desenvolvimento de um Modelo Empírico de Predição da Atividade de Inibidores da Esterol 14 α α α -Desmetilase (CYP51) utilizando o Método Semi-Empírico PM6. Dissertação (mestrado) Programa de Pós-graduação em Química - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

RODRIGUES, C.R.; Processos modernos no desenvolvimento de fármacos: Modelagem molecular 2001. Disponível em <<http://qnesc.sbq.org.br/online/cadernos/03/modelag.pdf>> Acesso em: 12 dez 2009.

- RSCB, 2005. RSCB Protein Data Bank. Disponível em: <http://www.rcsb.org/pdb/>. Acesso em: 23 mar, 2008.
- RÖSSLE, S. C. S., Desenvolvimento de um Sistema Computacional para a Modelagem Comparativa em Genômica Estrutural: Análise de Sequências do Genoma da *Gluconacetobacter diazotrophicus*. D.Sc., Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2004.
- RUSSEL, P. E. A Century of fungicides evolution. *J. Agric. Sci.*, v. 143, p.11-25, 2005.
- SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology*. v. 234, p. 779-815, 1993.
- SÁNCHEZ, R.; SALI, A. Comparative protein modelling in genomics. *Journal of Computational Physics*. n. 151, p. 388-401, 1998.
- SANTOS-FILHO, O. A., ALENCASTRO, R. B. Modelagem de proteínas por homologia. *Química Nova*. v26, n2, p253-259, 2003.
- SCHLEYER, P. VON R.; ENGLER, E. M.; ANDOSE, J. D.; *J. Am. Chem. Soc.* 1973, 95, 8005.
- SCHWEDE T, KOPP J, GUEX N, Peitsch MC (2003) SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* 31:3381–3385
- SHAW, M. W.; VANDENBON, A. E. A qualitative host-pathogen interaction in the *Theobroma cacao*-*Moniliophthora perniciosa* pathosystem. *Plant Pathology*, v. 56, p. 277-285, 2007.
- SHENG, C. et al. Structure-based optimization of azole antifungal agents by CoMFA, CoMSIA, and molecular docking. *J. Med. Chem.*, v. 49, p. 2512-2525, 2006.
- SILVA, J. R. Q. et al. Development of novel microsatellites from *Moniliophthora perniciosa*, causal agent of the witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Molecular Ecology Resources*, D.O.I 10.1111/j.1471-8286.2007.02063.x, 2007.
- SILVA, T. H. A.; Modelagem molecular com auxílio de computador. Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 2006
- SÖDING, J., BIEGERT, A., LUPAS, A. N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Research*, V. 34, P244-248, 2005a
- SÖDING, J. Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics*, v21, 951–960. 2005b
- SREENIVASAN, T. N., DABYDEEN, S. Modes of penetration of young cocoa leaves by *Crinipellis perniciosa*. *Plant Disease*. v73, n6, p478-481, 1989
- STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *J. Mol. Model.*, v.13, p.1173-1213,

2007.

SUÁREZ, C. (Ed.). Manual del cultivo de cacao. 2. ed. Quevedo: Estación Experimental Tropical Pichilingue, 1993. p.90-106. (Manual técnico, n. 25).

SUÁREZ, C. C.; DELGADO, A. J. C. La escoba de bruja del cacao. FUNDAGRO -INIAP, 1993. 21 p. (Boletín técnico, n. 11).

SVENSSON, M.; HUMBEL, S.; FROESE, R.D.J.; MATSUBARA, T.; SIEBER, S.; MOROKUMA, K.; J. "ONIOM: a multilayered integrated MO+MM method for geometry optimizations and single point energy predictions. A test for Diels-Alder reactions and Pt(P(t-Bu)₃)₂ + H₂ oxidative addition". **Chemical Physics**. v. 100, n. 50, p.19357-63, 1996.

SWISS-PROT, 1996, Swiss-Prot Protein knowledgebase. Disponível em: <http://ca.expasy.org/sprot/>. Acesso: 23 dez 2009.

TAFI, A. et al. Antifungal agents. 10. New derivatives of 1-[(aryl)[4-aryl-1H-pyrrol-3-yl]methyl]-1H-imidazole, synthesis, anti-candida activity, and quantitative structure-analysis relationship studies. *J. Med. Chem.*, v. 45, p. 2720-2732, 2002.

_____. Molecular modeling of azole antifungal agents active against *Candida albicans*. 1. A comparative molecular field analysis study. *J. Med. Chem.*, v. 39, p.1227-1235, 1996.

THONPSON, J.D.; HIGGINS, D.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

URBINA J.A 1997. Lipid biosynthesis pathway as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology*. 114: S91-S99.

VAKSER, I.A. (1997) Evaluation of GRAMM low-resolution docking methodology on the hemagglutinin-antibody complex. *Proteins* 1:226-230.

VREVEN, D. 3D shape discrimination using relative disparity derivatives. **Vision Research**, v. 46, n. 25, p. 4181-92, 2006.

VIÇOSA, A. L.; Estudo da utilização de incrementadores de dissolução para compressão direta: enfoque no desenvolvimento de medicamentos genéricos, 2003. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

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

WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L.; FOYE, W. O. Principles of Medicinal Chemistry. 4.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995.

WINGARD, J.R.; LEATHER, H. ; *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, v 10, p 73. 2004.

WU, G., FISER, A., TER KUILE, B., ŠALI, A. & MULLER, M. (1999) Convergent evolution of *Trichomonas vaginalis* lactate dehydrogenase from malate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6285-6290.

WOO, T.K.; CAVALLO, L.; ZIEGLER, T.; Tool of the trade in modeling inorganic reactions from balls and sticks to HOMO's and LUMO's. *Theoretical Chemistry*. n. 100, p. 307, 1998.

XIAO, L. et al. Three-dimensional models of wild-type and mutated forms of cytochrome P450 14 α -demethylases from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* provide insights into posaconazole binding antimicrob. *Agent. Chemo.*, v. 48, p. 568-574, 2004.

YOUNG, D. C. *Computational Chemistry: a practical guide for applying techniques to real world problems*. Canada: John Wiley & Sons, Inc, 2001.

YUAN, X, BYSTROFF, C. Non-sequential structure-based alignments reveal topology-independent core packing arrangements in proteins. *Bioinformatics*. v21, n7, p1010-9, 2005.

ANEXOS

Anexo A - PREP - Parâmetros do campo de força ff09 do AMBER para criação dos arquivos de topologia do grupamento heme.

0.50000									
1	DUMM	DU	M	0	0	0	0.0000	0.0000	0.0000
2	DUMM	DU	M	1	0	0	1.4490	0.0000	0.0000
3	DUMM	DU	M	2	1	0	1.5220	111.1000	0.0000
19	FE	FE	M	16	14	12	2.1000	124.0000	180.0000
20	NA	NP	S	19	16	14	2.0800	98.0000	90.0000
21	C1A	CC	S	20	19	16	1.3800	125.4000	90.0000
22	C2A	CB	B	21	20	19	1.4100	109.0000	180.0000
23	CAA	CT	3	22	21	20	1.5100	124.0000	180.0000
24	HP71	HC	E	23	22	21	1.0900	109.5000	60.0000
25	HP72	HC	E	23	22	21	1.0900	109.5000	300.0000
26	CBA	CT	3	23	22	21	1.5400	111.0000	180.0000
27	HP73	HC	E	26	23	22	1.0900	109.5000	60.0000
28	HP74	HC	E	26	23	22	1.0900	109.5000	300.0000
29	CGA	C	B	26	23	22	1.5270	109.4000	180.0000
30	O1A	O2	E	29	26	23	1.2600	117.2000	90.0000
31	O2A	O2	E	29	26	23	1.2600	117.2000	270.0000
32	C3A	CB	B	22	21	20	1.4100	107.0000	0.0000
33	CMA	CT	3	32	22	21	1.5100	125.0000	180.0000
34	HM81	HC	E	33	32	22	1.0900	109.5000	60.0000
35	HM82	HC	E	33	32	22	1.0900	109.5000	180.0000
36	HM83	HC	E	33	32	22	1.0900	109.5000	300.0000
37	C4A	CC	S	32	22	21	1.4100	107.0000	0.0000
38	CHB	CD	B	37	32	22	1.3700	127.0000	180.0000
39	HDM	HC	E	38	37	32	1.0800	120.0000	0.0000
40	C1B	CC	B	38	37	32	1.3700	127.0000	180.0000
41	NB	NO	E	40	38	37	1.3800	124.0000	0.0000
42	C2B	CB	B	40	38	37	1.4100	127.0000	180.0000
43	CMB	CT	3	42	40	38	1.5100	125.0000	0.0000
44	HM11	HC	E	43	42	40	1.0900	109.5000	60.0000
45	HM12	HC	E	43	42	40	1.0900	109.5000	180.0000
46	HM13	HC	E	43	42	40	1.0900	109.5000	300.0000
47	C3B	CB	B	42	40	38	1.4100	107.0000	180.0000
48	CAB	CY	B	47	42	40	1.5100	126.0000	180.0000
49	HV2	HC	E	48	47	42	1.0800	120.0000	0.0000
50	CBB	CX	B	48	47	42	1.3300	120.0000	180.0000
51	HVC2	HC	E	50	48	47	1.0800	120.0000	0.0000
52	HVT2	HC	E	50	48	47	1.0800	120.0000	180.0000
53	C4B	CC	S	47	42	40	1.4100	107.0000	0.0000
54	CHC	CD	B	53	47	42	1.3700	127.0000	180.0000
55	HAM	HC	E	54	53	47	1.0800	120.0000	0.0000
56	C1C	CC	B	54	53	47	1.3700	130.0000	180.0000
57	NC	NP	E	56	54	53	1.3800	124.0000	0.0000
58	C2C	CB	B	56	54	53	1.4100	127.0000	180.0000
59	CMC	CT	3	58	56	54	1.5100	125.0000	0.0000
60	HM31	HC	E	59	58	56	1.0900	109.5000	60.0000
61	HM32	HC	E	59	58	56	1.0900	109.5000	180.0000
62	HM33	HC	E	59	58	56	1.0900	109.5000	300.0000
63	C3C	CB	B	58	56	54	1.4100	107.0000	180.0000
64	CAC	CY	B	63	58	56	1.5100	126.0000	180.0000
65	HV4	HC	E	64	63	58	1.0800	120.0000	0.0000
66	CBC	CX	B	64	63	58	1.3300	120.0000	180.0000
67	HVC4	HC	E	66	64	63	1.0800	120.0000	0.0000
68	HVT4	HC	E	66	64	63	1.0800	120.0000	180.0000
69	C4C	CC	S	63	58	56	1.4100	107.0000	0.0000
70	CHD	CD	B	69	63	58	1.3700	127.0000	180.0000
71	HBM	HC	E	70	69	63	1.0800	120.0000	0.0000
72	C1D	CC	B	70	69	63	1.3700	130.0000	180.0000
73	ND	NO	E	72	70	69	1.3800	124.0000	0.0000
74	C2D	CB	B	72	70	69	1.4100	127.0000	180.0000
75	CMD	CT	3	74	72	70	1.5100	125.0000	0.0000
76	HM51	HC	E	75	74	72	1.0900	109.5000	60.0000
77	HM52	HC	E	75	74	72	1.0900	109.5000	180.0000
78	HM53	HC	E	75	74	72	1.0900	109.5000	300.0000

79	C3D	CB	B	74	72	70	1.4100	107.0000	180.0000
80	C4D	CC	S	79	74	72	1.4100	107.0000	0.0000
81	CHA	CD	S	80	79	74	1.3700	127.0000	180.0000
82	HGM	HC	E	81	80	79	1.0800	120.0000	0.0000
83	CAD	CT	3	79	74	72	1.5100	124.0000	180.0000
84	HP61	HC	E	83	79	74	1.0900	109.5000	60.0000
85	HP62	HC	E	83	79	74	1.0900	109.5000	300.0000
86	CBD	CT	3	83	79	74	1.5400	111.0000	180.0000
87	HP63	HC	E	86	83	79	1.0900	109.5000	60.0000
88	HP64	HC	E	86	83	79	1.0900	109.5000	300.0000
89	CGD	C	B	86	83	79	1.5300	109.4000	180.0000
90	O1D	O2	E	89	86	83	1.2600	117.2000	90.0000
91	O2D	O2	E	89	86	83	1.2600	117.2000	270.0000

LOOP EXPLICIT

NA C4A
 FE NB
 FE NC
 FE ND
 NB C4B
 NC C4C
 ND C4D
 C1A CHA

IMPROPER

NA C1A C4A FE
 NB C1B C4B FE
 NC C1C C4C FE
 ND C1D C4D FE
 C1A C2A NA CHA
 C1B C2B NB CHB
 C1C C2C NC CHC
 C1D C2D ND CHD
 C2A C3A C1A CAA
 C2B C3B C1B CMB
 C2C C3C C1C CMC
 C2D C3D C1D CMD
 C3A C4A C2A CMA
 C3B C4B C2B CAB
 C3C C4C C2C CAC
 C3D C4D C2D CAD
 C4A NA C3A CHB
 C4B NB C3B CHC
 C4C NC C3C CHD
 C4D ND C3D CHA

Anexo B – FRCMOD - Parâmetros do campo de força ff09 do AMBER para criação dos arquivos de topologia do grupamento heme coordenada.

MASS
 NP 14.01
 NO 14.01
 CY 12.0
 CX 12.0
 CD 12.0
 FE 55.0
 LC 12.01
 LO 16.00

BOND
 FE-NP 50.000 2.01000
 FE-LO 200.000 1.78
 FE-LC 200.000 1.75000
 LC-LO 1000.000 1.12000
 FE-NB 60.000 2.01000
 FE-NO 50.000 2.01000
 NP-CC 316.000 1.38400
 NO-CC 316.000 1.38400
 CC-CB 273.000 1.44400
 CC-CD 391.000 1.39100
 CB-CB 418.000 1.35700
 CB-CT 297.000 1.50100
 CB-CY 297.000 1.50100
 CD-HC 338.000 1.09000
 CY-HC 340.000 1.08000
 CX-HC 340.000 1.08000
 CY-CX 570.000 1.34000
 LO-LO 848.000 1.25000

ANGLE
 NB-FE-NP 50.000 90.000
 NB-FE-NO 50.000 90.000
 NB-FE-LC 0.000 90.000
 NB-FE-LO 0.000 90.000
 NP-FE-NP 0.000 90.000
 NO-FE-NO 0.000 90.000
 NO-FE-NP 50.000 90.000
 NO-FE-LC 45.000 90.000
 NO-FE-LO 45.000 90.000
 NP-FE-LC 45.000 90.000
 NP-FE-LO 45.000 90.000
 FE-NP-CC 30.000 127.400
 FE-NO-CC 30.000 127.400
 NO-CC-CB 70.000 110.300
 NP-CC-CB 70.000 110.300
 NO-CC-CD 70.000 125.500
 CC-CB-CT 70.000 124.900
 CB-CB-CT 70.000 128.200
 CB-CB-CT 70.000 128.200
 CC-CD-HC 30.000 118.000
 CR-NB-FE 0.000 110.000
 CV-NB-FE 0.000 110.000
 CB-CT-HC 35.000 109.500
 CB-CB-CY 70.000 128.200
 CB-CY-HC 35.000 120.000
 CB-CY-CX 70.000 120.000
 CY-CX-HC 35.000 120.000
 CC-CB-CY 70.000 124.900
 CX-CY-HC 35.000 120.000
 CB-CT-CT 63.000 114.000
 HC-CX-HC 35.000 120.000
 FE-LC-LO 35.000 180.000

FE-LO-LO	35.000	135.000		
LP-SH-LP	600.000	160.000		

DIHEDRAL

X -NB-FE-X	1	0.000	0.000	2.000
X -NO-FE-X	1	0.000	180.000	2.000
X -NP-FE-X	1	0.000	180.000	2.000
X -NO-CC-X	4	5.700	180.000	2.000
X -NP-CC-X	4	5.700	180.000	2.000
X -CC-CB-X	4	3.150	180.000	2.000
X -CB-CB-X	4	21.500	180.000	2.000
X -CD-CC-X	4	7.900	180.000	2.000
X -CB-CT-X	1	0.000	180.000	2.000
X -CB-CY-X	4	0.000	180.000	2.000
X -CY-CX-X	4	30.000	180.000	2.000
X -FE-LO-X	1	0.0	180.0	2.000

IMPROPER

X -X -CC-X	0	1.000	180.000	2.000
X -X -CB-X	0	1.000	180.000	2.000
X -X -NP-X	0	1.000	180.000	2.000
X -X -NO-X	0	1.000	180.000	2.000

NONBON

FE	1.20000	0.05000	0.00000
LO	1.60000	0.20000	0.00000
LC	1.85000	0.12	0.00000

Nome do arquivo: Cópia de Dissertação-Final corrigida pela banca.doc
Diretório: C:\Documents and Settings\Alessandra\Desktop
Modelo: C:\Documents and Settings\Alessandra\Dados de aplicativos\Microsoft\Modelos\Normal.dotm
Título:
Assunto:
Autor: pc
Palavras-chave:
Comentários:
Data de criação: 30/7/2010 09:53:00
Número de alterações: 18
Última gravação: 1/9/2010 19:00:00
Salvo por: pc
Tempo total de edição: 878 Minutos
Última impressão: 2/9/2010 05:03:00
Como a última impressão
Número de páginas: 92
Número de palavras: 25.577 (aprox.)
Número de caracteres: 138.119 (aprox.)