

UFRRJ

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA**

DISSERTAÇÃO

**Estudo Teórico do Mecanismo de Inibição da Acetilcolinesterase
de *Torpedo californica* por Novos Fosforamidatos**

Daniel Rosa da Silva

2009

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Estudo Teórico do Mecanismo de Inibição da Acetilcolinesterase
de *Torpedo californica* por Novos Fosforamidatos**

Daniel Rosa da Silva

2009



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDO TEÓRICO DO MECANISMO DE INIBIÇÃO DA
ACETILCOLINESTERASE DE *TORPEDO CALIFORNICA* POR
NOVOS FOSFORAMIDATOS

DANIEL ROSA DA SILVA

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

Dissertação submetida como requisito Parcial
para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no
Curso de Pós-Graduação em Química Área de
concentração Modelagem Molecular.

Seropédica, RJ

Junho de 2009

547

S586e Silva, Daniel Rosa da, 1981-

T Estudo teórico do mecanismo de inibição da acetilcolinesterase de torpedo californica por novos fosforamidatos / Daniel Rosa da Silva - 2009.
73 f. : il.

Orientador: Carlos Mauricio Rabello Sant'Anna.

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

Bibliografia: f. 52-57.

1. Química orgânica - Teses. 2. Inibidores químicos - Teses. 3. Compostos organofosforados - Teses. I. Sant'Anna, Carlos Maurício Rabello, 1965-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica. III. Título.

Bibliotecário: _____

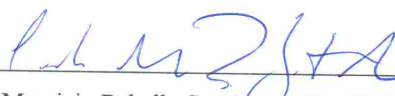
Data: ___/___/___

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

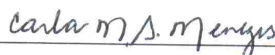
DANIEL ROSA DA SILVA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica, área de concentração em Modelagem Molecular.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 05/06/2009



Carlos Mauricio Rabello Sant'Anna, Dr., ICE, UFRRJ
(Orientador – Presidente)



Profª. Dra. Carla Maria de Souza Menezes (CCS-UFRRJ)



Profª. Dra. Clarissa Oliveira da Silva (DQ-ICE-UFRRJ)

Profª. Dra. Nelilma Correia Romeiro (IQ-UFRRJ)

DEDICATÓRIA

Agradeço e dedico este trabalho a Deus, a minha saudosa mãe Jussara pelo incondicional apoio e total incentivo, dedicação, estímulo e amor, ao meu pai Cosme por toda contribuição à minha formação, compreensão, a minha namorada pelo estímulo e carinho aos meus irmãos Marcos, Jaqueline, minha sobrinha Mayara, minhas tias Eufrasia, Julia, Nilane, Glória e Cleidimar pela torcida.

AGRADECIMENTOS

Nesta jornada longa da minha vida, este pequeno período não é suficiente para compartilhar a minha satisfação por todos que indireta ou diretamente me ajudaram a chegar neste momento.

Antes de tudo quero agradecer a Deus, por todas as vitórias incontestáveis e magníficas que tem me proporcionado desde meu nascimento até hoje.

Aos meus pais pelo apoio incondicional em todas as decisões que outrora tomei em minha vida.

A minha namorada, amiga e companheira Andreza que se mostrou ser uma pessoa maravilhosa e por sempre estar ao meu lado ajudando e sempre me apoiando nos momentos difíceis.

Aos meus grandes amigos: Vinicius, Leticia, Geraldo, André, Ceará, Rodney, Anivaldo, Breno, Marcelo, Saraf, Wagner, Aline pelo companheirismo, ajuda e amizade que foram fundamentais para meu trabalho e obtenção de conhecimento, principalmente nos momentos de tensão.

Ao Professor Carlos Maurício pela oportunidade, por creditar a mim a execução deste trabalho, pela paciência e confiança depositada.

Aos professores, João Batista, Mario Geraldo, Rosane e Vitor pelo conhecimento adquirido durante todo meu curso de pós-graduação em química que me tornaram o que sou hoje.

Aos amigos e primos de Belford Roxo: Alex, Leandro, Daniele, Douglas, Erlon, Gessiel, Kezia e minha afilhada Brenda pelo apoio e descontração nos finais de semana.

Aos todos os amigos da pós-graduação pelo convívio.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela oportunidade.

À CAPES por fornecer a bolsa.

E a todos aqueles que sempre torcem pelo meu sucesso, ajudando e incentivando-me.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE ESQUEMAS	xii
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Enzimas.....	4
1.2. Inibidores enzimáticos Reversíveis e Irreversíveis.....	6
1.2.1. Inibidores Reversíveis	6
1.2.2. Inibidores Irreversíveis	10
1.3. Acetilcolinaesterase	10
1.4. Inibidores Reversíveis e Irreversíveis da Acetilcolinaesterase.....	12
1.4.1. Inibidores Reversíveis	12
1.4.2. Inibidores Irreversíveis	15
1.4.2.1. Metil-Carbamatos	15
1.4.2.2. Compostos Organofosforados	16
1.5. Principais Aspectos da Inibição da AChE pelos Organofosforados.....	18
1.6. Métodos de Química Computacional (CASTRO, 2002).....	20
1.6.1. Mecânica Molecular	21
1.6.2. Métodos da Mecânica Quântica.....	23
1.6.2.1. As Equações de Hartree-Fock (LEACH, 2001)	24
1.6.2.2. Métodos Semi-Empíricos	26
1.6.3. Minimização de Energia (CASTRO, 2002).....	27
2. OBJETIVO	28
3. METODOLOGIA.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
6. CONCLUSÕES	50
7. PERSPECTIVAS.....	51
8. BIBLIOGRAFIA	52

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos dos inibidores reversíveis em $V_{máx}$ e K_m aparentes.....	9
Tabela 2. Percentual da Inibição da enzima AChE pelos fosforamidatos (Lira, A. F.; 2009).....	30
Tabela 3. Calores de reação dos fosforamidatos com R = iso-propil avaliados no sítio ativo da enzima AChE, método PM3.	37
Tabela 4. Calores de reação dos fosforamidatos com R= butil avaliados no sítio ativo da enzima AChE, método PM3.	37
Tabela 5. Distâncias de interações observadas nos sistemas 2 e 3 para algumas da estruturas modeladas.	39
Tabela 6. Entalpias de interação (ΔH_{int}) calculadas para os fosforamidatos e para a PBT no sítio ocupado pela PBT.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura tridimensional da acetilcolinaesterase do <i>Torpedo californica</i> . (SILMAN e SUSSMAN, 2005).	11
Figura 2. Alguns inibidores reversíveis da AChE.	13
Figura 3. Exemplos de carbamatos.	16
Figura 4. Exemplos de Organofosforados.	17
Figura 5. Sítios de ação da ACh no sistema nervoso e seus receptores (STINE, 1996)	18
Figura 6. Exemplo de variáveis em um campo de força típico.	21
Figura 7. Estrutura dos OFs avaliados neste estudo como inibidores da AChE. As estruturas de 1 a 5 possuem grupo R igual a iso-propila e as de 6 a 10 possuem grupo R igual a butila.	29
Figura 8. Modelo de trabalho, sítio da AChE com os aminoácidos localizados a 5 Å da acetilcolina ligada ao resíduo Ser200, código 2ACE do PDB.	32
Figura 9. Modelo de trabalho, sítio da AChE com os aminoácidos localizados a 5 Å da pentileno-bis-tacrina, código 2CMF do PDB.	33
Figura 10. Estrutura 10 no interior do sítio ativo após otimização (carbonos em amarelo) sobreposta com o sítio vazio (carbonos em cinza). Átomos de N em azul, átomos de O em vermelho, átomos de P em laranja; os átomos de H foram omitidos para maior clareza.	38
Figura 11. Exemplos de estruturas de ressonância do intermediário com o grupo retirador de elétrons.	41
Figura 12. Interação de empilhamento da estrutura 10 no sistema 2 (carbonos em amarelo) e no sistema 3 (carbonos em ciano), na cavidade formada pelos aminoácidos Trp84, Phe331 e His440. Átomos de N em azul, átomos de O em vermelho, átomos de P em laranja; os átomos de H foram omitidos para maior clareza.	42
Figura 13. Estruturas de ressonância para o grupo de saída com substituinte retirador de elétrons presente nas estruturas 5 e 10.	43

Figura 14. Sobreposição dos sistemas 4 otimizados contendo os isômeros do composto 10 (carbonos em amarelo, 10E e carbonos em cinza, 10Z). GS indica o grupo de saída. Átomos de N em azul, átomos de O em vermelho, átomos de P em laranja; os átomos de H foram omitidos para maior clareza.	44
Figura 15. Reações envolvidas método de Ellman.....	46
Figura 16. Interações da pentileno-bis-tacrina com os aminoácidos Trp 84, Trp 279, Phe330, His440,Tyr70. Átomos de C em amarelo, átomo de N em azul, átomos de O em vermelho, átomos de P em laranja; os átomos de H foram omitidos para maior clareza.....	48
Figura 17. Fosforoamidato 2E otimizado no sitio da PBT, com os principais aminoácidos responsáveis pela inibição destacados.....	49

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Três tipos de inibição reversível. (a) inibidores competitivos ligam-se ao sitio ativo da enzima.(b) Inibidores incompetitivos ligam-se em um sitio separado, mas une-se apenas ao complexo ES. K_1 é a constante de equilíbrio para a ligação do inibidor à E; K'_1 é a constante de equilíbrio para a ligação do inibidor ES. (c) Inibidores mistos ligam-se a sitios separados, mas podem unir-se quer a E quer a ES (Nelson e Cox, 2002).....	7
Esquema 2. Mecanismo de hidrólise da Acetilcolina pela AChE (Santos, 2007).....	12
Esquema 3. Mecanismo clássico de inibição da AChE por inseticida OF. (Santos, 2007)..	19
Esquema 4. Modelo reacional dos OFs inibindo a enzima AChE. Foram avaliados os valores de ΔH_r para os etapas indicadas do mecanismo.....	36

RESUMO

SILVA, Daniel Rosa. **Estudo Teórico do Mecanismo de Inibição da Acetilcolinaesterase de *Torpedo californica* por Novos Fosforamidatos**. 2009. Dissertação (mestrado em Química Orgânica, modelagem molecular). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

De todas as necessidades do homem, a alimentação é a de maior importância, sem a qual o progresso em outras áreas fica comprometido. Em muitos lugares onde há uma grande concentração populacional e poucas áreas para plantar, torna-se necessário um tratamento adequado das plantações a fim de aumentar a produção e abastecer toda a população. Este tratamento inclui a utilização de fertilizantes, solo apropriado para a plantação e a melhor proteção possível contra as pragas.

O controle de insetos que atuam como pragas é feito em grande parte com o uso de compostos organofosforados (OFs). Os OFs atuam inibindo a enzima acetilcolinaesterase (AChE), responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh). Apresentam baixa ação residual, com pouca estabilidade no meio ambiente e acumulação limitada em organismos vivos, sendo que 80 a 90% dos compostos são eliminados após 48 h do contato. Novas estruturas são necessárias devido ao processo de desenvolvimento de resistência às estruturas conhecidas por muitas espécies de insetos.

A modelagem molecular é uma ferramenta aplicada no planejamento de compostos com atividade biológica, como os pesticidas. Particularmente no caso de inibidores enzimáticos, que em geral reagem quimicamente com as enzimas, a previsão teórica da reatividade química pode trazer informações úteis no planejamento de novas estruturas.

Este trabalho se insere em uma linha de pesquisa de planejamento de novos OFs e tem como objetivo principal avaliar por métodos teóricos o perfil de inibição da AChE de *Torpedo californica* por novos compostos fosforamidatos sintetizados por nosso grupo. Foram considerados 2 possíveis sítios de interação na enzima: o sítio catalítico e o sítio da

AChE ocupado pelo inibidor reversível pentileno-bis-tacrina (PBT). As interações foram avaliadas através do uso de cálculos teóricos pelo método semi-empírico PM3.

As estruturas escolhidas para o desenvolvimento do trabalho foram as de AChE de *Torpedo californica* depositadas no PDB com os códigos 2ACE e 2CMF. Foram selecionados para o estudo de modelagem alguns aminoácidos de cada estrutura, baseado em informações sobre o sítio ativo da enzima e o sítio de interação com a PBT.

Os inibidores foram inseridos no modelo do sitio catalítico, através de modificações na estrutura da ACh, e no sítio da PBT, através de modificações na estrutura do inibidor. No caso do sitio catalítico, 5 etapas do mecanismo de inibição foram modeladas para cada inibidor. Os resultados obtidos permitem concluir que os compostos devem possuir dois mecanismo de inibição. Os compostos **2**, **7** e **8** devem inibir a AChE pelo mecanismo de interação no sitio ocupado pelo inibidor reversível PBT. As estruturas **9** e **10** devem atuar pelo mecanismo de inibição reacional tradicional no sitio catalítico da AChE.

ABSTRACT

SILVA, Daniel Rosa. **Theoretical Study of *Torpedo californica* Acetylcholinesterase Inhibition Mechanism by New Phosphoramidates**. 2009. Dissertação (mestrado em Química Orgânica, modelagem molecular). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

The most important necessity of humankind is food because without it the development in other areas is impaired. In many regions where there is a great concentration of population and a lack of cultivated areas, an adequate treatment of crops is necessary in order to enhance the production to assure the food supply to the population. This treatment includes the use of fertilizers, an adequate soil for plantation, and the best protection against pests.

The control of pest insects is primarily done with organophosphorus compounds (OPs). OPs act by inhibition of acetylcholinesterase (AChE), the enzyme responsible for the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine (ACh). These compounds have low residual effect, low stability in the environment and limited accumulation in living organisms, such as 80 to 90% are eliminated after 48 h after the initial contact. New structures are necessary because of resistance development in many insect species to known compounds.

Molecular modeling is a tool that could be applied for the design of biologically active compounds, such as pesticides. In the case of enzymatic inhibitors, compounds that generally react with the enzyme, a theoretical understanding of the chemical reactivity can bring new information exploitable for the design of new structures.

The present study is part of a research project aiming the development of new OPs. The principal objective of this work is the evaluation by theoretical methods of the inhibition profile of *Torpedo californica* AChE by new phosphoramidates synthesized by our group. Two possible interaction sites in AChE were considered: the catalytic site and

the site occupied by the reversible inhibitor pentylene-bis-tacrine (PBT). The interactions were evaluated by means of theoretical calculations at the PM3 semiempirical level.

The enzyme structures used for the work development were *Torpedo californica* AChE 3D structures deposited in PDB with codes 2ACE e 2CMF. Some aminoacids were selected from each structure based on literature information about the active site and the PBT interaction site. Ten inhibitor molecules were introduced in the selected sites by structural modifications in ACh or PBT structures. In the case of the catalytic site, 5 steps of the inhibition mechanism were modeled for each inhibitor. The results are indicative that the evaluated compounds could act by two different inhibition mechanisms. Compounds **2**, **7** and **8** may inhibit AChE by interaction with the site occupied by PBT. Structures **9** e **10** could act by the traditional mechanism of reaction in the catalytic site of AChE.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Å	Angstrom
Ach	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
Asp	Aspartato
CAS	Canal aniônico do Subsítio
CHARGE=n	Define a carga total n do sistema
E	Enzima
EF	Eigenvector Following (na pesquisa de mínimo de energia)
Gly	Glisina
GRA	Imprimir todos os gradientes
ΔH	Entalpia de Formação
ΔH_{int}	Entalpia de interação
His	Histidina
ΔH_r	Entalpia de reação
Ile	Iso-leucina
OF	Organofosforad
PAS	Subsítio aniônico periférico
PBT	Pentileno-bis-tacrina
PDB	Protein Data Bank
Phe	Fenilalanina
PM3	Parametric Method 3
Ser	Serina
T	Interação de empilhamento π perpendicular
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina

1. INTRODUÇÃO

De todas as necessidades do homem, a alimentação é a de maior importância, sem a qual o progresso em outras áreas fica comprometido. Em muitos lugares onde há uma grande concentração populacional e poucas áreas para plantar, torna-se necessário um tratamento adequado das plantações a fim de aumentar a produção e abastecer toda a população. Este tratamento inclui a utilização de fertilizantes, solo apropriado para a plantação e a melhor proteção possível contra as pragas. Devido ao vigoroso crescimento das safras, além de outros fatores complexos como a localização geográfica e a microecologia, os problemas de pragas têm se intensificado desde os tempos mais remotos (KATSUDA, 1999).

O controle dessas pragas é feito através do uso de pesticidas. Os pesticidas são categorizados pelos tipos de pragas que eles matam. Por exemplo: inseticidas matam insetos, herbicidas matam ervas daninhas, bactericidas matam bactérias, fungicidas matam fungos e algicidas matam algas. De um modo geral, muitos são nocivos também aos seres humanos e todo cuidado no manuseio é importante na preservação da vida.

A FAO (Food and Agriculture Organization), entidade que faz parte da ONU (Organização das Nações Unidas), define os pesticidas como: “Qualquer substância ou mistura de substâncias destinadas a prevenir, destruir ou controlar pragas, incluindo vetores de enfermidades de animais e seres humanos que prejudiquem ou interfiram na produção, processamento, estocagem, transporte ou comercialização de alimentos, produtos agrícolas, madeira e produtos da madeira, ou rações para animais, ou aqueles que podem ser administrados em animais para controle de insetos, aracnídeos, ou outras pragas internas ou externas a seus corpos”(Oliveira, 2003). O termo inclui substâncias destinadas ao uso como reguladores de crescimento de plantas, desfolhantes, dessecantes, agentes inibidores, ou agentes destinados a prevenir a queda prematura de frutas, e substâncias aplicadas a culturas, tanto antes como depois da colheita, para prevenir a deterioração durante a estocagem ou transporte” (SCHNEIDER , 2003).

Segundo a Lei brasileira nº. 7.802, de 11 de julho de 1986, artigo 2º, são considerados pesticidas e produtos afins:

a) os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos;

b) substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimulantes e inibidores de crescimento (BRASIL, 1990)”.

Ao longo de história, vários tipos de pragas, como insetos, ervas daninhas, bactérias, roedores e outros organismos, incomodaram ou ameaçaram direta e indiretamente a saúde humana. Pessoas têm usado pesticidas há milhares de anos tentando controlar estas pragas. Os sumerianos usaram enxofre para controlar insetos a cerca de 5.000 anos atrás. O mercúrio e arsênico eram usados pelos chineses para controlar piolhos e outras pragas. Os gregos e romanos usaram óleo, cinzas, enxofre e outros materiais para proteger o gado e as colheitas de várias pragas. Em várias culturas eram usados fumaça e sal para preservar comida e manter distantes pragas (WHEELER, 2002).

A descoberta e a síntese de moléculas de ação inseticida, durante a II Guerra Mundial, desencadearam um notável desenvolvimento destas substâncias, levando ao surgimento de inúmeros produtos químicos com essa finalidade. Os métodos de controle de pragas até então empregados (culturais, biológicos, físicos) foram rapidamente substituídos por métodos químicos, devido à sua rápida ação e eficiência.

Atualmente, o uso de pesticidas sintéticos representa custos elevados para a produção agrícola mundial. Em 1991, o mercado brasileiro de pesticidas agrícolas apresentava o valor de US\$ 972,7 milhões em vendas, o quinto maior mercado mundial de pesticidas agrícolas, situando-se logo após os EUA, o Japão, a França e a ex-URSS (PAULINO, 1993). Já em 1994, segundo o SINDAG (Sindicato das Indústrias de Defensivos Agrícolas), quando as vendas atingiram o valor de US\$ 1,4 bilhões, o Brasil situava-se em quarto lugar no mercado mundial de pesticidas, superando a ex-URSS. No ano de 1997 o Brasil tornou-se o terceiro mercado do mundo, superando a França, na medida em que se aproximava dos US\$ 2,2 bilhões arrecadados com as vendas de pesticidas agrícolas. No ano de 1998, alcançou os US\$ 2,56 bilhões. Para os anos de 1999,

2000, 2001 e 2002, o cenário brasileiro registrou ligeira queda, mas no ano de 2003 chegou-se a US\$ 3,14 bilhões e, em 2004, a US\$ 4,0 bilhões (SINDAG, 2008).

De acordo com o Relatório da FAO, em 2006, o Brasil era o terceiro maior consumidor de agroquímicos do mundo. O Brasil assumiu liderança mundial no consumo de agroquímicos, em 2008, superando os Estados Unidos, onde as lavouras ocupam uma área maior. Dados preliminares indicam que os produtores brasileiros compraram entre US\$ 6,9 bilhões e US\$ 7 bilhões em agroquímicos, US\$ 200 milhões a mais que os norte-americanos, até então líderes mundiais. A demanda global cresceu 15% em comparação com 2007 (<http://www.aged.ma.gov.br/2009/1/21/Pagina245.htm>, <http://www.clicrbs.com.br/canalrural>, 2009).

O resultado expressivo no mercado nacional não deve se repetir em 2009, mas pode se manter estável. Enquanto isso, a estimativa para as lavouras de todo o mundo é de queda de 5% no consumo de pesticidas. O potencial de crescimento no Brasil se deve ao clima tropical, propício para pragas nas lavouras, e também pelo efeito fisiológico garantido com a terceira aplicação, protocolo adotado nas lavouras européias e que começa a ser usado aqui, o que pode aumentar a produtividade. Outro motivo apontado para o aumento do uso de agroquímicos no País é a ampliação no cultivo de monoculturas, especialmente a soja. Por sua baixa resistência natural a doenças e pragas, a soja requer a aplicação de grandes quantidades de pesticidas. (Departamento de Assistência Técnica e Extensão Rural, 2009). Nas lavouras de soja, o número de aplicações aumentou 5,3% e movimentou US\$ 2,38 bilhões, 33% a mais que na safra anterior (<http://www.aged.ma.gov.br/2009/1/21/Pagina245.htm>, <http://www.clicrbs.com.br/canalrural>).

No caso do controle químicos dos insetos diversos fatores têm servido de estímulo ao desenvolvimento de novas substâncias com essa finalidade, dentre os quais:

- ◆ A grande competição com os insetos por alimentos e as grandes perdas de produtividade em diversos tipos de culturas ao redor do mundo;
- ◆ As perdas de produtividade dos rebanhos devido à ação de insetos e outros parasitas hematófagos;
- ◆ A transmissão de muitas doenças e infecções tendo como vetores os insetos;

◆ O desenvolvimento de resistência por alguns insetos aos inseticidas disponíveis no mercado.

A evolução da resistência é um dos grandes entraves em programas de controle de pragas envolvendo o uso de produtos químicos. Dentre as conseqüências do surgimento de resistência estão à aplicação mais freqüente de pesticidas; o aumento na dosagem do produto; o uso de misturas indevidas de produtos e a substituição por um outro produto, geralmente de maior toxicidade [Georghiou, 1983]. Esses fatores comprometem os programas de manejo integrado de pragas em vista da maior contaminação do meio ambiente com pesticidas, destruição de organismos benéficos e elevação nos custos de controle da praga.

Há várias formas de desenvolvimento de resistência aos pesticidas, que vão desde o decréscimo na disponibilidade do composto tóxico no seu sitio de ação, causadas pelo aumento da desintoxicação metabólica relacionada à sobreexpressão de enzimas específicas, até mudanças na susceptibilidade do sitio-alvo que são também, em grande parte, enzimas (Paiva, 2006).

1.1. Enzimas (SILVA, 2005a).

A vida depende de catalisadores poderosos e específicos: as enzimas. Praticamente todas as reações bioquímicas são catalisadas por alguma enzima. Com exceção de uns poucos RNAs catalíticos, todas as enzimas conhecidas são proteínas. As enzimas são catalisadores extraordinariamente efetivos, que comumente aumentam a velocidade das reações de um fator de 10^5 a 10^{17} . Para serem ativas, algumas enzimas requerem um co-fator químico, que pode estar fraca ou firmemente ligado à enzima. Cada enzima é classificada de acordo com a reação específica que ela realiza. (Nelson e Cox, 2002).

As reações catalisadas pelas enzimas são caracterizadas pela formação de um complexo entre o substrato e a enzima (o complexo ES). A ligação ocorre em uma região na molécula da enzima chamada sitio ativo. A função das enzimas e de outros catalisadores é diminuir a energia de ativação da reação e, dessa forma, aumentar a velocidade da reação. O equilíbrio de uma reação não é afetado pela enzima. (Nelson e Cox, 2002).

Uma das possíveis origens da energia empregada para aumentar a velocidade da reação enzimática são as interações intermoleculares (ligações hidrogênio, interações iônicas e hidrofóbicas, entre outras) entre o substrato e a enzima. O sítio ativo enzimático pode estar estruturado de tal maneira que algumas dessas interações ocorrem preferencialmente no estado de transição da reação, estabilizando-o assim. A necessidade de interações múltiplas é uma das razões para o grande tamanho das enzimas. Além disso, a energia de interação pode aumentar a energia do substrato, tensioná-lo ou provocar uma mudança conformacional na enzima (ajuste induzido). Essa mesma energia de interação responde pela refinada especificidade das enzimas em relação aos seus substratos. Outros mecanismos catalíticos incluem a catálise geral ácido-base e a catálise covalente. (Nelson e Cox, 2002).

Mecanismos de reação detalhados têm sido propostos para muitas enzimas. A cinética é uma metodologia importante para o estudo dos mecanismos de reação, incluindo os enzimáticos. A maioria das enzimas tem algumas propriedades cinéticas em comum. À medida que a concentração do substrato aumenta, a atividade catalítica de uma concentração fixa de uma enzima aumenta de forma hiperbólica, aproximando-se de uma velocidade máxima, v_{\max} característica na qual praticamente toda enzima está na forma do complexo ES. A concentração do substrato que produz metade da velocidade máxima é a constante de Michaelis, K_m , que é característica para cada enzima agindo sobre um determinado substrato. A equação de Michaelis-Menten (EQ. 1) relaciona a velocidade inicial de uma reação enzimática com a concentração de substrato [S], a v_{\max} e a constante K_m :

$$v_0 = \frac{v_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{EQ. 1})$$

Em condições de saturação, a velocidade limite de uma reação catalisada enzimaticamente é descrita pela constante K_{cat} , também chamada número de renovação. A relação K_{cat}/K_m fornece uma boa medida de eficiência catalítica. A equação de Michaelis-Menten é também aplicável a reações com dois substratos, que ocorrem ou pela formação de um complexo ternário ou por uma dupla-troca. Cada enzima tem um pH ótimo (ou intervalo de pH) no qual apresenta atividade máxima. (Nelson e Cox, 2002).

As enzimas podem ser inativadas por modificações irreversíveis de um grupo funcional essencial para a atividade catalítica. Elas também podem ser inibidas por moléculas com que se ligam reversivelmente. (Nelson e Cox, 2002).

1.2. Inibidores enzimáticos Reversíveis e Irreversíveis

1.2.1. Inibidores Reversíveis

Os inibidores enzimáticos são agentes moleculares que interferem com a catálise, diminuindo ou parando as reações enzimáticas. As enzimas catalisam virtualmente todos os processos celulares, de forma que não é surpreendente que inibidores enzimáticos estejam entre os agentes farmacêuticos e os pesticidas mais importantes conhecidos. O estudo dos inibidores enzimáticos também fornece informação valiosa sobre os mecanismos enzimáticos e tem ajudado a definir alguns caminhos metabólicos. Há duas grandes classes de inibidores enzimáticos: reversíveis e irreversíveis (Nelson e Cox, 2002).

Um tipo comum de inibição reversível é a competitiva (Esquema 2a). Um inibidor competitivo compete com o substrato pelo sitio ativo de uma enzima. Enquanto o inibidor (I) ocupa o sitio ativo, ele impede a ligação do substrato à enzima. Muitos inibidores competitivos são compostos que se assemelham com o substrato e se combinam com a enzima para formar um complexo ES, mas sem levar à catalise. Mesmo combinações transitórias desse tipo reduzirão a eficiência da enzima. Levando em consideração a geometria molecular dos inibidores que se assemelham ao substrato, podemos chegar a conclusões sobre que partes do substrato normal se ligam à enzima. A inibição competitiva pode ser analisada quantitativamente pela cinética do estado estacionário. Na presença de um inibidor competitivo, a equação de Michaelis-Menten (equação 2) torna-se

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{\alpha K_m + [S]} \quad (\text{EQ. 2})$$

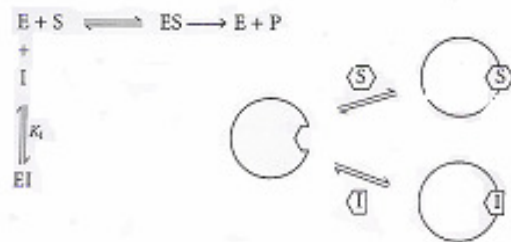
onde

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_1}$$

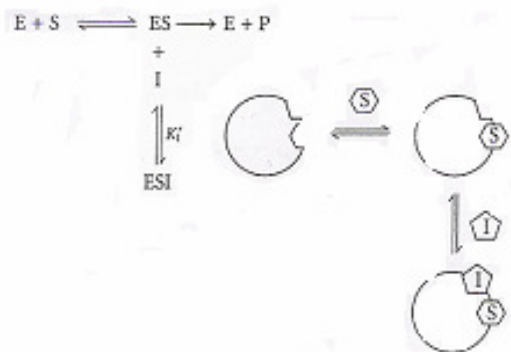
e

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

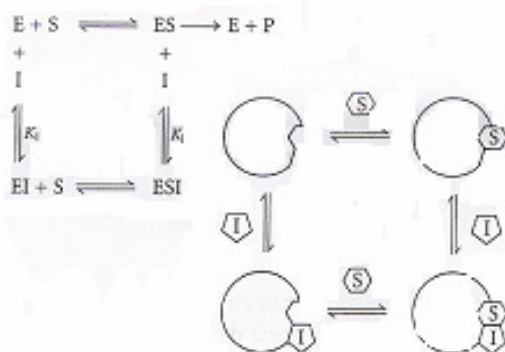
(a) Inibição competitiva



(b) Inibição incompetitiva



(c) Inibição mista



Esquema 1. Três tipos de inibição reversível. (a) inibidores competitivos ligam-se ao sítio ativo da enzima.(b) Inibidores incompetitivos ligam-se em um sítio separado, mas une-se apenas ao complexo ES. K_i é a constante de equilíbrio para a ligação do inibidor à E; K'_i é a constante de equilíbrio

para a ligação do inibidor ES. (c) Inibidores mistos ligam-se a sítios separados, mas podem unir-se quer a E quer a ES (Nelson e Cox, 2002).

Pelo fato de o inibidor ligar-se reversivelmente à enzima, a competição pode ser inclinada a favorecer o substrato simplesmente quando adiciona-se mais substrato. Quanto [S] exceder [I], a probabilidade de uma molécula de inibidor se ligar à enzima é minimizada e a reação exibe uma V_{\max} normal. Entretanto, a [S] onde $V_0 = 1/2V_{\max}$, a K_m aparente, aumenta na presença do inibidor por um fator de α . Esse efeito na K_m aparente, combinado com a ausência de um efeito em V_{\max} , é diagnóstico da inibição competitiva e facilmente revelada em um diagrama do duplo recíproco. A constante de equilíbrio para a ligação do inibidor K_1 pode ser obtida a partir do mesmo diagrama (Nelson e Cox, 2002).

As duas outras formas de competição reversível, incompetitiva e mista, são frequentemente definidas em termos de enzima com um único substrato, mas na prática têm sido observadas apenas com enzimas que tem dois ou mais substratos. Um inibidor incompetitivo (esquema 8b) se liga em um sítio diferente do sítio ativo do substrato, porém, diferentemente do inibidor competitivo, liga-se apenas ao complexo ES (Nelson e Cox, 2002).

Na presença de um inibidor incompetitivo, a equação de Michaelis-Menten se altera para

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + \alpha'[S]} \quad (\text{EQ. 3})$$

Onde

$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_1} \quad \text{e} \quad K_1 = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

Conforme descrito pela equação 3, em altas concentrações do substrato, V_0 se aproxima de V_{\max} . O valor de K_m aparente também diminui porque a [S] requerida para alcançar a metade da V_{\max} diminui de um fator de α' .

Um inibidor misto (esquema 2c) também se liga a um sítio diferente do sítio ativo do substrato, mas ele pode se ligar tanto a E como a ES. A equação que descreve a inibição mista é

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{\alpha K_m + \alpha' [S]} \quad (\text{EQ. 4})$$

onde α e α' são definidas como anteriormente. Um inibidor misto geralmente afeta tanto K_m como a $V_{m\acute{a}x}$. O caso especial em que $\alpha = \alpha'$, raramente encontrado na prática, é definido classicamente como inibição incompetitiva.

Na prática, as inibições incompetitiva e mista são observadas somente para enzimas com dois ou mais substratos (por exemplo, S_1 e S_2), e esses substratos são muito importantes na análise experimental de tais enzimas. Se um inibidor competitivo se liga ao sitio ocupado por S_1 , ele pode atuar como um inibidor competitivo em experimentos nos quais a $[S_1]$ é variável. Se um inibidor se ligar ao sitio normalmente ocupado por S_2 , ele pode atuar como um inibidor incompetitivo de S_1 . Os modelos de inibição atualmente observados dependem do fato de as ligações de S_1 e S_2 serem ordenadas ou ao caso. Desse modo, pode-se determinar a ordem com que esses substratos se ligam ao sitio ativo e os produtos são liberados. Frequentemente, o uso de um dos produtos da reação com um inibidor é particularmente informativo. Se somente um dos dois produtos da reação estiver presente, então a reação inversa não ocorrerá. Contudo, um produto geralmente se ligará em alguma parte do sitio atuando como um inibidor. Os estudos de inibição geralmente são elaborados e podem proporcionar uma descrição detalhada do mecanismo de uma reação bissubstrato (Nelson e Cox, 2002).

Tabela 1. Efeitos dos inibidores reversíveis em $V_{m\acute{a}x}$ e K_m aparentes.

Tipo de inibidor	$V_{m\acute{a}x}$ aparente	K_m aparente
Nenhum	$V_{m\acute{a}x}$	K_m
Competitivo	$V_{m\acute{a}x}$	αK_m
Incompetitivo	$V_{m\acute{a}x} / \alpha'$	K_m / α'
Misto	$V_{m\acute{a}x} / \alpha'$	$\alpha K_m / \alpha'$

1.2.2. Inibidores Irreversíveis

Inibidores irreversíveis são aqueles que se combinam com um grupo funcional na molécula da enzima por exemplo, através de uma associação covalente bastante estável, ou o destroem. A formação de uma ligação covalente entre o inibidor e a enzima é muito comum. Os inibidores irreversíveis representam uma ferramenta muito útil no estudo do mecanismo das reações. Os aminoácidos essenciais do sitio ativo que apresentam funções catalíticas importantes frequentemente são identificados por meio da determinação de aminoácido que está ligado covalentemente ao inibidor depois que a enzima é inativada (Nelson e Cox, 2002).

Uma classe especial de inibidores irreversíveis é a dos inibidores organofosforados. Esses compostos são relativamente pouco reativos até se ligarem ao sitio de uma enzima específica. Um inibidor organofosforado é desenhado para participar dos primeiros passos químicos da reação enzimática normal. Entretanto, em vez de ser transformado no produto normal, o inibidor é convertido em um composto muito reativo que se combina irreversivelmente com a enzima. Esses compostos são chamados de inibidores com base no mecanismo, porque eles utilizam o mecanismo da reação enzimática normal para inativar a enzima (Nelson e Cox, 2002). Esses aspectos serão abordados em mais detalhes depois.

1.3. Acetilcolinaesterase

As colinesterases pertencem a uma família de hidrolases de serina, que fazem parte de uma família maior de alfa/beta (α/β) hidrolases. As colinesterases se dividem em acetilcolinesterases (AChE) e butirilcolinesterases (BuChE). Cada uma delas tem diferentes especificidades por seus substratos (TAYLOR, 1994).

A primeira determinação da estrutura primária da AChE foi de uma espécie de peixe elétrico, *Torpedo californica*, que possui abundante quantidade da enzima em seu órgão elétrico (SCHUMACHER, 1986; SUSSMAN, 1991) (Figura 1). Posteriormente, as seqüências da AChE de várias outras espécies foram obtidas, inclusive da humana (SOREQ, 1990).

A AChE de *Torpedo californica* (TcAChE) apresenta grande similaridade em relação às AChE's de mamíferos. Por possuir cerca de 60% de identidade em suas estruturas primárias, estas enzimas apresentam grande semelhança em suas estruturas tridimensionais, juntamente com outras enzimas da família de α/β hidrolases (TAYLOR, 1991; CYCGLER, 1993).

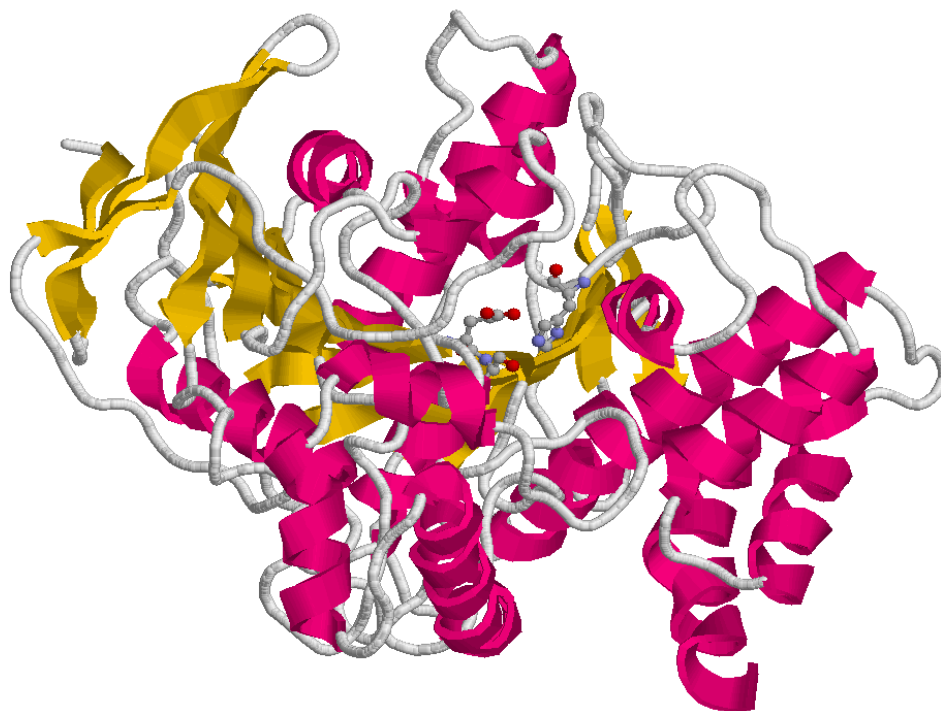
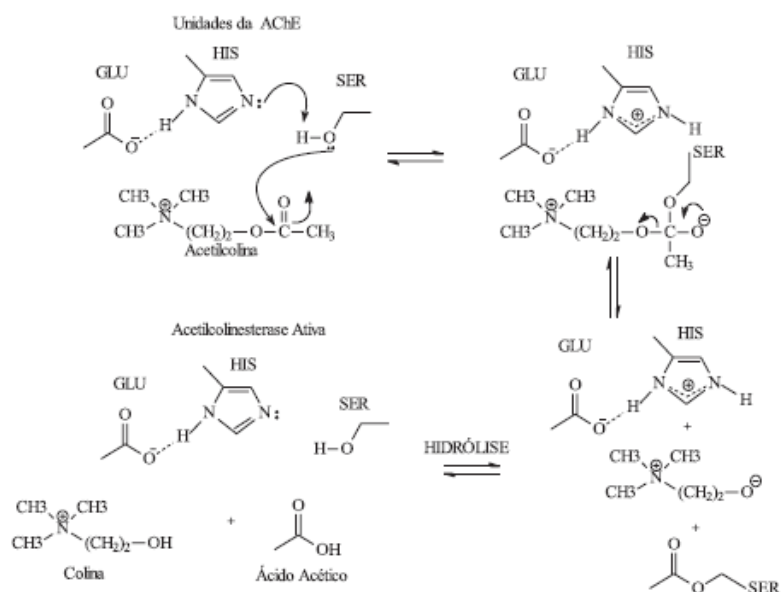


Figura 1. Estrutura tridimensional da acetilcolinaesterase do *Torpedo californica*. (SILMAN e SUSSMAN, 2005).

O sítio ativo é constituído por uma tríade catalítica, Ser-200, His-400 e Glu-327, localizada no fundo de um poço de 20 Å de profundidade, com o átomo O_γ do resíduo de serina 4 Å acima da base do poço. Este arranjo difere de outras hidrolases, onde um resíduo Asp é encontrado fazendo parte da tríade, ao invés de Glu. A superfície do poço é em grande parte formada por resíduos aromáticos, com poucos resíduos ácidos. Cerca de 40% do interior da superfície do canal é formado por 14 resíduos aromáticos. Foram identificados resíduos que são componentes de diferentes subsítios participantes na acomodação do ligante. Estes incluem a cavidade do acil, composta pelos resíduos Phe288 e Phe290, o subsítio hidrofóbico, constituído pelos resíduos aromáticos Trp84, Tyr130,

Tyr330 e Phe331 e o subsítio “aniônico” (denominação antiga, mas que permanece na literatura), que acomoda ligantes positivamente carregados através da interação cation π com o resíduo de Trp84 (SHAFFERMAN *et al*, 2005).

O mecanismo de hidrólise de ACh (Esquema 2) envolve o ataque nucleofílico da serina ao carbono carbonílico da ACh, gerando um intermediário tetraédrico estabilizado por ligações hidrogênio com grupos NH peptídicos de 3 resíduos (a cavidade do oxiânion), o qual produz colina livre e serina acetilada. Ao final, a hidrólise do grupo acetila da serina por meio de uma molécula de água recupera o sitio catalítico da enzima (<http://academic.scranton.edu/faculty/CANNM1/toxicology/toxicologymoduleport.html>).



Esquema 2. Mecanismo de hidrólise da acetilcolina pela AChE (Santos, 2007).

1.4. Inibidores Reversíveis e Irreversíveis da Acetilcolinaesterase

1.4.1. Inibidores Reversíveis

Os inibidores da acetilcolinesterase (IACHe) têm aplicação como fármacos e são as principais substâncias hoje licenciadas para o tratamento específico da doença de Alzheimer. Seu mecanismo baseia-se no princípio do déficit colinérgico decorrente da

doença, e busca aumentar a disponibilidade da acetilcolina nas terminações sinápticas. Os IChE são classificados com base na sua reversibilidade e duração da inibição das colinesterase (MARCOS, 2002; FORLENZA, 2005). Tacrina, galantamina e donepezil (Figura 2) são inibidores reversíveis da AChE, respectivamente de duração curta, intermediária e longa.

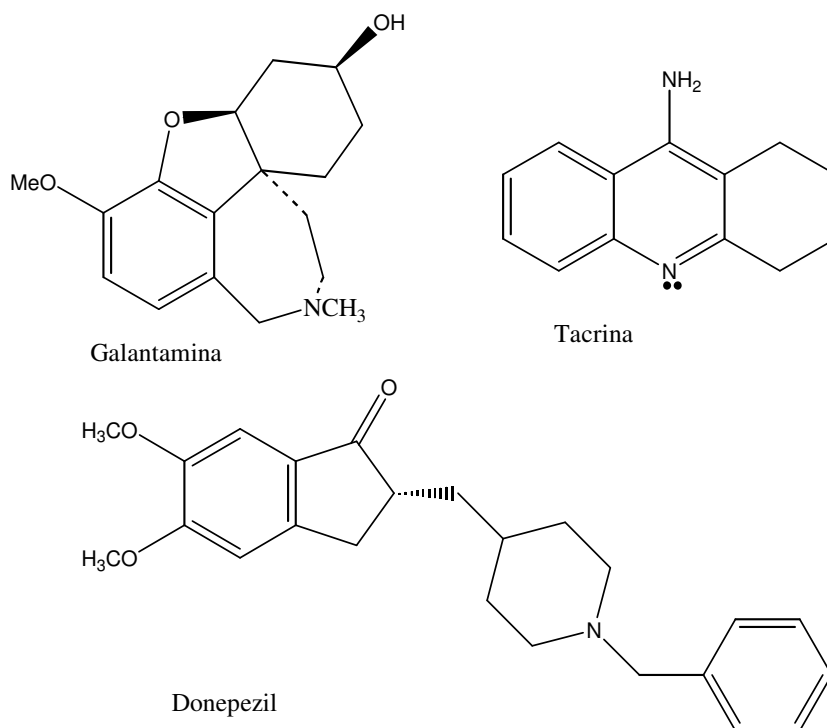


Figura 2. Alguns inibidores reversíveis da AChE.

A tacrina, cujo nome químico é 1,2,3,4-tetraidroacridin-9-amina, é comercializada pelo nome de Cognex®. Foi sintetizada pela primeira vez por Adrien Albert na Universidade de Sydney. Atua no sistema nervoso central, aumentando as concentrações da ACh no córtex cerebral; ao mesmo tempo, evita a degradação da ACh liberada pelos neurônios colinérgicos ainda não danificados pelo processo degenerativo, que continuam funcionando. Foi indicada para demência tipo Alzheimer, leve ou moderada (http://www.pdamed.com.br/diciomed/pdamed_0001_15547.php), sendo o primeiro fármaco a ser testado e clinicamente usado contra essa doença.

Esse fármaco foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1993 e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 1994. O grande inconveniente desse fármaco é a complexa posologia de quatro doses diárias e a toxicidade hepática, que fez com que ele caísse em desuso a partir do surgimento dos IChE de gerações mais novas, sendo retirado progressivamente do mercado. A tacrina, usada por pacientes em estágios moderados da doença, não possui seletividade para as colinesterases, sendo mais potente sobre a BuChE que sobre a AChE. Possui alta hepatotoxicidade, além de feitos colaterais indesejáveis como, por exemplo, náuseas/vômitos e diarreia (GANDIA, 2002; FORLENZA, 2005; GOMES & KOSZUOSKI, 2005).

Estudos computacionais (PANG et al, 1994) sugeriram uma interação da tacrina com AChE envolveria não apenas no subsítio catalítico “aniônico” (CAS), principalmente através de uma interação de empilhamento com o Trp84 (Harel et al, 1993), mas também uma interação com menor afinidade pelo anel de indólico do resíduo Trp279 no subsítio periférico aniônico (PAS). Foi assim previsto que a bis-tacrina, onde as duas unidades de tacrina foram separadas por uma cadeia carbônica de n átomos de carbono de comprimento adequado, teria maior potencial inibitório e seletividade do que a tacrina, uma hipótese que foi confirmada através da análise e síntese de uma série de bis-tacrinas (PANG et al, 1996 e CARLIER et al, 1999). Um desses compostos, a heptileno-bis-tacrina, foi 150 vezes mais ativo do que tacrina e até 250 vezes mais seletivo para AChE que para BuChE (CARLIER et al, 1999). A pentileno-bis-tacrina foi menos potente e seletiva do que heptileno-bis-tacrina (CARLIER et al, 1999).

As estruturas cristalográficas foram resolvidas para complexos da AChE de *Torpedo californica* de os dois compostos derivados da tacrina nos quais duas unidades de tacrina foram ligadas por espaçadores de 5 e 7 átomos de carbono. Os derivativos com 7 carbonos ocupam todo o comprimento do canal ao sítio ativo, estabelecendo interações com resíduos aromáticos tanto no CAS (Trp84 e Phe330), na parte inferior do canal, quanto no PAS, próximo da boca do canal (Tyr70 e Trp279). O derivado com 5 carbonos interage de forma semelhante no fundo do canal, mas o comprimento mais curto não permite a interação no PAS. Embora o grupo tacrina superior não interaja com o resíduo Trp279, ela desloca o resíduo Phe331, provocando assim um grande rearranjo no laço Trp279-Ser291. A capacidade deste inibidor para induzir mudanças estruturais de grande escala no canal do

sítio ativo da AChE tem importantes implicações para o planejamento de fármacos baseado na estrutura (RYDBERG *et al*, 2006).

O donepezil foi o segundo IChE a surgir. Foi aprovado pela FDA em 1996 e pela ANVISA em 2000. Esse fármaco tem como vantagem a posologia cômoda de uma tomada ao dia. Porém, tem uma meia-vida muito longa, que pode chegar a até 73 horas, o que é apontado como desvantagem, assim como todo fármaco de meia-vida longa usado em pacientes idosos. A galantamina é o fármaco mais recente desse grupo, aprovado pela FDA e pela ANVISA em 2001. A galantamina tem um efeito adicional, que é a atividade moduladora alostérica sobre os receptores nicotínicos da ACh, possibilitando o aumento da transmissão colinérgica e um possível efeito neuroprotetor, questionável (GOMES & KOSZUOSKI, 2005).

Ainda não há evidências sobre a superioridade clínica de um IChE sobre outro, mas estudos nessa perspectiva provavelmente trarão respostas em breve (GOMES & KOSZUOSKI, 2005).

1.4.2. Inibidores Irreversíveis

1.4.2.1. Metil-Carbamatos

Os metil-carbamatos são derivados do ácido carbâmico, que têm dois grupos substituintes, R_1 e R_2 , onde R_1 é um álcool, oxima, ou fenol e R_2 um hidrogênio ou um grupo metil (Figura 3) (Baron, 1991). Os derivados do ácido carbâmico são substâncias reconhecidas como altamente eficientes quanto à ação pesticida, principalmente inseticida. Os compostos deste grupo apresentam as seguintes características: 1) alta atividade inseticida; 2) baixa ação residual, devido à instabilidade química das moléculas; 3) baixa toxicidade a longo prazo, quando comparada com os derivados fosforados (Mídio e Silva, 1995). São exemplos: carbaril (Sevin), aldicarb (Temik), carbofuran (Furadan) (Figura 3) (Mortensen, 1986, Midio e Silva, 1995, Soares, 1998).

Os metil-carbamatos podem ser absorvidos por via oral, respiratória e dérmica (Lima, 1996, Moraes, 1998). A toxicidade dos metil-carbamatos é grandemente influenciada pelo veículo e pela via de exposição (Baron, 1991). Uma vez absorvido, os metil-carbamatos são rapidamente distribuídos aos tecidos e órgãos. O metabolismo e a eliminação são relativamente rápidos, e não há evidências de haver bioacumulação de metil-carbamatos (Baron, 1991, Machemer e Pickel, 1994).

Os metil-carbamatos são estruturalmente diferentes dos organofosforados (OFs), mas funcionam de forma similar, fazendo uma ligação no sitio ativo da enzima acetilcolinaesterase (AChE), inibindo-a. O fato da inibição da AChE produzida pelos metil-carbamatos ser de mais curta duração é uma das diferenças destes dois grupos de compostos (Ford, 1993; Jeyaratnam e Maroni, 1994; Morgan, 1998; e Mendes, 1995, Soares, 1998).

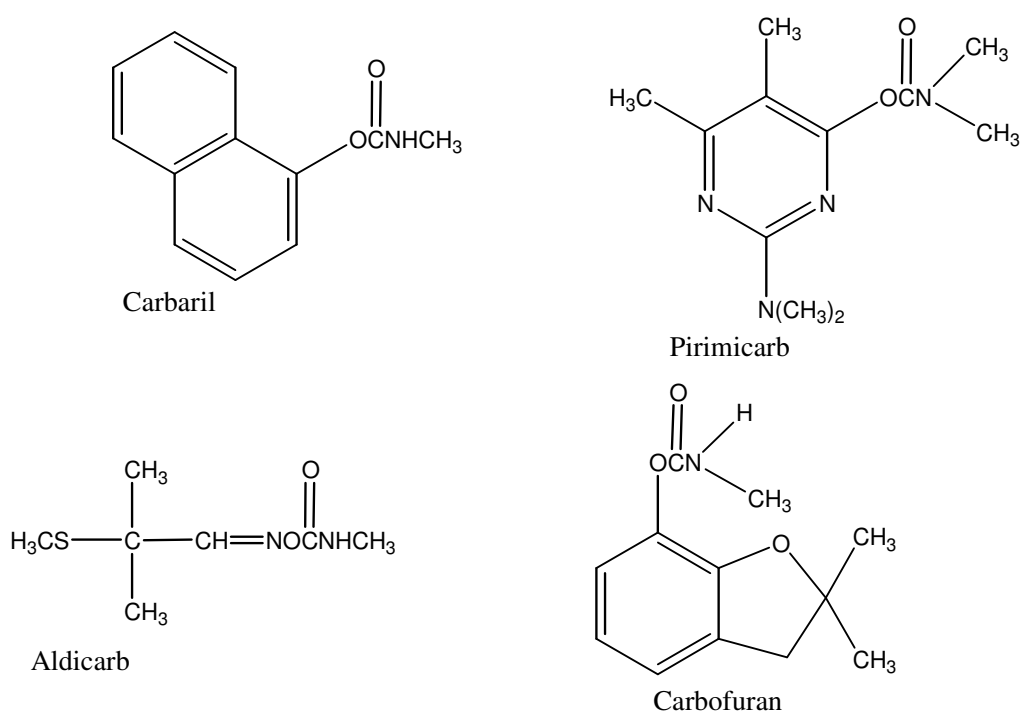


Figura 3. Exemplos de carbamatos.

1.4.2.2. Compostos Organofosforados

Os organofosforados (OFs) foram descobertos como compostos tóxicos para as pessoas em 1932 e para insetos em 1937. Eles evoluíram para os principais agentes de guerra química (sarin, soman e VX) e para a principal classe dos agentes inseticidas (incluindo clorpirifós, acefato, malation), normalmente com toxicidade seletiva contra insetos(Figura 4), em comparação com mamíferos (CASIDA e QUISTAD, 2005).

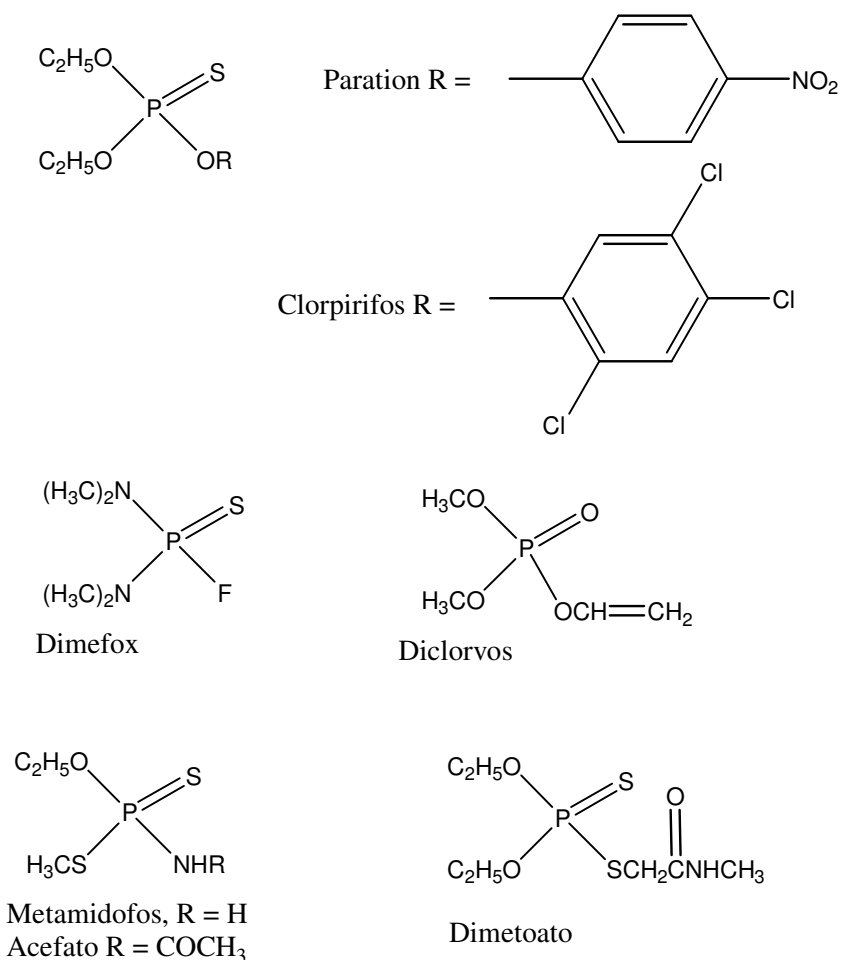


Figura 4. Exemplos de Organofosforados.

Os OFs inibem a enzima AChE, responsável pela hidrólise do neurotransmissor ACh nas fibras colinérgicas do sistema nervoso (CASTRO, 2002). As fibras colinérgicas são responsáveis pela estimulação de vários órgãos do corpo e dos músculos voluntários, ocorrendo no sistema nervoso central e nos sistemas periféricos simpático e parassimpático. Neste tipo de fibra nervosa, a ACh é responsável pela transmissão do impulso nervoso,

através da sinapse, até receptores específicos, que podem ser de dois tipos, nicotínicos e muscarínicos (Figura 5). A terminação do impulso nervoso ocorre através da hidrólise da ACh, realizada pela AChE. Desta forma, a inibição da AChE resulta de acúmulo de ACh em todos os sitios de transmissão colinérgica, com conseguinte superestimulação das estruturas enervadas por aquelas fibras. (CASTRO, 2002).

Os efeitos da acumulação da ACh (síndrome colinérgica) podem ser divididos em três tipos: centrais, muscarínicos e nicotínicos. A seqüência dos aparecimentos dos sintomas depende da rota de intoxicação e da quantidade de agente absorvido. Em intoxicações fatais, a morte ocorre por parada respiratória de origem central (depressão do centro respiratório) ou periférica (paralisia dos músculos respiratórios) (CASTRO, 2002).

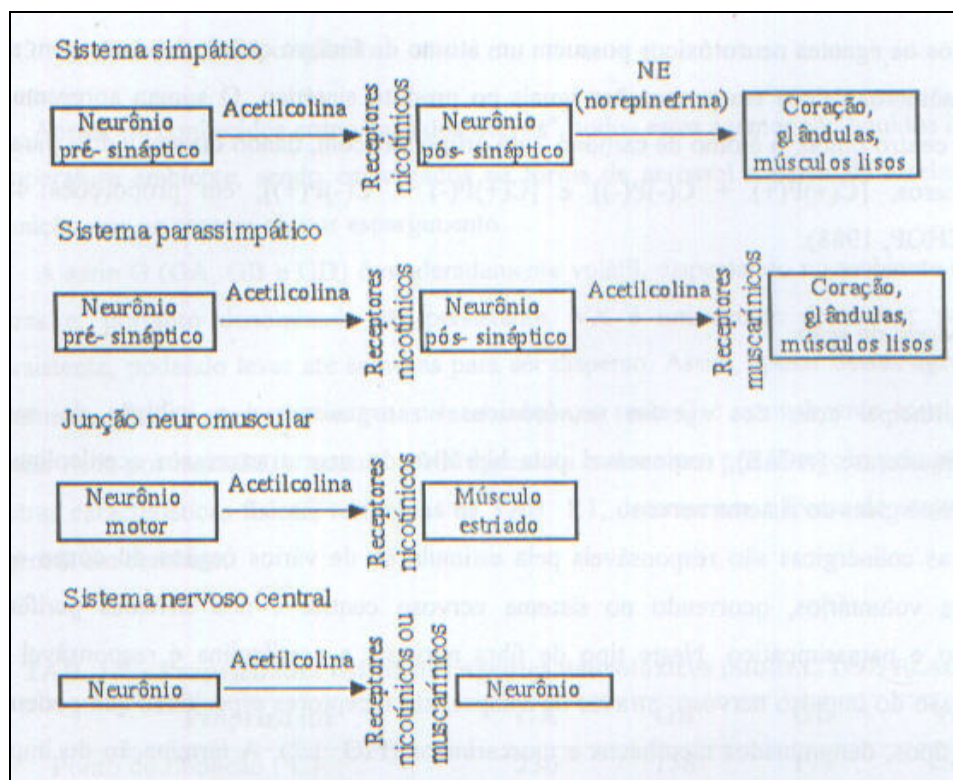
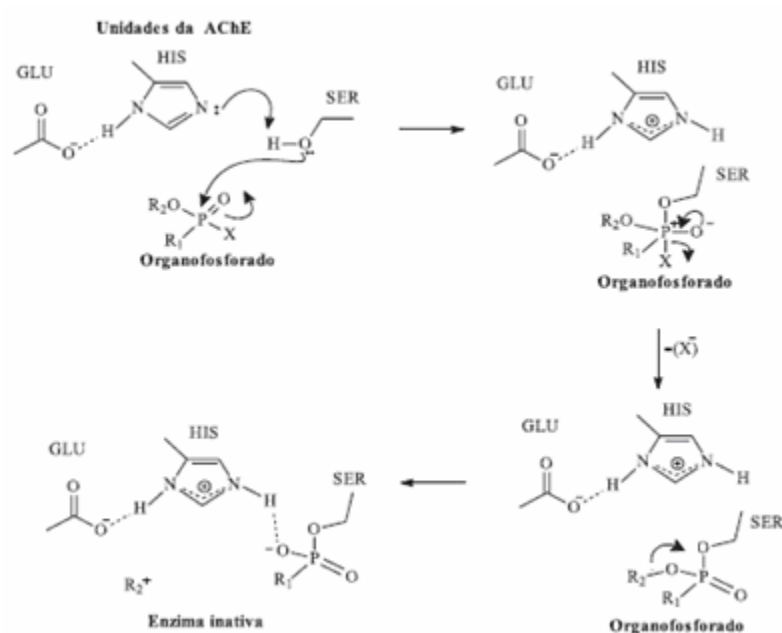


Figura 5. Sítios de ação da ACh no sistema nervoso e seus receptores (STINE, 1996)

1.5. Principais Aspectos da Inibição da AChE pelos Organofosforados

Os OFs reagem com o fragmento de serina do sitio ativo, permanecendo ligados a ele (Esquema 3). A reação com carbamatos é semelhante, mas o complexo não tem uma vida longa. O grupo hidroxila nucleofílico da serina, localizada no sitio ativo da AChE, liga-se covalentemente ao fósforo do OF. Da mesma maneira, o mesmo grupo hidroxila nucleofílico reage com o carbono do grupo carbonila para formar um carbamato ligado covalentemente, semelhante ao que ocorre na reação com a acetilcolina (ACh) (Santos *et al.* 2007).

A estabilidade do grupo de saída X, ajuda na sua eliminação e inibição da enzima gastando menos energia na quebra da ligação X-P. Após o grupo de saída do OF ser deslocado formando a enzima fosforilada, o sitio ativo fica efetivamente bloqueado em uma segunda etapa, chamada “envelhecimento”, em que há a eliminação de um substituinte alquila do OF na forma de um carbocátion. Esse bloqueio leva ao acúmulo de ACh, causando a interrupção da atividade nervosa, com conseqüente perda de coordenação muscular, convulsões e, por fim, morte (SILVA, 2005b).



Esquema 3. Mecanismo clássico de inibição da AChE por inseticida OF (Santos *et al.* 2007).

A reação de inibição da AChE por OFs apresenta três diferenças principais em relação à hidrólise da ACh (BENCSURA, 1995):

- Menor influência do grupo de saída X dos OFs em relação à colina;
- Maior estabilidade de estrutura fosforilada em relação à estrutura acetilada;
- A barreira de energia para a desfosforilação se aproxima do valor para a reação não enzimática, enquanto que para a desacetilação esta diferença é bastante significativa.

De forma semelhante à hidrólise da ACh, vários resíduos do sitio ativo agem estabilizando o complexo formado entre o agente OF e a enzima. O ataque da serina ocorre pelo lado oposto ao grupo de saída X (posicionando em direção à entrada do poço) com o grupo P=O orientado em direção a um subsítio do sitio ativo enzimático, chamado cavidade do oxianion.

1.6. Métodos de Química Computacional (CASTRO, 2002)

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

Quando os métodos supracitados são usados para calcular alguma propriedade do sistema quando ele está em uma dada configuração de átomos (um ponto em uma hipersuperfície de energia), diz-se que foi efetuado um cálculo de “ponto único”. Pode-se ir mais longe e usar vários cálculos deste tipo para varrer o hiperespaço de fase, enquanto se altera a disposição dos átomos, em busca regiões onde o gradiente de energia é baixo e o sistema é mais estável. Esta busca por mínimos de energia é chamado de otimização de geometria e utiliza métodos especiais que a tornam eficiente (FLETCHER, 1980; GILL *et al.*, 1981). A maioria desses métodos utiliza uma varredura na direção contrária à do vetor gradiente, que sempre dá a direção de maior variação da função, até que a variação de energia seja menor que um limite pré-definido.

Os cálculos de otimização de energia são bastante custosos do ponto de vista do tempo computacional, dado o grande número de ciclos de cálculo que precisam ser realizados. São também muito importantes, pois na maioria dos casos não se tem

informação sobre a estrutura dos compostos que se quer estudar e uma análise conformacional (cada ponto estacionário na superfície de energia define um confômero) se faz necessária.

A modelagem molecular tem sido empregada para, além de interpretar dados experimentais, suprir limitações destes dados. Esta poderosa ferramenta vem se desenvolvendo muito nas últimas décadas devido ao desenvolvimento de computadores e programas de computador cada vez mais sofisticados (HEHRE *et al.*, 1998).

1.6.1. Mecânica Molecular

A filosofia básica dos métodos de mecânica molecular é usar funções parametrizáveis para descrever as diversas interações entre os átomos que compõem a molécula, ou seja, fundamenta-se na possibilidade de particionar a energia total do sistema em termos independentes. A forma de tais funções depende da interação que se quer descrever. Seus parâmetros são obtidos, dependendo de átomos que participam da interação, pela comparação com dados experimentais.

O campo de força é o conjunto de expressões parametrizáveis que compõe um método de mecânica molecular. Em um campo de força genérico pode-se descrever a ligação entre dois átomos **a** e **b** (Figura 6) por meio de um oscilador harmônico simples.

$$V_1 = V_{\text{estiramento}} = \sum_{\text{ligações}} K_r^{(0)} (r - r^{(0)})^2 \quad \text{EQ. 5}$$

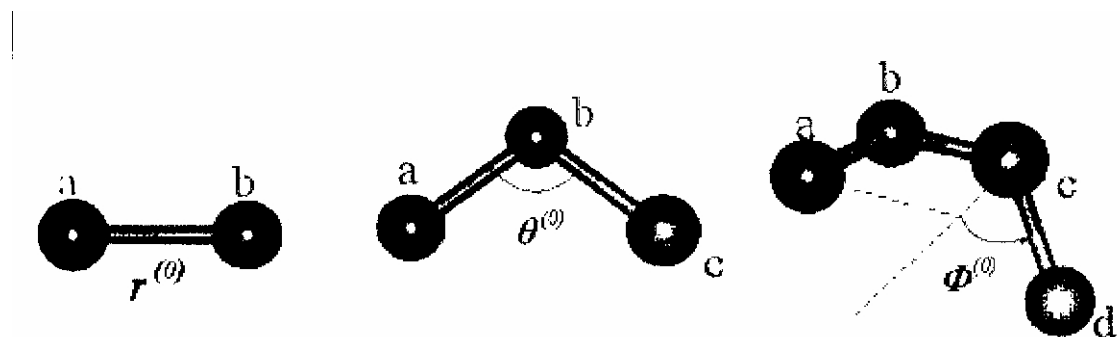


Figura 6. Exemplo de variáveis em um campo de força típico.

Os parâmetros $K_r^{(0)}$ e $r^{(0)}$ representam, respectivamente, a constante de força e a distância de equilíbrio do oscilador. Dependem dos átomos que estão participando da

ligação e seus valores são obtidos, por exemplo, através da comparação com dados experimentais, extraídos de um conjunto de moléculas escolhidos como padrão.

O ângulo entre duas ligações (Figura 6) também pode ser descrito como um oscilador e a energia V_2 de dobramento desse ângulo pode ser descrita pela expressão abaixo:

$$V_2 = V_{\text{dobramento}} = \sum_{\text{angulos}} K_0^{(0)} (\theta - \theta^{(0)})^2 \quad \text{EQ. 6}$$

A energia de torção ao redor de ângulos diedros (ângulo formado pelos átomos **a-b-c-d** define o quanto este último distancia-se do plano formado pelos outros três, Figura 6) é apropriadamente descrita por séries truncadas de Fourier (V_3), pois estas conferem caráter de simetria aos vários mínimos presentes.

$$V_3 = V_{\text{diedros}} = \sum_{\text{diedros}} \frac{V_n^{(0)}}{2} [1 + \cos(n\phi - \phi^{(0)})] \quad \text{EQ. 7}$$

A interação de Van der Walls pode ser descrita de várias formas: no exemplo abaixo, usa-se o potencial de Lennard-Jones (potencial 6-12), que é relativamente fácil de calcular e parametrizar (V_4):

$$V_4 = V_{V/W} = \sum_{i < j} \left[\frac{A_q^{(0)}}{R_q^{12}} - \frac{B_q^{(0)}}{R_q^6} \right] \quad \text{EQ. 8}$$

A interação eletrostática é dada pela expressão comum de Coulomb (V_5), onde $\epsilon^{(0)}$ é a constante dielétrica:

$$V_5 = V_{EIt} = \sum_{i < j} \frac{q_i q_j}{\epsilon^{(0)} R_q} \quad \text{EQ. 9}$$

A energia potencial total para esse campo de força é dada pela soma dos termos de potencial descritos. Muitas outras interações, inclusive termos cruzados, podem ser incluídas para tornar o campo de força mais preciso e abrangente.

$$E_{\text{total}} = V_1 + V_2 + V_3 + V_4 + V_5 + \dots + V_n \quad \text{EQ. 10}$$

Um dado campo de força, em associação a um conjunto de parâmetros, define um método específico de mecânica molecular. Muitos métodos estão disponíveis hoje em dia, a maioria deles parametrizados para sistemas orgânicos, fornecendo ótimos resultados qualitativos (ALLINGER, 1977; WEINER *et al.*, 1984; BROOKS *et al.*, 1983;

JORGENNSEN e TIRADORIVES, 1988). Os resultados serão tanto melhores quanto mais próxima estiver a estrutura da molécula que esta sendo estudada daquelas usadas como na parametrização.

Um exemplo de campo de força muito difundido é o MM2 (ALLINGER, 1997) e suas atualizações, desenvolvido com o intuito de descrever pequenos sistemas orgânicos. Um outro exemplo, aplicável principalmente a macromoléculas de interesse biológico, como proteínas e ácido nucléicos, é o AMBER (WEINER *et al.*, 1994).

A grande vantagem dos métodos de mecânica molecular é a rapidez com que podem ser processados, uma vez que a maioria das funções analíticas utilizadas é de cálculo trivial para os computadores atuais. Entretanto, informações que dependem do caráter eletrônico das moléculas, incluindo o estudo de reações químicas, não podem ser obtidas por esses métodos.

1.6.2. Métodos da Mecânica Quântica

Neste trabalho, a ênfase é dada à química quântica, que descreve as moléculas em termos da interação entre núcleos e elétrons, e a geometria molecular em termos de arranjos de energia mínima dos mesmos. Os métodos da Mecânica Quântica (MQ) se baseiam na equação de Schrödinger independente do tempo que, no caso particular do átomo com um único elétron (núcleo de massa infinita), tem solução exata (EQ. 11) (ATKINS, 1997).

$$\left[\frac{-\hbar^2}{4\pi^2 m} \nabla^2 - \frac{Ze^2}{r} \right] \Psi(X, Y, Z) = E\Psi(X, Y, Z) \quad (\text{EQ. 11})$$

O termo entre colchetes à esquerda representa os operadores de energia cinética e potencial de uma massa **m** a uma distancia **r** do núcleo de carga **Z**. A constante de Planck é representada por **h** e a carga do elétron por **e**. **E** é a energia total do átomo e **ψ** é a função de onda que descreve o movimento do elétron. A função de onda em um determinado ponto, quando multiplicada pelo seu complexo conjugado, é a densidade de probabilidade de se encontrar a partícula no ponto (Interpretação de Born da função de onda). Se a densidade de probabilidade for integrada em todo o espaço **τ**, o resultado será 1 (LEACH, 2001):

$$\int \Psi^* \Psi d\tau = 1 \quad (\text{EQ. 12})$$

As soluções da equação de Schrödinger são ortogonais, ou seja,

$$\int \psi_m^* \psi d\tau = \delta_{mn} = \{ 0 \text{ se } m \neq n \quad 1 \text{ se } m = n \} \quad (\text{EQ. 13})$$

onde δ_{mn} é chamado delta de Kronecker.

Pode-se generalizar a equação de Schrödinger para um sistema multinuclear e multieletrônico (EQ. 14):

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (\text{EQ. 14})$$

onde agora a função de onda é multieletrônica e \hat{H} é o operador Hamiltoniano, que tem a forma:

$$\hat{H} = \frac{-\hbar^2}{4\pi^2} \sum_A \frac{1}{M_A} \nabla_A^2 - \frac{\hbar^2}{4\pi^2 m} \sum_a \nabla_a^2 - e^2 \sum_A \sum_a \frac{Z_A}{r_{Aa}} + e^2 \sum_{A>} \sum_B \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} + e^2 \sum_{a>} \sum_b \frac{1}{r_{ab}} \quad (\text{EQ. 15})$$

Os dois primeiros termos descrevem a energia cinética dos núcleos (A) e dos elétrons (a), respectivamente. Os três termos restantes referem-se às interações coulombianas entre partículas. M é a massa nuclear e R_{AB} , r_{ab} e r_{Aa} são distâncias que separam núcleos, elétrons, e elétrons e núcleos, respectivamente.

1.6.2.1. As Equações de Hartree-Fock (LEACH, 2001)

De acordo com o teorema variacional, a energia calculada a partir de uma forma aproximada para a função de onda verdadeira será sempre maior do que a energia verdadeira. Consequentemente, quanto melhor a função de onda, menor a energia. No mínimo, a primeira derivada da energia, δE , será igual a zero. As equações Hartree-Fock

são obtidas, impondo, para dada função de onda, que a energia é um mínimo sujeito à restrição de que os OM's permaneçam ortonormais entre si.

Esta minimização, sujeita a vínculos, é obtida através da aplicação do método dos multiplicadores de Lagrange. Nesta aproximação a derivada da função a ser minimizada é adicionada às derivadas das restrições multiplicada por uma constante chamada de multiplicador de Lagrange, λ_{ij} . A soma é então igualada a zero (EQ.16)

$$\delta E + \delta \sum_i \sum_j \lambda_{ij} S_{ij} = 0 \quad (\text{EQ.16})$$

Nas equações de Hartree-Fock, os multiplicadores de Lagrange são realmente escritos por $-\lambda_{ij}$ para refletir o fato que eles estão relacionados às energias dos OM's. A equação a ser resolvida é então (EQ.17).

$$\delta E - 2\delta \sum_i \sum_j \lambda_{ij} = 0 \quad (\text{EQ.17})$$

Não será escrita a resolução desta equação, será apenas discutida a sua importância. A maior diferença entre sistema multieletrônicos e monoelétrônicos é a presença das interações entre elétrons. O que se deseja é obter a função de onda de menor energia para um sistema multieletrônico mantendo a formulação orbital. O problema então é achar uma solução que simultaneamente englobe todos os movimentos eletrônicos, bem como o efeito que um elétron de um OM exerce no comportamento de outro elétron em outro OM devido a estes movimentos eletrônicos.

Nas equações de Hartree-Fock (EQ. 18), considera-se um elétron no OM X_i no campo dos núcleos e dos outros elétrons em seus OM's fixos X_j .

$$f_i X_i = \sum_j \lambda_{ij} X_j \quad (\text{EQ. 18})$$

f_i é chamado de operador de Fock, que é um Hamiltoniano efetivo unieletrônico para um elétron no sistema multieletrônico.

É possível manipular matematicamente o conjunto das Equações de Hartree-Fock de modo que os multiplicadores de Lagrange sejam zeros quando i for diferente de j . Assim as equações de Hartree-Fock tomam a forma padrão das equações de autovalores, ou equações de Hartree-Fock canônicas (EQ.19)

$$f_i X_i = \epsilon_i X_i \quad (\text{EQ. 19})$$

O operador de Fock f_i depende do próprio orbital X_i e cada elétron é assumido se “mover” num campo fixo provocado pelo núcleo e demais elétrons. Ao se resolver estas equações, obtém-se o conjunto $\{ X_i \}$ e, por sua vez, a energia do estado eletrônico para cada geometria nuclear.

A estratégia de resolução das equações de Hartree-Fock é chamada de Método do Campo Auto-consistente (SCF), que pode ser resumida no algoritmo abaixo:

- 1- Arbitra-se um conjunto de orbitais iniciais $\{ X_i \}$.
- 2- Com este conjunto, calcula-se os operadores de Coulomb e de troca.
- 3- Resolve-se as equações de Hartree-Fock.
- 4- Novo conjunto $\{ X_i \}$ é obtido, recomeça-se no passo 2.

O método SCF é iterativo, prosseguindo refinando as soluções $\{ X_i \}$, com energia eletrônica total se reduzindo até que se alcance um dado valor, que segundo um critério de convergência não muda na interação seguinte: autoconsistência atingida.

1.6.2.2. Métodos Semi-Empíricos

Modelos semi-empíricos provêm diretamente dos modelos Hartree-Fock (LEACH, 2001). Primeiro, a dimensão do problema é reduzido por restringir o tratamento aos elétrons de valência somente (os demais são considerados parte fixa do núcleo, formando o caroço ou “core”). Elementos do segundo período incluem funções simples do tipo s e um conjunto de funções do tipo p, por exemplo, 2s, 2p_x, 2p_y, 2p_z; para elementos de transição pode se incluído um conjunto de funções do tipo d, por exemplo, 3d(x²-y²), 3d(z²), etc. Hidrogênio é representado por uma função simples tipo 1s. Integrais de dois elétrons são desprezadas e/ou parametrizadas. Como exemplos de métodos semi-empíricos, têm-se o MNDO (Modified Neglect of Diatomic Overlap) (DEWAR, 1977-a,b), MNDO/d (Modified Neglect of Diatomic Overlap to d orbitals) (THIEL, 1994), NDDO (Neglect of Diatomic Differential Overlap) (POPLE, 1965).

Simplificações adicionais foram introduzidas para simplificar o cálculo global e, mais importante ainda, foi produzir ferramenta para a introdução dos parâmetros empíricos. Exceto para modelos de metais de transição, as parametrizações semi-empíricas são

baseadas na reprodução de uma extensa variedade de dados experimentais, incluindo geometria no equilíbrio, calores de formação, momentos de dipolo e potencial de ionização. Os métodos AM1 (Austin Model 1) (DEWAR, 1985) e PM3 (Parametric Method 3, STEWART, 1989-a,b) incorporam essencialmente as mesmas aproximações mas diferem em suas parametrizações. Ambos têm sido largamente usados na literatura e embora as diferenças nos resultados sejam pequenas, o método PM3 é considerado, basicamente, uma melhoria do método AM1 em termos de parametrização e, por este motivo, foi o método escolhido para os cálculos semi-empíricos desenvolvidos no presente trabalho.

Há dois métodos mais recentes: o PM6 e o RM1. O método PM6 é considerado hoje uma melhoria dos métodos AM1 e PM3 em termos de parametrização, onde a maior parte das aproximações utilizadas é idêntica aquelas usadas em AM1 e PM3. As diferenças estão na melhoria da avaliação das interações, otimizações geométricas, calor de formação, momento de dipolo, potencial de ionização e uso de parâmetros para orbitais d de metais de transição (STEWART, 2007).

O método RM1 possui a mesma estrutura algébrica e o mesmo número de parâmetros do método AM1, porém foi parametrizado de uma forma muito mais elaborada. Assim como a AM1, as propriedades utilizadas no conjunto de parametrização foram: calor de formação, momento de dipolo, potencial de ionização e variáveis geométricas (distância e ângulos de ligação). O método RM1 foi testado com base na comparação de todas as propriedades envolvidas na parametrização e com os métodos AM1 e PM3. Os resultados revelam que o método RM1 apresenta um avanço sobre os métodos comparados (MORGON e COUTINHO, 2007).

1.6.3. Minimização de Energia (CASTRO, 2002)

A energia pode ser expressa como uma função das coordenadas dos núcleos atômicos. Tal função pode ser considerada uma superfície n-dimensional, conhecida como superfície de energia potencial. Nesta superfície é possível identificar os pontos estacionários, onde as primeiras derivadas se anulam.

Caso as segundas derivadas de um ponto sejam positivas, tem-se o “ponto de mínimo”, que corresponde a um estado estável do sistema. Quando o sistema apresentar

apenas uma segunda derivada negativa, tem-se o “estado de transição” (ponto de sela de ordem 1), muito importante nos estudos das reações. Se apresentar mais de uma segunda derivada negativa, mas não todas, o sistema se encontra em um “ponto de sela” de ordem superior, sem significado químico.

A determinação de um ponto estacionário é realizada através de cálculo das frequências normais de vibração para a estrutura. Como as frequências estão relacionadas às segundas derivadas de energia potencial, dizer que o sistema possui frequência imaginária é o mesmo que dizer que há uma segunda derivada negativa.

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo é obter, através do uso de cálculos teóricos pelo método semi-empírico PM3 [Stewart, 1989], informações estruturais e do perfil da reação entre a AChE do *Torpedo californica* e fosforamidatos sintetizados por nosso grupo, de forma a avaliar as possibilidades destes compostos atuarem como inibidores efetivos desta enzima. Duas possibilidades mecânicas de inibição foram avaliadas: a primeira no sítio da AChE ocupado pela acetilcolina e a segunda no sítio da AChE ocupado pelo inibidor reversível pentileno-bis-tacrina (PBT). Será feita uma análise comparativa desses resultados com aqueles obtidos experimentalmente pelo nosso grupo de pesquisa em agroquímica da UFRRJ.

O estudo foi feito através de cálculos semi-empíricos das estruturas evidenciadas na figura 7, incluindo-se os isômeros E e Z quando necessário, com o objetivo de prever a maior inibição, e ser capaz de propor o mecanismo mais viável para as moléculas analisadas.

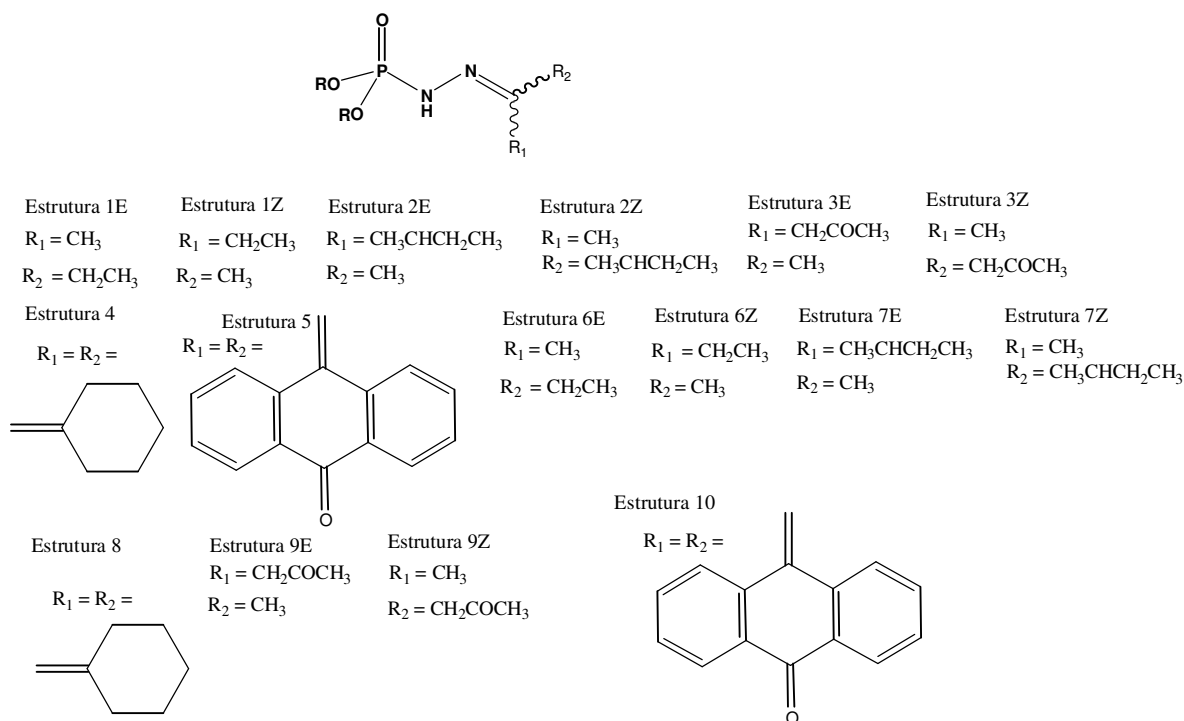


Figura 7. Estrutura dos OFs avaliados neste estudo como inibidores da AChE. As estruturas de 1 a 5 possuem grupo R igual a iso-propila e as de 6 a 10 possuem grupo R igual a butila.

Os fosforamidatos descritos na figura 7 foram testados *in vitro* pela aluna Aline F. Lira, em quatro concentrações diferentes (Tabela 2) a fim de determinar quais interagem com a AChE e em que grau a inibem. O OF comercial acefato foi usado como composto de referência.

Tabela 2. Percentual da Inibição da enzima AChE pelos fosforamidatos (Lira, A F., 2009).

Estrutura	Inibição (%)*				
	2 mM	4 mM	10 mM	20 mM	40 mM
1	0	0	0	0	0
2	11,00	12,00	27,20	40,00	-
3	0	0	0	0	0
4	0	8,00	9,20	39,00	88,10
5	2,50	3,00	-	-	-
6	25,00	33,00	34,60	-	-
7	35,00	-	-	-	-
8	25,00	26,00	-	-	-
9	80,00	97,00	99,85	-	-
10	10,00	30,00	-	-	-
acefato	25,00	30,00	42,00	50,00	-

*Compostos insolúveis são indicados por um traço.

3. METODOLOGIA

A estrutura escolhida para o desenvolvimento do trabalho foi a AChE do *Torpedo californica* (RAVES et al., 1997), por esta ser a enzima que está sendo testada experimentalmente pela aluna de mestrado Aline Figueira Lira, orientada pelo professor Dr. Victor M. Rumjanek, com os fosforamidatos já sintetizados pelo aluno de mestrado Vinicius Tomaz Gonçalves, orientado pelo professor Dr. João Batista Neves da Costa. Esta enzima possui algumas estruturas cristalográficas disponíveis no banco de dados de acesso público *Protein Data Bank* (PDB).

A primeira estrutura cristalográfica da AChE de *T. californica* escolhida foi aquela depositada no PDB com o código 2ACE (RAVES et al., 1997). Essa estrutura nativa tem resolução de 2,5 Å e contém uma molécula de ACh covalentemente ligada ao resíduo de serina da tríade catalítica, Ser200. A estrutura do substrato ligado à Ser200 foi obtida pela orientação da molécula na conformação totalmente *trans*, obtida anteriormente por um procedimento de “docking” manual na mesma enzima (SUSSMAN et al., 1991).

Em função das limitações para o cálculo de sistemas com grande número de átomos por métodos quânticos, foram selecionados para o estudo de modelagem alguns aminoácidos da estrutura, baseado em informações sobre o sítio ativo da enzima. Foram selecionados os aminoácidos localizados a 5 Å do substrato. O modelo de trabalho inicial foi constituído dos resíduos Trp 84, Gly 117, Gly 118, Gly 119, Glu 199, Ser 200, Ala 201, Trp 233, Phe 288, Phe 290, Glu 327, Phe 300, Phe 301, His 440, Gly 441, Phe 120, Tyr 121, Glu 327, e três moléculas de água H₂O 603, H₂O 727 e H₂O 742 (Figura 11). Os resíduos foram selecionados de modo a se considerar as várias subunidades que compõe o sítio ativo da enzima.

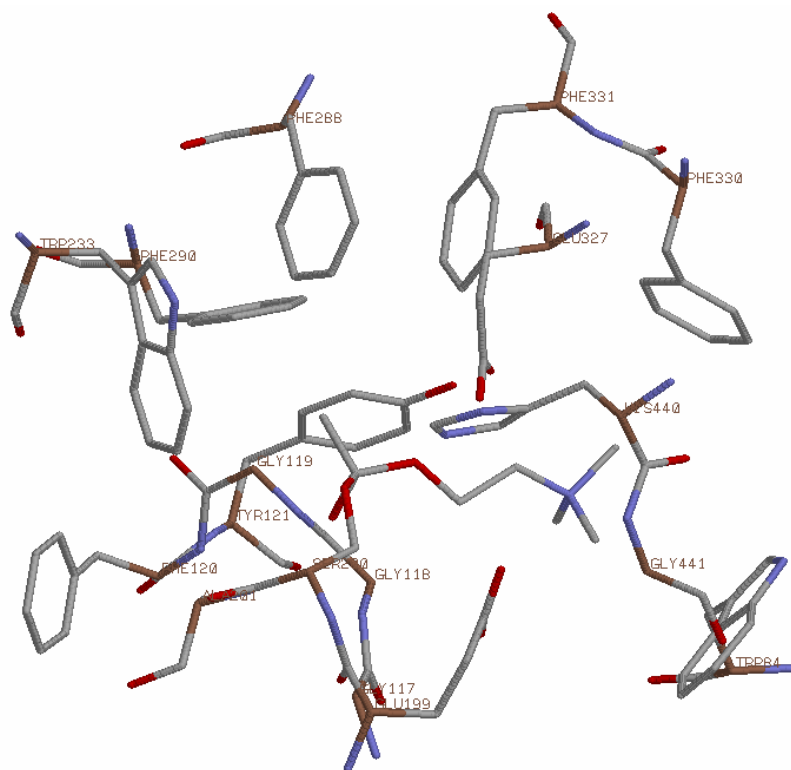


Figura 8. Modelo de trabalho, sitio da AChE com os aminoácidos localizados a 5 Å da acetilcolina ligada ao resíduo Ser200, código 2ACE do PDB.

A segunda estrutura escolhida para o desenvolvimento do trabalho foi a AChE do *T. californica* (SUSSMAN et al., 2006), depositada no PDB com o código 2CMF (SUSSMAN et al., 2006). Essa estrutura nativa tem resolução de 2,5 Å e contém uma molécula do inibidor pentileno-bis-tacrina. Foram selecionados para o estudo de modelagem alguns aminoácidos da estrutura, baseado em informações sobre o sítio ativo da enzima, localizados a 5 Å do inibidor. O modelo de trabalho inicial foi constituído dos resíduos Tyr70, Asp 72, Gly 80, Ser 81, Trp 84, Gly 117, Gly 118, Gly 119, Tyr 121, Ser 122, Tyr130, Glu 199, Ser 200, Trp 279, Ile 287, Phe 288, Phe 330, Phe 331, Tyr 334, Gly 335, Trp 432, Ile 439, His 440, Gly 441, Tyr 442, Ile 444 e sete moléculas de água H₂O 147, H₂O 148, H₂O 149, H₂O 150, H₂O 151, H₂O 152 e H₂O 153 (Figura 12). Os resíduos foram selecionados de modo a se considerar as várias subunidades que compõe o sítio de interação com o inibidor.

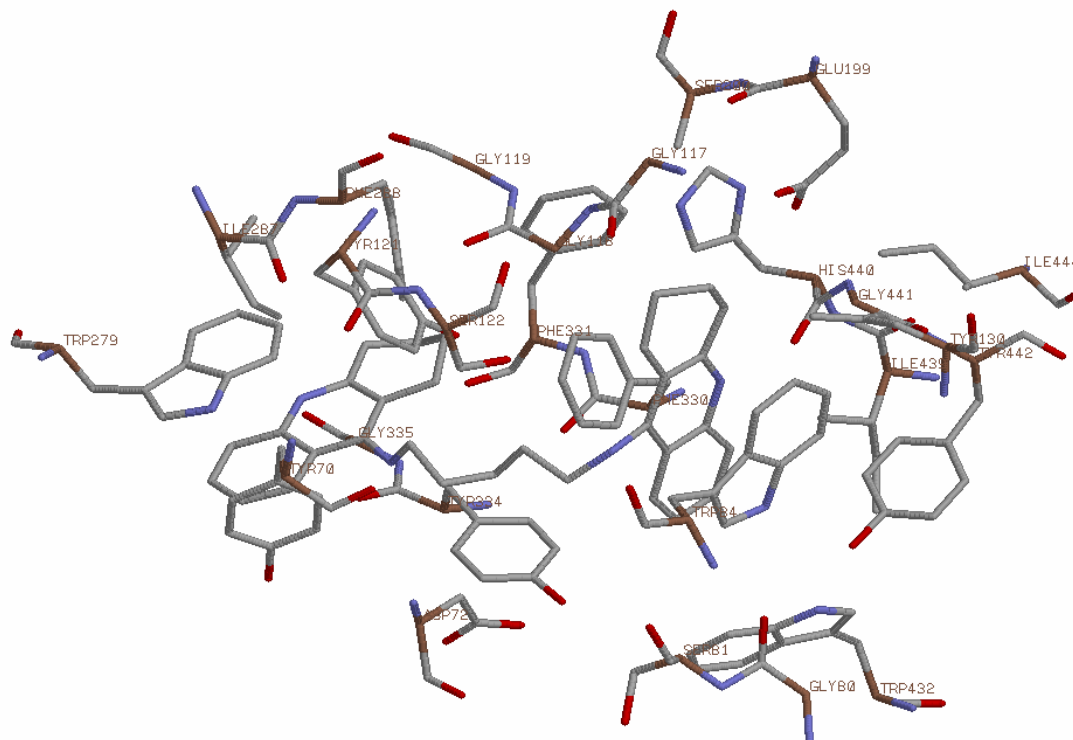


Figura 9. Modelo de trabalho, sítio da AChE com os aminoácidos localizados a 5 Å da pentileno-bis-tacrina, código 2CMF do PDB.

Os inibidores foram inseridos no modelo do sítio ativo, por meio do programa PC Spartan '08 (Wavefunction, Inc), através de modificações na estrutura da ACh, ou no sítio da pentileno-bis-tacrina, através de modificações na estrutura do inibidor. Para cada etapa do mecanismo de fosforilação da serina do sítio ativo pelos fosforamidatos, foram feitas as modificações necessárias no arquivo inicial de cada inibidor até se obter uma estrutura adequada para os cálculos semi-empíricos. Em alguns casos, foi preciso pré-otimizar as estruturas por mecânica molecular (campo de força MMFF) antes de se preparar os arquivos para os cálculos semi-empíricos, mantendo-se fixos os átomos das ligações peptídicas para se evitar afastamentos dos resíduos das suas posições originais na enzima.

Para os cálculos semi-empíricos das etapas do mecanismo, cada arquivo inicial, no formato pdb, foi convertido com o programa Babel 1.6 (Walters e Stahl, 1996) em um arquivo de coordenadas internas. O programa também foi usado para a adição dos átomos de hidrogênio, ausentes na estrutura cristalográfica. As otimizações das estruturas foram feitas com o Hamiltoniano PM3 (Stewart, 1989a, Stewart, 1989b) do programa Mopac 6.0

(Stewart, 1992), até uma norma de gradiente inferior a 0,5 kcal/(Å ou rad). Durante as otimizações, os átomos das ligações peptídicas foram mantidos fixos no espaço. Os átomos de hidrogênio e todos os átomos das cadeias laterais, dos ligantes e das moléculas de água foram mantidos livres para que pudessem alcançar conformações de menor energia durante a minimização de cada sistema modelado. A análise das estruturas, incluindo determinação das distâncias e ângulos de ligação, foi feita com o programa Rasmol 2.6 (Sayle, 1995).

As palavras-chave utilizadas para a realização de cálculos foram as seguintes, alterando-se apenas a palavra-chave CHARGE=n de acordo com a carga total de cada estrutura:

PM3 GRAD NOINTER MMOK EF CHARGE=n T=nH

PM3: Hamiltoniano

GRAD: Imprimir todos os gradientes

NOINTER: Não imprimir as distâncias interatômicas

MMOK: Usar correção de mecânica molecular em ligações CONH

EF: Usar a rotina EF (*Eigenvector Following*) na pesquisa de mínimo de energia

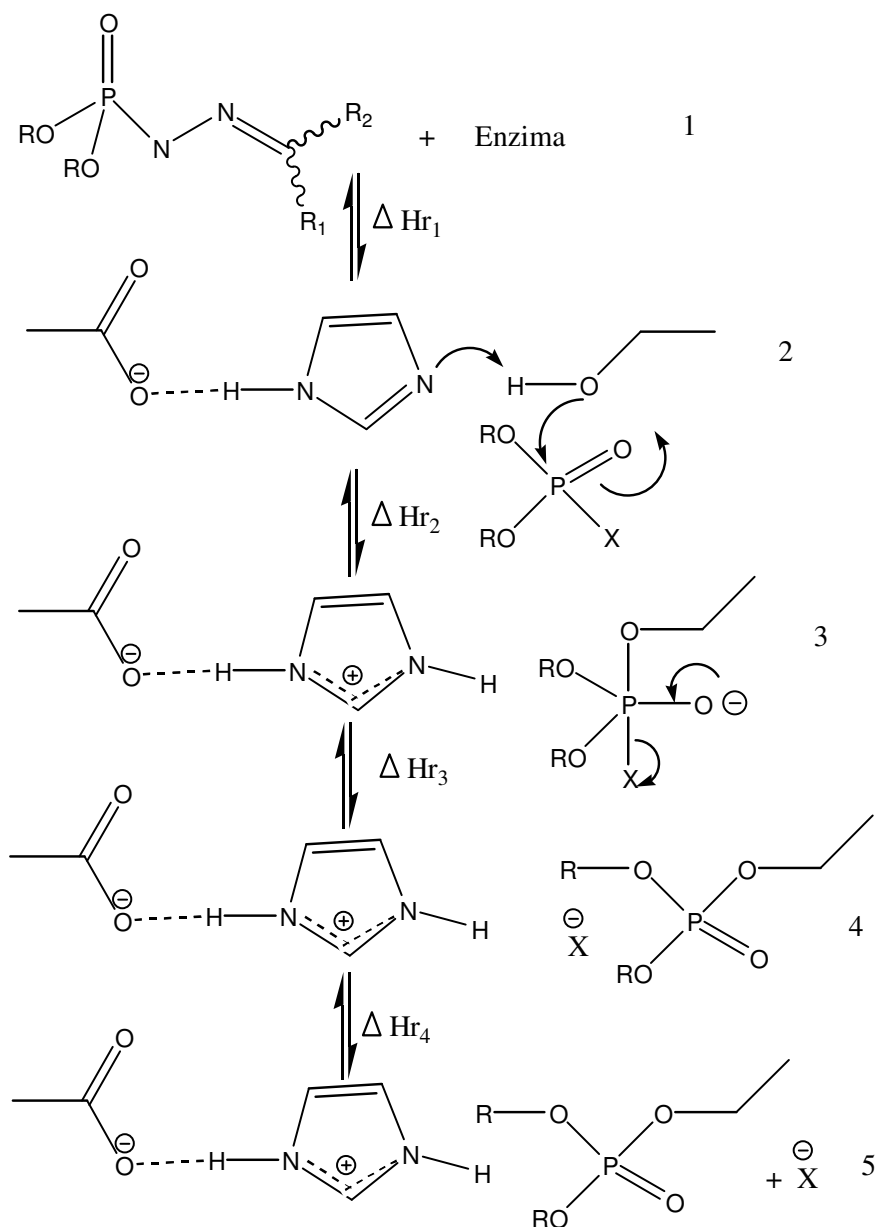
CHARGE=n: Define a carga total n do sistema

T=nH: Tempo requerido para o programa executar os cálculos em n horas

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A continuidade do interesse pela classe dos OFs deve-se à facilidade de síntese de novos derivados, à possibilidade de síntese de pró-inseticidas, que sofrem ativação preferencial em insetos e não em mamíferos, e à maior biodegradabilidade em comparação com os organoclorados. Os OFs apresentam baixa ação residual, com pouca estabilidade no meio ambiente e acumulação limitada em organismos vivos, sendo que 80 a 90% dos compostos são eliminados após 48 h do contato. Os inseticidas OFs são importantes não somente pela proteção agrícola que oferecem mas, também, pelos propósitos industriais, domiciliares e ambientais (Klocher et al, 1991). Todos esses fatores têm estimulado o Grupo de Pesquisa em Agroquímicos da UFRRJ a planejar, sintetizar e avaliar novas alternativas estruturais para essa classe de compostos.

Conforme descrito anteriormente, a ação dos OFs está associada à inibição da enzima AChE, que começa pela fosforilação de um resíduo de serina do sítio ativo, descrita em nosso modelo teórico pelas etapas reacionais mostradas no esquema 4.



Esquema 4. Modelo reacional dos OFs inibindo a enzima AChE. Foram avaliados os valores de ΔH_r para os etapas indicadas do mecanismo.

O modelo reacional avaliou a mudança na entalpia entre modelos, otimizados em fase gasosa, representando as quatro etapas mecânicas descritas no esquema 4: na primeira, a enzima e o OF separados ($E + OF$) formam o complexo não-covalente E.OF (ΔH_{r1}), onde o átomo P do OF mantém a geometria tetragonal. Na segunda, há formação do aduto covalente entre a serina do sitio ativo e o OF (E-OF), onde o átomo P encontra-se pentacoordenado (ΔH_{r2}). Na terceira, há quebra da ligação com o grupo de saída e o átomo

P do OF recupera a geometria tetragonal (ΔH_{r3}). Finalmente, na quarta etapa, o grupo de saída é eliminado da cavidade do sítio ativo (ΔH_{r4}) e a serina permanece fosforilada. Nas tabelas 3 e 4 são apresentados os resultados de ΔH_r para cada etapa do mecanismo modelado e a soma dos valores de ΔH_r , para as estruturas com substituintes iso-propil (tabela 3) e butil (tabela 4).

Tabela 3. Calores de reação dos fosforamidatos com R = iso-propil avaliados no sítio ativo da enzima AChE, método PM3.

Moléculas	ΔH_{r1}^a	ΔH_{r2}^a	ΔH_{r3}^a	ΔH_{r4}^a	$\Delta H_r^{a,b}$
1E	-2,66	9,59	10,83	19,86	37,62
1Z	8,37	10,98	9,83	22,35	51,53
2E	10,25	-14,33	2,20	10,16	8,28
2Z	10,54	-12,86	8,12	9,28	15,08
3E	19,88	-12,92	16,76	-11,06	12,66
3Z	10,70	1,44	2,91	-3,16	11,89
4	20,04	-13,44	-14,35	10,26	2,51
5	11,78	-6,90	-16,99	-12,65	-24,76

^a kcal/mol; ^b $\Delta H_r = \Delta H_{r1} + \Delta H_{r2} + \Delta H_{r3} + \Delta H_{r4}$

Tabela 4. Calores de reação dos fosforamidatos com R= butil avaliados no sítio ativo da enzima AChE, método PM3.

Moléculas	ΔH_{r1}^a	ΔH_{r2}^a	ΔH_{r3}^a	ΔH_{r4}^a	$\Delta H_r^{a,b}$
6E	0,16	0,64	14,89	19,36	35,05
6Z	3,89	-6,37	24,72	7,15	29,29
7E	16,19	-15,58	5,07	16,23	21,91
7Z	8,44	-14,08	2,01	10,71	7,08
8	14,07	-13,70	-10,22	12,75	2,90
9E	10,38	-5,86	-3,52	0,44	1,44
9Z	12,34	2,97	-14,87	-0,77	-0,33
10	8,74	-18,31	-4,53	-11,90	-26,00

^a kcal/mol; ^b $\Delta H_r = \Delta H_{r1} + \Delta H_{r2} + \Delta H_{r3} + \Delta H_{r4}$

Os resultados mostram que a primeira etapa do mecanismo é entalpicamente favorável (ΔH_{r1} negativo) apenas para o isômero E da estrutura 1, que tem os menores substituintes, metil e etil, na dupla ligação. Sobrepondo o sítio vazio com os sítios com os OF otimizados, observou-se apenas pequenos deslocamentos das cadeias laterais dos resíduos Phe331, Phe330, Phe290 e Tyr121. No entanto, as outras estruturas causaram maiores modificações nas posições das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos Trp84, Trp233, Phe288, Phe290, Phe330, Phe120, His440 e Tyr121 após a otimização, o que sugere que efeitos estéricos podem ser a causa das entalpias desfavoráveis para essa etapa do mecanismo de reação. Os deslocamentos estão exemplificados na figura 10 para a estrutura 10.

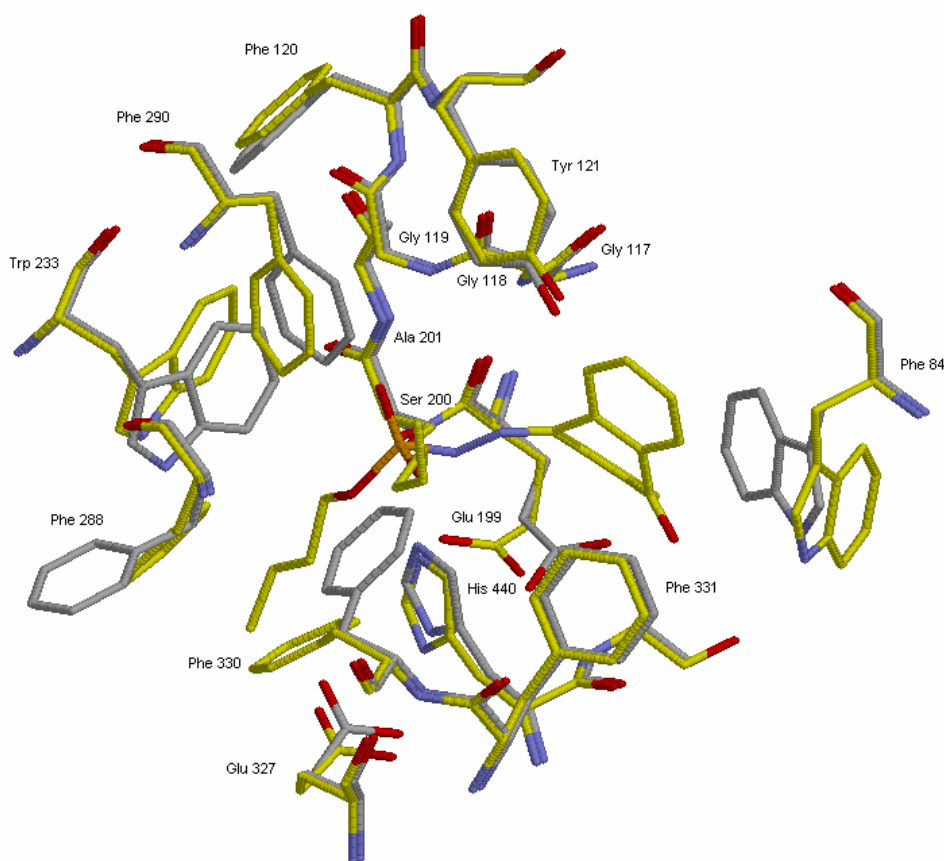
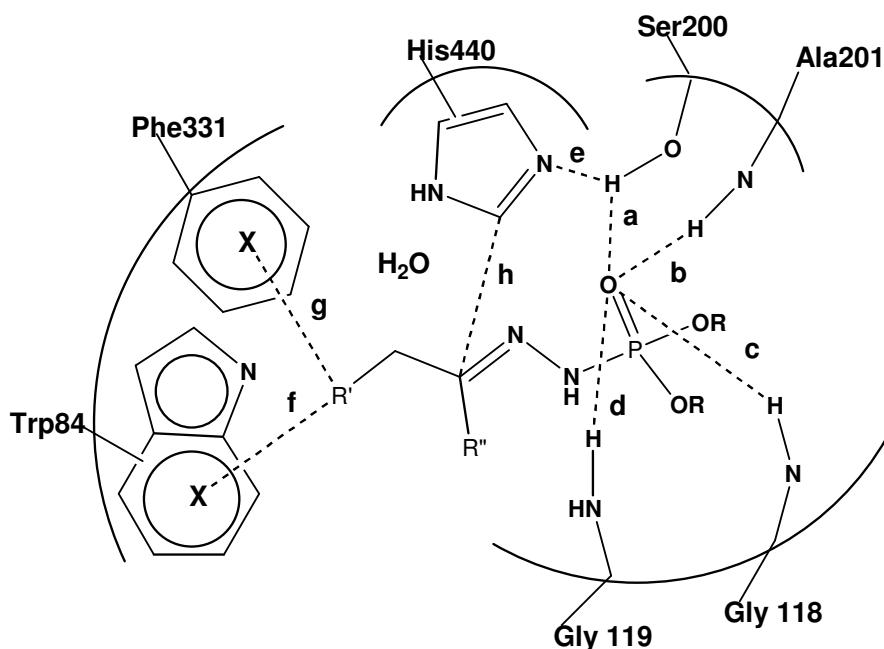


Figura 10. Estrutura 10 no interior do sítio ativo após otimização (carbonos em amarelo) sobreposta com o sítio vazio (carbonos em cinza). Átomos de N em azul, átomos de O em vermelho, átomos de P em laranja; os átomos de H foram omitidos para maior clareza.

A formação do aduto covalente, na segunda etapa do mecanismo, é mais favorável, com quase todas as estruturas com valores de ΔH_{r2} negativos; somente a estrutura 1 possui valor de ΔH_{r2} positivo considerável para ambos os diastereoisômeros. Nas condições do modelo, a transformação do complexo não-ligado na enzima no intermediário pentacoordenado é favorável ou muito pouco desfavorável para os demais compostos. Isso deve ser resultado, em parte, da formação da ligação entre Ser200 e o átomo P do fosforamidato, que é mais estável do que a ligação que foi quebrada, a ligação π da fosforila. Além disso, a cavidade do oxianion, formada pelo grupo NH peptídicos dos aminoácidos Gly118, Gly119 e Ala201, estabiliza a evolução do estado tetraédrico para o pentacoordenado através de ligações hidrogênio com o oxigênio carregado, como se pode observar na Tabela 5 (distâncias b, c, d).

Tabela 5. Distâncias de interações observadas nos sistemas 2 e 3 para algumas da estruturas modeladas.



Sistema 2	Distâncias*							
	a	b	c	d	e	f	g	h
10	1,72	4,82	4,42	2,72	1,72	2,84	5,46	4,76
9E	1,74	3,70	3,60	1,83	1,69	-	4,62	4,03
8	2,38	3,42	3,48	1,81	1,68	-	4,21	3,46
5	2,85	4,85	3,65	2,44	1,68	2,90	5,77	5,39
4	2,58	3,36	3,40	1,80	1,68	-	4,18	3,54
1E	1,74	4,56	3,62	1,83	1,67	-	4,76	3,76
Sistema 3								
10	-	2,42	2,42	1,71	-	2,48	5,19	4,67
9E	-	1,88	2,61	1,74	-	-	4,89	4,58
8	-	1,83	2,60	1,72	-	-	4,28	3,97
5	-	2,74	2,94	1,72	-	2,79	5,77	5,35
4	-	1,84	2,62	1,74	-	-	4,60	4,36
1E	-	1,84	2,59	1,74	-	-	4,51	4,95

*valores em Å

Através das reações modeladas, o efeito relativo dos substituintes R e X dos inibidores propostos pode ser avaliado nas etapas envolvidas no processo de inibição. Na segunda etapa do mecanismo reacional (sistema 2 para 3 da Figura 11), a adição da serina desprotonada leva à formação do aduto pentacoordenado, fazendo com que um fosforamidato neutro transforme-se um intermediário negativamente carregado. Grupos X com propriedades estabilizadoras de cargas negativas, como propriedades retiradoras de elétrons por ressonância e efeito indutivo, seriam favoráveis. É o caso do substituinte das estruturas **5** e **10**; esse substituinte poderia colocar, por ressonância, uma carga positiva no nitrogênio ligado ao fósforo que, por efeitos indutivo e de campo, ajudaria a estabilizar o átomo de oxigênio que adquiriu a carga negativa após a adição do ânion do resíduo Ser200 ao átomo P, fazendo o ΔH_{r2} ser mais negativo.

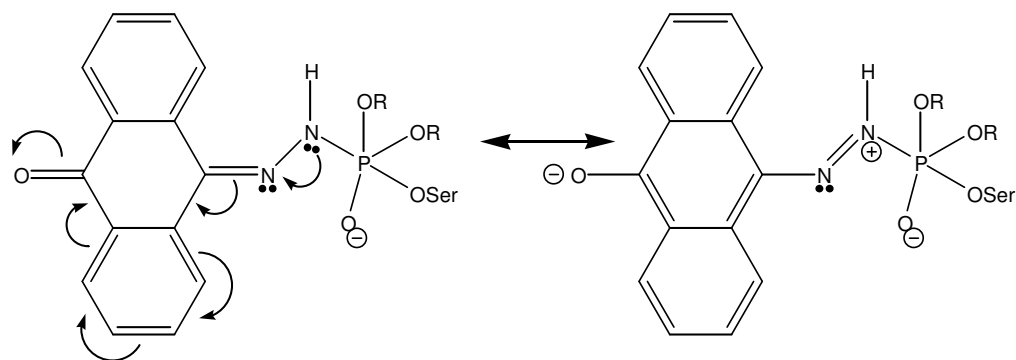


Figura 11. Exemplos de estruturas de ressonância do intermediário com o grupo retirador de elétrons.

Os fosforamidatos analisados se encontram localizados no sitio da AChE próximos de uma cavidade formada pelos aminoácidos Trp84, Phe331 e His440 (Figura 12) . Logo, os compostos com substituintes aromáticos **5** e **10** podem formar interação do tipo empilhamento π e T com as cadeias laterais dos aminoácidos da cavidade, contribuindo para uma entalpia mais negativa, em cada etapa do mecanismo, como é demonstrado na tabela 3 e 4 pelos valores de ΔH_r de cada etapa. Na Tabela 5 podem ser observadas algumas distâncias intermoleculares dos sistemas 2 e 3, onde os compostos citados apresentam distâncias adequadas para esse tipo de interação com os aminoácidos da cavidade.

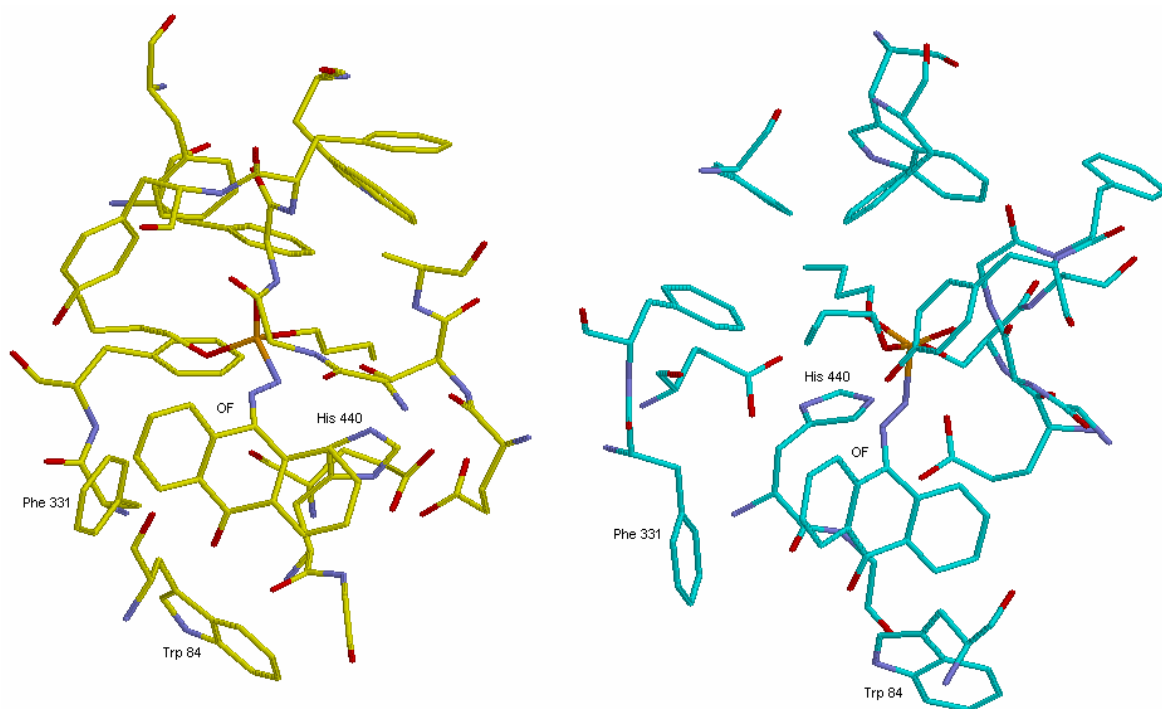


Figura 12. Interação de empilhamento da estrutura 10 no sistema 2 (carbonos em amarelo) e no sistema 3 (carbonos em ciano), na cavidade formada pelos aminoácidos Trp84, Phe331 e His440. Átomos de N em azul, átomos de O em vermelho, átomos de P em laranja; os átomos de H foram omitidos para maior clareza.

Além disso, os fosforamidatos **5** e **10** possuem em comum uma carbonila que faz uma ligação hidrogênio com o grupo NH indólico do resíduo Trp84. Com a mudança do estado tetraédrico para pentacoordenado houve uma diminuição da distância das ligações hidrogênio, que passou de 2,90 Å para 2,49 Å no complexo com a estrutura **5** e de 2,84 Å para 2,48 Å no complexo com a estrutura **10**, indicando uma estabilização extra na conversão entre os sistemas 2 e 3.

Grupos polarizáveis podem gerar dipolos que têm efeito estabilizador sobre sítios carregados, tanto positivos como negativos, dependendo da direção da polarização. Isso poderia explicar porque a série com o grupo R mais volumoso, o grupo butil, apresenta valores de ΔH_{r2} mais negativos, em geral. Esse grupo é um pouco mais polarizável do que o grupo iso-propil, criando um efeito de campo mais favorável, que ajuda a estabilizar a carga adquirida pelo aduto. Logo, a molécula do aduto pentacoordenado, qualquer que seja o

substituinte X, ganha uma maior estabilidade quando o grupo R é butil, o que é confirmado pelos valores de ΔH_{r2} da série com esse substituinte.

Para a terceira etapa do mecanismo (sistema 3 para 4), os valores de ΔH_{r3} são menos favoráveis, em geral, mas a mesma tendência pode ser observada para o efeito do grupo X sobre o valor de ΔH_{r2} , ou seja, grupos com capacidade estabilizadora de cargas negativas favorecem a reação. Isso é claro para as estruturas **5** e **10**, já que o substituinte agora pode entrar em ressonância direta com a carga negativa do grupo de saída (Figura 13). Além disso, a ligação hidrogênio com o grupo NH indólico do resíduo Trp84 pode ser um fator adicional para estabilização da carga negativa do grupo de saída.

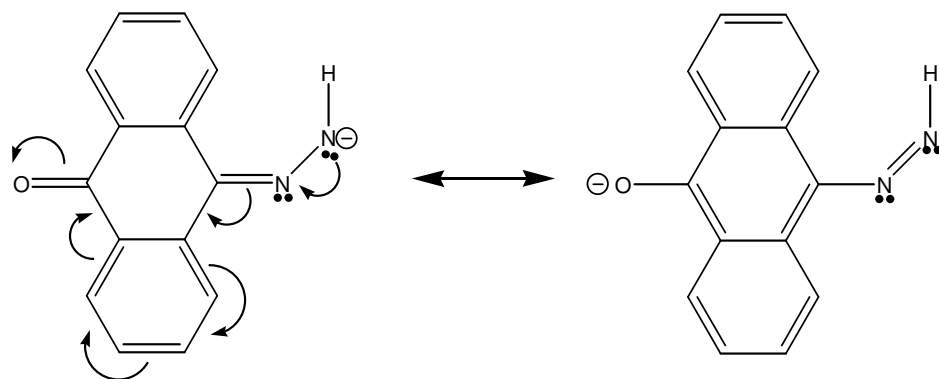


Figura 13. Estruturas de ressonância para o grupo de saída com substituinte retirador de elétrons presente nas estruturas 5 e 10.

As estruturas otimizadas contendo os isômeros **9E** e **9Z** mostram significativa diferença devido ao afastamento do seu grupo de saída, como mostra a figura 16. O grupo de saída da molécula **9Z** participa de interações favoráveis com as nuvens π polarizáveis dos aminoácidos Trp84, Phe331 e His440, que deve contribuir para um ΔH_{r3} mais negativo. Já o grupo de saída da molécula **9E** esta fora dessa cavidade de interação, resultando em um ΔH_{r3} menos negativo, como pode se observar na tabela 5.

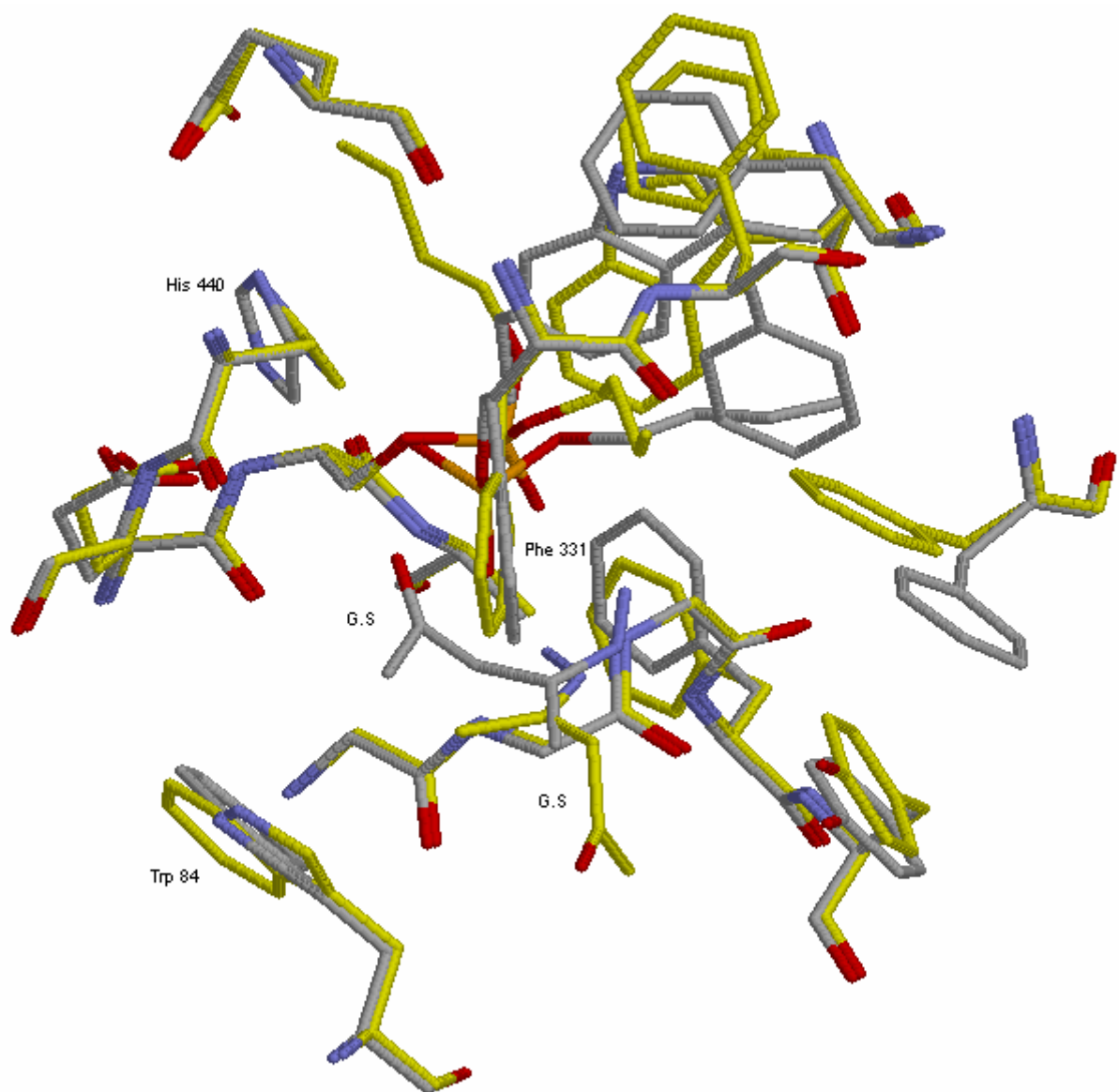


Figura 14. Sobreposição dos sistemas 4 otimizados contendo os isômeros do composto 9 (carbonos em amarelo, 9E e carbonos em cinza, 9Z). GS indica o grupo de saída. Átomos de N em azul, átomos de O em vermelho, átomos de P em laranja; os átomos de H foram omitidos para maior clareza.

Conforme apresentado nos objetivos, os fosforamidatos foram testados *in vitro* pela aluna de mestrado Aline Figueira Lira, orientada pelo professor Dr. Victor M. Rumjanek, na UFRRJ, em quatro concentrações diferentes (Tabela 2).

A soma dos valores de entalpia calculada de cada etapa do mecanismo ($\Delta H_r = \Delta H_{r1} + \Delta H_{r2} + \Delta H_{r3} + \Delta H_{r4}$) mostra que a reação de fosforilação do resíduo Ser200 é entalpicamente favorável apenas para algumas moléculas. O composto **1** é inativo, mesmo na alta concentração de 40 mM, o que concorda com o resultado teórico de ΔH_r , o mais positivo da série estudada para ambos os isômeros.

A atividade dos organofosforados se deve a mistura dos isômeros E e Z. O fosforamidato mais ativo é o composto **9**; na concentração de 2 mM, o composto **9** causou inibição enzimática de 80,00%, que chegou a praticamente 100% na concentração de 10 mM. O controle apresentou uma inibição de apenas 42% nessa concentração, sendo desta forma um inibidor mais fraco do que **9**. Esse resultado está só qualitativamente de acordo com os dados teóricos, pois o valor de ΔH_r do composto **9** (isômero Z), apesar de favorável, é menos negativo do que dos compostos **5** e **10**, logo sendo um inibidor previsto como menos efetivo pelo modelo reacional. Contudo, os compostos **5** e **10** só se solubilizaram com dificuldade, o que pode ter tido influência nas suas atividades determinadas experimentalmente. Devido à baixa solubilidade e também à sua coloração amarela, só foi possível determinar a percentagem de inibição de **10** e **5** em concentração bem baixa, pois o aumento de sua concentração interfere com o resultado do método usado para determinar a atividade, o método de Ellman.

No método de Ellman, a AChE tem como função catalisar a reação descrita na figura 15; quando a enzima é inibida, o resultado é a diminuição da formação de produto tiocolina e, conseqüentemente, do produto da reação com o DTNB, ácido 2-nitro-4-tiobenzóico, um composto amarelo. Neste método estamos medindo a absorvância final do produto; se temos um inibidor esta absorvância deve diminuir, isto é, a coloração amarela deveria ficar menos intensa. Logo, um inibidor amarelo poderia interferir no resultado, indicando uma atividade menor do que a real.

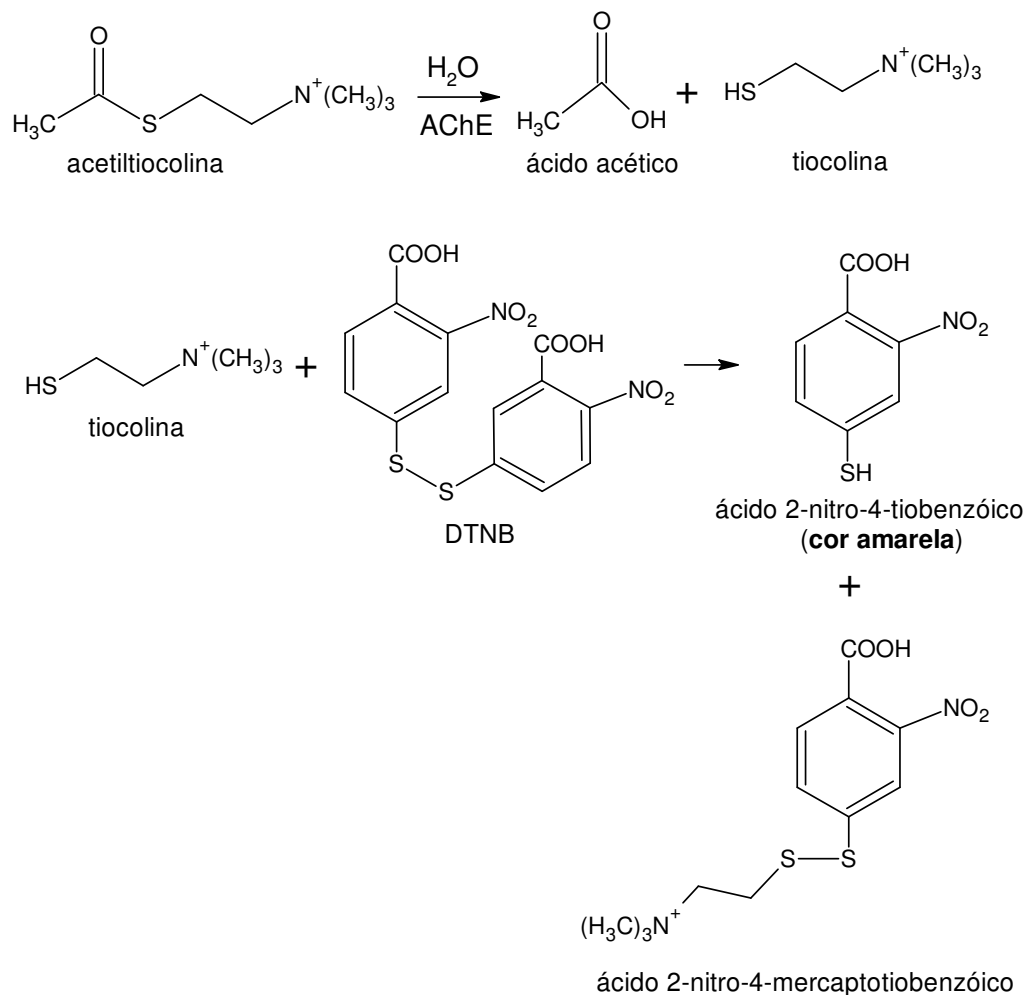


Figura 15. Reações envolvidas no método de Ellman.

Os compostos **2**, **6**, **7** e **8** possuem alguma atividade, mesmo na concentração mais baixa, 2 mM. Contudo, os resultados teóricos mostram esses compostos com uma entalpia de reação positiva, o que indicaria baixa ou nenhuma atividade. Isso sugere que esses compostos poderiam atuar com um outro mecanismo de inibição.

Como os compostos que apresentam valores de ΔH_r positivos são capazes de inibir a enzima, é possível que esses fosforamidatos interajam com outro sítio na AChE, como acontece com alguns inibidores reversíveis, sem de fato reagirem com a enzima. Por isso, foi avaliada a interação destes fosforamidatos no sítio onde interage a pentileno-bis-tacrina (PBT), para efeito de comparação com a reação no sítio ativo da enzima. Na Tabela 6 são apresentados os valores da entalpia de interação dos fosforamidatos nesse sítio. Como referência, foi determinada a entalpia de interação da PBT no mesmo sítio.

Tabela 6. Entalpias de interação (ΔH_{int}) calculadas para os fosforamidatos e para a PBT no sítio ocupado pela PBT.

Estrutura	ΔH_{int}^*
1E	-5,25
1Z	-5,75
2E	-12,82
2Z	-3,19
3E	-7,74
3Z	-3,61
4	-7,73
5	-2,51
6E	-6,95
6Z	-4,83
7E	-9,75
7Z	-7,03
8	-10,32
9E	-4,87
9Z	-5,52
10	-0,48
PBT	-14,32

$$*\Delta H_{\text{int}} = \Delta H_{\text{complexo}} - (\Delta H_{\text{ligante}} + \Delta H_{\text{sítio}}), \text{ em kcal/mol}$$

Os resultados mostram que, dentre todas as moléculas analisadas, a PBT é a que tem a interação mais favorável entalpicamente (ΔH_{int} mais negativo). A PBT apresenta uma forte interação de empilhamento π com os aminoácidos Trp 84 e Phe 330 e com os aminoácidos Trp 279 e Tyr 70, responsável pela inibição mais efetiva da enzima (Figura 16).

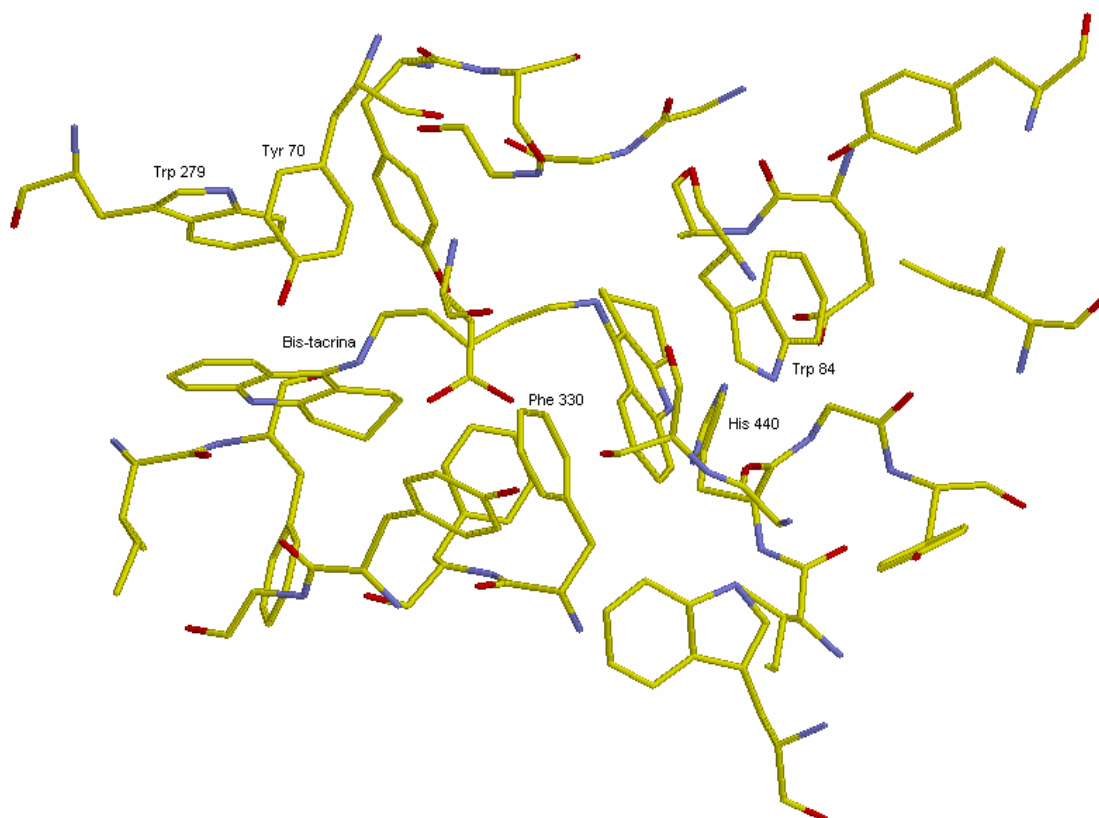


Figura 16. Interações da pentileno-bis-tacrina com os aminoácidos Trp 84, Trp 279, Phe330, His440, Tyr70. Átomos de C em amarelo, átomo de N em azul, átomos de O em vermelho, átomos de P em laranja; os átomos de H foram omitidos para maior clareza.

Todos os fosforamidatos analisados também interagem favoravelmente, possuindo um ΔH_{int} de interação negativo. A interação é menos favorável do que com a PBT, porque os fosforamidatos interagem mais efetivamente com os aminoácidos do CAS Trp 84 e Phe 330 e não tão bem com os aminoácidos do PAS, pois as moléculas são menores que a PBT, como pode ser observado na figura 17.

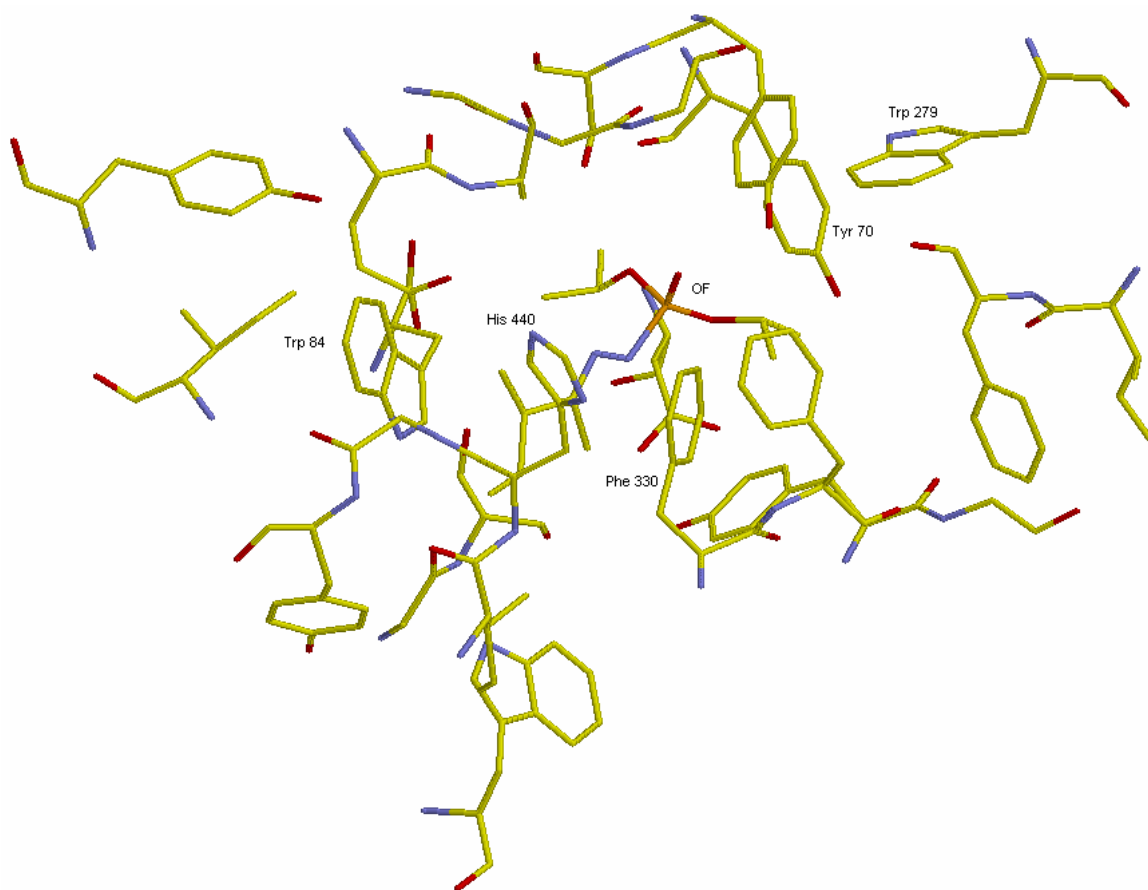


Figura 17. Fosforoamidato 2E otimizado no sítio da PBT, com os principais aminoácidos responsáveis pela inibição destacados.

Tentativas de correlacionar os dados de atividade com cada conjunto de dados teóricos (ΔH_{int} e ΔH_r) não foram bem sucedidas, o que sugere que podem haver compostos que atuam por mecanismos diferenciados. Analisando os resultados de ΔH_{int} , podemos observar que os fosforamidatos **2E**, **8** e **7E** têm boas interações, próximas da calculada para a PBT. Isso poderia explicar porque esses compostos inibem em certo grau a AChE. Já a estrutura mais ativa, **9** possui um valor de ΔH_{int} no sítio da PBT semelhante à da estrutura **1**, inativa. A estrutura **10** também tem um valor de ΔH_{int} menos favorável que o de ΔH_r . Esses resultados sugerem que as estruturas **9** e **10** devem de fato reagir com a enzima no sítio catalítico.

6. CONCLUSÕES

Na primeira parte do estudo, concluímos, através do modelo reacional do perfil inibitório proposto sobre a enzima acetilcolinaesterase, que os compostos **5**, **9** (principalmente o isômero Z) e **10** são prováveis inibidores desta enzima, pelo menos nas condições do modelo, pois apresentam uma entalpia resultante de fosforilação mais favorável em relação aos outros compostos avaliados. Isto é um indicativo de que esses novos compostos têm potencial atividade inseticida. Os resultados experimentais obtidos por nosso grupo mostram que o composto **10** e, principalmente, o composto **9** têm atividade inibitória sobre a AChE nas concentrações mais baixas avaliadas (2 mM e 4 mM). O composto **9** causou quase 100% de inibição na concentração de 10 mM, mas o composto **10** apresentou problemas de solubilidade e não pode ser avaliado em concentrações além de 4 mM.

As entalpias das várias etapas do mecanismo são em geral mais favoráveis quando o grupo alcóxi ligado ao fósforo tem cadeia carbônica mais longa, o que deve ser resultado do efeito estabilizador da nuvem eletrônica desse grupo, maior e mais polarizável, sobre a carga próxima. Esse efeito é típico em reações em fase gasosa e pode ter reflexo nas reações em solução, onde o efeito do solvente também é importante.

Para a etapa de afastamento do grupo de saída, os grupos retiradores de elétrons são favoráveis, visto que eles distribuem a carga negativa do grupo liberado, estabilizando-a e fazendo a entalpia da etapa do mecanismo ser mais negativa.

Na segunda parte do estudo, concluímos, que os compostos **2** (isômero E), **7** (isômero E) e **8** tem entalpias de interação no sítio da AChE ocupado pelo inibidor reversível PBT próximas do valor da própria PBT. Na concentração mais baixa avaliada experimentalmente (2 mM) por nosso grupo, além dos compostos **9** e **10**, os compostos **2**, **7** e **8** estão entre os mais ativos. O composto **2** aumentou a inibição até a concentração de 20 mM, mas os compostos **7** e **8** apresentaram problemas de solubilidade. Esses compostos não apresentaram valores favoráveis para a entalpia de fosforilação da serina do sítio ativo (primeira parte do estudo). Esses resultados sugerem que os compostos avaliados podem apresentar mecanismos diferentes de inibição da AChE.

Concluimos que os compostos **2**, **7** e **8** devem inibir a enzima AChE pelo mecanismo de interação no sítio da AChE ocupado pelo inibidor reversível PBT, interagindo mais efetivamente com os aminoácidos do CAS Trp 84 e Phe 330 e não tão bem com os aminoácidos do PAS, pois as moléculas são menores que a PBT. As estruturas **9** e **10** devem atuar pelo mecanismo de inibição reacional tradicional no sítio da AChE ocupado pela ACh.

7. PERSPECTIVAS

Avaliar outros modos de interação dos fosforamidatos na AChE através do uso da metodologia de atracamento molecular, seguida de cálculos semiempíricos para avaliar a entalpia de interação para estes modos.

Incluir o efeito do solvente nos cálculos semiempíricos para ter uma melhor aproximação do sistema experimental.

Propor modificações estruturais baseadas nas estruturas modeladas buscando a melhoria do perfil de inibição da AChE.

8. BIBLIOGRAFIA

- ALLINGER, N. L. J. **Am. Chem. Soc.** v. 99, p. 8127, 1977.
- ATKINS, P. W.; FRIEDMAN, R. S. **Molecular quantum mechanics**. 3. ed. Oxford University Press, Oxford, 1997.
- BARON, R.L. Carbamate Insecticides. In: Hayes, W.R., Laws, E.R.. **Handbook of Pesticide Toxicology**. San Diego, California, USA. Academic Press, Inc., v. 3, p.1125-1190, 1991.
- BENCURA, A.; ENYEDY, I. KOVACH, I.M. Origins and diversity of the aging reaction in phosphonate adducts of serine hydrolase enzymes: what characteristics of the active site do they probe? **Biochemistry**, v. 34, p. 8989- 8999, 1995.
- BOOKS, B. R.; BRUCCOLERI, R.E. et. al. **J. Comput. Chem.** v. 4, p. 187 – 217, 1983.
- BRASIL. Lei n. 7602- 11 jul. 1989: Lei dos Agrotóxicos. Brasília: IBAMA, 1990.
- CARLIER, P. R.; HAN, Y. F.; CHOW, E. S.; LI, C. P.; WANG, H.; LIEU, T. X.; WONG, H. S.; PANG, Y. P. Evaluation of short-tether bis-THA AChE inhibitors. A further test of the dual binding site hypothesis. **Bioorg. Med. Chem.** v. 7, p. 351-357, 1999.
- CASIDA, J. E. e QUISTAD, G. B. Serine hydrolase targets of organophosphorus toxicants. **Chemico-Biological Interactions**, U.S.A, v. 157–158, p. 277–283, 2005.
- CASTRO, A. T. Estudo por modelagem molecular da reativação da acetilcolinesterase inibida por agentes químicos neurológicos. 121 f. Dissertação (mestrado em área envolvida) – IME, Rio de Janeiro, 2002.
- KLOCHER, J. A.; Hu, M. Y.; Chiu, S. F.; Kubo, I.; **Phytochemistry**, v. 30, p. 1800, 1991.
- DEWAR, M. J. S.; THIEL, W. Ground state of molecules. 38. The MNDO Method. Approximations and Parameters. **J. Am. Chemical Soc.** v. 99, p. 4899-4907, 1977-a.
- DEWAR, M. J. S.; ZOEBISCH, E. G.; HEALY, E. F.; STEWART, J. J. P. AM1: A new general purpose quantum mechanical model. **J. Am Chem Soc**; v. 107, p. 3902 – 3909p, 1985.

CYGLER, M.; SCHRAG, I.D.; SUSSMAN, J.L.; HAREL, M., SILMAN, I.; GENTRY, M.K.; DOSTOR, B.P. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. **Protein Science**. v. 2 (3), p. 366-382, 1993.

FLETCHER, R. “**Practical methods of optimization**”, John Wiley e Sons, New York, 1980.

FORD, M. Insecticides and Pesticides. In Viccellio, P. **Handbook of Medical Toxicology**, 1a ed. USA. Little, Brown and Company. p. 303-314, 1993.

FORLENZA, O.V. Tratamento farmacológico da doença de alzheimer. **Rev. Psiq. Clin.** v. 32 (3), p. 137-148, 2005.

GANDIA, L.; ROJO, J.; GONZALES-RUBIO, J.M.; PASCUAL, R.; HERNÁNDESGUIJO, J.M. Diana terapéuticas colinérgica en la enfermedad de alzheimer. www.imsersomayores.csic.es/documentos/documentos/farmaindustria-fronteras-01.pdf –

GILL, P. E.; MURRAY, W. e WRIGHT, M.H. “**Practical optimization**”, Academic press, Inc., New York, 1981.

GOMES, A.M.; KOSZUOSKI, R. Evidências atuais do impacto terapêutico dos inibidores da acetilcolinesterase no transtorno cognitivo leve e na demência vascular. **Rev. Psiq. RS**. v. 27 (2), p. 197-205, 2005.

HAREL, M.; SCHALK, I.; EHRET-SABATIER, L.; BOUET, F.; GOELDNER, M.; HIRTH, C.; AXELSEN, P.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. **Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.** v. 90, p. 9031-9035, 1993.

HEHRE, W.J.; JIANGUO, Y.; KLUNZINGER, P.E.; LIANG, L. A brief guide to molecular mechanism and quantum chemical calculations. Wavefunction, Inc Editora, 1998.

JEYARATNAM, J. e MARONI, M. Organophosphorous Componds. **Toxicology**, v. 91, p. 15-27, 1994.

- JORGENSEN, W. L.; TIRADORIVES, J., *J. Am. Chem. Soc.* v. 110, p. 1657- 1666, 1988.
- KATSUDA, Y. Development of and Future S Chemistry. *Pestic. Sci.* v. 55, p.782, 1999.
- LEACH, A. R. **Molecular Modeling Principles and Applications**. 2. ed. Pearson Education, England, 2001.
- LIRA, A. F. Dissertação de Mestrado (em preparação), 2009.
- LIMA, J.S. e PEREIRA, R.H.B. Intoxicação por organofosforados: Análise crítica e considerações especiais. **Rev. Bras. de Ter. Int.**, v. 8 (3), p. 100-101, 1996.
- MACHEMER, L. H. e PICKEL, M. Carbamates insecticides. *Toxicology*, v. 91, p. 29-36, 1994.
- MARCO, J.L.; Inibidores clásicos y nuevos inibidores de la acetilcolinesterasa para tratarla enfermedad de alzheimer. www.imsersomayores.csic.es/documentos/documentos/farmaindustria-fronteras-01.pdf –28/04/2009.
- MIDIO, A. F. e SILVA, E.S. Inseticidas-Acaricidas – Organofosforados e Carbamatos. São Paulo, Ed. Roca Ltda, 1995.
- MORAES, ACL, et al. Intoxicações Agudas por Pesticidas na Infância: Revisão Clínico-Terapêutica. In: I Congresso Internacional de Segurança na Infância e Adolescência Niterói, Rio de Janeiro, 1998. Anais, Niterói, 1998.
- MORGAN, D. P. Carbamate. International Healthcare Series – Poisindex. Micromedex. Colorado, United States of America. v. 95, disc A , 1998.
- MORGON, N.H.; COUTINHO, K. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**. 1º Edição. Editora livraria da Física. p. 29-63, 2007.
- MORTENSEN, M. L. Management of Acute Childhood Poisonings Caused by Selected Insecticides and Herbicides. **Ped. Clin. of N. Am.**, v. 33 (2), p. 421-432, 1986.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. ; **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3º Edição. Editora Ltda, Brasil. 2002.

- PANG, Y.-P.; KOZIKOWSKI, A. Prediction of the binding sites of huperzine A in acetylcholinesterase by docking studies. **J. Comput. aided Mol. Des.** v. 8, p. 669-681, 1994.
- PANG, Y.-P.; QUIRAM, P.; JELACIC, T.; HONG, F.; BRIMIJOIN, S. Highly potent, selective, and low cost bis-tetrahydroaminacrine inhibitors of acetylcholinesterase. **J. Biol. Chem.** v. 271, p. 23646-23649, 1996.
- PAULINO, S. R. A Indústria de Pesticidas Agrícolas no Brasil: Dinâmica Inovativa e Demandas Ambientais. Campinas, I. E./Unicamp, Tese de Mestrado, p.59, 1993.
- POPLE, J.A.; SEGAL, G.A. Approximate self-consistent molecular orbital theory. II. Calculations with complete neglect of differential overlap. **J. Chem. Phys.** v. 43, p. S136-S149, 1965.
- RYDBERG, E.H.; BRUMSHTEIN, B.; GREENBLATT, H.M.; WONG, D.M.; SHAYA, D.; WILLIAMS, L.D.; CARLIER, P.R.; PANG, Y.-P.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J.L. Complexes of Alkylene-Linked Tacrine Dimers with *Torpedo californica* Acetylcholinesterase: Binding of Bis(5)-tacrine Produces a Dramatic Rearrangement in the Active-Site Gorge. **J. Méd. Chem.** v. 49 (18), p. 5491-5500, 2006.
- SANTOS, R. Síntese, modelagem molecular e valiação da atividade inseticida de novos piretróides do tipo éter de oxima. 2006. Dissertação de Mestrado. UFRRJ.
- SANTOS, V.M.R.; DONNICI, C.L.; DACOSTA, J.B.N.; CAXEIRO, J.M.R. Compostos Oroganofosforados Pentavalentes: Histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Quím. Nova.** v.30, n. 1, p. 159-179, 2007.
- SCHNEIDER, M.O.; MORAGAS, W.M. Biocidas: Suas Propriedade e Histórico no Brasil. **Caminhos da Geografia**, v. 3, n. 10, p. 26-46, 2003.
- SHAFFERMAN, A.; BARAK, D.; KAPLAN, D.; ORDENTLICH, A.; KRONMAN, C.; VELAN, B. Functional requirements for the optimal catalytic configuration of the AChE active center. **Chemico-Biological Interaction**, v.157 (158), p. 123-131, 2005.

- SILMAN, I. E SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 5, p. 293–302, 20, 2005;
- SILVA, R. H. S. C. Estudo Teórico do Mecanismo Da Reação Entre a Glutathione e o Organofosforado Diclorvos Catalisada por Uma Glutathione S-Transferase de *Musca Domestica* 2005. Monografia de Graduação – UFRRJ, Rio de Janeiro, 2005a
- SILVA, G. R. Estudo da reativação da acetilcolinesterase inibida por organofosforados: análise conformacional da molécula de HI-6 e simulação da reação de desfosforilação. 2005. Dissertação de Mestrado – IME, Rio de Janeiro, 2005b
- SINDAG (Sindicato das Indústrias de Defensivos Agrícolas), Perfil do Setor de Defensivos Agrícolas no Brasil. São Paulo, Dez/2008, p.3.
- SOARES, L.F. Intoxicações Agudas por Carbamatos em Pediatria. Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Terapêuticos. Rio de Janeiro, 1998. [Monografia do Curso de Especialização em Pediatria da UFF].
- SOUSA, S.C.A.; REBELO, M.J.F. Acetylcholinesterase – Choline Oxidase Biosensor for Pirimicarb Determination. **Portugaliae Electrochimica Acta**, v. 26, p. 65-75, 2008.
- SOREQ, H.; BEN-AZIZ, R.; PRODY, C.A.; SEIDMAN, S.; GNATT, A.; NEVILLE, L.; LIEMAN-HURWITZ, J.; LEV-LEHMAN, E.; GINZBERG, D.; LIPIDOT-LIFSON, Y. Molecular cloning and construction of the coding region for human acetylcholinesterase reveals a G + C-rich attenuating structure. Proceedings of the Nacional Academy of Science. USA, v. 87, p. 9688-92, 1990.
- STEWART, J.J.P. Optimization of parameters for semi-empirical methods. I. Method. **J Comput Chem.**, v. 10, p. 209-220, 1989-a.
- STEWART, J.J.P. Optimization of parameters for semi-empirical methods. II. Application. **J Comput Chem.**, v. 10, p. 221-264, 1989-b.
- STEWART, J.J.P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. **J. Mol. Model.** v. 13, p.1173–1213, 2007.
- STINE, K.E.; BROWN, T.M. Principles of Toxicology, CRC Press, 1996.

SUSSMAN, J.L.; HAREL, M.; PROLOW, F.; OEFNER, C.; GOLDMAN, A.; TOKER, L.; SILMAN, I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, v. 253, p. 872-879, 1991.

TAYLOR, P. The cholinesterase **J. Biol. Chem.** v. 266 (7), p. 4025-4028, 1991.

TAYLOR, P.; RADIC, Z. The Cholinesterase: From Genes to Proteins. *Annual Review Pharmacology and Toxicology*. v. 34, p. 281-320, 1994.

THIEL, W.; VOITYUK, A.A. Extension of MNDO to d orbitals: Parameters and results for Silicon. *J Molecular Structure (Theochem)*, v. 313, p. 141-154, 1994.

WEINER, S.J.; KOLLMAN, P. A. et al. **J. Am. Chem. Soc.** v. 106, p. 765 – 784, 1984.

WHEELER, W. Role of Research and Regulation in 50 Years of Pest Management in Agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4151–4155, 2002.

<http://academic.scranton.edu/faculty/CANNM1/toxicology/toxicologymoduleport.html>)
29/04/2009.

<http://www.aged.ma.gov.br/2009/1/21/Pagina245.htm> 30/04/2009.

<http://www.clicrbs.com.br/canalrural>, 2009) 28/04/2009.

http://www.pdamed.com.br/diciomed/pdamed_0001_15547.php) 29/04/2009.