



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



**“DOCKING MOLECULAR E INTERAÇÕES NÃO-COVALENTES DE
COMPOSTOS ORIGINAIS DERIVADOS DE 2-ARIL-OXAZOLINAS EM
ENZIMAS DE CANDIDA SPP.”**

RUI FILIPE NOGUEIRA DA SILVA*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadores:

Profa. Dra. Ignez Caracelli

Prof. Dr. Julio Zukerman-Schpector

* bolsista CAPES-1543561

**São Carlos – SP
2019**

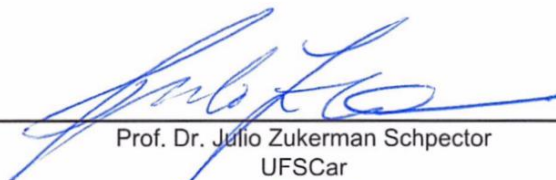


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

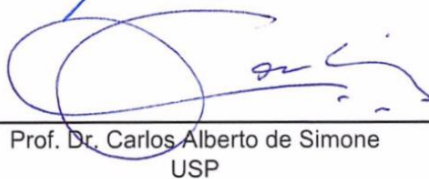
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Rui Filipe Nogueira da Silva, realizada em 23/08/2019:



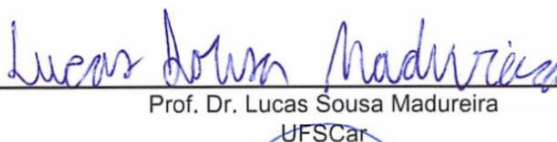
Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector
UFSCar



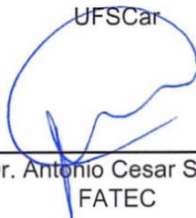
Prof. Dr. Carlos Alberto de Simone
USP



Prof. Dr. Fernando Luis Barroso Silva
USP



Prof. Dr. Lucas Sousa Madureira
UFSCar



Prof. Dr. Antonio Cesar Silva Sacco
FATEC

DEDICATÓRIA

À minha fabulosa esposa, que amo e que, incansavelmente, me ensina a ser uma pessoa melhor, um profissional mais assertivo e um marido singularmente especial. Sem ela nunca teria iniciado metade das caminhadas da minha vida.

Aos meus pais, Etelvina e José, que, na sua simplicidade, me ensinaram a fazer perguntas e a procurar as respostas.

À minha querida irmã Sandra, que, como eu, nunca desistiu de superar e renovar os desafios.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me facultou os dons que precisei para cumprir os objetivos de mais um episódio da minha história.

À Professora Ignez e ao Professor Julio, que, como mãe e pai científicos, me acolheram na sua família e me ensinaram a procurar as perguntas e a questionar as respostas.

Aos colegas e amigos do BioMat e do LaCrEMM, em especial à Stella e à Majo, pelas horas de aprendizagem e partilha, pelo maravilhoso ambiente de trabalho que criámos e pelos debates filosóficos que me enriqueceram e deixarão saudade.

À CAPES, pela bolsa que permitiu a realização dos trabalhos e a minha manutenção.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

“I never lose. Either I win or I learn.”

Nelson Mandela

Silva RFN. Docking molecular e interações não-covalentes de compostos originais derivados de 2-aril-oxazolininas em enzimas de *Candida spp.* [tese]. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos; 2019.

RESUMO

A candidíase é uma micose causada por fungos do gênero *Candida spp.* e afeta até 50% da população mundial, podendo evoluir para candidemia e causar a morte em até metade dos pacientes. Os fármacos comerciais usados no seu tratamento pertencem a três famílias, existem há cerca de meio século e alvejam apenas dois componentes celulares do fungo, a membrana celular e a parede celular. Na última década, foram identificadas novas espécies de *Candida* que manifestam resistência a um ou vários desses fármacos tradicionais, o que torna urgente a necessidade de encontrar novos fármacos que atuem em vias metabólicas do fungo. Visando enfrentar este problema o grupo do Prof. Helio A. Stefani da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP sintetizou 26 compostos derivados de 2-aril-oxazolinina realizando estudos biológicos em cinco espécies de fungos do gênero *Candida*, obtendo os valores de MIC₅₀. Neste trabalho, utilizaram-se métodos *in silico* para identificar um alvo molecular para os 26 compostos em *Candida spp.* e caracterizar as interações que podem ser responsáveis pelos MIC₅₀ encontrados. Para isso, foram modelados os 26 ligantes e realizados experimentos de docking molecular nas enzimas diidrofolato redutase de *Candida albicans* e lanosterol 14- α -demetilase de *Candida glabrata*. As principais interações não-covalentes dos 26 ligantes com as proteínas foram monitoradas e caracterizadas, especialmente no caso das interações com a diidrofolato redutase de *Candida albicans*. Várias destas interações são descritas neste trabalho, incluindo uma importante interação dos haletos dos ligantes com o resíduo de ácido glutâmico 32 desta enzima e as interações dos ligantes com o loop tirosina 21-leucina 29, nomeadamente interações CH... π com o resíduo de metionina 25. Com estas análises, obteve-se uma relação dos experimentos *in silico* com os resultados obtidos nos ensaios *in vitro*. A análise dos resultados de docking e das interações não-covalentes ligantes-proteína permitiu apontar a diidrofolato redutase como um novo potencial alvo dos compostos derivados de oxazolinina em *Candida albicans*.

PALAVRAS-CHAVE: Candidíase. Aril-oxazolininas. Docking molecular. Interações não-covalentes. GOLD. NCI PLOT. Diidrofolato redutase.

Silva RFN. Molecular docking and non-covalent interactions of original 2-aryl-oxazoline derived compounds in *Candida spp.* enzymes [thesis]. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos; 2019.

ABSTRACT

Candidiasis is a mycosis caused by fungi of the genus *Candida spp.* It affects up to 50% of the world's population and may progress to candidaemia, leading to death in up to a half of patients. Commercial drugs used in its treatment belong to three families, exist for about half a century and target only two cellular components of the fungus, the cell membrane and the cell wall. In the last decade, reports of new *Candida* species resistant to one or more of these traditional drugs make urgent the need to find new drugs, specially targeting new fungal metabolic pathways. In order to face this problem, the research group of Prof. Helio A. Stefani from USP's Faculty of Pharmaceutical Sciences synthesized 26 compounds derived from 2-aryl-oxazoline, carrying out biological studies on five species of fungi of the genus *Candida*, obtaining the MIC₅₀ values. In this work, the use of *in silico* methods envisioned the identification of a molecular target for the 2-aryl oxazoline compounds in *Candida spp.* and the characterization of the interactions that may be responsible for the MIC₅₀ values. Therefore, molecular docking experiments were carried out with the 26 modeled ligands on the enzymes dihydrofolate reductase from *Candida albicans* and lanosterol 14- α -demethylase from *Candida glabrata*. The monitoring and the characterization of the main non-covalent interactions of the 26 ligands with the proteins, specifically the *Candida albicans* dihydrofolate reductase, pointed an important interaction of the substituent halides with the enzyme's glutamic acid 32 residue, and the interaction of the ligands with the tyrosine 21-leucine 29 protein loop, namely CH... π interactions with methionine 25 residue. The reported interactions supported the correlation of the *in silico* experiments with the results of the biological assays. Analysis of the docking results and the non-covalent protein-ligand interactions allowed the branding of dihydrofolate reductase as a potential target of oxazoline-derived compounds in *Candida albicans*.

KEYWORDS: Candidiasis. Aryl-oxazolines. Molecular docking. Non-covalent interactions. GOLD. NCI PLOT. Dihydrofolate reductase.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Principais órgãos do corpo humano afetados por candidíase sistêmica. A seta vermelha representa os órgãos onde a candidíase é mais frequentemente diagnosticada. 2
- Figura 2 – Representação de uma levedura do gênero *Candida* e das respectivas estruturas celulares. 5
- Figura 3 – Esquema do método de docking molecular. Um ligante forma um complexo com uma proteína, realizando interações no sítio de ligação. 8
- Figura 4 – Esquema de operação de um algoritmo genético aplicado à população P1. As mutações correspondem a perturbações, como a rotação de um ângulo diedro, e o crossover à combinação de várias poses. Em cada etapa (*step*), as poses menos *fit* recebem mutações e crossover formando-se uma nova população. As etapas repetem-se até atingir a convergência nas poses, ou após um número predeterminado de gerações. 9
- Figura 5 – Descritores geométricos de uma ligação de hidrogênio (HB): d_1 – distância da ligação D-H; d_2 – distância da HB (H-A); d_3 – distância D-A; Φ – ângulo entre D-H e H-A. H = átomo de hidrogênio; A – átomo aceptor da HB; D – átomo doador do hidrogênio para a HB. Raios de van der Waals de cada átomo representados em sobra cinzenta. 10
- Figura 6 – Três principais classificações de interações entre sistemas π : **a)** em paralelo; **b)** paralelamente deslocados; **c)** em forma de T. 11
- Figura 7 – Representação das interações π do tipo D-H... π (com D = Oxigênio) de acordo com a direcionalidade: **i-** deslocalizada; **ii-** semi-localizada; **iii-** localizada. 12

Figura 8	–	Representação do benzeno (esquerda) e da topologia 2D da densidade eletrônica (direita) entre os átomos delineados a cor-de-rosa. O ponto verde corresponde a um mínimo local no centroide do anel aromático. Os traços vermelhos correspondem a máximos locais, sobre os núcleos dos átomos. O traço amarelo corresponde a um ponto de sela entre os átomos de carbono.	14
Figura 9		Representação das estruturas tridimensionais das proteínas com os ligantes cristalográficos: a) lanosterol 14- α -demetilase de <i>C. glabrata</i> (PDB-ID 5JLC); b) diidrofolato redutase de <i>C. albicans</i> (PDB-ID 4H96). No respetivo sítio de ligação encontram-se os inibidores coloridos a amarelo (a) 1YN e b) 14Q) e os grupos prostéticos coloridos a azul (a) HEM e b) NDP). Uma molécula de água representada em CPK, para referência e escala.	20
Figura 10		Estruturas 2D dos ligantes 1YN e 14Q.	20
Figura 11	–	Esquema de definição da cavidade onde o GOLD vai procurar interações do ligante com a proteína.	21
Figura 12	–	Resultados de redocking de 1YN em 5JLC (esquerda) e de 14Q em 4H96 (direita). Os inibidores na sua pose cristalográfica estão representados com os átomos de carbono em cor-de-rosa. As poses de redocking possuem os carbonos coloridos de preto. Os átomos de H foram omitidos.	23
Figura 13	–	Representação do esqueleto base das duas séries de compostos modelados: ao centro, o esqueleto oxazolina comum a ambas as séries; série 4/LZ à esquerda; série 9/CB à direita. As diferenças nas regiões A e C estão salientadas com círculos verdes e descritas no texto.	26

- Figura 14 – Representação 2D das estruturas dos ligantes da série 4/LZ. 27
Os ligantes estão ordenados de acordo com a substituição na região A, com os grupos substituintes salientados com círculos coloridos: *para*-substituídos em azul; *meta*-substituídos em amarelo; *orto*-substituídos em cinzento.
- Figura 15 – Representação 2D das estruturas dos ligantes da série 9/CB. 27
Os círculos verdes salientam a substituição na região A. Em cor-de-rosa salientam-se as diferentes regiões C. O ligante **10** é o único com substituinte diferente de cloro (bromo). O ligante **6** é o único sem anel oxazolina (região B).
- Figura 16 – Estruturas depositadas no CSD com os códigos JEMPLIZ (i) e 28
JEMLOF (ii). A estrutura JEMPLIZ corresponde ao composto **7** da série 9/CB e o JEMLOF é o enantiômero 4*R* do composto **9f** (4*S*).
- Figura 17 – Representação do complexo de código PDB 5JLC (a), do 29
inibidor 1YN (b) e do cofator grupo heme (c) (PDB-ID HEM). Os átomos de H foram omitidos.
- Figura 18 – Representação do complexo de código PDB 4H96 (a), do 29
inibidor 14Q (b) e da coenzima NADP (c) (PDB-ID NDP). Os átomos de H foram omitidos.
- Figura 19 – Posição relativa da região com os resíduos de aminoácidos 30
em falta na estrutura proteica de 5JLC (quadrados cor-de-rosa), em relação ao grupo heme (azul) e ao itraconazol (amarelo). As distâncias pontilhadas em preto (24.1 Å e 22.3 Å) evidenciam o afastamento desta região em falta para o átomo de Fe do grupo heme. Uma molécula de água representada para referência e escala.

- Figura 20 – Representação da interação O... π (linha tracejada verde) entre o NDP e o inibidor 14Q no complexo cristalográfico 4H96: $d = 3.4 \text{ \AA}$, $\theta = 113^\circ$. Os átomos de hidrogênio foram omitidos. 32
- Figura 21 – Ausência de um padrão de ligação dos compostos das séries 4/LZ (esquerda) e 9/CB (direita) na enzima lanosterol 14- α -demetilase (PDB-ID 5JLC). Os grupos substituintes estão salientados em “ball” para melhor visualização. Átomos de H omitidos. 34
- Figura 22 – Posição do resíduo M25 na cavidade de ligação e respectivo confômero M25' da cadeia lateral (com os átomos coloridos de azul claro), da estrutura de código PDB 4H96. Ligante 14Q com os átomos de carbono coloridos de cor-de-rosa. Ligante NDP com os átomos de carbono coloridos de cor-de-laranja. Átomos de hidrogênio omitidos. 35
- Figura 23 – Padrão de ligação das séries 4/LZ (carbonos em cor-de-rosa) e 9/CB (carbonos em amarelo pálido). Átomos de H omitidos. 36
- Figura 24 – Padrão de ligação obtido para os ligantes da série 4/LZ na enzima diidrofolato redutase (PDB-ID 4H96). Os grupos substituintes estão representados em “ball” para melhor visualização. NDP com carbonos em laranja. Átomos de H omitidos. 37
- Figura 25 – Superfície da cavidade do sítio ativo de 4H96 com o ligante **4g** (em cima) e esquemas de corte da cavidade com os bolsos **a** e **b** assinalados (em baixo à esquerda) e com as regiões A e B dos ligantes posicionadas no fundo da cavidade (em baixo à direita). A letra X marca as posições *meta*- e *para*-substituídas nos ligantes 4/LZ no sítio de ligação. 38

- Figura 26 – Distância entre os resíduos M25 e E32 da enzima diidrofolato redutase de *C. albicans* com o código PDB 4H96, medida nos átomos mais próximos. 39
- Figura 27 – Poses de docking dos compostos da série 4/LZ e tabela com os valores de MIC₅₀, salientando-se os ligantes **4g**, **4e** e **4j**. Grupos substituintes em “ball” para clareza de visualização. Átomos de H omitidos. A tabela está organizada pelos valores de MIC₅₀. 39
- Figura 28 – A linha tracejada representa a interação O(LP)...π entre o oxigênio da região nicotinamida de NDP e o sistema aromático dos ligantes mostrada para o ligante **4g** (esquerda) $d = 3.0 \text{ \AA}$, $\theta = 108^\circ$, e para o ligante **9i** (direita) $d = 3.3 \text{ \AA}$, $\theta = 136^\circ$. Átomos de H omitidos. 40
- Figura 29 – Ligações de hidrogênio (HB) que se estabelecem entre o grupo hidroxila da região A e resíduos de aminoácidos vizinhos. O tracejado verde representa as HB para o ligante **4g** (carbonos em azul). O tracejado roxo representa a HB para o ligante **9i** (carbonos em amarelo). Apenas as regiões A de **4g** e **9i** estão representadas. Átomos de H omitidos. 41
- Figura 30 – Vizinhança dos ligantes 4/LZ na região A *para*-substituída. A linha tracejada representa a região de interações de van der Waals dos grupos substituintes dos ligantes com a proteína. Átomos de H omitidos. 42
- Figura 31 – Interações entre a região A dos ligantes e os átomos OE1 e OE2 da cadeia lateral de Glu32. Em cima, os ligantes *para*-substituídos. Em baixo, os ligantes *meta*-substituídos. O átomo OE1 fica voltado para o bolso **b** da cavidade, enquanto OE2 fica voltado para o bolso **a**. 43

- Figura 32 – Isossuperfícies de interação dos ligantes 4/LZ com Glu32, representado com a cadeia lateral. Foram mantidas as orientações da cadeia lateral de Glu32, para facilidade de comparação das interações com os ligantes. Isossuperfície mais azul corresponde a interação com caráter mais atrativo. Isossuperfície vermelha corresponde à interação repulsiva. A cor verde suave corresponde à interação muito fraca. 45
- Figura 33 – Isossuperfícies de NCI (em cima) e gráficos 2D (em baixo) das interações entre as regiões A dos ligantes **4f**, **4g'** e **4g** com Glu32. O ligante **4g'** não pertence a nenhuma série de compostos sintetizados. 46
- Figura 34 – Isossuperfícies de NCI (à esquerda) e gráfico 2D (à direita) das interações entre a região A de **4h** e Glu32. As caixas azuis salientam a interação mais atrativa e as caixas laranja salientam a interação mais repulsiva. 47
- Figura 35 – Em cima: superfície da cavidade do sítio ativo de 4H96 com os ligantes **7** (carbonos em amarelo), **9i** (carbonos em azul claro), e **9a** (carbonos em salmão). Em baixo, à esquerda: esquema de corte da cavidade com os bolsos a e b assinalados. Em baixo, à direita: orientação da região A dos ligantes 9/CB posicionada no fundo da cavidade. 48
- Figura 36 – Interações que contribuem para fixar a região A dos ligantes 9/CB no sítio de ligação. Átomos de H omitidos. 49
- Figura 37 – Posição de Met25 no loop com Pro26 e Trp27 (em cima). Oposto a Met25 na cavidade está o resíduo Leu69. Em baixo, interações CH... π de Met25 e Pro26 com Trp27. 50

- Figura 38 – Três exemplos de ligantes envolvidos em interações CH... π com Met25: **7** (carbonos em amarelo); **9a** (carbonos em rosa); e **9i** (carbonos em azul claro). As distâncias de interação variam de 2.2 Å a 2.7 Å. Átomos de H omitidos nos ligantes. 51
- Figura 39 – Representação dos padrões de ligação da região C dos três ligantes com menores MIC₅₀ (**7**, **9a**, e **9i**) e dos três ligantes com maiores MIC₅₀ (**6**, **9d**, e **11a**) da série 9/CB. As regiões A estão no fundo da cavidade e representadas em “line”. As regiões B e C estão na entrada da cavidade e representadas em “CPK”. **9i**, **7** e **9a** representados em tons de azul. **9d**, **11a**, e **6** representados em roxo, violeta e bege, respectivamente. Os resíduos Met25 e Leu69 estão representados em “stick” e a proteína colorida de acordo com a estrutura secundária. 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Incidência e mortalidade das principais micoses invasivas (adaptado de Pemán e Quindós, <i>Rev. Iberoam. Micol.</i> 2016)	3
Tabela 2	– Antifúngicos mais comuns no mercado e respectivos alvos terapêuticos (adaptado de Martinez-Rossi, <i>Mycopathologia</i> , 2008)	4
Tabela 3	– Descrição dos mecanismos de atuação das três famílias de fármacos mais comuns no tratamento de candidíase no mundo	6
Tabela 4	– Raios de van der Waals (r_{vdW}) de alguns átomos comuns em biomoléculas	10
Tabela 5	– Interações observadas entre resíduos vizinhos no loop I62-R72	52
Tabela 6	– Interações observadas entre resíduos vizinhos no loop Y21-L29	52

APÊNDICES

Apêndice 1	– MIC ₅₀ dos compostos da série 4/LZ em <i>C. albicans</i> .	61
Apêndice 2	– MIC ₅₀ dos compostos da série 9/CB em <i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i> .	61
Apêndice 3	– MIC ₅₀ de referência de três antifúngicos comerciais em <i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i> .	62
Apêndice 4	– Tabela de interações dos ligantes 4/LZ com os resíduos de aminoácidos e com o NDP da diidrofolato redutase de 4H96.	62
Apêndice 5	– Tabela de interações dos ligantes 9/CB com os resíduos de aminoácidos e com o NDP da diidrofolato redutase de 4H96. Com fundo verde, estão representadas as interações dos ligantes com resíduos que pertencem ao loop Y21-L29. Com fundo cor-de-rosa, estão representadas as interações dos ligantes com resíduos que pertencem ao loop I62-R72.	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Ångström
CSD	Cambridge Structural Database
EC	Número da Comissão Enzimática, (do inglês, <i>Enzyme Commission number</i>)
GOLD	Genetic Optimization of Ligand Docking
HB	Ligação de hidrogênio (do inglês, <i>Hydrogen Bond</i>)
LP	Par isolado de elétrons (do inglês, <i>Lone Pair</i>)
MIC	Concentração Mínima Inibitória (do inglês, <i>Minimal Inhibitory Concentration</i>)
MIC ₅₀	Concentração mínima que inibe o crescimento de 50% da colônia de microrganismos
NCI	Interações não-covalentes (do inglês, <i>Non-Covalent Interactions</i>)
NDP	Código identificador de 3 dígitos no PDB para o ligante Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
µg/mL	Microgramas por mililitro
PDB	Banco de Dados de Proteínas (do inglês, <i>Protein Data Bank</i>)
PDB-ID	Código identificador da estrutura no PDB
ALA	Alanina
GLU	Ácido Glutâmico
ILE	Isoleucina
LEU	Leucina
MET	Metionina
PHE	Fenilalanina
TRP	Triptofano
TYR	Tirosina
VAL	Valina

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Objetivos	16
3. Materiais e Métodos	17
3.1. Obtenção do alvo biológico	17
3.2. Obtenção e preparação dos ligantes	17
3.3. Docking molecular	18
3.4. Estudo das interações não-covalentes	23
3.5. Visualização gráfica	24
4. Resultados e Discussão	26
4.1. Os ligantes	26
4.2. A proteína-alvo	28
4.3. Docking Molecular	32
4.3.1. Estudos de docking na proteína 14- α -demetilase ...	32
4.3.2. Estudos de docking na proteína diidrofolato redutase	34
a) Série 4/LZ	41
b) Série 9/CB	47
5. Conclusões	54
6. Referências Bibliográficas	55
7. Apêndices	61

1. INTRODUÇÃO

Este trabalho se insere dentro das linhas de trabalho dos grupos de pesquisa BioMat (Grupo de Física Teórica, de Materiais e Biomoléculas) do Departamento de Física e do LaCrEMM (Laboratório de Cristalografia, Estereodinâmica e Modelagem Molecular) do Departamento de Química da UFSCar. Estes grupos têm desenvolvido, ao longo dos anos, pesquisas fundamentais nas áreas de elucidação e modelagem de estruturas moleculares e de docking molecular assim como no descobrimento de novas interações intermoleculares fundamentais para os estudos relacionados nesta tese (BALFOUR, 2019; SOUZA, 2019; CARACELLI, 2019, 2017, 2016, 2014, 2013a, 2013b; REIS, 2019; SILVA, 2018; OLIVEIRA, 2018, 2017; MAGANHI, 2017; VENTURINI, 2017; e ZUKERMAN-SCHPECTOR, 2015). Em particular, serão descritos os trabalhos envolvendo novos compostos desenvolvidos para o combate de fungos oportunistas.

Os fungos são organismos que colonizam uma grande diversidade de biomas, sendo geralmente reconhecidos pelo seu papel na decomposição de matéria orgânica. No entanto, das centenas de milhares de espécies descritas, apenas algumas centenas podem ser classificadas como fungos patogênicos ou oportunistas. Destas, apenas algumas dezenas são patogênicas, capazes de causar micoses superficiais leves ou invadir tecidos e órgãos, donde resultam danos graves e micoses invasivas de elevada mortalidade (QUINDÓS, 2018).

As leveduras do gênero *Candida* são microrganismos sistemicamente presentes na microbiota do ser humano, ao longo de toda a vida. Embora, em situações de imunidade competente, estes fungos sejam inofensivos, em condições de imunidade comprometida podem desenvolver patogenicidade e inclusive levar à morte dos pacientes (PAPAS, 2018; QUINDÓS, 2018; KRAGELUND, 2017; PIERCE, 2015; ARENDRUP, 2013). Essa micose invasiva causada por fungos do gênero *Candida* é designada candidíase. Na maioria da população, com imunidade competente e sem danos às barreiras físicas de proteção, a candidíase não é uma condição grave, provocando apenas micoses superficiais na pele, nas unhas e nas

mucosas (nomeadamente a oral e a vaginal). Por exemplo, a candidíase vulvovaginal é uma condição que afeta até 75% das mulheres no mundo, pelo menos uma vez na vida, e que causa uma diminuição da qualidade de vida nas pacientes (DENNING, 2018; JACOB, 2018). No entanto, em condições em que a imunidade dos pacientes se encontra comprometida, os fungos podem crescer no tecido infectado e proliferar para a corrente sanguínea. Alguns casos de imunidade comprometida são os pacientes com HIV, os que passam por cirurgias, os que tratam neoplasias, os expostos a antibióticos de largo espectro, os que passam por transplante de órgãos, os sujeitos a longos períodos de internação hospitalar, ou os que possuem implantes médicos (por exemplo, cateteres vasculares) (BEN-AMI, 2018). Daí podem colonizar novos tecidos e órgãos (**FIGURA 1**) e formar novos locais de disseminação.

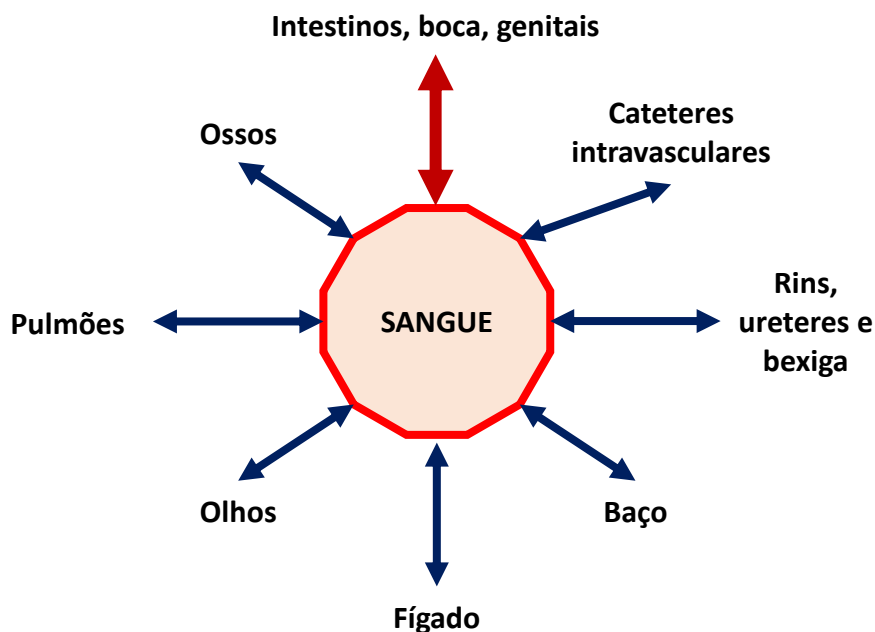


Figura 1. Principais órgãos do corpo humano afetados por candidíase sistêmica. A seta vermelha representa os órgãos onde a candidíase é mais frequentemente diagnosticada. (Figura elaborada pelo autor e livremente adaptada de KULLBERG e ARENDRUP, 2015)

Numa perspectiva global, causando, ou não, alguma condição clínica, as leveduras do gênero *Candida* colonizam o sistema digestivo de até 50% de todas as pessoas, o que representa uma convivência significativa do ser humano com o fungo. A candidíase é a micose invasiva mais comum e frequente no mundo, tendo sofrido um grande aumento de incidência relacionado com o desenvolvimento e a

generalização das cirurgias, dos tratamentos de neoplasias e do transplante de órgãos, sobretudo desde a década de 1980 até hoje (PAPAS, 2018; PEMÁN e QUINDÓS, 2016). No entanto, a mortalidade associada à candidíase mantém-se em 30% a 50%, que são números dificilmente aceitáveis para o século XXI (TABELA 1).

Tabela 1. Incidência e mortalidade das principais micoses invasivas (adaptado de Pemán e Quindós, *Rev. Iberoam. Micol.* 2016)

Micose	Incidência anual (por milhão de hab.)	Mortalidade atribuída
Candidíase	20 – 200	30 – 50%
Criptococose	20 – 60	10 – 20%
Aspergilose	10 – 30	30 – 100%
Outras	0,5 – 2	40 – 100%

Os fármacos utilizados no combate à candidíase, bem como os alvos terapêuticos que eles visam, são limitados, o que está relacionado com o crescente surgimento dos episódios de resistência microbiana (SELLAM e WHITEWAY, 2016). Os antifúngicos mais recentes a chegar ao mercado, foram introduzidos em 2001 (há 18 anos). Desde então, a procura por novos alvos terapêuticos com maior especificidade e seletividade tem sido de grande importância (SALCI, 2018). Os antifúngicos prescritos para candidíase são variados, mas atuam em apenas dois componentes de *Candida spp.*: a membrana celular e a parede celular. Isso torna a abordagem a uma situação de infecção muito restrita e contribui para o surgimento de resistência do fungo aos antibióticos (BAILLY, 2016).

Candida albicans é o fungo do gênero *Candida* mais estudado e o que prevalece nos casos de candidíase, sendo responsável por até 75% das candidíases sistêmicas. No entanto, outras espécies estão a ser consideradas muito significativas no panorama infeccioso, nomeadamente *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. dubliniensis*, tendo já sido identificadas mais de 30 espécies associadas a candidíase invasiva (PAPAS, 2018; KRAGELUND, 2017; ARENDRUP, 2013; PEMÁN e QUINDÓS, 2016; SARDI, 2013; PFALLER, 2014; GARCIA e PEMÁN, 2018).

A situação que gera maior preocupação quando se trata de candidíase, é o uso indiscriminado de antifúngicos, que está relacionado com potenciais episódios de resistência, nomeadamente em espécies de *Candida* que não *Candida albicans* (SALCI, 2018; BAILLY, 2016). Ainda, o tratamento continuado com antibióticos de largo espectro em diversas situações de doença pode levar à modificação da microbiota do paciente, o que facilita a proliferação dos fungos do gênero *Candida* e aumenta o risco de candidemia, isto é, a invasão do sangue por células de *Candida spp.* (PEMÁN e QUINDÓS, 2016).

Os tratamentos mais comuns para candidíases recorrem, clinicamente, aos mesmos grupos de antifúngicos, em todas as circunstâncias, desde o século passado: azóis, polienos e equinocandinas (PAPAS, 2018; SARDI, 2013). A **TABELA 2** apresenta as três classes de fármacos antifúngicos usados atualmente no tratamento de micoses, bem como os respetivos alvos terapêuticos.

Tabela 2. Antifúngicos mais comuns no mercado e respetivos alvos terapêuticos (adaptado de Martinez-Rossi, *Mycopathologia*, 2008)

Classe química	Fármacos	Alvos
Azóis	Tioconazol Clotrimazol Econazol Miconazol Cetoconazol Fluconazol Itraconazol Terconazol Voriconazol Posaconazol	Síntese de ergosterol (membrana celular)
Polienos	Anfotericina B Nistatina	Membrana celular
Equinocandinas	Caspofungina Micafungina Anidulafungina	Síntese de glicanos (parede celular)

Algumas das novas espécies associadas à candidíase são altamente resistentes a antifúngicos tradicionais, como é o caso de *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. dubliniensis*, que têm uma baixa sensibilidade ao tratamento com azóis, devido aos mecanismos de síntese do ergosterol serem diferentes de *C. albicans* (KRAGELUND,

2017). Recentemente, uma nova espécie de *Candida*, *C. auris* (SATO, 2009), foi identificada em ambiente hospitalar, com ampla resistência ao tratamento com antifúngicos tradicionais, e com elevada taxa de mortalidade, tornando-a uma emergente ameaça à saúde global (NAMI, 2019; PAPAS, 2018).

Como pode ser observado na **TABELA 2**, os alvos dos fármacos antifúngicos disponíveis no mercado estão relacionados com funções membranares. Enquanto os fármacos das classes dos azóis e dos polienos atuam, respectivamente, na síntese de ergosterol e diretamente na membrana celular dos fungos *Candida spp.*, as equinocandinas atuam na síntese de glicanos, afetando a estrutura da parede celular dos microrganismos (SARDI, 2013; MARTINEZ-ROSSI, 2008). Na **FIGURA 2** está representado um esquema celular de *Candida spp.*

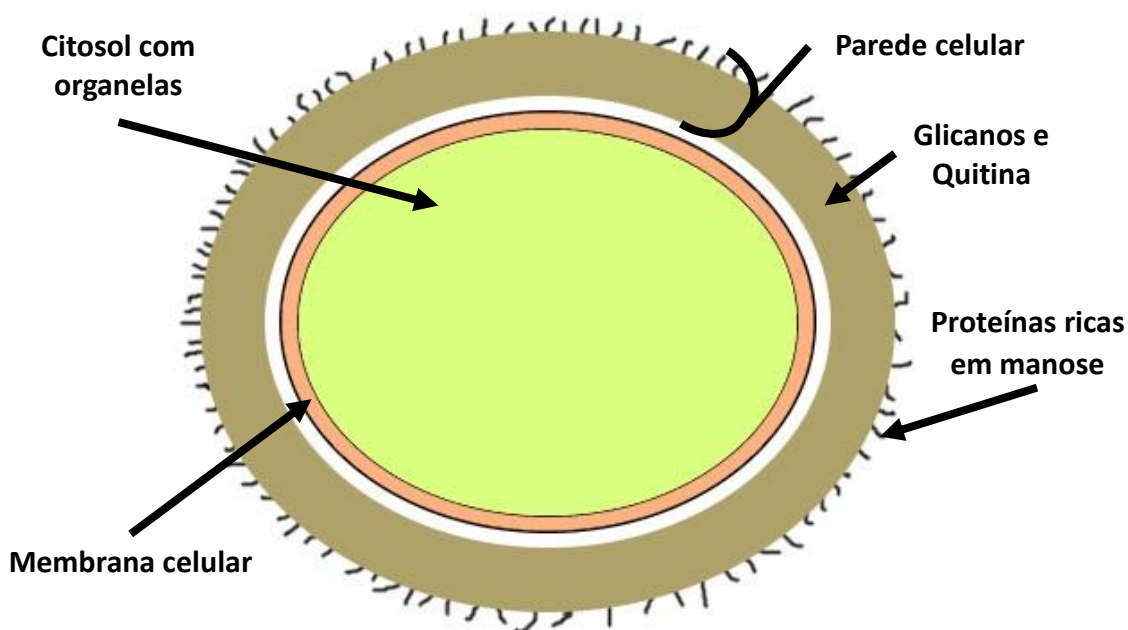

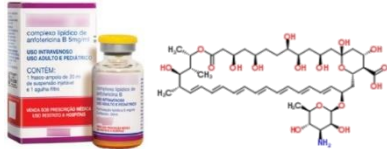
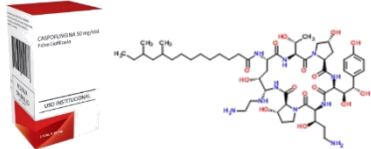


Figura 2. Representação de uma levedura do gênero *Candida* e das respectivas estruturas celulares. (Figura elaborada pelo autor e livremente adaptada de CASSONE, 2013 e BEN-AMI, 2018)

Os alvos moleculares dos compostos em uso como antifúngicos são bem conhecidos (**TABELA 3**), bem como alguns mecanismos de resistência desenvolvidos por *Candida spp.*:

- Os azóis atuam na inibição da enzima lanosterol 14- α -demetilase (EC 1.14.13.70), essencial na via metabólica de síntese do ergosterol, (THE UNIPROT CONSORTIUM, P10613) afetando a estabilidade da membrana celular e limitando o crescimento do fungo (AOKI, 1992).
- Os polienos (o mais comum sendo a anfotericina B, utilizada como antifúngico desde a década de 1950) atuam ligando-se ao ergosterol na membrana celular dos fungos, o que a desestabiliza assim como as funções a ela associadas, resultando na formação de poros membranares e na morte celular (CAO, 2013).
- As equinocandinas (cujo fármaco mais utilizado é a caspofungina, descoberta em 2001) atuam na enzima 1,3- β -glicano sintase (EC: 2.4.1.34), inibindo a via metabólica de síntese de glicanos, o que vai afetar a biossíntese da parede celular, que fica mais desestruturada e mais exposta aos agentes imunológicos do hospedeiro (YANG, 2017).

Tabela 3. Descrição dos mecanismos de atuação das três famílias de fármacos mais comuns no tratamento de candidíase no mundo

Família	Exemplos (fármacos)	Mecanismo de ação em <i>Candida spp.</i>
Azóis	Fluconazol ^a 	Inibidores da enzima lanosterol 14- α -demetilase. Lanosterol não é convertido em ergosterol, levando à morte celular.
Polienos	Anfotericina B ^b 	Liga-se covalentemente ao ergosterol e forma poros na membrana celular. Ocorre a desregulação iônica da célula e a saída de componentes da célula para o meio extracelular, levando à morte celular.
Equinocandinas	Caspofungina ^c 	Inibidores da enzima 1,3- β -glicano sintase. A ausência de glicanos na parede celular deixa-a menos estruturada (levando à lise celular) e mais exposta ao reconhecimento pelo sistema imunitário do hospedeiro.

^{a,b,c} imagens comerciais adaptadas de <http://blogdakamaleoah.com/fluconazol/>, <http://arteriaonline.com.br/sites/teva/produtos/hospitalar>, <http://farmaciainformativa.com/c-antiinfeciosos-sistemicos/caspofungina/>, respectivamente.

A diversificação das espécies causadoras de candidíase, sobretudo na população de pacientes com o sistema imunitário comprometido, junto como o aumento da resistência aos fármacos atualmente utilizados, criam um cenário em que é necessário melhor entender esses fenômenos de resistência e, com esse conhecimento, desenvolver novos fármacos, com novos alvos/mecanismos de ação, que resultem de um conhecimento mais detalhado sobre as micoses invasivas, como é o caso da candidíase (PIERCE, 2015; MARTINEZ-ROSSI, 2008).

Nesse sentido o grupo do Professor Hélio A. Stefani, do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP-SP) sintetizou e testou em fungos do gênero *Candida* 26 novos compostos derivados de oxazolina. Os ensaios realizados foram *in vitro* de forma a avaliar a suscetibilidade microbiana aos novos compostos em comparação com fármacos comerciais de conhecida atividade (Fluconazol[®], Anfotericina B[®] e Caspofungina[®]). O parâmetro avaliado foi o MIC₅₀ que é um parâmetro que quantifica a concentração mínima que inibe o crescimento de 50% de uma colônia de microrganismos completos e funcionais (SVETAZ, 2007). No entanto, *Candida spp.* são organismos eucariontes complexos, com diversas funções celulares, núcleo individualizado e toda uma parafernália de organelas e enzimas. Desta forma, a comparação dos MIC₅₀ permite concluir que compostos são melhores inviabilizadores do crescimento do fungo, mas não elucidam o alvo molecular nem a via metabólica que está sendo afetada no microrganismo. Os valores de MIC₅₀ dos compostos estudados neste trabalho podem ser consultados nos **APÊNDICES 1 e 2** e comparados com os valores de MIC₅₀ de três fármacos comerciais, no **APÊNDICE 3**.

É, então, necessário realizar outros experimentos para identificar um potencial alvo dos compostos candidatos a fármacos, esclarecendo a sua intervenção numa determinada via metabólica.

O método computacional de docking molecular é de extrema utilidade na descoberta e no desenho de novos fármacos, bem como auxiliar na seleção dos melhores candidatos a fármacos numa família de compostos (CIEMNY, 2018; BENCUROVA, 2018). O docking molecular é uma técnica *in silico* usada para encontrar os complexos mais estáveis entre uma biomolécula, por exemplo uma proteína, e um ligante, por exemplo uma pequena molécula candidata a fármaco (**FIGURA 3**) (ZOETE, 2009). Trata-se de uma ferramenta-chave no *screening* virtual de

bibliotecas de compostos, que visa identificar pequenas moléculas capazes de interagir com um alvo biológico, normalmente em um amplo sítio de ligação ou em um sítio ativo, influenciando a atividade da biomolécula (BORTOLATO e MORO, 2008; VERDONK, 2003).

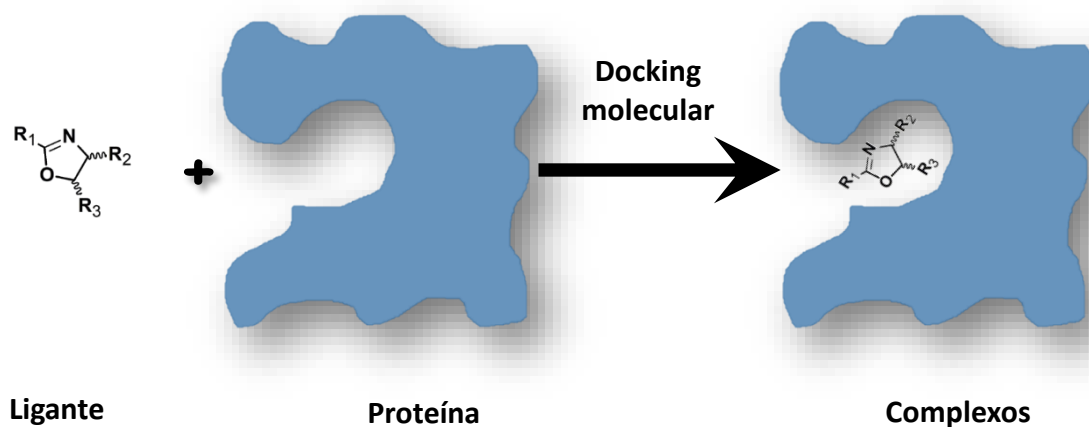


Figura 3. Esquema do método de docking molecular. Um ligante forma um complexo com uma proteína, realizando interações no sítio de ligação. Figura elaborada pelo autor.

No docking molecular são aplicados algoritmos de cálculo que vão permitir a um pesquisador selecionar os complexos em que um composto tem maior afinidade de ligação por um determinado sítio de uma biomolécula. Existem três diferentes algoritmos usados em docking molecular: algoritmos de busca sistemática; métodos estocásticos; e abordagens de simulação (ZOETE, 2009). Na busca sistemática, os ligantes são desconstruídos e o docking é realizado por fragmentos, que são acrescentados em etapas sequenciais, começando pelas porções mais rígidas. Nos métodos estocásticos, o ligante completo é posicionado no sítio de ligação e são aplicadas mudanças torcionais à pose (designação dada ao conjunto de posição, conformação e orientação de um ligante) inicial, resultando numa nova pose, o composto testado deverá sofrer alterações torcionais numa etapa seguinte, e assim, sucessivamente, em busca do melhoramento das interações com a biomolécula. Um exemplo deste tipo de algoritmo são os algoritmos genéticos (**FIGURA 4**), onde o docking começa com uma população de poses, que recebem uma pontuação (score) de uma função de fitness. Em seguida, os modos de ligação menos favoráveis são substituídos por novas poses, geradas por operadores computacionais. E assim,

sucesivamente, em busca do encaixe mais favorável do ligante no sítio, isto é, o complexo de mais baixa energia.

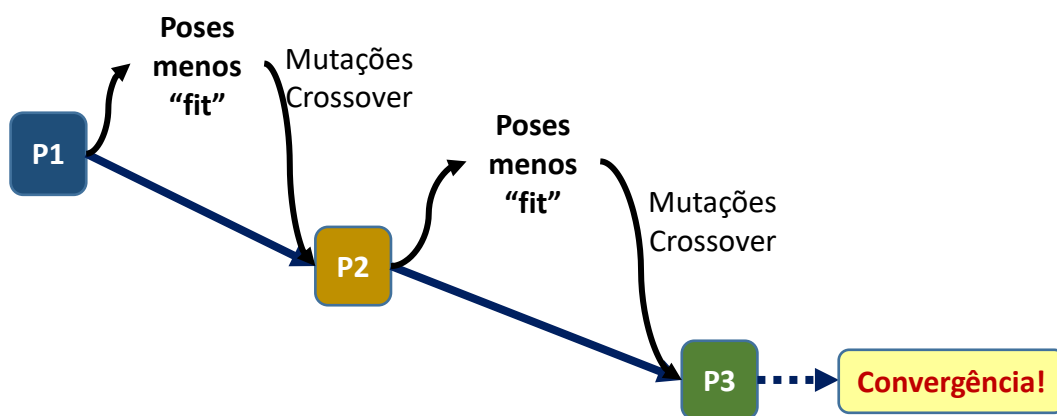


Figura 4. Esquema de operação de um algoritmo genético aplicado à população P1. As mutações correspondem a perturbações, como a rotação de um ângulo diedro, e o crossover à combinação de várias poses. Em cada etapa (*step*), as poses menos *fit* recebem mutações e crossover formando-se uma nova população. As etapas repetem-se até atingir a convergência nas poses, ou após um número predeterminado de gerações. Figura elaborada pelo autor.

As abordagens de simulação incluem métodos de minimização de energia e dinâmica molecular. São métodos computacionalmente pesados e necessitam de longos tempos de CPU na busca por mínimos de energia ligante-biomolécula, mas podem eficientemente complementar os resultados obtidos usando outros algoritmos.

Como guia, os diferentes algoritmos utilizam funções de ranqueamento (fitness score) de forma a relacionar as poses de docking da “melhor pose” (mais baixa energia e maior expressão das interações atrativas) para a “pior pose” (mais alta energia e menor expressão das interações atrativas). Sendo que estas energias de interação são o somatório das contribuições das diferentes interações ligante-biomolécula, e como mencionado acima é apenas um guia.

Como existem múltiplas (e diferentes) funções de fitness usadas pelos diferentes softwares de docking molecular, atualmente recorre-se a funções de consenso para identificar a “melhor” pose produzida pelos cálculos operados nos diferentes programas, (PALACIO-RODRÍGUEZ, 2019). Esta ferramenta estatística, apesar de validada e otimizada na identificação de compostos candidatos a fármacos em grandes bibliotecas de compostos, não foi aplicada neste trabalho, pois foi selecionada apenas uma função de fitness em um único software de cálculo utilizado.

As interações não-covalentes entre um ligante e uma biomolécula são de natureza eletrostática, isto é, de acordo com Mecânica Clássica, podem ser caracterizadas por uma função potencial entre duas entidades carregadas ou com dipolo (ERMONDI e CARON, 2006). Algumas, como as ligações de hidrogênio, são interações direcionais, facilitando a sua determinação e o cálculo da respetiva energia. Uma ligação de hidrogênio (HB, do inglês *hydrogen bond*) corresponde à associação entre um par de elétrons não-ligados de um átomo eletronegativo e um átomo de hidrogênio (FIGURA 5), que se encontra covalentemente ligado a outro átomo relativamente eletronegativo (IUPAC, 1997). A energia de ligação numa HB é tipicamente inferior a 25,0 kcal/mol.

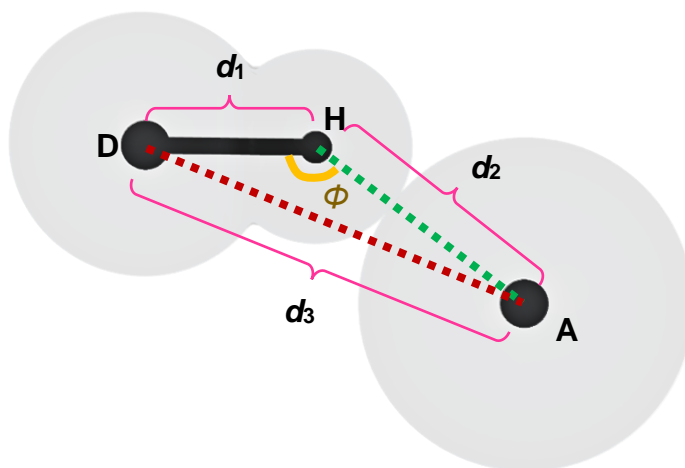


Figura 5. Descritores geométricos de uma ligação de hidrogênio (HB): d_1 – distância da ligação D-H; d_2 – distância da HB (H-A); d_3 – distância D-A; ϕ – ângulo entre D-H e H-A. H = átomo de hidrogênio; A – átomo aceptor da HB; D – átomo doador do hidrogênio para a HB. Raios de van der Waals de cada átomo representados em sobra cinzenta. Figura elaborada pelo autor, de acordo com ERMONDI e CARON, 2006 e SACCO, 2017.

A busca por HB é, normalmente, realizada por monitoramento da distância D...A ou H...A (FIGURA 5), somando-se os raios de van der Waals dos elementos monitorados. Os raios de van der Waals dos átomos de alguns elementos comuns em biomoléculas são apresentados na TABELA 4 (BONDI, 1964; MANTINA, 2009).

Tabela 4. Raios de van der Waals (r_{vdW}) de alguns átomos comuns em biomoléculas

Átomo	r_{vdW} (Å)
H	1.10
C	1.70
N	1.55
O	1.52

P	1.80
S	1.80

Os ângulos Φ , correspondentes à HB, podem variar muito, mas são geralmente considerados significativos para valores entre 120° e 180° (WOOD, 2009). Ainda assim, não devem ser imediatamente desconsiderados ângulos inferiores a 120° , mas individualmente observada a interação e avaliados outros parâmetros, como a distância da interação, ou a vizinhança da interação.

Outras interações, como as de van der Waals, não sendo direcionais, também são computadas, uma vez que, sendo muito numerosas, têm uma expressiva contribuição para a energia total de interação (HUTTER, 2018). Além destas, uma nova classe emergente de interações deve ser destacada e que são as interações envolvendo sistemas π (SILVA, 2018; SACCO, 2017; CARACELLI, 2010, 2012, 2013a, 2013b, 2014, 2016; TIEKINK e ZUKERMAN-SCHPECTOR, 2011; ZUKERMAN-SCHPECTOR, 2011; SENG, 2008; ZUKERMAN-SCHPECTOR e HAIDUC, 2002). Este tipo de interações é de abordagem computacional bem mais complexa e está ausente nos algoritmos e campos de forças usados nos cálculos de docking (SHERRILL, 2013; ARIYAEIFAR, 2018).

As interações entre sistemas π podem ser classificadas como do tipo $\pi\dots\pi$ (FIGURA 6) ou D-H... π (FIGURA 7): uma interação do tipo D-H... π com o centroide do sistema aromático é designada deslocalizada; se a interação é com a região entre dois átomos do sistema aromático, designa-se semi-localizada; no caso de a interação ser com um dos átomos do sistema aromático, trata-se de uma interação localizada (CARACELLI, 2013a; SACCO, 2017).

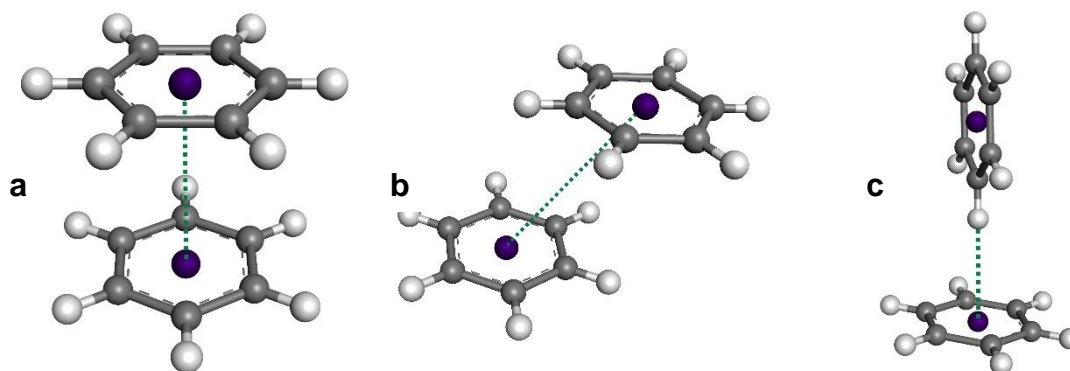


Figura 6. Três principais classificações de interações entre sistemas π : **a)** em paralelo; **b)** paralelamente deslocados; **c)** em forma de T. Figura elaborada pelo autor.

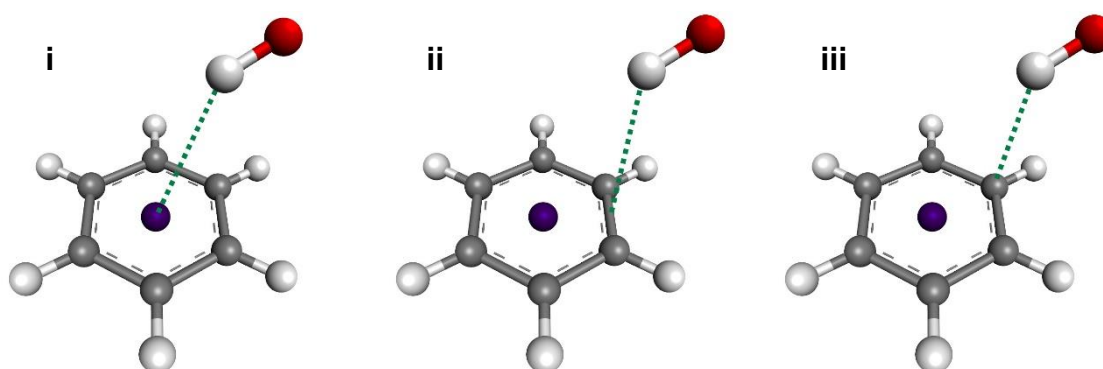


Figura 7. Representação das interações π do tipo D-H... π (com D = Oxigênio) de acordo com a direcionalidade: **i-** deslocalizada; **ii-** semi-localizada; **iii-** localizada. Figura elaborada pelo autor.

Ainda devemos mencionar, entre as interações recentemente caracterizadas, as denominadas como ligações de halogênio que vêm ganhando importância e a necessidade de serem reconhecidas (METRANGOLO, 2005, 2008; POLITZER, 2013; WILCKEN, 2013; BOSCH, 2019).

As interações não-covalentes correspondem a regiões entre átomos próximos no espaço onde as nuvens eletrônicas interagem, a distâncias inferiores à soma dos raios de van der Waals, mas superiores à soma dos raios covalentes dos átomos (ou sistemas π) interagindo.

Em Física da Matéria Condensada, a caracterização de sistemas com muitas partículas (elétrons, átomos) recorre à Mecânica Quântica – Teoria do Funcional de Densidade (DFT, do inglês *Density Function Theory*), resolvendo complexas funções

para cada sistema interagindo. Como num complexo proteína-ligantes existem milhares, ou dezenas de milhares de átomos (e elétrons) interagindo entre si, esta abordagem torna-se temporalmente e computacionalmente muito pesada e exigente, pelo que existem algumas alternativas que recorrem a aproximações nos cálculos para produzir resultados confiáveis e num curto período de tempo. É o caso do software NCIPLOT, que permite cruzar a densidade eletrônica com o gradiente de densidade reduzido em regiões do espaço entre átomos interagindo, produzindo isossuperfícies tridimensionais sempre que se verifica a interação entre nuvens eletrônicas. De forma breve, segue-se uma descrição NCIPLOT.

A densidade eletrônica é definida como uma medida da probabilidade de um elétron estar presente num determinado volume do espaço (IUPAC, 1997). Como descrito por JOHNSON (2010) usando o modelo de orbital do tipo Slater (STO, do inglês *Slater Type Orbitals*), em que funções são usadas como orbitais atômicos nos métodos de combinação linear de orbitais atômicos, a densidade eletrônica $\rho(\mathbf{r})$ para um único orbital atômico é dada pela função:

$$\rho(\mathbf{r}) = e^{-2\alpha r}$$

em que α é um termo de ajuste aos dados empíricos, e o gradiente de densidade $\nabla\rho(\mathbf{r})$ é:

$$\nabla\rho(\mathbf{r}) = -2\alpha\rho(\mathbf{r}) .$$

O gradiente de densidade reduzido (s , ou R.D.G., do inglês *Reduced Density Gradient*) é uma grandeza adimensional usada em DFT para descrever o desvio da distribuição eletrônica em relação a um sistema homogêneo (JOHNSON, 2010; BOTO, 2015) e é dado por

$$s(\mathbf{r}) = \frac{|\nabla\rho(\mathbf{r})|}{2(3\pi^2)^{1/3} \rho(\mathbf{r})^{4/3}}$$

Ao analisar a topologia da densidade eletrônica numa molécula, surgem três pontos críticos, que são pontos no espaço em que o gradiente de densidade eletrônica desaparece (MATTA e BOYD, 2007; SALEH, 2012): mínimos locais, máximos locais e pontos de sela (**FIGURA 8**):

$$\nabla\rho = \mathbf{i}\frac{d\rho}{dx} + \mathbf{j}\frac{d\rho}{dy} + \mathbf{k}\frac{d\rho}{dz} \rightarrow \begin{cases} = \vec{0} & \text{(nos pontos críticos e no infinito)} \\ \text{Geralmente } \neq \vec{0} & \text{(nos outros pontos do espaço)} \end{cases}$$

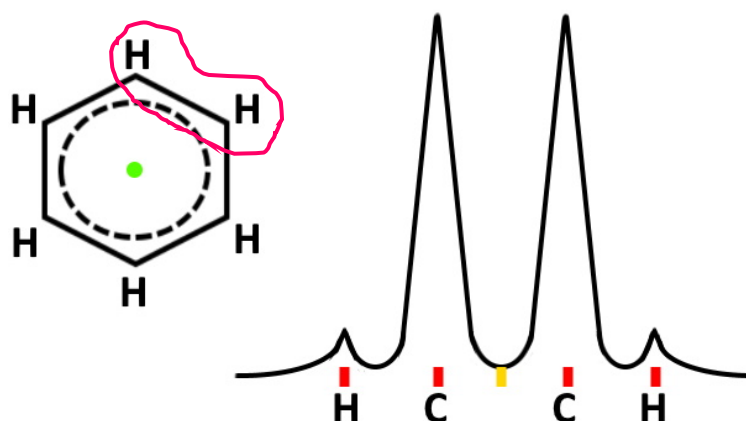


Figura 8. Representação do benzeno (esquerda) e da topologia 2D da densidade eletrônica (direita) entre os átomos delineados a cor-de-rosa. O ponto verde corresponde a um mínimo local no centroide do anel aromático. Os traços vermelhos correspondem a máximos locais, sobre os núcleos dos átomos. O traço amarelo corresponde a um ponto de sela entre os átomos de carbono. Figura elaborada pelo autor e livremente adaptada de MATTA e BOYD, 2007.

A distinção entre os diferentes pontos críticos pode ser avaliada pela curvatura (Laplaciana) da densidade em relação aos principais eixos (x' , y' e z') entre os átomos interagindo. Assim, a Laplaciana da densidade é dada por:

$$\nabla^2\rho(\mathbf{r}) = \nabla \cdot \nabla\rho(\mathbf{r}) = \underbrace{\frac{\partial^2\rho(\mathbf{r})}{\partial x^2}}_{\lambda_1} + \underbrace{\frac{\partial^2\rho(\mathbf{r})}{\partial y^2}}_{\lambda_2} + \underbrace{\frac{\partial^2\rho(\mathbf{r})}{\partial z^2}}_{\lambda_3}, \quad \lambda_1 \leq \lambda_2 \leq \lambda_3$$

O sinal de $\nabla^2\rho(\mathbf{r})$ determina qual o efeito dominante na densidade eletrônica num determinado ponto do espaço, isto é, se a compressão ($\nabla^2\rho(\mathbf{r}) < 0$) ou a expansão ($\nabla^2\rho(\mathbf{r}) > 0$) (MATTA e BOYD, 2007).

Sobre os núcleos,

$$\rho(\mathbf{r}) = \text{máx}, \quad \text{e} \quad \lambda_1 < 0, \lambda_2 < 0, \lambda_3 < 0,$$

resultando numa Laplaciana largamente negativa.

Na região entre os núcleos, para interações lineares numa configuração de nível fechado,

$$\lambda_1 = \lambda_2 < 0, \quad \lambda_3 > 0, \quad |\lambda_1| + |\lambda_2| > |\lambda_3|$$

resultando numa Laplaciana negativa.

Na região internuclear, para interações partilhadas (nos pontos de sela), onde a contribuição de átomos vizinhos afeta a elipticidade da interação,

$$\lambda_3 > 0, \quad |\lambda_1| > |\lambda_2| \quad \lambda_1 + \lambda_2 < 0,$$

resultando numa Laplaciana que pode ser positiva, ou negativa, ou nula.

Usando os pontos críticos representados na **FIGURA 8**, as interações não covalentes podem ser avaliadas recorrendo ao comportamento da Laplaciana da densidade eletrônica, nomeadamente o sinal de λ_2 .

Núcleo	Centroide	Outros pontos do espaço (sela)
$\rho = \text{máx}$	$\rho = \text{min}$	
$\lambda_1 < 0$	$\lambda_1 > 0$	$\lambda_1 < 0$
$\lambda_2 < 0$	$\lambda_2 > 0$	$\lambda_2 > 0 \quad \lambda_2 < 0$
$\lambda_3 < 0$	$\lambda_3 > 0$	$\lambda_3 > 0$

A plotagem de $s(\mathbf{r})$ em função de $\rho(\mathbf{r})$ permite o surgimento de isossuperfícies, no espaço real, correspondentes a interações não covalentes entre átomos próximos e podem ser observadas tanto em interações intramoleculares, como em interações intermoleculares. A avaliação do sinal de λ_2 , em regiões do espaço onde a densidade eletrônica e o gradiente de densidade reduzido são próximos de zero, permite identificar interações fracas e classifica-las como atrativas ($\lambda_2 < 0$) ou repulsivas ($\lambda_2 > 0$).

Em suma, a avaliação dos resultados de docking molecular necessita de um pesquisador com profundos conhecimentos de biologia, química e física para a seleção de um dado padrão de ligação de um composto, baseado na identificação das interações mais relevantes e responsáveis por essa ligação.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é:

- Propor um alvo molecular em *Candida spp.* para os novos compostos derivados de oxazolina.

Os objetivos específicos do presente projeto são:

- Realizar experimentos de docking molecular em estruturas cristalográficas de proteínas, para obter complexos proteína-ligante com os novos compostos;
- Analisar os resultados de docking, procurando padrões de ligação dos ligantes no sítio de ligação das proteínas de acordo com as interações não-covalentes identificadas;
- Avaliar as interações não-covalentes, buscando caracterizar interações essenciais para a atividade biológica;
- Propor um mecanismo de atuação dos novos compostos numa via metabólica de *Candida spp.*

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O principal método de simulação utilizado neste trabalho foi o docking molecular. Para realizar este tipo de estudo, que visam a interpretação e a análise da formação de complexos proteína-ligantes, é necessário selecionar um alvo biológico adequado aos experimentos *in silico*, bem como são necessários os compostos a serem estudados.

3.1. OBTENÇÃO DO ALVO BIOLÓGICO

O Banco de Dados de Proteínas (PDB, do inglês *Protein Data Bank*) (BERMAN, 2000) é um banco de dados tridimensionais, na sua maioria oriundos de experimentos de cristalografia por difração de raio X, de biomacromoléculas (proteínas e ácidos nucleicos) no seu estado apo (*per se*) ou complexadas com ligantes (átomos ou moléculas que não fazem parte da estrutura proteica ou nucleotídica). Foi feita uma busca no PDB para encontrar complexos de proteínas de *Candida spp.* com ligantes nos sítios já descritos na literatura, preferencialmente grupos prostéticos (cofatores e coenzimas) e inibidores. Foi valorizada, também, a semelhança da estrutura molecular dos inibidores no complexo cristalográfico com a estrutura molecular dos compostos derivados de oxazolina. Uma vez selecionadas, foram obtidas as coordenadas das estruturas tridimensionais das proteínas que seriam utilizadas nos estudos de docking molecular.

3.2. OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DOS LIGANTES

As estruturas tridimensionais dos ligantes podem ser obtidas por estudos de cristalografia por difração de raio X e/ou modelagem.

O Cambridge Structural Database (CSD) (GROOM, 2016) é um banco de dados cristalográficos de pequenas moléculas e foi utilizado para buscar compostos que tivessem como base o esqueleto oxazolina. Os esqueletos encontrados serviram de ponto de partida para a modelagem dos compostos.

Os ligantes foram, então, modelados com o software Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Labs) ChemSketch 2016.2.2 (versão freeware). O ACD ChemSketch é um software de modelagem molecular com uma versão de uso gratuito, que permite desenhar estruturas em 2D e salvá-las em diversos formatos, nomeadamente .mol.

O pacote UCSF Chimera (PETTERSEN, 2004), na versão 1.11.2 foi utilizado para obter as estruturas tridimensionais dos ligantes modelados com o ACD ChemSketch, realizando a conversão do formato do arquivo para .mol2, que é um dos formatos de arquivos aceitos no programa de docking molecular.

3.3. DOCKING MOLECULAR

Em posse das estruturas tridimensionais dos ligantes e das proteínas, foram realizados experimentos de docking molecular, em busca de complexos proteína-ligante. Para a realização destes experimentos, foi utilizado o software GOLD (Genetic Optimization of Ligand Docking) (JONES, 1997) na versão 5.2.2, que utiliza um algoritmo genético na procura pelo melhor encaixe do ligante no sítio de ligação. O GOLD foi selecionado para a realização dos cálculos de docking molecular deste trabalho pela sua facilidade de utilização (interface e parametrização), pela multiplicidade de opções disponíveis na definição dos parâmetros de cálculo, pela utilização dos dados cristalográficos de pequenas moléculas depositados no Cambridge Structural Database (CSD) na validação dos parâmetros de cálculo do software, e porque é o software de cálculo usado nos grupos de pesquisa BioMat e LaCrEMM, da UFSCar. Não foram testados outros softwares para a realização dos estudos relatados nesta tese. O GOLD foi validado como software competente para a realização dos estudos de docking molecular pela realização de cálculos prévios de redocking com as estruturas cristalográficas selecionadas do PDB. Obtendo-se sistematicamente uma elevada similaridade entre os resultados de redocking e a pose cristalográfica dos ligantes nos respectivos sítios de ligação.

Na preparação para os cálculos de docking, foram adicionados os átomos de hidrogênio às proteínas e aos ligantes. As moléculas de água presentes na estrutura cristalográfica das proteínas foram removidas, pois não foi observada nenhuma interação destas com os ligantes cristalográficos. O sítio de ligação foi determinado

de acordo com a localização dos inibidores nos complexos cristalográficos depositados no PDB.

- **Seleção das Proteínas**

Como mencionado anteriormente, as estruturas tridimensionais de proteínas de *Candida spp.* foram pesquisadas no banco de dados PDB, que é atualizado semanalmente. Em 23 de julho de 2019, o número de estruturas tridimensionais de enzimas de *Candida spp.* depositadas era de 305. Destas, 197 estruturas correspondiam a proteínas de *C. albicans*, 72 a *C. glabrata*, 14 a *C. tropicalis* e 13 estruturas a *C. parapsilosis*.

Nas 197 estruturas de *C. albicans*, foram identificados 7 grupos de proteínas: diidrofolato redutase (código UniProt: Q5A5E); glicano 1,3- β -glicosidase (código UniProt: P29717); metiltransferase (código UniProt: P82610); acetolactato sintase (código UniProt: A0A1D8PJF9); proteína transportadora de amônio (código UniProt: Q59UP8); proteína de superfície superóxido de cobre dismutase (código UniProt: Q5AD07); e chaperona Hsp90 (código UniProt: P46598).

A maioria das estruturas de *C. glabrata* correspondiam a proteínas não caracterizadas. Apenas uma estrutura corresponde a uma enzima lanosterol 14- α -demetilase e está complexada com o inibidor itraconazol® (2-[(2*R*)-butano-2-ila]-4-{4-[4-(4-[(2*R*,4*S*)-2-(2,4-diclorofenila)-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ilmetila)-1,3-dioxolano-4-ila]metoxi)fenil]piperazina-1-ila]fenila}-2,4-diidro-3*H*-1,2,4-triazol-3-ona), antifúngico da família dos azóis.

As enzimas escolhidas foram a 14- α -demetilase de *C. glabrata* (PDB-ID 5JLC) cristalizada com o itraconazol® (PDB-ID 1YN) e a diidrofolato redutase de *C. albicans* (PDB-ID 4H96) cristalizada com 5-{3-[3-(1,3-benzodioxol-5-il)-5-metoxifenil]prop-1-in-1-il}-6-etilpirimidina-2,4-diamina (PDB-ID 14Q). A estrutura tridimensional das proteínas é apresentada na **FIGURA 9**. Os ligantes estão apresentados na **FIGURA 10**.

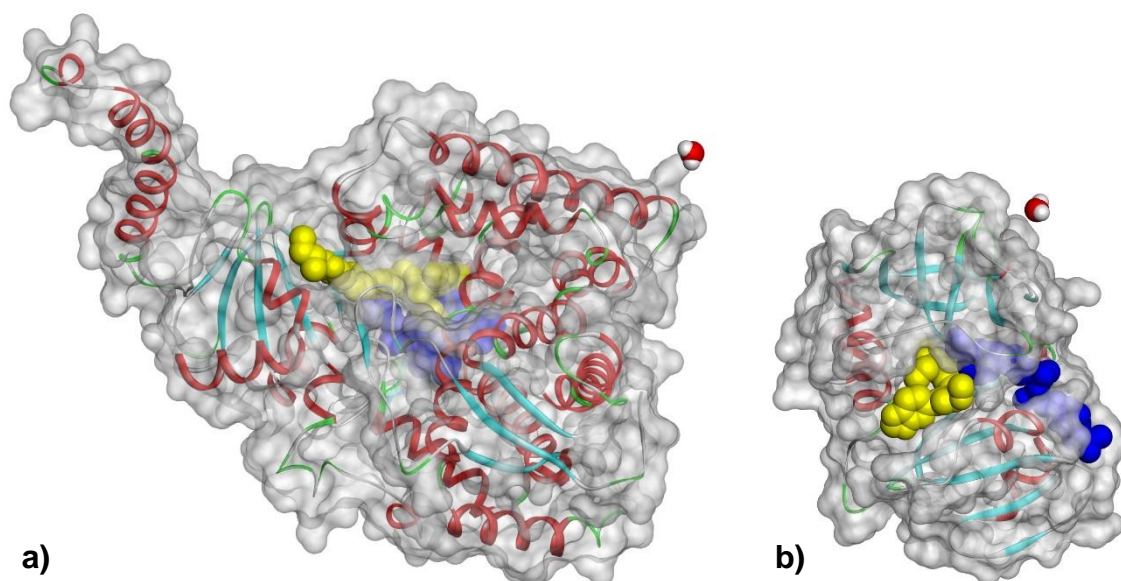


Figura 9. Representação das estruturas tridimensionais das proteínas com os ligantes cristalográficos: **a)** lanosterol 14- α -demetilase de *C. glabrata* (PDB-ID 5JLC); **b)** diidrofolato redutase de *C. albicans* (PDB-ID 4H96). No respetivo sítio de ligação encontram-se os inibidores coloridos a amarelo (**a)** 1YN e **b)** 14Q) e os grupos prostéticos coloridos a azul (**a)** HEM e **b)** NDP). Uma molécula de água representada em CPK, para referência e escala. Figura elaborada pelo autor.

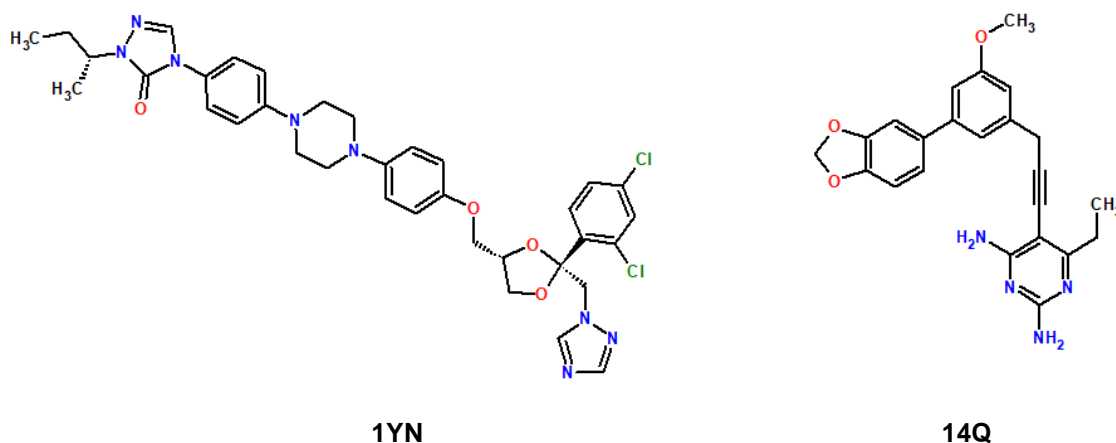


Figura 10. Estruturas 2D dos ligantes 1YN e 14Q. Figura elaborada pelo autor.

Os motivos que levaram à seleção das proteínas utilizadas neste trabalho bem como sua descrição encontram-se na **Seção 4.2**.

O sítio escolhido em cada proteína para a realização dos experimentos de docking foi determinado pela posição do ligante cristalográfico, ou seja, o 1YN na enzima de código pdb 5JLC e 14Q na enzima de código pdb 4H96. Esta escolha é

muito importante, pois o programa GOLD necessita de uma cavidade para executar os cálculos de busca por interações. Assim, o raio de cálculo $R_{\text{calc}} = r_{\text{vdW}} + R$, onde r_{vdW} corresponde ao raio de van der Waals dos átomos do ligante (**FIGURA 11**). De acordo com esta definição, na enzima 14- α -demetilase de *C. glabrata*, a cavidade selecionada desta forma tinha $R = 10.0 \text{ \AA}$ e estava centrada em 1YN. Na enzima diidrofolato redutase de *C. albicans*, a cavidade selecionada tinha $R = 8.0 \text{ \AA}$ e estava centrada em 14Q. Estes valores de R foram definidos após a realização de múltiplos experimentos de redocking, com valores entre 6.0 \AA e 16.0 \AA , tendo em consideração as diferenças de profundidade e morfologia das cavidades.

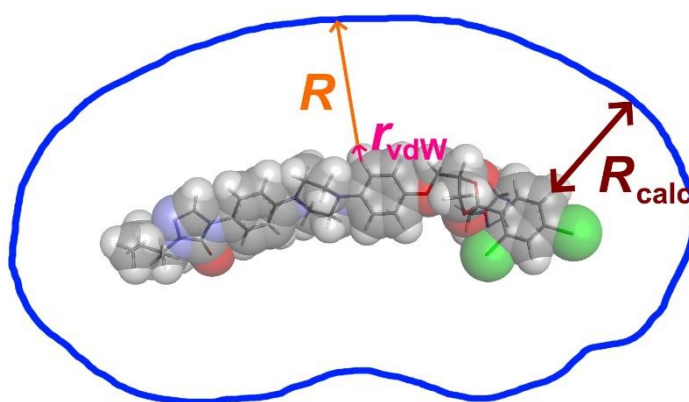


Figura 11. Esquema de definição da cavidade onde o GOLD vai procurar interações do ligante com a proteína. (Figura elaborada pelo autor)

Os resultados obtidos dos cálculos foram observados utilizando-se programas de visualização gráfica, onde foram avaliados os padrões de pose (posição, conformação e orientação) de cada ligante dentro do sítio e as interações entre os átomos da proteína e do ligante.

A função de fitness utilizada foi a GoldScore (VERDONK, 2003). Esta função de fitness valoriza as interações intermoleculares e penaliza as interações intramoleculares, tanto ligações de hidrogênio, quanto interações de van der Waals:

$$\text{Fitness} = S(\text{hb_ext}) + S(\text{vdw_ext}) + S(\text{hb_int}) + S(\text{int}) + \text{intcor}$$

- S (hb_ext) = contribuição das ligações de hidrogênio Ligante-Proteína
- S (vdw_ext) = contribuição das interações de van der Waals Ligante-Proteína
- S (hb_int) = contribuição das ligações de hidrogênio intramoleculares no Ligante
- S (int) = contribuição das interações de van der Waals intramoleculares no Ligante
- intcor = correção dos valores de S(hb_int) e S(int) pela estrutura de mínima energia do Ligante encontrada nos cálculos (“internal energy offset”)

Antes de realizar os experimentos de docking com as moléculas a serem estudadas foram efetuados experimentos de redocking para validar os parâmetros que seriam utilizados nos cálculos bem como a função de fitness. Neste processo, removeram-se os inibidores 1YN e 14Q de cada um dos complexos, 5JLC e 4H96, respectivamente, e foram executadas várias simulações de docking rígido (sem permitir variação dos ângulos torcionais nos ligantes ou na enzima), buscando reproduzir o padrão de ligação cristalográfico. Foram testadas as funções de fitness GoldScore e ChemScore. Os resultados obtidos validaram o conjunto de parâmetros que seriam utilizados, pois, como pode ser visto na **FIGURA 12**, as poses obtidas no redocking corresponderam à pose do ligante cristalográfico. A função de fitness escolhida foi a GoldScore, pois as poses de redocking foram obtidas com menor valor de desvio médio dos átomos ($\text{RMSD}_{\text{GoldScore}} = 0.19 \text{ \AA}$ tanto para 1YN como para 14Q, enquanto $\text{RMSD}_{\text{ChemScore}} = 0.45 \text{ \AA}$ para 1YN e $\text{RMSD}_{\text{ChemScore}} = 0.46 \text{ \AA}$ para 14Q).

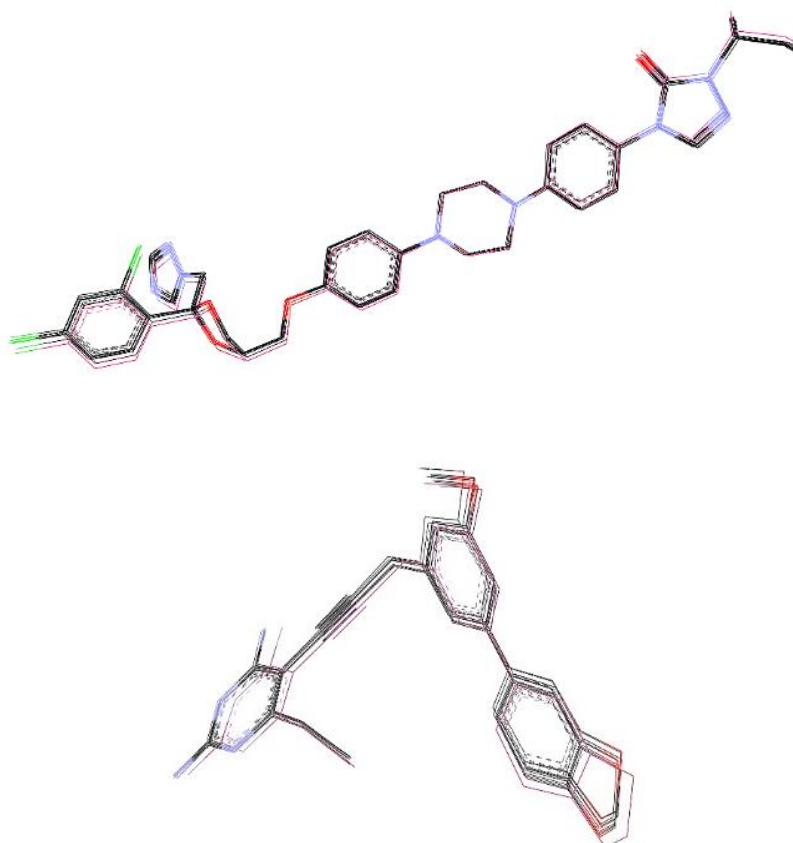


Figura 12. Resultados de redocking de 1YN em 5JLC (em cima) e de 14Q em 4H96 (em baixo). Os inibidores na sua pose cristalográfica estão representados com os átomos de carbono em cor-de-rosa. As poses de redocking possuem os carbonos coloridos de preto. Os átomos de H foram omitidos. Figura elaboradas pelo autor.

Os resultados obtidos dos cálculos foram analisados utilizando-se programas de visualização gráfica, onde foram avaliados os padrões de pose (posição, conformação e orientação) de cada ligante dentro do sítio e as interações entre os átomos da proteína e do ligante, como detalhado na **Seção 3.5**.

3.4. ESTUDO DAS INTERAÇÕES NÃO-COVALENTES

Foi necessário aprofundar a análise das interações não-covalentes ligante-proteína encontradas. Para isso recorreu-se aos cálculos realizados pelo sistema NCI PLOT (JOHNSON, 2010; CONTRERAS-GARCIA, 2011), versão 3.0, que fornece uma representação visual da natureza do contato entre átomos e entre átomos e

sistemas π , e foi empregado no presente estudo para confirmar a natureza de alguns contatos intermoleculares.

Este programa permite a criação de isossuperfícies tridimensionais de interação entre átomos ou moléculas próximas, plotando a densidade eletrônica *versus* o gradiente de densidade reduzido na região do espaço entre os átomos interagindo. As isossuperfícies geradas são baseadas em um esquema de três cores, de forma que uma interação específica pode ser identificada como atrativa ou não. Assim, uma isossuperfície verde indica uma atração relativamente fraca, enquanto uma isossuperfície azul indica uma atração forte, tipicamente as das ligações de hidrogênio clássicas, e uma interação repulsiva aparece em vermelho.

Os dados gerados pelo NCIPLLOT podem ainda ser representados em gráficos bidimensionais (2D), onde as interações atrativas e repulsivas surgem como picos nas regiões negativa e positiva do eixo da densidade (respectivamente), de acordo com o sinal de λ_2 da Laplaciana da densidade eletrônica. Para coerência na apresentação dos resultados, as escalas de cores vermelha-verde-azul (RGB, do inglês, *red-green-blue*) foram aplicadas da mesma forma às isossuperfícies e aos gráficos 2D.

3.5. VISUALIZAÇÃO GRÁFICA

Desde a seleção da proteína até a avaliação dos resultados dos cálculos e nos estudos das interações não-covalentes, foi necessário o uso da visualização gráfica. Para isso foram utilizados os seguintes softwares: Accelrys (presentemente Biovia) Discovery Studio Visualizer (Accelrys Software Inc., 2013), na versão 3.5; e Visual Molecular Dynamics (VMD) (HUMPHREY, 1996), na versão 1.9.2. Estas ferramentas foram essenciais para todo o trabalho, pois permitiram visualizar as moléculas, calcular distâncias e ângulos de interação, obter diferentes representações dos ligantes e das proteínas, e elaborar quase todas as figuras deste trabalho.

Para a identificação das interações clássicas foram utilizados os parâmetros geométricos descritos por ERMONDI e CARON, 2005. Em muitos casos foi necessário utilizar a soma dos raios de van der Waals dos átomos acrescentada de um limite de tolerância de 10%. Esta margem corresponde à aceitação de que, como as estruturas cristalográficas de proteínas podem conter até 60% de água, não são tão rígidas como nos cristais de pequenas moléculas. Ainda, as estruturas

cristalográficas depositadas no PDB apresentam erros experimentais, resumidos num valor R (R-Value), que representa uma variação do resultado da resolução da estrutura para a estrutura real (KARPLUS e DIEDERICHS, 2012). Para um modelo aleatório, R = 0.59 (59%). No caso da estrutura 5JLC, o R é de 0.201 (20.1%). Já para 4H96, o R é de 0.248 (24.8%).

Para os estudos das interações envolvendo sistemas π foram utilizados os descritos por CARACELLI, 2012, 2013a; 2013b, 2014 e SACCO, 2017.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. OS LIGANTES

Os compostos modelados são todos derivados de 1,3-oxazolina (**FIGURA 13** ao centro), possuindo uma região aromática (A) ligada ao átomo C2 (R'), uma metila ligada ao átomo C5 (R''') e uma região de cadeia estendida (C) ligada ao átomo C4 (R''). A série 4/LZ (**FIGURA 13** à esquerda) é composta por 10 estruturas, com uma região A aromática 1-hidroxibenzeno, bem como uma região C igual em todos os compostos. A série 9/CB (**FIGURA 13** à direita) é formada por 16 estruturas com uma região A aromática 1-hidroxinaftaleno e uma região C muito variada, podendo ser um éster ($y = O$) ou uma amida ($y = NH$).

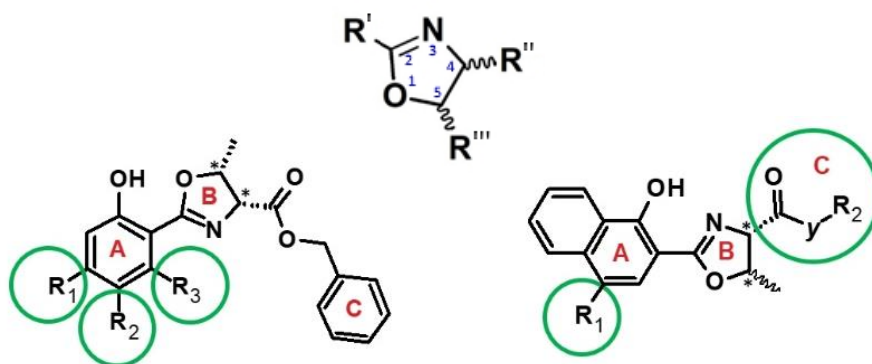


Figura 13. Representação do esqueleto base das duas séries de compostos modelados: ao centro, o esqueleto oxazolina comum a ambas as séries; série 4/LZ à esquerda; série 9/CB à direita. As diferenças nas regiões A e C estão salientadas com círculos verdes e descritas no texto. Figura elaborada pelo autor.

As diferenças nos compostos 4/LZ (**FIGURA 13** à esquerda) estão apenas na substituição e sua posição na região A. Desta forma, temos ligantes *orto*-, *meta*- e *para*-substituídos no anel aromático hidroxibenzeno (região A) em relação à posição da oxazolina (região B), podendo a substituição ser -F, -Cl, -Br, -I, -N₃ ou -OCH₃. A **FIGURA 14** apresenta todos os compostos da série 4/LZ.

No caso da série 9/CB (**FIGURA 13** à direita), a região A é bem conservada em todos os elementos da série, havendo 11 compostos com cloro ligado ao átomo C4 do anel hidroxinaftaleno, 1 com bromo nessa posição, e 4 sem substituição. De

salientar que um composto da série (6) não possui o anel oxazolina, provavelmente por ser o precursor da síntese de todos os outros compostos. A **FIGURA 15** apresenta todos os ligantes da série 9/CB.

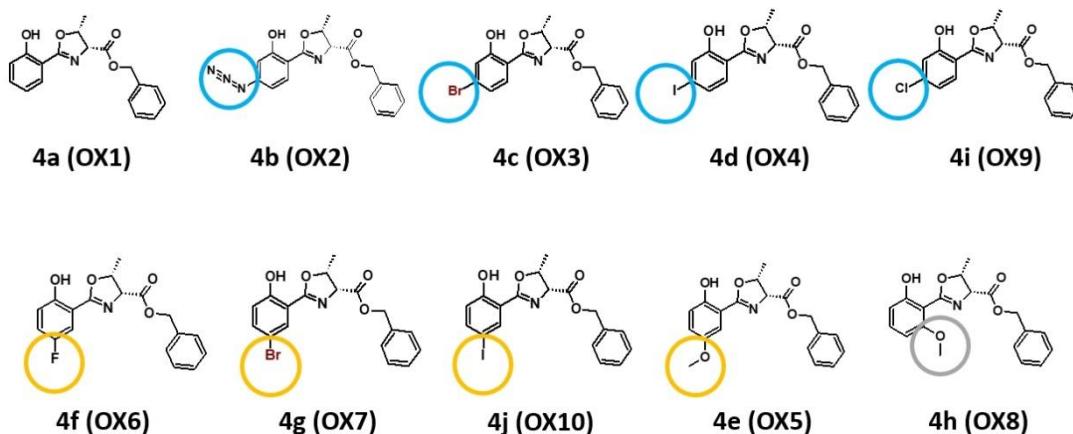


Figura 14. Representação 2D das estruturas dos ligantes da série 4/LZ. Os ligantes estão ordenados de acordo com a substituição na região A, com os grupos substituintes salientados com círculos coloridos: *para*-substituídos em azul; *meta*-substituídos em amarelo; *orto*-substituídos em cinzento. Figura elaborada pelo autor.

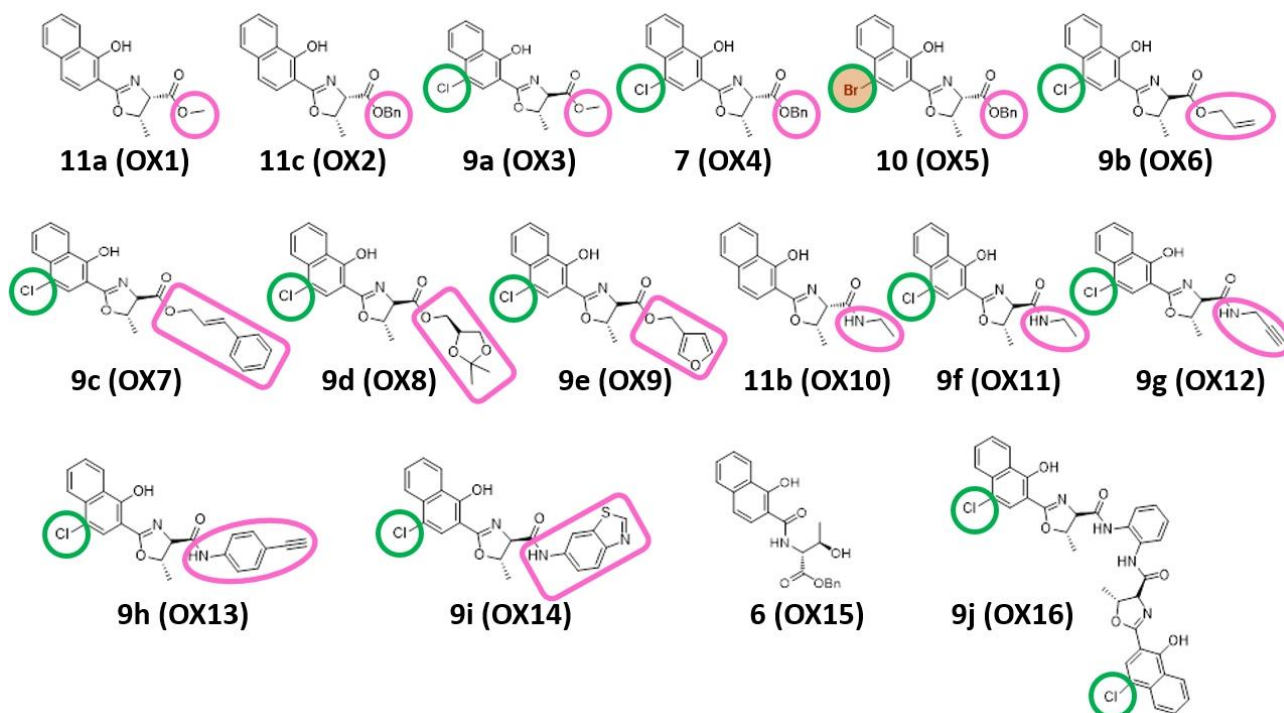


Figura 15. Representação 2D das estruturas dos ligantes da série 9/CB. Os círculos verdes salientam a substituição na região A. Em cor-de-rosa salientam-se as diferentes regiões C. O ligante 10 é o único com substituinte diferente de cloro (bromo). O ligante 6 é o único sem anel oxazolina (região B). Figura elaborada pelo autor.

Após uma busca no CSD, verificou-se a existência de duas estruturas cristalográficas depositadas, com os códigos JEMPLIZ e JEMLOF (BARBEIRO, 2016) (FIGURA 16).

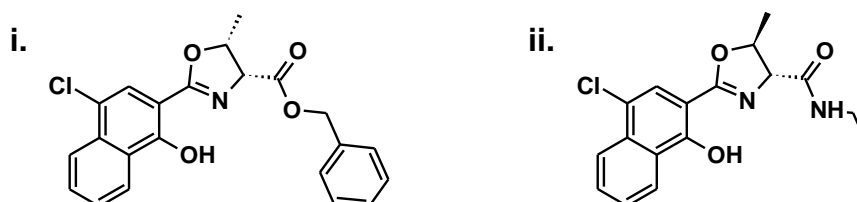


Figura 16. Estruturas depositadas no CSD com os códigos JEMPLIZ (i) e JEMLOF (ii). A estrutura JEMPLIZ corresponde ao composto **7** da série 9/CB e JEMLOF é o enantiômero 4R do composto **9f** (4S). Figura elaborada pelo autor.

4.2. A PROTEÍNA-ALVO

A busca realizada no PDB por estruturas de proteínas complexadas com ligantes, de organismos do gênero *Candida*, resultou em quase 200 estruturas depositadas. Foram selecionadas duas para prosseguir com o trabalho: uma lanosterol 14- α -demetilase (EC 1.14.14.154) de *Candida glabrata* complexada com o inibidor itraconazol® (PDB-ID 1YN) com o código PDB 5JLC (FIGURA 17); e uma diidrofolato redutase (EC 1.5.1.3) de *Candida albicans* complexada com um inibidor (PDB-ID 14Q) com o código PDB 4H96 (FIGURA 18).

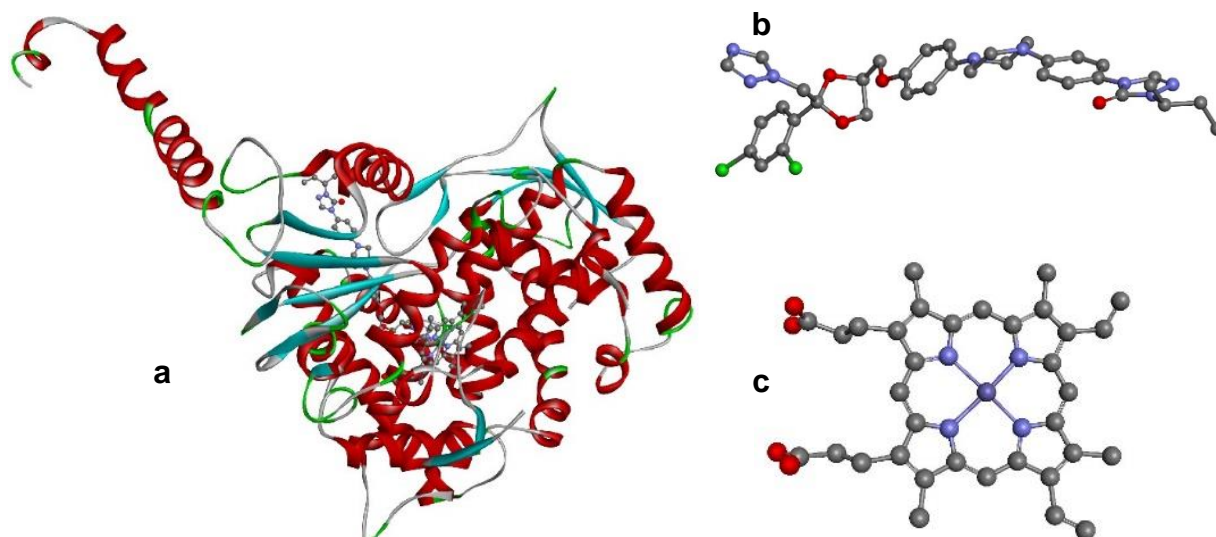


Figura 17. Representação do complexo de código PDB 5JLC (a), do inibidor 1YN (b) e do cofator grupo heme (c) (PDB-ID HEM). Os átomos de H foram omitidos. Figura elaborada pelo autor.

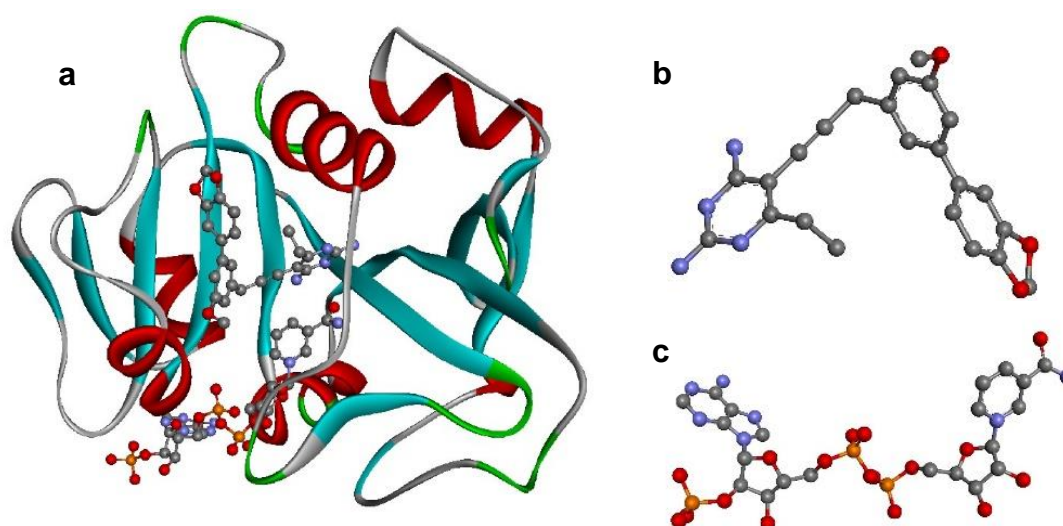


Figura 18. Representação do complexo de código PDB 4H96 (a), do inibidor 14Q (b) e da coenzima NADP (c) (PDB-ID NDP). Os átomos de H foram omitidos. Figura elaborada pelo autor.

A lanosterol 14- α -demetilase de *Candida glabrata* (PDB-ID 5JLC) foi sugerida pelo grupo do Professor Hélio Stefani, possivelmente porque é uma enzima-alvo dos fármacos da família dos azóis (KENIYA, 2018), estando envolvida no metabolismo do ergosterol (GARCIA e PEMÁN, 2018). A estrutura depositada no PDB com o código 5JLC corresponde a um monômero com uma cadeia de 503 resíduos de aminoácidos, que possui a protoporfirina IX com Fe (grupo heme) enterrada no fundo de uma

cavidade com mais de 25,0 Å e foi cristalizada a pH 9.0. A estrutura 5JLC possui 9 resíduos em falta na cadeia peptídica, mas a sua localização na estrutura proteica não interfere com a cavidade de ligação do inibidor cristalográfico para os cálculos de docking molecular, tanto por estar no extremo oposto à cavidade de ligação do inibidor (em relação ao grupo heme), como por estar a mais de 22,0 Å de distância do átomo de ferro do cofator (**FIGURA 19**).

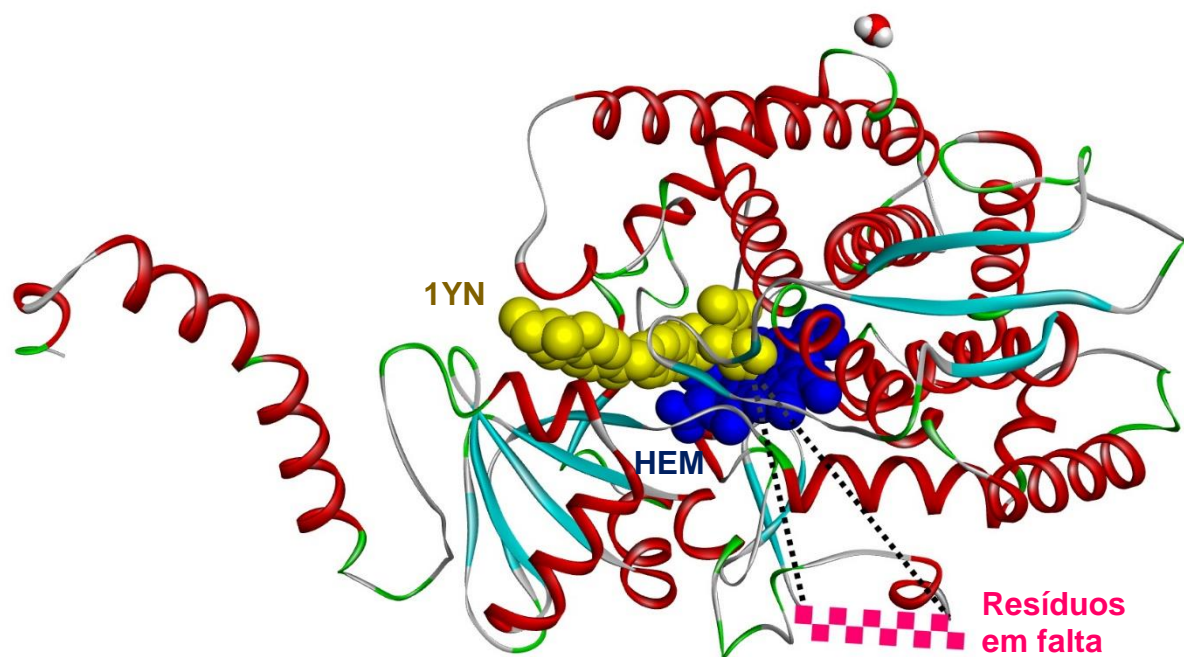


Figura 19. Posição relativa da região com os resíduos de aminoácidos em falta na estrutura proteica de 5JLC (quadrados cor-de-rosa), em relação ao grupo heme (azul) e ao itraconazol (amarelo). As distâncias pontilhadas em preto (24,1 Å e 22,3 Å) evidenciam o afastamento desta região em falta para o átomo de Fe do grupo heme. Uma molécula de água representada para referência e escala. Figura elaborada pelo autor.

A lanosterol 14- α -demetilase catalisa a demetilação no átomo C14 do lanosterol, estando envolvida na via metabólica de síntese do ergosterol, um importante componente da membrana celular dos fungos do gênero *Candida*.

A diidrofolato redutase de *Candida albicans* (PDB-ID 4H96) foi selecionada por três motivos:

- a maioria das estruturas depositadas no PDB de complexos proteína-ligante de fungos do gênero *Candida* corresponde à espécie *Candida albicans*;
- o inibidor 14Q possui três regiões com anéis aromáticos, o que se assemelha aos ligantes sintetizados;
- esta enzima está envolvida no metabolismo de purinas, ainda não considerado como alvo dos antifúngicos comerciais.

A diidrofolato redutase (DHFR – do inglês *dihydrofolate reductase*) é uma enzima envolvida da biossíntese de folatos, catalisando a conversão de 7,8-diidrofolato (DHF – do inglês *dihydrofolate*) em 5,6,7,8-tetraidrofolato (THF – do inglês *tetrahydrofolate*). O THF é um dos metabolitos usado na biossíntese de timidilato, um dos precursores das purinas, nucleotídeos essenciais no ácido ribonucleico (RNA – do inglês *ribonucleic acid*) e no ácido desoxirribonucleico (DNA – do inglês *deoxy ribonucleic acid*). Assim, a diidrofolato redutase é reconhecida como um alvo de fármacos que visam inibir a síntese de ácidos nucleicos em células de proliferação rápida, como em infecções microbianas, ou em tecidos cancerosos. (SAWAYA e KRAUT, 1997; PAULSEN, 2014).

Na estrutura de código PDB 4H96, a DHFR foi cristalizada a pH 6,5 com o grupo prostético nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) e o inibidor de código PDB 14Q. Trata-se de um dímero cristalográfico com 189 resíduos de aminoácido por monômero. A unidade biológica é o monômero.

A DHFR é uma enzima NAD-dependente, isto é, necessita da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) para a catálise (THE UNIPROT CONSORTIUM, P22906). No complexo 4H96, o NDP (código PDB para o ligante nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) realiza uma interação O... π com o inibidor 14Q (**FIGURA 20**).

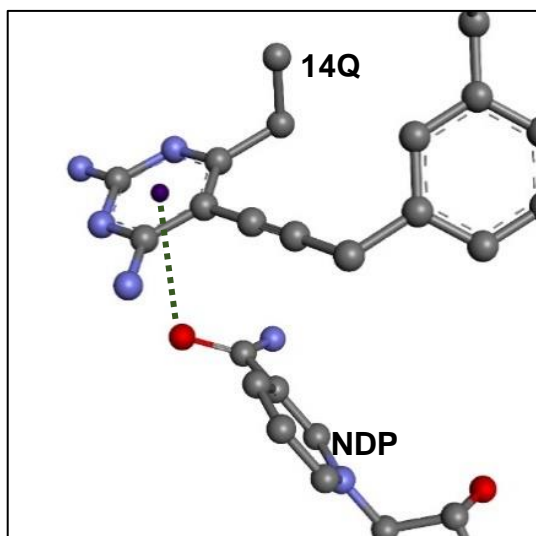


Figura 20. Representação da interação O... π (linha tracejada) entre o NDP e o inibidor 14Q no complexo cristalográfico 4H96: $d = 3,4 \text{ \AA}$, $\theta = 113^\circ$. Os átomos de hidrogênio foram omitidos. Figura elaborada pelo autor.

Esta interação pode ser importante para a estabilização dos ligantes (neste caso, um inibidor) no sítio ativo da enzima.

4.3. DOCKING MOLECULAR

Após os estudos de redocking, procedeu-se aos experimentos de docking molecular dos ligantes 4/LZ e 9/CB na lanosterol 14- α -demetilase de 5JLC e na diidrofolato redutase de 4H96.

- **4.3.1. Estudos de docking na proteína 14- α -demetilase**

Foram executados diversos cálculos de docking molecular, com os parâmetros validados no redocking, e com raios de cálculo variados ($6 \text{ \AA} \leq R \leq 16,0 \text{ \AA}$), pois os ligantes estudados são de dimensões significativamente menores (comprimento $< 20,0 \text{ \AA}$) do que o ligante cristalográfico 1YN (comprimento $\approx 28,0 \text{ \AA}$). O sítio de docking foi definido como centrado no ligante 1YN, acrescido de R . O átomo de Fe do grupo heme foi preparado em diferentes estados de oxidação, Fe^{2+} e Fe^{3+} , mas não foram observadas diferenças significativas no padrão de ligação obtido pelos ligantes. A cadeia lateral do resíduo de histidina 382 (His382 ou H382) foi protonada

apenas no átomo ND1, mantendo o átomo NE2 sem hidrogênio. Não foi admitida nenhuma variação das torções das ligações na cadeia peptídica da lanosterol 14- α -demetilase, nem no grupo heme. As torções foram permitidas livremente no GOLD para os ligantes, baseadas nos dados cristalográficos de pequenas moléculas do CSD. Ainda, o GOLD foi explicitamente responsável pela definição do tipo de átomo (*atom typing*), tanto nos ligantes, como na estrutura cristalográfica. Este procedimento foi importante, uma vez que o GOLD usa a base de dados cristalográficos para definir, de acordo com a distância entre os átomos e os ângulos de ligação, hibridização dos átomos de carbono, sistemas aromáticos, ligações aromáticas ou ressonantes, o que permite ao algoritmo de cálculo estabelecer relações de atração ou repulsão entre os sistemas interagindo. Não foram definidos tautômeros dos resíduos de aminoácidos da cavidade e nenhuma cadeia lateral foi flexibilizada. Também não foi necessário modelar os resíduos em falta na estrutura proteica de 5JLC, pois a sua localização está excluída do volume de cálculo definido para o docking.

Os ligantes de ambas as séries não obtiveram um padrão de ligação no sítio ativo de 5JLC (**FIGURA 21**).

Quando comparados os resultados de docking com os valores de MIC₅₀, também não foi possível sugerir uma correlação. O fato de todos os compostos da serie 4/LZ terem um esqueleto muito semelhante contrasta com as poses muito diversas encontradas no docking em 5JLC. Ainda, os fármacos comerciais da família dos azóis que se encontram complexados com a enzima lanosterol 14- α -demetilase surgem em poses tais que coordenam o Fe do grupo heme através de anéis nitrogenados. Esta interação com o Fe está descrita na literatura como muito importante para a inibição da lanosterol 14- α -demetilase (WARRILLOW, 2013; KENIYA, 2018). Os ligantes estudados possuem um anel nitrogenado (oxazolina), mas a sua conformação (relacionando as regiões A, B e C) não permite que o átomo de nitrogênio da oxazolina se posicione no fundo da cavidade próximo do átomo de Fe do grupo heme de 5JLC.

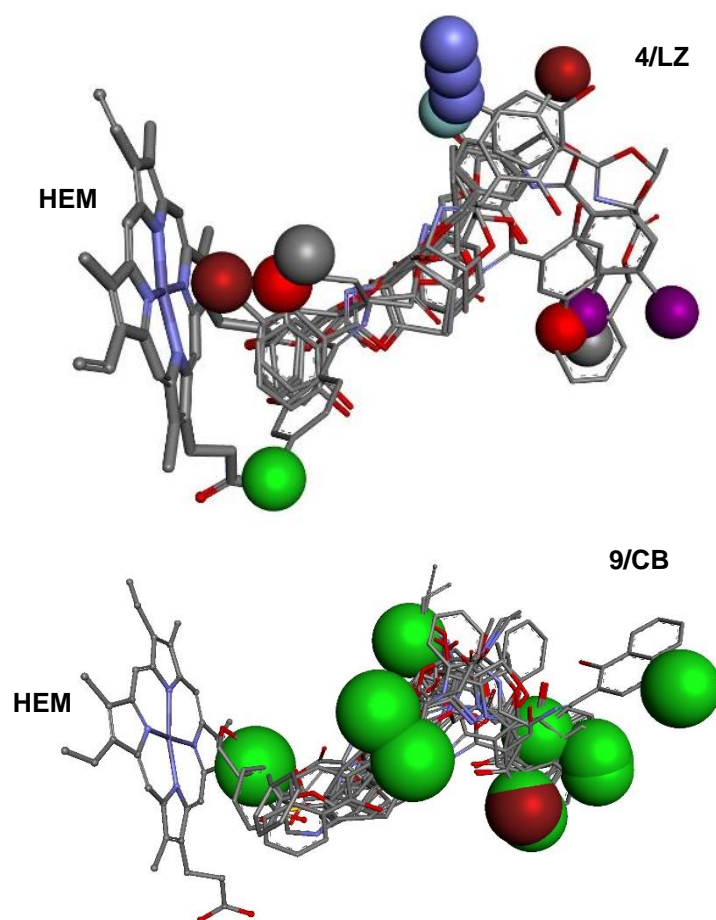


Figura 21. Ausência de um padrão de ligação dos compostos das séries 4/LZ (cima) e 9/CB (baixo) na enzima lanosterol 14- α -demetilase (PDB-ID 5JLC). Os grupos substituintes estão salientados como esferas para melhor visualização. Átomos de H omitidos. Figura elaborada pelo autor.

De acordo com os resultados obtidos no docking molecular, a enzima lanosterol 14- α -demetilase de *C. glabrata* foi descartada como potencial alvo molecular dos compostos estudados.

- **4.3.2. Estudos de docking na proteína diidrofolato redutase**

Os cálculos de docking molecular na estrutura 4H96 foram preparados com o acréscimo dos átomos de hidrogênio à proteína e aos ligantes. O sítio de docking foi definido como centrado no ligante 14Q e acrescido de um raio $R = 12,0 \text{ \AA}$. O sítio de ligação possui o resíduo ácido glutâmico 32 (Glu32, ou E32), que foi configurado como tendo a cadeia lateral ionizada, com as ligações O-C-O definidas como parcialmente duplas. O resíduo metionina 25 (Met25 ou M25) pertence a um loop na entrada do

sítio ativo, e pode, de acordo com SAWAYA e KRAUT, 1997, assumir três configurações na cavidade: oclusão do sítio ativo (impedindo a ligação de ligantes); fechado (quando estão presentes ligantes no sítio ativo); aberto (quando não há ligantes no sítio ativo). M25 possui um confômero (**FIGURA 22**) na estrutura depositada no PDB com o código 4H96. Esse confômero de M25 foi removido antes dos cálculos e mantido o confômero definido na literatura como associado ao sítio de ligação fechado (contendo ligante na cavidade de ligação do substrato).

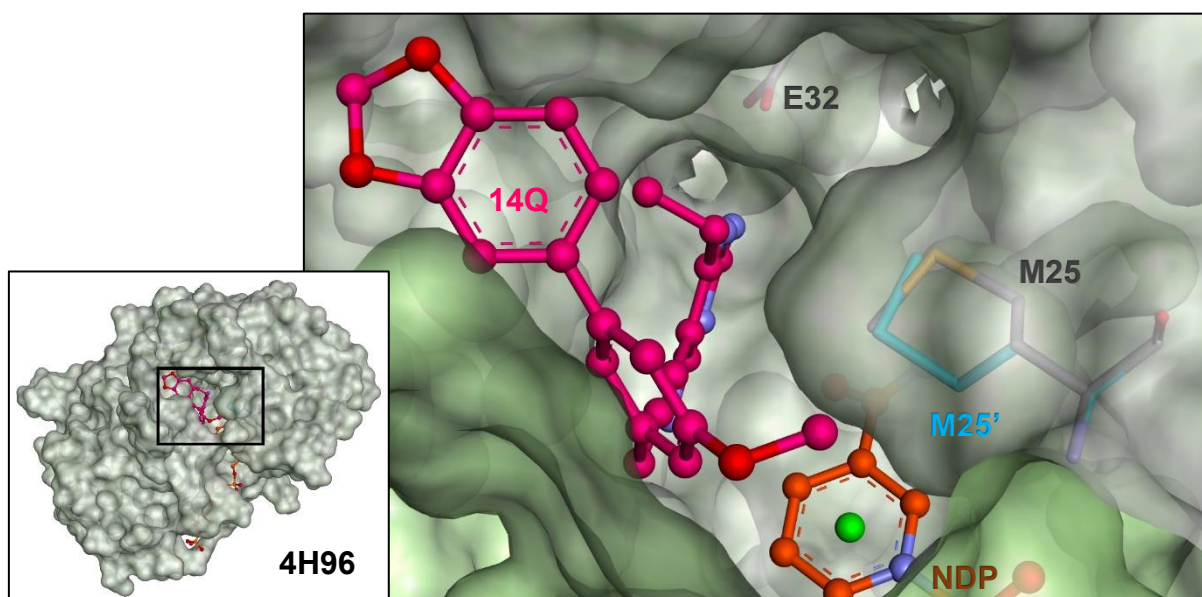


Figura 22. Posição do resíduo M25 na cavidade de ligação e respectivo confômero M25' da cadeia lateral (com os átomos coloridos de azul claro), da estrutura de código PDB 4H96. Ligante 14Q com os átomos de carbono coloridos de cor-de-rosa. Ligante NDP com os átomos de carbono coloridos de cor-de-laranja. Átomos de hidrogênio omitidos. Figura elaborada pelo autor.

Não foram definidos tautômeros dos resíduos de aminoácidos da cavidade e nenhuma cadeia lateral foi flexibilizada. O anel pirimidina do ligante NDP foi definido como aromático, pela análise das distâncias interatômicas. Apenas a cadeia A da estrutura cristalográfica foi utilizada nos estudos de docking.

O docking molecular dos ligantes de ambas as séries no sítio ativo de 4H96 produziu um padrão de ligação muito evidente (**FIGURA 23**).

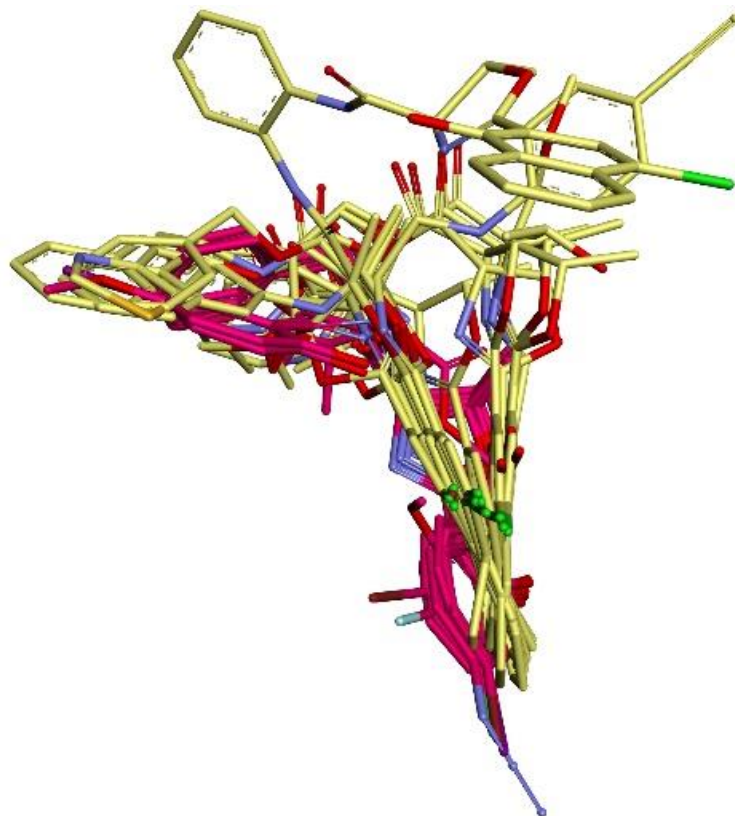


Figura 23. Padrão de ligação das séries 4/LZ (carbonos em cor-de-rosa) e 9/CB (carbonos em amarelo pálido). Átomos de H omitidos. Figura elaborada pelo autor.

O padrão de ligação encontrado sugere que os ligantes estabelecem interações preferenciais dentro da cavidade da proteína correspondente ao sítio ativo. Nesse sentido, como os ligantes da série 4/LZ são estruturalmente semelhantes, exceto pelo grupo substituinte e respetiva posição de substituição na região A, procedeu-se primeiramente ao estudo das interações realizadas por esta série de ligantes.

A análise do padrão de ligação da série 4/LZ (**FIGURA 24**) permite perceber que oito ligantes assumem uma pose com as regiões A, B e C sobrepostas, mas dois ligantes surgem invertidos no sítio, com a região C onde, nos outros ligantes, está a região A.

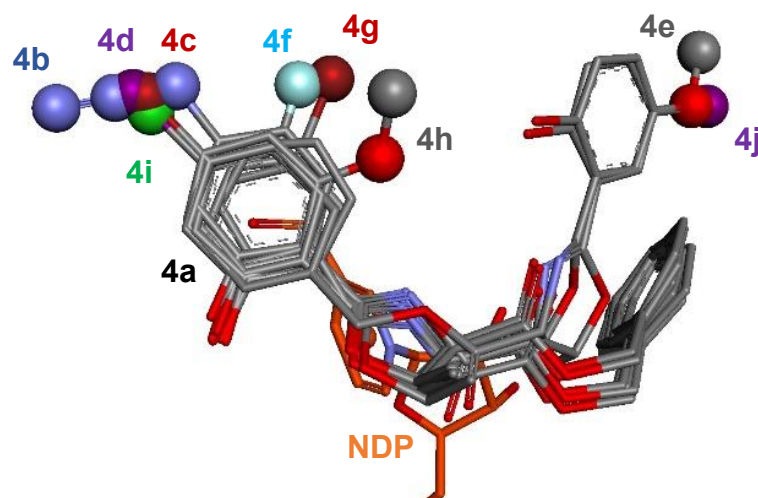


Figura 24. Padrão de ligação obtido para os ligantes da série 4/LZ na enzima diidrofolato redutase (PDB-ID 4H96). Os grupos substituintes estão representados como esferas para melhor visualização. NDP com carbonos em laranja. Átomos de H omitidos. Figura elaborada pelo autor.

O fundo da cavidade (**FIGURA 25**) é delimitado por quatro resíduos de aminoácidos: isoleucina 9 (I9, ou Ile9), valina 10 (V10 ou Val10), alanina 11 (A11 ou Ala11) e ácido glutâmico 32 (E32 ou Glu32). Glu32 também se situa na fronteira de dois bolsos que surgem no fundo da cavidade (**a** e **b**), como apresentado na **FIGURA 25**.

O bolso **a**, maior, está delimitado pelos resíduos Glu32 e Ile112. É neste bolso que a maioria dos ligantes posiciona a região A (com os grupos substituintes). O bolso **b**, menor, é delimitado mais profundamente por E32 e, exteriormente na cavidade, pelo resíduo de metionina 25 (M25 ou Met25).

A observação detalhada dos compostos na cavidade do sítio de ligação permitiu sugerir uma explicação para os compostos **4e** e **4j** se acomodarem de forma diferente dos demais da mesma série. Como a região C corresponde a um anel benzênico em todos os ligantes da série 4/LZ, os ligantes invertidos no sítio de ligação possuem essa região localizada no bolso **a**, onde todos os outros ligantes posicionam a região A. No entanto, a região A possui o grupo hidroxila e os haletos substituintes, que permitem estabelecer interações que a região C não consegue.

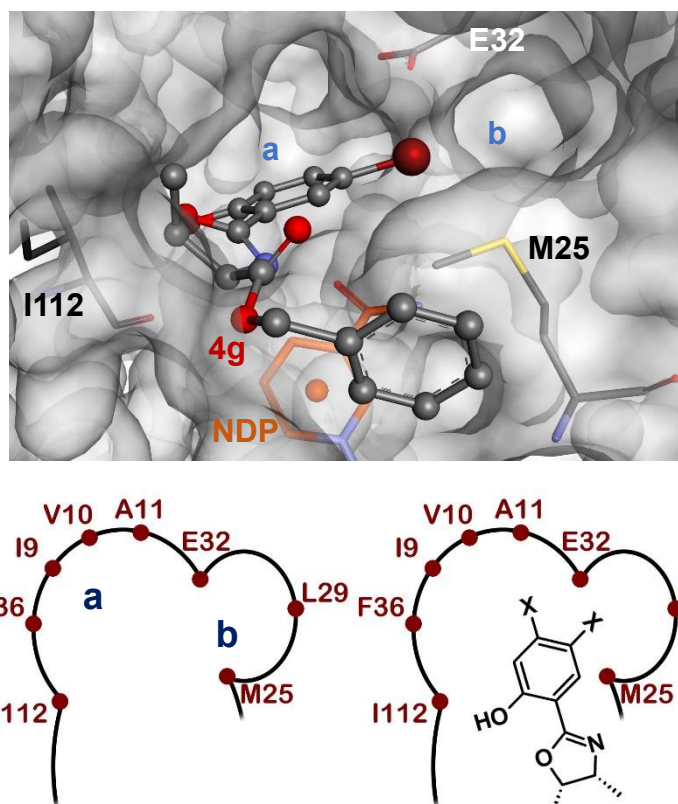


Figura 25. Superfície da cavidade do sítio ativo de 4H96 com o ligante **4g** (em cima) e esquemas de corte da cavidade com os bolsos **a** e **b** assinalados (em baixo à esquerda) e com as regiões A e B dos ligantes posicionadas no fundo da cavidade (em baixo à direita). A letra X marca as posições *meta*- e *para*-substituídas nos ligantes 4/LZ no sítio de ligação. Figura elaborada pelo autor.

A menor distância medida entre as cadeias laterais de E32 e M25 é, em 4H96, de 5,7 Å entre OE1_{E32} e HE1_{M25} (**FIGURA 26**). Sendo os raios de van der Waals do hidrogênio e do oxigênio $r_{vdW}(H) = 1,0 \text{ \AA}$ e $r_{vdW}(O) = 1,5 \text{ \AA}$, sobram cerca de 3,2 Å para um átomo de um ligante se acomodar. Como o átomo de iodo de **4j** tem um raio de van der Waals $r_{vdW}(I) = 2,1 \text{ \AA}$, o seu diâmetro de 4,2 Å é significativamente maior que o espaço disponível para se posicionar entre os resíduos M25 e E32. Do mesmo modo, o grupo metoxila (-OCH₃) de **4e** também não consegue se posicionar como **4g** (-Br) e **4f** (-F). Assim, a proximidade das cadeias laterais de M25 e E32 pode impedir grupos muito volumosos orientados para o bolso **b**, como é o caso dos ligantes **4e** (*m*-I) e **4j** (*m*-OCH₃). Ainda assim, a região C (benzeno) dos ligantes **4e** e **4j** posiciona-se no interior da cavidade, sendo que a região substituída (região hidroxibenzeno) fica orientada para fora da cavidade, interagindo com o solvente.

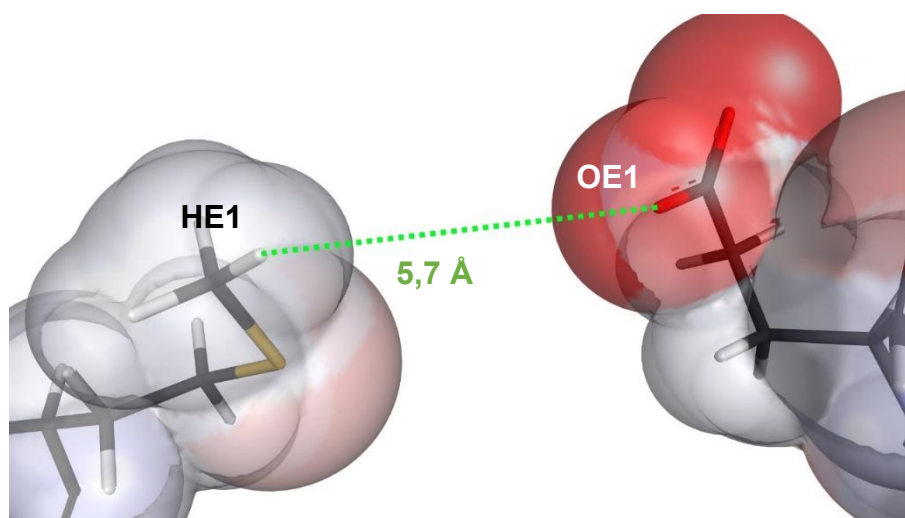


Figura 26. Distância entre os resíduos M25 e E32 da enzima diidrofolato redutase de *C. albicans* com o código PDB 4H96, medida nos átomos mais próximos. Figura elaborada pelo autor.

Assim, os ligantes *para*-substituídos (**4b**, **4d**, **4c**, **4i**) ficam com o substituinte no bolso **a**, enquanto os ligantes *meta*-substituídos por flúor (**4f**) e bromo (**4g**) ficam com o haleto voltado para o bolso **b**. O único ligante *orto*-substituído (**4h**) apresenta o grupo *o*-metoxila voltado para o bolso **b**, e o ligante **4a**, não tem substituição na região A, mas orienta-se como a maioria dos ligantes.

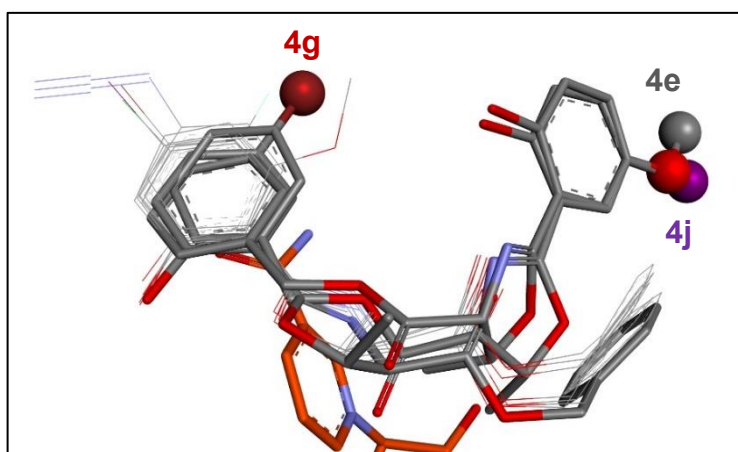


Figura 27. Poses de docking dos compostos da série 4/LZ e tabela com os valores de MIC₅₀, salientando-se os ligantes **4g**, **4e** e **4j**. Grupos substituintes representados como esferas para clareza de visualização. Átomos de H omitidos. A tabela está organizada pelos valores de MIC₅₀. Figura elaborada pelo autor.

Ligante	MIC ₅₀ (µg/mL) em <i>C. albicans</i>
4g	0,12
4i	0,25
4b	0,50
4c	0,50
4d	1,00
4f	1,00
4j	1,00
4a	1,00
4e	2,00
4h	16,00

O composto **4g** foi o que apresentou menor MIC₅₀ na série 4/LZ. Quando comparado com os ligantes **4e** e **4j**, pode-se perceber uma grande variação dos MIC₅₀ destes compostos, que pode estar relacionada com a sua diferente orientação no sítio de ligação (**FIGURA 27**).

Uma interação que foi encontrada em todos os ligantes foi com a coenzima NAD-fosfato (PDB-*Ligand* ID NDP) (**FIGURA 28**). Nesta interação, o átomo de oxigênio da região nicotinamida de NDP encontra-se a uma distância dos sistemas aromáticos (π) dos ligantes inferior à soma dos raios de van der Waals ($d = 3,8 \text{ \AA}$). Esta distância e o ângulo favorável ($100^\circ < \theta < 160^\circ$) permitem classificar uma importante interação – O(LP)... π , também encontrada com o ligante cristalográfico (**FIGURA 20**) que pode ser localizada, semilocalizada, ou deslocalizada (CARACELLI, 2013).

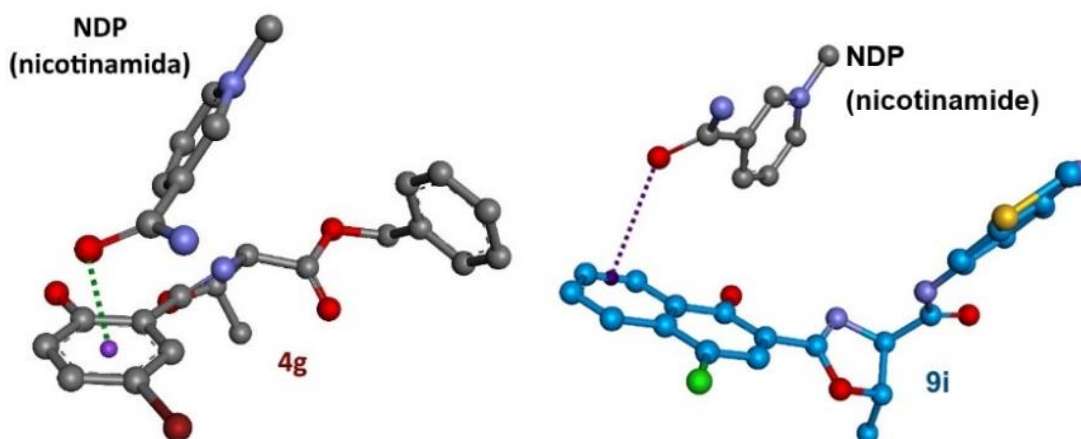


Figura 28. A linha tracejada representa a interação O(LP)... π entre o oxigênio da região nicotinamida de NDP e o sistema aromático dos ligantes mostrada para o ligante **4g** (esquerda) $d = 3,0 \text{ \AA}$, $\theta = 108^\circ$, e para o ligante **9i** (direita) $d = 3,3 \text{ \AA}$, $\theta = 136^\circ$. Átomos de H omitidos. Figura elaborada pelo autor.

A interação representada na **FIGURA 28** facilita o posicionamento da região aromática dos ligantes, o que contribui para a sua estabilidade no sítio de ligação.

Outra interação que contribui para a estabilidade dos ligantes no sítio de ligação é a ligação de hidrogênio que podem efetuar *via* hidroxila da região A com os resíduos próximos isoleucina 9 (I9 ou Ile9), isoleucina 112 (I112 ou Ile112) e tirosina 118 (Y118 ou Tyr118). A **FIGURA 29** representa um exemplo de cada série a realizar essa interação.

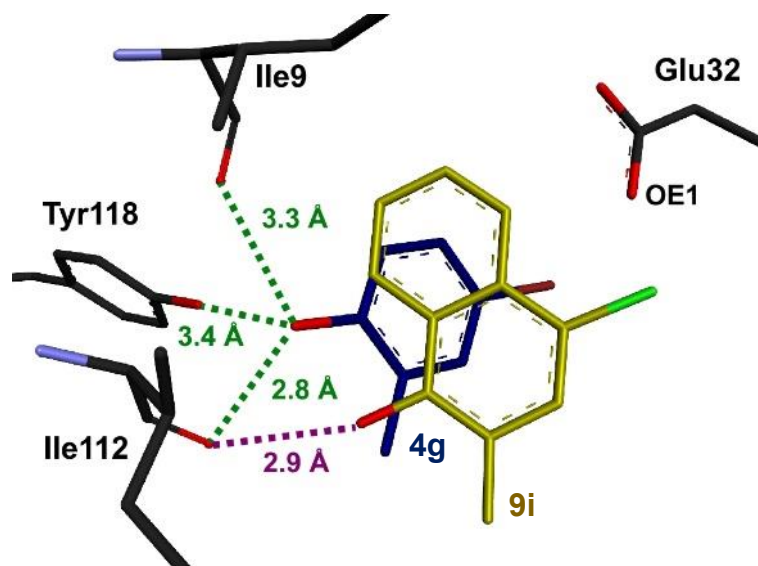


Figura 29. Ligações de hidrogênio (HB) que se estabelecem entre o grupo hidroxila da região A e resíduos de aminoácidos vizinhos. O tracejado verde representa as HB para o ligante **4g** (carbonos em azul). O tracejado roxo representa a HB para o ligante **9i** (carbonos em amarelo). Apenas as regiões A de **4g** e **9i** estão representadas. Átomos de H omitidos. Figura elaborada pelo autor.

Os resíduos I9, I112 e Y118 estão localizados no bolso **a** da cavidade, opostos a E32. Desta forma, como as regiões A dos ligantes são planares devido aos anéis aromáticos hidroxibenzeno (série 4/LZ) e hidroxinaftaleno (série 9/CB), a realização de uma ligação de hidrogênio entre o grupo hidroxila dos ligantes e I9, I112 e Y118 permite um posicionamento do haleto substituinte próximo da (e orientado para a) cadeia lateral de E32 e, especificamente, para o átomo OE1.

a) Série 4/LZ

Os ligantes *para*-substituídos da série 4/LZ, que apresentam os MIC₅₀ intermédios, têm o substituinte voltado para o bolso **a** da cavidade. Aí estabelecem interações do tipo van der Waals com os resíduos de aminoácidos do fundo da cavidade, nomeadamente I9, V10 e A11 (**FIGURA 30**).

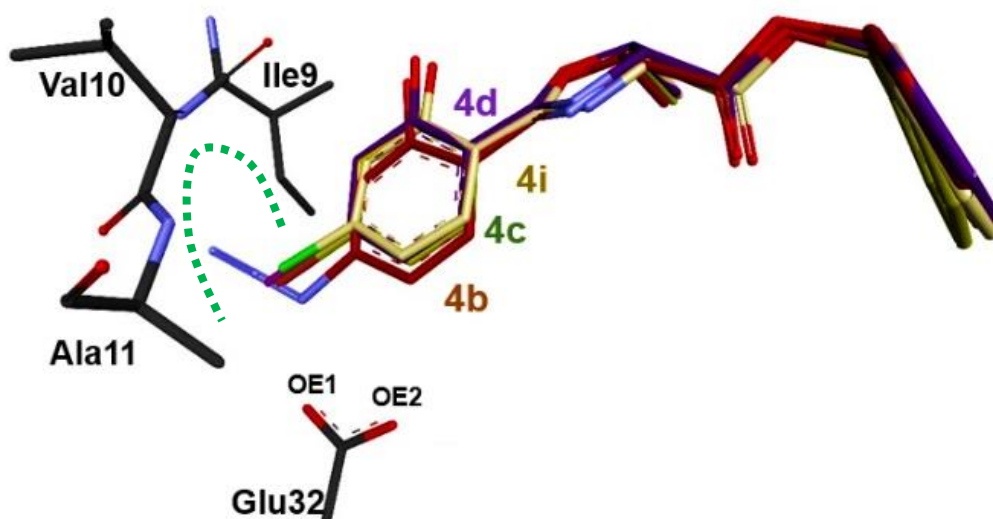


Figura 30. Vizinhança dos ligantes 4/LZ na região A *para*-substituída. A linha tracejada representa a região de interações de van der Waals dos grupos substituintes dos ligantes com a proteína. Átomos de H omitidos. Figura elaborada pelo autor.

Foi observado que o resíduo Glu32 realiza interações, sobretudo com os haletos e substituintes dos ligantes da série 4/LZ, pelos átomos de oxigênio da cadeia lateral. No entanto, com os ligantes *para*-substituídos, a interação é com ambos os átomos de oxigênio (OE1 e OE2), enquanto para os ligantes *meta*-substituídos, essa interação é preferencialmente com OE1 (**FIGURA 31**).

Para melhor caracterizar as interações Glu32-ligantes 4/LZ, foram realizados cálculos de interações não-covalentes. A **FIGURA 32** apresenta as isossuperfícies de interação para cada ligante com Glu32.

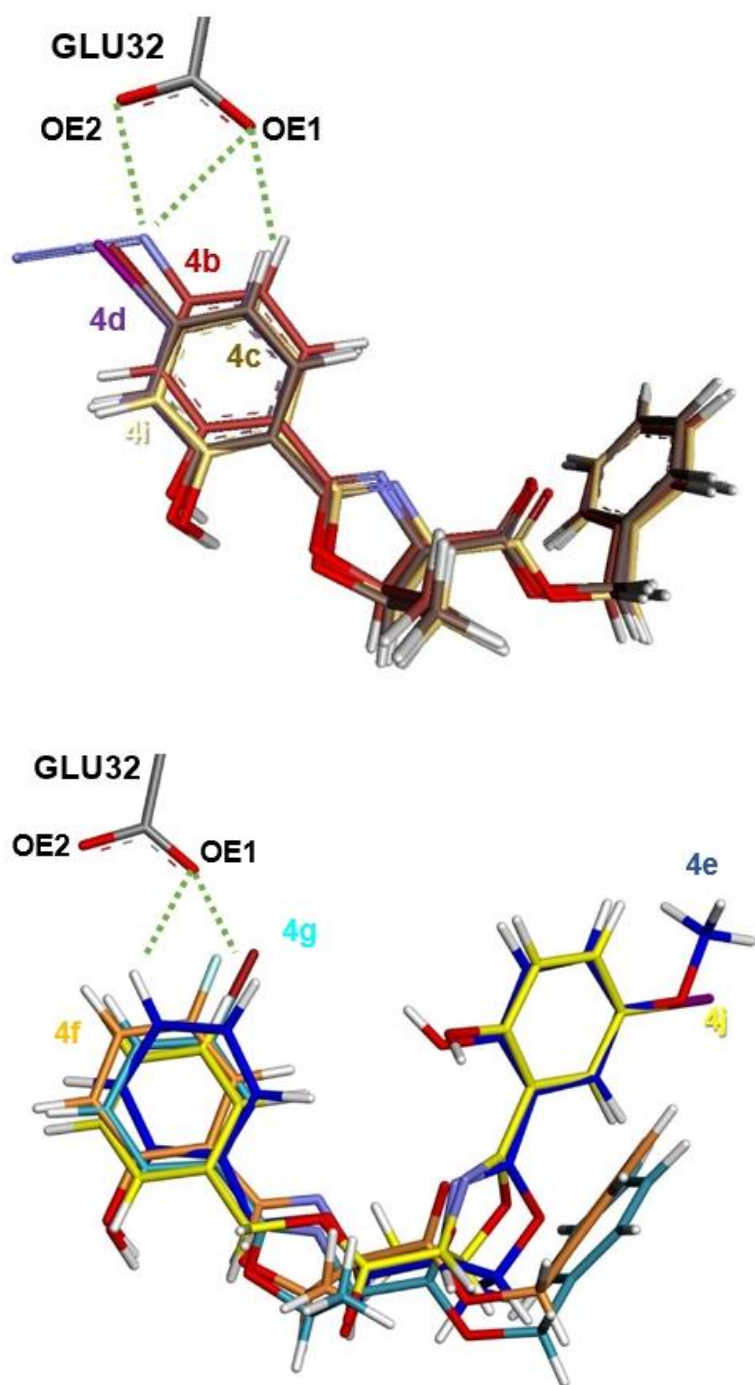
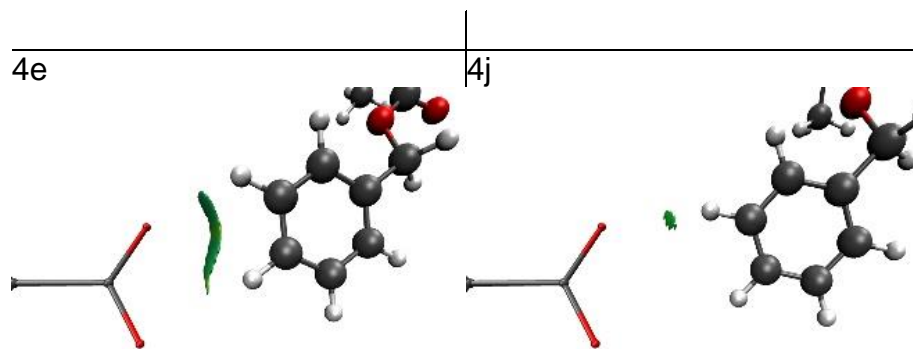
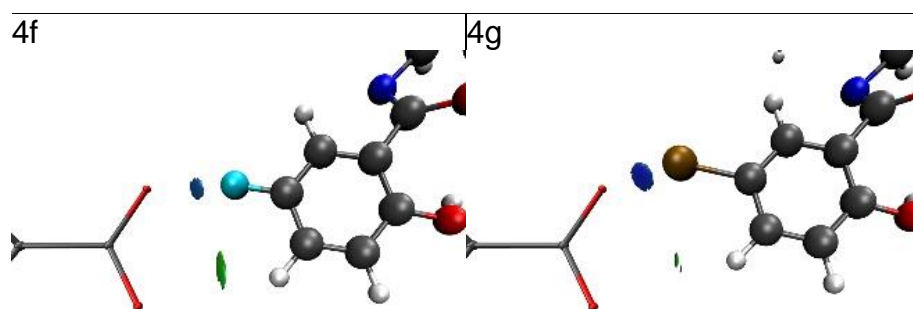
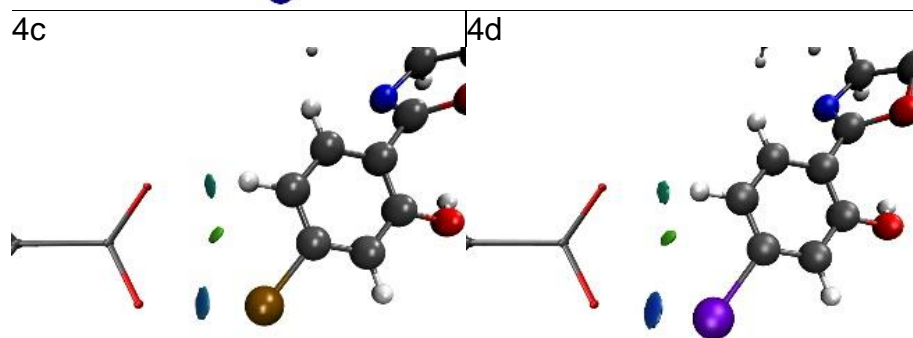
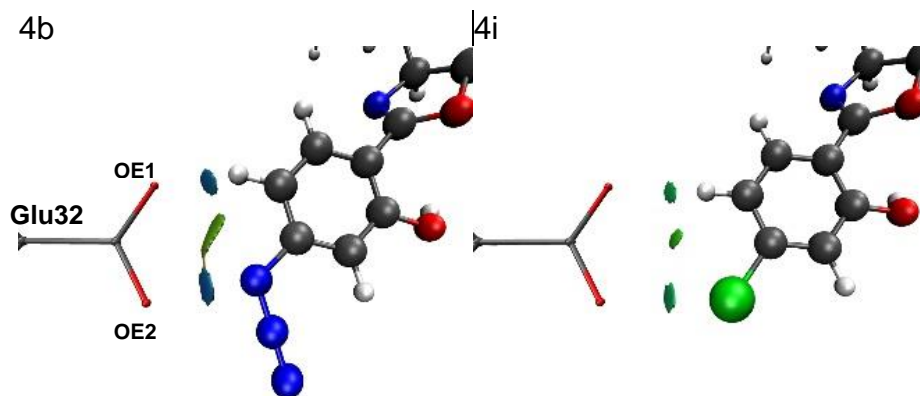


Figura 31. Interações entre a região A dos ligantes e os átomos OE1 e OE2 da cadeia lateral de Glu32. Em cima, os ligantes *para*-substituídos. Em baixo, os ligantes *meta*-substituídos. O átomo OE1 fica voltado para o bolso **b** da cavidade, enquanto OE2 fica voltado para o bolso **a**. Figura elaborada pelo autor.



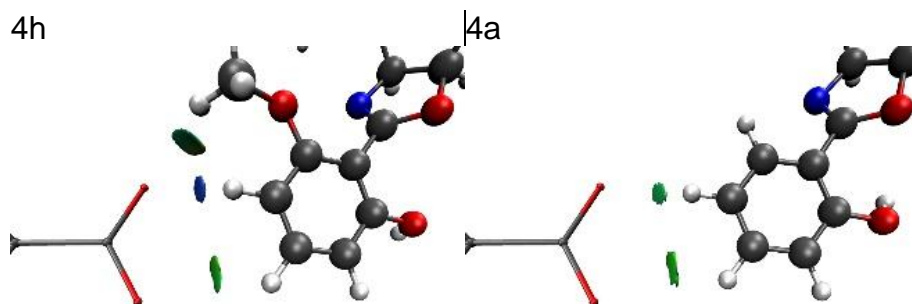


Figura 32. Isossuperfícies de interação dos ligantes 4/LZ com Glu32, representado com a cadeia lateral. Foram mantidas as orientações da cadeia lateral de Glu32, para facilidade de comparação das interações com os ligantes. Isossuperfície mais azul corresponde a interação com caráter mais atrativo. Isossuperfície vermelha corresponde à interação repulsiva. A cor verde suave corresponde à interação muito fraca. Figura elaborada pelo autor.

A **FIGURA 32 (4b, 4i, 4c e 4d)** apresenta os ligantes *para*-substituídos. Como verificado na análise em tela gráfica, as interações da região A são bem difusas e ocorrem tanto com OE1, como com OE2 de Glu32, sendo que o grupo substituinte interage com OE2 (principalmente) e OE1.

Na **FIGURA 32 (4f, 4g, 4e e 4j)**, os ligantes *meta*-substituídos dividem-se em dois grupos: os que possuem o haleto em interação com OE1 de Glu32 (voltado para o bolso **b** da cavidade); e os que estão invertidos na cavidade (com o anel benzênico da região C interagindo com Glu32).

Na **FIGURA 32** ainda apresenta os ligantes **4h** (*orto*-substituído com $-OCH_3$) e **4a** (sem substituição).

De todos os ligantes, apenas **4g** realiza uma interação muito atrativa (isossuperfície azul escura), bem definida entre Br e OE1. Todos os outros ligantes apresentam interações mais difusas, ou fracas (isossuperfície verde clara), ou com OE1 e OE2.

Junto com as outras interações descritas neste trabalho, esta interação do haleto do ligante **4g** com OE1 de Glu32, no sítio de ligação, parece ser a mais favorável para uma melhor atividade biológica.

Uma vez que a série 4/LZ possui ligantes com *m*-F e *m*-Br similarmente orientados na cavidade da diidrofolato redutase, foram feitos estudos com o ligante

modelado *m*-Cl. A previsão era que teria o mesmo padrão de ligação e isossuperfícies de NCI intermédias entre **4f** e **4g**. Como pode ser observado na **FIGURA 33**, as interações fracas (picos verdes nos gráficos 2D) diminuem quando o substituinte muda de F para Cl. Além disso, o pico azul (atrativo), move-se para o quadrante mais negativo de “ $\text{sign}(\lambda_2)\rho$ ” quando o substituinte varia de F→Cl→Br, o que caracteriza o aumento do caráter atrativo da interação haleto-OE1.

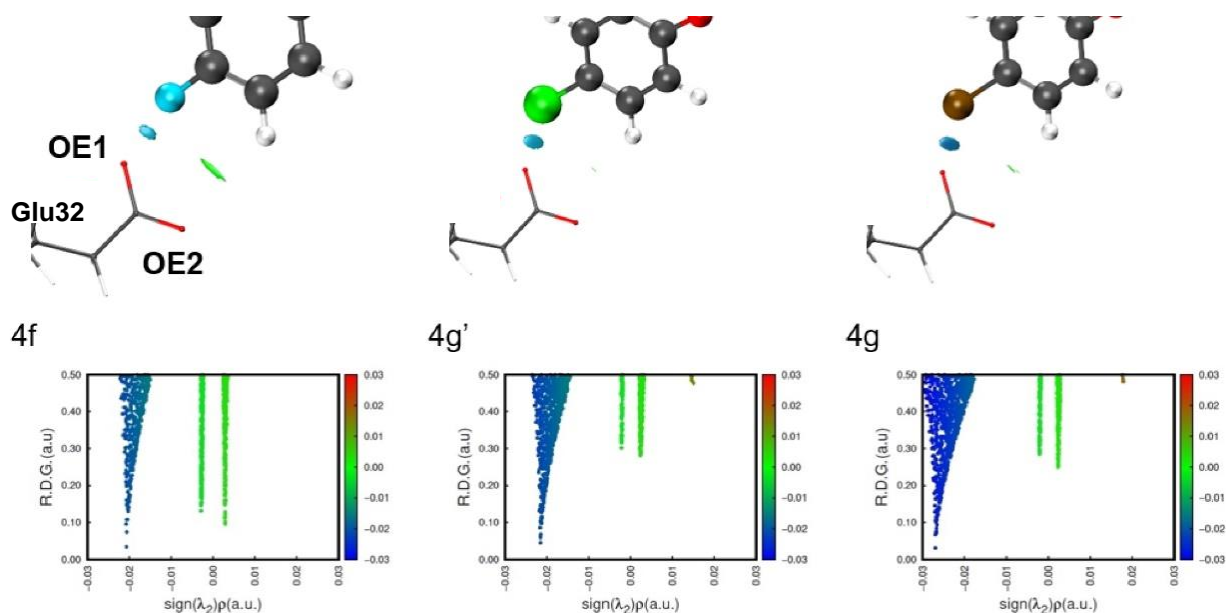


Figura 33. Isossuperfícies de NCI (em cima) e gráficos 2D (em baixo) das interações entre as regiões A dos ligantes **4f**, **4g'** e **4g** com Glu32. O ligante **4g'** não pertence a nenhuma série de compostos sintetizados. (Figura elaborada pelo autor)

Estes resultados de NCIPLLOT para o ligante **4g'** permitem supor que, se fosse um composto da série 4/LZ e fosse submetido aos ensaios *in vitro* em *Candida spp.*, o valor esperado para o MIC₅₀ desse composto estaria entre os valores de MIC₅₀ de **4f** e **4g**, pois o Cl tem uma dimensão entre o F e o Br e o padrão de ligação obtido no docking molecular também posiciona o haleto no fundo da cavidade e orientado para o bolso **b**.

Vale salientar que os picos de interações fracas são bem significativos em **4f** e diminuem grandemente em **4g**. Uma possível explicação para o MIC₅₀ de **4f** ser oito vezes mais elevado que o de **4g** pode ser o volume do átomo: como F é muito menos volumoso que Br, toda a região A de **4f** se desloca na cavidade, permitindo uma maior proximidade de Glu32; isso leva ao surgimento de mais interações difusas e fracas, o

que pode significar uma menor capacidade do ligante permanecer no sítio e estar relacionado com uma menor eficácia inibitória.

A observação dos resultados dos cálculos de NCI para o ligante **4h** (FIGURA 34) também permite uma correlação com o MIC₅₀ elevado (16.00 µg/mL).

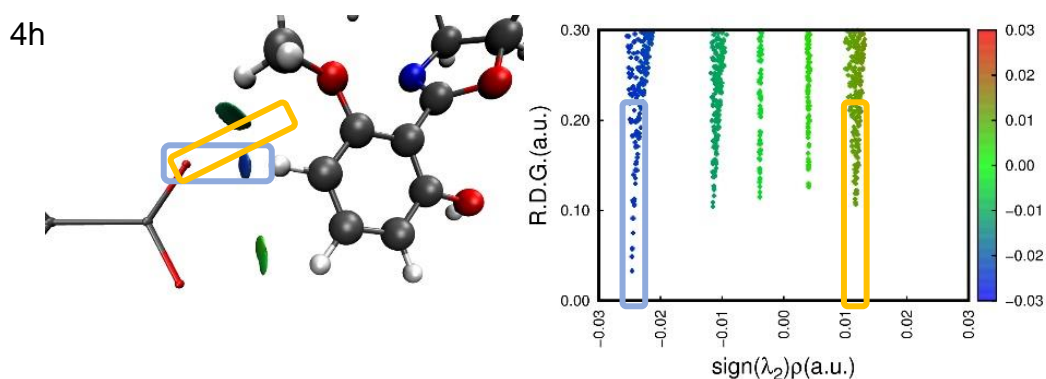


Figura 34. Isossuperfícies de NCI (à esquerda) e gráfico 2D (à direita) das interações entre a região A de **4h** e Glu32. As caixas azuis salientam a interação mais atrativa e as caixas laranja salientam a interação mais repulsiva. Figura elaborada pelo autor.

Apesar da interação **4h**–Glu32 ser globalmente atrativa (vários picos no quadrante negativo do gráfico 2D, também surge uma interação repulsiva entre o substituinte metoxila e OE1 de Glu32 (caixa laranja), que não aparece nos outros ligantes da série.

Os resultados de docking molecular da série 4/LZ mostraram que a posição *meta*-substituída é a que mais contribui para um adequado posicionamento dos ligantes no sítio de ligação, orientando o grupo substituinte halogenado para o bolso **b** da cavidade e interagindo com o resíduo Glu32, especialmente com o átomo OE1. Esta análise permite afirmar que a interação que os ligantes realizam com Glu32 é determinante para a atividade do composto.

b) Série 9/CB

Em seguida, foi realizada a análise das interações obtidas dos resultados de docking molecular nos 16 ligantes 9/CB.

À semelhança dos ligantes 4/LZ, o docking molecular da série 9/CB posiciona a região hidroxinaftaleno alongada no bolso **a** da cavidade, com os grupos

substituintes (Cl e Br), quando presentes, orientados para o bolso **b** da cavidade (FIGURA 35).

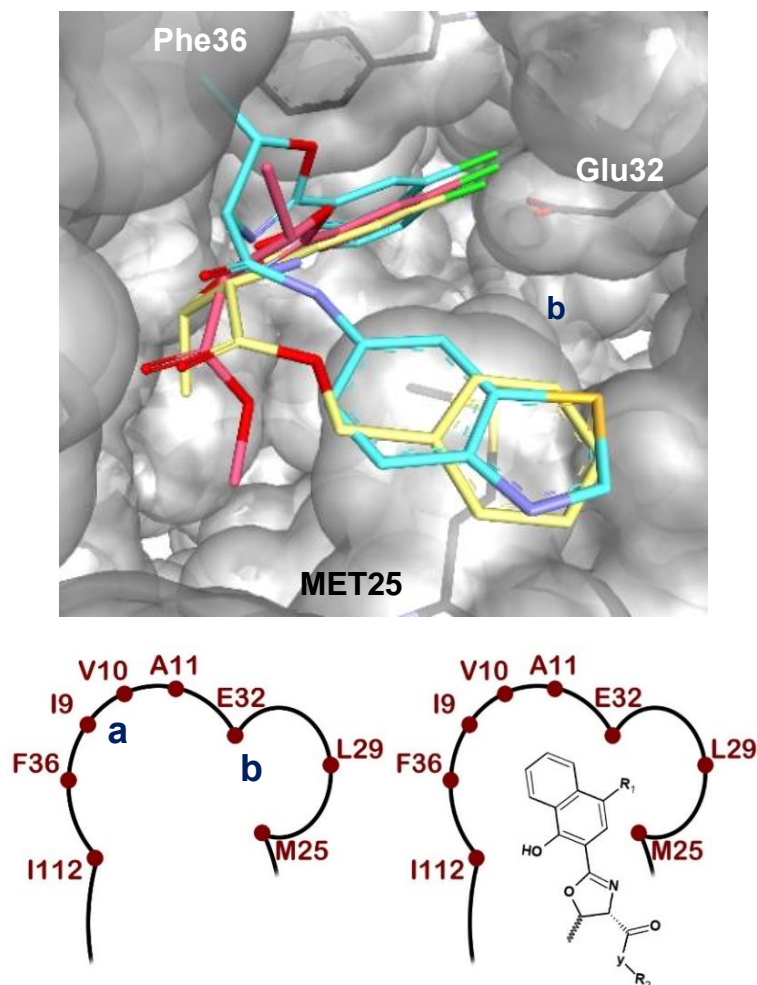


Figura 35. Em cima: superfície da cavidade do sítio ativo de 4H96 com os ligantes **7** (carbonos em amarelo), **9i** (carbonos em azul claro), e **9a** (carbonos em salmão). Em baixo, à esquerda: esquema de corte da cavidade com os bolsos **a** e **b** assinalados. Em baixo, à direita: orientação da região A dos ligantes 9/CB posicionada no fundo da cavidade. Figura elaborada pelo autor.

Em comparação com a série 4/LZ, a estabilidade dos ligantes 9/CB no sítio ativo da diidrofolato redutase de *C. albicans* é incrementada pelo surgimento de uma interação $\pi\cdots\pi$ entre a região hidroxinaftaleno dos ligantes e o anel aromático do resíduo fenilalanina 36 (F36 ou Phe36). Assim, a região hidroxinaftaleno é mantida no sítio de ligação pela interação O(LP) $\cdots\pi$ com o NDP (FIGURA 28) e, no plano oposto, pela interação $\pi\cdots\pi$ com a Phe36 (FIGURA 36).

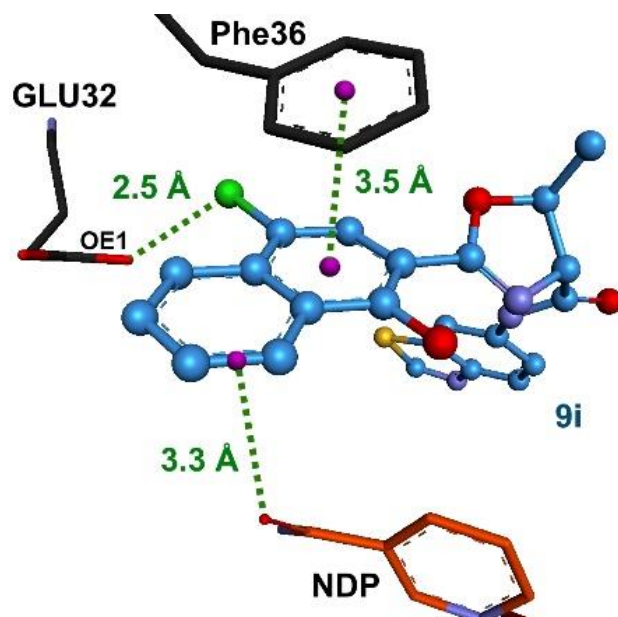


Figura 36. Interações que contribuem para fixar a região A dos ligantes 9/CB no sítio de ligação. Átomos de H omitidos. Figura elaborada pelo autor.

As poses de docking dos ligantes mais compridos apresentaram uma curvatura, como se os compostos se posicionassem a envolver uma estrutura da proteína. Isso foi constatado com o resíduo metionina 25 (M25 ou Met25). A análise da estrutura tridimensional da diidrofolato redutase em 4H96 mostrou que M25 faz parte de um loop que fecha o acesso ao bolso **b** da cavidade de ligação (**FIGURA 35** à esquerda). Assim, o fundo da cavidade não consegue acomodar os ligantes da série 4/LZ que obtiveram poses invertidas.

O loop que contém M25 é muito bem estruturado, permitindo a M25 permanecer com a cadeia lateral sem torsões muito variadas. Isso sucede porque o resíduo triptofano 27 (W27 ou Trp27), separado de M25 por apenas outro resíduo (Pro26), posiciona a cadeia lateral aromática de forma a poder aceitar interações CH... π de M25 (**FIGURA 37**).

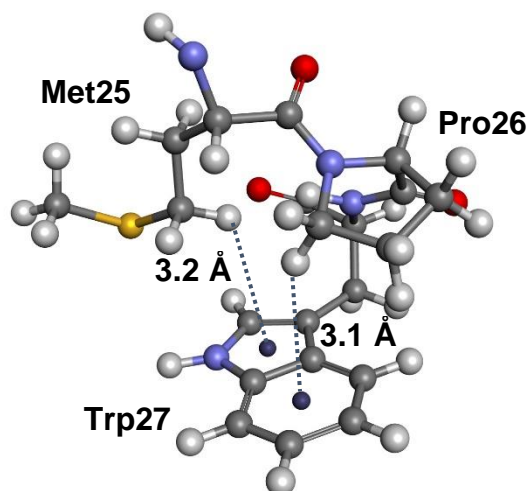
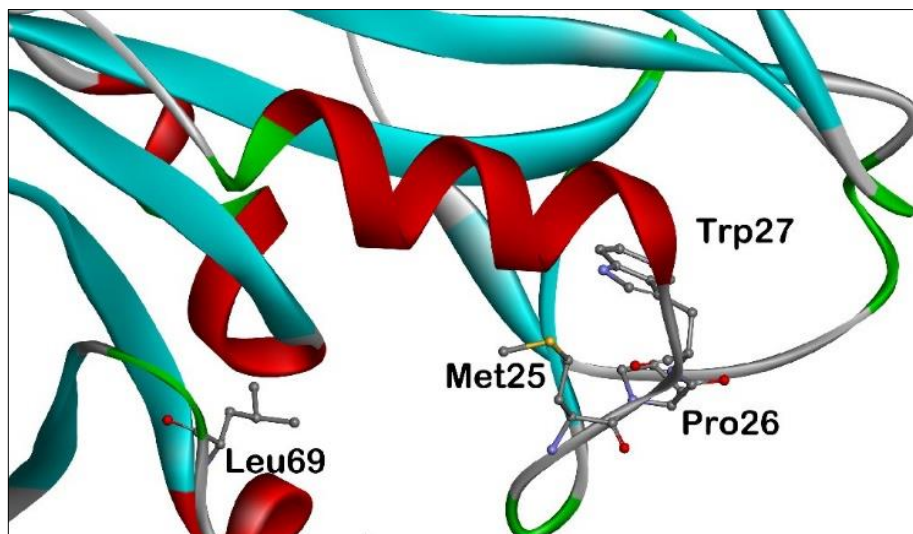


Figura 37. Posição de Met25 no loop com Pro26 e Trp27 (em cima). Oposto a Met25 na cavidade está o resíduo Leu69. Em baixo, interações CH... π de Met25 e Pro26 com Trp27. Figura elaborada pelo autor.

Com a cadeia lateral estável, M25 pode envolver-se em interações CH... π , também, com os ligantes na cavidade (**FIGURA 38**).

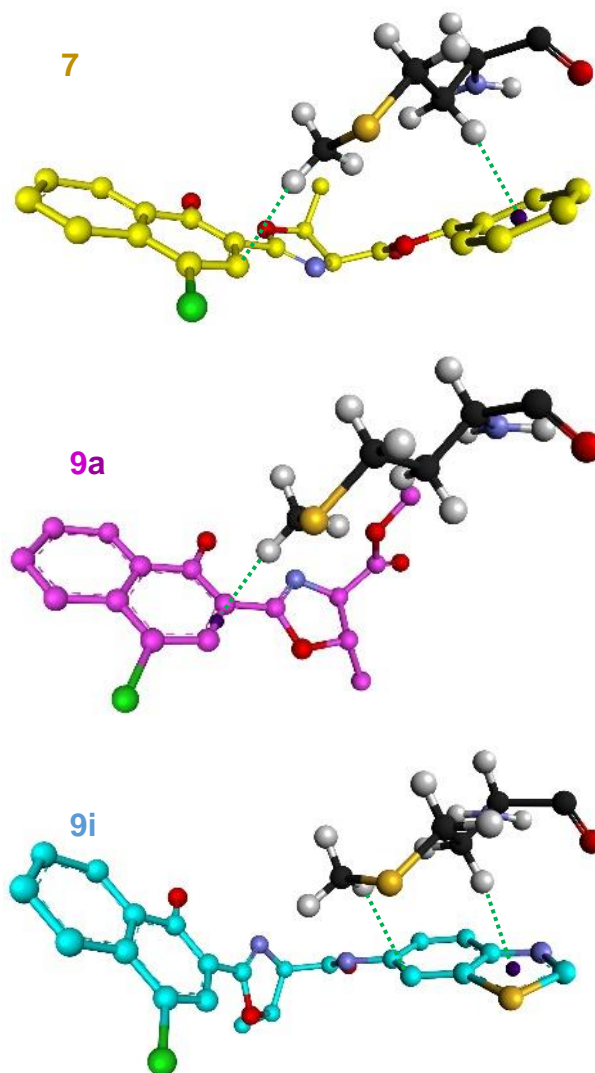


Figura 38. Três exemplos de ligantes envolvidos em interações CH... π com Met25: **7** (carbonos em amarelo); **9a** (carbonos em rosa); e **9i** (carbonos em ciano). As distâncias de interação variam de 2,2 Å a 2,7 Å. Átomos de H omitidos nos ligantes. Figura elaborada pelo autor.

A comparação dos padrões de ligação dos ligantes que obtiveram menores MIC₅₀ com os que obtiveram os maiores (**FIGURA 39**) permitiu a clarificação de mais uma interação que valida a relação dos experimentos *in silico* com os ensaios biológicos.

Os compostos com menores MIC₅₀ são **7**, **9a** e **9i** e a sua região C encontra-se próxima do loop Tyr21-Leu29, que contém Met25. Destes ligantes, apenas **9a** não realiza interações da região C com Met25, pois **9a** é o menor ligante da série 9/CB que tem substituinte na região A e a região C é uma metoxila (-OCH₃), um grupo pequeno quando comparado com a região C de **7** e **9i**.

Já no caso dos ligantes **6**, **9d**, e **11a**, com MIC₅₀ elevados, tanto a região B como a região C encontram-se afastadas do loop que contém Met25 e próximas do loop Ile62-Arg72, que contém Leu69 (resíduo oposto na cavidade a Met25). Este loop da diidrofolato redutase, que contém Leu69, comparado ao loop que contém Met25 (Tyr21-Leu29), é um elemento da estrutura secundária que admite mais flexibilidade, uma vez que é maior (11 resíduos de aminoácidos em relação a 9 resíduos) e estabelece um menor número de interações entre resíduos vizinhos (3 interações em relação a 5 interações), como pode ser observado na **TABELA 5** e na **TABELA 6**.

Tabela 5. Interações observadas entre resíduos vizinhos no loop I62-R72

Resíduo a	Resíduo b	Interação	Distância (Å)	Ângulo (°)
Phe66	Pro63	NH...O	2,5	130
Arg72	Leu69	NH...O	2,6	145
Arg72	Pro70	NH...O	2,4	166

Tabela 6. Interações observadas entre resíduos vizinhos no loop Y21-L29

Resíduo a	Resíduo b	Interação	Distância (Å)	Ângulo (°)
Tyr21	Lys24	NH...O	1,7	167
Lys24	Tyr21	NH...O	2,3	163
Met25	Trp27	CH...π	3,2	120
Met25	Trp27	CH...π	3,1	145
Trp27	Met25	NH...S	3,3	95

Neste sentido, os ligantes mais próximos do loop Ile62-Arg72 poderão deslocar-se da cavidade com os movimentos desse loop. Já os ligantes cuja região C estiver envolvida em interações CH...π com Met25 estarão mais estáveis no sítio de ligação, o que lhes pode conferir uma mais elevada capacidade inibitória da diidrofolato redutase.

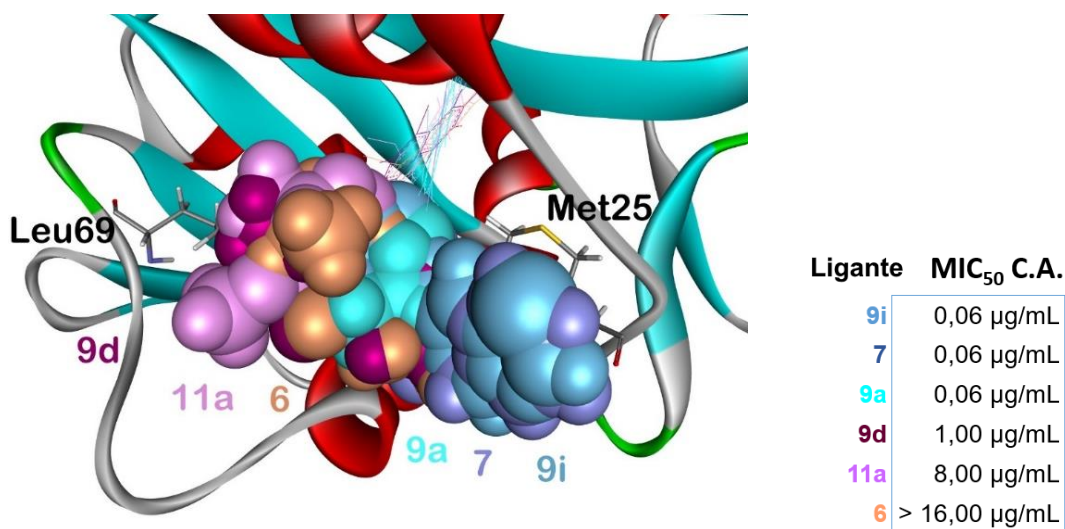


Figura 39. Representação dos padrões de ligação da região C dos três ligantes com menores MIC₅₀ (7, 9a, e 9i) e dos três ligantes com maiores MIC₅₀ (6, 9d, e 11a) da série 9/CB. As regiões A estão no fundo da cavidade e representadas em linhas. As regiões B e C estão na entrada da cavidade e representadas em “CPK”. 9i, 7 e 9a representados em tons de azul. 9d, 11a, e 6 representados em roxo, violeta e bege, respectivamente. Os resíduos Met25 e Leu69 estão representados em “stick” e a proteína colorida de acordo com a estrutura secundária. Figura elaborada pelo autor.

Os resultados de docking molecular e as interações proteína-ligantes encontradas e descritas permitiram a identificação de uma potencial proteína-alvo dos compostos derivados de oxazolina.

5. CONCLUSÕES

A enzima diidrofolato redutase (EC: 1.5.1.3) de *Candida albicans* foi identificada como um potencial alvo de inibição pelos compostos derivados de oxazolina estudados.

De acordo com os resultados obtidos, os compostos derivados de oxazolina posicionam-se no sítio ativo da diidrofolato redutase de *Candida albicans*, impedindo a entrada do substrato e levando à redução da atividade catalítica desta enzima. Assim, podem inibir a via metabólica de síntese de purinas, o que resultaria na incapacidade de *C. albicans* se reproduzir.

O anel oxazolina (região B dos compostos) mostrou-se determinante para as poses dos ligantes no sítio de ligação da diidrofolato redutase de *C. albicans*, pois permite manter as regiões A e C em interações com os resíduos da cavidade.

Os compostos com menor MIC₅₀ das duas séries realizam interações do haleto substituinte com o oxigênio OE1 de Glu32. Esta interação mostrou ser importante para o planejamento de novos fármacos que visem a diidrofolato redutase de *C. albicans* como alvo.

A nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NDP) estabiliza as regiões aromáticas dos ligantes no sítio de ligação por interações O...π. No desenho racional de novos fármacos que visem a diidrofolato redutase de *C. albicans* como alvo, esta interação ligante-coenzima também deverá ser considerada.

O resíduo metionina 25 também se revelou importante para a estabilização dos ligantes no sítio de ligação, através de interações C-H...π, sobretudo por se tratar de um resíduo inserido num loop da proteína que permite o acesso dos ligantes ao átomo OE1 de Glu32, uma vez que a cadeia lateral de M25 pode ocluir o bolso **b** da cavidade do sítio ativo da diidrofolato redutase de *C. albicans*.

Este trabalho permitiu estabelecer uma correlação entre os resultados dos ensaios biológicos *in vitro* e dos experimentos *in silico*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOKI, Y. et al. **A new series of natural antifungals that inhibit P450 lanosterol C-14 demethylase.** J. Antibiot. (Tokyo)., v. 45, n. 2, p. 151-159, 1992.
- ARENDRUP, M. C. **Candida and Candidaemia: Susceptibility and Epidemiology.**, Dan Med J. v. 60, n. 11-B4698, p. 1-32, 2013.
- ARIYAEIFAR, M. et al. **Chiral halogenated Schiff base compounds: green synthesis, anticancer activity and DNA-binding study.**, J. Mol. Struct., v. 1161, p. 497-511, 2018.
- BAILLY, S. et al. **Impact of antifungal prescription on relative distribution and susceptibility of Candida spp. – Trends over 10 years.**, J Infect., v. 72, n. 1, p. 103-111, 2016.
- BALFOUR, M. N. et al. **Combination of Sonogashira coupling and 5-endo-dig cyclization for the synthesis of 2,6-disubstituted-5-azaindoles.** Synth. Commun., v. 49, n. 3, p. 351-358, 2019.
- BARBEIRO, C. S. et al. Chem. Sel., v. 1, p. 5647, 2016.
- BEN-AMI, R. **Treatment of Invasive Candidiasis: A Narrative Review.** J. Funghi (Basel)., v. 4, n. 3, p. 97, 2018.
- BENCUROVA, E. et al. **Identification of Antifungal Targets Based on Computer Modeling.** J. Funghi (Basel)., v. 4, n. 3, p. 81, 2018.
- BERMAN, H. M. et al. Nucleic Acids Research., v. 28, n. 1, p. 235, 2000. <https://www.rcsb.org/> (consultado em 23/04/2019).
- BONDI, A. **van der Waals Volumes and Radii.** J. Phys. Chem., v. 68, n. 3, p. 441-451, 1964.
- BORTOLATO, A.; MORO, S. **Designing a ligand for pharmaceutical purposes.** Expert Opin. Drug Discov., v. 3, n. 5, p. 579-590, 2008.
- BOSCH, E. et al. **Role of π - π Stacking and Halogen Bonding by 1,4-Diiodoperchlorobenzene To Organize the Solid State To Achieve a [2 + 2] Cycloaddition Reaction.** Cryst. Growth Des., v. 19, p. 3092-3096, 2019.
- BOTO, R. A. et al. **Interpretation of the reduced density gradient.** Mol. Phys., v. 114, n. 7-8, p. 1406-1414. 2015.
- CAO, YY. et al. **Effect of Amphotericin B on the Metabolic Profiles of Candida albicans.** J. Proteome Res., v. 12, n. 6, p. 2921-2932, 2013.
- CARACELLI, I. et al. **2-chlorovinyl tellurium dihalides, (p-tol)Te[C(H)=C(Cl)Ph]X₂ for X = Cl, Br and I: variable coordination environments, supramolecular structures and docking studies in cathepsin B.** J. Braz. Chem. Soc., v. 21, n. 11, p. 2155-2163, 2010.
- CARACELLI, I.; ZUKERMAN-SCHPECTOR J.; TIEKINK E. R. T. **Supramolecular aggregation patterns based on the bio-inspired Se(lone pair)··· π (aryl) synthon.** Coord. Chem. Rev., v. 256, p. 412-438, 2012.

- CARACELLI, I. et al. **Delocalised antimony(lone pair)- and bismuth-(lone pair) . . π (arene) interactions**: Supramolecular assembly and other considerations. *Coord. Chem. Rev.*, v. 257, p. 2863-2879, 2013a.
- CARACELLI, I.; ZUKERMAN-SCHPECTOR J.; TIEKINK E. R. T. **Supra-molecular synthons based on gold... π (arene) interactions**. *Gold Bull.*, v. 46, n. 2, p. 81-89, 2013b.
- CARACELLI, I. et al. **M... π (arene) interactions for M = gallium, indium and thallium**: Influence upon supramolecular self-assembly and prevalence in some proteins. *Coord. Chem. Rev.*, v. 281, p. 50-63, 2014.
- CARACELLI, I. et al. **Main group metal lone-pair... π (arene) interactions**: a new bonding mode for supramolecular associations. *CrystEngComm.*, v. 18, n. 37, p. 6960-6978, 2016.
- CARACELLI, I. et al. **Crystallographic and docking (Cathepsins B, K, L and S) studies on bioactive halotelluroxetanes**. *Z. Kristallogr. Cryst. Mater.*, v. 233, n. 2, p. 113-, 2017.
- CARACELLI, I. et al. **2-[(4-Bromo-phen-yl)sulfan-yl]-2-meth-oxy-1-phenyl-ethan-1-one**: Crystal Structure, Hirshfeld Surface Analysis and Computational Chemistry. *Acta Cryst.*, v. E75, p. 816-822, 2019.
- CIEMNY, M. et al. **Protein-peptide docking**: opportunities and challenges. *Drug Discov. Today.*, v. 23, n. 8. p. 1530-1537, 2018.
- CONTRERAS-GARCIA, J. et al. **A benchmark for the non-covalent interaction (NCI) index or is it really all in the geometry?** *J. Chem. Theory Comput.*, v. 7, n. 3, p. 625, 2011.
- DENNING, D. W., et al. **Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis**: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.*, v. 18, n. 11, p. e339, 2018.
- ERMONDI, G.; CARON, G. **Recognition forces in ligand-protein complexes**: Blending information from different sources. *Biochem. Pharmacol.*, v. 72, p. 1633-1645, 2006.
- GARCIA, J.; PEMÁN, J. **Diagnóstico microbiológico de las micosis invasoras**. *Rev. Iberoam. Micol.*, v. 35, n. 4, p. 179-185, 2018.
- GROOM, C. R. et al. **The Cambridge Structural Database**. *Acta Cryst. Section B.*, v. B72, p. 171, 2016. <https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-system/components/csd/> (consultado em 28/04/2019).
- HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. **VMD**: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graphics.*, v. 14, n. 1, p. 33, 1996.
- HUTTER, M. C. **The current limits in virtual screening and property prediction**. *Future Med. Chem.*, v. 10, n. 13, p. 1623-1635, 2018.
- IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology**, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online version (2019-) created by S. J. Chalk. ISBN 0-9678550-9-8. <https://doi.org/10.1351/goldbook>.
- JACOB, L. et al. **Prevalence of vulvovaginal candidiasis in gynaecological practices in Germany**: A retrospective study of 954,186 patients. *Curr. Med. Mycol.*, v. 4, n. 1, p. 6-11, 2018.

- JOHNSON, E. R. et al. **Revealing Non-Covalent Interactions**. J. Am. Chem. Soc., v. 132, n. 18, p. 6498-6506, 2010.
- JONES, G. et al. **Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking**. J. Mol. Biol., v. 267, n. 3, p. 727-748, 1997.
- KARPLUS, P. A.; DIEDERICHS, K. **Linking crystallographic model and data quality**. Science., v. 336, n. 6084, p. 1030-1033, 2012.
- KENIYA, M. V. et al. **Heterologous Expression of Full-Length Lanosterol 14 α Demethylases of Prominent Fungal Pathogens *Candida albicans* and *Candida glabrata* Provides Tools for Antifungal Discovery**. Antimicrob. Agents Chemother., v. 62, n. 11, p. e01131-18, 2018.
- KRAGELUND, C. **Exploiting new knowledge of Candidal infection for future antifungal combat**. Oral Diseases., v. 23, p. 543-547, 2017.
- MAGANHI, S. H. et al. **Palbociclib can Overcome Mutations in Cyclin Dependent Kinase 6 that break Hydrogen Bonds between the Drug and the Protein**. Protein Sci., v. 26, n. 4, p. 870-879, 2017.
- MANTINA, M. et al. **Consistent van der Waals Radii for the Whole Main Group**. J Phys Chem A., v. 113, n. 19, p. 5806–5812, 2009.
- MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T. A.; ROSSI, A. **Antifungal Resistance Mechanisms in Dermatophytes**. Mycopathologia., v. 166, p. 369-383, 2008.
- MATTA C. F.; BOYD, R. J. **The Quantum Theory of Atoms in Molecules**. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2007.
- METRANGOLO, P. et al. **Halogen Bonding Based Recognition Processes: A World Parallel to Hydrogen Bonding**. Acc. Chem. Res., v. 38, p. 386-395, 2005.
- METRANGOLO, P. et al. **Halogen Bonding in Supramolecular Chemistry**. Angew. Chem. Int. Ed., v. 47, p. 6114-6127, 2008.
- NAMI, S. et al. **Current antifungal drugs and immunotherapeutic approaches as promising strategies to treatment of fungal diseases**. Biomed. Pharmacother., v. 110, p. 857-868, 2019.
- OLIVEIRA, I. M. et al. **Ytterbium(III)-catalyzed three-component reactions: synthesis of 4-organoselenium-quinolines**. New J. Chem., v. 41, n. 18, p. 9884-9888, 2017.
- OLIVEIRA, I. M. et al. **Copper(I)/succinic acid cooperatively catalyzed one-pot synthesis of organoselenium-propargylamines via A3-coupling**. New J. Chem., v. 42, n. 12, p. 10118-10123, 2018.
- PALACIO-RODRÍGUEZ, K. et al. **Exponential consensus ranking improves the outcome in docking and receptor ensemble docking**. Sci. Rep., v. 9, n. 5142, p. 1-14, 2019.
- PAPAS, P. G. et al. **Invasive candidiasis**. Nat. Rev. Dis. Primers., v. 4, p. 18026, 2018.
- PAULSEN, J. et al. **Structural analysis of the active sites of dihydrofolate reductase from two species of *Candida* uncovers ligand-induced conformational changes shared among species**. Bioorg Med Chem Lett., v. 23, p. 1279-1284. 2014.

- PEMÁN, J.; QUINDÓS, G. **Aspectos actuales de las enfermedades invasoras causadas por *Candida* y otros hongos levaduriformes.** Rev. Iberoam. Micol., v. 33, n. 3, p. 133-139, 2016.
- PETTERSEN, E. F. et al. **UCSF Chimera—A Visualization System for Exploratory Research and Analysis.** J. Comput. Chem., v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.
- PFALLER, M. A. et al. **Epidemiology and Outcomes of Invasive Candidiasis Due to Non-albicans Species of *Candida* in 2,496 Patients:** Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) Registry 2004–2008. Plos One., v. 9, n. 7, p. e101510, 2014.
- PIERCE, C. G. et al. **A novel small molecule inhibitor of *Candida albicans* biofilm formation, filamentation and virulence with low potential for the development of resistance.** npj Biofilms and Microbiomes., v. 1, p. 15012, 2015.
- POLITZER, P.; MURRAY, J. S.; CLARK, T. **Halogen bonding and other σ -hole interactions:** a perspective. Phys. Chem. Chem. Phys., v. 15, p. 11178-11189, 2013.
- QUINDÓS, G. **Epidemiología de las micosis invasoras:** un paisaje en continuo cambio. Rev. Iberoam. Micol., v. 35, n. 4, p. 171-178, 2018.
- REIS, J. S. et al. **Sonogashira cross-coupling in iodo-containing 2-aryloxazolines.** Synth. Commun., v. 49, n. 10, p. 1252-1261, 2019.
- SACCO, A. C. S. **Aplicação do mapeamento vetorial para biomoléculas.** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2017.
- SALCI, T. P. et al. **Targeting *Candida* spp. to develop antifungal agents.** Drug Disc. Today., v. 23, n. 4, p. 802-814, 2018.
- SALEH, G. et al. **Revealing Non-covalent Interactions in Molecular Crystals through Their Experimental Electron Densities.** Chem.: Eur. J., v. 8, n. 48, p. 15523-15536, 2012.
- SARDI, J. C. O. et al. ***Candida* species:** current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. J. Med. Microbiol., v. 62, p. 10-24, 2013.
- SATOH, K. et al. ***Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital.** Microbiol. Immunol., v. 53, p. 41-44, 2009.
- SAWAYA, M. R.; KRAUT, J. **Loop and subdomain movements in the mechanism of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase:** crystallographic evidence. Biochemistry., v. 36, n. 3, p. 586-603, 1997.
- SELLAM, A.; WHITEWAY, M. **Recent advances on *Candida albicans* biology and virulence.** F1000Research., v. 5, n. F1000 Faculty Rev, p. 2582, 2016.
- SENG, H-L. et al. **Factors affecting nucleolytic efficiency of some ternary metal complexes with DNA binding and recognition domains.** Crystal and molecular structure of Zn(phen)(edda). J. Inorg. Biochem., v. 102, n. 11, p. 1997-2011, 2008.
- SHERRILL, C. D. **Energy Component Analysis of π Interactions.** Acc. Chem. Res. 46(4): 1020, 2013.

SILVA, R. F. N. et al. **Sulfur(lone-pair)... π interactions with FAD in flavoenzymes.** Z. Kristallogr. Cryst. Mater., v. 233, n. 8, p. 531, 2018.

SOUZA, A. R. et al. **Elucidation of the Induced Chirality of Dansylglycine by its Interaction with Human Serum Albumin.** Quím. Nova., v. 42, n. 2, p. 135-142, 2019.

SVETAZ, L. et al. **Antifungal Activity of Zuccagnia punctata Cav.:** Evidence for the Mechanism of Action. Planta Medica., v. 73, n. 10, p. 1074-1080, 2007.

THE UNIPROT CONSORTIUM. <http://www.uniprot.org/uniprot/P10613> (acessado em 21/04/2019).

THE UNIPROT CONSORTIUM. <https://www.uniprot.org/uniprot/P22906> (consultado a 23/04/2019).

TIEKINK, E. R. T.; ZUKERMAN-SCHPECTOR J. **Emerging supramolecular synthons:** C–H... π (chelate) interactions in metal bis(1,1-dithiolates). Chem. Commun., v. 47, n. 11, p. 6623-6625, 2011.

VENTURINI, D. et al. **Induction of Axial Chirality in Divanillin by Interaction with Bovine Serum Albumin.** Plos One., v. 12, n. 6, p. e0178597, 2017.

VERDONK, M. L. et al. **Improved Protein–Ligand Docking Using GOLD.** Proteins: Struct., Funct., Genet., v. 52, p. 609-623, 2003.

WARRILOW, A. G. et al. **Azole Affinity of Sterol 14 α -Demethylase (CYP51) Enzymes from Candida albicans and Homo sapiens.** Antimicrob. Agents Chemother., v. 57, n. 3, p. 1352-1360, 2013.

WILKEN, R. et al. **Principles and Applications of Halogen Bonding in Medicinal Chemistry and Chemical Biology.** J. Med. Chem., v. 56, p. 1363-1388, 2013.

WOOD, P. A.; ALLEN, F. H., PIDCOCK, E. **Hydrogen-bond directionality at the donor H atom – analysis of interaction.** CrystEngComm., v. 11, p. 1563-1571, 2009.

energies and database statistics.

YANG, F. et al. **Tolerance to caspofungin in Candida albicans is associated with at least three distinctive mechanisms that govern expression of FKS genes and cell wall remodeling.** Antimicrob Agents Chemother., v. 61, n. 5, p. e00071, 2017.

ZOETE, V.; GROSDIDIER, A.; MICHIELIN, O. **Docking, virtual high throughput screening and in silico fragment-based drug design.** J. Cell. Mol. Med., v. 13, n. 2, p. 238-248, 2009.

ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; HAIDUC I. **Tellurium... π -aryl interactions:** a new bonding motif for supramolecular self-assembly and crystal engineering. CrystEngComm., v. 4, n. 33, p. 178-193, 2002.

ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. et al. **Supramolecular architectures based on As(lone pair)... π (aryl) interactions.** Chem. Commun., v. 47, n. 27, p. 7608-7610, 2011.

ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. et al. **Crystal structure of [(2R,3R,4S)-3,4-bis(acet-yloxy)-5-iodo-3,4-di-hydro-2H-pyran-2-yl]methyl acetate.** Acta Cryst., v. E71, p. o53-o54, 2015.

Software: ACD/Chemsketch, version 2016.2.2, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, www.acdlabs.com, 2016.

Software: Accelrys Software Inc., Discovery Studio Modeling Environment, Release 3.5, San Diego: Accelrys Software Inc., 2013.
<http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio/>

7. APÊNDICES

APÊNDICE 1. MIC₅₀ dos compostos da série 4/LZ em *C. albicans*.

LIGANTE	MIC ₅₀ (µg/mL) em <i>C. albicans</i>
4g	0,12
4i	0,25
4b	0,50
4c	0,50
4d	1,00
4f	1,00
4j	1,00
4a	1,00
4e	2,00
4h	16,00

APÊNDICE 2. MIC₅₀ dos compostos da série 9/CB em *C. albicans* e *C. glabrata*.

LIGANTE	MIC ₅₀ (µg/mL) em <i>C. albicans</i>	MIC ₅₀ (µg/mL) em <i>C. glabrata</i>
9i	0.06	<0,03
7	0.06	0,25
9a	0.06	1,00
11b	0.12	<0,03
9c	0.12	0,06
9g	0.12	0,06
9h	0.25	0,06
9f	1.00	0,06
9j	4.00	0,06
11c	0.25	0,12
10	0.12	0,25
9b	0.50	0,25
9d	1.00	0,25
9e	0.50	0,25
11a	8.00	1,00
6	>16.00	>16,00

APÊNDICE 3. MIC₅₀ de referência de três antifúngicos comerciais em *C. albicans* e *C. glabrata*.

Antifúngico comercial	MIC ₅₀ (µg/mL)	
	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>
Fluconazol	4,00	16,00
Anfotericina B	0,12	0,03
Caspofungina	0,12	0,50

APÊNDICE 4. Tabela de interações dos ligantes 4/LZ com os resíduos de aminoácidos e com o NDP da diidrofolato redutase de 4H96.

Resíduos de aa de 4H96	Ligantes									
	4a	4b	4c	4d	4e	4f	4g	4h	4i	4j
Ile9	x	x	x	x		x	x	x	x	x
Val10		x	x	x	x			x	x	x
Ala11		x	x	x			x		x	x
Lys24	x	x	x	x			x	x	x	
Met25	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Trp27					x					x
Arg28					x					x
Glu32	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Ile33										x
Phe36	x	x	x	x		x	x	x	x	x
Thr58					x					
Ser61		x	x	x			x		x	
Ile62		x	x	x	x		x		x	x
Ile112	x	x	x	x		x	x	x	x	x
Tyr118								x		
Leu131		x								
Thr133		x	x	x						
NDP	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

APÊNDICE 5. Tabela de interações dos ligantes 9/CB com os resíduos de aminoácidos e com o NDP da diidrofolato redutase de 4H96. Com fundo verde, estão representadas as interações dos ligantes com resíduos que pertencem ao loop Y21-L29. Com fundo cor-de-rosa, estão representadas as interações dos ligantes com resíduos que pertencem ao loop I62-R72.

Resíduos de aa de 4H96	Ligantes															
	6	7	9a	9b	9c	9d	9e	9f	9g	9h	9i	9j	10	11a	11b	11c
Ile9	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Val10	X		X		X			X			X					X
Ala11	X															
Gly23									X							
Lys24	X															
Met25		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X		X	
Trp27		X			X						X		X			
Arg28											X					
Glu32	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ile33		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
Phe36	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Lys37												X				
Thr58							X	X								
Ser61	X		X	X			X	X	X			X			X	X
Ile62	X					X	X	X					X	X		
Pro63	X					X	X					X				X
Phe66										X						
Leu69										X				X		
Ile112	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X
NDP	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X