

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Planejamento por Docagem e Dinâmica Molecular de
pesticidas inibidores da Acetilcolinesterase do mosquito *Aedes
aegypti***

Design by Docking and Molecular Dynamics of *Aedes aegypti* mosquito

Acetylcholinesterase inhibitors

Isadóra Aurora Guerra

Dissertação de Mestrado em Química

Vitória

2021

Isadora Aurora Guerra

**Planejamento por Docagem e por Dinâmica Molecular de pesticidas
inibidores da Acetilcolinesterase do mosquito *Aedes aegypti***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Química, na área de Físico-Química.

Orientadores: Prof. Dr. Arlan da Silva Gonçalves
e Prof. Dr. Tanos Celmar Costa França.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Adgasito Guerra (*in memoriam*) e Sueli Almeida Santos, por todo o suporte, dedicação e incentivo ao longo da minha trajetória. Aos meus irmãos e ao meu companheiro: ofereço com gratidão e amor.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a DEUS por ter me sustentado e a VIRGEM MARIA pela proteção e pelas graças alcançadas na minha vida.

A CAPES e a Ufes pelo fornecimento dos recursos necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. ARLAN DA SILVA GONÇALVES pela sua orientação, pela amizade e pelas palavras duras nos momentos que eu precisava ouvi-las.

Ao meu coorientador, professor Dr. TANOS CELMAR COSTA FRANÇA pelas colocações e sugestões para que o nosso trabalho fosse aprimorado.

Aos professores Dr. ELÓI ALVES DA SILVA FILHO, Dr. OSMAIR VITAL DE OLIVEIRA e Dr. TEOBALDO RICARDO CUYA GUIZADO por aceitarem fazer parte da minha banca.

Agradeço a minha família, SUELI ALMEIDA SANTOS, ANTONIO GUERRA SOBRINHO, INDIRA ALMEIDA SANTOS por estarem sempre presentes e por me apoiarem nas minhas escolhas de vida. Ao meu pai ADGASITO GUERRA (in memoriam) pela resiliência e por me incentivar a continuar sempre estudando.

Ao meu companheiro, FRANCISCO CASAGRANDE, pelo suporte psicológico e emocional que tanto precisei durante o mestrado e na vida pessoal durante os anos em questão.

A FABIANA, ROGERIO, SAMANTHA, RHAYNER e demais colegas do grupo de pesquisa, pela amizade e companheirismo ao longo desses anos.

Aos professores do programa de pós-graduação, aos coordenadores, em especial ao ALEX DE SOUZA pela amizade e pela ajuda em resolver questões administrativas.

Ao JOÃO PAULO MENEZES SPADETO pela ajuda e disponibilidade nos últimos meses de pesquisa.

Ao ANDRÉ MAZEGA FONTES, ELOI CAÇADOR, ADRIEL MARCULANO e BRENDA FERRARI pela amizade e companheirismo.

RESUMO

O uso de inseticidas aparece como uma das estratégias de prevenção de arbovirose como a Zika, a *Chikungunya*, a dengue e a malária, uma vez que auxiliam no controle da proliferação de mosquitos. Entretanto, pesticidas da classe dos organofosforados apresentam alta toxicidade aos mamíferos, podendo causar intoxicações e eventuais mortes aos usuários. Neste trabalho, fizemos estudos por docagem e dinâmica molecular das enzimas acetilcolinesterase do mosquito *Aedes aegypti* (AaAChE) e do *Homo sapiens sapiens* (HssAChE) com dezenove pesticidas, sendo seis reportados para utilização em mosquitos da espécie *Anophele gambiae*, o paraoxon como branco e seis novas propostas que foram planejadas a partir de adição de grupos farmacofóricos com interação a tirosinas mutantes na entrada do sítio ativo da enzima AaAChE. Os resultados mostraram que a energia livre de Gibbs estimada pelo método MM-PBSA dos complexos PM22-AaAChE, PROP2-AaAChE e PROP3-AaAChE apresentaram uma maior estabilidade quando comparados aos complexos com a enzima humana. O melhor resultado reportado neste trabalho foi do pesticida PM22 que apresentou média da energia livre de Gibbs de $-775,1 \text{ kJ.mol}^{-1}$ para o complexo formado com a enzima AaAChE e média da energia livre de Gibbs de $-468,52 \text{ kJ.mol}^{-1}$ para o complexo formado com a enzima HssAChE. Os resultados e análises por dinâmica molecular das propostas PM22, PROP2 e PROP3 podem ser úteis para o desenvolvimento de novos pesticidas que sejam seletivos aos mosquitos do gênero *Aedes aegypti* e que sejam pouco tóxicos aos humanos.

Descritores: Acetilcolinesterase, dinâmica molecular, docagem molecular, pesticidas organofosforados, mosquito *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

The use of insecticides appears as one of the strategies to prevent arboviruses such as Zika, Chikungunya, dengue and malaria, since they help to control the proliferation of mosquitoes. However, organophosphate pesticides are high toxicity to mammals, and can cause poisoning and eventual death to users. In this work, we carried out studies by docking and molecular dynamics of the acetylcholinesterase enzymes from the mosquito *Aedes aegypti* (*AaAChE*) and from *Homo sapiens sapiens* (*HssAChE*) with nineteen pesticides, of which six were reported for use in *Anophele gambiae* mosquitoes, paraoxon as comparison and six new proposals that were planned from the addition of pharmacophoric groups interacting with mutant tyrosines at the entry of the active site of the enzyme *AaAChE*. Results show that the Gibbs free energy estimated by the MM-PBSA method of the complexes PM22-*AaAChE*, PROP2-*AaAChE* and PROP3-*AaAChE* showed greater stability when compared to complexes with the human enzyme. The best result reported in this work was the pesticide PM22, which presented an average Gibbs free energy of $-775.1 \text{ kJ.mol}^{-1}$ for the complex formed with the enzyme *AaAChE* and an average Gibbs free energy of $-468.52 \text{ kJ.mol}^{-1}$ for the complex formed with the *HssAChE* enzyme. Those results and analyzes by molecular dynamics of the PM22, PROP2 and PROP3 proposals may be useful for the development of new pesticides that are selective for mosquitoes of the *Aedes aegypti* genus and that present less toxic to humans.

DESCRIPTORS: Acetylcholinesterase, molecular dynamics, molecular docking, organophosphate pesticides, *Aedes aegypti*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida comum a todos os mosquitos. O local de postura dos ovos varia de acordo com a espécie.	21
Figura 2	Transmissão neuronal da acetilcolina e sua hidrólise por AChE	26
Figura 3	Esquema da inibição e envelhecimento da AChE por organofosforados.	27
Figura 4	Ilustração dos ângulos diedros ψ e ϕ em uma cadeia tripeptídica. Imagem gerada pelo programa GMOLDEN, versão 5.0 (SCHAFTENAAR e NOORDIK, 2000) e adaptado por Silveira, 2018.	34
Figura 5	Mutações na região da entrada do sítio ativo da AaAChE.	37
Figura 6	Fórmula estrutural plana dos pesticidas PMn, PMSn, PYn e PYSn.	38
Figura 7	Fórmula estrutural plana dos pesticidas propostos a partir da adição de grupos farmacofóricos: Propostas 1 a 6 e Paraoxon.	38
Figura 8	A esquerda, redocking do ligante FP1 na proteína de código 5HFA (RMSD 2,232 Angstroms) e a direita, redocking do HI6 na proteína de código 5HF9 (RMSD 2,715).	42
Figura 9	Grid box da enzima AaAChE para cálculo de docagem molecular. A esquerda, o grid box da etapa 1 e a direita, o grid box da etapa 2.	43
Figura 10	Diagrama de Ramachandran, gerado pelo PROCHECK, versão 3.5 (LASKOWSK, MACARTHUR e MOSS <i>et al.</i> 1993) da AaAChE obtida por modelagem comparativa.	48
Figura 11	Alinhamento sequencial das enzimas HssAChE e AaAChE obtido com o SwissPdbViewer (GUEx, 1997).	49
Figura 12	Alinhamento sequencial entre as enzimas HssAChE e AaAChE. Imagem gerada pelo programa PYMOL.	50
Figura 13	Gráfico de energia de interação, em kcal/mol, dos 19 pesticidas docados as enzimas AaAChE e HssAChE.	56
Figura 14	Gráfico de energia de interação, em kcal/mol, dos 8 pesticidas docados as enzimas AaAChE e HssAChE - Etapa 2.	65
Figura 15	Energia total dos sistemas simulados por dinâmica molecular a partir dos dois melhores resultados de pesticidas selecionados na primeira etapa de docagem molecular.	72
Figura 16	RMSD comparativo entre os complexos da primeira etapa de DM no tempo de 0 a 50 ns de simulação.	73

Figura 17	RMSD dos ligantes no tempo de 0 a 50 ns de simulação.	74
Figura 18	Variação na conformação do ligante PM22 durante a simulação por dinâmica molecular com a enzima <i>AaAChE</i> .	75
Figura 19	Variação na conformação do ligante PM22 durante a simulação por dinâmica molecular com a enzima <i>HssAChE</i> .	75
Figura 20	Quadros de simulação por DM do complexo PROP2- <i>Hss</i> . Representação em superfície molecular da enzima <i>HssAChE</i> (coloração anil) e aminoácidos Tyr124 e Tyr337 (coloração rosa), em representação esferas com coloração magenta (PROP2).	76
Figura 21	RMSF 2D dos sistemas PM22- <i>Aa</i> , PM22- <i>Hss</i> , PROP2- <i>Aa</i> e PROP2- <i>Hss</i> .	77
Figura 22	Em ciano <i>AaAChE</i> e em verde <i>HssAChE</i> . Aminoácidos com RMSF maior do que 0,4 nm em seleção. Resultados para as proteínas complexadas com o pesticida PM22.	78
Figura 23	Em ciano <i>AaAChE</i> e em verde <i>HssAChE</i> . Aminoácidos com RMSF maior do que 0,4 nm em seleção. Resultados para as proteínas complexadas com o pesticida PROP2.	79
Figura 24	Raio de giro das proteínas <i>AaAChE</i> e <i>HssAChE</i> da primeira etapa.	80
Figura 25	Distância entre PM22 e o aminoácido Tyr344 da <i>AaAChE</i> .	82
Figura 26	Imagens a cada 10 ns de simulação para o complexo PM22 - <i>AaAChE</i> .	83
Figura 27	Interações entre aminoácidos mutantes da entrada do sítio ativo da <i>AaAChE</i> e pesticida PM22.	84
Figura 28	Distância entre PM22 e o aminoácido Thr83 da <i>HssAChE</i> por quadros de simulação à esquerda. A direita, distância dos aminoácidos Tyr72, Asp74, Leu76, Leu289, Ser293 e Val294 da enzima <i>HssAChE</i> pelo número de quadros de dinâmica molecular.	85
Figura 29	Imagens geradas a cada 10 ns de simulação por DM para o complexo PM22 - <i>HssAChE</i> . Em azul, aminoácidos da tríade catalítica da enzima <i>HssAChE</i> , em violeta aminoácidos da entrada do sítio ativo da enzima humana (Tyr72, Asp74, Leu289, Ser293 e Val294). PM22 em representação do tipo licorice.	86
Figura 30	Distância entre o pesticida PM22 e os aminoácidos Ser203, His447 e Glu334 da enzima <i>HssAChE</i> pelo número de quadros de dinâmica molecular.	87
Figura 31	Imagens geradas a cada 10 ns de simulação por DM entre o ligante PROP2 e a enzima <i>AaAChE</i> .	87
Figura 32	No gráfico a esquerda distâncias entre os aminoácidos da tríade catalítica da enzima <i>AaAChE</i> . No gráfico a direita distância entre o	88

pesticida PROP2 e os aminoácidos Glu97, Tyr99, Tyr101, Tyr344, Gly346 e Ile347 da enzima *AaAChE* pelo número de quadros de dinâmica molecular.

- Figura 33** Enzima *AaAChE* em superfície de contato na cor rosa. Em destaque aminoácido Glu100 que realiza dois contatos polares com o ligante PROP2. **89**
- Figura 34** Distância entre o pesticida PROP2 e o aminoácido Glu100 da proteína *AaAChE*. **89**
- Figura 35** Imagens geradas a cada 10 ns de simulação por DM para o complexo PROP2 - *HssAChE*. **90**
- Figura 36** A esquerda, distância entre o pesticida PROP2 e os aminoácidos Ser203, His447 e Glu334 da enzima *HssAChE* pelo número de quadros de dinâmica molecular. A direita, distância entre o pesticida PROP2 e os aminoácidos Tyr72, Asp74, Leu76, Leu289, Ser293, Val294 da enzima *HssAChE* pelo número de quadros de dinâmica molecular. **91**
- Figura 37** Enzima *HssAChE* em superfície de contato na cor rosa. Em destaque aminoácido Phe295 que realiza um contato polar com o ligante PROP2. **92**
- Figura 38** Distância entre o pesticida PROP2 e o aminoácido Phe295. **92**
- Figura 39** Ligações hidrogênio observadas nos complexos simulados para a primeira etapa de dinâmica molecular. **93**
- Figura 40** Aminoácidos que mais interagiram por contatos polares nos complexos da primeira etapa de dinâmica molecular. **94**
- Figura 41** Quadros de simulação por DM das proteínas *AaAChE* (amarelo) e *HssAChE* (rosa) complexadas com ligante paraoxon (representação licorice). Em destaque, os aminoácidos Met176 e Tyr390 (azul) e Tyr124 e Tyr337 (amarelo). **96**
- Figura 42** Quadros de simulação por DM das proteínas *AaAChE* (amarelo) e *HssAChE* (rosa) complexadas com ligante PM22 (representação licorice). Em destaque, os aminoácidos Met176 e Tyr390 (azul) e Tyr124 e Tyr337 (amarelo). **97**
- Figura 43** Quadros de simulação por DM das proteínas *AaAChE* (amarelo) e *HssAChE* (rosa) complexadas com ligante PROP2 (representação licorice). Em destaque, os aminoácidos Met176 e Tyr390 (azul) e Tyr124 e Tyr337 (amarelo). **98**
- Figura 44** Energia livre de Gibbs estimada pelo método MM-PBSA para os complexos da primeira etapa. **100**

Figura 45	Dez aminoácidos com maior contribuição para energia livre, segundo o método MM-PBSA, primeira etapa de simulações por dinâmica molecular.	103
Figura 46	Energia total dos sistemas simulados por dinâmica molecular a partir dos dois melhores resultados de pesticidas selecionados na segunda etapa de docagem molecular.	104
Figura 47	RMSD comparativo entre os complexos da segunda etapa de DM no tempo de 0 a 50 ns de simulação.	105
Figura 48	RMSD dos ligantes no tempo de 0 a 50 ns de simulação.	106
Figura 49	Movimento observado nos quadros de simulação 20 a 25 do PROP2- <i>AaAChE</i> .	107
Figura 50	Movimento observado nos quadros de simulação 150 a 200 do PROP2- <i>AaAChE</i> .	107
Figura 51	Movimento observado no tempo de simulação igual a 6,36 ns a 6,40 ns do PROP2- <i>HssAChE</i> .	108
Figura 52	Movimento observado no tempo de simulação igual a 7,84 ns a 9,42 ns do PROP2- <i>HssAChE</i> .	108
Figura 53	Movimento observado no tempo de simulação igual a 7,84 ns a 9,42 ns do PROP3- <i>AaAChE</i> .	109
Figura 54	Movimento observado no tempo de simulação igual a 1,6 ns a 2,2 ns do PROP3- <i>HssAChE</i> .	109
Figura 55	RMSF dos sistemas Paraoxon- <i>HssAChE</i> , Paraoxon- <i>AaAChE</i> , PROP2- <i>HssAChE</i> , PROP2- <i>AaAChE</i> , PROP3- <i>HssAChE</i> e PROP3- <i>AaAChE</i> .	110
Figura 56	Em ciano <i>AaAChE</i> e em verde <i>HssAChE</i> . Aminoácidos com RMSF maior do que 0,4 nm em representação de <i>sticks</i> . Resultados para as proteínas complexadas com o pesticida PROP2.	111
Figura 57	Em ciano <i>AaAChE</i> e em verde <i>HssAChE</i> . Aminoácidos com RMSF maior do que 0,4 nm em representação de <i>sticks</i> . Resultados para as proteínas complexadas com o pesticida PROP3.	111
Figura 58	Raio de giro das propostas Paraoxon, PROP2 e PROP3 com as enzimas <i>AaAChE</i> e <i>HssAChE</i> .	112
Figura 59	Distância de interação entre o aminoácido Tyr394 pelo número de quadros da simulação.	114
Figura 60	Quadros de simulação por DM do complexo PROP2- <i>AaAChE</i> . Representação em superfície molecular da enzima <i>AaAChE</i> (coloração bronze) e aminoácidos MET176 e Tyr390 (coloração rosa).	114

Figura 61	Imagens geradas a cada 10 ns de simulação por DM do complexo PROP2- <i>AaAChE</i> .	115
Figura 62	Distâncias de interação entre o pesticida PROP2 e os resíduos da tríade catalítica (esquerda) e aminoácidos mutantes da entrada do sítio ativo (direita) da enzima <i>AaAChE</i> .	116
Figura 63	Imagens a cada 10 ns de simulação para o complexo PROP2- <i>HssAChE</i> .	116
Figura 64	Distâncias de interação entre o pesticida PROP2 e os resíduos da tríade catalítica (esquerda) e aminoácidos mutantes da entrada do sítio ativo (direita) da enzima <i>HssAChE</i> .	117
Figura 65	Imagens geradas a cada 10 ns de simulação por DM do complexo PROP3- <i>AaAChE</i> .	118
Figura 66	Distâncias de interação entre o pesticida PROP3 e os resíduos da tríade catalítica (esquerda) e aminoácidos mutantes da entrada do sítio ativo (direita) da enzima <i>AaAChE</i> .	119
Figura 67	Quadros de simulação por DM do complexo PROP3- <i>HssAChE</i> . Representação em superfície molecular da enzima <i>HssAChE</i> (coloração rosa) e aminoácidos Tyr124 e Tyr337 (coloração amarelo), em representação de licorice ligante PROP3.	120
Figura 68	Imagens a cada 10 ns de simulação para o complexo PROP3- <i>HssAChE</i> .	120
Figura 69	Distâncias de interação entre o pesticida PROP3 e os resíduos da tríade catalítica (esquerda) e aminoácidos mutantes da entrada do sítio ativo (direita) da enzima <i>HssAChE</i> .	121
Figura 70	Média de ligações hidrogênio observadas nos complexos simulados para a segunda etapa de dinâmica molecular.	122
Figura 71	Aminoácidos que mais interagiram por contatos polares nos complexos da segunda etapa de dinâmica molecular.	123
Figura 72	Quadros de simulação por DM das proteínas <i>AaAChE</i> (amarelo) e <i>HssAChE</i> (rosa) complexadas com ligante paraoxon. Em destaque, os aminoácidos Met176 e Tyr390 (azul) e Tyr124 e Tyr337 (amarelo).	125
Figura 73	Quadros de simulação por DM das proteínas <i>AaAChE</i> (amarelo) e <i>HssAChE</i> (rosa) complexadas com ligante PROP2-Etapa2. Em destaque, os aminoácidos Met176 e Tyr390 (azul) e Tyr124 e Tyr337 (amarelo).	125
Figura 74	Quadros de simulação por DM das proteínas <i>AaAChE</i> (amarelo) e <i>HssAChE</i> (rosa) complexadas com ligante PROP3 (representação licorice). Em destaque, os aminoácidos Met176 e Tyr390 (azul) e Tyr124 e Tyr337 (amarelo).	126

- Figura 75** Energia livre de Gibbs estimada pelo método MM-PBSA para os complexos da segunda etapa. 127
- Figura 76** Dez aminoácidos com maior contribuição para energia livre, segundo o método MM-PBSA, segunda etapa de simulações por dinâmica molecular. 130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação toxicológica dos agrotóxicos segundo a DL50.	23
Tabela 2	Número de moléculas de solvente e íons para os sistemas de simulação por dinâmica molecular.	44
Tabela 3	Aminoácidos da região do sítio ativo das enzimas <i>HssAChE</i> e <i>AaAChE</i> . Em negrito, estão representados os resíduos diferentes.	50
Tabela 4	Aminoácidos da região do sítio ativo das enzimas <i>AgAChE</i> e <i>AaAChE</i> . Em negrito, estão representados os resíduos diferentes.	51
Tabela 5	Dados toxicológicos estimados pelo servidor ProTox-II das moléculas propostas neste trabalho.	53
Tabela 6	Resultados das energias de docagem entre as enzimas acetilcolinesterase (<i>HssAChE</i> e <i>AaAChE</i>) e os pesticidas em estudo.	55
Tabela 7	Resultados de docagem dos pesticidas propostos (PMn, PMSn, PYn, PYSn e Paraoxon) com a enzima <i>AaAChE</i> .	57
Tabela 8	Resultados de docagem dos pesticidas propostos (Propostas 1 a 6) com a enzima <i>AaAChE</i> .	58
Tabela 9	Resultados de docagem dos pesticidas propostos (PMn, PMSn, PYn, PYSn e Paraoxon) com a enzima <i>HssAChE</i> .	59
Tabela 10	Resultados de docagem dos pesticidas propostos (Propostas 1 a 6) e paraoxon com a enzima <i>HssAChE</i> .	61
Tabela 11	Parâmetros de seleção dos melhores pesticidas para a enzima <i>AaAChE</i> da primeira etapa.	62
Tabela 12	Parâmetros de seleção dos melhores pesticidas para a enzima <i>HssAChE</i> da primeira etapa.	63
Tabela 13	Resultados das energias de docagem entre as enzimas acetilcolinesterase (<i>HssAChE</i> e <i>AaAChE</i>) e os pesticidas propostos a partir de adição de grupos farmacofóricos de interação a tirosina.	64
Tabela 14	Resultados de docagem dos pesticidas propostos (Propostas 1 a 6 e PM22) com a enzima <i>AaAChE</i>	66
Tabela 15	Resultados de docagem dos pesticidas propostos (Propostas 1 a 6 e PM22) com a enzima <i>HssAChE</i>	67
Tabela 16	Parâmetros de seleção dos melhores pesticidas para a enzima <i>AaAChE</i> da segunda etapa.	68
Tabela 17	Parâmetros de seleção dos melhores pesticidas para a enzima <i>HssAChE</i> da segunda etapa.	69

Tabela 18	Distâncias médias entre os centros de massas das proteínas com os ligantes.	81
Tabela 19	Contribuição total de energia por resíduo do sítio ativo para os complexos simulados por DM - Etapa 1.	100
Tabela 20	Distância entre os centros de massas das enzimas <i>AaAChE</i> e <i>HssAChE</i> com os ligantes PROP2 e PROP3.	113
Tabela 21	Contribuição total de energia por resíduo do sítio ativo para os complexos simulados por DM - Etapa 2.	128

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Å - Angstrom

AaAChE - Acetilcolinesterase do mosquito *Aedes aegypti*

ACh - Acetilcolina

AChE - Acetilcolinesterase

AgAChE - Acetilcolinesterase do mosquito *Anopheles gambiae*

Arg - Arginina ou R

Asn - Asparagina ou N

Asp - Ácido Aspártico ou D

Cys - Cisteína ou C

DM - Dinâmica Molecular

Gln - Glutamina ou Q

Glu - Ácido Glutâmico ou E

Gly - Glicina ou G

His - Histidina ou H

HssAChE- Acetilcolinesterase do *Homo sapiens sapiens*

kcal/mol- quilocalorias por mol

Leu - Leucina ou L

Lis - Lisina ou K

Met - Metionina ou M

nm - Nanômetro

PDB - Protein Data Bank

Phe - Fenilalanina ou F

Pro - Prolina ou P

Ser - Serina ou S

SNC - Sistema Nervoso Central

TcAChE- Acetilcolinesterase de *Torpedo californica*

Thr - Treonina ou T

Trp - Triptofano ou W

Tyr - Tirosina ou Y

Val - Valina ou V

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE O MOSQUITO Aedes Aegypti	21
3.2 INSETICIDAS DE USO DOMÉSTICO NO BRASIL	22
3.3 A TRANSMISSÃO DOS IMPULSOS NERVOSOS E A AÇÃO DOS PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS	24
3.4 QUÍMICA COMPUTACIONAL E O PLANEJAMENTO RACIONAL DE MOLÉCULAS COM AÇÃO INSETICIDA	28
3.4.1 Modelagem Molecular	29
3.4.3 Dinâmica Molecular	30
4 METODOLOGIA	33
4.1 SELEÇÃO DAS ENZIMAS	33
4.1.1 Acetilcolinesterase Humana (HsAChE)	33
4.1.2 Acetilcolinesterase do Mosquito Aedes aegypti (AaAChE)	33
4.1.3 Alinhamento sequencial entre as enzimas AaAChE e Acetilcolinesterase do mosquito Anopheles gambiae (AgAChE)	35
4.2 SELEÇÃO DOS PESTICIDAS UTILIZADOS	35
4.3 ESTUDO DO ESTADO DE PROTONAÇÃO DOS LIGANTES	39
4.4 DESENHO E OTIMIZAÇÃO DOS LIGANTES	39
4.5 ESTIMATIVA TEÓRICA DA TOXICIDADE AOS MAMÍFEROS PARA AS MOLÉCULAS PROPOSTAS	40
4.6 OTIMIZAÇÃO DAS ENZIMAS AaAChE E HsAChE	40
4.7 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE DOCAÇÃO MOLECULAR	40
4.8 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS PARA OS CÁLCULOS DE DOCAÇÃO MOLECULAR	41
4.9 ANÁLISE DOS RESULTADOS DE DOCAÇÃO MOLECULAR	43
4.10 SIMULAÇÕES POR DINÂMICA MOLECULAR	43
4.11 ANÁLISE DE ESTRUTURAS E GERAÇÃO DE FIGURAS	45
4.12 RECURSOS COMPUTACIONAIS UTILIZADOS	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 CONSTRUÇÃO E VALIDAÇÃO DO MODELO TRIDIMENSIONAL DA AaAChE	47
5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS RESÍDUOS DO SÍTIO ATIVO DA AaAChE	48
5.3 CÁLCULO DA IDENTIDADE SEQUENCIAL ENTRE AS ENZIMAS AaAChE E AgAChE	51
5.4 ESTUDO DO ESTADO DE PROTONAÇÃO DOS LIGANTES	52

5.5 CLASSIFICAÇÃO TOXICOLÓGICA DOS PESTICIDAS E PREDIÇÃO TEÓRICA DE LD50	52
5.6 RESULTADOS DE DOCAGEM MOLECULAR	54
5.5.1 PRIMEIRA ETAPA DE CÁLCULO	55
5.5.2 Segunda etapa de cálculo	64
5.6 RESULTADOS DE DINÂMICA MOLECULAR	71
5.6.1 Resultados de DM advindos dos sistemas da primeira etapa de Docagem Molecular	72
5.6.1.1 Energia Total	72
5.6.1.2 RMSD	73
5.6.1.3 RMSF	77
5.6.1.4 Raio de Giro	80
5.6.1.5 Distância entre os centros de Massas	82
5.6.1.6 Ligações Hidrogênio	93
5.6.1.7 MM-PBSA	100
5.6.2 Resultados de DM advindos dos sistemas da segunda etapa de Docagem Molecular	105
5.6.2.1 Energia Total	105
5.6.2.1 RMSD	106
5.6.2.3 RMSF	110
5.6.2.4 Raio de Giro	112
5.6.2.5 Distância entre os centros de Massas	113
5.6.2.6 Ligações Hidrogênio	122
5.6.2.8 MM-PBSA	128
6 CONCLUSÕES	131
REFERÊNCIAS	133

1 INTRODUÇÃO

A pesquisa “Planejamento por Docagem e Dinâmica Molecular de pesticidas inibidores da Acetilcolinesterase do mosquito *Aedes aegypti*”, foi um trabalho financiado pela CAPES e desenvolvido dentro do programa de pós-graduação em Química, nível mestrado, no Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo.

O estudo *in silico* foi focado no planejamento racional de pesticidas com boa interação com a acetilcolinesterase do mosquito *Aedes aegypti* (AaAChE) e que apresentaram menor toxicidade aos seres humanos quando comparados com o inseticida organofosforado Paraoxon que é atualmente comercializado no Brasil para o controle do vetor de doenças como a dengue. Para tanto, foram utilizadas técnicas que simulam interações biológicas receptor-ligante por meio de cálculos de energia de interação, além da predição e análise de interações formadas entre as moléculas de pesticidas propostas e as enzimas em estudo.

Sabe-se que o planejamento computacional é de extrema importância no que diz respeito à diminuição do tempo de bancada e à diminuição de reagentes necessários no desenvolvimento de novas moléculas (ARAGÃO, 2011). Dessa maneira, o estudo torna-se fundamental dada a sua relevância na área de planejamento de potenciais pesticidas.

Os mosquitos da espécie *Aedes aegypti* são vetores de arboviroses como a dengue, a febre amarela urbana, a Zika e o chikungunya (BARNETT, 2007; POWELL & TABACHNICK, 2013; WEAVER & LECUIT, 2015, PETERSEN *et al*, 2016; BUENO, 2017 apud GARAYO, 2019). Estratégias de prevenção a essas doenças estão muitas vezes associadas ao uso de inseticidas domésticos que combatem os mosquitos transmissores devido ao seus mecanismos de ação. Cita-se por exemplo a proposta de Lombardi e colaboradores, em 1983 (LOMBARDI *et al.*, 1983), que já apontavam que o manuseio de inseticidas era frequentemente feito de maneira errônea por parte dos consumidores. Dessa maneira, havia uma exposição frequente a produtos que por vezes não apresentavam cheiro ou que possuíam aromas agradáveis em suas formulações, contribuindo assim para um alto índice de intoxicações por compostos presentes nas formulações químicas desses pesticidas. Em concordância com o exposto por Lombardi e colaboradores, dados mais recentes obtidos pelo Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (Sinitox), apontando que entre os anos de 2013 e 2017, foram registrados 9.013 casos de intoxicação por pesticidas domésticos no Brasil. (Fiocruz-Sinitox, 2020).

Dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2021), mostram que entre os anos 2000 e 2020, foram registrados 4051 novos agrotóxicos, componentes e afins no território brasileiro. A diversificação de fórmulas ofertadas para a comercialização é um fator que torna mais complexo a avaliação de impactos à saúde humana quando ocorre a exposição a esses produtos (LOMBARDI *et al.*, 1983). Segundo dados obtidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2012 apud FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2016), no ano de 2012 foram aprovados no âmbito da saúde pública cinco inseticidas para o controle de mosquitos adultos da espécie *Aedes aegypti*: um pertencente à classe dos organofosforados e os demais à classe dos piretróides. Entretanto, apenas um desses pesticidas, o organofosforado malation, oferecia real efeito sobre o controle dos vetores uma vez que as populações de *Aedes aegypti* do Brasil apresentam resistência aos pesticidas piretróides causada pelo uso indiscriminado durante décadas de pesticidas dessa classe como uma das principais formas de controle do vetor da dengue (IOC/Fiocruz, 2011 apud FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2016).

A atuação dos organofosforados se dá pela inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável pela transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas. Com sua inibição, a acetilcolina não é hidrolisada, fazendo com que haja uma crise colinérgica (GONÇALVES, 2005).

A AChE humana é similar à AChE do mosquito, havendo algumas diferenças, quando comparadas as sequências dos aminoácidos. A análise e o estudo dessas diferenças e a relação de estabilidade com os pesticidas é de fundamental importância pois o local de docagem molecular possui uma ligação direta com o tipo de pesticida e interações que surgem entre os aminoácidos ligantes (DOU *et al.*, 2013).

Com base no exposto, foram realizados cálculos computacionais a fim de analisar a energia de interação e os modos de ligação entre os pesticidas planejados *in silico* e os modelos tridimensionais das enzimas acetilcolinesterase do mosquito *Aedes aegypti* (AaAChE) e acetilcolinesterase do *Homo sapiens sapiens* (HssAChE).

2 OBJETIVOS

Diante da percepção de que uma maior contribuição ao planejamento de pesticidas menos nocivos à saúde humana possa ser oferecido mediante o desenvolvimento de um estudo in silico, propõe-se como objetivos geral e específicos, os itens 2.1 e 2.2.

2.1 OBJETIVO GERAL

Planejar, por docagem e dinâmica molecular, pesticidas nocivos ao mosquito *Aedes aegypti* e com baixa toxicidade aos mamíferos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

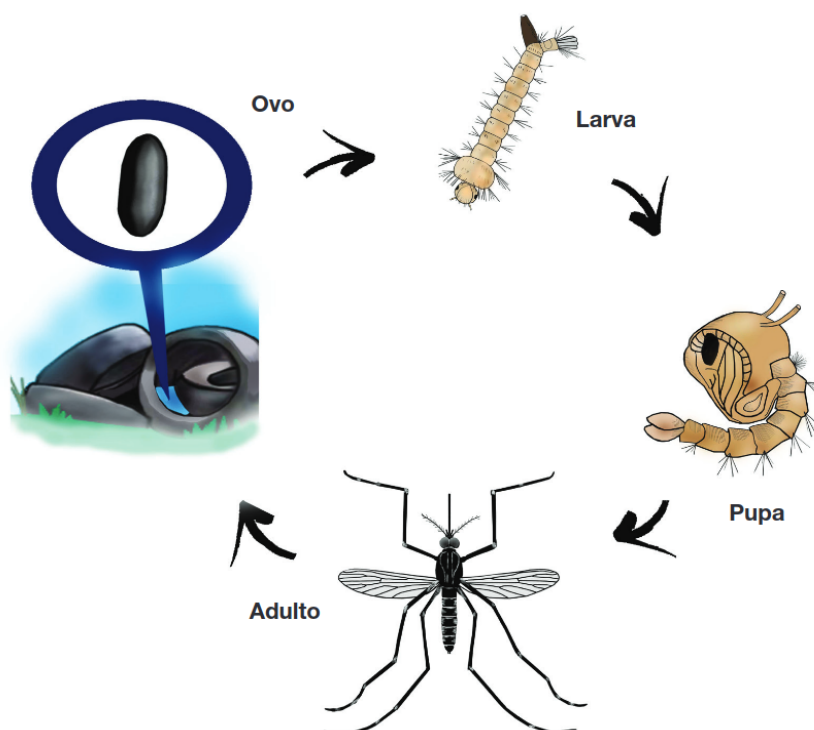
- Construir, por modelagem comparativa, o modelo tridimensional da Acetilcolinesterase do mosquito *Aedes aegypti* (AaAChE) e calcular a identidade sequencial entre as regiões do sítio ativo das enzimas acetilcolinesterase de humano (HssAChE) e AaAChE,
- Realizar cálculos de docagem molecular entre as enzimas HssAChE e AaAChE com os pesticidas propostos neste trabalho,
- Analisar as interações energéticas e conformacionais dos complexos calculados,
- Realizar simulações por dinâmica molecular dos melhores resultados de docking molecular.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE O MOSQUITO Aedes Aegypti

Em relação a classificação biológica, os mosquitos *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1792) são pertencentes ao filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Diptera, família Culicidae, gênero Aedes e espécie aegypti. Esses mosquitos medem menos de um centímetro e apresentam coloração preta ou marrom, com listras brancas no corpo e nas pernas. Em relação a reprodução, apresentam ciclo biológico dividido em quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto (figura 1). Utilizam-se preferencialmente de depósitos artificiais de água parada, limpa ou suja, para colocar seus ovos. Os ovos dessa espécie são extremamente resistentes ao ressecamento, podendo permanecer sem eclodir por um grande período de tempo (LORENZ; BREVIGLIERI e VIRGÍNIO, 2018; GARAYO, 2019).

Figura 1: Ciclo de vida comum a todos os mosquitos. O local de postura dos ovos varia de acordo com a espécie.



Fonte: (LORENZ; BREVIGLIERI e VIRGÍNIO, 2018).

Os mosquitos da espécie *Aedes aegypti* são conhecidos por transmitir arboviroses como a Dengue, a Zika e a Chikungunya no Brasil e em outros países tropicais. Além disso, são responsáveis pela transmissão do vírus da Febre Amarela Urbana (LWANDE *et. al.*, 2020).

Apresentam distribuição relacionada ao clima, ocorrendo maior abundância nas regiões tropical e subtropical do globo. Durante o verão as infestações costumam ser mais intensas, uma vez que o tempo quente e chuvoso propiciam a reprodução do mosquito em maior escala (WHO, 2009; LORENZ, BREVIGLIERI e VIRGÍNIO, 2018).

Em relação às arboviroses causadas pelo mosquito *Aedes aegypti*, pode-se citar a *Zika* que é uma doença viral aguda, que possui como características manchas vermelhas no corpo que causam muita coceira, febre, olhos avermelhados, dor nos músculos e dor de cabeça. Em relação a dengue, apresenta sintomas de febre alta, forte dor de cabeça, dor atrás dos olhos, perda de paladar e apetite, manchas e erupções na pele, náuseas e vômitos, tontura, extremo cansaço, moleza e dor no corpo, além de muita dor nos ossos. Já a *Chikungunya*, apresenta como sintomas febre alta, dores intensas nas articulações dos pés e mãos, dor de cabeça, dores nos músculos e manchas vermelhas na pele. A febre amarela apresenta sintomas como febre, dor de cabeça, náuseas e vômitos e em casos graves podem causar doenças cardíacas, hepáticas e renais fatais (LORENZ, BREVIGLIERI e VIRGÍNIO, 2018).

A fim de controlar a proliferação desses mosquitos, são utilizados alguns mecanismos de combate aos vetores como uso de telas, repelentes, limpezas e esvaziamento de reservatórios de água parada e, devido ao seu mecanismo de ação, o uso de inseticidas domésticos aparece muitas vezes como uma das estratégias de prevenção dessas doenças (LOMBARDI *et al.*, 1983; RIGOTTO, 2014; LORENZ, BREVIGLIERI e VIRGÍNIO, 2018).

3.2 INSETICIDAS DE USO DOMÉSTICO NO BRASIL

Alguns aspectos como os baixos preços, a disponibilidade e facilidade em encontrar os produtos nas prateleiras de supermercado, agravados por propagandas induzida pelos meios de comunicação do uso de inseticidas no combate a vetores de doenças, tornam os inseticidas de uso doméstico cada vez mais frequentes. Seu uso, quase sempre de forma inadequada, é estimulado por um tipo de propaganda que os apresenta como inócuos aos seres humanos (LOMBARDI *et al.*, 1983). Porém, como esses compostos são biocidas, interferem em mecanismos fisiológicos de sustentação da vida que são comuns aos seres humanos, sendo associados a uma ampla gama de danos à saúde (MIRANDA, 2007 apud RIGOTTO, 2014).

Usualmente, os pesticidas de uso doméstico são formulações classificadas como moderadas ou pouco perigosas, tendo sido os do tipo fosforados, carbamatos, piretrinas e piretróides mais encontrados. Entretanto, não é excluída a possibilidade de ocorrência de intoxicações agudas e crônicas, uma vez que os compostos são discriminados apenas em relação a sua taxa de letalidade. Esta, é considerada essencial para a classificação que versa

sobre intoxicações agudas. No entanto, o que mais ocorre no meio doméstico são as intoxicações crônicas (CASARETTI apud LOMBARDI *et al.*, 1983). Em termos gerais, as piretrinas e os piretróides sintéticos são considerados de relativa baixa toxicidade humana e de largo espectro de ação. Embora esta seja a opção menos tóxica, é mais cara, o que pode estimular o consumo de produtos mais tóxicos (LOMBARDI *et al.*, 1983).

No livro “Carbamate inseticides: Chemistry, biochemistry and toxicology” (KUHR; DOROUGH, 1976 apud LOMBARDI *et al.*, 1983) é disposto que ao contrário do que se é pensado, não são apenas os princípios ativos que causam efeitos adversos ao organismo. As misturas químicas podem potencializar os efeitos tóxicos do inseticida e os adjuvantes utilizados nas formulações como querosene, xileno, butano e butóxido de piperonila também são tóxicos, de maneira que os autores relatam que a exposição a misturas pode apresentar maior risco à saúde quando comparado a exposição a uma única substância.

A maneira mais comum de se classificar esses compostos em função de sua toxicidade é através de sua Dose Letal 50%. Este desígnio representa estatisticamente a dose ou concentração letal da substância (em mg do composto por kg de peso corpóreo) que quando administrado a um grupo determinado de animais de experimentação, obtém-se uma mortalidade de 50% da população. Porém, para os seres humanos estes valores são estimados. No caso de exposição ao vapor, a dose é dada pelo produto $C \times t$ (concentração do agente no ar $\times$ tempo de exposição) (SIDELL, 1997; THE WEDNESDAY REPORT, 2004 apud GONÇALVES, 2005).

A Tabela 1 apresenta os diferentes grupos de perigo das substâncias químicas, a dose letal de 50% comparando-as com as doses mortais, aproximadas, para o homem (OPAS/OMS, 1997).

Tabela 1: Classificação toxicológica dos agrotóxicos segundo a DL50.

Descrição	DL50 (mg/Kg)	Doses capazes de matar uma pessoa adulta
Extremamente tóxicos	= 5	1 pitada – algumas gotas
Altamente tóxicos	5-50	1 colher de chá – algumas gotas
Medianamente tóxicos	50 –500	1 colher de chá – 2 colheres de sopa
Pouco tóxicos	500-5000	2 colheres de sopa – 1 copo

Muito pouco tóxicos	5000 ou +	1 copo – 1 litro
---------------------	-----------	------------------

Fonte: (OPAS/OMS, 1997)

Os inseticidas podem ser divididos em organofosforados, organoclorados, carbamatos e piretróides. Os organofosforados são compostos absorvidos com facilidade por todas as vias: dérmica, gastrointestinal e respiratória. A absorção cutânea é a principal via de penetração deste inseticida em indivíduos que os aplicam na forma de pulverização (LOMBARDI *et al.*, 1983).

Os organofosforados foram desenvolvidos primeiramente nas décadas de 1930 e 1940 para serem utilizados como armas químicas durante a Segunda Guerra Mundial. São compostos derivados do ácido fosfórico e apresentam toxicidade aguda.

Como exemplo de composto organofosforado temos o inseticida paration que quando absorvido, sofre biotransformação, formando um metabólito ativo de nome paraoxon. Este é um inibidor da acetilcolinesterase, e causa sintomas de envenenamento (BRAIBANTE e ZAPPE, 2012; MARASCHIN, 2003).

Os organofosforados possuem como alvo a enzima acetilcolinesterase, enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina, um importante neurotransmissor. A inibição da acetilcolinesterase leva ao acúmulo do neurotransmissor nas fendas sinápticas, ocasionando uma super transmissão dos impulsos nervosos, podendo levar à morte.

Seu efeito em mamíferos, manifesta-se principalmente por lacrimejo, salivação, sudorese, diarreia, tremores e distúrbios cardiorrespiratórios. Estes últimos são decorrentes de broncoconstrição, aumento das secreções brônquicas e bradicardia, bem como de depressão do sistema nervoso central, sendo as principais causas de morbidez e mortalidade por estes produtos. (VALENTE, 2012).

3.3 A TRANSMISSÃO DOS IMPULSOS NERVOSOS E A AÇÃO DOS PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS

Para que o impulso nervoso gerado chegue ao seu destino final é necessário que o estímulo seja passado de neurônio a neurônio, o que é conhecido como sinapse nervosa.

Quando o neurônio é estimulado e o impulso nervoso é gerado, corresponde a uma corrente elétrica que caminha rapidamente no axônio até os botões sinápticos e o potencial de ação chega ao fim, encontrando fendas sinápticas. O neurônio que transmite o impulso é chamado de neurônio pré-sináptico, enquanto o que recebe, de neurônio pós-sináptico.

Basicamente, existem dois tipos de sinapses: a elétrica e a química. "Na primeira o potencial de ação pode ser transmitido diretamente para outra célula, por meio de conexões célula-célula." Já na segunda, a fenda sináptica é maior e o impulso nervoso não consegue ser transmitido diretamente para o neurônio pós-sináptico. "Assim, é necessário que proteínas, conhecidas como neurotransmissores, conduzam a mensagem neural através das sinapses." Após atravessar a fenda sináptica, os neurotransmissores ligam-se à receptores específicos na membrana plasmática do neurônio pós-sináptico. Um exemplo de neurotransmissor é a acetilcolina (THIEMANN, 2016).

A acetilcolina é o único neurotransmissor utilizado no sistema nervoso somático e um dos muitos neurotransmissores do sistema nervoso autônomo e, para que a acetilcolina exerça sua função corretamente, deverá ser hidrolisada ou inativada de acordo com as demandas de tempo para cada resposta sináptica específica pretendida, que ocorre graças a ação da enzima acetilcolinesterase. A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima responsável pela hidrólise da ACh, fazendo com que a transmissão do impulso nervoso na sinapse colinérgica seja cessada.

Para que a ACh exerça sua função corretamente, ela deve ser removida ou inativada de acordo com as demandas de tempo para cada resposta sináptica específica pretendida. A AChE, por sua vez, possui uma alta eficiência catalítica (SILMAN, 2005 apud PETRONILHO, PINTO & VILLAR, 2011). Esta enzima possui um sítio ativo onde existem três resíduos principais de aminoácidos que estão envolvidos diretamente no processo de hidrólise da ACh. (Sussman, 1991 apud Petronilho, Pinto & Villar, 2011).

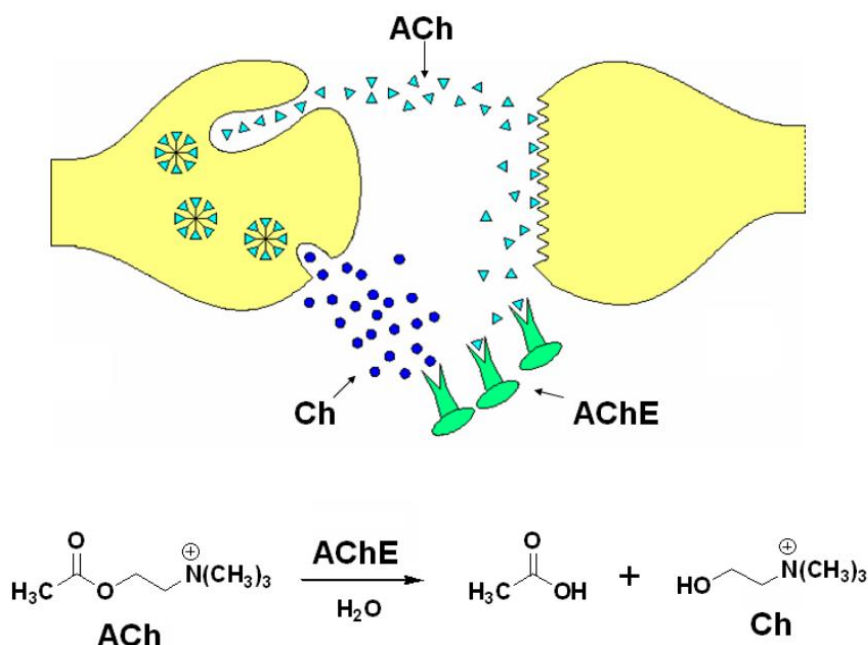
A figura 2 mostra um esquema de uma sinapse química, onde basicamente ocorre a síntese da acetilcolina no neurônio pré sináptico, sendo este englobado por uma vesícula e transportado até a fenda sináptica. Neste local a acetilcolina é transmitida ao neurônio pós sináptico, ocorrendo a transmissão do impulso nervoso. Na sequência, a enzima acetilcolinesterase hidrolisa a acetilcolina a colina e acetato. Então a colina é transportada por um transportador de colina para sintetizar acetilcolina a partir da reação com a acetilcoenzima A.

Os pesticidas organofosforados atuam no sistema nervoso central (SNC), inativando a enzima acetilcolinesterase (AChE), através da interação do seu grupo fosfato com o resíduo de serina presente no sítio ativo da AChE. Esta interação altera a configuração da enzima, impedindo seu funcionamento.

Com a inibição da acetilcolinesterase, a acetilcolina não é hidrolisada, fazendo com que haja uma crise colinérgica pelo acúmulo na fenda sináptica ou na junção neuromuscular, fazendo com que ocorra uma estimulação excessiva dos receptores colinérgicos (HOLSTEGE

e DOBMEIER, 2005). Dessa forma, a contração muscular não cessa, tendo como consequência, convulsões, vômito, batimento cardíaco irregular seguido de uma parada respiratória central com morte (GONÇALVES, 2005).

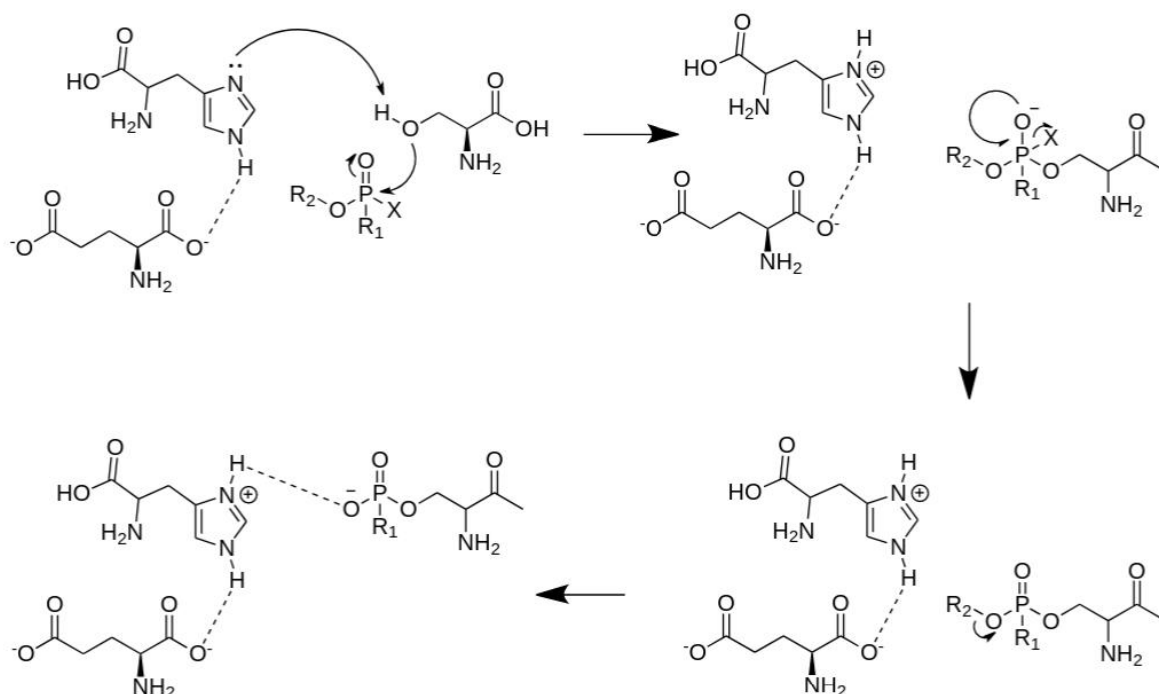
Figura 2: Transmissão neuronal da acetilcolina e sua hidrólise por AChE.



Fonte: PETRONILHO e FIGUEROA-VILLAR, 2014.

A figura 3 mostra um esquema de inibição e de envelhecimento da acetilcolinesterase por pesticidas organofosforados. Inicialmente, o átomo de fósforo do organofosforado liga-se ao átomo de oxigênio do aminoácido Ser203, formando uma ligação covalente. Para tanto, a ligação dupla entre o fósforo e o oxigênio do organofosforado transforma-se em uma ligação simples, onde o átomo de oxigênio passa a ficar com uma carga negativa. Na sequência, o átomo de nitrogênio da histidina 501 abstrai o hidrogênio da serina. É então formado um intermediário, onde o átomo de fósforo realiza cinco ligações simples. Ocorre a movimentação do elétron do oxigênio no sentido de retomar a ligação dupla entre oxigênio e fósforo, sendo liberado concomitantemente um grupo de saída X, sendo obtida a enzima inibida. Na sequência, ocorre a desalquilação da forma fosforilada, ocorrendo a formação de interação por contato polar com a histidina protonada, sendo obtida a forma envelhecida da enzima acetilcolinesterase.

Figura 3: Esquema da inibição e envelhecimento da AChE por organofosforados.



Fonte: o autor.

Segundo Smith 1962 e Orborne, 1962, citados por Freitas, 2017, “o sistema nervoso de insetos é formado pelo sistema nervoso central e pelo sistema nervoso periférico, que acompanha o sistema digestivo do animal.” (SMITH 1962; ORBORNE 1996 *apud* FREITAS, 2017). Freitas relata que no sistema de neurotransmissores utilizados pelos insetos, se faz presente a acetilcolina, além de amins biogênicas. Dessa maneira, a enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina também está presente nos insetos. Assim, a utilização de pesticidas afeta não somente os insetos, mas também a saúde humana, uma vez que a acetilcolinesterase é um alvo comum nas duas espécies, podendo gerar problemas causados pela interação com essa enzima.

Levando em consideração que as enzimas acetilcolinesterase humana e de mosquito apresentam diferenças na sequência primária proteica, o planejamento de pesticidas que interajam de maneira seletiva com a acetilcolinesterase de mosquito faz-se necessária a fim de reduzir os prejuízos causados aos humanos pela utilização de pesticidas. Para tanto, o planejamento racional de novas moléculas pode ser realizado com o auxílio de ferramentas computacionais como o docagem molecular e a dinâmica molecular.

3.4 QUÍMICA COMPUTACIONAL E O PLANEJAMENTO RACIONAL DE MOLÉCULAS COM AÇÃO INSETICIDA

O estudo de biomoléculas por métodos computacionais demonstra ser de relativo baixo custo e fornece resultados de alta qualidade. Para tanto, são utilizadas ferramentas computacionais que permitem estudos de predição de interação receptor-ligante, planejamento racional de moléculas com potencial farmacológico, bem como um melhor entendimento de funções específicas de biomoléculas e processos biológicos. (CAPRILES, *et al.*, 2010 *apud* FREITAS, 2017)

Um dos primeiros trabalhos publicados que relacionam a biodisponibilidade oral de um determinado composto com suas propriedades físico-químicas foi escrito por Lipinski e colaboradores em 1997. (LIPINSKI *et. al*, 1997) Neste trabalho, foram analisados quatro parâmetros físico químicos associados com medidas de permeabilidade de 2245 fármacos que apresentavam índices de absorção e permeabilidade condizentes a uma boa biodisponibilidade oral. Os parâmetros utilizados foram massa molecular do composto, coeficiente de partição octanol/água, número de átomos doadores de ligação de hidrogênio e número de átomos aceptores de ligação de hidrogênio. (PICCIRILLO e AMARAL, 2018) Os resultados reportaram que aproximadamente 90% das moléculas em estudo apresentaram parâmetros dentro de um valor de corte, que foram então denominados de “Regra dos 5”, tendo como referência os valores de massa molecular maior ou igual a 500 g/mol, coeficiente de partição inferior ou igual a cinco, número de átomos doadores de ligação hidrogênio inferior ou igual a cinco e número de aceptores de ligação hidrogênio inferiores ou igual a 10.

Dos compostos analisados, 10% apresentaram apenas dois dos parâmetros fora da Regra dos 5. Assim, foi sugerido que moléculas que apresentassem dois dos parâmetros fora da Regra dos 5 ($MM \leq 500$; $ClogP \leq 5$, $HBD \leq 5$ e $HBA \leq 10$) não apresentariam boa biodisponibilidade oral. (PICCIRILLO e AMARAL, 2018)

Derivada da regra de Lipinski, foi proposta a Regra de Tice que é uma regra aplicada aos inseticidas. Ela utiliza outros valores para os parâmetros usados por Lipinski e adiciona um novo parâmetro: o número de ligações com livre rotação (RTB), conforme segue:

$$150 \geq MM \leq 500; 0 \geq alogP^* \leq 6,5; HBD \leq 2; 1 \geq HBA \leq 8 \text{ e } RTB^{**} \leq 12$$

Ao planejar uma molécula com ação inseticida, o objetivo principal está em encontrar uma proposta que interage de maneira específica com o alvo molecular de interesse. Para tanto,

ferramentas da química computacional como modelagem comparativa, docagem molecular, dinâmica molecular, estimativa de toxidez das moléculas e outras ferramentas são de fundamental importância. (PICCIRILLO e AMARAL, 2018)

3.4.1 Modelagem Molecular

A Modelagem Molecular compreende um número de ferramentas e métodos computacionais e teóricos que tem como objetivo entender e prever o comportamento de sistemas reais. Também é usado para descrever e prever estruturas moleculares, propriedades do estado de transição e equilíbrio de reações, propriedades termodinâmicas, entre outras (NOVAES & SCOTT, 2009).

A técnica computacional de Modelagem Comparativa possibilita a criação de modelos tridimensionais completos de proteínas, sem que haja quebras na estrutura ou fragmentos faltando. É utilizada como molde a sequência primária da proteína que se quer modelar e a partir de um banco de dados, é realizada uma busca por fragmentos de proteínas homólogas que possam servir para a criação do modelo 3D completo. (FERREIRA, 2018)

Basicamente, identifica-se o molde e é realizado um alinhamento de sequências de aminoácido no formato FASTA, gerando coordenadas do modelo no formato pdb. A otimização e validação do modelo são necessárias, além de análises estatísticas da qualidade do modelo criado.

Para um resultado ser considerado de boa qualidade em relação ao alinhamento sequencial, é necessária a existência de uma boa similaridade com o molde (acima de 35%) (HIGGINS, 2001 *apud* GONÇALVES, 2005; SACCONNAY *et al.*, 2014)

Esse tipo de técnica consegue resolver casos onde não se tem um estudo por cristalografia e difração de raios X do alvo a ser estudado, desde que o modelo criado seja submetido a algum tipo de refinamento como dinâmica molecular, a fim de garantir robustez ao modelo. (KRUGUER *et al*, 2018 *apud* FERREIRA, 2018)

3.4.2 Docagem Molecular

A docagem molecular pode ser descrita como um problema de otimização, cujo objetivo consiste prever a orientação do ligante em relação ao receptor quando ligados quimicamente, formando um complexo energeticamente estável (GODOY *et al.*, 2015).

A ferramenta de docagem molecular é comumente utilizada no processo de planejamento de novas moléculas, apresentando dois objetivos principais: a predição de conformação e a afinidade de ligação (NAMBA, DA SILVA E DA SILVA, 2008), sendo uma

elucidação preliminar para o mecanismo receptor-ligante o modelo chave-fechadura proposta por Fischer (1894), em que o ligante se encaixa no receptor como uma chave na fechadura. Esse mecanismo tem por finalidade a previsão dos modos de interação entre duas moléculas conhecendo apenas suas estruturas tridimensionais isoladas, onde os primeiros métodos relatados foram baseados nesta teoria, em que, tanto o ligante quanto o receptor eram tratados como corpos rígidos. Existem diferentes abordagens em relação à flexibilidade ou rigidez do complexo receptor-ligante. Entretanto, normalmente a proteína é considerada rígida enquanto o ligante permanece flexível, sendo explorados seus graus de liberdade rotacional, translacional e conformacional. (de PAULA, 2014)

O programa AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2010) é uma ferramenta open-source para realização de docagem molecular e triagem virtual que fornece uma função de energia a fim de prever conformações para o complexo proteína-ligante. Esse programa foi o software escolhido para realizar os cálculos de docagem molecular deste trabalho, uma vez atinge uma maior velocidade de cálculo quando comparado com o AutoDock 4 que é alcançada a partir do paralelismo em máquinas multicore. Leonhart (2019), cita em sua dissertação que “em seu desenvolvimento diversos algoritmos foram testados, entre eles GA, PSO e SA, até se chegar no algoritmo de busca local iterada (ILS - Iterated local search algorithm) (LOURENÇO; MARTIN; STÜTZLE, 2003).”

Nos cálculos de docagem molecular realizados neste trabalho, o receptor foi tratado como rígido e os ligantes flexíveis.

3.4.3 Dinâmica Molecular

Dinâmica molecular é uma técnica com a qual se estudam os movimentos em um sistema de partículas por simulação. Ela pode ser empregada em sistemas macromoleculares, movimento de proteínas e de outros biopolímeros, ao longo do tempo (BRUCCOLERI; KARPLUS, 1990; MARK, 2000 apud GONÇALVES, 2005).

Nesta técnica, o ligante e o receptor estudados são considerados flexíveis ao longo da simulação. Além disso, são incorporadas moléculas de solvente nas simulações, permitindo entender o efeito da água sobre a estabilidade dos complexos estudados. (NAMBA, DA SILVA E DA SILVA, 2008)

Simulações por Dinâmica Molecular têm sido rotineiramente utilizadas no processo de planejamento de moléculas bioativas. Sua finalidade está na investigação das interações que surgem entre os complexos formados do alvo molecular e as estruturas em estudo.

A mecânica clássica é utilizada como fundamentação metodológica, uma vez que a simulação por dinâmica molecular é dependente do tempo e dos átomos que compõem o sistema para compreender o comportamento dinâmico do sistema a ser estudado. Além disso, baseia-se na dinâmica molecular, uma vez que as moléculas são consideradas um conjunto de átomos unidos por forças atômicas, cuja interação é determinada por energias potenciais. Dessa forma, a energia total do sistema pode ser calculada a partir da soma das contribuições das energias (MORI *et al.*, 2016 apud FERREIRA, 2018), conforme a equação 1:

$$(Eq. 1) \quad E_{total} = \sum_{i=1}^{i=n} E_{est} + \sum_{i=1}^{i=n} E_{ang} + \sum_{i=1}^{i=n} E_{vdW} + \sum_{i=1}^{i=n} E_{1,4} + \sum_{i=1}^{i=n} E_{elet} + \sum_{i=1}^{i=n} E_{tors}$$

Onde E_{total} representa a soma dos termos de energia; E_{est} representa a energia de estiramento da ligação em relação ao valor de equilíbrio; E_{ang} representa a energia de deformação angular; E_{vdW} representa a energia das interações de van der Waals; $E_{1,4}$ representa a energia de interações não ligadas do tipo 1-4; E_{elet} é a energia de atração ou repulsão entre duas cargas eletrostáticas e E_{tors} corresponde à deformação torsional.

As forças que agem sobre cada átomo do sistema são provenientes das contribuições das interações entre os átomos ligados e não ligados (BRUCCOLERI, KARPLUS, 1990; MORI *et al.*, 2016 apud FERREIRA, 2018) e podem ser obtidas pela equação 2.

$$(Eq. 2) \quad F_i(t) = m_i a_i$$

Onde F_i representa a força exercida em cada átomo no tempo t ; m_i representa a massa do átomo; a_i representa a aceleração.

É chamado de campo de forças, o conjunto de interações que descrevem as contribuições das forças dos átomos do sistema simulado por DM. Há vários tipos de campos de forças e o utilizado neste trabalho foi o OPLS-AA (*Optimized Potential for Liquid Simulations All Atoms*).

Com o campo de forças definido, é possível calcular as forças que atuam em cada átomo, conforme equação 3, onde ocorre a derivada da energia potencial (V) em relação às posições dos átomos (r).

$$(Eq. 3) \quad F_i(t) = -dV(r_i)$$

$$(Eq. 4) \quad r(t + \Delta t) = 2r(t) - r(t - \Delta t) + a(t) \Delta t^2$$

A partir da derivação da equação que calcula a aceleração da partícula obtém-se as velocidades. O cálculo das velocidades ao longo do tempo, possibilita o cálculo das posições atômicas a cada instante. (KARPLUS, PETSKO, 1990 *apud* FERREIRA, 2018) A partir das posições e velocidades obtidas de cada átomo, calcula-se a energia potencial e a cinética do sistema. Aplicando este processo repetidamente e consecutivamente, obtém-se a trajetória do sistema. (BRUCCOLERI, KARPLUS, 1990 *apud* FERREIRA, 2018)

4 METODOLOGIA

4.1 SELEÇÃO DAS ENZIMAS

4.1.1 Acetilcolinesterase Humana (*HssAChE*)

O modelo da enzima acetilcolinesterase humana (*HssAChE*) utilizada neste estudo foi cedido pelo professor Dr. Arlan da Silva Gonçalves. A modelagem da enzima acetilcolinesterase humana se deu em conformidade com o disposto por GONÇALVES (2005), onde a estrutura cristalográfica obtida no banco de dados Protein Data Bank foi a de código 1B41. Também foi utilizada a estrutura de um precursor da acetilcolinesterase humana, conhecido pelo código P22303 no servidor ExPASy (GASTEIGER, 2003 *apud* GONÇALVES, 2005).

Ao realizar o download do modelo de código 1B41, o autor observou a presença de um ligante docado à proteína. Esse ligante foi a fasciculina-II que teve suas coordenadas retiradas do arquivo obtido inicialmente. Em seguida foi observado que entre os aminoácidos Pro492 e o Pro495 e entre os aminoácidos Pro258 e Asn265 haviam duas alças incompletas, uma vez que não haviam sido determinadas pela técnica de cristalografia e difração de Raios-X no modelo proposto. Assim, de maneira a obter a sequência de aminoácidos dessas alças por modelagem comparativa, foi utilizado o programa Swiss-PdbViewer para realizar uma sobreposição entre a sequência de aminoácidos do precursor da *HssAChE* e o modelo de código 1B41, já sem as coordenadas da fasciculina-II.

O melhor alinhamento sequencial se deu entre os resíduos iniciais Asp36 da sequência do precursor e Asp5 da *HssAChE*, finalizando com os resíduos Thr574 do precursor e Thr543 da *HuAChE*, respectivamente. A validação do modelo criado foi realizada utilizando um diagrama de Ramachandran utilizando o servidor ProCheck.

A identificação dos aminoácidos do sítio ativo da enzima *HssAChE* foi descrita por Gonçalves (2005), tendo sido realizado uma modelagem comparativa da acetilcolinesterase do peixe elétrico *Torpedo californica* da família *Torpedinidae* com a *HssAChE*, utilizando o Swiss-PdbViewer (GUEx e PEITSCH0, 1997) uma vez que a *TcAChE* possui todos os resíduos do sítio ativo elucidados (KOELLNER, 2000, *apud* GONÇALVES, 2005).

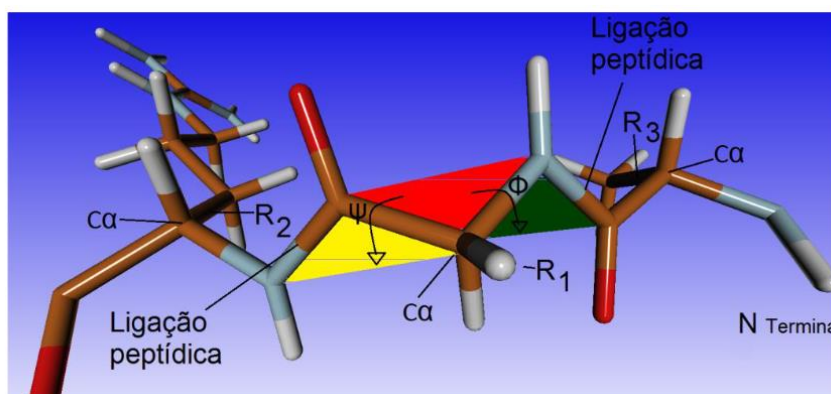
4.1.2 Acetilcolinesterase do Mosquito *Aedes aegypti* (*AaAChE*)

Uma vez que não há disponível em banco de dados um modelo tridimensional da enzima do mosquito, foi realizada a construção do modelo por modelagem comparativa. A obtenção da sequência primária completa da enzima acetilcolinesterase do mosquito *Aedes*

aegypti foi encontrada no servidor uniprot.org pelo código Q9TX11 e foi submetida ao servidor Swiss Model Server. Foram utilizados 50 modelos para a criação da estrutura tridimensional da enzima acetilcolinesterase de mosquito que apresentou 69,96% de identidade sequencial com a acetilcolinesterase de *Drosophila melanogaster* (código 1QO9). A literatura descreve um valor acima de 30% de identidade sequencial entre a proteína molde e a proteína alvo como sendo aceitável para proteínas que apresentam 60 aminoácidos ou mais na sequência molde. Desta maneira, o modelo tridimensional completo da AaAChE criado por modelagem comparativa apresentou valores aceitáveis de identidade sequencial com o molde utilizado.

A fim de estimar a qualidade do modelo criado, foram utilizados parâmetros de avaliação do próprio servidor SWISS-MODEL e posteriormente, foi plotado um diagrama de Ramachandran (RAMACHANDRAN, 1968) a fim de avaliar a sua qualidade estereoquímica. Esse tipo de diagrama consiste na disposição, em um plano, dos pares de valores assumidos pelos ângulos diedros ψ e ϕ . Os ângulos de torção ψ e ϕ descrevem a orientação relativa dos planos peptídicos, conforme demonstrado na figura 4.

Figura 4: Ilustração dos ângulos diedros ψ e ϕ em uma cadeia tripeptídica. Imagem gerada pelo programa GMOLDEN, versão 5.0 (SCHAFTENAAR e NOORDIK, 2000) e adaptado por Silveira, 2018.



Fonte: Imagem gerada pelo programa GMOLDEN, versão 5.0 (SCHAFTENAAR e NOORDIK, 2000) e adaptado por SILVEIRA, 2018.

Certos pares de valores ψ e ϕ não podem ser assumidos uma vez que provocam impedimento estérico na proteína. No diagrama essa região é conhecida como região não permitida. Observa-se que os aminoácidos Glicina e Prolina possuem uma maior região acessível no diagrama, uma vez que o primeiro não apresenta cadeia lateral e o segundo é o único aminoácido capaz de realizar conformações cis e trans.

No Diagrama de Ramachandran, cada ponto representa um aminoácido e estes estão dispostos em regiões descritas como “mais favoráveis, adicionalmente permitidas,

generosamente permitidas e regiões não permitidas.” (RAMACHANDRAN, 1968 *apud* GONÇALVES, 2005)

Na sequência, foi realizado um alinhamento sequencial entre as enzimas *HssAChE* e *AaAChE*, utilizado o software Swiss-PdbViewer (GUEX, 1997), a fim de que, por modelagem comparativa entre os modelos, fosse determinado os resíduos do sítio ativo da enzima do mosquito.

4.1.3 Alinhamento sequencial entre as enzimas *AaAChE* e Acetilcolinesterase do mosquito *Anopheles gambiae* (*AgAChE*)

Com o intuito de observar a identidade sequencial entre as regiões do sítio ativo das proteínas das duas espécies, foi realizado um alinhamento sequencial, com posterior cálculo de identidade. Conhecendo as mutações presentes nas enzimas *AaAChE* e *AgAChE*, pode-se observar que os pesticidas que apresentam seletividade para uma espécie não necessariamente apresentarão para a outra, de maneira que após os cálculos de docagem molecular com os pesticidas estudados neste trabalho, pode-se justificar os resultados obtidos.

4.2 SELEÇÃO DOS PESTICIDAS UTILIZADOS

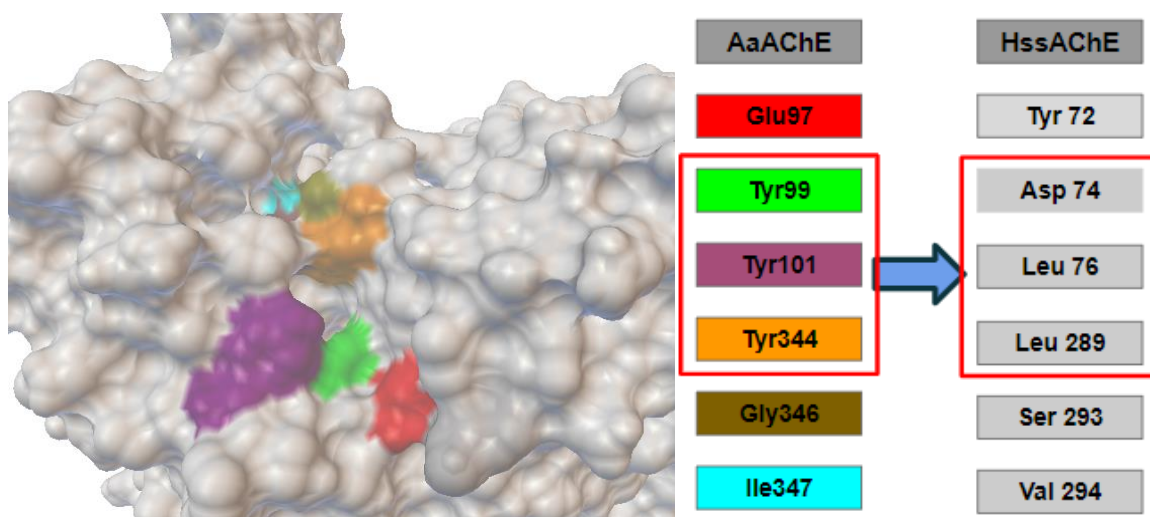
Dou e colaboradores, 2003, em trabalho intitulado “Novos inibidores seletivos e irreversíveis da acetilcolinesterase do mosquito para o controle da malária e outras doenças transmitidas por mosquitos” (DOU *et al*, 2013), realizaram o planejamento de seis pesticidas que interagem com mutações presentes na acetilcolinesterase do mosquito *Anopheles gambiae* e que não estavam presentes na acetilcolinesterase humana. A mutação relatada pelos autores foi de um aminoácido localizado na região da entrada do sítio ativo das enzimas, de número 286, sendo uma cisteína na enzima do mosquito *Anopheles* e uma fenilalanina na enzima humana. Os pesticidas utilizados no estudo foram o PM18, PM20, PMS20, PY18, PY20 e PYS18 (FIGURA 6). No trabalho em questão, foram reportados resultados experimentais e teóricos que indicaram que os seis pesticidas propostos inibem seletivamente a enzima do mosquito *Anopheles*. De acordo com os autores, a inibição irreversível foi indicada pela inibição enzimática progressiva ao longo do tempo, enquanto a inibição enzimática reversível foi evidente a partir de uma inibição constante ao longo do tempo. Dessa maneira, os resultados experimentais demonstraram que os pesticidas PY18 e PM20 inibem irreversivelmente a enzima de mosquito *Anopheles gambiae*, mas não a humana. Além disso, o inibidor de controle paraoxon inibiu irreversivelmente ambas as enzimas.

Quando comparadas as regiões do sítio ativo da proteína acetilcolinesterase do mosquito *Anopheles gambiae*, de código 2AZG no protein data bank, e o sítio ativo da enzima acetilcolinesterase do mosquito *Aedes aegypti* proposta neste trabalho, são observadas 28,94% de mutações, sendo que a mutação descrita no aminoácido de número 286 não ocorre na enzima do mosquito do gênero *Aedes*. Dessa maneira, a fim de verificar se os pesticidas propostos por Dou e colaboradores também apresentam seletividade a AaAChE, foram realizadas cálculos de docagem molecular entre os pesticidas e as enzimas HssAChE e AaAChE selecionadas previamente.

A fim de observar possíveis alterações na lipofilicidade dos compostos, foram alterados os tamanhos das cadeias carbônicas dos dois melhores resultados experimentais reportados por Dou e colaboradores, de maneira que foram propostas deste trabalho os compostos PM16, PM22, PM24, PY14, PY20 e PY22. Para efeito de comparação, foi utilizado o Paraoxon com a finalidade de obter resultados de pesticidas menos tóxicos aos seres humanos e que apresentem boa interação com a enzima AaAChE.

Ao observar as mutações na região do sítio ativo das enzimas HssAChE e AaAChE, foi realizado o mapeamento dos aminoácidos diferentes que estão localizados na região da entrada do sítio ativo para que a partir das características desses aminoácidos fossem planejadas modificações nos pesticidas, de maneira que estes interajam de maneira seletiva com os resíduos presentes na entrada do sítio ativo da AaAChE. A figura 5 mostra as mutações presentes na região da entrada do sítio ativo da enzima AaAChE.

Figura 5: Mutações na região da entrada do sítio ativo da AaAChE.



Fonte: o próprio autor

Existem três tirosinas (Tyr99, Tyr101 e Tyr344) localizadas na entrada do sítio ativo da enzima AaAChE. Esses aminoácidos apresentam caráter polar que se contrapõe ao caráter apolar da Leucina (Leu76 e Leu289), presente na região da entrada do sítio ativo da HssAChE.

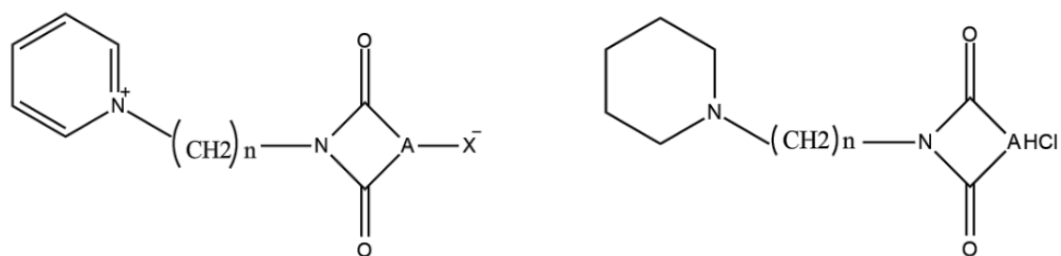
Após observar as mutações presentes na entrada do sítio ativo da enzima AaAChE, foram planejadas alterações por adição de grupos farmacofóricos nos pesticidas propostos com a finalidade de obter propostas que interajam de maneira seletiva com a enzima AaAChE. Dessa maneira, foram planejadas as seguintes moléculas: PROP1, PROP2, PROP3, PRO4, PROP5 e PROP6 (Figura 7).

Essas propostas foram desenhadas de maneira que as moléculas apresentassem um maior volume quando comparadas com as estruturas iniciais propostas por Dou e colaboradores. Assim, ao interagirem com a região da entrada do sítio ativo das enzimas, pudessem interagir como “rolhas”, fechando o acesso a região do poço do sítio ativo, inativando a enzima AaAChE.

Como referência, foram utilizados os livros “Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos”, 3ª edição de Barreiro e Fraga, publicado em 2015 e o livro publicado na *Royal Society of Chemistry*, intitulado “*Metabolism, Pharmacokinetics and Toxicity of Functional Groups: Impact of Chemical Building Blocks on ADMET*” editado por Dennis A. Smith em 2010. Ainda, foi utilizado o artigo “*In-Silico Drug discovery approach targeting receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 for cancer treatment*” dos autores Nath, Singh e Singh, publicado na revista *Nature* em 2017.

As fórmulas moleculares dos compostos propostos no presente trabalho estão dispostas nas figuras 6 e 7.

Figura 6: Fórmula estrutural plana dos pesticidas PMn, PMSn, PYn e PYSn.

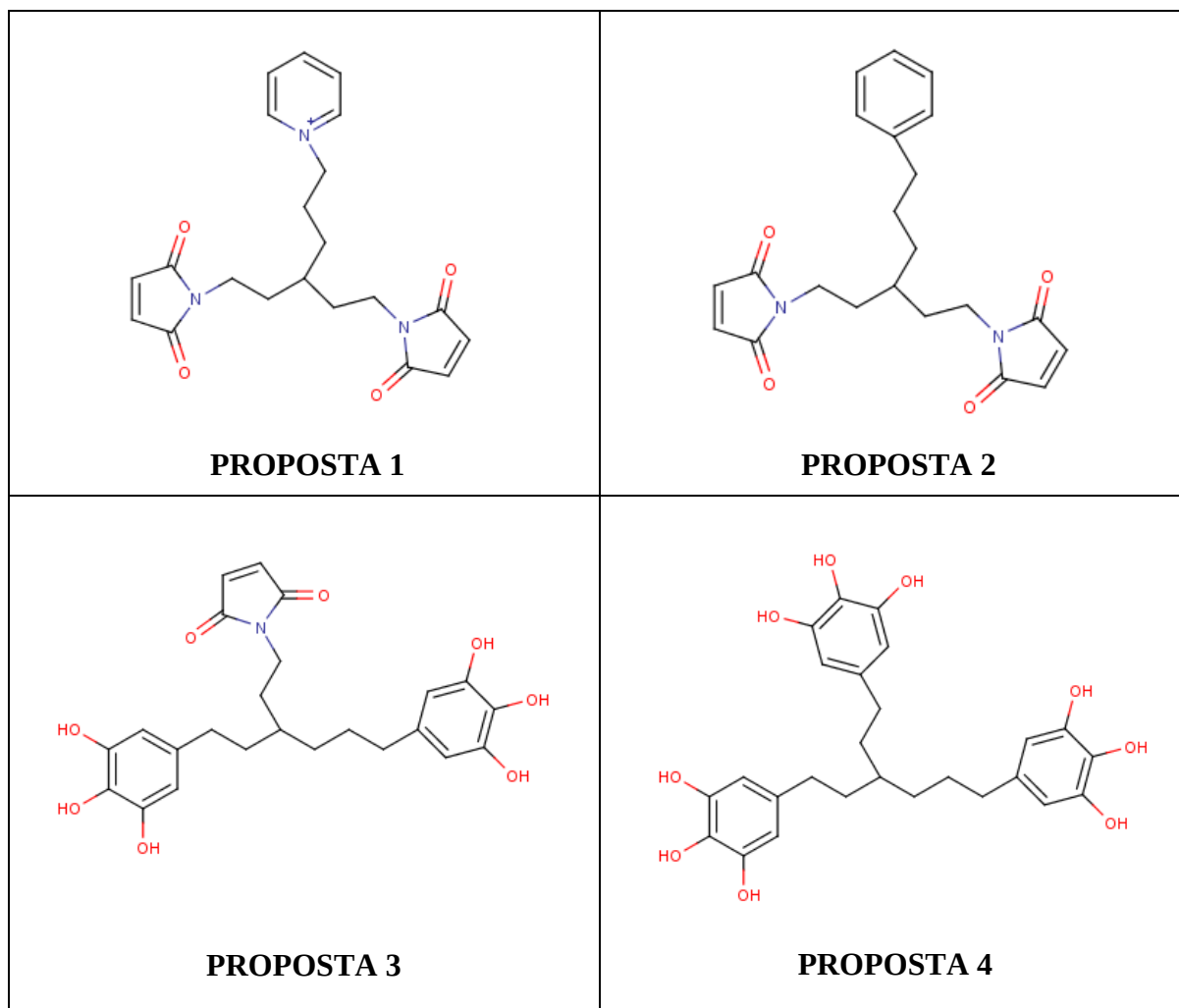


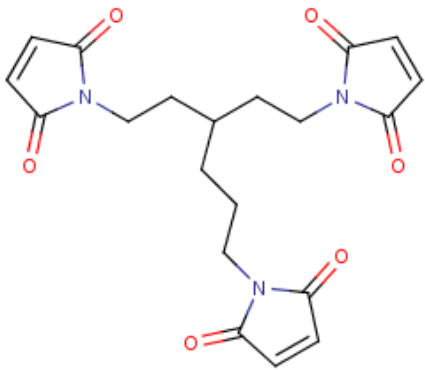
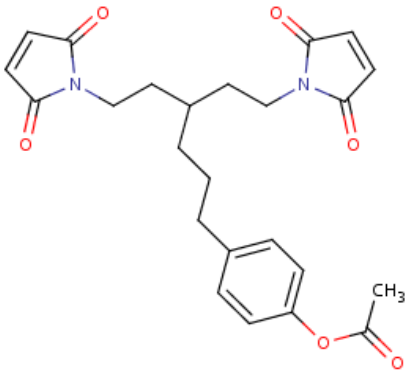
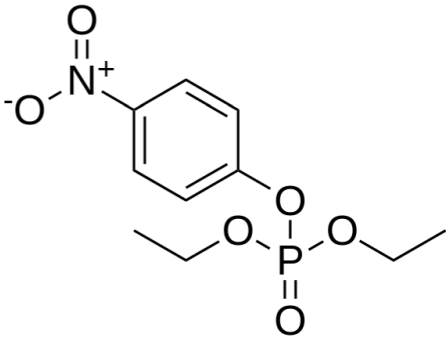
PMn: A = -CH=CH-; X = Br; n = 16, 18, 20, 22 ou 24.
PMSn: A = -(CH₂)₂-; X = TFA; n = 20

PYn: A = -CH=CH-; n = 14, 16, 18, 20 ou 22
PYSn: A = -(CH₂)₂-; n = 18

Fonte: DOU *et al*, 2003 adaptada pelo autor.

Figura 7: Fórmula estrutural plana dos pesticidas propostos a partir da adição de grupos farmacofóricos: Propostas 1 a 6 e Paraoxon.



 PROPOSTA 5	 PROPOSTA 6
 Paraoxon	

4.3 ESTUDO DO ESTADO DE PROTONAÇÃO DOS LIGANTES

O correto estado de protonação dos ligantes em pH fisiológico foi verificado com o auxílio do programa MarvinSketch 19.11 (ChemAxon, 2019).

4.4 DESENHO E OTIMIZAÇÃO DOS LIGANTES

Para o desenho tridimensional dos pesticidas, foi utilizado o programa GHEMICAL (Hassinen *et al.*, 2001) e o campo de forças Tripos-5.2 (SHIH *et al.*, 1995) de forma a colocar as estruturas com distâncias entre os átomos, ângulos e diedros o mais próximo possível do experimental, com uma limitação da mecânica clássica, onde os átomos são considerados como massas e as ligações como pequenas molas. Foram realizadas otimizações geométrica e conformacional randômica também com o software Ghemical utilizando o mesmo campo de forças. Em seguida foram realizadas otimizações semi-empíricas utilizando o método PM7 (Parametric Method 7) (STEWART, 2016) com o programa MOPAC (Stewart, 2007).

Ao arquivo dos ligantes no formato .pdb, adicionou-se cargas AM1-BCC (Jakalian *et al.*, 2000), utilizando o programa Chimera que em seguida foi salvo no formato .mol2. Por fim, foi utilizado o programa AutoDock Tools para que fosse determinada as partes rígidas e móveis das moléculas, além das coordenadas atômicas e cargas parciais, obtendo o arquivo no formato .pdbqt para posterior cálculo de docagem molecular com o AutoDock Vina.

4.5 ESTIMATIVA TEÓRICA DA TOXICIDADE AOS MAMÍFEROS PARA AS MOLÉCULAS PROPOSTAS

Foi realizada a estimativa da toxicidade dos pesticidas propostos utilizando o servidor ProTox-II. Como forma de comparação, foi utilizado o Paraoxon. Foram obtidos valores de LD50 para cada um dos compostos, bem como observada a capacidade mutagênica e carcinogênica dos compostos.

4.6 OTIMIZAÇÃO DAS ENZIMAS AaAChE E HssAChE

Utilizando o programa AutoDock Tools, adicionou-se os hidrogênios polares aos arquivos das proteínas HssAChE e AaAChE no formato .pdb. Então, foram computadas as cargas Gasteiger e os arquivos foram salvos no formato .pdbqt que além de armazenar as coordenadas atômicas, apresenta as cargas parciais e os parâmetros de solvatação para cada átomo da proteína.

4.7 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE DOCAGEM MOLECULAR

Foram realizados o redocking do ligante FP1 no cristal de código 5HFA e o do ligante HI-6 no cristal 5HF9 de forma a validar o protocolo utilizado. Para tanto, foi baixado o arquivo de coordenadas .pdb das proteínas mencionadas no banco de dados Protein Data Bank, foi realizada a remoção manual dos ligantes e dos demais monômeros a fim de obtermos apenas um monômero de cada proteína. Na sequência, foram preparadas as proteínas adicionando-se os hidrogênios polares e cargas Gasteiger, sendo então salvas no formato .pdbqt.

Aos ligantes que foram salvos na etapa anterior, foi realizada a adição de hidrogênios com o programa Avogadro e então os arquivos foram salvos para posterior comparação com os resultados de docagem obtidos. Na sequência, foram preparados os arquivos dos ligantes para cálculo de docagem sendo os ligantes otimizados com o método semi empírico PM7. Posteriormente, foi realizada a adição de cargas AM1-BCC (Jakalian *et al.*, 2000) com o

programa Chimera. Por fim, com o programa AutoDock Tools, foram determinadas as partes rígidas e móveis das moléculas, obtendo-se arquivos no formato .pdbqt.

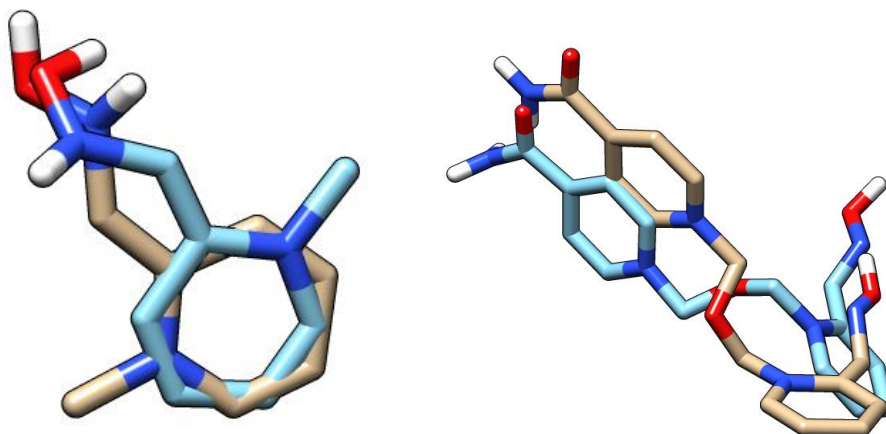
Foram selecionados os parâmetros do grid box com o programa AutoDock Tools, sendo que para a proteína 5HFA, as coordenadas centrais foram $x = -9.502$, $y = -42.740$, $z = 28.027$ e tamanho das coordenadas $x = 40$, $y = 40$ e $z = 40$. Já para a proteína 5HF9, os parâmetros do grid foram coordenadas centrais $x = -14.451$, $y = -40.704$, $z = 31.049$ e o tamanho das coordenadas $x = 40$, $y = 40$ e $z = 40$.

Foi realizada uma simulação com 20 repetições de docagem, exaustividade igual a 16, número de modos de ligação igual a 20, sendo utilizado 4 CPUs para realização do cálculo.

Os melhores resultados de simulação foram selecionados com o auxílio do programa vinascreengettop. Por fim, para cada uma das proteínas, as coordenadas do cristal e do melhor resultado de docagem foram abertas utilizando o programa Chimera. Foi realizado o cálculo do RMSD, obtendo valor igual a 2,232 Angstroms para o FP1 e 2,715 para o HI6.

Os resultados obtidos validam a metodologia adotada, uma vez que apresentou valores de RMSD abaixo de 3 Angstroms. O alinhamento da estrutura pode ser observado na figura 8.

Figura 8: A esquerda, redocking do ligante FP1 na proteína de código 5HFA (RMSD 2,232 Angstroms) e a direita, redocking do HI6 na proteína de código 5HF9 (RMSD 2,715).



Fonte: o próprio autor.

4.8 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS PARA OS CÁLCULOS DE DOCAGEM MOLECULAR

Foi realizado o alinhamento sequencial das proteínas *AaAChE* e *HssAChE* com o programa Swiss Pdb Viewer, obtendo-se um RMSD de 1,12 Angstroms. Na sequência, os arquivos de coordenada das enzimas foi aberto com o programa Autodock Tools, sendo

selecionados os aminoácidos do sítio ativo das proteínas, previamente definidos por modelagem comparativa. A representação utilizada na seleção desses aminoácidos foi a esfera de van der Waals, a fim de que o volume atômico de cada resíduo estivesse incluído na região do *grid box*.

Foram realizadas duas etapas de cálculo de docagem molecular: na primeira, foram utilizados os pesticidas Paraoxon, PM16, PM18, PM20, PM22, PM24, PMS20, PY14, PY16, PY18, PY20, PY22, PYS18, PROP1, PROP2, PROP3, PROP4, PROP5 e PROP6 utilizando os parâmetros do *grid box* com coordenadas centrais $x = 116.421$, $y = 114.332$, $z = -130.646$, com tamanhos $x = 60$, $y = 54$ e $z = 54$, de maneira que todos os resíduos do sítio ativo, bem como a região da entrada do sítio estavam acessíveis ao cálculo de docagem molecular.

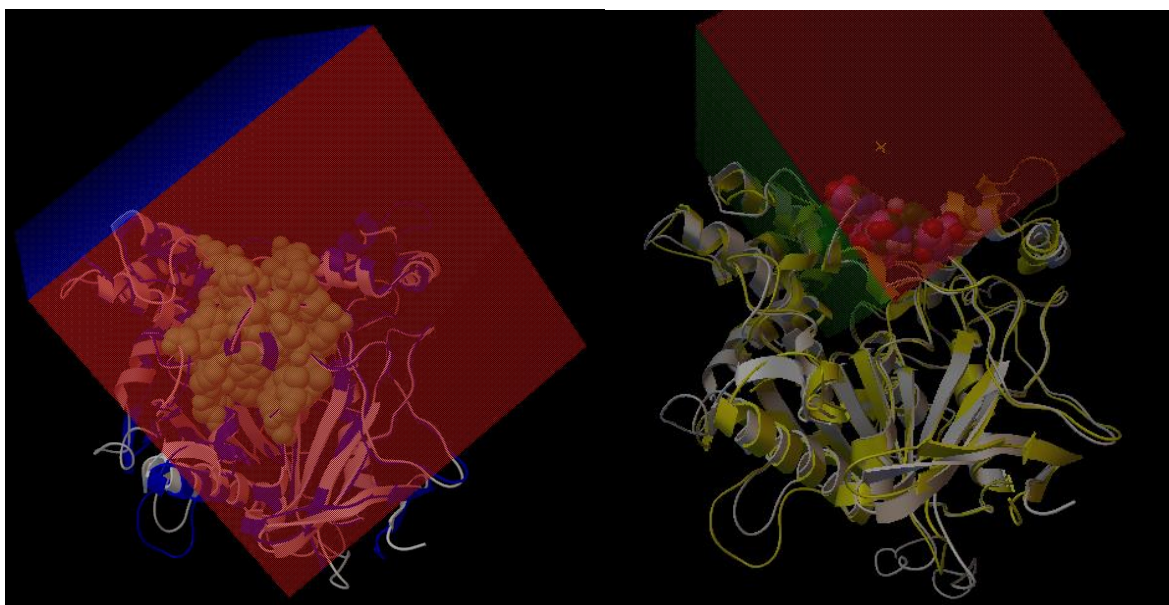
Na segunda etapa de docagem molecular, foram realizados apenas os cálculos com os pesticidas das propostas 1 a 6 e o PM22, foi realizada uma alteração nas dimensões do *grid box* a fim de que este estivesse localizado na região que contempla os aminoácidos mutantes da entrada do sítio ativo das proteínas, tendo sido selecionados os aminoácidos Glu97, Tyr99, Tyr101, Tyr344, Gly346 e Ile347 da AaAChE, bem como os aminoácidos Tyr72, Asp74, Leu76, Leu289, Ser293 e Val294 da HssAChE. Após essa seleção, foi determinado o *grid* com as dimensões centrais $x = 110.063$, $y = 124.029$, $z = -119.455$ e com os tamanhos $x = 50$, $y = 38$ e $z = 38$, de maneira que todos os resíduos mutantes da entrada dos sítios ativos estivessem acessíveis ao cálculo de docagem molecular.

Foi determinado como parâmetro de cálculo, 20 repetições de docagem com exaustividade igual a 16, número de modos de ligação igual a 20, sendo utilizado 4 CPUs para realização do cálculo.

Ao todo, foram gerados 16.000 resultados com o AutoDock Vina que foram analisados com o auxílio de um *script* que faz uma busca pelo menor valor de energia gerado em cada arquivo. Dessa maneira, foi dada a sequência metodológica com análise das interações a partir da criação do diagrama 2D de cada um dos melhores resultados com o programa LigPlot v.4.4.2 (Wallace *et al.*, 1995).

A figura 9 foi gerada com o programa AutoDockTools, onde pode-se observar as proteínas AaAChE e HssAChE alinhadas, os resíduos do sítio ativo em representação de esfera de van der Waals e o *grid box* utilizado para os cálculos.

Figura 9: Grid box da enzima AaAChE para cálculo de docagem molecular. A esquerda, o *grid box* da etapa 1 e a direita, o *grid box* da etapa 2.



Fonte: o próprio autor

4.9 ANÁLISE DOS RESULTADOS DE DOCAGEM MOLECULAR

Após a realização das simulações de docagem molecular, as interações entre as enzimas (*AaAChE* e *HssAChE*) e os pesticidas propostos foram avaliadas com o auxílio do software LigPlot v.4.4.2 (Wallace *et al.*, 1995). Além disso, foram utilizados os programas VMD (HUMPHREY, 1996), PyMOL (WARREN, 2004) e AutodockTools.

4.10 SIMULAÇÕES POR DINÂMICA MOLECULAR

Após os cálculos de docagem molecular, para cada complexo proteína-inseticida, foi selecionado o melhor resultado de docagem de acordo com a menor energia de docking obtida para a realização da etapa de dinâmica molecular (DM). As simulações por DM foram realizadas utilizando-se o pacote GROMACS 2016.4 (<http://www.gromacs.org>) (Páll *et al.*, 2015).

Os arquivos dos ligantes que obtiveram os melhores resultados de docking foram parametrizados com os softwares Acptype (Silva *et al.*, 2012) e MKTOP. Já os arquivos .pdb das proteínas (*HssAChE* e *AaAChE*), foram utilizados para gerar os arquivos topologia com o comando `pdb2gmx`. O arquivo topologia gerado apresenta parâmetros para cada átomo no campo de força utilizado, além de informações como ângulos e diedros e a composição do sistema a ser simulado. Os sistemas em estudo foram minimizados com o campo de forças OPLS-AA (do inglês, *Optimized Potentials for Liquid Simulations All Atoms*) e o modelo de água selecionado foi o TIP3P (transferable intermolecular potential 3P) (Mark *et al.*, 2010).

Também foi utilizado um arquivo de entrada com extensão .mdp que apresenta os parâmetros de simulação e contém critérios que delimitam o tempo de simulação, bem como

critérios de parada para a etapa de minimização de energia, temperatura e pressão do sistema e outras condições iniciais. Os sistemas foram simulados utilizando condições periódicas de contorno, a temperatura foi de 310 K e a pressão de 1 Bar.

Os sistemas foram simulados em caixas dodecahédricas contendo moléculas de água para solvatação e moléculas de íons a fim de manter a eletroneutralidade do sistema. A escolha do tipo de caixa dodecaédrica se deu devido a esta ser a menor e mais regular célula unitária, apresentando volume menor do que a caixa cúbica, economizando tempo de cálculo computacional. A tabela 2 mostra o número de moléculas de água e quantidades de íons que foram adicionadas em cada um dos sistemas simulados.

Tabela 2: Número de moléculas de solvente e íons para os sistemas de simulação por dinâmica molecular.

Sistema de simulação por DM	Número de moléculas de água	Número de íons sódio (Na ⁺)
PM22- <i>AaAChE</i>	25483 moléculas de água	19 íons de sódio
PM22- <i>HssAChE</i>	24614 moléculas de água	6 íons de sódio
PROP2- <i>AaAChE</i> -etapa1	25485 moléculas de água	20 íons de sódio
PROP2- <i>HssAChE</i> -etapa1	24643 moléculas de água	7 íons de sódio
Paraoxon- <i>AaAChE</i> -etapa1	27160 moléculas de água	19 íons de sódio
Paraoxon- <i>HssAChE</i> -etapa1	26334 moléculas de água	6 íons de sódio
PROP2- <i>AaAChE</i> -etapa2	27141 moléculas de água	20 íons de sódio
PROP2- <i>HssAChE</i> -etapa2	26358 moléculas de água	7 íons de sódio
PROP3- <i>AaAChE</i>	27145 moléculas de água	20 íons de sódio
PROP3- <i>HssAChE</i>	26361 moléculas de água	7 íons de sódio
Paraoxon- <i>AaAChE</i> -etapa2	27163 moléculas de água	19 íons de sódio
Paraoxon- <i>HssAChE</i> -etapa2	26336 moléculas de água	6 íons de sódio

Foram realizadas etapas de minimização de energia (com restrição de posição para átomos pesados, seguida de uma minimização sem restrições de posição), além de uma otimização pelo método quase-Newton utilizando o algoritmo L-BFGS.

Após a etapa de minimização de energia, foi realizada uma dinâmica de água a fim de acomodar as moléculas de água do sistema com tempo de simulação igual a 500 picosegundos.

Depois disso, foi realizada uma simulação por dinâmica molecular sem restrição de posição com tempo de simulação de 50 nanosegundos. O algoritmo de minimização empregado foi o do máximo declive (steepest descent). As duas condições iniciais da DM foram a posição inicial das moléculas simuladas (que foram as melhores poses obtidas nos cálculos de docking molecular) e a velocidade inicial das moléculas.

Após a execução das simulações por dinâmica molecular, foram gerados resultados de energia total, rmsd do carbono alfa, rmsd dos ligantes, rmsf, raio de giro, distância média entre os centros de massas, ligações hidrogênio entre os ligantes e a proteína e energia livre de ligação obtida pelo método MM-PBSA.

Para o cálculo da energia livre, foram utilizados quadros a cada 200 ps de simulação, gerando um total de 250 frames.

4.11 ANÁLISE DE ESTRUTURAS E GERAÇÃO DE FIGURAS

Para analisar as estruturas geradas após as simulações por dinâmica molecular, foram utilizados os programas VMD (HUMPHREY, 1996) e PyMOL(WARREN, 2004). Os resultados obtidos foram analisados utilizando o software XMGRACE.

4.12 RECURSOS COMPUTACIONAIS UTILIZADOS

Foi utilizado um computador pessoal Dell com 12GB de memória RAM, processador Intel Core i7 e 450 GB SSD para a realização de cálculos de docagem bem como a análise dos resultados.

Para a etapa de dinâmica molecular, foi utilizado um computador pessoal com 16GB de memória RAM 3000mhz operando em *dual channel*, processador AMD Ryzen 2600, *clock* 3.9GHz, 6 núcleos e 12 *threads*, 240GB SSD e placa de vídeo NVIDIA GTX 1080 com 8GB de VRAM GDDR5X, *clock* 1797MHz e 2560 CUDA *cores*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONSTRUÇÃO E VALIDAÇÃO DO MODELO TRIDIMENSIONAL DA AaAChE

Algumas estimativas de qualidade do modelo foram geradas a partir do próprio servidor SWISS-MODEL (WATERHOUSE et. Al., 2018) e, dentre elas, a Estimativa de Qualidade Global do Modelo (GMQE), combina propriedades do alinhamento entre o modelo criado e a proteína molde utilizado e do método de pesquisa dos moldes. A pontuação dessa estimativa varia de 0 a 1 e quanto mais próximo de 1, representam uma maior confiabilidade do modelo criado. O valor obtido de GMQE pelo modelo criado foi de 0,76.

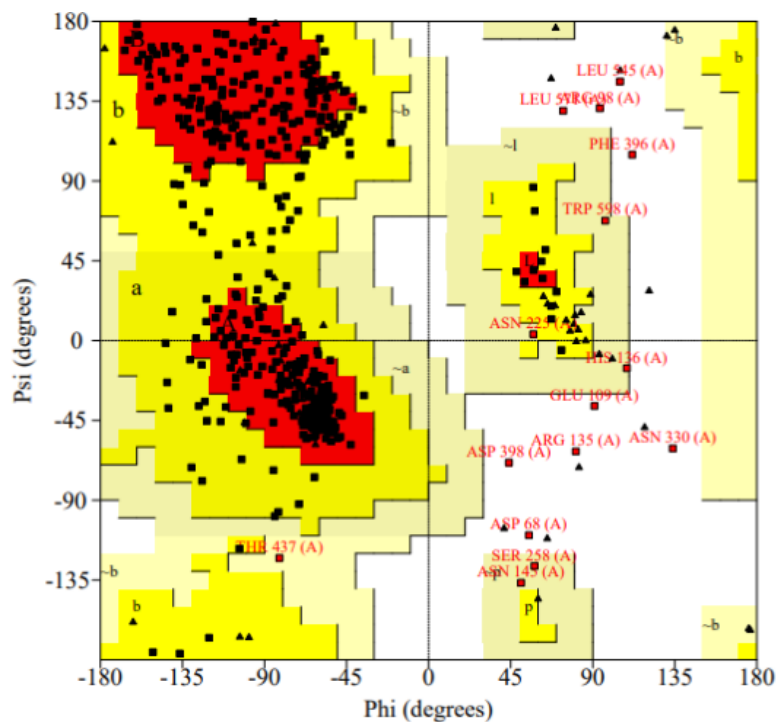
Já o QMEAN (BENKERT, BIASINI, SCHWEDE, 2011), que estima a qualidade global (de toda a estrutura) e local (por aminoácido) com base em diferentes propriedades geométricas, foi de -2,52. Essa pontuação pode variar, sendo que valores igual ou inferiores a -4,0 são indicativos de que o modelo apresenta baixa qualidade.

Em relação à qualidade local, observou-se que as regiões que apresentaram menores valores de QMEAN foram as regiões de alças da proteína. Isso pode ser devido à alta vibração molecular que é comum nessas regiões mais expostas.

Para avaliar a qualidade estereo química do modelo criado, foi utilizado um Diagrama de Ramachandran (Figura 10).

Observa-se que 1,2% dos aminoácidos encontram-se em regiões denominadas de generosamente permitidas e 1,9% dos aminoácidos encontram-se em regiões não permitidas. Assim, 96,9% dos resíduos encontram-se em regiões mais permitidas. Uma vez que cálculos de Dinâmica Molecular serão empregados na sequência deste trabalho, haverá uma melhora na estabilidade conformacional da enzima, fazendo com que o modelo tridimensional criado apresente melhor qualidade.

Figura 10: Diagrama de Ramachandran, gerado pelo PROCHECK, versão 3.5 (LASKOWSK, MACARTHUR e MOSS *et al.* 1993) da AaAChE obtida por modelagem comparativa.



	Resíduos em regiões mais favoráveis: 80,8%
	Resíduos em regiões adicionalmente favoráveis: 16,1%
	Resíduos em regiões generosamente favoráveis: 1,2%
	Resíduos em regiões não permitidas: 1,9%

Fonte: o autor, programa PROCHECK (LASKOWSK, MACARTHUR e MOSS *et al.* 1993)

5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS RESÍDUOS DO SÍTIO ATIVO DA AaAChE

A fim de obter o sítio ativo da *HssAChE*, GONÇALVES (2005) realizou um alinhamento sequencial entre os aminoácidos da enzima acetilcolinesterase da Torpedo Californica (*TcAChE*) de código 1EA5 disponível no Protein Data Bank e a *HssAChE* criada, utilizando o SwissPdbViewer (GUEx e PEITSCH0, 1997) uma vez que a *TcAChE* possui todos os resíduos do sítio ativo elucidados (KOELLNER, 2000, apud GONÇALVES, 2005). Por comparação com os aminoácidos do sítio ativo da *TcAChE*, obteve os resíduos do sítio ativo da *HssAChE*. Da mesma maneira, foram identificados, por modelagem comparativa, os aminoácidos do sítio ativo da *AaAChE*. O alinhamento sequencial das enzimas *HssAChE* e *AaAChE* apresentou um valor de RMSD de 1,12 Angstroms.

A figura 11 mostra o alinhamento sequencial das enzimas *HssAChE* e *AaAChE* no formato FASTA e a figura 12 mostra o alinhamento sequencial tridimensional, gerado com o programa PYMOL.

Na figura 11, os aminoácidos iguais no alinhamento sequencial são representados por asterisco (*), os aminoácidos semelhantes são representados por ponto (.) e os aminoácidos diferentes são representados por um espaço em branco.

Os aminoácidos do sítio ativos das enzimas foram representados na tabela 3, de maneira que os resíduos que estão em negrito representam as mutações existentes nas enzimas.

Figura 11: Alinhamento sequencial das enzimas *HssAChE* e *AaAChE* obtido com o SwissPdbViewer (GUEX, 1997).

HssAChE-align-re	5	DAELLVTVRG	GRLRGIRLKT	PGGP-VSAFL	GIPFAEPPMG	PRRFLPPEPK
AaAChE-align	31	DRLVVQTSS	GPIRGIRSTM-	VLGREVHVFN	GVFFAKPPVD	GLRFRKPVPA
		,,*	*,*,*,*	*,*,*	*,*,*,*,*	*,*,*,*
HssAChE-align-re	54	QPWSGVVDAT	TFQSVCYQYV	DTLYPGFEGT	EMWNPNRELS	EDCLYLNVT
AaAChE-align	79	EPWHGVLDAT	RLPPSCIQR	YEFPGFAGE	EMWNPNTNVS	EDCLYLNIVV
		,,*,*,*,*,*	*,*,*,*	*,*,*,*	*,*,*,*,*,*	*,*,*,*,*,*
HssAChE-align-re	104	PYPRPTS---	-----	-----	----PTPVLV	WIYGGGFYSG
AaAChE-align	129	PTKTRLRHGR	GLNFGNNDYF	QDDDDFQROH	QSKGGLAMLV	WIYGGGFMSG
		*			*,*,*	*,*,*,*,*,*
HssAChE-align-re	127	ASSLDVYDGR	FLVQAERTVL	VSMNYRVGAF	GFLALPG---	SREAPGNVGL
AaAChE-align	179	TSTLDVYNAE	MLAAVGNVIV	ASMQYRVGSF	GFFYLAPYLN	DDDAAPGNVGL
		,,*,*,*,*	*	*,*,*,*,*,*	*,*,*,*	*,*,*,*,*,*
HssAChE-align-re	174	LDQRLALQWV	QENVAAFGGD	PTSVTLFGES	AGAASVGMHL	LSPPSRGLFH
AaAChE-align	229	WDQALAIRWL	KENAKAFGGD	PDLITLFGES	AGGSSVSLHL	LSPVTRGLSR
		,,*,*,*,*	*,*,*,*,*,*	*,*,*,*,*,*	*,*,*,*,*,*	*,*,*,*,*,*
HssAChE-align-re	224	RAVLQSGAPN	GPWATVGMGE	ARRRATQLAH	LVGCPPGGTG	GNDT---ELV
AaAChE-align	279	RGILQSGTLN	APWSHMSAEK	ALSVAEALID	DCNCN---VT	LLKDNPNYVM
		,,*,*,*,*,*	*,*,*,*,*	*,*,*,*	*,*,*,*,*	*,*,*,*,*,*
HssAChE-align-re	271	ACLRTRPAQV	LVNHEWHVLP	QESVFRFSFV	PVVDGDFLSD	TPEALINAGD
AaAChE-align	326	NCMRNVDAKT	ISVQQWNSYS	--GILGFPSA	PTIDGVFMTA	DPMTMLREAN
		,,*	*,*,*,*,*	*,*,*,*	*,*,*,*,*	*,*,*,*,*,*
HssAChE-align-re	321	FHGLQVLVGV	VKDEGSYFLV	YGA-PGFSKD	NESLISRAEF	LAVRVGVGPQ
AaAChE-align	374	LEGVEILVGS	NRDEGTYFLL	YDFIDYFEKD	AATSLPRDKF	LEIMNTIFSK
		,,*,*,*,*,*	*,*,*,*,*,*	*,*,*,*	*,*,*,*,*	*,*,*,*,*,*
HssAChE-align-re	370	VSDLAAEAVV	LHYTDWLHPE	DPARLREALS	DVVGDNHNVV	PVAQLAGRIA
AaAChE-align	424	ASEPEREAAII	FQYTGWESGN	DGYQNQQQVG	RSVGDHFFIC	PTNEFALGLA
		,,*,*,*,*	*,*,*,*,*,*	*,*,*,*,*,*	*,*,*,*,*,*	*,*,*,*,*,*
HssAChE-align-re	420	AQGARVYAYV	FEHRASLWS	PLWMGVPHGY	EIEFIFGIPL	DPSRNYTAE
AaAChE-align	474	ERGASVYVYV	FTHRTSTLSW	GEWMGVHLGD	EVEYIFGQPM	NVSMQYRQRE
		,,*,*,*,*	*,*,*,*,*,*	*,*,*,*,*,*	*,*,*,*,*,*	*,*,*,*,*,*
HssAChE-align-re	470	KIFAQRLMRY	WANFARTGDP	NEPRDPKAPQ	WPPYTAGAQQ	YVSLDLR---
AaAChE-align	524	RDLRRRMVLS	VSEFARSGNP	ALEG----EH	WPVYTKENPI	YFIFNAEGED
		,,*,*,*,*	*,*,*,*,*,*	*,*,*,*,*	*,*,*,*,*	*,*,*,*,*,*
HssAChE-align-re	517	---PLEVRRG	LRAQACAFWN	RFLPKLLSA		
AaAChE-align	570	DLRGEKYGRG	PMATACAFWN	DPLPRLRAWS	-	
			,,*,*,*,*	*,*,*,*,*		

Figura 12: Alinhamento sequencial entre as enzimas *HssAChE* e *AaAChE* Imagem gerada pelo programa PYMOL.



Tabela 3: Aminoácidos da região do sítio ativo das enzimas *HssAChE* e *AaAChE*. Em negrito, estão representados os resíduos diferentes.

<i>HssAChE</i>	<i>AaAChE</i>	<i>HssAChE</i>	<i>AaAChE</i>	<i>HssAChE</i>	<i>AaAChE</i>	<i>HssAChE</i>	<i>AaAChE</i>
Gln71	Gln96	Phe123	Phe175	Trp236	Trp291	Phe338	Phe391
Tyr72	Glu97	Tyr124	Met176	Trp286	Trp341	Tyr341	Tyr394
Asp74	Tyr99	Ser125	Ser177	Leu289	Tyr344	Gly342	Asp395
Leu76	Tyr101	Gly126	Gly178	Ser293	Gly346	Trp439	Trp493
Thr83	Glu108	Ala127	Thr179	Val294	Ile347	His447	His501
Trp86	Trp111	Leu130	Leu182	Phe295	Leu348	Gly448	Gly502
Asn87	Asn112	Tyr133	Tyr185	Arg296	Gly349	Tyr449	Asp503
Gly120	Gly172	Glu202	Glu257	Phe297	Phe350	Glu450	Glu504
Gly121	Gly173	Ser203	Ser258	Glu334	Glu387		
Gly122	Gly174	Ala204	Ala259	Tyr337	Tyr390		

Pode-se observar que treze aminoácidos são diferentes. Dessa maneira, pode-se calcular a Identidade sequencial entre os aminoácidos dos sítios ativos das enzimas *AaAChE* e *HssAChE*, sendo obtido um valor de 65,78%.

5.3 CÁLCULO DA IDENTIDADE SEQUENCIAL ENTRE AS ENZIMAS *AaAChE* E *AgAChE*

Com o intuito de observar as mutações existentes no sítio ativo do mosquito *Aedes aegypti* do modelo de AChE criado, em comparação com o modelo da acetilcolinesterase do mosquito *Anopheles gambiae* (*AgAChE*) de código 2AZG, foi realizada uma modelagem comparativa com o programa SwissPdbViewer. Dessa maneira, a partir dos aminoácidos do sítio ativo da *AaAChE*, foram determinados os resíduos do sítio ativo da *AgAChE* e na sequência foi realizado o cálculo de identidade sequencial dessa região, como mostrado na tabela 4.

Tabela 4: Aminoácidos da região do sítio ativo das enzimas *AgAChE* e *AaAChE*. Em negrito, estão representados os resíduos diferentes.

<i>AgAChE</i>	<i>AaAChE</i>	<i>AgAChE</i>	<i>AaAChE</i>	<i>AgAChE</i>	<i>AaAChE</i>	<i>AgAChE</i>	<i>AaAChE</i>
Gln69	Gln96	Phe120	Phe175	Trp232	Trp291	Phe329	Phe391
TyIle70	Glu97	Tyr121	Met176	Trp280	Trp341	Tyr332	Tyr394
Asp72	Tyr99	Ser122	Ser177	Leu283	Tyr344	Tyr333	Asp395
Val74	Tyr101	Gly123	Gly178	Ile285	Gly346	Trp431	Trp493
Ala81	Glu108	Thr124	Thr179	Cys286	Ile347	His439	His501
Trp94	Trp111	Leu127	Leu182	-	Leu348	Gly440	Gly502
Asn95	Asn112	Tyr130	Tyr185	Glu287	Gly349	Asp441	Asp503
Gly117	Gly172	Glu198	Glu257	Phe288	Phe350	Glu442	Glu504
Gly118	Gly173	Ser199	Ser258	Glu325	Glu387		
Gly119	Gly174	Ala200	Ala259	Tyr328	Tyr390		

Pode-se observar que onze aminoácidos são diferentes. Dessa maneira, calculando a identidade sequencial da região do sítio ativo das enzimas *AaAChE* e *AgAChE*, obtém-se um valor de 71,06%. Assim, são observadas 28,94% de mutações nessa região, o que indica que pesticidas que atuam seletivamente em relação a uma das espécies podem não apresentar seletividade para a outra espécie.

5.4 ESTUDO DO ESTADO DE PROTONAÇÃO DOS LIGANTES

O correto estado de protonação dos ligantes foi determinado utilizando o programa MarvinSketch. Dessa maneira, os ligantes PYN e PYSn, em pH 7,4, encontram-se protonados, havendo 99,7% de espécies protonadas para este pH. Os ligantes PMn e PMSn encontram-se, com 99,8%, em seu estado protonado, conforme proposto por Dou e colaboradores. O paraoxon apresentou-se protonado com carga +1. O pesticida da proposta 1, apresentou-se protonado com carga +1 e as propostas PROP2, PROP3, PROP4, PROP5 e PROP6 permaneceram no estado neutro.

5.5 CLASSIFICAÇÃO TOXICOLÓGICA DOS PESTICIDAS E PREDIÇÃO TEÓRICA DE LD50

De acordo com os resultados obtidos no servidor ProTox-II, o Paraoxon apresentou classificação toxicológica classe 2, com acurácia de predição de 70,97%. Foi observado um LD50 de 37 mg/kg corpóreo. Foi observada uma probabilidade de 93% de apresentar atividade mutagênica, além de ser reportado um alto risco para o sistema reprodutor humano.

Os pesticidas PM16, PM18, PM20, PM22 e PM24 apresentaram classificação 4 de toxicidade aos mamíferos, com um LD50 de 1500 mg/kg corpóreo. A acurácia da predição foi de 68,07%. Esses compostos apresentaram 72% de probabilidade de não apresentar atividade mutagênica e 57% de probabilidade de não apresentar atividade carcinogênica.

Já o pesticida PMS20, apresentou LD50 de 2000 mg/kg, também se enquadrando na classe 4 de toxicidade com 68,07% de acurácia. Não foram reportadas informações a respeito de atividade mutagênica ou carcinogênica para essa molécula.

Os pesticidas PY14, PY16, PY18, PY20 e PY22 apresentaram LD50 de 1210 mg/kg corpóreo, estando enquadrados na classificação 4 de toxicidade, com 69,26% de acurácia.

Já a proposta PYS18, apresentou LD50 de 2000 mg/kg corpóreo, com acurácia de 70,97%, estando classificado no grupo de risco 4.

A proposta 1 se enquadrou na classe 4 de toxicidade aos mamíferos, apresentando um LD50 estimado de 1500 mg/kg corpóreo com acurácia da predição de 67,38%. Apresentou 75% de probabilidade de ser inativo para a mutagenicidade. A predição de carcinogenicidade apresentou probabilidade de 56% de ser inativo.

A proposta 2 apresentou um LD50 de 400 mg/kg corpóreo, com uma acurácia na predição de 68,07%, se enquadrando na classe 4 de toxicidade. Não apresentou atividade carcinogênica (52% de probabilidade) nem mutagênica (76% de probabilidade de ser inativo).

A proposta 3 se enquadrrou na classe 4 de toxicidade aos mamíferos, apresentando um LD50 estimado de 344 mg/kg corpóreo. A acurácia da predição ficou em 68,07%. Apresentou 71% de probabilidade de ser inativo para a mutagenicidade e 53% de probabilidade de ser inativo para carcinogenicidade.

A Proposta 4 apresentou predição de toxicidade classe 4, apresentando um LD50 de 2000 mg/kg corpóreo, com acurácia na predição de 70,97%. Apresentou 60% de probabilidade de não ser carcinogênico e 69% de probabilidade de não ser mutagênico. Entretanto, a proposta 4 apresentou 75% de probabilidade de apresentar atividade no domínio de ligação de receptores estrogênicos.

A proposta 5 apresentou classificação toxicológica de nível 3, sendo observado um LD50 de 215 mg/kg corpóreo, com uma acurácia na predição de 72,9%. Ainda, apresentou 55% de probabilidade de apresentar atividade carcinogênica e 73% de probabilidade de não apresentar atividade mutagênica.

A proposta 6 apresentou classificação toxicológica 4, com 68,08% de acurácia na predição. O LD50 estimado para esse composto foi de 471 mg/kg corpóreo. Ainda, foi observada 51% de probabilidade de apresentar atividade carcinogênica e 76% ser inativo para mutagênese.

A tabela 5 apresenta os valores de LD50 com a classificação toxicológica estimada pelo servidor ProTox-II para os pesticidas em estudo.

Tabela 5: Dados toxicológicos estimados pelo servidor ProTox-II das moléculas propostas neste trabalho.

Pesticidas	Classificação Toxicológica	LD50 (mg do pesticida / kg corpóreo)	Efeitos indesejados
Paraoxon	2	37 mg/kg	Atividade mutagênica; alto risco para o sistema reprodutor humano.
PMn	4	1500 mg/kg	
PMS20	4	2000 mg/kg	
PYn	4	1210 mg/kg	
PYS18	4	2000 mg/kg	

PROP1	4	1500 mg/kg	
PROP2	4	400 mg/kg	
PROP3	4	344 mg/kg	
PROP4	4	2000 mg/kg	Atividade no domínio de ligação de receptores estrogênicos.
PROP5	3	215 mg/kg	Atividade carcinogênica.
PROP6	4	471 mg/kg	Atividade carcinogênica.

Fonte: Dados obtidos no servidor ProTox II.

5.6 RESULTADOS DE DOCAGEM MOLECULAR

Foram realizados ensaios de docagem em que os ligantes realizam uma busca por complementaridade eletrostática e de van der Waals, considerando o efeito de solvente implícito através da constante dielétrica da água. Uma vez que o docagem molecular é uma técnica estocástica, todos os cálculos foram realizados 20 vezes, com extração dos vinte melhores resultados para cada um dos ligantes, totalizando 400 resultados por pesticida e 10.400 conformâmeros para cada uma das enzimas.

Sabe-se que energia de docagem é um parâmetro importante na análise de estabilidade da ligação entre as enzimas e as moléculas propostas, de maneira que a estabilidade do complexo formado será inversamente proporcional ao valor da energia de ligação. Além disso, a estabilidade da interação está relacionada ao local de docagem molecular e ao tipo e a quantidade de interações que surgem entre os aminoácidos ligantes.

Dessa maneira, a fim de analisar os resultados obtidos, foram selecionadas com o auxílio de um script do AutoDock Vina as conformações com menores energias de interação, uma vez que estas representam as interações mais favoráveis termodinamicamente falando.

Foram realizadas análises energética e conformacional para cada um dos melhores resultados, totalizando 38 análises para a primeira etapa de docagem e 14 análises para a segunda etapa.

5.5.1 PRIMEIRA ETAPA DE CÁLCULO

Os dados foram gerados a partir dos resultados que apresentaram menor energia de docagem molecular da primeira etapa, onde foi utilizado o grid box com as dimensões que abrangia toda a região do sítio ativo das proteínas, bem como sua entrada estão dispostos na tabela 6.

Tabela 6: Resultados das energias de docagem entre as enzimas acetilcolinesterase (*HssAChE* e *AaAChE*) e os pesticidas em estudo.

ENERGIAS DE DOCAGEM (kcal.mol ⁻¹)			
PESTICIDA	ENZIMAS		Diferença Energética (kcal/mol)
	<i>AaAChE</i>	<i>HssAChE</i>	
PARAOXON	-7,0	-7,0	<i>AaAChE</i> = <i>HssAChE</i>
PM16	-7,7	-8,4	0,7 <i>AaAChE</i> > <i>HssAChE</i>
PM18	-7,6	-8,1	0,5 <i>AaAChE</i> > <i>HssAChE</i>
PM20	-7,3	-7,9	0,6 <i>AaAChE</i> > <i>HssAChE</i>
PM22	-7,6	-7,8	0,2 <i>AaAChE</i> > <i>HssAChE</i>
PM24	-7,3	-7,6	0,3 <i>AaAChE</i> > <i>HssAChE</i>
PMS20	-7,1	-7,9	0,8 <i>AaAChE</i> > <i>HssAChE</i>
PY14	-8,0	-7,9	0,1 <i>AaAChE</i> < <i>HssAChE</i>
PY16	-8,1	-8,0	0,1 <i>AaAChE</i> < <i>HssAChE</i>
PY18	-7,5	-8,0	0,5 <i>AaAChE</i> > <i>HssAChE</i>
PY20	-7,4	-7,8	0,4 <i>AaAChE</i> > <i>HssAChE</i>
PY22	-7,6	-7,7	0,1 <i>AaAChE</i> > <i>HssAChE</i>
PYS18	-7,2	-8,0	0,8 <i>AaAChE</i> > <i>HssAChE</i>
PROP 1	-8,4	-9,3	0,9 <i>AaAChE</i> > <i>HssAChE</i>
PROP 2	-9,0	-8,6	0,4 <i>AaAChE</i> < <i>HssAChE</i>
PROP 3	-9,3	-10	0,7 <i>AaAChE</i> > <i>HssAChE</i>
PROP 4	-8,7	-10	0,3 <i>AaAChE</i> > <i>HssAChE</i>
PROP 5	-8,6	-9,6	1,0 <i>AaAChE</i> > <i>HssAChE</i>

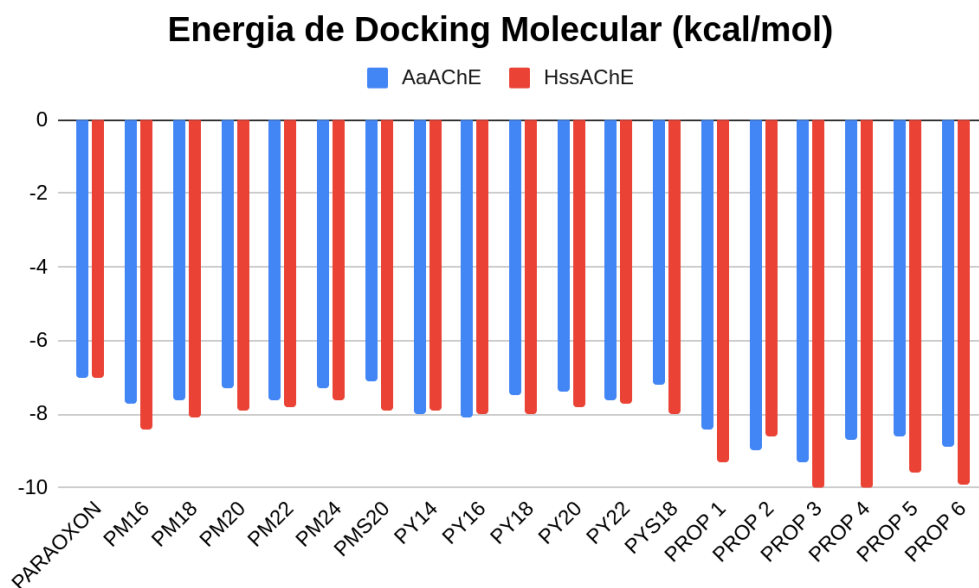
PROP 6	-8,9	-9,9	1,0 AaAChE > HssAChE
--------	------	------	----------------------

Conforme pode-se observar na tabela 3, as energias de docagem obtidas foram em sua maioria menores para os complexos formados com a enzima *HssAChE*, apenas os pesticidas PY14, PY16 e PROP2 apresentaram diferença energética de maneira a ser mais favorável a interação com a enzima *AaAChE*. Entretanto, para as propostas PY14 e PY16, observa-se que uma diferença energética de 0,1 kcal/mol não é significativa, de maneira que apenas esse parâmetro isolado não indica que esses pesticidas sejam melhores do que as demais. Já no caso da molécula PROP2, houve uma diferença energética de 0,4 kcal/mol.

O pesticida Paraoxon apresentou energias de interação maiores para ambas as enzimas quando comparado com os demais pesticidas. Sabe-se que o Paraoxon inibe as enzimas acetilcolinesterase uma vez que interage com os resíduos da tríade catalítica dessas enzimas, inativando-as. Dessa maneira, além das energias de interação serão observados os contatos polares e apolares formados a partir dos cálculos de docagem entre as enzimas e demais moléculas de pesticidas a fim de uma melhor interpretação dos resultados.

Os dados da tabela 6 foram transformados em gráfico, conforme figura 13.

Figura 13: Gráfico de energia de interação, em kcal/mol, dos 19 pesticidas docados as enzimas *AaAChE* e *HssAChE*.



Os pesticidas propostos apresentam interação favorável, energeticamente falando, com a enzima acetilcolinesterase do mosquito *Aedes aegypti*. Porém, de acordo com os resultados da simulação realizada também apresentaram interação favorável com a enzima

F350													
Y394		X											
F391													
W111				X		1							
G174		X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
Y101	X												
F396	X	X					X	X			X		X
E97	X	X	X	X	X		X				X		
V338	X	X	X	X	X		X				X		
S177	X		1	X	1	X		X		X	1	X	
R98	X		X		X	X		X	X				
E100	X		X	X	X	X	1	X	X	X			X
S117	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
W419	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
Y399	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
D398	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
G346	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
N342	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X

Fonte: o próprio autor.

Tabela 8: Resultados de docagem dos pesticidas propostos (Propostas 1 a 6) com a enzima AaAChE.

AaAChE						
Aminoácido	PROP1	PROP2	PROP3	PROP4	PROP5	PROP6
His501	X	X	X	X	X	X
Ser258	X	X	X	X	X	X
Glu387	X	X	X	X	X	X
Tyr394				X		
Asp395				X		
Tyr344				X		
Phe396				X		
Tyr101				X		

Arg98				X		X
Trp341				X		
Tyr99				X		
Glu97				X		
Phe391				X		
Asn342	X	X		X	X	X
Val338	X	X		X	X	
Phe350	X	X		X		
Glu467	X	X	X		X	X
Asn589	X	X	X		X	X
His459	X	X	X		X	X
Trp588	X	X	X		X	X
Arg596	X	X	X		X	X
Phe421	X	X	X		X	X
Ile432	X	X	X		X	X
Ala424	X	X	X		X	X
Lys423	X	X	X		X	X
Gly349	X	X	X		X	X
Phe460	X	X	X		X	X
Ile420	X	X	X		X	X
ILe347	X	X	X		X	X
Pro290	X	X	X		X	X
Asn288	X	X	X		X	X
Pro464	X	X	X		X	X
Tyr390	X	X	X	X		

Tabela 9: Resultados de docagem dos pesticidas propostos (PMn, PMSn, PYn, PYSn e Paraoxon) com a enzima *HssAChE*.

Y124	1	1									1		
S125	1		X			1	X	X	X				
F297													
Y337												X	
G121								1					
G120		X				X		X			X	X	X
W86								X					
N87			X	X	X	X	X	X	X	X		X	X
D74			X	X	X	X	X	X	X	X			
G122							X	X	X				
F338													
F295		X		X			X	X	X	X	X	X	X
W286	X		X								X		
Y72	X							X	1				X
Y341	X												
E202	X	X				X		X		X	X	X	X
R296	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X
L289	X	X				X			X		X		
V294	X	X		X		X	X	X	X	X	X	X	X
S293	X	X	X	X	X	X			X	X			1
N283	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
H287	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
E292	X	X	X	X	X	X			X	X	X		
Q291	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X		
L76	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X
Y133	X	X	X	X	X	X	X	X	X	1	X	X	X
W285	X	X		X	X	X	X	X	X	X		X	X
G448	X	X				X		X	X	X	X	X	X
V282	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
Q279	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
Y70	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
L92	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X

Q71	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
Y377	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	1	X

Fonte: o próprio autor.

Tabela 10: Resultados de docagem dos pesticidas propostos (Propostas 1 a 6) e paraoxon com a enzima *HssAChE*.

<i>HssAChE</i>							
Aminoácido	PROP1	PROP2	PROP3	PROP4	PROP5	PROP6	Paraoxon
Ser203		X		X			
His447		X					
Glu334	X	X	X	X	X	X	
Tyr337							
Asp74							
Asn87		X					
Tyr124							
Phe295			X				
Ser125		X					
Trp86		X					
Glu202		X					
Gly120		X					
Gly121		X					
Phe297		X					
Phe338							
Tyr341							
Val294							
Ser293	X		X	X	X	X	
Glu292	X		X	X	X	X	
Leu289	X		X	X	X		
Trp286	X				X		
Leu76	X		X	X	X	X	
Tyr72	X		X	X	X	X	
Gln291	X		X	X	X	X	
Thr83	X	X		X	X	X	

Arg296	X	X			X	X	
Tyr133	X	X	X		X	X	
Gly122	X	X	X	X			

Fonte: o próprio autor.

Os parâmetros utilizados para escolha dos melhores resultados de docagem foram cinco:

- se o pesticida realiza interações com resíduos da tríade catalítica da enzima (e quais os tipos de interação);
- quantidade de contatos polares;
- quantidade de contatos apolares;
- energia de interação;
- Se o pesticida apresenta elevada toxicidade estimada aos mamíferos.

As tabelas 11 e 12 apresentam a relação dos parâmetros utilizados para escolha dos melhores resultados, de maneira que a sigla “C.P.” representa a quantidade de contatos polares e “C.A.” a quantidade de contatos apolares.

Tabela 11: Parâmetros de seleção dos melhores pesticidas para a enzima AaAChE da primeira etapa.

AaAChE																			
	PA RA OX ON	PM 16	PM 18	PM 20	PM 22	PM 24	PM S20	PY1 4	PY1 6	PY1 8	PY2 0	PY2 2	PYS 18	Pro p1	Pro p2	Pro p3	Pro p4	Pro p5	Pro p6
S 258														X	X	X	X	X	X
H 501							X		x	X			X	X	X	X	X	X	X
E 387	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
C.P.	4	2	3	1	3	3	1	2	0	1	2	3	0	1	1	1	4	1	1
C.A.	11	12	13	14	15	14	13	13	16	15	14	15	14	9	9	12	12	11	11
E kcal /mol	-7,0	-7,7	-7,6	-7,3	-7,6	-7,3	-7,1	-8,0	-8,1	-7,5	-7,9	-7,6	-7,2	-8,4	-9,0	-9,3	-8,7	-8,6	-8,9

Fonte: o próprio autor.

Ao analisar as energias de interação dos pesticidas com a enzima *AaAChE*, pode-se observar que em comparação com o Paraoxon, ocorrem interações menos estáveis com os pesticidas PM20, PM24, PMS20 e PYS18. Observa-se nestes casos, a não formação de ligações hidrogênio com a Serina 258 e, exceto no PM24, a não formação de contatos polares com a Histidina 501. Apesar de os pesticidas PM16, PY14, PY16, PY18 e PY20 apresentarem uma melhor estabilidade energética, quando comparados ao resultado do Paraoxon, ocorrem menos interações por contatos polares, não ocorrendo contatos polares com a Serina 258 e, no casos do PY16 e do PY18, não ocorrendo contatos polares ou apolares com a Histidina 501.

Já em relação às propostas 1 a 6, as interações formadas são energeticamente mais favoráveis. No caso da proposta 4, são observadas as mesmas quantidades de interações por contatos polares. Apesar de nesses casos não serem observadas interações com os resíduos da tríade catalítica da enzima, esses pesticidas interagem com a *AaAChE* na superfície enzimática, inibindo o acesso ao poço do sítio ativo.

Dessa maneira, de acordo com os parâmetros utilizados, foram selecionados os pesticidas PM18, PM22, PY22, Prop2 e Prop3 uma vez que essas moléculas satisfazem os requisitos de seleção.

Tabela 12: Parâmetros de seleção dos melhores pesticidas para a enzima *HssAChE* da primeira etapa.

<i>HssAChE</i>																			
	PAR AOX ON	PM1 6	PM1 8	PM2 0	PM2 2	PM2 4	PMS 20	PY1 4	PY1 6	PY1 8	PY2 0	PY2 2	PYS 18	Porp 1	Prop 2	Prop 3	Prop 4	Prop 5	Prop 6
S203			X	X	X		X		X						X		X		
H44 7															X				
E33 4	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
C.P. .	3	1	0	0	0	1	0	2	1	1	1	1	1	4	2	5	6	4	3
C.A.	11	14	17	16	18	19	17	10	12	15	16	17	16	12	12	13	12	13	16
E (kca	-7,0	-8,4	-8,1	-7,9	-7,8	-7,6	-7,9	-7,9	-8,0	-8,0	-7,8	-7,7	-8,0	-9,3	-8,6	-10	-10	-10	-9,6

l/mol l)																			
-------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Fonte: o próprio autor.

Ao analisar as energias de interação dos pesticidas com a enzima *HssAChE*, pode-se observar que em comparação com o Paraoxon, todos os pesticidas propostos apresentaram maior estabilidade energética. Entretanto, apenas a estabilidade energética não é um parâmetro suficiente para dizer que os pesticidas irão se manter no sítio ativo da proteína, principalmente os que interagem apenas por contatos apolares, uma vez que os contatos polares contribuem majoritariamente para a estabilização do ligante no sítio ativo da proteína.

Assim, ao observar os tipos de interação que ocorrem, chama-se atenção para uma redução na quantidade de interações por ligação hidrogênio quando comparados aos resultados do Paraoxon. No caso dos pesticidas PM18, PM20, PM22, PMS20, PY16 e Prop2 não ocorrem interações com a Serina 203. Dessa forma, os três melhores resultados de interações observados para a enzima *HssAChE* são o PM20, o PM22 e a Prop2, uma vez que não apresentam duas ou nenhuma interação do tipo Ligação Hidrogênio, além de não interagir com a Serina 203.

Dessa maneira, ao cruzar os resultados obtidos nas simulações de docagem molecular das duas enzimas, pode-se observar que os melhores resultados de acordo com os parâmetros adotados foram a Proposta 2 e o PM22 na primeira etapa de docagem.

5.5.2 Segunda etapa de cálculo

Na segunda etapa do cálculo de docagem, o grid box selecionado foi delimitado na região da entrada do sítio ativo das proteínas, de maneira que estivessem inseridas os aminoácidos Glu97, Tyr99, Tyr101, Tyr344, Gly346 e Ile347 da *AaAChE* e os aminoácidos Tyr72, Asp74, Leu76, Leu289, Ser293 e Val294 da *HssAChE*.

Os dados gerados a partir dos resultados que apresentaram menor energia de docagem molecular da segunda etapa estão descritos na tabela 13.

Tabela 13: Resultados das energias de docagem entre as enzimas acetilcolinesterase (*HssAChE* e *AaAChE*) e os pesticidas propostos a partir de adição de grupos farmacofóricos de interação a tirosina.

ENERGIAS DE DOCAGEM (kcal.mol ⁻¹)			
Pesticidas	<i>AaAChE</i>	<i>HssAChE</i>	Diferença Energética (kcal/mol)
PARAOXON	-7,0	-6,4	0,6 <i>AaAChE</i> < <i>HssAChE</i>

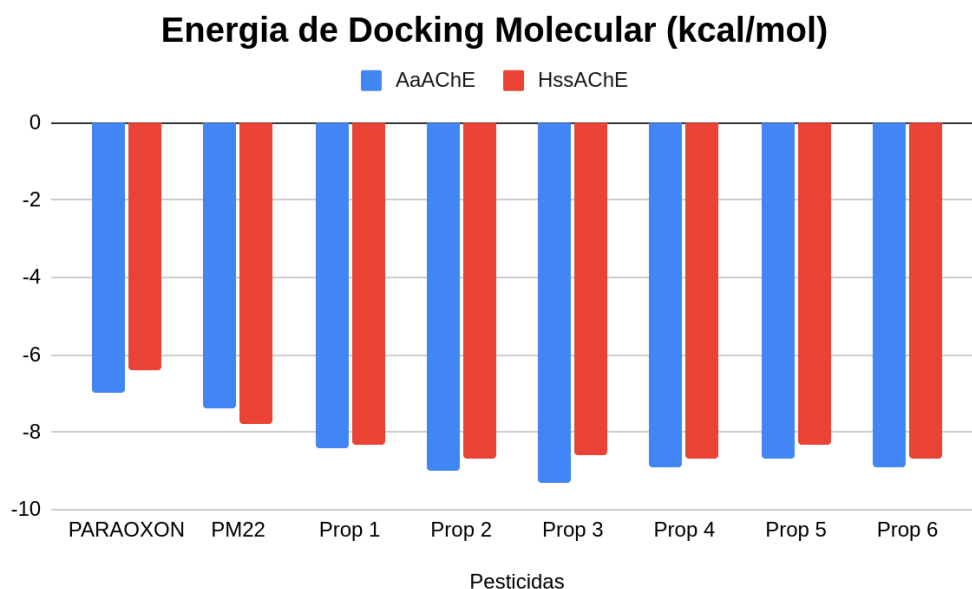
PM22	-7,4	-7,8	0,4 <i>AaAChE</i> > <i>HssAChE</i>
Prop 1	-8,4	-8,3	0,1 <i>AaAChE</i> < <i>HssAChE</i>
Prop 2	-9,0	-8,7	0,3 <i>AaAChE</i> < <i>HssAChE</i>
Prop 3	-9,3	-8,6	0,7 <i>AaAChE</i> < <i>HssAChE</i>
Prop 4	-8,9	-8,7	0,2 <i>AaAChE</i> < <i>HssAChE</i>
Prop 5	-8,7	-8,3	0,3 <i>AaAChE</i> < <i>HssAChE</i>
Prop 6	-8,9	-8,7	0,2 <i>AaAChE</i> < <i>HssAChE</i>

Fonte: o próprio autor.

Nesta etapa de docagem molecular, pode-se observar que as propostas 1 a 6 apresentaram menores resultados energéticos quando interagindo com a *AaAChE* do que com a *HssAChE*. Sabe-se que uma menor energia de docagem significa dizer que ocorreu uma melhor estabilização do complexo proteína-ligante. A maior diferença energética, 0,7 kcal/mol, foi observada para a proposta 3. Em segundo lugar, ficaram as propostas 2 e 5, com uma diferença energética de 0,3 kcal/mol. Entretanto, uma vez que a proposta 5 apresentou maior risco toxicológico aos humanos, com probabilidade de apresentar atividade carcinogênica, essa proposta foi descartada. Na sequência, as propostas 4 e 6 apresentaram diferença energética de 0,2 kcal/mol e a proposta 1 apresentou diferença de 0,1 kcal/mol. Ainda, nota-se que a proposta PM22 apresentou menor resultado energético para o complexo formado com a *HssAChE*, com diferença energética de 0,4 kcal/mol.

Os dados da tabela 13 foram transformados em um gráfico, conforme figura 14.

Figura 14: Gráfico de energia de interação, em kcal/mol, dos 8 pesticidas docados as enzimas *AaAChE* e *HssAChE* - Etapa 2.



Fonte: o próprio autor.

Da mesma maneira que na primeira etapa, foi realizado o mapeamento dos aminoácidos das enzimas que interagem com cada pesticida proposto. Observa-se nas tabelas 14 e 15 as análises obtidas. Em amarelo, aminoácidos mutantes da entrada do sítio ativo das enzimas AChE`s.

A legenda a seguir será utilizada para as tabelas de número 14 a 17.

Legenda

	Contato polar		aminoácidos mutantes da região da entrada do sítio ativo	X	Não ocorre interação
	Contato apolar		tríade catalítica		

Tabela 14: Resultados de docagem dos pesticidas propostos (Propostas 1 a 6 e PM22) com a enzima AaAChE

AaAChE								
Aminoácidos	Paraoxon	PROP1	PROP2	PROP3	PROP4	PROP5	PROP6	PM22
His501		X	X	X	X	X	X	
Ser258		X	X	X	X	X	X	X
Glu387	X	X	X	X	X	X	X	X
Tyr101	X							
Trp341								

Arg98	X							X
Tyr99								
Tyr390				X				
Phe391								
Tyr394	X							
Asp395								
Tyr344								
Phe396	X							
Glu97	X							X
Asn342	X	X	X			X		
Val338	X	X	X			X	X	
Phe350		X	X		X			
Trp111		X	X	X	X	X	X	
Gly173		X	X	X	X	X	X	
Ser177	X	X	X	X	X	X	X	

Fonte: o próprio autor.

Tabela 15: Resultados de docagem dos pesticidas propostos (Propostas 1 a 6 e PM22) com a enzima *HssAChE*

<i>HssAChE</i>								
Aminoácidos	Paraoxon	PROP1	PROP2	PROP3	PROP4	PROP5	PROP6	PM22
Ser203	X	X	X	X	X	X	X	
His447	X	X	X	X	X	X	X	X
Glu334	X	X	X	X	X	X	X	X
Phe295								
Tyr124								
Tyr337	X			X	X			
Phe338	X							
Leu289	X							X
Gln291	X							X
Glu292	X							X
Ser293	X							
Trp286	X							
Leu76	X							

Tyr72	X							
Asp74	X			X		X	X	
Tyr341								
Val294	X							X
Thr75	X	X	X	X		X		X
Arg296	X	X	X	X		X	X	
Phe297	X	X	X	X		X	X	
Gly121	X	X	X	X	X	X	X	
Ser125	X	X	X	X	X	X	X	
Trp86	X	X	X	X	X	X	X	
Asn87	X	X	X	X	X	X	X	

Fonte: o próprio autor.

Ao analisar as tabelas 14 e 15, observa-se que as propostas 1 a 6 não interagem com os aminoácidos da tríade catalítica em nenhum dos dois casos (*HssAChE* e *AaAChE*). Uma vez que estas propostas foram planejadas com um maior volume, de maneira a ocupar a região da entrada do sítio ativo ao invés de se posicionarem no poço do mesmo, isto está de acordo com o que foi proposto.

O pesticida PM22 apresentou interação com os resíduos His501 da *AaAChE* e Ser203 da *HssAChE* mesmo com a alteração da posição do *grid box* realizada na etapa 2. Esta interação caracteriza um posicionamento desta molécula na região do poço do sítio ativo desta proteína após os cálculos de docagem molecular.

As propostas de 1 a 6 realizam algum tipo de interação com os aminoácidos Glu97, Tyr99, Tyr101 e Tyr344, que são quatro das seis mutações presentes na região da entrada do sítio ativo da enzima *AaAChE*. É importante ressaltar que as propostas 1, 2, 5 e 6 interagem por ligação hidrogênio com o resíduo Tyr101 e a proposta 3 realiza uma ligação hidrogênio com a Tyr344.

As propostas 1, 2 e 4 interagem com os seis aminoácidos mutantes da região da entrada do sítio ativo da *HssAChE*, que são Tyr72, Asp74, Leu76, Leu289, Ser293 e Val294. Já as propostas 3, 5 e 6 não interagem com o resíduo Asp74, mas interagem com os demais. Ressalta-se que ocorrem contatos polares nas propostas 1 a 6 com o resíduo Ser293; nas propostas 3 e 6 com o resíduo Tyr72 e na proposta 4 com os resíduos Leu76 e Asp74.

As tabelas 16 e 17 apresentam a relação dos parâmetros utilizados para escolha dos melhores resultados da segunda etapa de docagem.

Tabela 16: Parâmetros de seleção dos melhores pesticidas para a enzima *AaAChE* da segunda etapa.

<i>AaAChE</i>								
	Paraoxon	PROP1	PROP2	PROP3	PROP4	PROP5	PROP6	PM22
S258		X	X	X	X	X	X	
H501		X	X	X	X	X	X	X
E387	X	X	X	X	X	X	X	X
C.P.,	1	1	1	2	1	1	1	1
C.A.	10	10	10	11	12	11	12	15
E kcal/mol	-7,0	-8,4	-9,0	-9,3	-8,9	-8,7	-8,9	-7,4

Fonte: o próprio autor.

A ordem crescente de energia dos resultados das propostas da segunda etapa de docagem com a enzima *AaAChE* foi PROP3, PROP2, PROP4 e PROP6 com a mesma energia, PROP5, PROP1 e PM22. Dessa maneira, uma vez que espera-se uma melhor estabilização desses pesticidas com a proteína do mosquito, os dois melhores resultados no quesito energético foram as propostas 3 (PROP3) e 2 (PROP2).

Em relação a quantidade de contatos polares observados na interação proteína-ligante, a proposta 3 (PROP3) apresentou duas ligações hidrogênio e as demais propostas apresentaram apenas uma, observando que apenas a proposta 4 (PROP4) não interagiu por contato polar com algum dos resíduos mutantes da entrada do sítio ativo da *AaAChE*.

Em relação ao número de interações por contatos apolares, observou-se uma pequena variação entre as propostas, sendo que o PM22 apresentou maior número de interações com quinze, seguido das propostas 4 e 6 com doze interações cada, as propostas 3 e 5 com onze interações e as propostas 1 e 2 com dez interações por contatos apolares. Esse parâmetro, entretanto, possui menor relevância quando comparado aos parâmetros de energia de interação e número de ligações hidrogênio, uma vez que contribui mais francamente para a estabilização do ligante docado na proteína.

Em relação à toxicidade das moléculas, a ordem crescente de toxicidade estimada a partir da dose letal estimada a 50% da população (LD50), em miligramas da substância por quilo corpóreo, é em primeiro lugar a proposta 4 (PROP4) com LD50 de 2000 mg/kg, seguido do PM22 e da proposta 1 (PROP1) ambos com LD50 de 1500 mg/kg, na sequência a proposta 6 (PROP6), com LD50 de 471 mg/kg, a proposta 2 (PROP2) com LD50 de 400 mg/kg, a

proposta 3 (PROP3) com LD50 de 344 mg/kg e por último a proposta 5 (PROP5) com LD50 de 215 mg/kg. Uma vez que foi estimado atividade no domínio de ligação receptor estrogênico da proposta 4 e atividade carcinogênica nas propostas 5 e 6, restaram as propostas PM22, PROP1, PROP2 e PROP3 como menos nocivas à saúde humana a partir das estimativas realizadas pelo servidor ProTox II.

Dessa maneira, as melhores propostas selecionadas para a segunda etapa em relação a enzima AaAChE foram a proposta 3, seguida da proposta 2.

Tabela 17: Parâmetros de seleção dos melhores pesticidas para a enzima *HssAChE* da segunda etapa.

<i>HssAChE</i>								
	Paraoxon	PROP1	PROP2	PROP3	PROP4	PROP5	PROP6	PM22
S203	X	X	X	X	X	X	X	
H447	X	X	X	X	X	X	X	X
E334	X	X	X	X	X	X	X	X
C.P..	1	2	2	4	7	2	4	1
C.A.	2	12	12	8	9	11	10	16
E (kcal/mol)	-6,4	-8,3	-8,7	-8,6	-8,7	-8,3	-8,7	-7,8

A ordem crescente de energia dos resultados das propostas da segunda etapa de docagem com a enzima *HssAChE* foi as propostas 2, 4 e 6 com energia de interação de -8,7 kcal/mol, proposta 3 com -8,6 kcal/mol, prop 1 e 5 com -8,3 kcal/mol e PM22 com -7,8 kcal/mol. Uma vez que se espera obter pesticidas que interajam mais fracamente com a enzima humana, as melhores propostas energeticamente falando foram as que obtiveram menores energias de interação quando comparados aos resultados obtidos com as docagens entre os pesticidas com a enzima AaAChE. Nesse caso, fala-se da diferença energética entre os resultados obtidos. Ao observarmos a tabela 13, a diferença energética descrita aponta que os melhores pesticidas (que interagem mais fracamente com a enzima humana quando comparados à enzima de mosquito) são as propostas 3, 2 e 5. Dessa maneira, apesar de a proposta PM22 apresentar maior valor de energia de interação, este resultado não é o melhor, uma vez que apresenta uma diferença energética de 0,4 kcal/mol maior para a interação observada com a AaAChE do que com a enzima *HssAChE*.

Em relação aos contatos polares, observa-se que as propostas 4, 3 e 6 apresentam maior quantidade de ligações hidrogênio, sendo que a proposta 4 interage com três aminoácidos mutantes da entrada do sítio ativo da *HssAChE* (Ser293, Leu76 e Asp74) e a proposta 3, com dois desses aminoácidos (Ser293 e Tyr72). Os demais pesticidas propostos interagem apenas com a Ser293, podendo ocorrer contatos polares com outros aminoácidos que não os seis aminoácidos mutantes em questão. Uma vez que espera-se uma menor estabilização dos pesticidas com a *HssAChE*, os resultados que apresentam menos contatos polares são mais desejáveis. Assim, em relação a este parâmetro, os melhores resultados apresentados foram o PM22 com uma interação, as propostas 1, 2 e 5 com duas ligações hidrogênio cada, PROP3 com quatro interações e PROP 4 com sete interações.

Observa-se que apenas o pesticida PM22 interage com um resíduo da tríade catalítica da enzima *HssAChE*. Já em relação aos contatos apolares, a proposta 3 (PROP3) apresenta menor número de interações, seguido das propostas 4 com oito interações por contatos apolares, 6 com nove contatos, 5 com dez contatos, 1 e 2 com doze interações e o PM22 com 16 interações.

Como dito anteriormente, as propostas PM22, PROP1, PROP2 e PROP3 apresentaram menos nocivas à saúde humana a partir das estimativas realizadas pelo servidor ProTox II. Levando-se em consideração todos esses aspectos, as propostas selecionadas como melhores resultados para a segunda etapa de docagem molecular em relação a proteína *HssAChE* foram as propostas 2 e 3.

Ao final da análise dos resultados de docagem molecular, os dois melhores resultados na etapa 1 e os dois melhores resultados na etapa dois foram selecionadas para a realização de simulações por dinâmica molecular. Além disso, também foi utilizado o paraoxon, como forma de comparação.

5.6 RESULTADOS DE DINÂMICA MOLECULAR

Após as simulações por dinâmica molecular dos 12 complexos, foram realizadas análises da energia total dos sistemas, RMSD do carbono alfa da proteína, distância entre os centros de massas, RMSF, Raio de Giro, Ligações Hidrogênio e MM-PBSA a fim de verificar a qualidade das dinâmicas e observar os melhores resultados dentre os pesticidas propostos.

Para fins de organização, as análises foram separadas em duas etapas, concordantes com as etapas anteriores de docagem molecular, de onde foram selecionados os resultados para simulação por dinâmica molecular. Dessa maneira, as análises seguem nos tópicos 5.6.1 e 5.6.2.

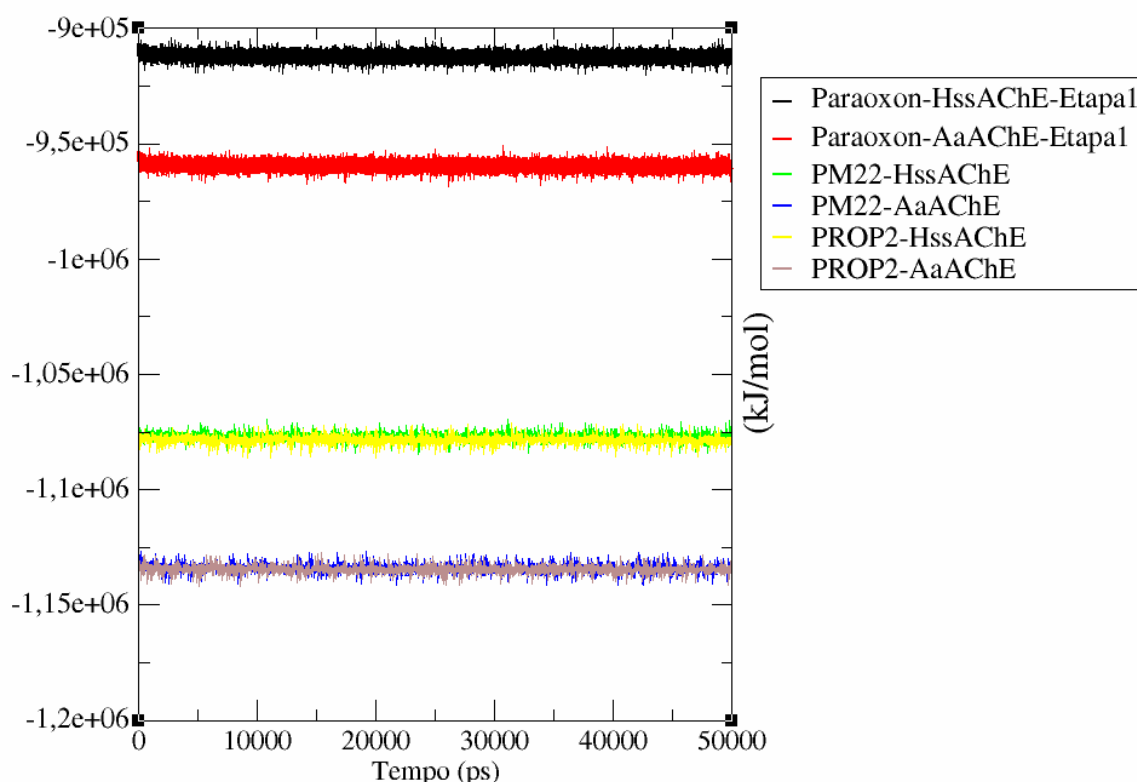
5.6.1 Resultados de DM advindos dos sistemas da primeira etapa de Docagem Molecular

5.6.1.1 Energia Total

A figura 15 mostra o gráfico de energia total ao longo do tempo de simulação, onde estão representados os resultados obtidos nos sistemas PM22-*Aa*, PM22-*Hss*, PROP2-*Aa*, PROP2-*Hss*, Paraoxon-*Aa*-etapa1 e Paraoxon-*Hss*-etapa1. A análise da variação total de energia do sistema, no caso das enzimas AChE's, buscam a verificação da estabilidade do sistema, de acordo com o período de tempo da simulação. Ao analisar a figura 15, observa-se que os quatro sistemas avaliados apresentaram pouca variação energética ao longo do tempo de simulação de dinâmica molecular. Isso significa dizer que os sistemas se mantiveram estáveis ao longo das simulações. Para os resultados gerados a partir da primeira etapa de docagem, foram observadas variações médias de $(-1134087,136 \pm 0,424)$ kJ/mol para o sistema PM22-*Aa*, para o sistema PM22-*Hss* $(-1076891,588 \pm 0,402)$ kJ/mol, para o sistema PROP2-*Aa* $(-1134679,199 \pm 0,419)$ kJ/mol, para o sistema PROP2-*Hss* $(-1078565,304 \pm 0,413)$ kJ/mol, para o sistema Paraoxon-*Aa*-etapa1 $(-958317,4353 \pm 0,5747)$ e para o sistema Paraoxon-*Hss*-etapa1 $(-910988,1546 \pm 0,5305)$.

Figura 15: Energia total dos sistemas simulados por dinâmica molecular a partir dos dois melhores resultados de pesticidas selecionados na primeira etapa de docagem molecular.

Energia Total



5.6.1.2 RMSD

A Raiz do Desvio Médio Quadrático (Root mean square deviation, RMSD) é um tipo de medida de dispersão e indica se os valores utilizados estão relativamente próximos ou separados em torno de uma medida de posição: a média (Shiguti e Shiguti, 2012).

O cálculo de RMSD é feito para comparação das estruturas e no caso da Dinâmica Molecular pode ser utilizado para a comparação entre conformações espaciais calculadas ao longo do tempo em relação à estrutura média temporal deste conjunto (GONÇALVES, 2005).

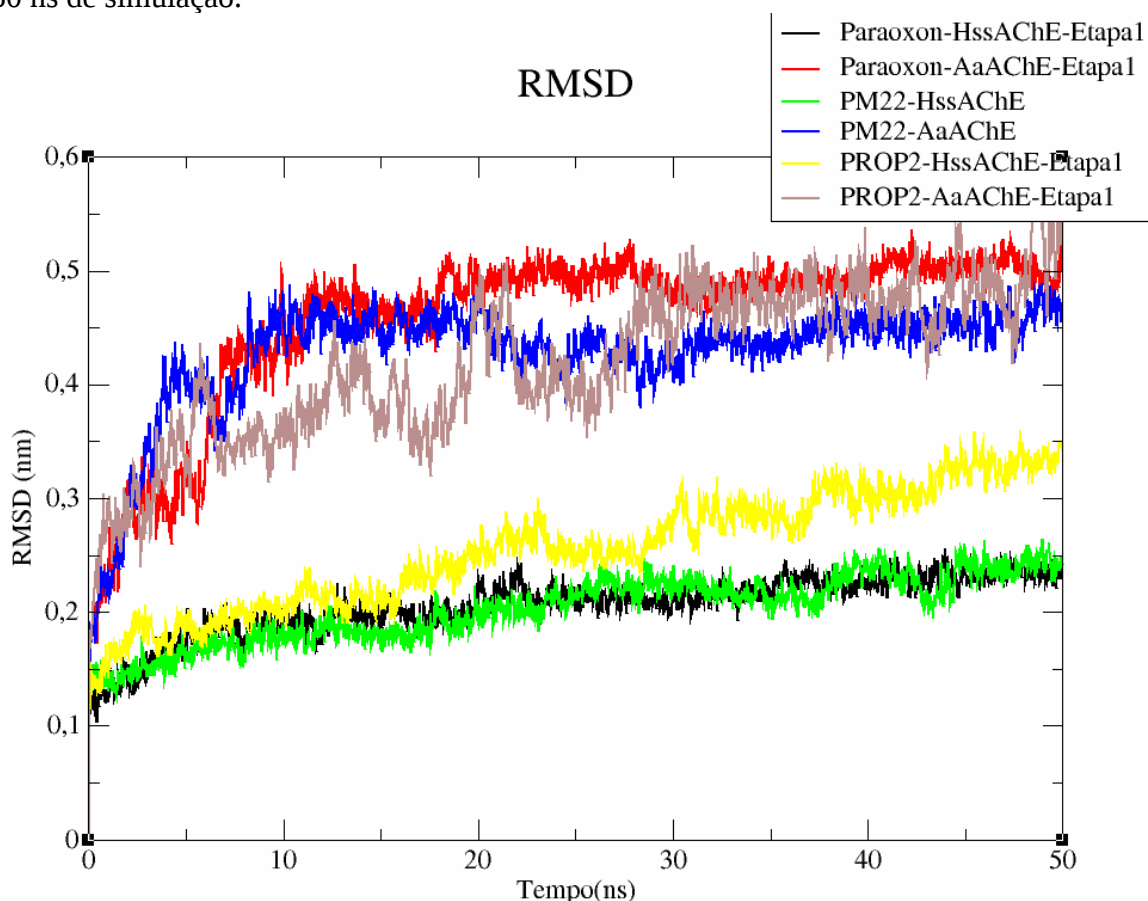
A avaliação do cálculo do RMSD quantifica a deformação da estrutura em comparação à referência do ponto inicial, e essa é uma das medidas mais comuns para se avaliar a condição da proteína ao longo da trajetória. De acordo com GONÇALVES (2005, P. 53) “Este parâmetro pode dar uma ideia do quanto a estrutura tridimensional flutuou ao longo do tempo, bem como permitir a observação de flutuações locais, como por exemplo, quais os resíduos com maior mobilidade durante uma dinâmica, para o caso de proteínas.”

Pode-se observar a média do RMSD durante o tempo de simulação, de maneira que pequenas oscilações na média indicam posições de equilíbrio, já mudanças bruscas indicam

alterações importantes na conformação da molécula em estudo. (GONÇALVES, 2005)

Os valores de RMSD foram analisados para verificar a estabilidade da proteína e do ligante em cada complexo, conforme observado na figura 16.

Figura 16: RMSD comparativo entre os complexos da primeira etapa de DM no tempo de 0 a 50 ns de simulação.



A variação média do complexo Paraoxon-*HssAChE*-Etapa1 foi de $(0,2057 \pm 0,00001073)$ nm, já do complexo Paraoxon-*AaAChE*-Etapa1 foi de $0,4578 \pm 0,00002932$ nm. Para o complexo PM22-*Aa* a variação foi de $(0,4276 \pm 0,0010)$ nm. Já o complexo PM22-*Hss* variou em média $(0,2029 \pm 0,0006)$ nm. Apesar do complexo formado com a proteína do mosquito apresentar uma variação maior em relação ao complexo formado com a proteína humana no período de 50 ns de simulação, o erro observado foi na ordem de 0,1 %.

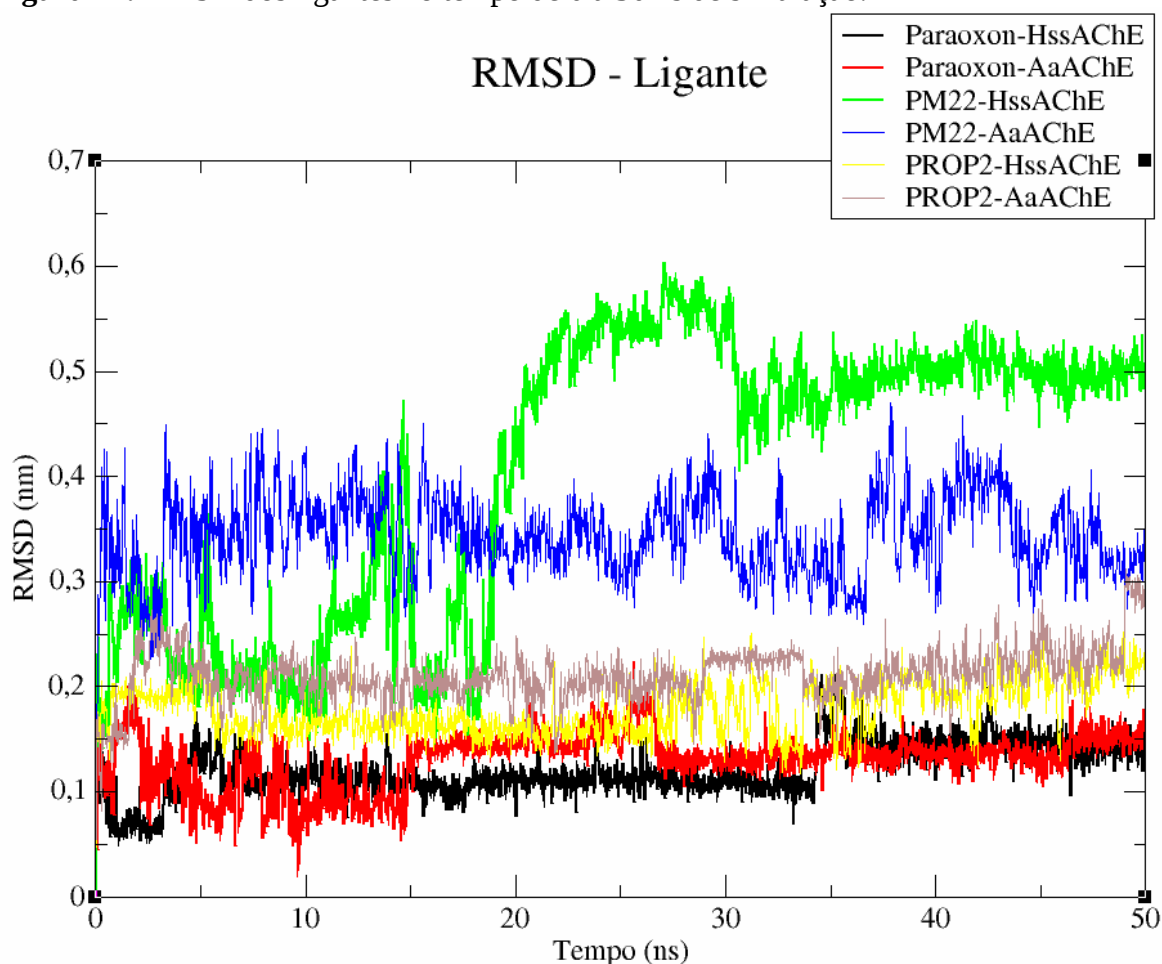
Em relação ao complexo PROP2-*Aa*, foi observado uma variação média de $(0,4200 \pm 0,0014)$ nm e o complexo PROP2-*Hss* apresentou variação média de $(0,2551 \pm 0,0010)$ nm.

Observa-se ainda que as maiores variações de RMSD dos complexos formados com a enzima *AaAChE* ocorreram no início das simulações, o que indica que os complexos tendem a se estabilizar no decorrer do tempo. Enquanto isso, os complexos formados com a enzima

HssAChE apresentaram um aumento gradual ao longo do tempo.

A figura 17 apresenta um gráfico de RMSD dos ligantes versus o tempo de simulação.

Figura 17: RMSD dos ligantes no tempo de 0 a 50 ns de simulação.



Foram observadas variações médias de $(0,3438 \pm 0,0008)$ nm em “PM22-AaAChE”, $(0,4053 \pm 0,0027)$ nm em “PM22-HssAChE”, $(0,2110 \pm 0,0005)$ nm em “PROP2-AaAChE”, $(0,1786 \pm 0,0005)$ nm em “PROP2-HssAChE”, $(0,1207 \pm 0,00001002)$ para o complexo Paraoxon-HssAChE e $(0,1305 \pm 0,00001059)$ para o complexo Paraoxon-AaAChE.

Ao observar os ligantes de maneira isolada, verifica-se que os menores valores de RMSD foram observados nos dois complexos com o pesticida Paraoxon. Já a proposta PM22-Aa apresenta alguns picos no gráfico de RMSD, entretanto, como observado na figura 18, o ligante não apresenta variação significativa em sua conformação, estando em uma posição predominantemente estendida.

Podemos perceber que ocorre uma variação acentuada na proposta PM22-Hss, observa-se picos importantes em 5, 10 e 20 ns, entretanto, o mais importante a se observar é o que ocorre entre 20 e 30 ns. Observa-se neste intervalo de simulação uma grande variação na

conformação do ligante, de maneira que a molécula passa de uma conformação estendida para uma conformação de “dobra”, conforme observado na figura 19.

Figura 18: Variação na conformação do ligante PM22 durante a simulação por dinâmica molecular com a enzima *AaAChE*.

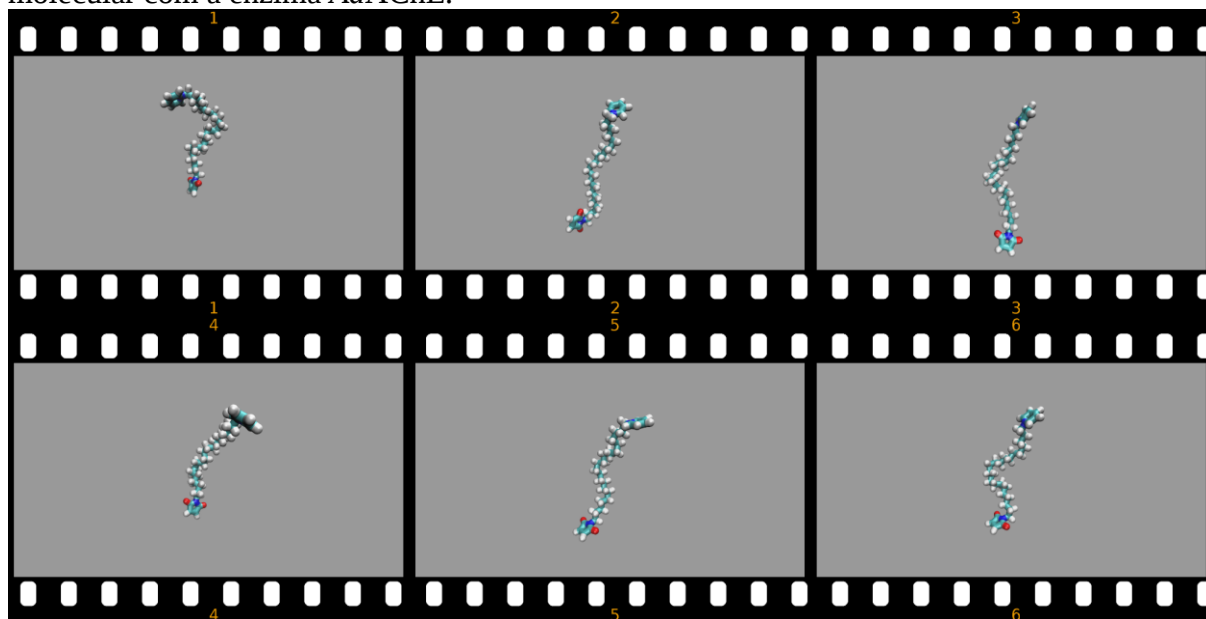
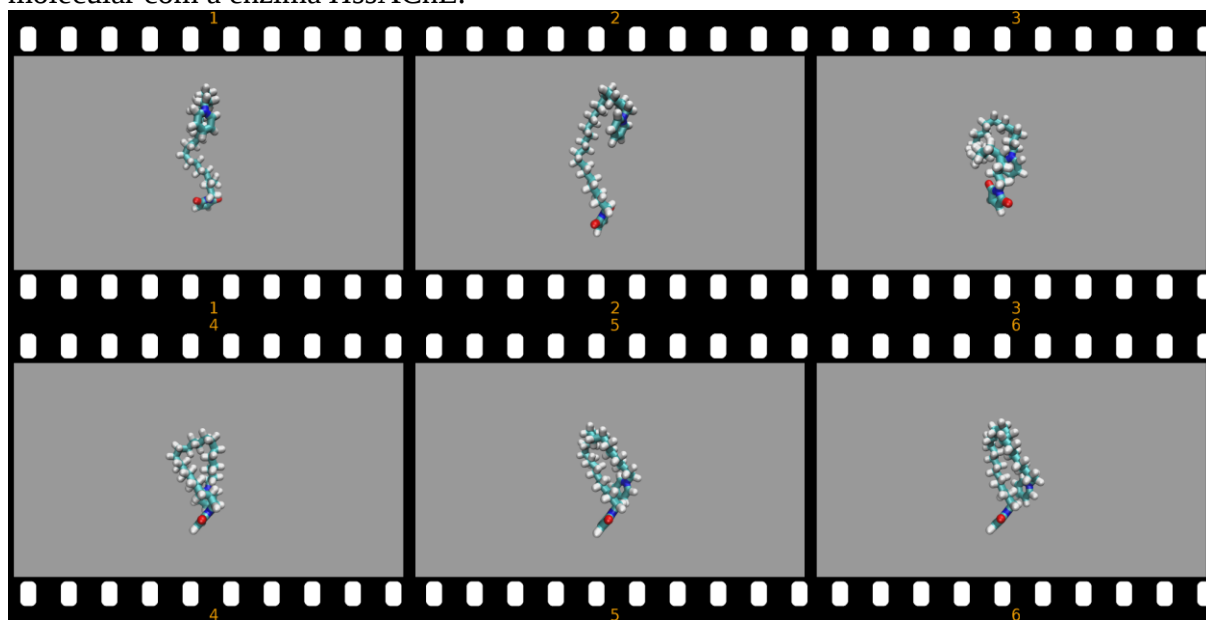


Figura 19: Variação na conformação do ligante PM22 durante a simulação por dinâmica molecular com a enzima *HssAChE*.



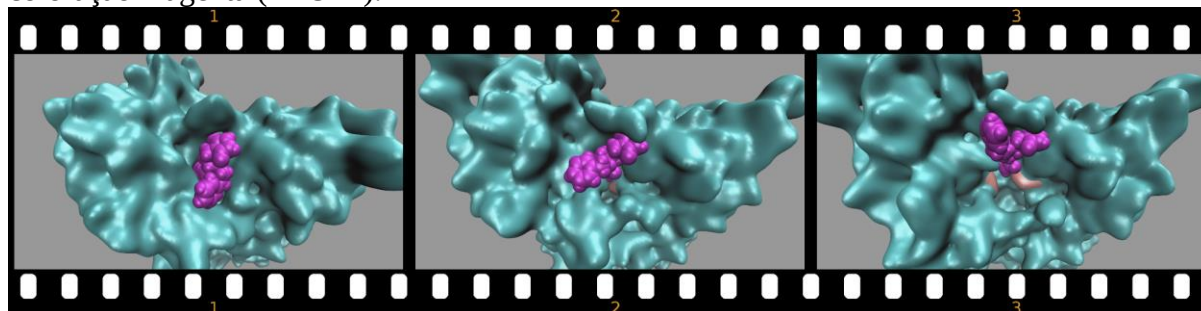
Os quadros da figura 19 foram selecionados a cada 10 ns de simulação, iniciando no tempo igual a 0 ns. Em conformidade com os dados observados no RMSD do ligante PM22 do complexo com a enzima *HssAChE*, é observada uma grande variação na posição tridimensional do ligante durante a simulação por DM. Do tempo de simulação igual a zero (quadro 1), ao tempo tempo igual a 10 ns (quadro 2), o ligante alcança uma conformação mais estendida. No

tempo de simulação igual a 20 ns (quadro 3), ocorre uma dobra, fazendo com que o anel piridínico se aproxime do anel de cinco membros. Essa conformação se estabiliza, conforme observados nos quadros 4, 5 e 6.

O gráfico de RMSD da molécula de PROP2 com a enzima *AaAChE* apresenta poucas alterações, de maneira que o pesticida tende a manter certa estabilidade ao longo do tempo de simulação. Inicialmente, o ajuste da posição do ligante em relação à proteína causa um ligeiro aumento no valor do desvio, ocorrendo uma segunda flutuação importante no tempo de simulação próximo a 30 ns. Essa flutuação condiz com dados observados no raio de giro da proteína, indicando um possível movimento de rotação da mesma, ocasionando assim uma flutuação também no gráfico de RMSD do ligante.

O sistema PROP2-*Hss* apresentou um gráfico com flutuações globais que demonstram o ajuste do ligante em relação à proteína ao longo do tempo de simulação. A figura 20 apresenta 3 diferentes posições que são observadas nos tempo iguais a 0 ns, 25 ns e 50 ns. Assim, observa-se que as flutuações do RMSD observadas no último gráfico da figura 17 correspondem a essas variações de uma parte da molécula que varre a superfície da proteína em busca de uma melhor complementaridade eletrostática.

Figura 20: Quadros de simulação por DM do complexo PROP2-*Hss*. Representação em superfície molecular da enzima *HssAChE* (coloração anil) e em representação esferas com coloração magenta (PROP2).



Observa-se que ocorreu uma pequena variação na posição do ligante PROP2 durante o período da simulação por DM. Dessa maneira, o gráfico de RMSD apresentou uma flutuação pequena quando comparado aos demais sistemas.

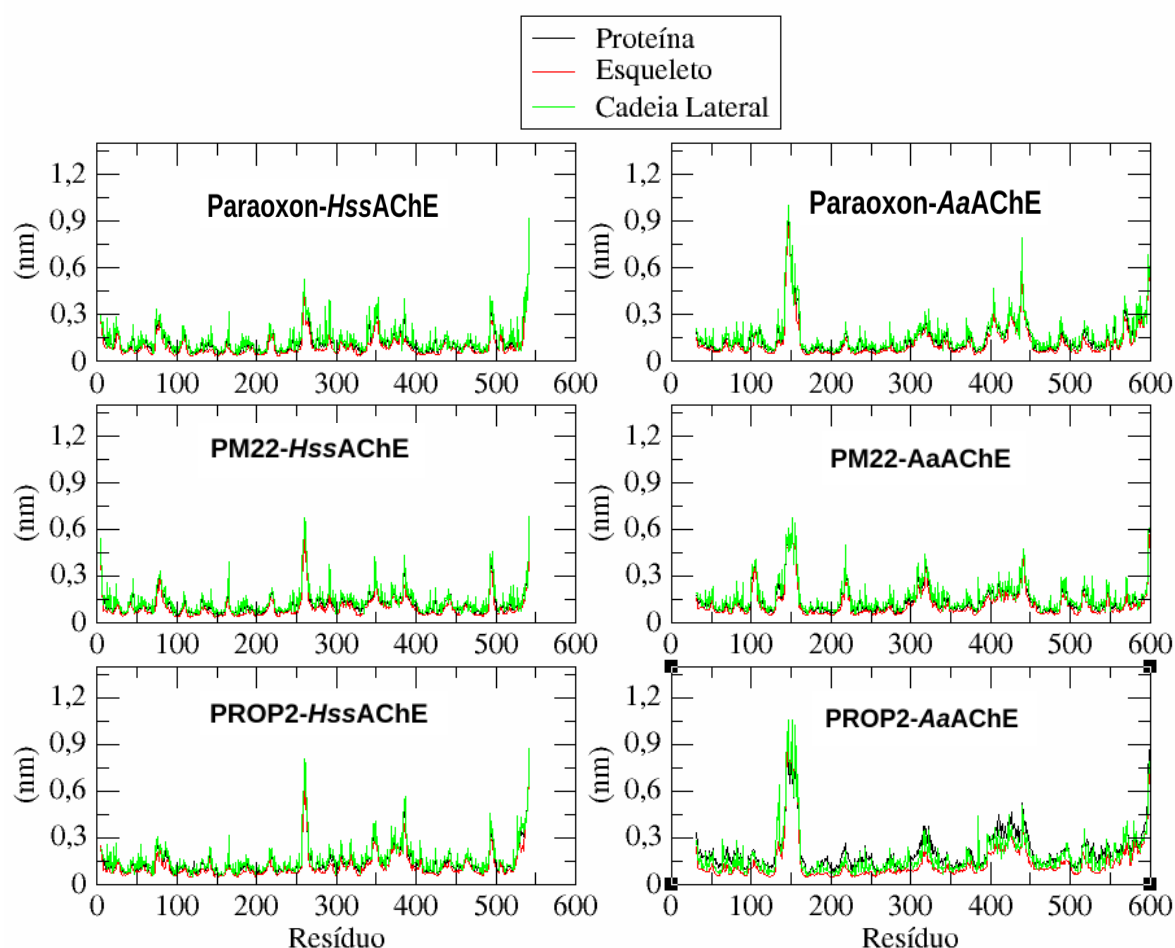
5.6.1.3 RMSF

A flutuação do desvio médio quadrático foi realizada para verificar a flexibilidade local dos resíduos componentes das estruturas durante a trajetória obtida nos 50 ns de simulação de dinâmica molecular. Esse cálculo é realizado com o objetivo de observar em quais regiões

ocorreram maiores flutuações nos sistemas, ou seja, quanto maiores os valores de RMSF, maior a flexibilidade naquela região da proteína. (FREITAS, 2017)

A figura 21 apresenta o RMSF dos sistemas PM22-Aa, PM22-Hss, PROP2-Aa e PROP2-Hss. As regiões observadas nesta figura são “*side chain*” em laranja, que corresponde às cadeias laterais da proteína, “*Backbone*” em preto, que corresponde ao esqueleto proteico e em verde “*Protein*”, que é a proteína como um todo.

Figura 21: RMSF 2D dos sistemas PM22-Aa, PM22-Hss, PROP2-Aa e PROP2-Hss.



Os aminoácidos que apresentam maior flutuação no complexo PM22-AaAChE são Phe105, Ala106, Phe142, Gly143, Asn144, Asn145, Asp146, Tyr147, Phe148, Gln149, Asp151, Asp152, Asp153, Phe154, Gln155, Arg156, Gln157, Asn218, Lys318, Glu440, Ser441, Gly442, Ala597, Trp598 e Ser599.

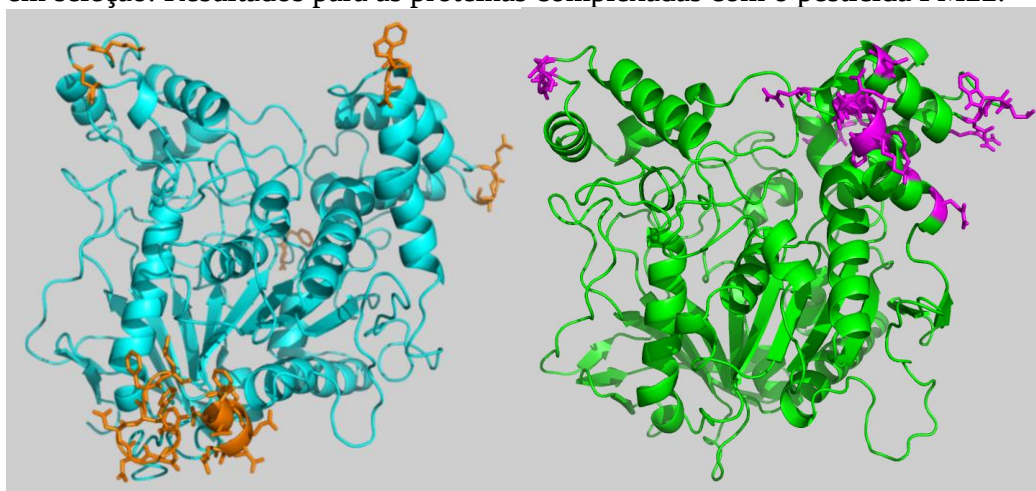
Em relação ao complexo PM22-HssAChE os aminoácidos que apresentaram RMSF maior do que 0,4 nm foram Asp5, Cys257, Pro258, Pro259, Gly260, Gly261, Thr262, Gly263,

Lys348, Trp385, Arg493, Asp494, Lys496, Leu540, Ser541 e Ala542. Esses resíduos estão localizados em regiões da cadeia lateral da enzima, e por serem regiões acessíveis ao solvente apresentam maior flexibilidade. Além disso, alguns desses resíduos fazem parte de *loops* da proteína, além de aminoácidos C,N-terminais.

Como esperado, as regiões correspondentes às folhas beta e alfa hélice apresentaram as menores flutuações, indicando serem as regiões mais estáveis. Enquanto as regiões de cadeia lateral, apresentaram maior flutuação do desvio médio quadrático.

A figura 22 apresenta a enzima *HssAChE* em verde e a enzima *AaAChE* em ciano, os aminoácidos que apresentam RMSF maior que 0,4 nm estão representados em *Sticks* com coloração magenta e laranja, respectivamente.

Figura 22: Em ciano *AaAChE* e em verde *HssAChE*. Aminoácidos com RMSF maior do que 0,4 nm em seleção. Resultados para as proteínas complexadas com o pesticida PM22.

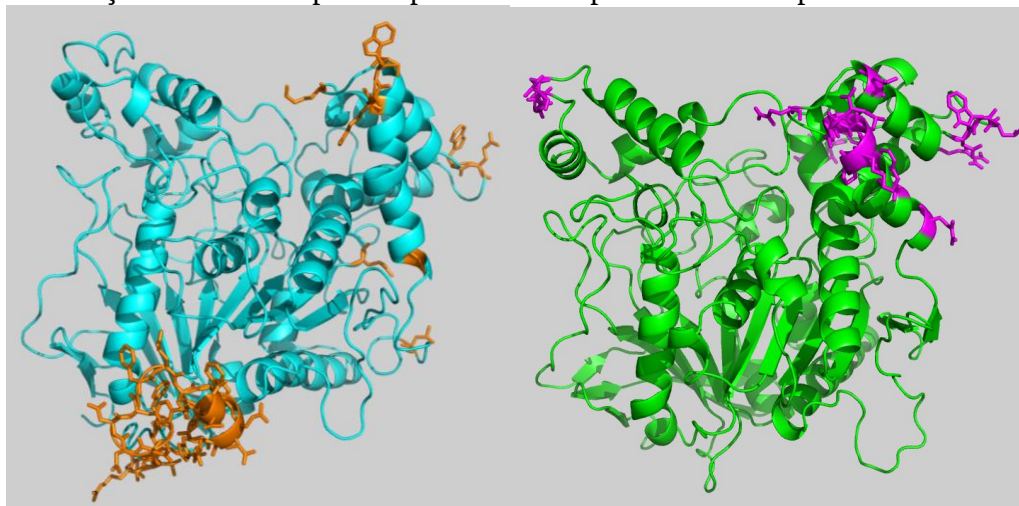


Em relação ao complexo PROP2-*AaAChE*, os aminoácidos que apresentaram RMSF maior do que 0,4 nm foram Thr132, Arg133, Leu134, Arg135, Asn141, Phe142, Gly143, Asn144, Asn145, Asp146, Tyr147, Phe148, Gln149, Asp150, Asp151, Asp152, Asp153, Phe154, Gln155, Arg156, Gln157, His158, Gln159, Arg385, Lys423, Trp439, Glu440, Leu571, Pro580, Arg596, Ala597, Trp598 e Ser599.

Já para o complexo PROP2-*HssAChE*, os aminoácidos com maior flutuação são Pro259, Gly260, Gly261, Phe346, Lys348, Asp349, Gln369, Leu373, Asp384, Trp385, Leu386, Arg393, Gln527, Phe531, Leu536, Pro537, Lys538, Leu539, Leu540, Ser541 e Ala542.

A figura 23 apresenta os modelos tridimensionais das proteínas *AaAChE* e *HssAChE* e em destaque os aminoácidos que apresentam RMSF maior do que 0,4 nm.

Figura 23: Em ciano *AaAChE* e em verde *HssAChE*. Aminoácidos com RMSF maior do que 0,4 nm em seleção. Resultados para as proteínas complexadas com o pesticida PROP2.



5.6.1.4 Raio de Giro

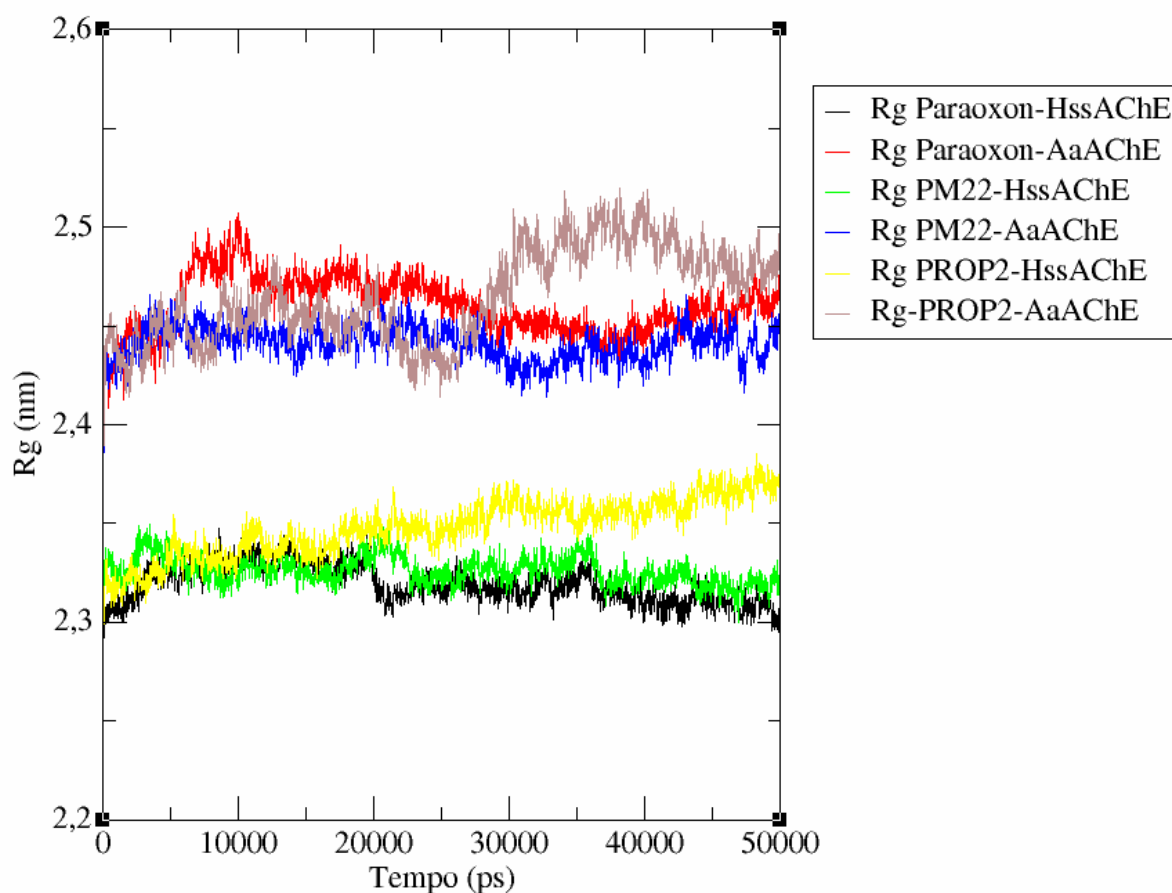
Sabe-se que o Raio de Giro é uma ferramenta que analisa a estabilidade do complexo ligante-proteína ao longo da simulação por dinâmica molecular. Esse parâmetro calcula a compactação de biomoléculas, gerando informações a respeito da evolução da geometria da proteína, ou seja, movimentos periódicos de contração, expansão e também enovelamento e desnaturação (Shahbaaz *et al.*, 2019 *apud* Spadeto *et al.*, 2020; Ishak, *et al.*, 2017 *apud* FREITAS, 2017).

Este parâmetro pode ser observado na figura 24, de maneira que é observada uma oscilação importante para o complexo PROP2-*Aa* a partir de 25 ns de simulação e os demais complexos apresentam somente oscilações de pequenas amplitudes.

Nota-se que a oscilação apresentada pelo complexo PROP2-*Aa* apresenta crescimento do Rg após 25 ns de simulação, mas volta a diminuir a partir de 40 ns. Entretanto, como a simulação apresentou um tempo total de 50 ns, esses movimentos não são conclusivos uma vez que a amostragem temporal não nos dá informações suficientes para a análise de movimentos de baixa frequência e grandes amplitudes, por exemplo. (GUIZADO, 2008)

Figura 24: Raio de giro das proteínas *AaAChE* e *HssAChE* da primeira etapa.

Raio de Giro



Observa-se um aumento no raio de giro (R_g) de ambas as enzimas quando elas estão interagindo com o pesticida PROP2 ao final da simulação, de maneira que $R_g \text{ PM22-Hss} < R_g \text{ PROP2-Hss}$ e $R_g \text{ PM22-Aa} < R_g \text{ PROP2-Aa}$. Assim, sugere-se que ocorre um pequeno aumento na compactação geral da estrutura quando se trata dos complexos formados com o pesticida PM22. Os complexos formados com o pesticida PROP2 apresentam crescimento nos valores de raio de giro ao longo do tempo de simulação, embora nenhuma delas tenha atingido valores variáveis o bastante que pudessem indicar desenovelamento ou desnaturação proteica. Em relação ao raio de giro das proteínas quando estas interagem com o paraoxon, ocorre um ligeiro aumento em relação ao complexo Paraoxon-AaAChE. Já o complexo Paraoxon-HssAChE apresenta o menor valor de raio de giro quando comparado com os demais complexos ao final da simulação por DM.

O sistema PM22-AaAChE inicia a simulação com um valor de raio de giro de 2,36 nm e finaliza em 2,45 nm, apresentando um valor médio de $(2,44 \pm 0,000178)$ nm, o sistema PM22-HssAChE apresenta raio de giro igual a 2,29 no início da simulação por DM e finaliza em 2,32

nm, apresentando média de $(2,32 \pm 0,000146)$ nm. O sistema PROP2-*AaAChE* apresentou raio de giro igual a 2,36 no início da simulação e 2,50 no final da simulação, com valor médio de $(2,46 \pm 0,000466)$ nm. Já o sistema PROP2-*HssAChE* apresentou média de $(2,35 \pm 0,000291)$ nm, tendo como valor de Rg inicial de 2,28 nm e ao final da simulação um valor de 2,37 nm. A pequena variação de valores sugeriu estruturas estáveis quanto ao seu empacotamento.

5.6.1.5 Distância entre os centros de Massas

As distâncias médias entre os centros de massas das proteínas e dos ligantes estão descritas na tabela 18.

Tabela 18: Distâncias médias entre os centros de massas das proteínas com os ligantes.

Ligante-Proteína	Distância média entre centros de massas (nm)
PM22- <i>AaAChE</i>	$2,02\text{E-}01 \pm 0,0003$
PM22- <i>HssAChE</i>	$1,90\text{E-}01 \pm 0,0003$
PROP2- <i>AaAChE</i>	$1,94\text{E-}01 \pm 0,0003$
PROP2- <i>HssAChE</i>	$1,96\text{E-}01 \pm 0,0003$
Paraoxon- <i>AaAChE</i>	$2,11\text{E-}01 \pm 0,000006$
Paraoxon- <i>HssAChE</i>	$1,96\text{E-}01 \pm 0,000007$

Esses valores médios mostram que ao analisar as distâncias entre os ligantes e as proteínas ao longo do tempo de simulação, os ligantes permanecem na maior parte do tempo aderidos a proteína, apresentando médias entre 2,02 e 1,90 Angstroms (Å) de distância. Para a primeira etapa de dinâmica, o primeiro complexo, PM22-*AaAChE*, apresentou o maior valor de distância média entre os centros de massas.

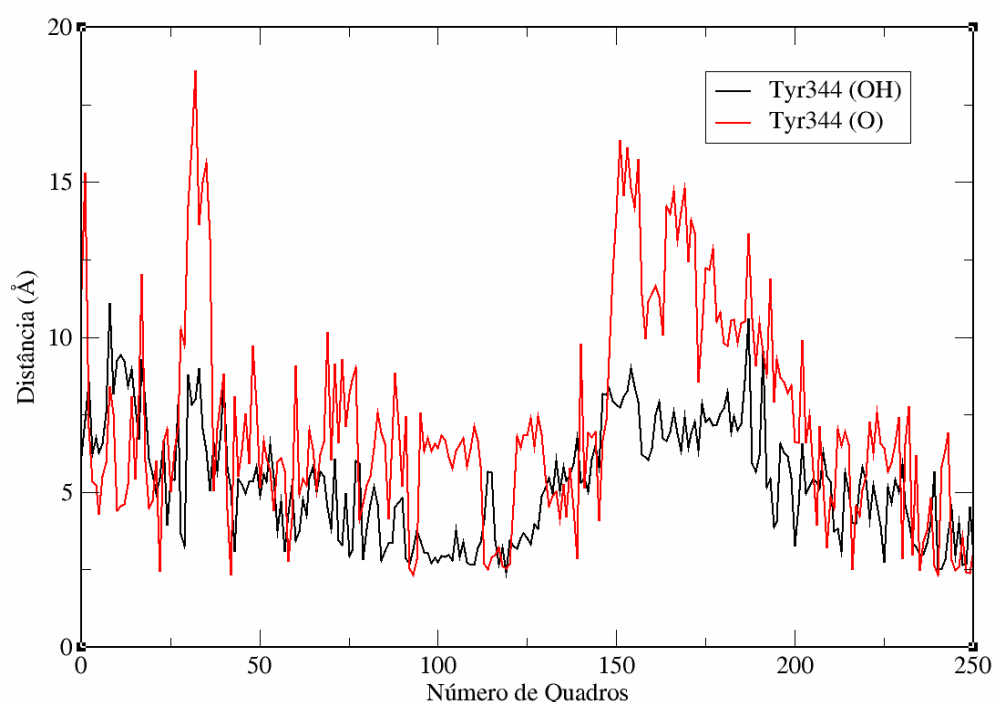
A fim de observar o comportamento de cada um dos ligantes, foram selecionados os aminoácidos mutantes da região da entrada do sítio ativo das proteínas *AaAChE* e *HssAChE* e foram geradas figuras que relacionam a posição dos ligantes com o tempo de simulação. Foram geradas imagens a cada 10 nanosegundos de simulação, com início no tempo igual a zero

nanosegundos, apresentando um total de seis frames para cada um dos ligantes.

No tempo de simulação igual a 50 nanosegundos, foram selecionados aminoácidos que apresentaram distância de até 2,1 angstroms de distância do ligante, a fim de que fossem geradas gráficos de distância por número de quadros da simulação, possibilitando observar a acomodação do ligante em relação a esses aminoácidos.

Em relação ao complexo PM22-AaAChE, ao final da simulação, o aminoácido Tyr344 interage por ligação hidrogênio com a molécula do PM22 com uma distância de ligação de 2,91 Angstroms e 3,15 Angstroms. A variação da distância dessas interações pode ser observada na figura 25. A figura 25 foi gerada pelo software VMD, onde pode-se observar a distância em Angstroms entre os aminoácidos da proteína e o ligante pelo número de quadros de simulação.

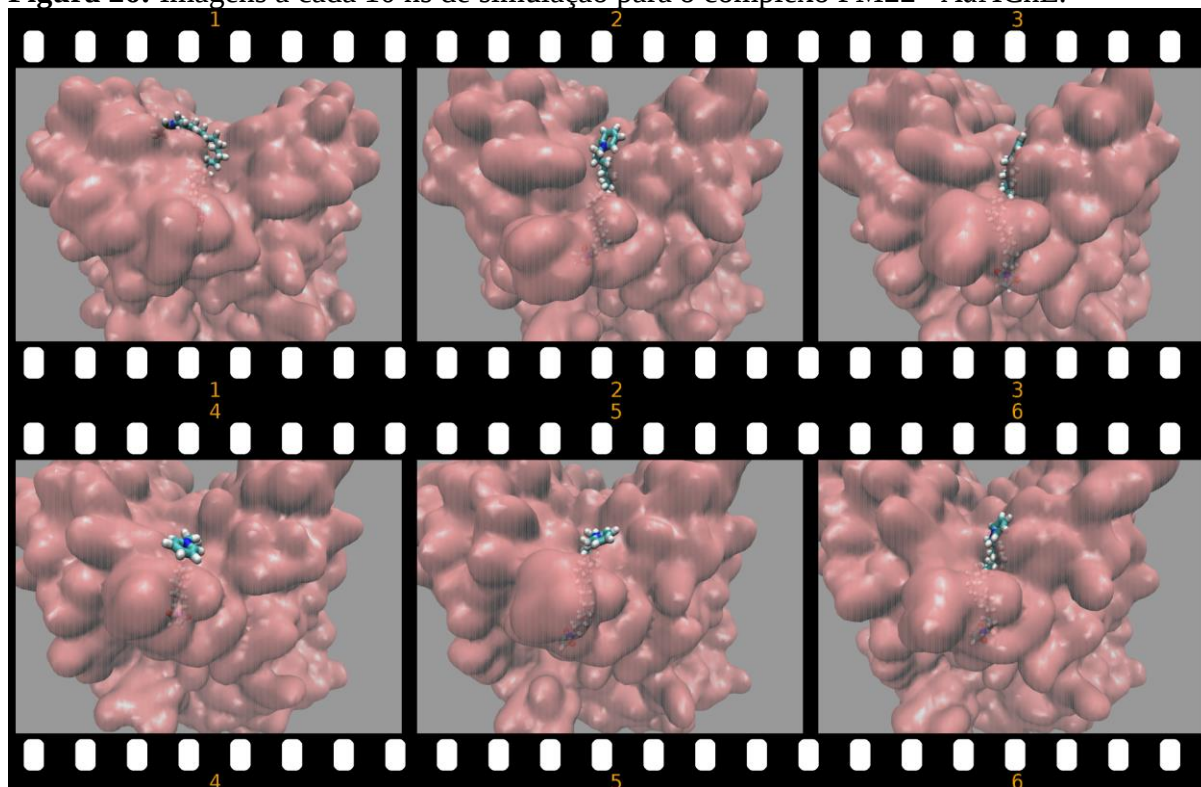
Figura 25: Distância entre PM22 e o aminoácido Tyr344 da AaAChE.



O oxigênio da Tirosina 344 interage inicialmente com uma distância de 11,56 Å e ao final da simulação passa a uma distância de 3,14 Å do ligante, representado na cor vermelha na figura 25. Já a hidroxila do anel de seis membros da tirosina, interage inicialmente a uma distância de 6,19 Å e ao final da simulação passa a uma distância de 2,91 Å do ligante, representado na cor preta no gráfico da figura 25.

A figura 26 mostra o pesticida PM22 interagindo com a enzima AaAChE ao longo da simulação por DM, onde o primeiro quadro representa o tempo igual a zero ns, e os demais quadros variam a cada 10 ns, finalizando no tempo igual a 50 ns.

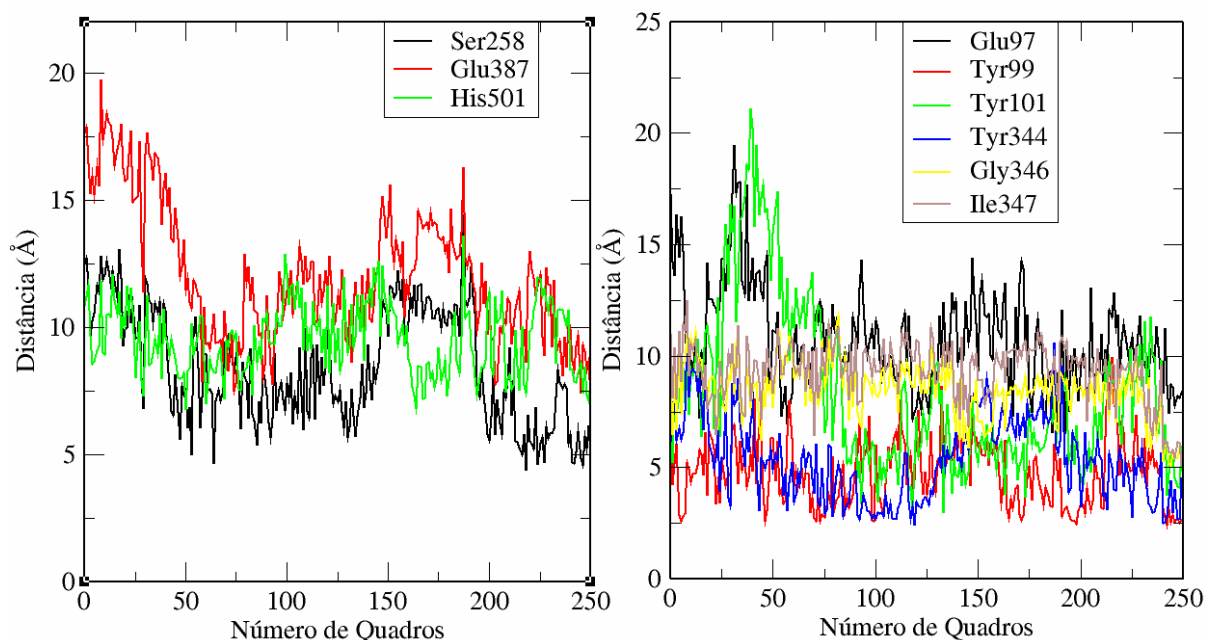
Figura 26: Imagens a cada 10 ns de simulação para o complexo PM22 - AaAChE.



A partir da figura 26, observa-se que o ligante que estava inicialmente na região da entrada do sítio ativo, adentra a proteína à medida em que a simulação ocorre, havendo uma redução na distância entre os aminoácidos da tríade catalítica da enzima com a região da cadeia carbônica do ligante, como mostra no primeiro gráfico da figura 27.

Além disso, o anel de seis membros do PM22 interagiu por contatos polares e contatos apolares com os aminoácidos da região da entrada do sítio ativo. Essas interações foram verificadas a partir da seleção dos aminoácidos Glu97, Tyr99, Tyr101, Tyr344, Gly346, Ile347 que são mutações em relação a enzima *HssAChE*. O segundo gráfico da figura 27 mostra a distância das interações entre esses aminoácidos e a proteína *AaAChE*.

Figura 27: Interações entre aminoácidos mutantes da entrada do sítio ativo da *AaAChE* e pesticida PM22.

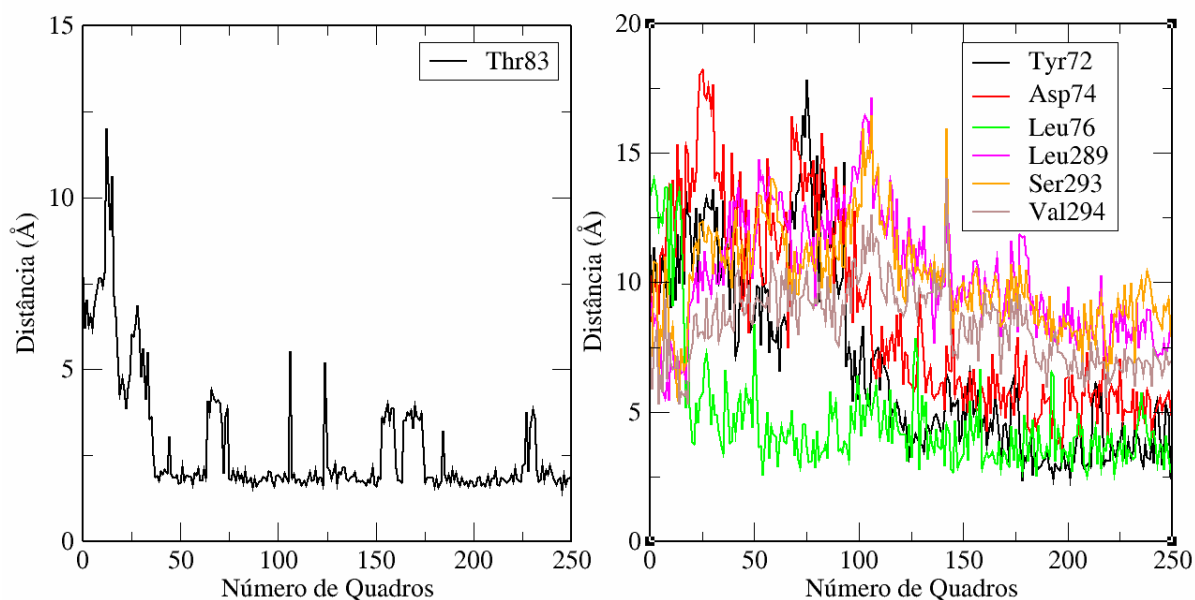


Observa-se uma variação da distância entre o ligante e o aminoácido Ser258 da proteína *AaAChE* de 12,48 Å a 4,98 Å, o aminoácido Glu387 varia de uma distância igual a 17,64 Å para 7,24 Å e a His501 varia de 10,87 Å a 7,88 Å.

Já em relação aos aminoácidos da entrada do sítio ativo da enzima, são observadas variações de 17,23 Å a 8,16 Å para o resíduo Glu97, de 6,89 Å a 2,69 Å para a Tyr99, de 8,63 Å a 3,69 Å para a Tyr101, de 6,19 Å a 2,91 Å para a Tyr344, de 9,39 Å a 5,71 Å para a Gly346 e de 10,98 Å a 6,24 Å para o aminoácido Ile347.

Na sequência, foram realizadas análises a respeito da interação entre o pesticida PM22 e a proteína *HssAChE*. No quadro de simulação 250 do pesticida PM22 com a proteína *HssAChE*, o aminoácido que apresentou distância de ligação menor ou igual a 2,1 Angstroms com o ligante foi o Thr83. Dessa maneira, foi gerado o gráfico com a distância de ligação por número de quadros de simulação com o software XMGRACE, conforme observado no primeiro gráfico da na figura 28. Além disso, foram selecionados os aminoácidos Tyr72, Asp74, Leu76, Leu289, Ser293, Val294, além dos resíduos da tríade catalítica da enzima *HssAChE*, Ser203, His447 e Glu334 e foi observada as interações entre a enzima e esses aminoácidos, conforme apresentado no segundo gráfico da figura 28.

Figura 28: Distância entre PM22 e o aminoácido Thr83 da *HssAChE* por quadros de simulação à esquerda. A direita, distância dos aminoácidos Tyr72, Asp74, Leu76, Leu289, Ser293 e Val294 da enzima *HssAChE* pelo número de quadros de dinâmica molecular.

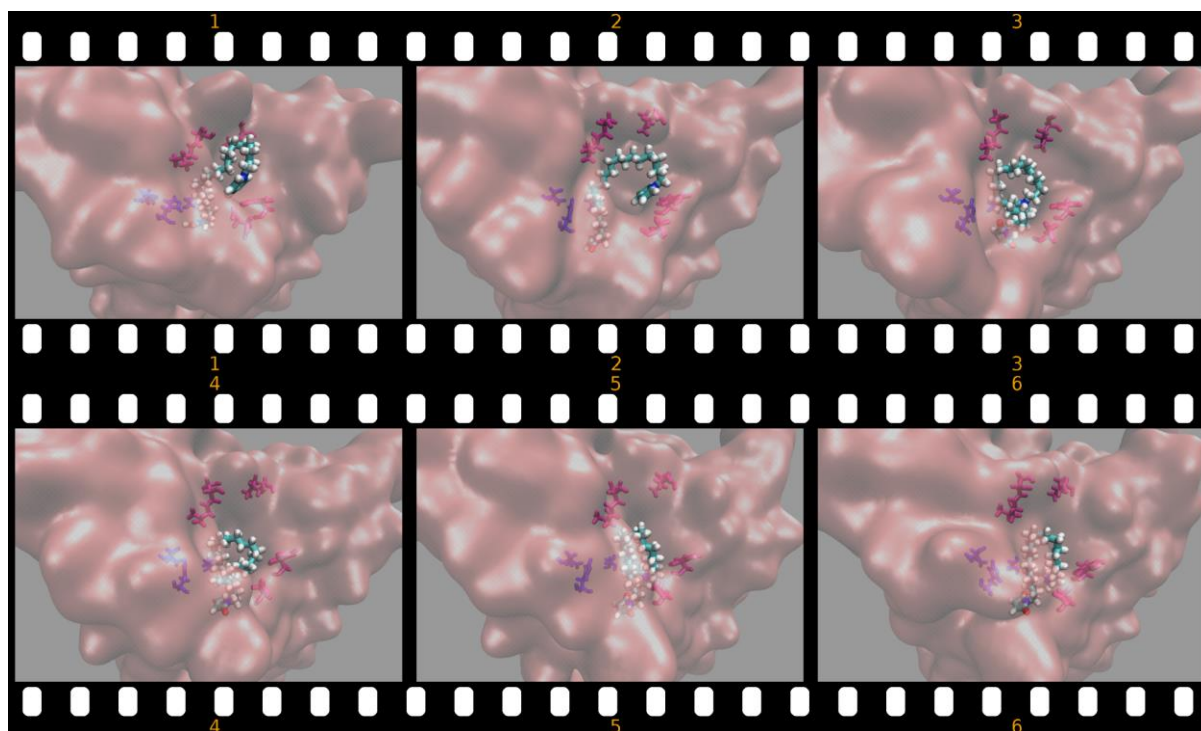


A partir do segundo gráfico da figura 28, observa-se que ocorre uma redução na distância de interação entre o pesticida PM22 e a maioria dos aminoácidos da entrada do sítio ativo da proteína *HssAChE*. A Tyr72 inicialmente apresenta uma distância de 11,06 Å e ao final da dinâmica, passa a uma distância de 2,80 Å. O aminoácido Asp74 passa de 10,26 Å para 4,59 Å, o aminoácido Leu76 passa de uma distância de 13,38 Å a 3,01 Å, o aminoácido Leu289 passa de 8,70 Å a 7,41 Å, o aminoácido Ser293 passa de 7,36 Å a 8,68 Å e a Val294 passa de uma distância igual a 7,54 Å para 7,06 Å.

Ao final da simulação, os aminoácidos Tyr72 e Leu76 apresentam distância inferior a 3,0 Å em relação ao PM22. A maior distância observada em relação a esses resíduos ao final da dinâmica é da Ser293, com 8,67 Å do ligante.

As imagens geradas a cada 10 ns de simulação por DM para o complexo PM22 - *HssAChE* estão representadas na figura 29.

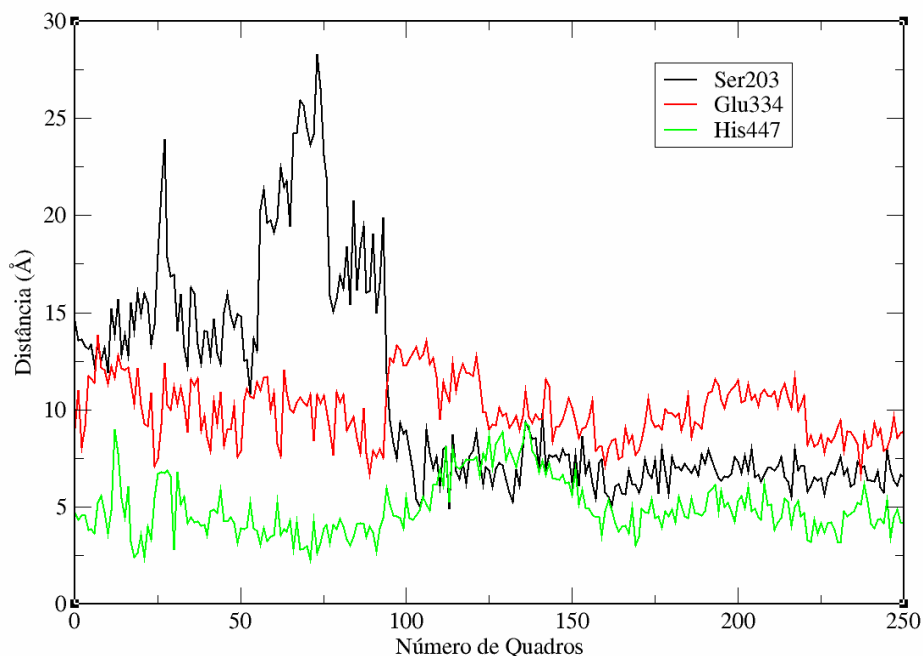
Figura 29: Imagens geradas a cada 10 ns de simulação por DM para o complexo PM22 - *HssAChE*. Em azul, aminoácidos da tríade catalítica da enzima *HssAChE*, em violeta aminoácidos da entrada do sítio ativo da enzima humana (Tyr72, Asp74, Leu289, Ser293 e Val294). PM22 em representação do tipo licorice.



A figura 30 apresenta a distância entre os aminoácidos da tríade catalítica da enzima *HssAChE* (Ser203, His447 e Glu334) e o pesticida PM22.

A variação da distância observada do início para o final da simulação foi de 14,56 para 6,52 Å para o aminoácido Ser203, de 4,71 para 4,15 Å para a His447 e de 9,08 para 8,89 Å para o Glu334. Apesar de haver uma aproximação do ligante em relação aos resíduos da tríade catalítica, a distância de interação observada não possibilita a ocorrência de uma interação intermolecular forte como uma ligação hidrogênio.

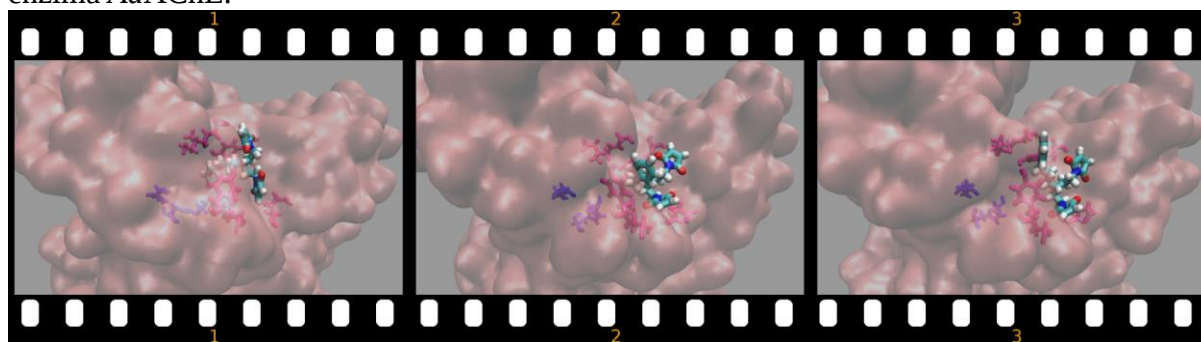
Figura 30: Distância entre o pesticida PM22 e os aminoácidos Ser203, His447 e Glu334 da enzima *HssAChE* pelo número de quadros de dinâmica molecular.



Em relação ao ligante PROP2, foram geradas imagens a cada 10 ns de simulação por DM com a proteína *AaAChE*, na figura 31, onde a proteína está em representação QuickSurf, a molécula de PROP2 está em representação licorice, os aminoácidos mutantes da entrada do sítio ativo estão em representação licorice cor magenta e os resíduos da tríade catalítica estão em representação licorice na cor azul.

As distâncias entre os aminoácidos da tríade catalítica da enzima *AaAChE* foram medidas (primeiro gráfico da figura 32), bem como entre os resíduos Glu97, Tyr99, Tyr101, Tyr344, Gly346 e Ile347 e o ligante (segundo gráfico da figura 32).

Figura 31: Imagens geradas a cada 10 ns de simulação por DM entre o ligante PROP2 e a enzima *AaAChE*.



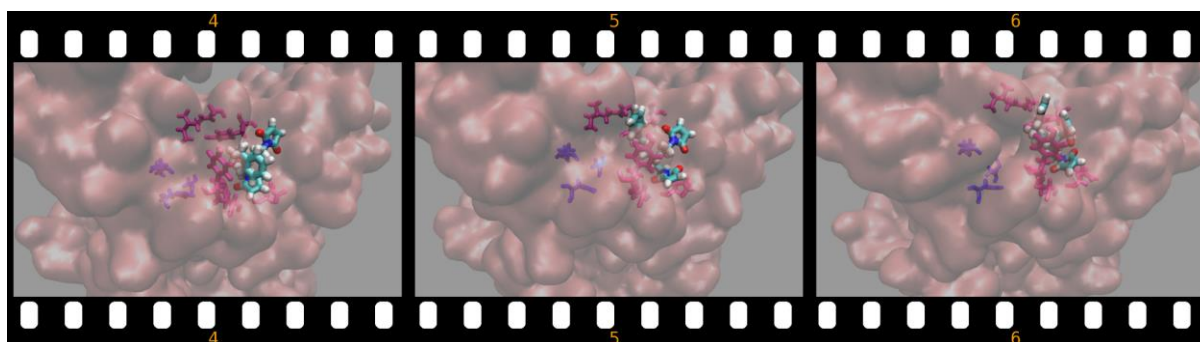
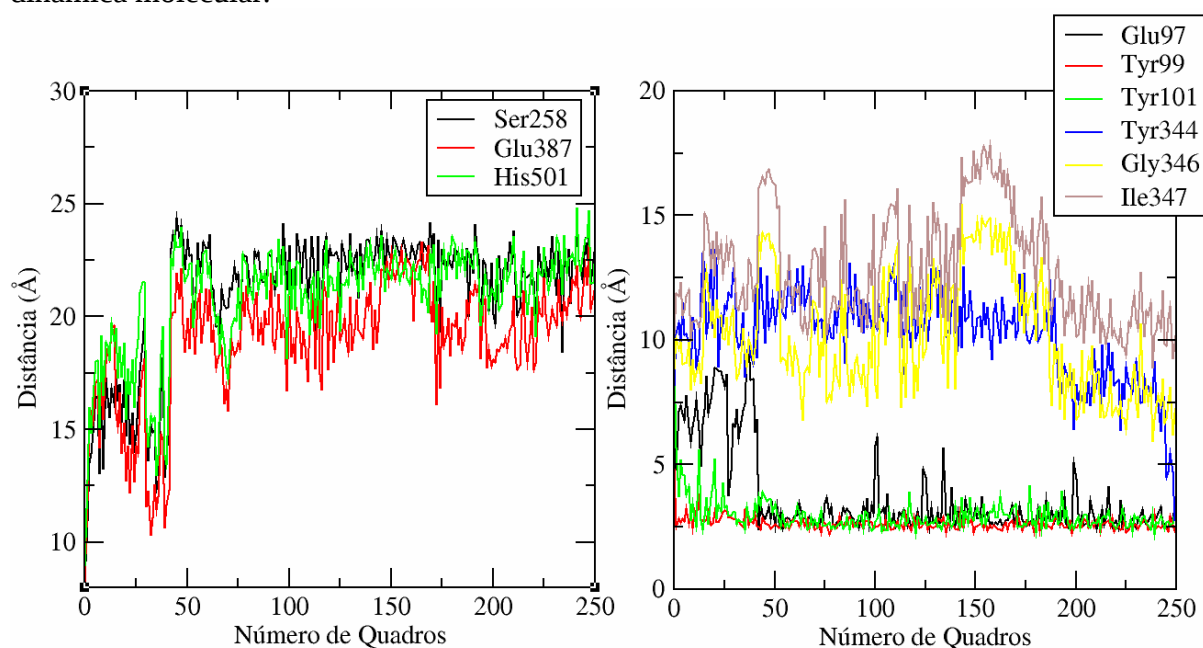


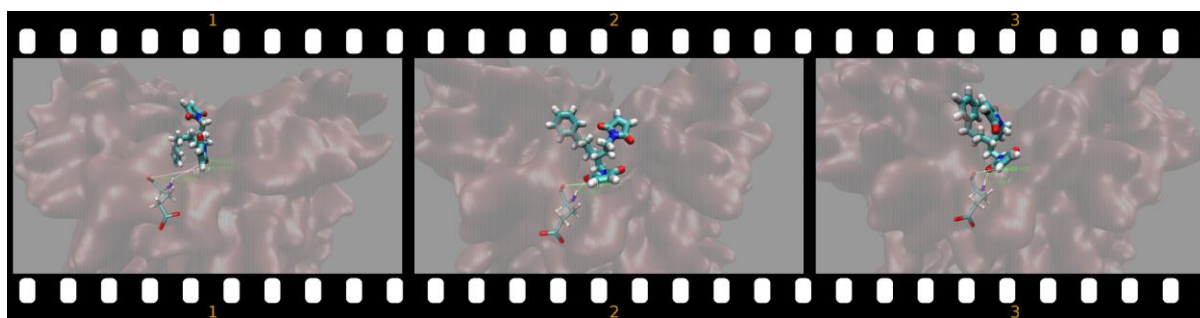
Figura 32: No gráfico a esquerda distâncias entre os aminoácidos da tríade catalítica da enzima AaAChE. No gráfico a direita distância entre o pesticida PROP2 e os aminoácidos Glu97, Tyr99, Tyr101, Tyr344, Gly346 e Ile347 da enzima AaAChE pelo número de quadros de dinâmica molecular.



O aminoácido Glu97 apresenta variação de distância do ligante PROP2 de 6,81 a 3,05 Å, a Tyr99 varia entre 4,85 e 2,53 Å, a Tyr101 varia entre 9,17 e 2,79, a Tyr344 varia entre 5,73 e 5,53 Å, a Gly346 varia entre 10,24 e 7,33 Å e a Ile347 varia entre 11,16 e 9,71 Å.

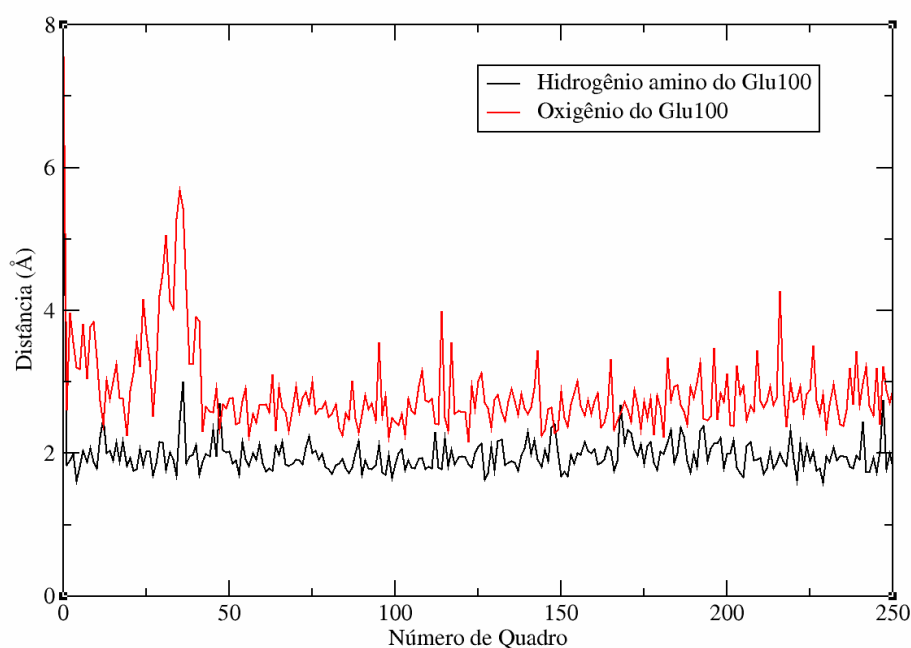
O aminoácido que apresentou distancia de ate 2.1 angstroms do ligante no último quadro de simulação foi selecionado e foram medidas as distâncias de duas ligações hidrogênio que ocorrem com o Glu100 da proteína, sendo uma com a parte amino do glutamato e outra com o oxigênio da cadeia lateral do aminoácido. A figura 33 mostra os quadros 0, 125 e 250 que correspondem a zero ns, 25 ns e 50 ns de simulação.

Figura 33: Enzima AaAChE em superfície de contato na cor rosa. Em destaque aminoácido Glu100 que realiza dois contatos polares com o ligante PROP2.



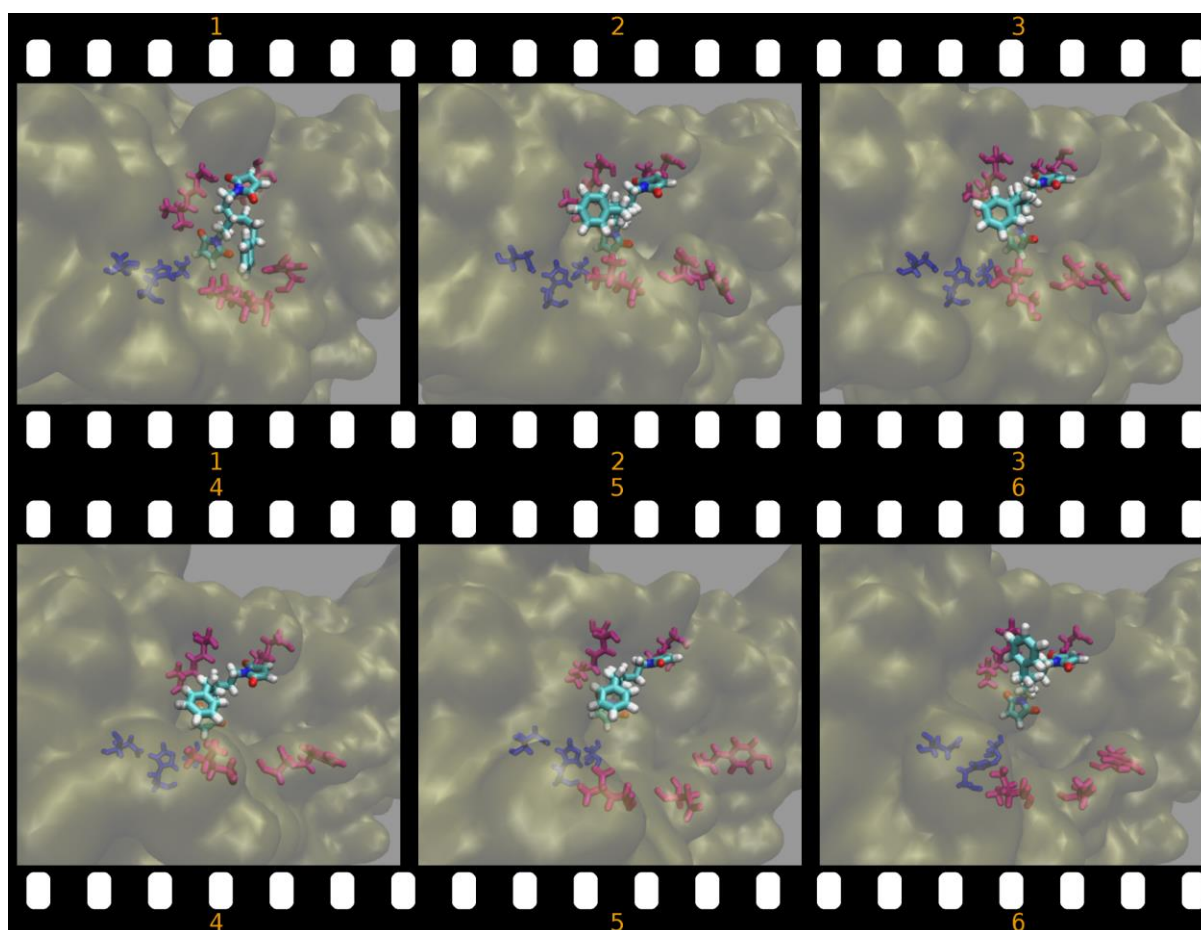
Nota-se que ocorre uma redução na distância de interação entre o pesticida PROP2 e o aminoácido Glu100 logo nos primeiros quadros de simulação. Os valores apresentam variação de 6,58 para 1,82 Å para a ligação entre o hidrogênio da parte amino do aminoácido com o oxigênio do anel de cinco membros da PROP2 e de 7,55 para 2,89 Å para a ligação entre o oxigênio da cadeia lateral da proteína com o hidrogênio do anel de cinco membros da PROP2, conforme observado na figura 34.

Figura 34: Distância entre o pesticida PROP2 e o aminoácido Glu100 da proteína *AaAChE*.



Em relação a interação entre o pesticida PROP2 com a proteína *HssAChE*, foram selecionados os aminoácidos Tyr72, Asp74, Leu76, Leu289, Ser293, Val294 e os resíduos da tríade catalítica da enzima (Ser203, His447 e Glu334). Foram geradas imagens a cada 10 ns de simulação que estão representadas na figura 35.

Figura 35: Imagens geradas a cada 10 ns de simulação por DM para o complexo PROP2 - *HssAChE*.

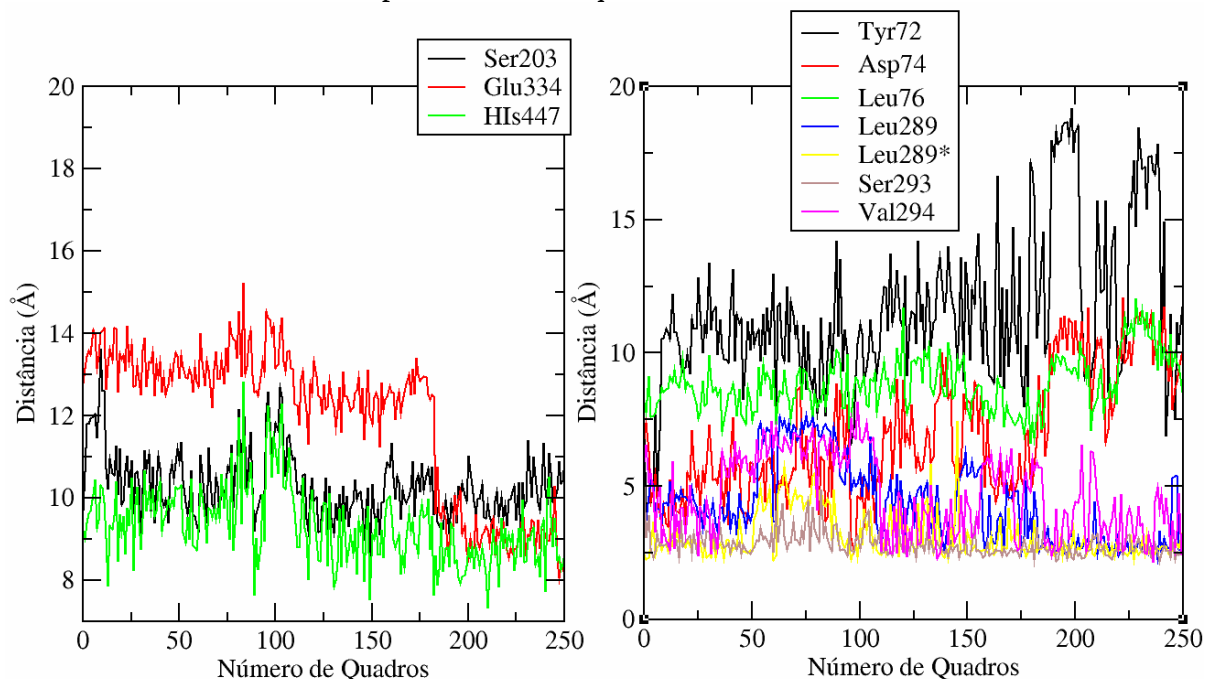


Em relação aos aminoácidos da tríade catalítica, o primeiro gráfico da figura 36 mostra a variação das distâncias pelo número de quadros. A Ser203 apresenta variação de distância em relação ao pesticida PROP2 de 9,70 a 10,94 Å, a His447 varia de 9,20 a 8,66 Å e o Glu334 varia de 12,80 a 8,14 Å. Dessa maneira, ocorre uma aproximação em relação aos resíduos His447 e Glu 334 e um afastamento em relação ao resíduo Ser203. As distâncias finais, entretanto, são distâncias altas, não ocorrendo interações por contatos polares com esses aminoácidos.

O segundo gráfico da figura 36 mostra as distâncias de ligação entre os aminoácidos da proteína *HssAChE* e o ligante PROP2. Em relação às distâncias observadas, ocorre variação de 6,92 Å a 12,05 Å para Tyr72, 6,78 Å a 9,70 Å para Asp74, 8,13 Å a 9,30 Å para Leu76, 3,37 Å a 2,97 Å para a Leu289, uma segunda interação variando entre 2,43 Å a 2,44 Å para a Leu289, 4,99 Å a 2,49 Å para a Ser293 e 5,93 Å a 2,54 Å para Val294. Dessa maneira, verifica-se que o ligante se aproxima dos aminoácidos Ser293 e Val294 ao longo da simulação.

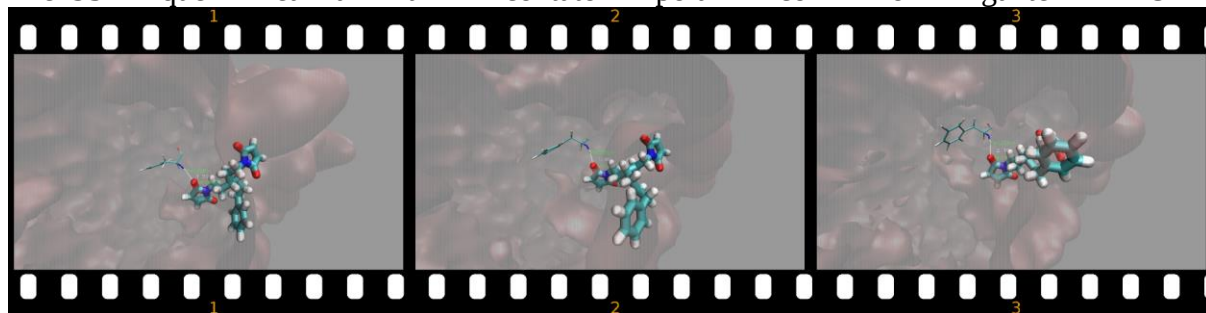
As interações mais importantes observadas em relação a esses aminoácidos são com a Leu289, Ser293 e Val294, ocorrendo nesses casos interações por ligação hidrogênio com o pesticida PROP2.

Figura 36: A esquerda, distância entre o pesticida PROP2 e os aminoácidos Ser203, His447 e Glu334 da enzima *HssAChE* pelo número de quadros de dinâmica molecular. A direita, distância entre o pesticida PROP2 e os aminoácidos Tyr72, Asp74, Leu76, Leu289, Ser293, Val294 da enzima *HssAChE* pelo número de quadros de dinâmica molecular.



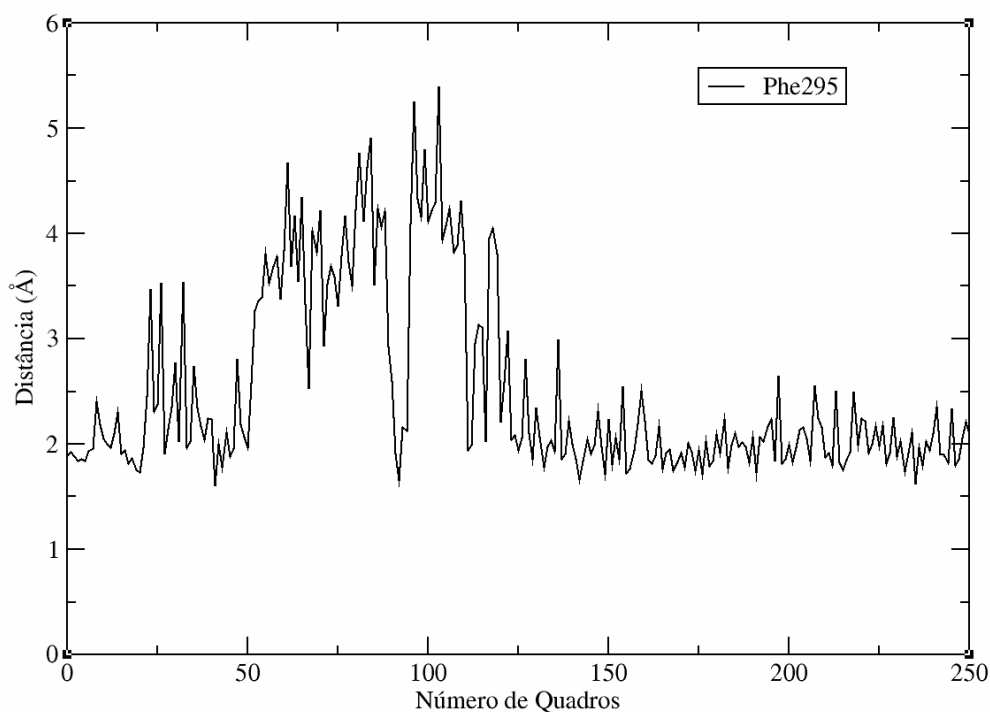
No último quadro da simulação, foi selecionado o aminoácido que apresentou distância de até 2,1 Å em relação ao ligante, sendo encontrado o resíduo Phe295. Na sequência, foi realizada a medida de distância entre o hidrogênio da parte amino desse resíduo com o oxigênio do anel de cinco membros do ligante e foram geradas imagens com os valores dessas distâncias nos tempos de simulação iguais a zero ns, 25 ns e 50 ns, como pode ser observado na figura 37.

Figura 37: Enzima *HssAChE* em superfície de contato na cor rosa. Em destaque aminoácido Phe295 que realiza um contato polar com o ligante PROP2.



A distância observada entre o aminoácido Phe295 e o ligante PROP2 no início da simulação foi de 1,89 Å e ao final da simulação foi de 2,09 Å, demonstrando que este é um importante aminoácido no que diz respeito a estabilização do ligante junto a proteína.

Figura 38: Distância entre o pesticida PROP2 e o aminoácido Phe295.

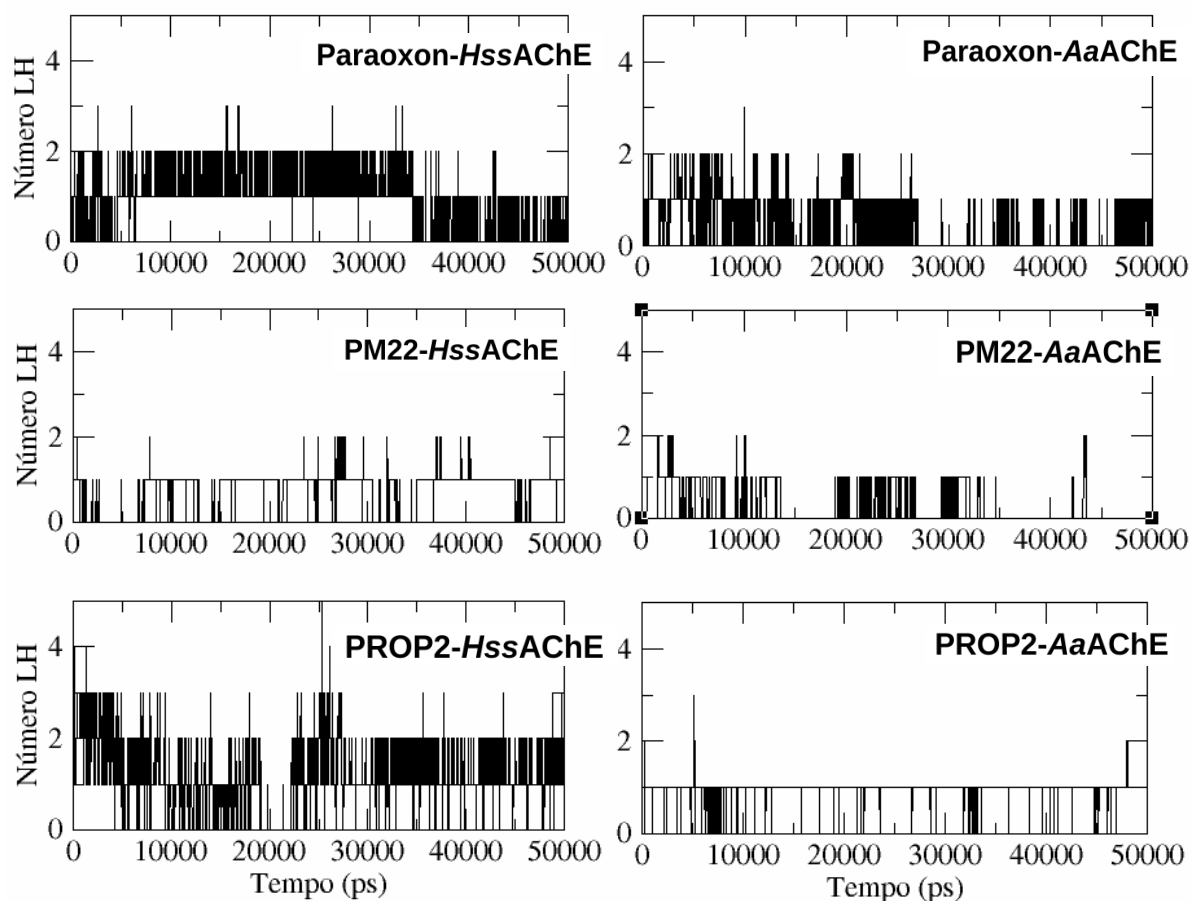


5.6.1.6 Ligações Hidrogênio

Ligações hidrogênio são uma classe de interação não covalente e têm um papel importante na afinidade do ligante pelo sítio de ligação. Esse tipo de interação apresenta um papel de efeito estabilizador no ligante (GUIZADO, 2008). Dessa maneira, o número médio de interações por ligação hidrogênio que ocorrem durante a simulação por DM é uma importante ferramenta para a análise de estabilidade dos complexos simulados.

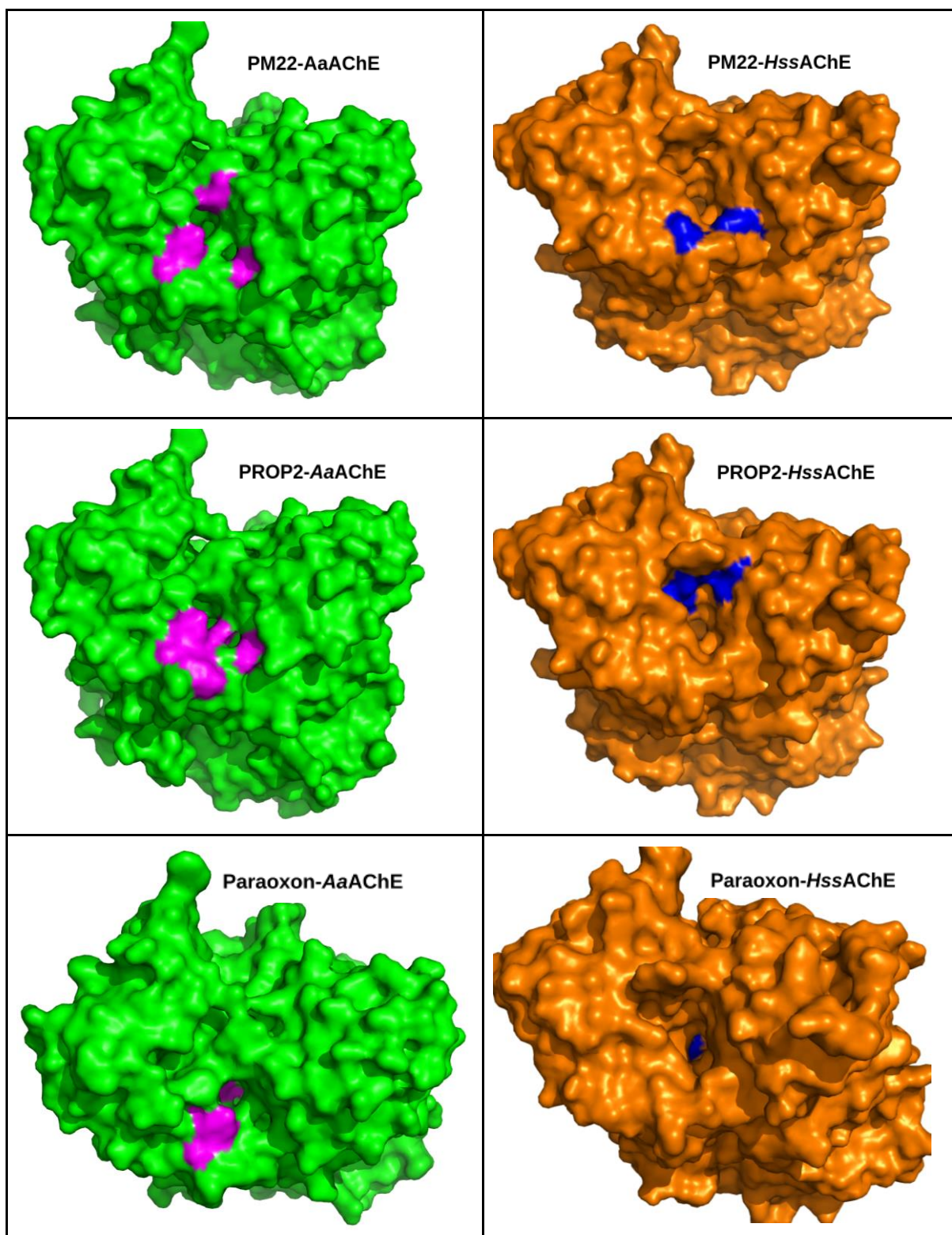
Foram gerados gráficos com os números médios de ligações hidrogênio para os complexos Paraoxon-*HssAChE*, Paraoxon-*AaAChE*, PM22-*HssAChE*, PM22-*AaAChE*, PROP2-*HssAChE* e PROP2-*AaAChE*, conforme observado na figura 39.

Figura 39: Ligações hidrogênio observadas nos complexos simulados para a primeira etapa de dinâmica molecular.



O número de ligações hidrogênio formados durante as simulações por DM mostraram que as interações entre os ligantes PM22 e o PROP2 com a enzima *AaAChE* apresentaram números iguais ou menores nas quantidades de ligações hidrogênio quando comparados com os complexos formados com a enzima *HssAChE*. Entretanto, ao observar os aminoácidos da enzima do mosquito *Aedes aegypti*, nota-se que as mutações presentes na região da entrada do sítio ativo interagem por ligações hidrogênio com os ligantes PM22 e PROP2. A figura 40 apresenta os aminoácidos que com maior frequência interagem por ligações hidrogênio nos complexos formados.

Figura 40: Aminoácidos que mais interagiram por contatos polares nos complexos da primeira etapa de dinâmica molecular.



Em destaque, no complexo PM22-AaAChE estão os aminoácidos Glu97, Tyr101 e Tyr344. Este último, apresentou distância de ligação de 2,91 Å ao final da dinâmica molecular.

Já o complexo PROP2-*AaAChE* apresenta em destaque os aminoácidos Glu97, Tyr99, Tyr101 e Glu100. Este último apresenta distância de 1,82 Å do ligante ao final da simulação por DM.

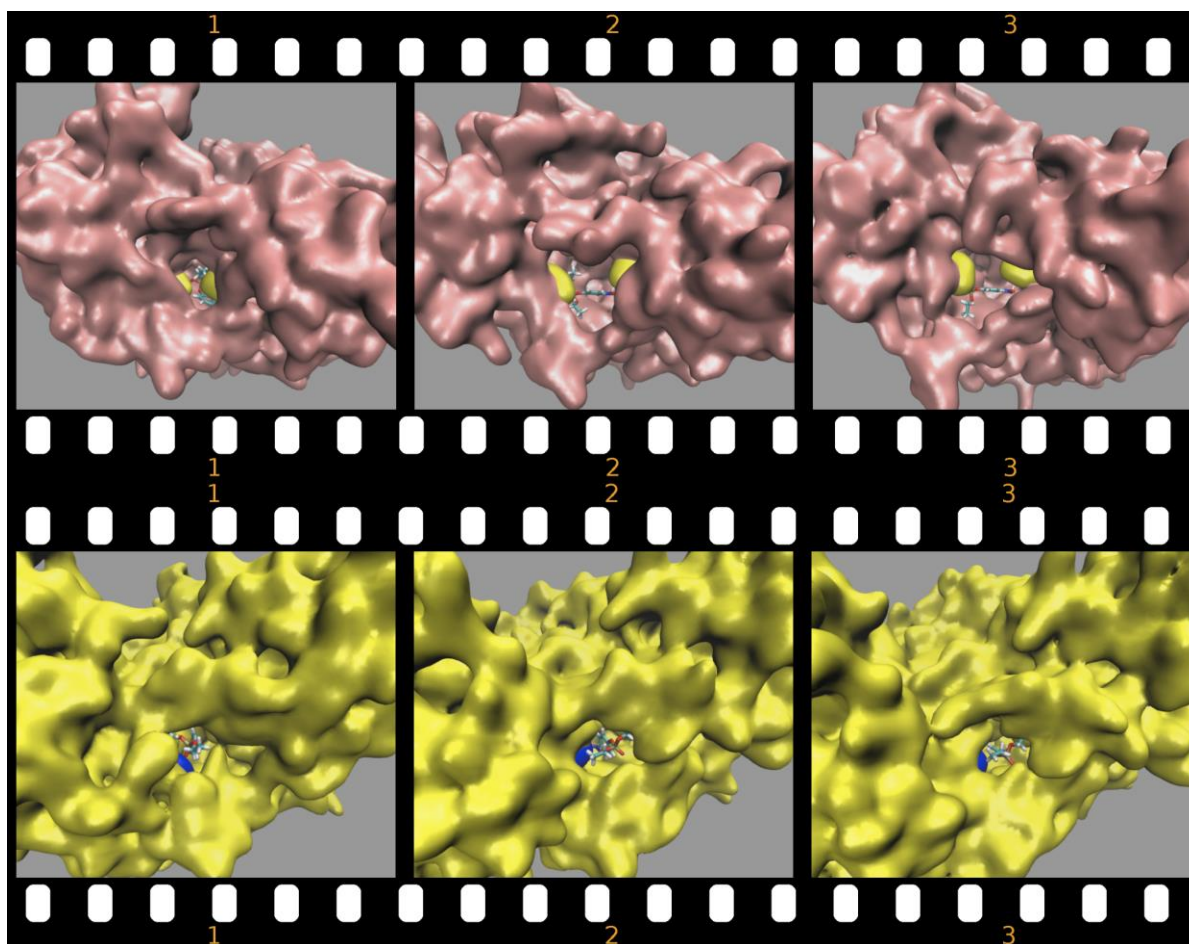
O complexo PM22-*HssAChE* apresenta em destaque os aminoácidos Tyr72, Leu76 e Thr83. Este último com distância de interação de 2,1 Å ao final da DM. Já o complexo PROP2-*HssAChE*, os aminoácidos em destaque são a Leu289, Ser293, Val294 e Phe295. Ao final da DM, o aminoácido Phe295 foi o que apresentou menor distância de interação com o ligante, sendo 2,1 Å.

Na figura 40, o complexo Paraoxon-*AaAChE* apresenta em destaque os aminoácidos Tyr394, His501, Glu257, Gly174 e Tyr101. Estes aminoácidos apresentaram distância de ligação igual ou inferior a 2,8 Å em relação ao paraoxon ao final da simulação por dinâmica molecular. Já o complexo Paraoxon-*HssAChE* apresenta em destaque os aminoácidos Trp439 e His447, que foram os dois aminoácidos que apresentaram menor distância de interação com o ligante ao final da simulação por DM (2,05 Å e 2,34 Å, respectivamente). Esses aminoácidos estão localizados na região do poço do sítio ativo, sendo a histidina pertencente a tríade catalítica da enzima *HssAChE*.

Como parâmetro para observar se ocorre o impedimento estérico da entrada do sítio ativo, foram selecionados dois aminoácidos que pertencem a entrada da cavidade do sítio ativo da enzima *HssAChE*, que são a tirosina 124 (Tyr124) e a tirosina 337 (Tyr337) (ALMEIDA, 2014). Por homologia, sabe-se que esses aminoácidos para a enzima *AaAChE* são a Met176 e Tyr390. Assim, foram geradas imagens de quadros da simulação por DM a fim de observar se ocorre ou não o impedimento estérico da entrada do sítio ativo das enzimas AChEs.

A figura 41 apresenta a sequência de quadros de simulação entre o ligante Paraoxon e as proteínas *HssAChE* e *AaAChE*.

Figura 41: Quadros de simulação por DM das proteínas *AaAChE* (amarelo) e *HssAChE* (rosa) complexadas com ligante paraoxon (representação licorice). Em destaque, os aminoácidos Met176 e Tyr390 (azul) e Tyr124 e Tyr337 (amarelo).

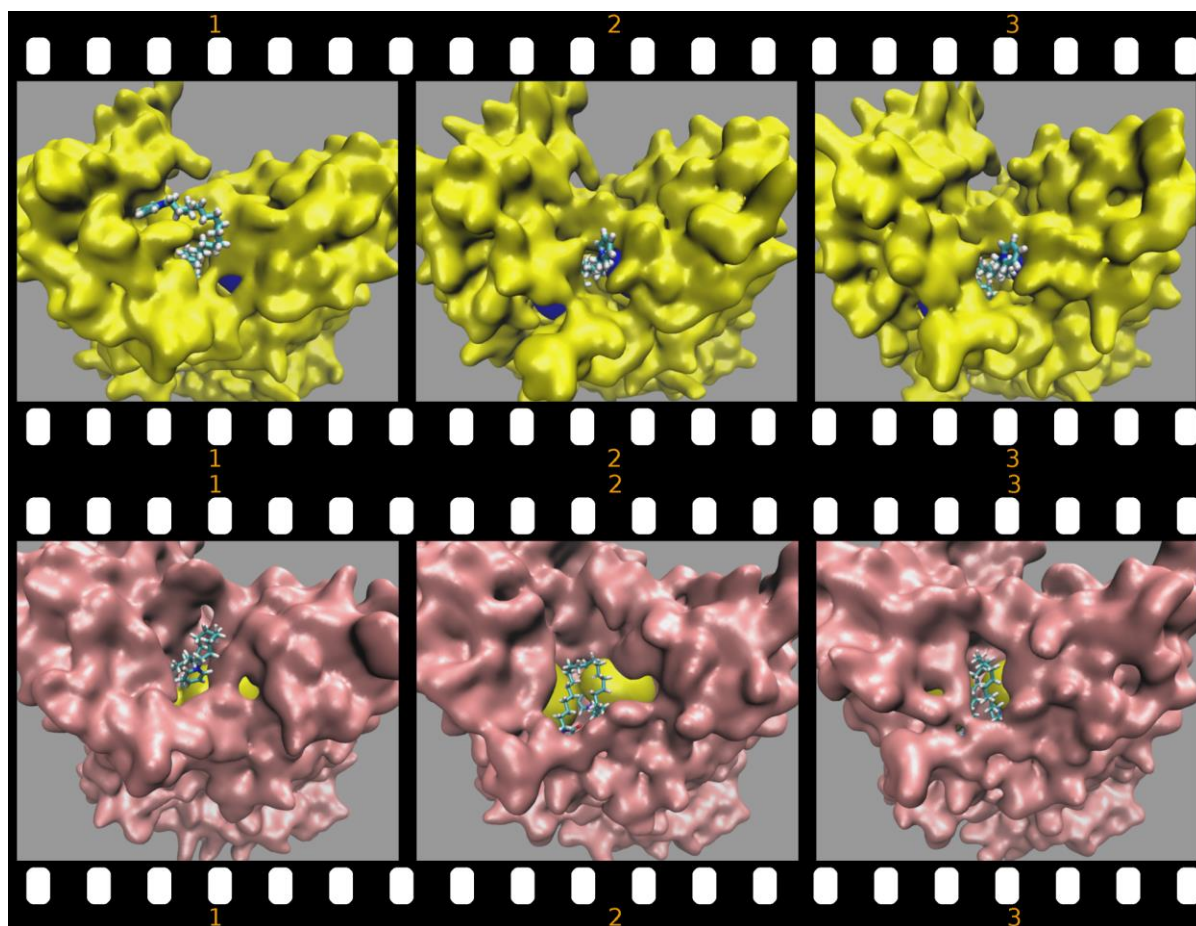


Nota-se que em relação a proteína humana, o paraoxon encontra-se na região do poço do sítio ativo, uma vez que o ligante já ultrapassou a região em que os aminoácidos Tyr124 e Tyr337 estão localizados.

Da mesma maneira, o paraoxon encontra-se no sítio ativo da proteína *AaAChE*, uma vez que ultrapassou a região em que os aminoácidos Met176 e Tyr390 estão localizados.

A figura 42 apresenta uma sequência de quadros da simulação por DM, onde pode-se observar a movimentação dos ligantes. Em amarelo, está representado a proteína *AaAChE* e em rosa, a proteína *HssAChE*, ambas com o ligante PM22.

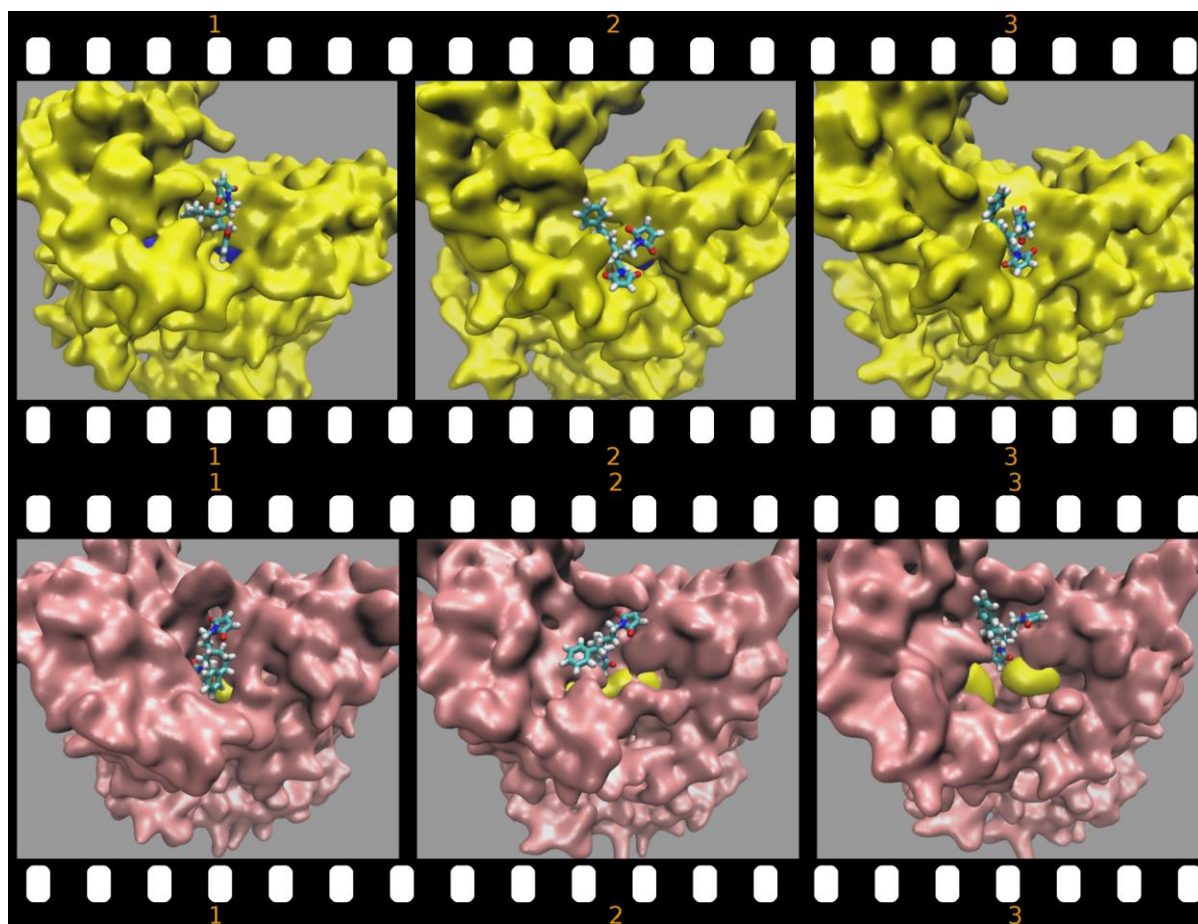
Figura 42: Quadros de simulação por DM das proteínas *AaAChE* (amarelo) e *HssAChE* (rosa) complexadas com ligante PM22 (representação licorice). Em destaque, os aminoácidos Met176 e Tyr390 (azul) e Tyr124 e Tyr337 (amarelo).



A figura 42 mostra que ambas as proteínas, ao final da simulação por DM, apresentam o ligante PM22 posicionado na região da entrada do sítio ativo, uma vez que os aminoácidos Met176 e Tyr390 da *AaAChE* e Tyr124 e Tyr337 da *HssAChE* encontram-se obstruídos pelo ligante.

A figura 43 apresenta uma sequência de quadros da simulação por DM das proteínas *AaAChE* (em amarelo) e a proteína *HssAChE* (em rosa), ambas com o ligante PROP2.

Figura 43: Quadros de simulação por DM das proteínas *AaAChE* (amarelo) e *HssAChE* (rosa) complexadas com ligante PROP2 (representação licorice). Em destaque, os aminoácidos Met176 e Tyr390 (azul) e Tyr124 e Tyr337 (amarelo).



Em relação ao complexo PROP2-*AaAChE*, observa-se que ao final da simulação por DM, o ligante PROP2 se posicionou de maneira a impedir o acesso aos aminoácidos Met176 e Tyr390 da proteína do mosquito.

Já em relação ao complexo PROP2-*HssAChE*, no primeiro quadro de simulação (que representa um tempo de simulação igual a 0 ns), ocorre a obstrução da cavidade do sítio ativo da enzima. Nos quadros 2 e 3, que representam respectivamente tempo de simulação igual a 25 ns e 50 ns, ocorre um deslocamento do ligante de maneira que os aminoácidos Tyr337 e Tyr124 passam a ficar expostos, indicando que a entrada do sítio ativo da enzima *HssAChE* encontra-se desobstruída.

Ao correlacionar essas informações com os resultados observados das ligações hidrogênio, pode-se dizer que as interações formadas entre a molécula da PROP2 e a proteína humana melhoram a estabilização do ligante em uma região que não causa impedimento estérico na região da entrada do sítio ativo. Da mesma maneira, as interações observadas no complexo PROP2-*AaAChE* contribuem para que o ligante se estabilize na região da entrada do sítio ativo da enzima do mosquito.

5.6.1.7 MM-PBSA

O método MM-PBSA é uma função scoring da química computacional utilizada para prever a energia livre de ligação no estudo de proteínas ligantes. (Oda *et al.*, 2006 apud MIGOTT, 2016) Esse método é baseado no modelo de campos de força, onde são utilizados cálculos de mecânica clássica para estimar as afinidades pela somatória das forças intermoleculares e interações eletrostáticas que ocorrem entre todos os átomos do complexo. (MIGOTTI, 2016)

A seguinte equação é utilizada:

$$\Delta G_{bind,solv0} = \Delta G_{bind,vacuum0} + \Delta G_{solv,complex0} - \Delta G_{solv,ligand0} - \Delta G_{solv,receptor0}$$

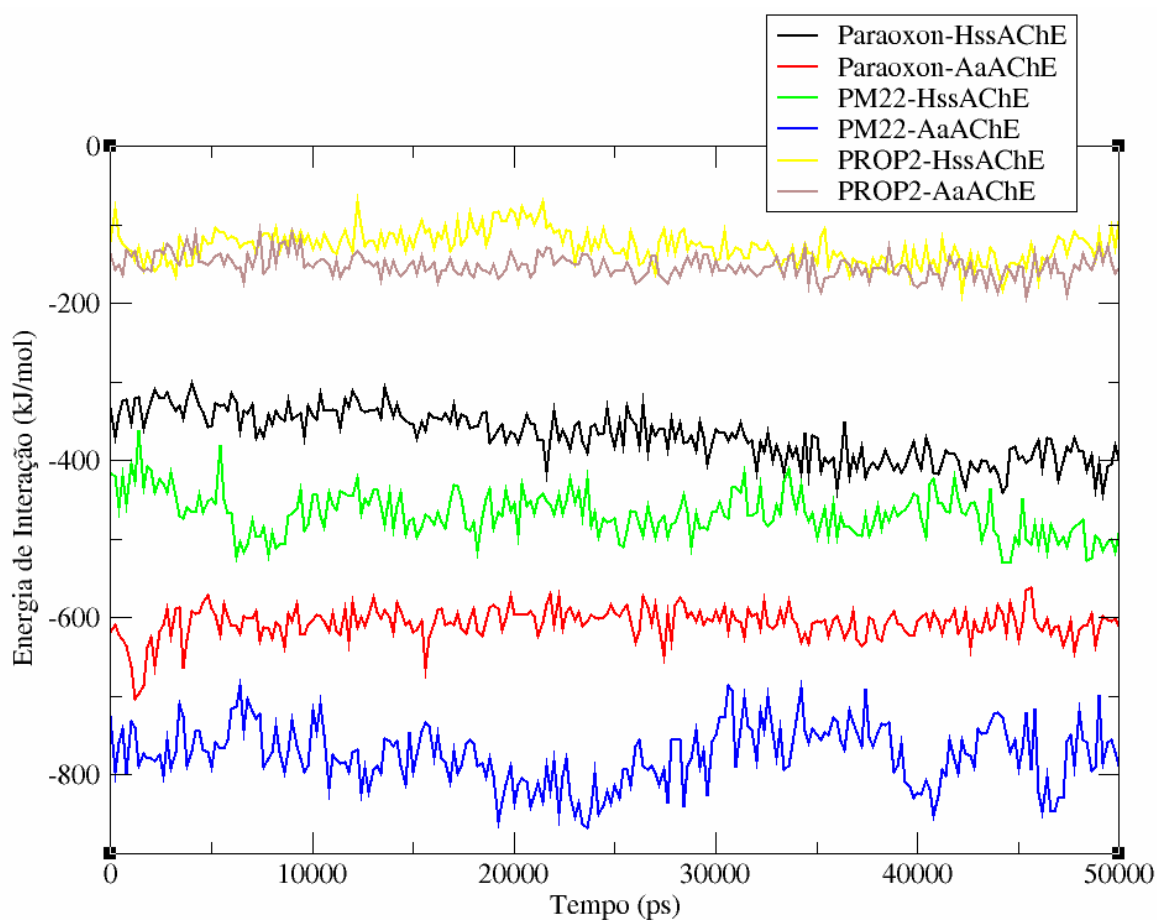
onde $\Delta G_{bind,solv0}$ é a energia livre de ligação do complexo em meio solvatado, $\Delta G_{bind,vacuum0}$ é a energia livre de ligação do complexo no vácuo, $\Delta G_{solv,complex0}$ é a energia livre de solvatação do complexo, $\Delta G_{solv,ligand0}$ é a energia livre de solvatação do ligante e $\Delta G_{solv,receptor0}$ é a energia livre de solvatação do receptor. (Cavalheiro, 2015)

As energias de interação entre o pesticida PM22 e as proteínas *HssAChE* e *AaAChE*, mostram que ocorre uma maior estabilidade do complexo formado com a proteína de mosquito do que com a proteína humana, tendo sido o melhor resultado reportado neste trabalho.

Observa-se uma variação de -726kJ.mol^{-1} a -789kJ.mol^{-1} para o PM22-*AaAChE*, uma variação de -416kJ.mol^{-1} a -493kJ.mol^{-1} para o PM22-*HssAChE*, -137kJ.mol^{-1} a -156kJ.mol^{-1} para o PROP2-*AaAChE*, -121kJ.mol^{-1} a -96kJ.mol^{-1} para o complexo PROP2-*HssAChE*, o complexo Paraoxon-*HssAChE* apresenta variação de $-333,19\text{ kJ.mol}^{-1}$ a $-398,501\text{ kJ.mol}^{-1}$ e o complexo Paraoxon-*AaAChE* apresenta variação de energia livre de $-618,41\text{ kJ.mol}^{-1}$ a $-610,77\text{ kJ.mol}^{-1}$ conforme observado na figura 44.

Chama-se atenção para os valores observados para a energia livre de Gibbs do complexo PM22-*AaAChE*, onde a formação deste complexo é muito mais favorável quando comparado ao complexo do mesmo ligante com a proteína humana.

Figura 44: Energia livre de Gibbs estimada pelo método MM-PBSA para os complexos da primeira etapa.



Foram selecionados os aminoácidos da região do sítio ativo das enzimas *AaAChE* e *HssAChE* e posteriormente foram selecionados os que apresentaram contribuição menor ou igual a -1kJ.mol^{-1} . Após essa seleção, foi gerada a tabela 19, conforme observado a seguir.

Tabela 19: Contribuição total de energia por resíduo do sítio ativo para os complexos simulados por DM - Etapa1.

Ligante	Energia de ligação média obtida pelo método MM-PBSA (kJ.mol^{-1})	Contribuição total de energia por resíduo do sítio ativo (kJ.mol^{-1})
---------	--	---

PM22 AaAChE	-775,1	Glu97 (-26,81120±0,20990), Tyr99 (-1,22910±0,18290), Tyr101 (-1,46080±0,13150), Glu108(-21,60590±0,19860), Trp111(-8,51680±0,18880), Asn112(-1,62520±0,03450), Gly174(-1,41650±0,07680), Leu182(-2,28220±0,11870), Glu257(-1,45020±1,05580), Trp341(-7,38400±0,17610), Tyr344 (-6,36120±0,14530), Leu348(-1,06560±0,08200), Phe350(-2,65880±0,06330), Glu387(-9,68360±0,41580), Tyr390(-3,41530±0,17540), Phe391(-4,47880±0,09160), Tyr394(-6,00100±0,16690), Asp395(-30,89520±0,42670), Asp503(-17,59330±0,20870), Glu504(-11,03460±0,17380)
PM22 HssAChE	-468,52	Gln71(-1,1821±0,0611), Tyr72 (-3,8413±0,1535), Asp74 (-29,459±0,4205), Leu76 (-5,4315±0,1844), Thr83(-5,4145±0,2067), Trp86(-9,1185±0,2205), Gly121(-1,1405±0,0705), Tyr124(-1,846±0,1172), Glu202(-21,5139±0,7019), Trp286(-6,6546±0,1911), Phe297(-1,1677±0,0684), Glu334(-19,1737±0,3171), Tyr337(-8,0486±0,1603), Phe338(-5,6979±0,096), Tyr341(-5,7088±0,224), Gly342(-1,7453±0,0726), His447(-3,1332±0,0957), Tyr449(-1,1772±0,0976), Glu450(-19,2574±0,3123).
PROP2 AaAChE	-152,63	Tyr99 (-5,9471±0,1071), Tyr101 (-10,084±0,2055), Glu108(-4,586±0,082), Trp341(-13,0376±0,1472), Tyr344 (-1,9851±0,0972), Tyr394(-3,7397±0,1416), Asp395(-7,7222±0,1995).
PROP2 HssAChE	-127,80	Leu76 (-1,719±0,0863), Trp286(-10,766±0,1313), Val294 (-6,5516±0,1612), Phe295(-2,9053±0,1452), Phe297(-4,4218±0,083), Tyr337(-2,2268±0,1082), Phe338(-3,8529±0,0978), Tyr341(-11,6002±0,1918).
Paraoxon AaAChE	-606,87	Ser258 (-1,2404±0,0427), Gly502(-1,582±0,0671), Tyr99 (-2,8779±0,1362), Gly174(-3,094±0,0945), Tyr394(-3,1595±0,1011), His501(-3,7863 ± 0,1207), Tyr390(-4,8347±0,104), Phe391(-7,5354±0,1125), Trp111(-8,0327±0,2336), Glu257(-12,4351±0,6376), Glu387(-17,3558±0,0949), Glu504 (-18,2995±0,1417), Glu97 (-19,3071±0,0706), Asp503(-19,3771±0,1585), Asp395(-19,5986±0,1049), Glu108(-26,2384±0,2046).
Paraoxon HssAChE	-367,79	Gly448(-1,1387±0,0765), Thr83(-1,1503± 0,0991), Tyr72 (-1,1923 ±0,0608), Gly120(-1,4947 ±0,133), Ala127(-1,5809± 0,0311), Gln71(-1,8113 ±0,0719), Gly121(-1,9095 ±0,0884), Trp439(-2,4824 ±0,1228), His447(-2,7133 ±0,1432), Tyr337(-4,9005± 0,1147), Tyr449(-4,9183 ±0,1583), Trp86(-13,2026± 0,1513), Glu202(-16,7658± 0,5605), Glu450(-21,1214± 0,174), Glu334(-23,8732± 0,1448), Asp74 (-26,9378±0,3137).

Em negrito, estão selecionados os aminoácidos mutantes da região da entrada do sítio ativo das enzimas acetilcolinesterase humana e de mosquito. Dessa maneira, nota-se que as propostas PM22 e PROP2 apresentaram interação com esses aminoácidos.

A figura 45, mostra em destaque os dez aminoácidos que mais contribuem energeticamente falando para a energia livre, de acordo com os resultados obtidos pelo método MM-PBSA.

Para o complexo PM22-*AaAChE*, os aminoácidos que mais contribuíram energeticamente para o cálculo de energia livre, foram Asp395, Glu97, Glu100, Asp308, Asp398, Asp309, Glu108, Glu415, Glu109 e Glu401, respectivamente. A contribuição energética desses resíduos representou 29,97% da energia livre total média calculada para este complexo.

O complexo PM22-*HssAChE* apresentou maior contribuição energética por parte dos aminoácidos Asp74, Glu285, Glu202, Glu84, Glu450, Glu334, Glu292, Asp333, Glu452 e Glu81, respectivamente. A contribuição destes dez aminoácidos representou 43,77% do total da energia livre média calculada.

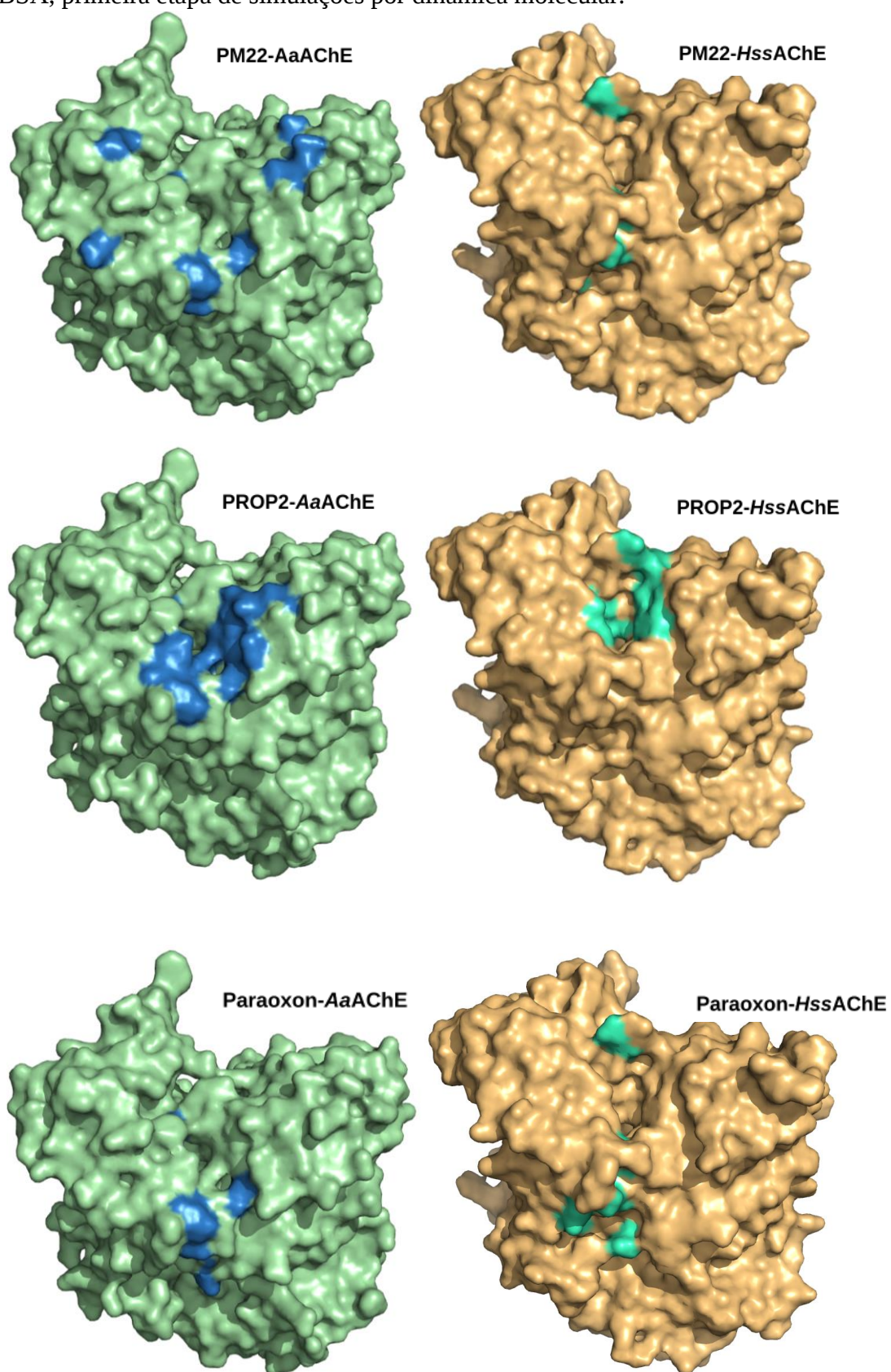
Para o complexo PROP2-*AaAChE*, os aminoácidos que mais contribuíram foram Trp341, Glu100, Tyr101, Glu97, Asp395, Tyr99, Val338, Glu108, Asp309 e Asn342, que representa um total de 48,88% da média da energia livre total para este complexo.

Para o complexo PROP2-*HssAChE*, os aminoácidos que mais contribuíram foram Tyr341, Trp286, Val294, Phe297, Phe338, Gln291, Leu289, Phe295, Pro290 e Tyr337, respectivamente. Estes aminoácidos apresentam uma contribuição de 40,33% no total da energia livre média para este complexo.

Em relação ao complexo Paraoxon-*AaAChE*, os aminoácidos que mais contribuem para a energia livre média são Glu108, Asp395, Asp503, Glu97, Glu109, Glu504, Glu100, Glu387, Glu506 e Asp183, respectivamente. A porcentagem de contribuição desses resíduos foi de 31,45% do total da energia livre média para este complexo.

Para o complexo Paraoxon-*HssAChE*, os dez aminoácidos que apresentaram maior contribuição no total da energia livre foram Asp74, Glu334, Glu84, Glu450, Glu285, Glu81, Glu452, Asp131, Glu292 e Glu202, respectivamente. Estes resíduos apresentaram contribuição de 55,41% no total da energia livre média.

Figura 45: Dez aminoácidos com maior contribuição para energia livre, segundo o método MM-PBSA, primeira etapa de simulações por dinâmica molecular.

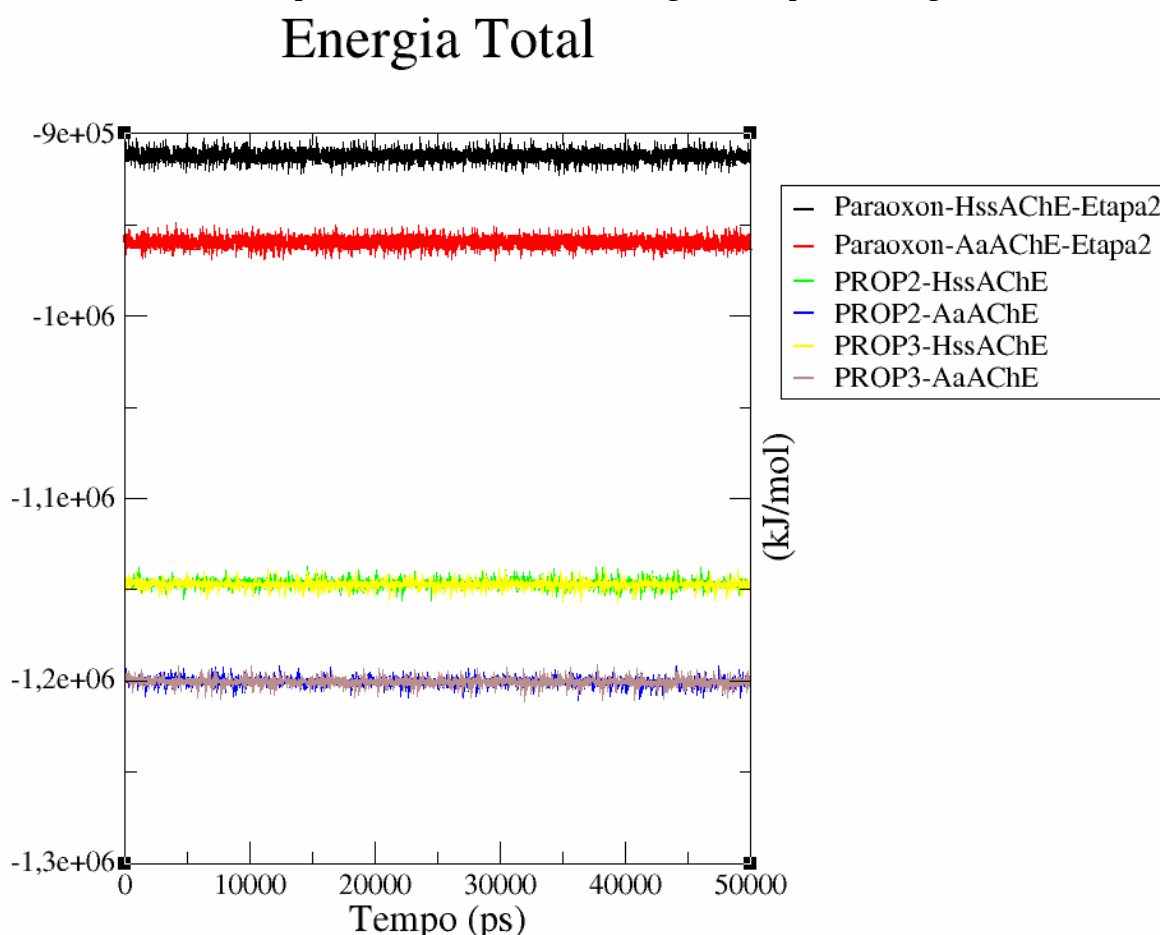


5.6.2 Resultados de DM advindos dos sistemas da segunda etapa de Docagem Molecular

5.6.2.1 Energia Total

A figura 46 mostra o gráfico de energia total ao longo do tempo de simulação, onde estão representados os resultados obtidos nos sistemas PROP2-Aa, PROP2-Hss, PROP3-Aa, PROP3-Hss, Paraoxon-Aa-Etapa2 e Paraoxon-Hss-Etapa2.

Figura 46: Energia total dos sistemas simulados por dinâmica molecular a partir dos dois melhores resultados de pesticidas selecionados na segunda etapa de docagem molecular.



Para os resultados gerados a partir da segunda etapa de docagem, foram observadas variações médias de $(-1200687,732 \pm 0,454)$ kJ/mol para o sistema PROP2-Aa, para o sistema PROP2-Hss $(-1146645,539 \pm 0,425)$ kJ/mol, para o sistema PROP3-Aa $(-1200753,436 \pm 0,443)$ kJ/mol, para o sistema PROP3-Hss $(-1147215,485 \pm 0,422)$ kJ/mol, para o sistema Paraoxon-HssAChE-Etapa2 $(-911347,3752 \pm 0,5072)$ e para o sistema Paraoxon-AaAChE-Etapa2 $(-958335,6008 \pm 0,5549)$.

5.6.2.1 RMSD

De maneira geral, o rmsd das estruturas calculadas apresentaram um comportamento estável durante as simulações, com a proteína não ultrapassando o valor máximo de 0,656 nm para o sistema do grid menor, conforme observado na figura 47.

A variação média do complexo Paraoxon-*HssAChE*-Etapa2 foi de $(0,2219 \pm 0,00001183)$, já a variação que o complexo Paraoxon-*AaAChE*-Etapa2 apresentou foi de $(0,4186 \pm 0,00002382)$. O complexo PROP2-*Aa* apresentou variação de $(0,4831 \pm 0,0017)$ nm. Já o complexo PROP2-*Hss* variou em média $(0,2438 \pm 0,0010)$ nm. Em relação ao complexo PROP3-*Aa*, foi observado uma variação média de $(0,4235 \pm 0,0016)$ nm e o complexo PROP3-*Hss* apresentou variação média de $(0,2548 \pm 0,0005)$ nm.

Figura 47: RMSD comparativo entre os complexos da segunda etapa de DM no tempo de 0 a 50 ns de simulação.

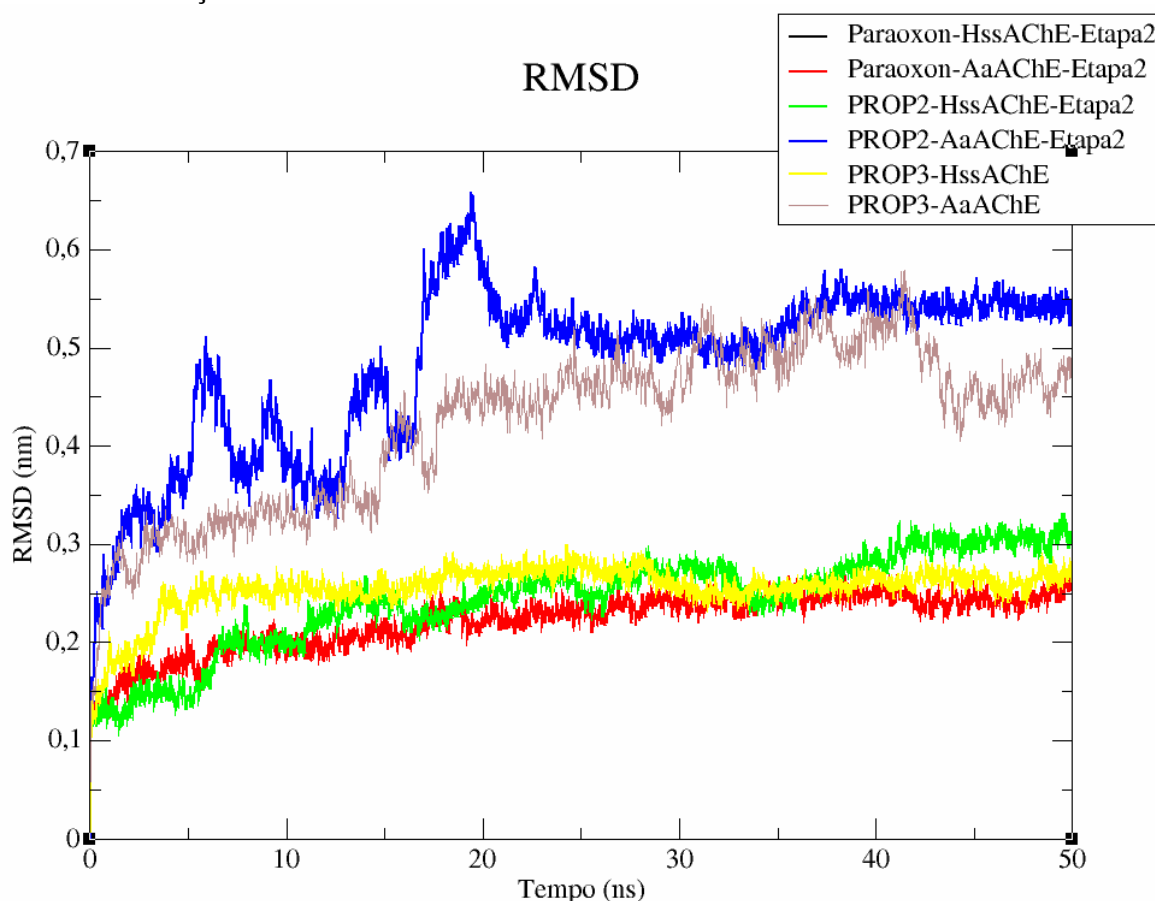
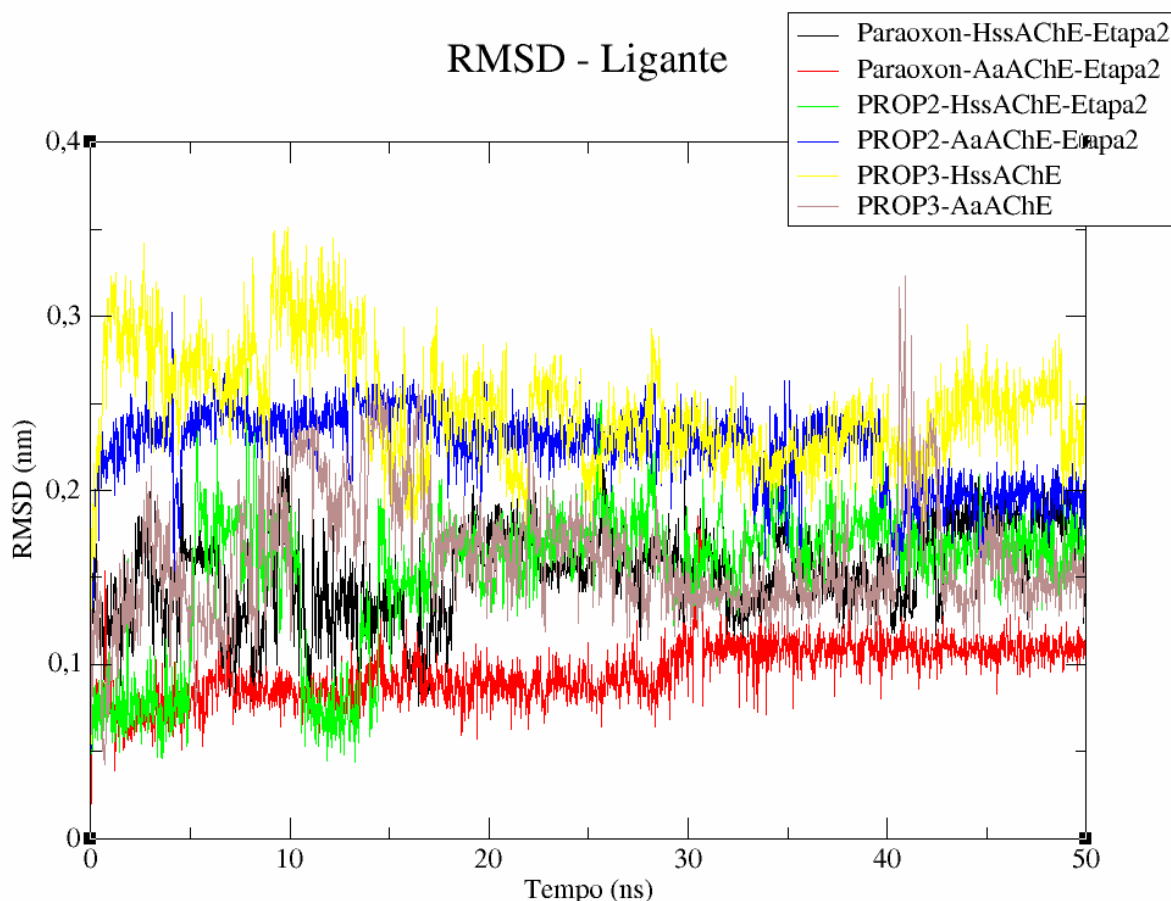


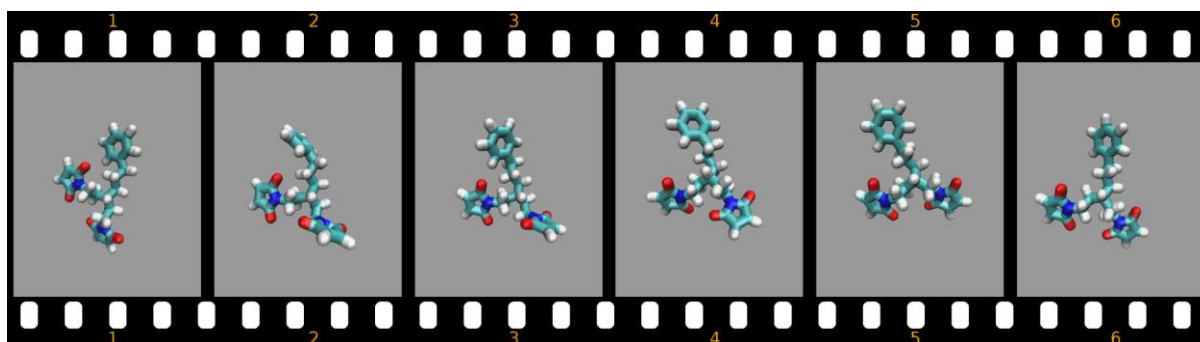
Figura 48: RMSD dos ligantes no tempo de 0 a 50 ns de simulação.



A figura 48 apresenta um gráfico de RMSD dos ligantes versus o tempo de simulação, onde foram observadas variações médias de $(0,2243 \pm 0,0004)$ nm em “PROP2-AaAChE”, $(0,1522 \pm 0,0008)$ nm em “PROP2-HssAChE”, $(0,1618 \pm 0,0007)$ nm em “PROP3-AaAChE”, $(0,2469 \pm 0,0006)$ nm em “PROP3-HssAChE”, $(0,1526 \pm 0,00001038)$ nm em Paraoxon-HssAChE e $(0,0953 \pm 0,000006652)$ nm em Paraoxon-AaAChE.

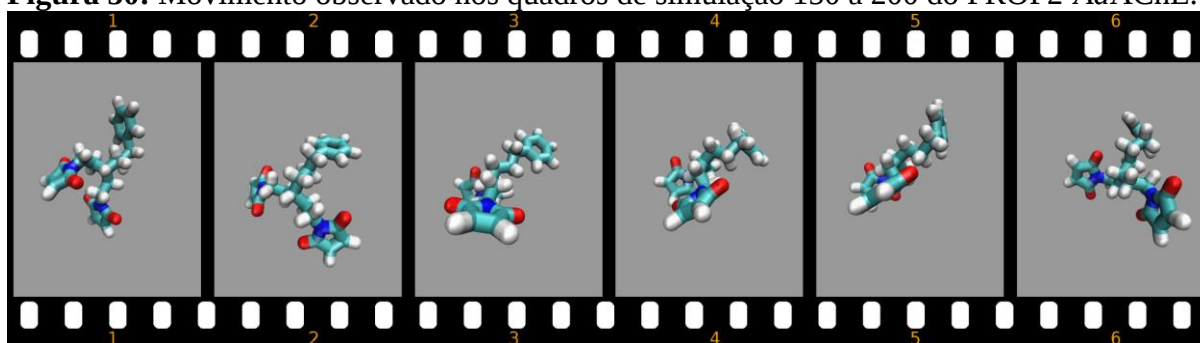
Ao observar os ligantes de maneira isolada, podemos perceber que ocorrem algumas variações acentuadas na proposta PROP2-Aa. No tempo de simulação igual a 5 ns, ocorre uma variação acentuada de RMSD, que corresponde a um movimento do ligante, conforme observado na figura 49.

Figura 49: Movimento observado nos quadros de simulação 20 a 25 do PROP2-AaAChE.



Entre 30 e 40 ns de simulação, ocorre uma segunda flutuação importante, que demonstra outro movimento de rotação do ligante. Pode-se observar na figura 50 os quadros 150, 160, 170, 180, 190 e 200 da simulação, que correspondem aos tempos 30, 32, 34, 36, 38 e 40 ns. Essas variações na conformação dos ligantes geram picos no gráfico de RMSD.

Figura 50: Movimento observado nos quadros de simulação 150 a 200 do PROP2-AaAChE.



Em relação a proposta PROP2-HssAChE, observa-se picos importantes no gráfico de RMSD do ligante nos tempos de simulação igual a 6,36 ns, o RMSD observado e de 0,229 nm. Essa variação corresponde a um movimento do ligante, onde ocorre uma deformação grande em relação à posição inicial, como mostrado na figura 51.

Uma segunda alteração na conformação também é observada no tempo de simulação igual a 7,84 ns, com RMSD de 0,267 nm. A sequência de quadros com esse movimento pode ser observada na figura 52.

Figura 51: Movimento observado no tempo de simulação igual a 6,36 ns a 6,40 ns do PROP2-HssAChE.

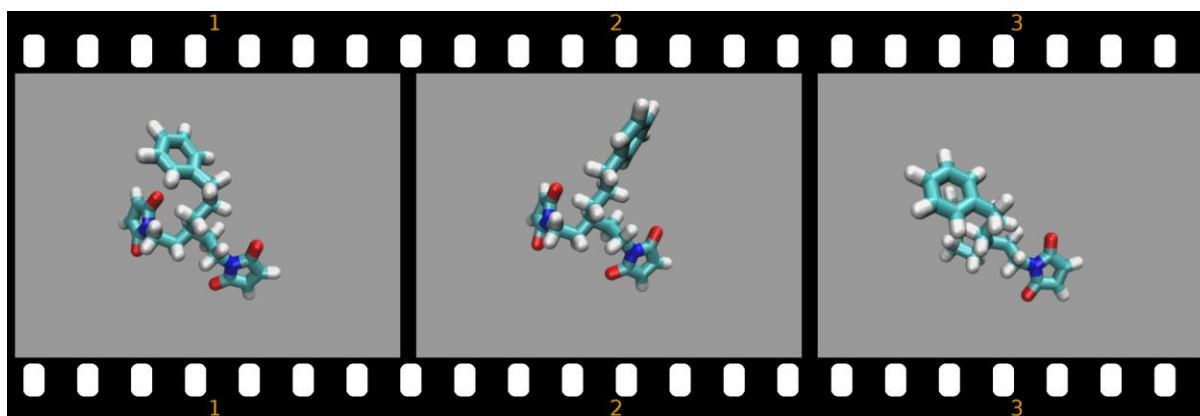
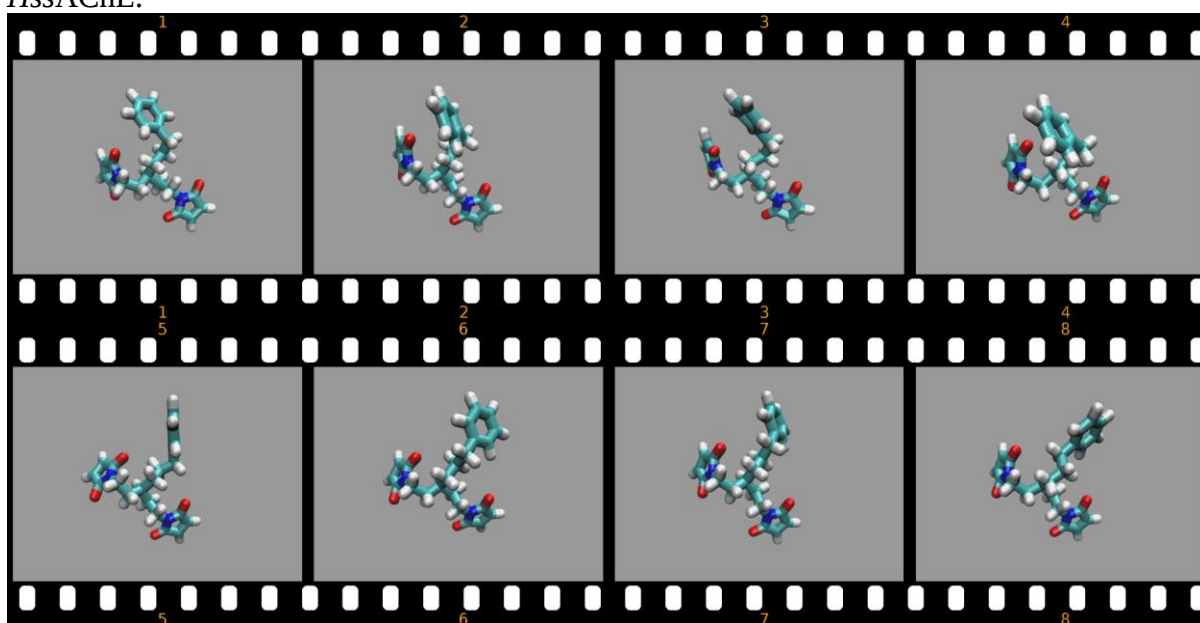


Figura 52: Movimento observado no tempo de simulação igual a 7,84 ns a 9,42 ns do PROP2-*HssAChE*.



No tempo de simulação igual a 40,62 ns foi observado o maior RMSD para o ligante PROP3-*AaAChE*, com um valor de 0,317 nm. A figura 51 mostra a variação da posição do ligante nesse tempo de simulação.

Em relação ao ligante PROP3-*HssAChE*, foi observado um pico importante no gráfico de RMSD no início da simulação. A figura 52 mostra a posição do ligante nos tempos de simulação iguais a 1,6 ns A 2,2 ns.

Figura 53: Movimento observado no tempo de simulação igual a 7,84 ns a 9,42 ns do PROP3-*AaAChE*.

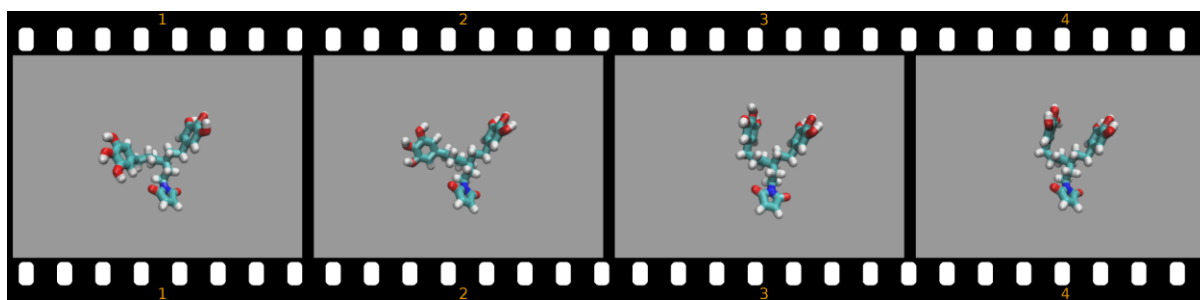
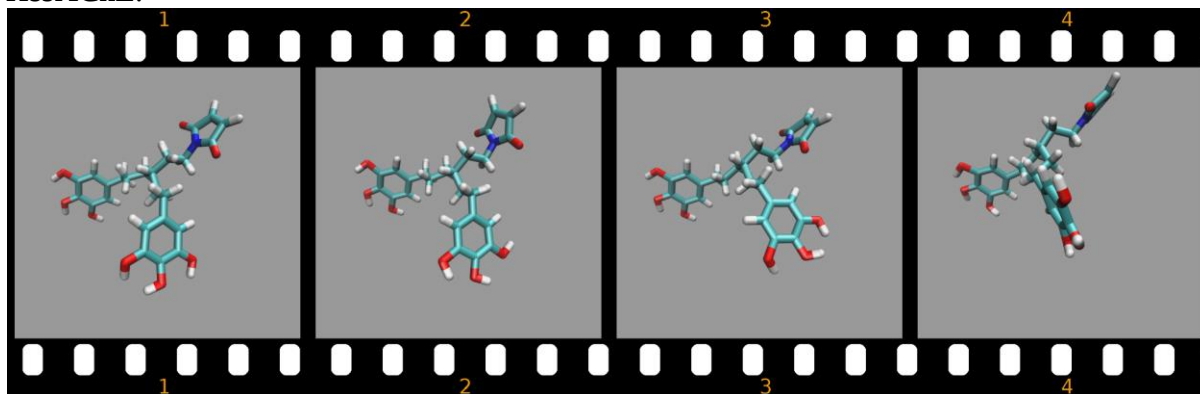


Figura 54: Movimento observado no tempo de simulação igual a 1,6 ns a 2,2 ns do PROP3-*HssAChE*.



5.6.2.3 RMSF

A figura 55 mostra os gráficos de RMSF dos sistemas Paraoxon-*HssAChE*, Paraoxon-*AaAChE*, PROP2-*HssAChE*, PROP2-*AaAChE*, PROP3-*HssAChE* e PROP3-*AaAChE*.

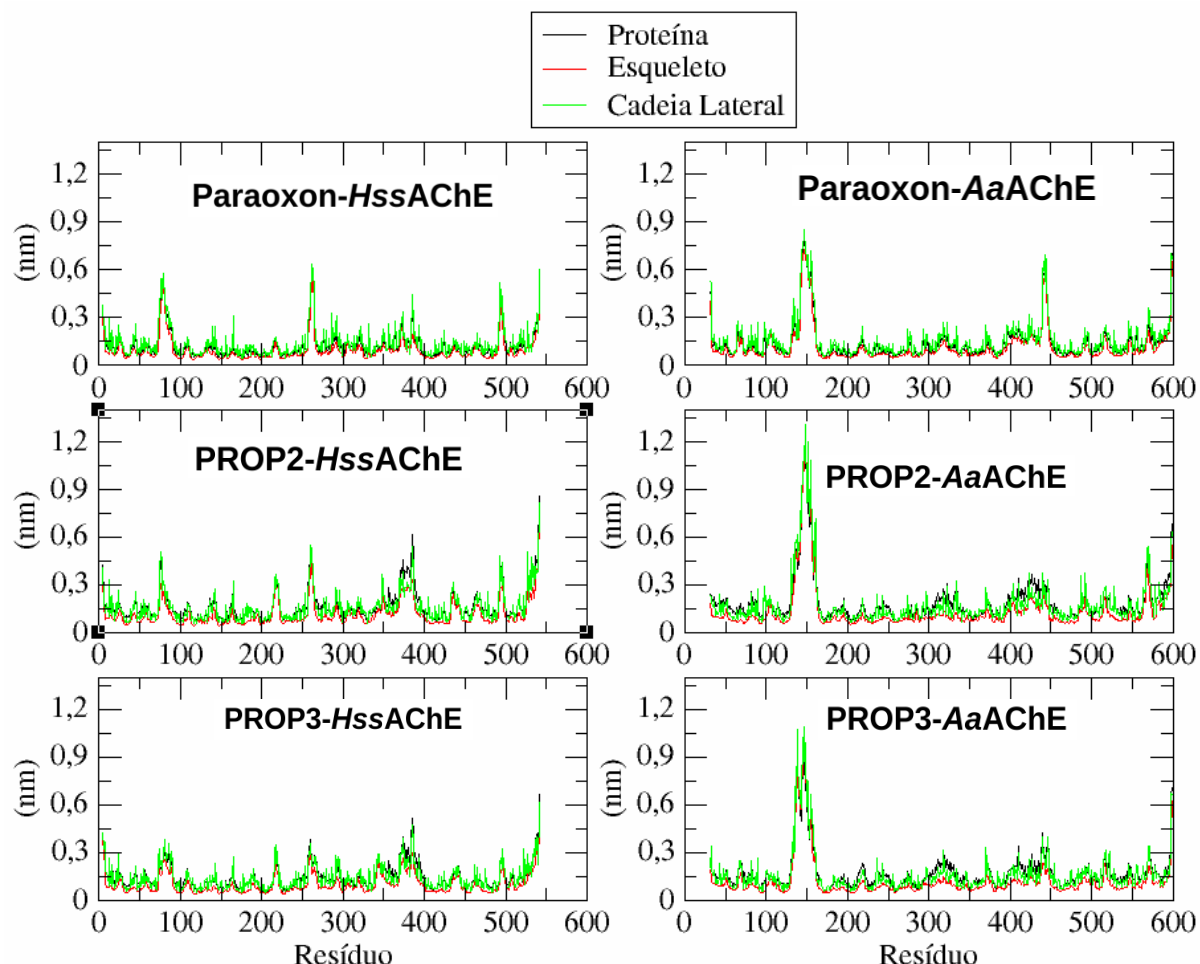
Os aminoácidos que apresentam maior flutuação no complexo PROP2-*AaAChE* são Lys131, Arg133, His136, Gly137, Arg138, Gly139, Leu140, Asn141, Phe142, Gly143, Asn144, Asn145, Asp146, Tyr147, Phe148, Gln149, Asp150, Asp151, Asp152, Asp153, Phe154, Gln155, Arg156, Gln157, Gln159, Ser160, Lys161, Glu568, Asp569, Leu571, Arg572, Trp598 e Ser599.

Em relação ao complexo PROP2-*HssAChE* os aminoácidos que apresentaram RMSF maior do que 0,4 nm foram Asp5, Thr75, Leu76, Tyr77, Pro259, Gly260, Gly261, Thr262, Trp385, Arg493, Lys496, Gln527, Phe531, Asn533, Pro537, Leu540, Ser541, Ala542.

Os aminoácidos que apresentam maior flutuação no complexo PROP3-*AaAChE* foram Arg133, His136, Gly137, Arg138, Gly139, Leu140, Asn141, Phe142, Gly143, Asn144, Asn145, Asp146, Tyr147, Phe148, Gln149, Asp150, Asp151, Asp152, Phe154, Gln155, Arg156, Gln157, Trp598 e Ser599.

Os aminoácidos que apresentaram RMSF maior do que 0,4 nm para o complexo PROP3-*HssAChE* foram Asp5, Trp385, Ser541 e Ala542.

Figura 55: RMSF dos sistemas Paraoxon-*HssAChE*, Paraoxon-*AaAChE*, PROP2-*HssAChE*, PROP2-*AaAChE*, PROP3-*HssAChE* e PROP3-*AaAChE*.



Os aminoácidos que apresentaram valores de RMSF superiores a 0,4 nm foram resíduos localizados em regiões da cadeia lateral das enzimas, e por serem regiões acessíveis ao solvente apresentam maior flexibilidade.

As figuras 56 e 57 mostram as enzimas *AaAChE* e *HssAChE* com os aminoácidos descritos em destaque na representação sticks.

Figura 56: Em ciano *AaAChE* e em verde *HssAChE*. Aminoácidos com RMSF maior do que 0,4 nm em representação de *sticks*. Resultados para as proteínas complexadas com o pesticida PROP2.

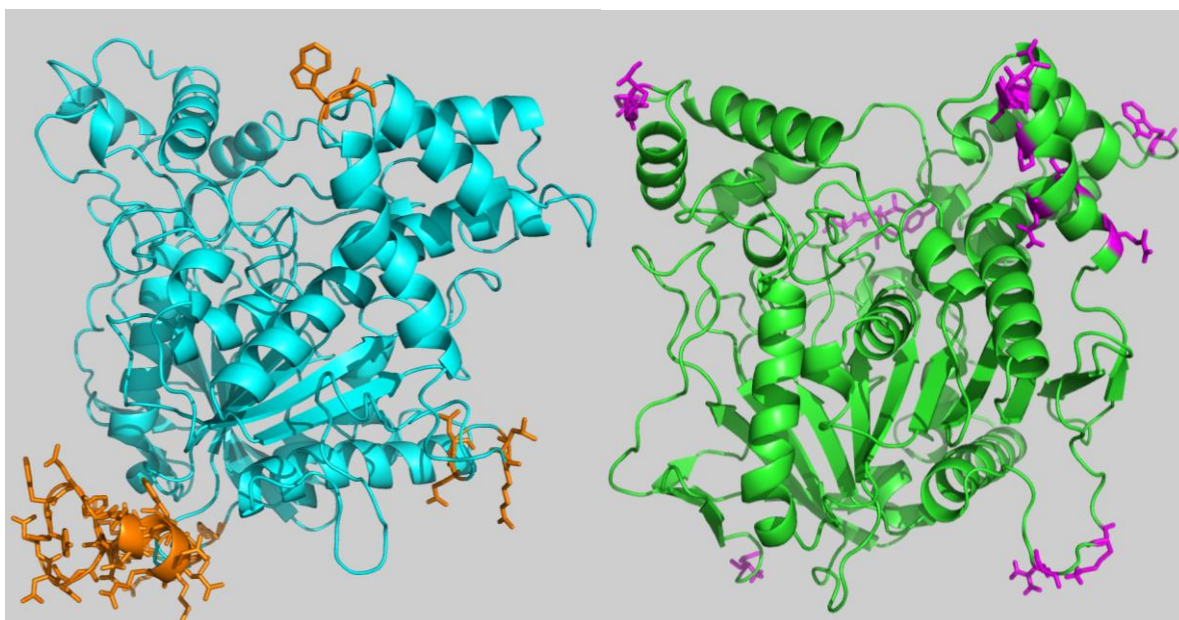
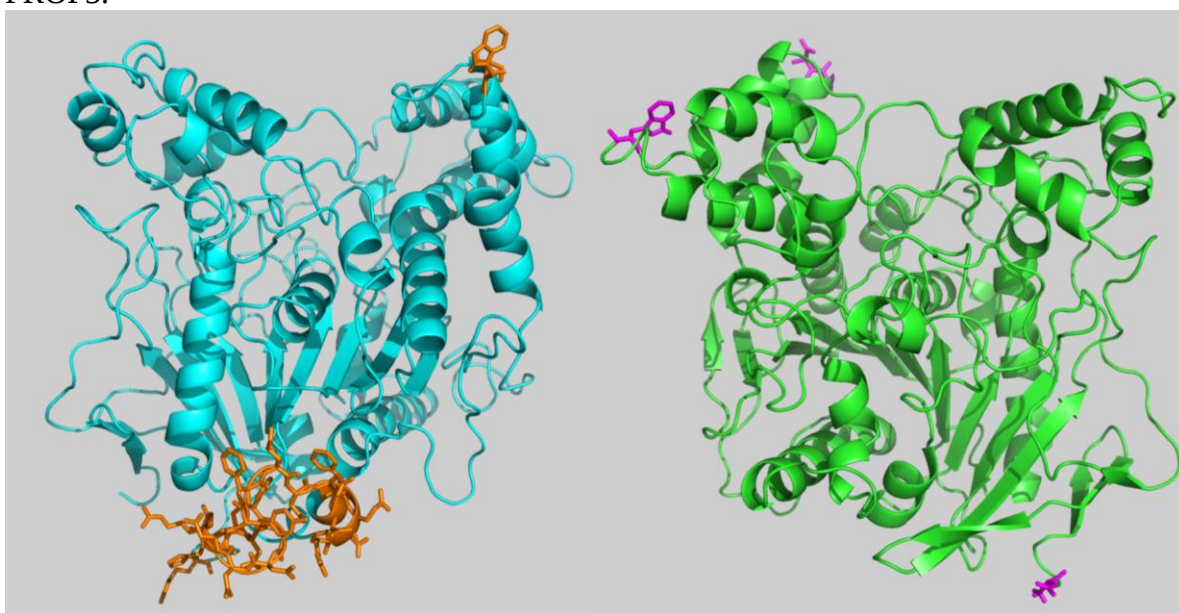


Figura 57: Em ciano *AaAChE* e em verde *HssAChE*. Aminoácidos com RMSF maior do que 0,4 nm em representação de *sticks*. Resultados para as proteínas complexadas com o pesticida PROP3.

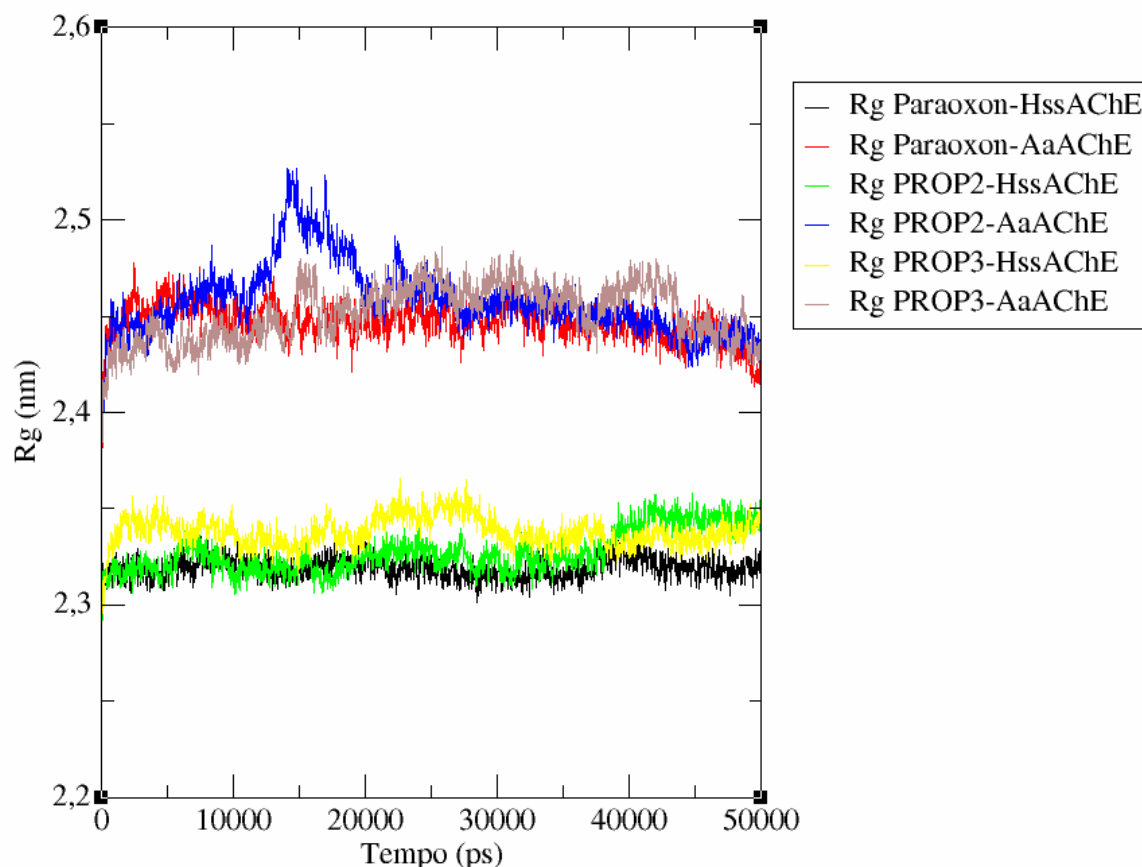


5.6.2.4 Raio de Giro

A figura 58 mostra um gráfico de Raio de giro das propostas PROP2-*AaAChE*, PROP2-*HssAChE*, PROP3-*AaAChE* e PROP3-*HssAChE*.

Figura 58: Raio de giro das propostas Paraoxon, PROP2 e PROP3 com as enzimas *AaAChE* e *HssAChE*.

Raio de Giro



O sistema PROP2-*AaAChE* inicia a simulação com um valor de raio de giro de 2,36 nm e finaliza em 2,43 nm, apresentando um valor médio de $(2,46 \pm 0,00000733)$ nm, o sistema PROP2-*HssAChE* apresenta raio de giro igual a 2,28 no início da simulação por DM e finaliza em 2,35 nm, apresentando média de $(2,33 \pm 0,00000420)$ nm. O sistema PROP3-*AaAChE* apresentou raio de giro igual a 2,36 no início da simulação e 2,45 no final da simulação, com valor médio de $(2,45 \pm 0,00000584)$ nm. Já o sistema PROP3-*HssAChE* apresentou média de $(2,34 \pm 0,00000312)$ nm, tendo como valor de Rg inicial de 2,28 nm e ao final da simulação um valor de 2,34 nm.

5.6.2.5 Distância entre os centros de Massas

A tabela 20 apresenta os valores de distância média entre os centros de massas dos ligantes e das proteínas em estudo nesta etapa.

Tabela 20: Distância entre os centros de massas das enzimas *AaAChE* e *HssAChE* com os ligantes PROP2 e PROP3.

Ligante - Proteína	Distância média entre centros de massas (nm)	Desvio da média das distâncias (nm)
PROP2- <i>AaAChE</i> -Etapa2	1,99E-01	0,0003
PROP2- <i>HssAChE</i> -Etapa2	1,96E-01	0,0004
PROP3- <i>AaAChE</i>	1,61E-01	0,0002
PROP3- <i>HssAChE</i>	1,62E-01	0,0002
Paraoxon- <i>AaAChE</i>	2,15E-01	0,000004
Paraoxon- <i>HssAChE</i>	2,05E-01	0,000008

Esses valores médios mostram que os ligantes apresentaram médias entre 0,215 e 0,161 nm de distância da proteína, indicando que os mesmos permanecem aderidos à superfície da proteína durante toda a simulação por DM.

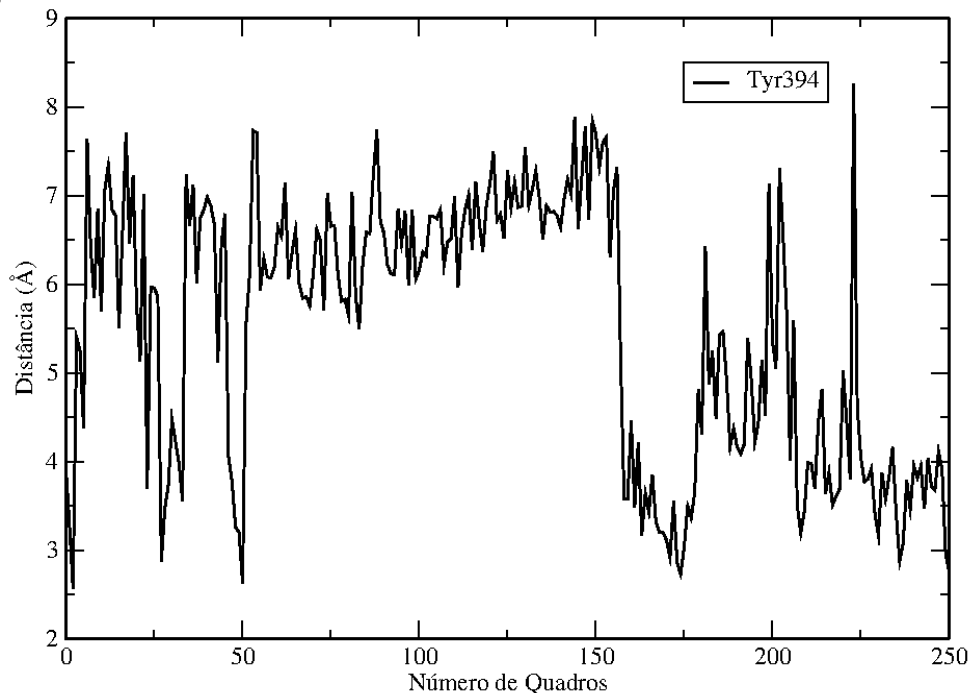
A fim de observar o comportamento de cada um dos ligantes, foram selecionados os aminoácidos mutantes da região da entrada do sítio ativo das proteínas *AaAChE* e *HssAChE* e foram geradas figuras que relacionam a posição dos ligantes com o tempo de simulação. Foram geradas imagens a cada 10 nanosegundos de simulação, com início no tempo igual a zero nanosegundos, apresentando um total de seis frames para cada um dos ligantes.

No tempo de simulação igual a 50 nanosegundos, foram selecionados aminoácidos que apresentaram distância de até 2,1 angstroms de distância do ligante, a fim de que fossem geradas gráficos de distância por número de quadros da simulação, possibilitando observar a acomodação do ligante em relação a esses aminoácidos, conforme realizado na etapa anterior.

Em relação ao complexo PROP2-*AaAChE*, o aminoácido Tyr394 apresentou no último quadro menor distância de interação com o ligante PROP2, dessa maneira, esse resíduo contribuiu para a estabilização do complexo PROP2-*AaAChE*. A distância do resíduo Tyr394 inicial em relação ao ligante foi de 3,91 Å e ao final da simulação passou para 2,75 Å.

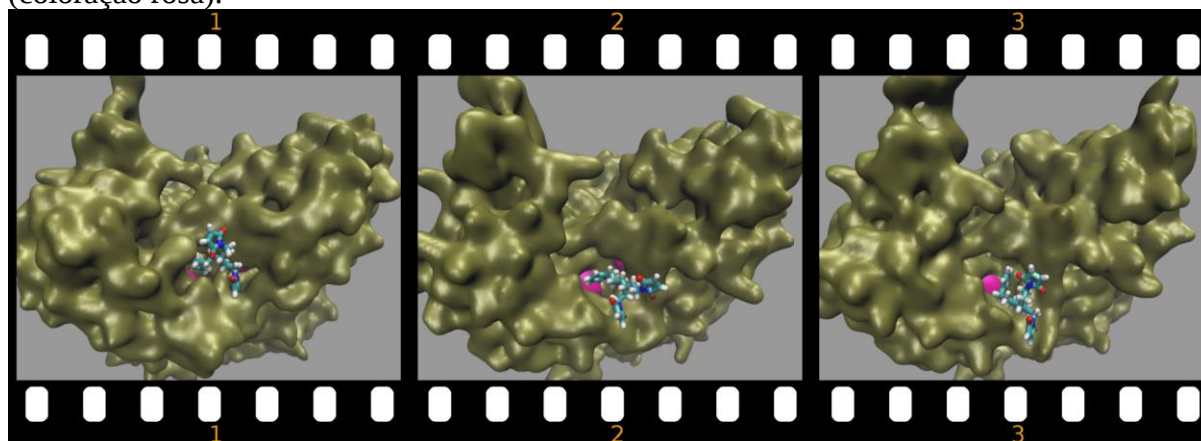
O gráfico da figura 59 mostra a distância de interação pelo número de quadros da simulação.

Figura 59: Distância de interação entre o aminoácido Tyr394 pelo número de quadros da simulação.



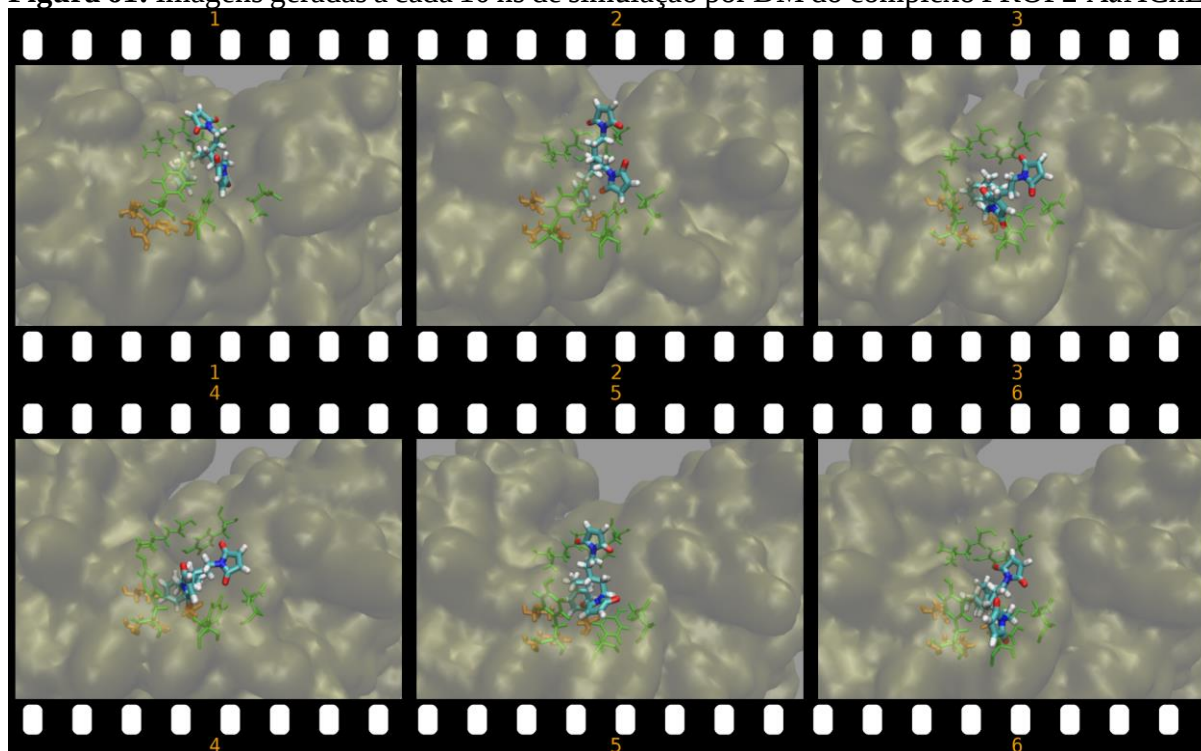
Conhecendo os aminoácidos do sítio ativo da *HssAChE*, por comparação foram selecionados os aminoácidos Met176 e Tyr390 para observar se ocorre o impedimento estérico da entrada do sítio ativo (ALMEIDA, 2014). Esses aminoácidos estão representados em rosa, enquanto a proteína está representada em coloração bronze. Nos quadros de simulação iguais a 0 ns, 25 ns e 50 ns, o ligante permanece obstruindo a entrada do sítio, como verificado na figura 60.

Figura 60: Quadros de simulação por DM do complexo PROP2-AaChE. Representação em superfície molecular da enzima AaChE (coloração bronze) e aminoácidos MET176 e Tyr390 (coloração rosa).



Na sequência, foram selecionados quadros de simulação a cada 10 ns de simulação, com os aminoácidos Glu97, Tyr99, Tyr101, Tyr344, Gly346 e Ile347 selecionados em verde, os resíduos da tríade catalítica em laranja e foi gerada a imagem da figura 61.

Figura 61: Imagens geradas a cada 10 ns de simulação por DM do complexo PROP2-AaAChE.

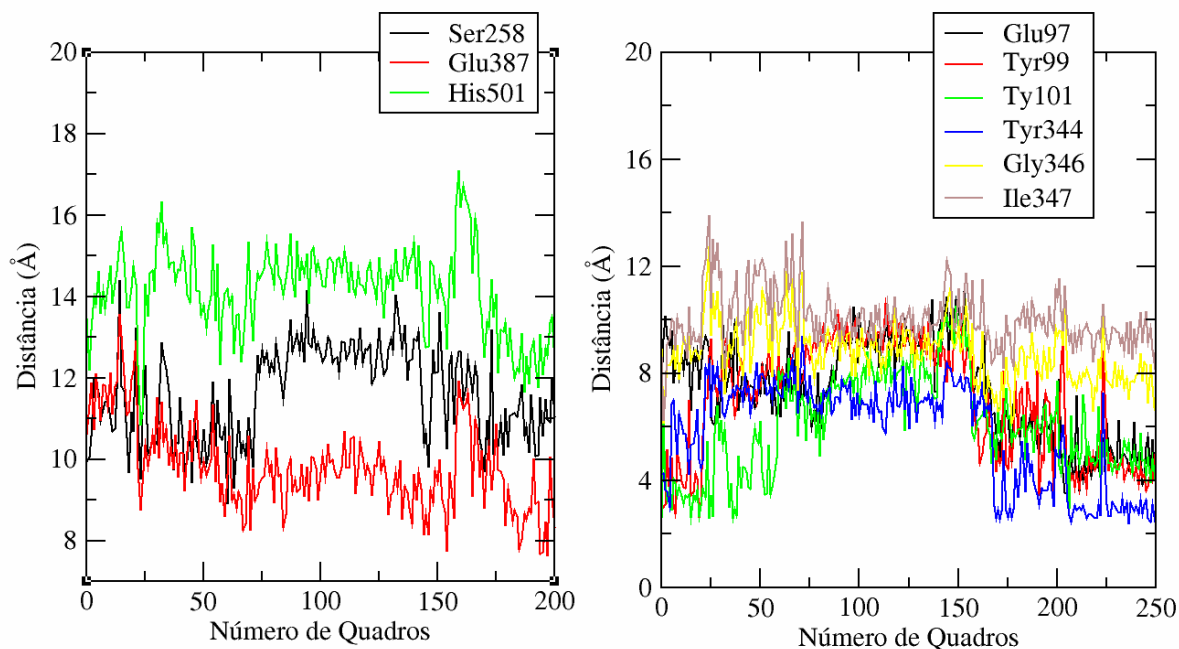


Foram medidas as distâncias de interação entre esses aminoácidos e o ligante ao longo da simulação, sendo gerados os gráficos da figura 62.

Para o aminoácido Ser258, as distâncias variaram de 9,95 Å no início da simulação a 11,34 Å ao final, para o Glu387, variação observada foi de 10,62 Å a 11,01 Å e para a His501, observou-se uma variação de 13,44 Å a 13,14 Å.

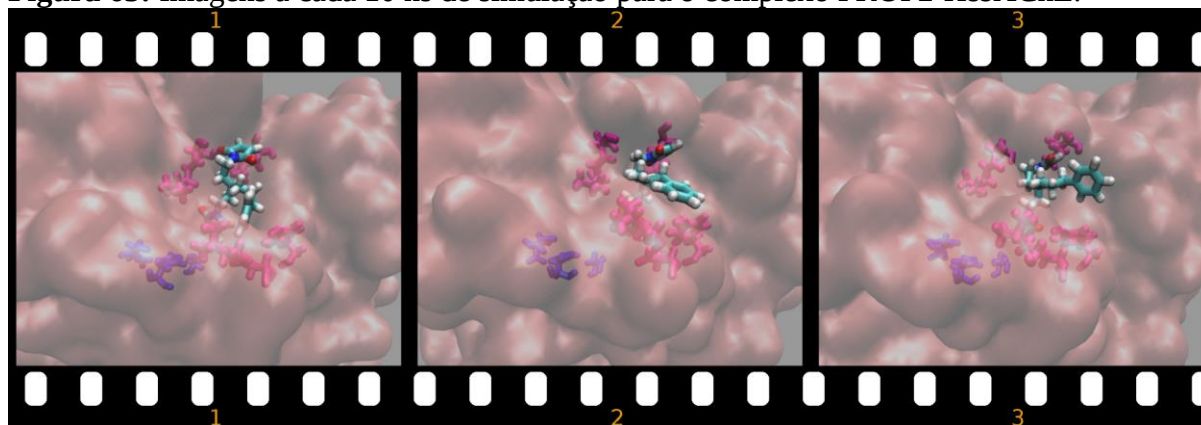
No segundo gráfico da figura 58, observou-se uma variação de 7,59 Å a 4,35 Å para o aminoácido Glu97, para a Tyr99 a variação foi de 3,14 Å a 4,33 Å, para a Tyr101, a distância variou de 2,64 Å a 3,67 Å, para a Tyr344, a distância variou de 4,22 Å a 3,10 Å, para a Gly346 variou de 8,90 Å a 6,94 Å e para a Ile, a variação observada foi de 8,61 Å a 9,16 Å.

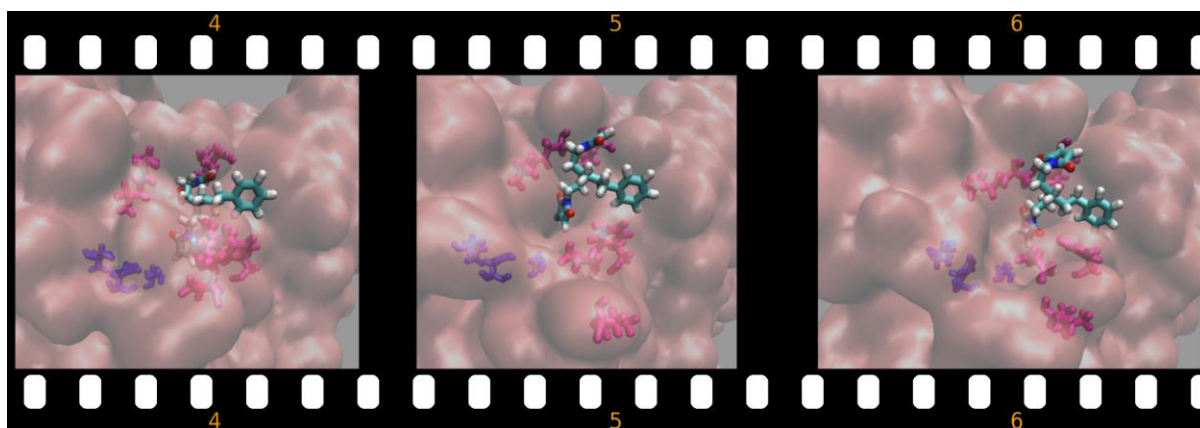
Figura 62: Distâncias de interação entre o pesticida PROP2 e os resíduos da tríade catalítica (esquerda) e aminoácidos mutantes da entrada do sítio ativo (direita) da enzima AaAChE.



Em relação a interação entre o pesticida PROP2 com a proteína *HssAChE* da segunda etapa, foram selecionados os aminoácidos Tyr72, Asp74, Leu76, Leu289, Ser293, Val294 e os resíduos da tríade catalítica da enzima (Ser203, His447 e Glu334). Foram geradas imagens a cada 10 ns de simulação que estão representadas na figura 63.

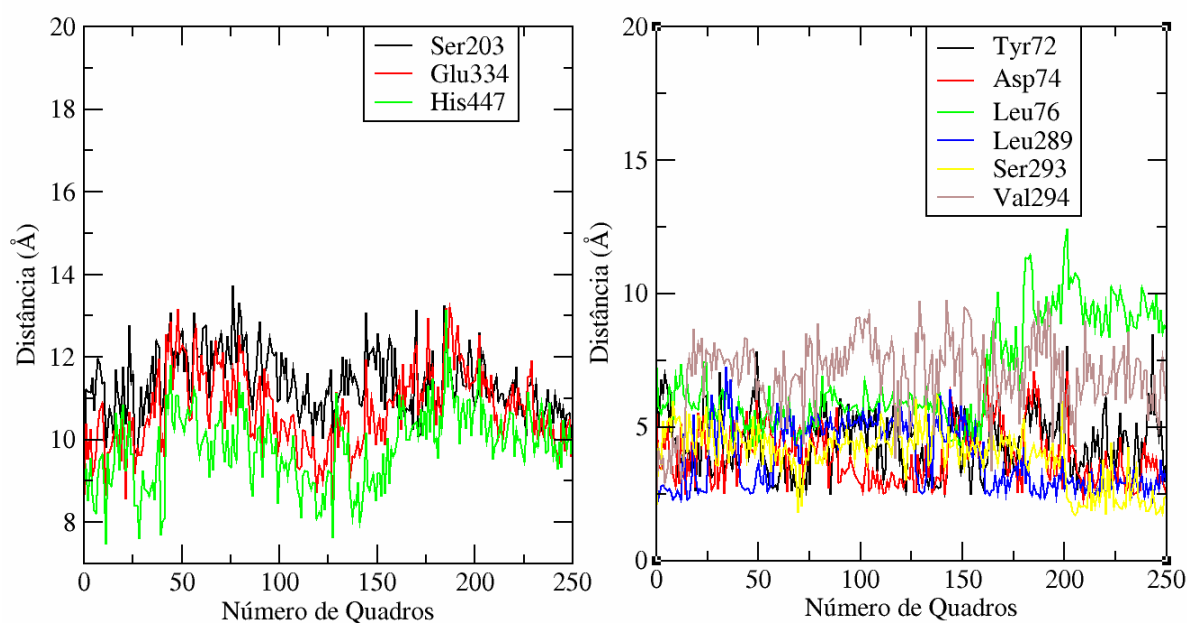
Figura 63: Imagens a cada 10 ns de simulação para o complexo PROP2-*HssAChE*.





As distâncias de interação foram medidas ao longo dos quadros de simulação e foram obtidos os gráficos da figura 64.

Figura 64: Distâncias de interação entre o pesticida PROP2 e os resíduos da tríade catalítica (esquerda) e aminoácidos mutantes da entrada do sítio ativo (direita) da enzima *HssAChE*.



A variação da distância para o aminoácido Ser203 foi de 9,34 Å a 10,90 Å, para o Glu334, foi de 8,67 Å a 10,04 Å e para a His447 foi de 9,02 Å a 10,09 Å.

Em relação aos aminoácidos mutantes da entrada do sítio da enzima *HssAChE*, foi observada uma variação da distância para a Tyr72 de 6,06 Å a 3,86 Å, para a Asp74 foi de 5,49 Å a 2,45 Å, para a Leu76 foi de 7,21 Å a 8,67 Å, para a Leu289 variou de 2,90 Å a 2,82 Å, para a Ser293 variou de 2,10 Å a 2,44 Å e para o aminoácido Val294 a distância variou de 2,63 Å a 5,68 Å.

Além de Ser293, foram identificados outros dois aminoácidos que apresentaram distância inferior a 2,1 Å de distância do ligante ao final da simulação por DM. Foram eles a Tyr341 e o Trp286, que interagiram com distância de 3,17 Å e 2,98 Å, respectivamente.

Em relação a interação entre o pesticida PROP3 com a proteína *AaAChE* da segunda etapa, foram selecionados os aminoácidos da tríade catalítica da enzima e os aminoácidos mutantes, Glu97, Tyr99, Tyr101, Tyr344, Gly346 e Ile347. Foram geradas imagens a cada 10 ns de simulação que estão representadas na figura 65.

Os gráficos das distâncias ao longo dos quadros de simulação para este complexo estão representados na figura 66.

Figura 65: Imagens geradas a cada 10 ns de simulação por DM do complexo PROP3-*AaAChE*.

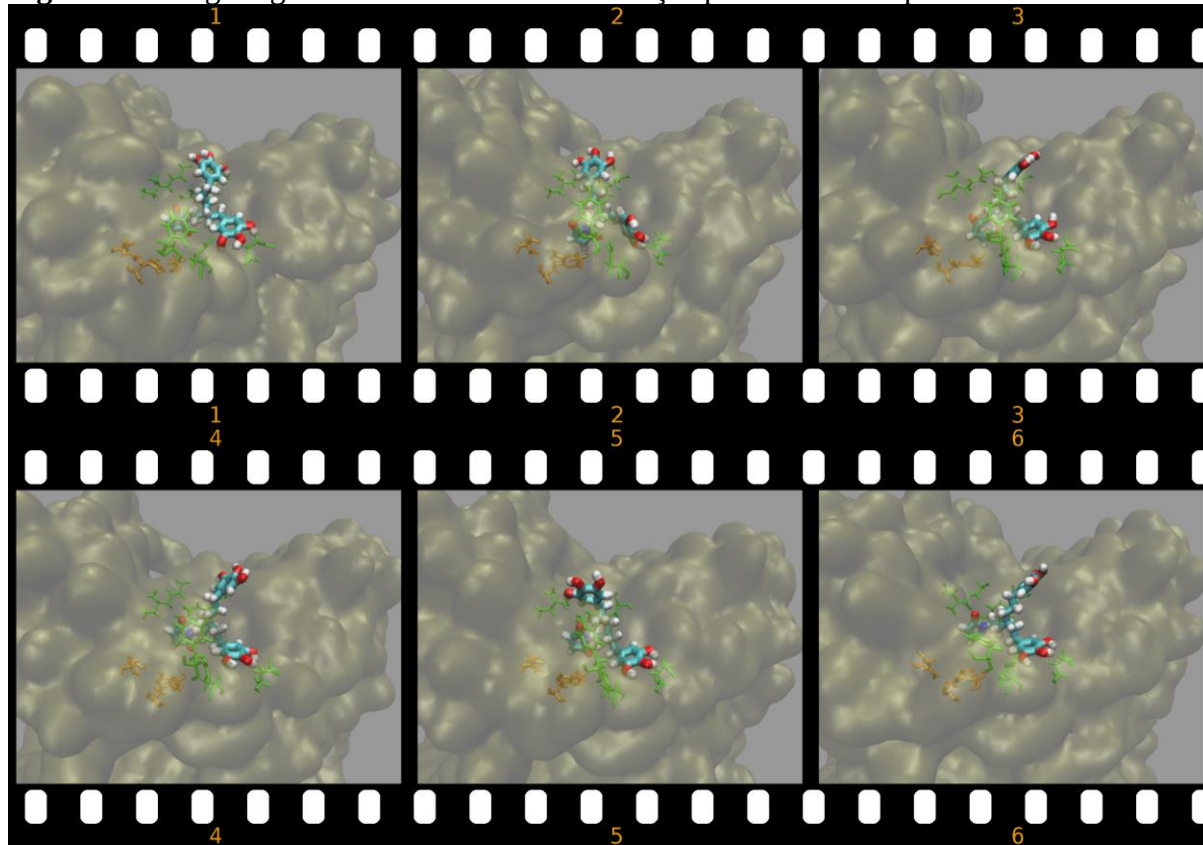
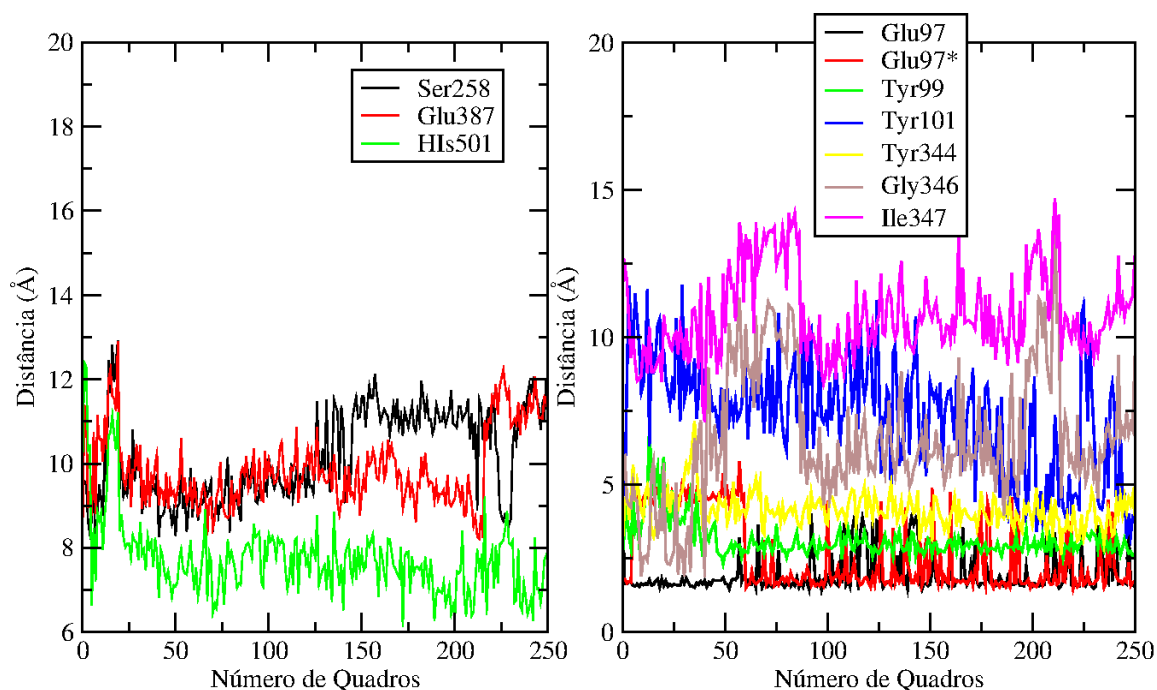


Figura 66: Distâncias de interação entre o pesticida PROP3 e os resíduos da tríade catalítica (esquerda) e aminoácidos mutantes da entrada do sítio ativo (direita) da enzima *AaAChE*.

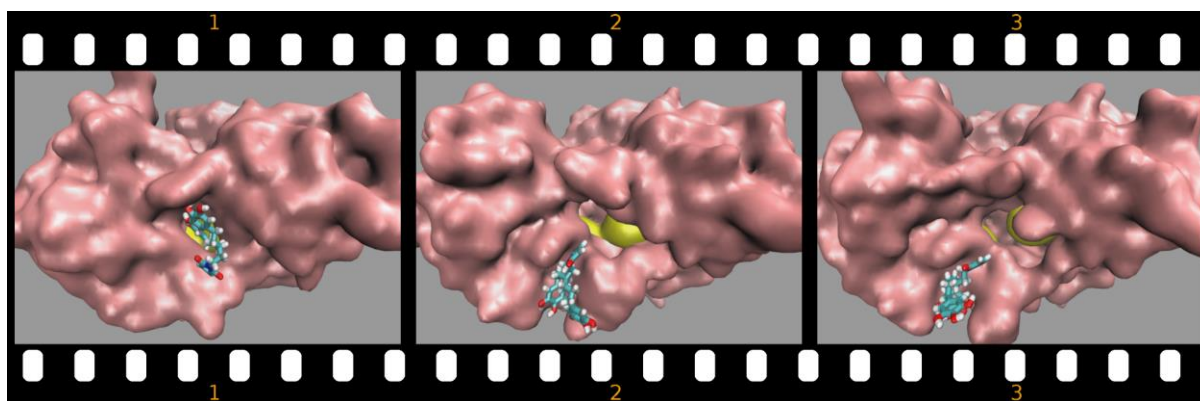


As distâncias observadas entre os aminoácidos da tríade catalítica da enzima *AaAChE* e do ligante PROP3 foram de 9,35 Å para 11,50 Å para a Ser258, de 8,18 Å a 11,81 Å para o Glu387 e de 9,83 Å para 7,64 Å para a His501.

No segundo gráfico da figura 66, as distâncias iniciais e finais para o aminoácido Glu97 vai de 3,71 Å a 1,54 Å, uma segunda interação entre o ligante e o aminoácido Glu97* varia de 1,83 Å para 1,72 Å, a Tyr99 apresenta variação de distância de 2,72 Å a 2,67 Å, a Tyr101 vai de 4,70 Å a 3,98 Å, a Tyr344 vai de 3,14 Å a 3,96 Å, a Gly346 vai de 5,87 Å a 9,36 Å e a Ile347 vai de 11,85 Å a 12,78 Å.

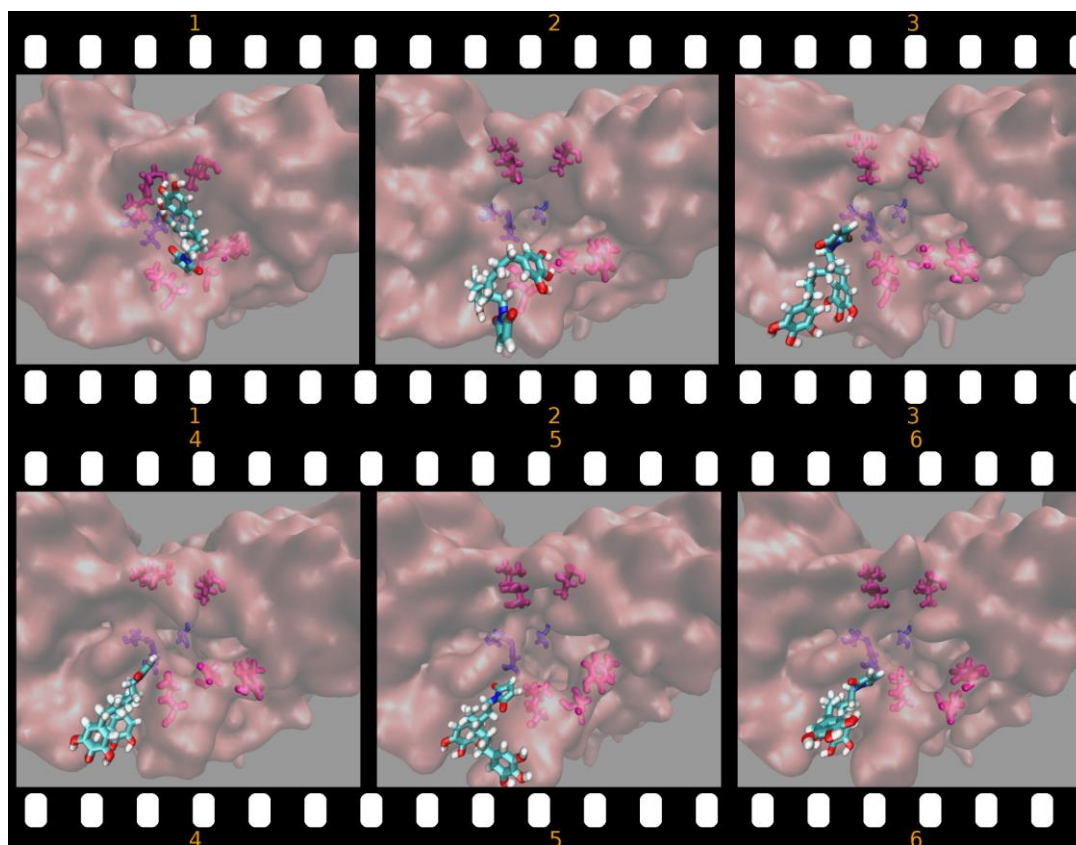
Em relação a interação entre o pesticida PROP3 com a proteína *HssAChE* da segunda etapa, as figuras 67 e 68 apresentam a região da entrada do sítio ativo com os aminoácidos Tyr337 e Tyr 124 selecionados, quadros de simulação a cada 10 ns de simulação e gráficos de distância por número de quadros de simulação, respectivamente.

Figura 67: Quadros de simulação por DM do complexo PROP3-*Hss*. Representação em superfície molecular da enzima *HssAChE* (coloração rosa) e aminoácidos Tyr124 e Tyr337 (coloração amarelo), em representação de licorice ligante PROP3.



A partir da figura 67, pode-se observar que no início da simulação, o ligante PROP3 encontrava-se na região da entrada do sítio ativo da enzima *HssAChE*. Entretanto, na sequência de quadros representando os tempos de simulação iguais a 25 ns e 50 ns, o ligante PROP3 não está na região da entrada do sítio ativo da proteína, dessa maneira, o acesso ao poço do sítio ativo encontra-se desobstruído ao final da simulação por DM.

Figura 68: Imagens a cada 10 ns de simulação para o complexo PROP3-*HssAChE*.

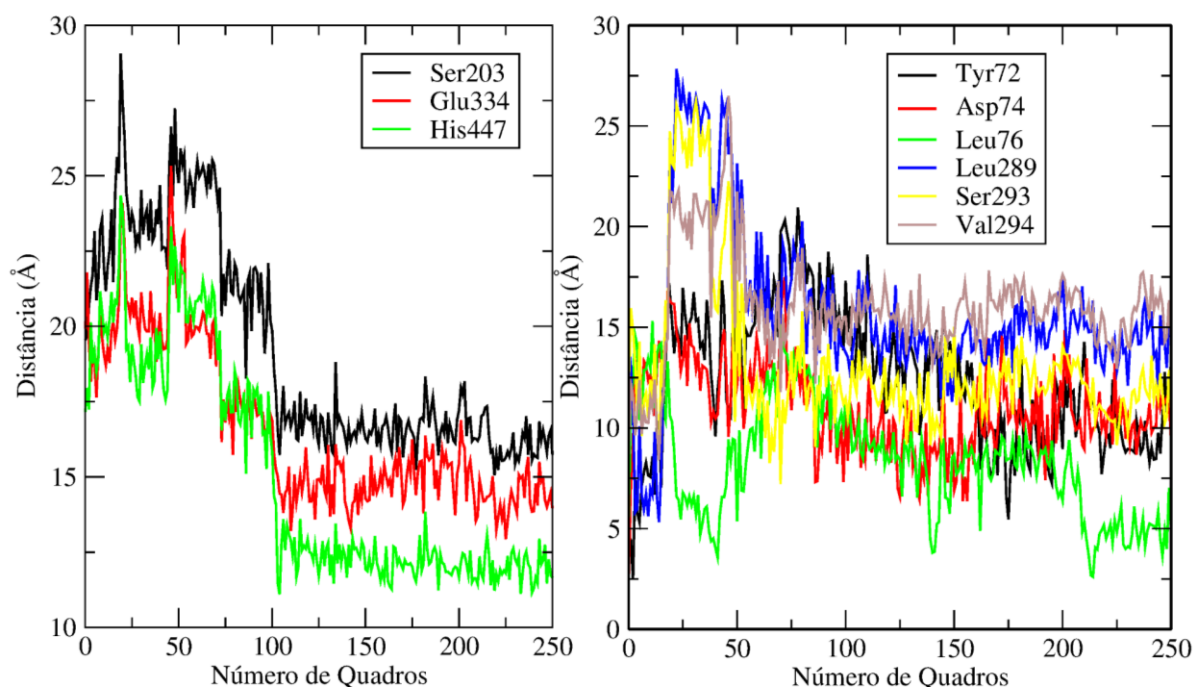


A partir da figura 68, observa-se que o ligante PROP3 se movimenta para fora da região da entrada do sítio ativo da enzima a partir dos primeiros 10 ns de simulação, estabilizando-se

na região da enzima próximo ao aminoácido Asp349, que de uma distância inicial de 22,09 Å para uma distância de 1,60 Å do ligante ao final da simulação.

A figura 69 mostra as distâncias de interação entre os aminoácidos da tríade catalítica da enzima *HssAChE* e os aminoácidos da entrada do sítio ativo com o ligante PROP3.

Figura 69: Distâncias de interação entre o pesticida PROP3 e os resíduos da tríade catalítica (esquerda) e aminoácidos mutantes da entrada do sítio ativo (direita) da enzima *HssAChE*.



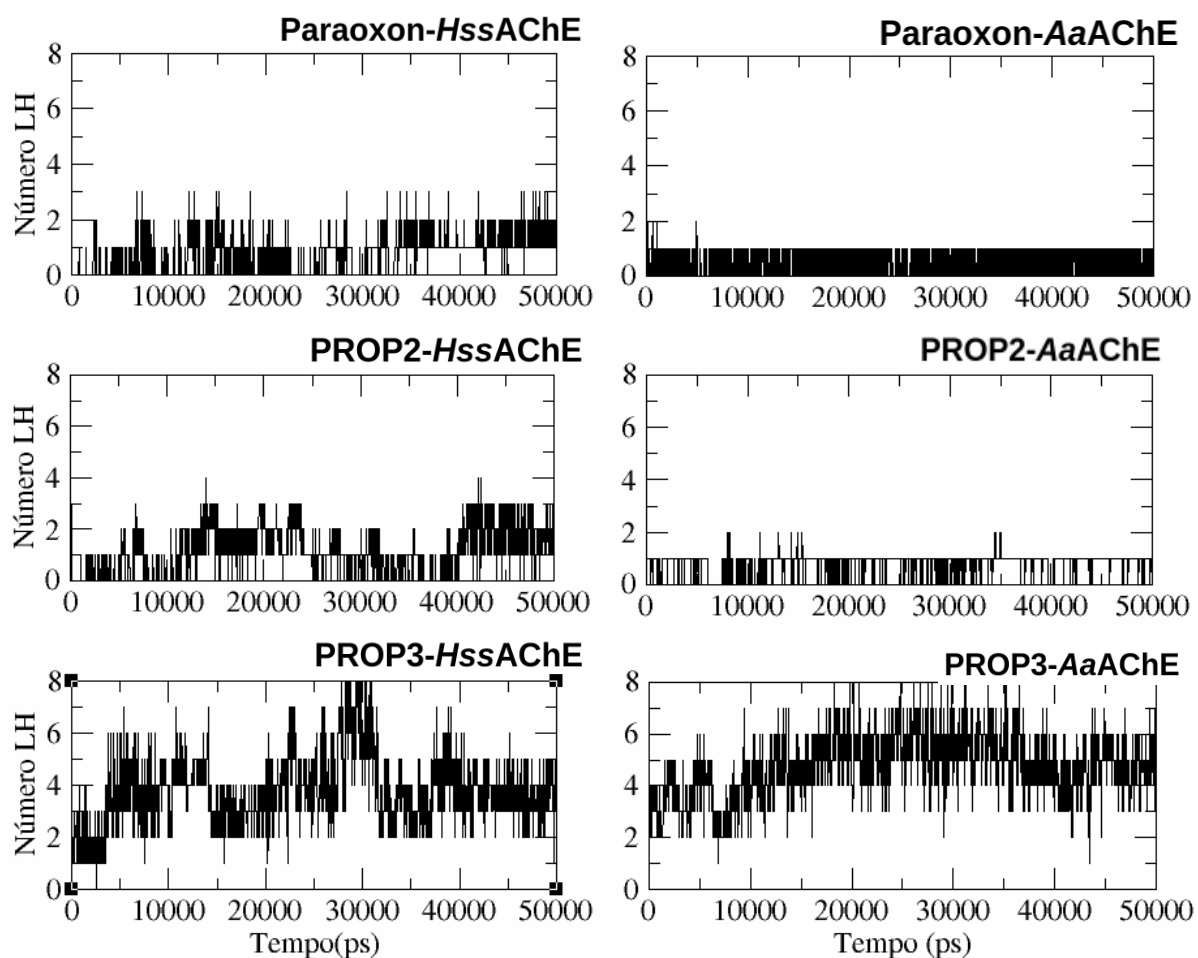
Em relação às distâncias observadas na figura 69, o aminoácido Ser203 varia de uma distância inicial de 19,54 Å para uma distância final de 15,73 Å, o aminoácido Glu334 varia de 19,93 Å a 13,96 Å e a His447 varia de 17,16 Å a 11,65 Å.

Em relação aos resíduos mutantes da entrada do sítio ativo da enzima *HssAChE*, o aminoácido Tyr72 varia de 4,60 Å a 13,15 Å, o Asp74 varia de 2,70 Å a 9,31 Å, a Leu76 varia de 5,49 Å a 4,83 Å, a Leu289 varia de 14,21 Å a 14,68 Å, a Ser293 varia de uma distância igual a 11,99 Å a 10,63 Å e a Val294 varia de uma distância igual a 8,64 Å a 14,24 Å.

5.6.2.6 Ligações Hidrogênio

A figura 70 mostra a média de interações por ligações hidrogênio que ocorrem nos complexos da segunda etapa de dinâmica molecular.

Figura 70: Média de ligações hidrogênio observadas nos complexos simulados para a segunda etapa de dinâmica molecular.

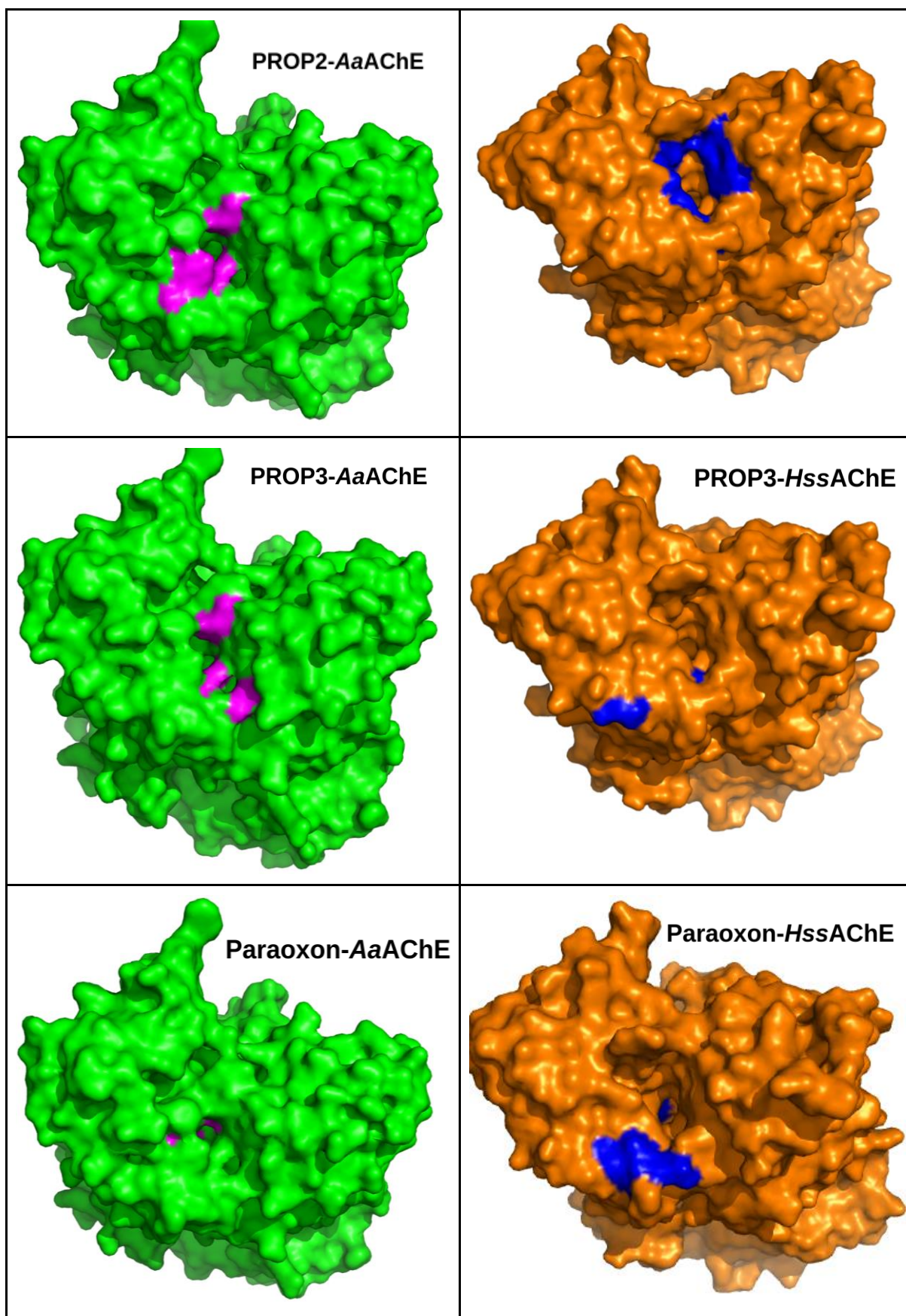


O número de ligações hidrogênio formados durante as simulações por DM dos complexos com a enzima *AaAChE* apresentaram números iguais ou menores quando comparados com os complexos formados com a enzima *HssAChE*.

Os aminoácidos mutantes da região da entrada do sítio ativo da enzima do mosquito *Aedes aegypti* interagiram por contato polar com os ligantes PROP2 e PROP3, conforme observado na figura 71.

Figura 71: Aminoácidos que mais interagiram por contatos polares nos complexos da segunda etapa de dinâmica molecular.

PROP2-HssAChE



Em destaque, no complexo PROP2-*AaAChE* estão os aminoácidos Tyr99, Tyr101, Tyr344 e Tyr 394. Em destaque no complexo PROP2-*HssAChE*, estão os aminoácidos Asp74, Leu289, Ser293, Val294, Trp286 e Tyr341.

Para o complexo PROP3-*AaAChE*, estão destacados em magenta os aminoácidos Tyr99, Tyr344 e Glu97, sendo que ao final da simulação por DM a Glu97 apresenta distância do ligante de 1,54 Å. Já em relação ao complexo PROP3-*HssAChE*, os aminoácidos que interagem por contato polar com o ligante são Asp74 e Asp349. Este último com distância de interação de 1,6 Å ao final da simulação.

O complexo Paraoxon-*AaAChE* apresenta em destaque os aminoácidos Glu387, Phe350, Tyr394, Gly174, Ala259 e His501 que foram aminoácidos que interagem por ligações hidrogênio com o paraoxon. Ao final da simulação por DM, os aminoácidos que apresentaram menor distância em relação ao ligante foram o Glu387 e a Tyr394 com 2,47 Å e 2,45 Å, respectivamente. Já o complexo Paraoxon-*HssAChE* apresenta em destaque os aminoácidos Thr83, Tyr77, Thr75, Leu76 e His447, que foram os resíduos que interagem por ligações hidrogênio com distância igual ou inferior a 2,5 Å durante a simulação por DM.

Nota-se que as propostas PROP2 e PROP3 interagem por ligação hidrogênio com os aminoácidos mutantes da região da entrada do sítio ativo da enzima *AaAChE*. Ainda, em relação à proposta3, observou-se que ao final da dinâmica molecular, o ligante encontrava-se em uma região afastada da entrada do sítio ativo, indicando que não ocorreu a inibição da enzima *HssAChE*.

As figuras 72, 73 e 74 apresentam uma sequência de quadros da simulação por DM, onde pode-se observar a movimentação dos ligantes. Em amarelo, está representada a proteína *AaAChE* e em rosa, a proteína *HssAChE*. Em destaque os aminoácidos localizados na região da entrada do sítio ativo das enzimas, a fim de observar se houve impedimento estérico das proteínas.

Figura 72: Quadros de simulação por DM das proteínas *AaAChE* (amarelo) e *HssAChE* (rosa) complexadas com ligante paraoxon. Em destaque, os aminoácidos Met176 e Tyr390 (azul) e Tyr124 e Tyr337 (amarelo).

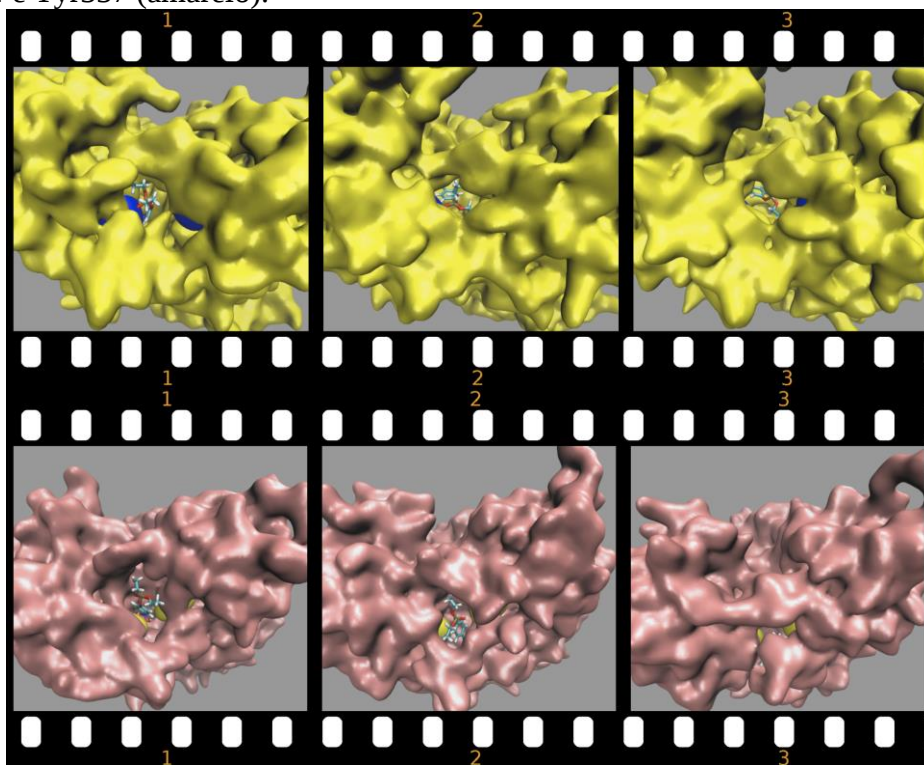
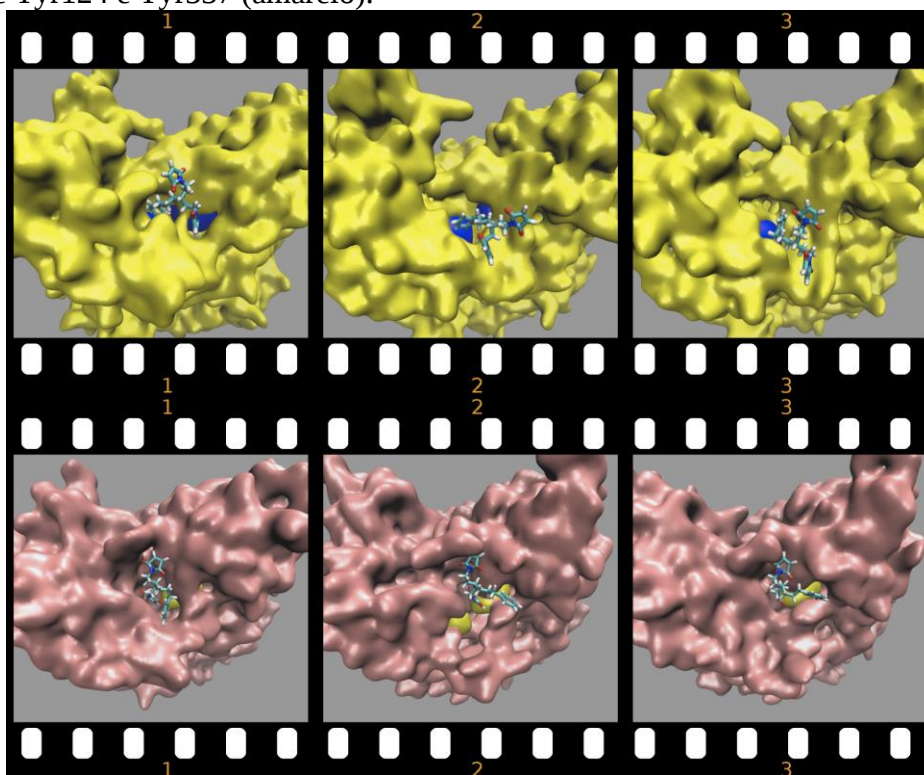
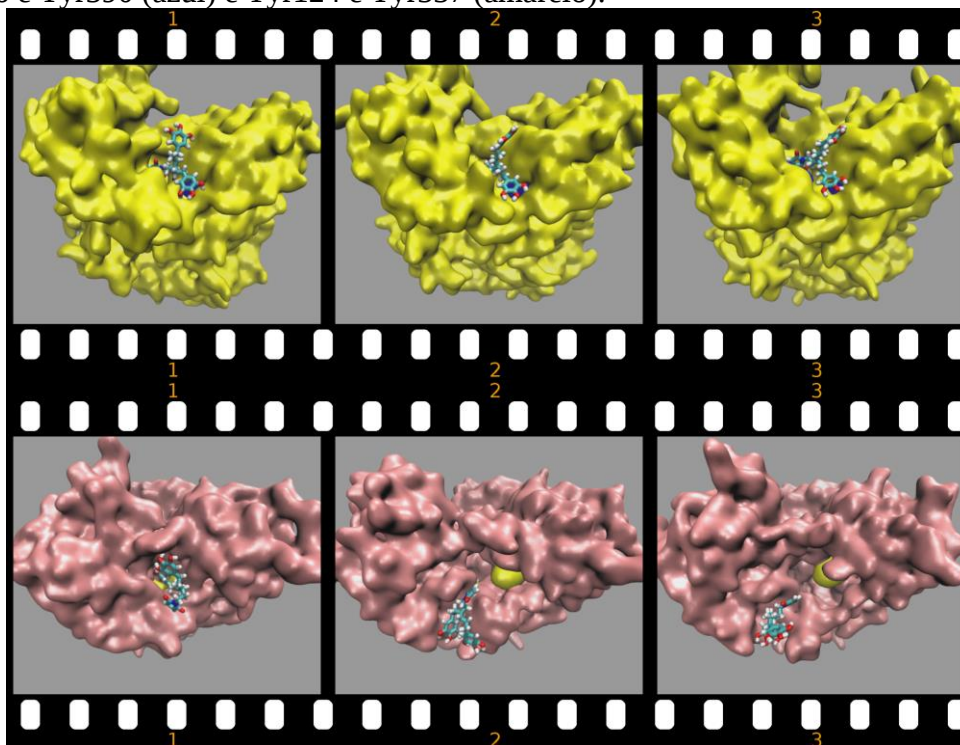


Figura 73: Quadros de simulação por DM das proteínas *AaAChE* (amarelo) e *HssAChE* (rosa) complexadas com ligante PROP2-Etapa2. Em destaque, os aminoácidos Met176 e Tyr390 (azul) e Tyr124 e Tyr337 (amarelo).



A partir da análise das figuras 72 e 73, percebe-se que em ambos os complexos Paraoxon-*AaAChE*, Paraoxon-*HssAChE*, PROP2-*AaAChE* e PROP2-*HssAChE*, a região da entrada do sítio ativo das proteínas permanecem impedidas estericamente.

Figura 74: Quadros de simulação por DM das proteínas *AaAChE* (amarelo) e *HssAChE* (rosa) complexadas com ligante PROP3 (representação licorice). Em destaque, os aminoácidos Met176 e Tyr390 (azul) e Tyr124 e Tyr337 (amarelo).



Em relação ao complexo PROP3-*AaAChE*, o ligante permanece na região da entrada do sítio ativo, de maneira que obstrui os aminoácidos Met176 e Tyr390. Esse impedimento é estabilizado por contatos polares que se formam com aminoácidos desta região como Tyr99, Tyr344 e Glu97.

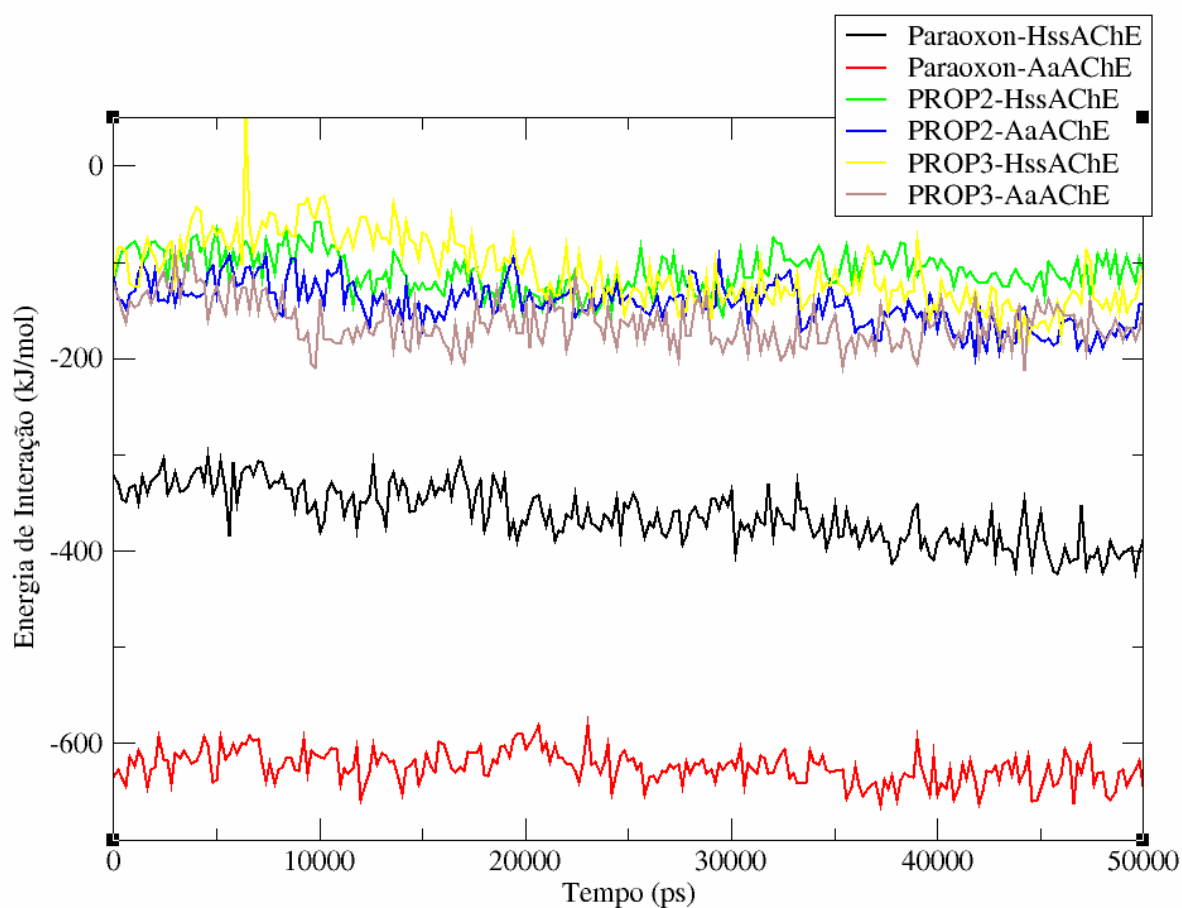
Pode-se observar que no início da simulação do complexo PROP3-*HssAChE*, o ligante encontrava-se na região da entrada do sítio ativo. Na sequência de quadros, o ligante se locomove para uma região mais afastada, desobstruindo a entrada do sítio ativo. Pode-se observar este fato a partir dos aminoácidos indicados em amarelo (Tyr124 e Tyr337), que encontram-se desimpedidos estericamente ao final da simulação por DM. Além disso, o aminoácido Asp349 possui papel importante na estabilização do ligante em região afastada da entrada do sítio ativo, interagindo a uma distância de 1,6 Å com o ligante ao final da simulação.

5.6.2.8 MM-PBSA

As energias de interação entre o pesticida PROP2 e as proteínas *HssAChE* e *AaAChE*, mostram que ocorre uma maior estabilidade do complexo formado com a proteína do mosquito do que com a proteína humana.

Observa-se uma variação de energias do início da simulação ao final de $-114 \text{ k.J.mol}^{-1}$ a $-144 \text{ k.J.mol}^{-1}$ para o PROP2-*AaAChE*, uma variação de -99 k.J.mol^{-1} a $-109 \text{ k.J.mol}^{-1}$ para o PROP2-*HssAChE*, $-122 \text{ k.J.mol}^{-1}$ a $-150 \text{ k.J.mol}^{-1}$ para o PROP3-*AaAChE* e $-113 \text{ k.J.mol}^{-1}$ a $-108 \text{ k.J.mol}^{-1}$ para o complexo PROP3-*HssAChE*, conforme observado na figura 75.

Figura 75: Energia livre de Gibbs estimada pelo método MM-PBSA para os complexos da segunda etapa.



Os valores médios da Energia livre de Gibbs para os complexos da segunda etapa foram $(-114,04 \pm 0,090127) \text{ k.J.mol}^{-1}$ para o complexo PROP2-*AaAChE*, $(-109,56 \pm 0,078164) \text{ k.J.mol}^{-1}$ para o complexo PROP2-*HssAChE*, $(-163,250 \pm 0,091) \text{ k.J.mol}^{-1}$ para o complexo PROP3-*AaAChE*, $(-110,350 \pm 0,139) \text{ k.J.mol}^{-1}$ para o complexo PROP3-*HssAChE*, $(-624,27 \pm 0,586)$ para o complexo Paraoxon-*AaAChE* e para o complexo Paraoxon-*HssAChE*, (-

362,45±0,404).

A tabela 21 apresenta os aminoácidos do sítio ativo das enzimas *AaAChE* e *HssAChE* que contribuem com energia de interação menor ou igual a -1,0 kJ/mol para a energia livre de ligação.

Tabela 21: Contribuição total de energia por resíduo do sítio ativo para os complexos simulados por DM - Etapa 2.

Ligante	Energia de ligação média obtida pelo método MM-PBSA (kJ.mol ⁻¹)	Contribuição total de energia por resíduo do sítio ativo (kJ.mol ⁻¹)
PROP2 <i>AaAChE</i>	-144,04	Glu257 (-1,0126±0,0565), Glu387 (-1,0718±0,0397), Met176 (-1,2368±0,0568), Glu108 (-2,2126±0,1383), Asp395 (-2,5096±0,4104), Tyr344 (-2,5937±0,1965), Phe391 (-2,9375±0,1255), Trp111 (-3,1572±0,0837), Tyr394 (-3,1663±0,1521), Glu97 (-8,4976±0,2854), Tyr99 (-9,818±0,1842), Tyr101 (-9,8735±0,2493), Trp341(-12,5078±0,1942)
PROP2 <i>HssAChE</i>	-109,56	Val294 (-1,072±0,0783), Phe297 (-1,5978±0,063), Phe338 (-2,264±0,0885), Leu289 (-2,7351±0,0863), Leu76 (-2,7493±0,1999), Tyr72 (-4,9987±0,1786), Tyr341 (-9,3556±0,1553), Trp286 (-15,613±0,1849).
PROP3 <i>AaAChE</i>	-163,25	Gly346 (-1,139±0,0577), Phe350 (-1,1688±0,0459), Asp503 (-1,5546±0,0261), Glu504 (-1,568±0,0297), Glu97 (-1,8521±0,3807), Asp395 (-2,0903±0,6266), Glu257 (-2,1072±0,0817), Glu387 (-2,1146±0,0436), Tyr390 (-4,9791±0,1397), Glu108 (-5,8036±0,1036), Phe391 (-5,9501±0,1149), Tyr101 (-6,6793±0,2192), Tyr394 (-7,1387±0,1868), Tyr99 (-8,3989±0,1786), Tyr344 (-9,9473±0,1761), Trp341 (-13,0836±0,1259).
PROP3 <i>HssAChE</i>	-110,35	Trp439 (-2,1526±0,118), Gly342 (-2,7797±0,1108), Tyr341 (-4,0093±0,1465), Leu76 (-7,8801±0,204).
Paraoxon <i>AaAChE</i>	-624,27	Gly346 (-1,1985±0,0355), Tyr99 (-1,4321±0,0823), Tyr344 (-1,5634±0,0854), His501(-2,9707±0,141), Trp291(-3,1875±0,0817), Phe350(-3,5914±0,1065), Tyr394(-3,6655±0,1098), Phe391(-6,7757±0,1381), Trp111(-7,6886±0,1457), Glu97 (-14,1383±0,0494), Asp503(-18,1638±0,0977), Asp395(-19,921±0,0876), Glu108(-20,841±0,1026), Glu504(-21,0379±0,1343), Glu257(-23,0054±0,3744), Glu387(-29,5049±0,3366).
Paraoxon <i>HssAChE</i>	-362,45	Tyr337(-1,496±0,0813), Phe338(-1,7405±0,0494), His447(-1,9636±0,0588), Leu289 (-1,977±0,1175), Trp286(-3,6456±0,2381), Leu76 (-4,3901±0,2014), Tyr341(-6,8707±0,2082), Glu450(-14,1711 ±0,0909), Asp74 (-17,3001±0,7377), Glu334(-17,9215±0,1368), Glu202(-22,5974±0,2853).

Para o complexo PROP2-*AaAChE*, os dez aminoácidos que mais contribuíram para a

energia livre foram Trp341, Tyr101, Tyr99, Glu97, Glu100, Tyr394, Trp111, Phe391, Glu109 e Tyr344, respectivamente. Esses aminoácidos contribuem com 43,69% do total calculado.

Para o complexo PROP2-*HssAChE*, os dez aminoácidos que mais contribuíram para o cálculo da energia livre média foram, respectivamente, Trp286, Tyr341, Tyr72, Gln291, Leu76, Leu289, Glu292, Phe338, His287 e Pro290, o que representa 44,26% do total da energia livre média calculada para este complexo.

Para o complexo PROP3-*AaAChE*, os dez aminoácidos que apresentaram maior contribuição de energia livre por resíduo foram Trp341, Tyr344, Tyr99, Tyr394, Tyr101, Phe391, Glu108, Tyr390, Asp309 e Asn342, respectivamente. A porcentagem de contribuição desses aminoácidos foi de 42,94%.

Para o complexo PROP3-*HssAChE*, os dez aminoácidos que apresentaram maior contribuição de energia livre média foram Tyr77, Leu76, Pro344, Tyr341, Val340, Phe80, Gly342, Trp439, Ser347 e Glu81, respectivamente, que representam 38,73% do total da energia livre média calculada.

Para o complexo Paraoxon-*AaAChE*, os dez aminoácidos que apresentaram maior contribuição de energia livre por resíduo foram Glu387, Glu257, Glu504, Glu108, Asp395, Asp503, Glu506, Asp386, Asp458 e Glu100, respectivamente. A porcentagem de contribuição desses aminoácidos foi de 31,86% do total de energia livre para este complexo.

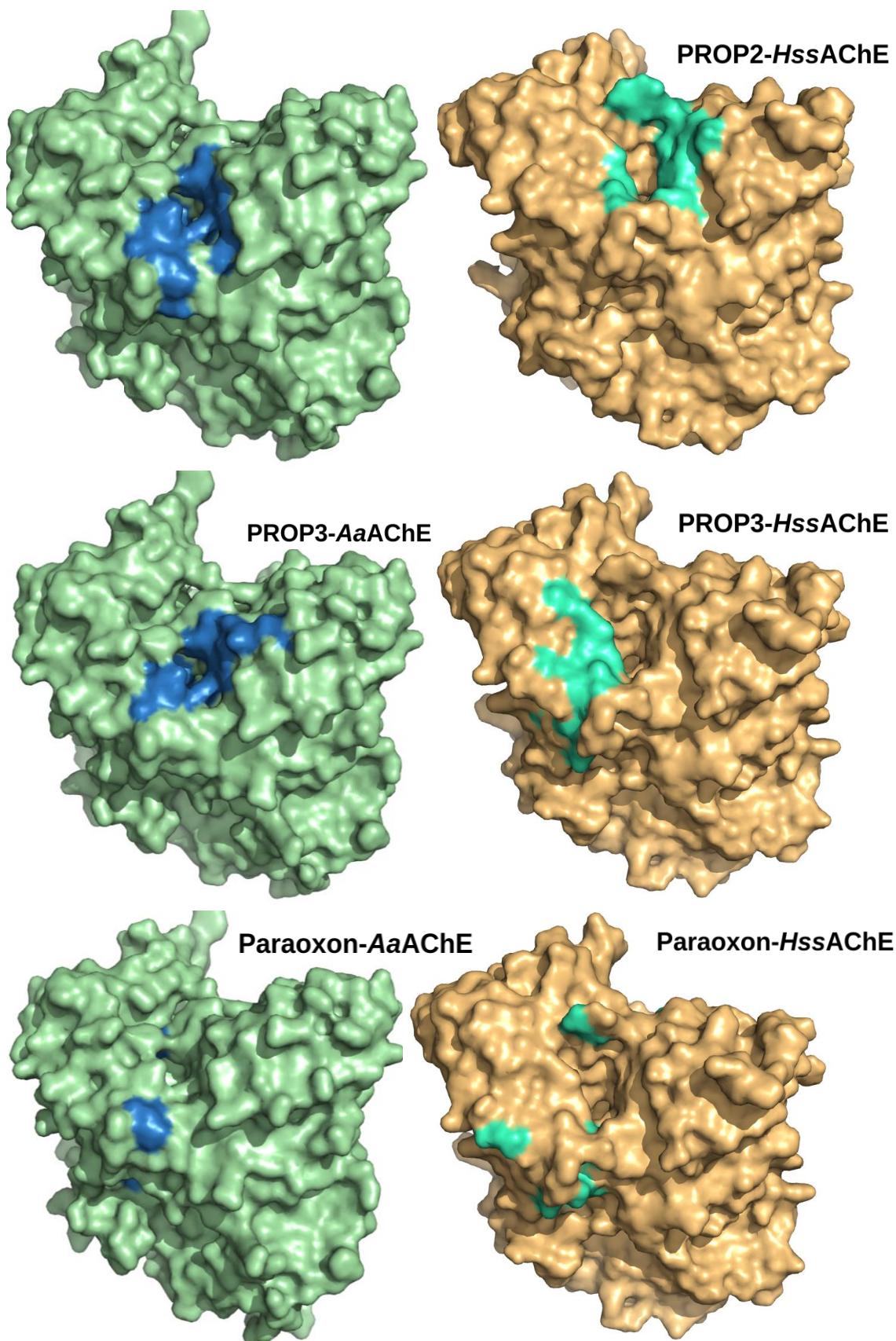
Para o complexo Paraoxon-*HssAChE*, os dez aminoácidos que apresentaram maior contribuição de energia livre por resíduo foram Glu202, Glu285, Glu81, Glu292, Glu334, Glu84, Asp349, Asp74, Glu452 e Glu243, respectivamente. A porcentagem de contribuição desses aminoácidos foi de 51,82% do total de energia livre para este complexo.

A figura 73 apresenta graficamente os dez aminoácidos que mais contribuíram para o total de energia livre de cada um dos complexos simulados na segunda etapa de dinâmica molecular.

Nota-se que as propostas PROP2 e PROP3 apresentaram interações fortes com os aminoácidos mutantes da região da entrada do sítio ativo da proteína *AaAChE*. Ainda, a proposta 3 interagiu mais fortemente com aminoácidos mais afastados da região da entrada do sítio ativo da *HssAChE*, conforme observado na figura 76.

Figura 76: Dez aminoácidos com maior contribuição para energia livre, segundo o método MM-PBSA, segunda etapa de simulações por dinâmica molecular.

PROP2-*AaAChE*



6 CONCLUSÕES

Na primeira etapa deste trabalho foi feita a modelagem por homologia utilizando o servidor Swiss Model Server do modelo tridimensional da acetilcolinesterase de *Drosophila melanogaster* (código 1QO9) com a sequência primária da acetilcolinesterase do mosquito *aedes aegypti* encontrado no servidor uniprot.org pelo código Q9TX11. Foi então construído e validado o modelo da acetilcolinesterase do mosquito *Aedes aegypti*, obtendo 96,9% dos resíduos em regiões mais permitidas.

Na sequência, foi realizada a modelagem comparativa entre as enzimas *AaAChE* e *HssAChE*, apresentando RMSD de 1,12 Angstroms. A determinação dos resíduos do sítio ativo da *AaAChE* foi realizada, obtendo-se 65,79% de identidade sequencial.

A modelagem comparativa entre as enzimas *AaAChE* e *AgAChE* os aminoácidos da região do sítio ativo destas enzimas apresentaram identidade sequencial de 71,06%, logo foram observadas 28,94% de mutações nesta região. Isso implica dizer que os pesticidas planejados para a enzima *AgAChE* não necessariamente apresentará seletividade a enzima *AaAChE*.

A partir dos parâmetros selecionados para verificar os melhores resultados de docagem molecular simulados neste trabalho, foram selecionados os resultados PROP2 e PM22 na primeira etapa e PROP2 e PROP3 para a segunda etapa.

Os parâmetros utilizados para verificar a estabilidade dos complexos simulados por dinâmica molecular (energia total, RMSD, RMSF e Raio de Giro), demonstraram que todos os sistemas apresentaram boa estabilidade durante os 50 ns de simulação.

A partir dos resultados de simulação por dinâmica molecular, os pesticidas PM22, PROP2 e PROP3 apresentaram melhores resultados de interação (energia livre de Gibbs, ligações hidrogênio e distância média entre os centros de massas) com a enzima *AaAChE* do que com a enzima *HssAChE*.

Os resultados obtidos de energia livre da primeira etapa de simulação por DM mostraram que os complexos apresentaram a seguinte ordem energética: PM22-*HssAChE* < Paraoxon-*HssAChE* < PROP2-*HssAChE* e PM22-*AaAChE* < Paraoxon-*AaAChE* < PROP2-*AaAChE*. Os resultados obtidos de energia livre da segunda etapa de simulação por DM mostraram que os complexos apresentaram a seguinte ordem energética: Paraoxon-*HssAChE* < PROP3-*HssAChE* < PROP2-*HssAChE*, de maneira que as propostas PROP2 e PROP3 apresentaram energia de interação com a acetilcolinesterase humana maior do que a energia observada para o complexo formado com o paraoxon, o que sugere uma menor toxicidade quando comparados com o pesticida organofosforado. Em relação à ordem energética observada para os complexos formados com a *AaAChE*, observou-se que Paraoxon-*AaAChE* < PROP3-*AaAChE* < PROP2-*AaAChE*.

Em relação ao parâmetro de energia livre calculado pelo método MM-PBSA, o melhor resultado reportado foi do pesticida PM22 que apresentou média da energia livre de Gibbs de -775,1 kJ.mol⁻¹ para o complexo formado com a enzima *AaAChE* e média da energia livre de Gibbs de -468,52 kJ.mol⁻¹ para o complexo formado com a enzima *HssAChE*.

Quando observados os aminoácidos que apresentaram maior contribuição energética para o cálculo de energia livre total, a proposta 3 (PROP3), foi o ligante que apresentou melhor resultado, quando comparado às interações observadas com o ligante paraoxon. Quando este ligante interage com a proteína *AaAChE* apresenta interação com aminoácidos da região da entrada do sítio ativo, impedindo estericamente esta região e quando interage com a enzima *HssAChE*, se desloca para uma região fora da entrada do sítio ativo.

Como continuidade deste trabalho, são sugeridos estudo de rotas sintéticas para os pesticidas PM22, PROP2 e PROP3 para posterior avaliação experimental dessas propostas, como estudo de toxicidade e avaliação da atividade enzimática das acetilcolinesterases humana e do mosquito *Aedes aegypti* por tempo de exposição a esses compostos.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. R. Planejamento, ensaio e otimização in silico de novos protótipos inibidores da enzima acetilcolinesterase. 2014. 156f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

ARAGÃO, A. P. Modelagem e simulação computacional de processos produtivos: o caso da cerâmica vermelha de Campos dos Goytacazes-RJ. 2011. Diss.

ASSAD, Leonor. Doenças negligenciadas estão nos países pobres e em desenvolvimento. Cienc. Cult., São Paulo, v. 62, n. 1, p. 6-8, 2010. Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252010000100003&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 17 de Maio de 2019.

BAIRD, C. Química Ambiental. Bookmam. 2005.

BARREIRO, Eliezer J.; FRAGA, Carlos Alberto Manssour. **Química Medicinal:- As bases moleculares da ação dos fármacos**. Artmed Editora, 2015.

BENKERT, Pascal; BIASINI, Marco; SCHWEDE, Torsten. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**, v. 27, n. 3, p. 343-350, 2011.

BRAIBANTE, M.E.F.; ZAPPE, J.A. A química dos agrotóxicos. Química Nova na Escola, v. 34, n. 1, p. 10-15, 2012.

BRUCCOLERI, R. E.; KARPLUS, M. Conformational sampling using high-temperature molecular dynamics. Biopolymers, v. 29, n. 14, p. 1847–1862, 1990.

CAVALHEIRO, João Pedro do Vale Hipólito. Optimization of a MM-PBSA/GBSA protocol for the prediction of binding free energy of Bcl-xL inhibitors. 2015. Disponível em: <file:///tmp/Final_thesis_pdf.pdf>

ChemAxon; MarvinSketch, Version 19.11; ChemAxon Ltd., Cambridge Innovation Center, Cambridge, MA, USA, 2019.

CONHEÇA as principais doenças tropicais negligenciadas. Comunicação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 21 de set. de 2012. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1585&sid=32>>

GUIZADO, Teobaldo Ricardo Cuya. **Estudos computacionais da interação de porfirinas e seus complexos de ferro com albumina sérica humana**. 2008. 2008. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Física)–Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro.

de PAULA, G. C.; Horta, B. A. C. MÉTODOS DE MULTI-DOCKING GENERALIZADO. 2014. Relatório de PIBIC do departamento de Engenharia Elétrica da PUC-RIO.

DINIZ, V. A. A. Curso de aprofundamento em química. 2016. 51 slides. Disponível em: <<https://slideplayer.com.br/slide/6084164/>> Acesso em 15 de Maio de 2019.

DOU, D. *et al.* Novel Selective and Irreversible Mosquito Acetylcholinesterase Inhibitors for Controlling Malaria and Other Mosquito-Borne Diseases. *Sci. Rep.* 3, 1068; DOI:10.1038/srep01068 (2013).

FERREIRA, Glaucio Monteiro. **Busca por inibidores seletivos de Sirtuína 2 de *T. cruzi* empregando técnicas de planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor.** 2018. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ / SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO-FARMACOLÓGICAS – FIOCRUZ / SINITOX, Casos registrados de intoxicação e/ou envenenamento. Disponível em: <<https://sinitox.icict.fiocruz.br/dados-de-agentes-toxicos>>

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). Instituto Oswaldo Cruz. Nota técnica n. 4/2016/IOC-FIOCRUZ/ Diretoria (Versão 1, 14 de julho de 2016). Considerações técnicas sobre a aplicação aérea de inseticidas em área urbana, 2016a.

FREITAS, Thiago Carrazoni de. Neurotoxicidade central e periférica induzida pela urease majoritária de *Canavalia ensiformis* em insetos modelo. 2017.

FREITAS, Marta Costa de Dinâmica Molecular e Análise In Silico da Proteína Triptofano Hidroxilase 2 (TPH2)/ Marta Costa de Freitas. -- Rio de Janeiro, 2017.

GARAYO, E. L. S. Avaliação da susceptibilidade a inseticidas de mosquitos *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) do município de Pedro Juan Caballero, Paraguai. Monografia Rio de Janeiro, 2019.

GONÇALVES, A. S.; Estudo por dinâmica molecular das interações da pralidoxima e da deazapralidoxima com a acetilcolinesterase humana inibida pelo agente neurotóxico tabun. 2005. 125 f. Dissertação (mestrado em Química) - Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro. 2005.

GODOY, M. J. G. *et al.* Solving molecular docking problems with multi-objective metaheuristics. *Molecules*, v. 20, n. 20, p. 10154–10155, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26042856/>>

GUEx, N. M. C. PEITSCH, SWISS-MODEL and Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling, *Electrophoresis*, 18, 2714- 2723, 1997.

GUEx, N.; PEITSCH M.; SCHWEDE T.; DIEMAND A., DeepView / SwissPdbViewer, www.expasy.org/spdbv/ , 2001.

HASSINEN, T.; PERÄKYLÄ, M. New energy terms for reduced protein models implemented in an off-lattice force field. *J. Comput Chem.* 22, 1229, 2001.

HOLSTEGE, C.P., Dobmeier, S. G. 2005, “Nerve Agent Toxicity and Treatment”, *Current Treatment Options in Neurology*, vol. 7, pp. 91-98

HUMPHREY, William; DALKE, Andrew; SCHULTEN, Klaus. VMD: visual molecular dynamics. **Journal of molecular graphics**, v. 14, n. 1, p. 33-38, 1996.

JAKALIAN, A. *et al.* Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: I. Method. *J. Comput Chem.* 21, 132, 2000

J. J. P. Stewart, L. Fiedler, P. Zhang, J. Zheng, I. Rossi, W.-P. Hu, G. C. Lynch, Y.-P. Liu, Y.-Y. Chuang, J. Pu, J. Li, C. J. Cramer, P. L. Fast, J. Gao, and D. G. Truhlar, MOPAC–version 5.022mn (2015), University of Minnesota, Minneapolis, MN 55455.

LASKOWSKI, Roman A. *et al.* PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of applied crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283-291, 1993.

Leonhart, P. F. Um Algoritmo Multimemético Auto-Adaptativo para o Problema de Atracamento Molecular / Pablo Felipe Leonhart. – Porto Alegre: PPGC da UFRGS, 2019.

LI, H., ROBERTSON, A. D., JENSEN, J. H. (2005). Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 61(4), 704-721.

LIPINSKI, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J.; *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1997, 23, 3.

LOMBARDI M, MINUISSI J, MIDIO A. Aspectos toxicológicos de inseticidas de uso doméstico. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional* 1983;11(41):36-48.

LORENZ, C; BREVIGLIERI, E. L.; VIRGINIO, F. O fantástico mundo dos mosquitos. – Águas de São Pedro: Livronovo, 2018.

LWANDE, Olivia Wesula *et al.* Globe-trotting *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: risk factors for arbovirus pandemics. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 20, n. 2, p. 71-81, 2020. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/pdf/10.1089/vbz.2019.2486>>

MARASCHIN, Leandro. Avaliação do Grau de Contaminação por Pesticidas nas Águas dos principais rios formadores do Pantanal Mato-Grossense. 2003. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente, Departamento de Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2003. Cap. 2. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/teses/online/DST23.pdf>>

Mark, P., & Nilsson, L. Structure and Dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC / E Water Models at 298 K. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2010, 105(43), 9954–9960. <http://doi.org/10.1021/jp003020w>

MAPA. Resumo de Registro de Agrotóxicos Componentes e Afins, 2021. Acesso em 13 de Julho de 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/informacoes-tecnicas>>

MANGAS, I., *et al.* Neurotoxic effects associated with current uses of Organophosphorus Compounds. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 27, n. 5, p. 809-825, 2016.

MENDONÇA, F. D. A., Veiga e Souza, A., & de Almeida Dutra, D. (2009). Saúde pública, urbanização e dengue no Brasil. *Sociedade & natureza*, 21(3).

MIGOTT, Gustavo Bellani *et al.* Determinação de energia livre de ligação por métodos in silico para ligantes da enzima InhA (EC 1.3. 1.9) de *Mycobacterium tuberculosis*. 2016. Disponível em: <<https://repositorio.pucrs.br/dspace/bitstream/10923/8750/1/000479917-Texto%2bCompleto-0.pdf>>

NAMBA, Adriana Míeco; DA SILVA, Vinícius Barreto; DA SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química**, v. 33, p. 13-24, 2008.

NATH, Onkar; SINGH, Archana; SINGH, Indrakant K. In-Silico Drug discovery approach targeting receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 for cancer treatment. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2017.

Novaes, B.C.S.; Scott, L.P.B. Modelagem Molecular e Docking de Proteína - Ligante. II Simpósio de Iniciação Científica da Universidade do ABC (SIC-UFABC), 2009. Disponível em: <http://ic.ufabc.edu.br/II_SIC_UFABC/resumos/paper_5_286.pdf>

OPAS/OMS. Manual de vigilância de saúde de populações expostas a agrotóxicos. Brasília, 1997.

PETRONILHO. C. E. , PINTO. C. A. VILLAR. F. D. J. Acetilcolinesterase: Alzheimer e guerra química, *Revista Militar de Ciência e Tecnologia*, v. 28, n. 3, p. 3-14, 2011.

PETRONILHO, Elaine C.; FIGUEROA-VILLAR, José Daniel. Agentes para Defesa Contra Guerra Química: Reativadores da Acetilcolinesterase Inibida com Organofosforados Neurotóxicos. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 3, p. 671-686, 2014.

PICCIRILLO, Erika; AMARAL, Antonia Tavares do. Busca virtual de compostos bioativos: conceitos e aplicações. **Química Nova**, v. 41, p. 662-677, 2018.

RAMACHANDRAN, G. N.; SASISEKHARAN, V.; *Adv. Prot. Chem.*, 23, 283-437.,1968.

RIGOTTO, M.R. Agrotóxicos. Observatório de Conflitos Ambientais - Universidade Federal de Minas Gerais. 2014. Disponível em: <http://conflitosambientaismg.lcc.ufmg.br/wp-content/uploads/2014/04/TAMC-RIGOTTO_Raquel_-_Agrotoxicos.pdf> Acesso em: 24 de Maio de 2019.

SACCONNAY, L. *et al.* Structural insights of SIR2rp3 proteins as promising biotargets to fight against Chagas disease and leishmaniasis. *Mol Biosyst*, v. 9, n. 9, p. 2223–2230, 2013. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/8560/2/Sacconay%20L%20Structural%20insights%20of.....pdf>>

SHIH, J. H; CHEN, C. L. Molecular Dynamics Simulation of Bisphenol A Polycarbonate. *Macromolecules*, 28, 4509, 1995.

SHIGUTI, W. A.; SHIGUTI, V. S. C. Apostila de estatística. Disponível em: <<http://www.ecnsoft.net/wp-content/uploads/2009/08/Apostila-Estatistica-UFSC.pdf>>. Acesso em: 13 fev. 2012.

SILVA, J. M.; NONATO-SILVA, E.; FARIA, H. P.; PINHEIRO, T. M. M. Agrotóxico e Trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. *Ciência & Saúde Coletiva*. ABRASCO – v. 10. n. 4, 2005. p.891-903.

SILVA, A. W. S; VRANKEN, W. F. ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interface. *BMC Research Notes*. 5, 367, 2012.

SILVEIRA, C. O. C., Estudos Computacionais do Modelo de Mucina 2 e Sua Interação Com Quitosanas Tioladas: uma Nova Estratégia para o Estudo da Mucoadesão e Retenção de Fármacos. Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Vitória, 2018.

SMITH, Dennis A. (Ed.). **Metabolism, pharmacokinetics and toxicity of functional groups: impact of chemical building blocks on ADMET**. Royal Society of Chemistry, 2010.

SPADETO, Joao PM *et al.* Docking and molecular dynamics studies of potential new leads against DBL3x derived from chondroitin sulfate A (CSA): a new approach for the treatment of malaria. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1-10, 2021.

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

STEWART, J. J. . MOPAC2016, Version: 16.111W,,2016.

THIEMANN, O. Curso de Biologia-I. Apostila Elementos de Histologia - Transmissão de Informação do curso oferecido pelo Instituto de Física de São Carlos -USP, São Paulo. 2016. Disponível em: <http://biologia.ifsc.usp.br/bio1/apostila/bio1_parte_09.pdf> Acesso em: 20 de Maio de 2019.

TROTT, O.; OLSON, A. J. Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, v. 31, n. 2, p. 455-461, Jan 2010. ISSN 0192-8651.

VALENTE, Nuno Ilídio Pereira. Análise de Pesticidas Organofosforados em Toxicologia Forense. 2012. 148 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2012. Disponível em: <http://ria.ua.pt/bitstream/10773/10150/1/tese_nuno_valente.pdf>

van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., Berendsen, H. J. C. GROMACS: Fast, Flexible and Free. *J. Comp. Chem*. 26:1701–1718, 2005.

Wallace, A. C., Laskowski, R. A. and Thornton, J. M. (1995) LIGPLOT: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Engineering* 8, 127-134, <<https://doi.org/10.1093/protein/8.2.127>>

WARREN, L. D. PyMOL User's Guide. **Delano Scientific, San Carlos**, 2004.

WATERHOUSE, Andrew *et al.* SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic acids research**, v. 46, n. W1, p. W296-W303, 2018.

WHO, World Health Organization. Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: WHO Press. 2009.