



Felipe de Carvalho Pires

**ESTUDOS COMPUTACIONAIS DE
POTENCIAIS INIBIDORES DA PROTEÍNA
QUITINASE**

LAVRAS-MG

2019

Felipe de Carvalho Pires

**ESTUDOS COMPUTACIONAIS DE POTENCIAIS INIBIDORES DA
PROTEÍNA QUITINASE**

Monografia apresentada ao colegiado do Curso
de Química, para a obtenção do título de
Licenciado em Química.

Orientadora

Profa. Dra. Elaine Fontes Ferreira da Cunha

LAVRAS-MG

2019

Felipe de Carvalho Pires

**ESTUDOS COMPUTACIONAIS DE POTENCIAIS INIBIDORES DA
PROTEINA QUITINASE**

Monografia apresentada ao colegiado do Curso
de Química, para a obtenção do título de
Licenciada em Química.

Aprovado em _____ de _____ de 2019.

Prof. Dra. Elaine Fontes Ferreira da Cunha
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS-MG
2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus queridos familiares e amigos, que durante todo o período da graduação me apoiaram de perto e de longe.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer inicialmente a toda minha família que me ensinou, o respeito, a responsabilidade e a gratidão. Valores morais e éticos esses que me proporcionaram muitas conquistas ao longo da minha trajetória, principalmente a minha mãe e meu pai, Rosângela de Carvalho Pires e Walmir Pires pelo amor, confiança e dedicação.

Aos meus vizinhos Celene e Julho que sempre incentivaram o meu lado curioso desde criança.

A minha irmã, Fabiana pelo carinho, compreensão e amizade.

Aos amigos que conquistei durante esta jornada, tendo paciência comigo nos momentos bons e ruins, obrigado pela amizade.

A minha orientadora, Prof.^a Elaine, pela oportunidade, paciência, confiança, incentivo e apoio.

Aos colegas e companheiros do Grupo de Química Computacional, a "Era do gelo" pelo apoio e parceria durante este ano de convivência.

Aos amigos e colegas do Centro Acadêmico De Química por todos esses anos de convivência

A todos os professores que participaram da minha, formação desde o ensino fundamental até a graduação que nos transmitiram conhecimento da melhor forma possível.

A CNPQ, pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

A FAPEMIG, pela concessão de equipamentos para a pesquisa.

A CAPES, por ter financiado em partes a pesquisa.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química, pela oportunidade de realização do curso.

RESUMO

Pires, Felipe de Carvalho. **Estudos computacionais de potenciais inibidores da proteína quitinase.**

Monografia apresentada a Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG¹.

Valsa mali é a causa direta do cancro da maçã, o fungo é um parasita que fica nos ferimentos causados pelo vento, podas, insetos, entre outras causas. Possui poder de penetração nas células vivas do hospedeiro, entretanto prospera em feridas onde as células vizinhas estão mortas e produz uma massa de hifas que penetram as células vivas secretando enzimas. O composto 4-metil-1,2,3-tiadiazole-5 carboxaldeído benzoil hidrazona, um pesticida, mostrou atividades antifúngicas de amplo espectro, sendo eficaz contra *Valsa mali*, *Botrytis cinerea*, *Pythium Aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium moniliforme* e *Alternaria solani*. A síntese de novos pesticidas eficazes na prevenção e no combate a pragas é de grande importância devido ao aumento no cultivo e produção de alimentos suficientes para abastecer uma população crescente. Com o objetivo de entender o modo de interação fungicida-proteína para propor novos compostos mais eficientes e menos poluentes, estudos de ancoramento molecular foram realizados visando a proteína quitinase. Apresentando uma correlação favorável entre a energia MolDock Score e a atividade biológica EC₅₀.

Palavras-chave: *Valsa mali*. Quitinase. Fungo. Fungicida. Ancoramento molecular.

¹Comitê Orientador: Profa. Dra Elaine Fontes Ferreira da Cunha – UFLA (Orientadora)

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Estruturas do 4-metil-1,2,3-tiadiazole-5 carboxaldeído benzoil hidrazona e dos seus derivados e suas respectivas atividades biológicas (ZHANG et al., 2017).....**24**
- Tabela 2.** Valores de MolDock Score (kcal mol^{-1}), energia intermolecular (kcal mol^{-1}) e de ligação de hidrogênio (kcal mol^{-1}) e pEC_{50} ($-\log\text{EC}_{50}$), para os compostos ancorados no SL1 da proteína quitinase.....**31**
- Tabela 3.** Valores de MolDock Score (kcal mol^{-1}), energia intermolecular (kcal mol^{-1}) e de ligação de hidrogênio (kcal mol^{-1}) e pEC_{50} , para os compostos ancorados no sítio SL2 da proteína quitinase.**33**
- Tabela 4.** Valores de MolDock Score (kcal mol^{-1}), energia intermolecular (kcal mol^{-1}) e de ligação de hidrogênio (kcal mol^{-1}) e pEC_{50} , para os compostos ancorados no sítio SL1/2 da proteína quitinase.....**34**

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 . Fungo Valsa Mali na maçã e no tronco da macieira (Fonte: plantix.net)	13
Figura 2. Rota sintética do 4-metil-1,2,3-tiadiazóí-5 a partir do tiadinil. (ZHANG et al., 2017).....	17
Figura 3. Hidrólise da quitina pela quitinase (FLEURI; SATO, 2005).....	18
Figura 4. Classificação das quitinases. (POLLA, 2010).....	19
Figura 5. Estrutura secundária da quitinase 2A3C com os dois sítios de ligação separados pelo resíduo Trp137	31
Gráfico 1. Correlação entre os valores da concentração do fungicida que induz metade do efeito máximo (pEC_{50}) e Moldock Score, obtida no ancoramento molecular para os inibidores em estudo, para o sítio SL1 da proteína quitinase. Coeficiente de Pearson é de 0,93.....	37
Gráfico 2. Correlação de Spearman, para a o sítio SL1 da proteína quitinase, com o valor do coeficiente de Spearman igual a 0,97.....	37

- Gráfico 3.** Correlação entre os valores da concentração do fungicida que induz metade do efeito máximo (pEC_{50}) e Moldock Score, obtida no ancoramento molecular para os inibidores em estudo, para o sítio SL1/2 da proteína quitinase. Coeficiente de Pearson é de 0,61.....**38**
- Gráfico 4.** Correlação de Spearman, para no sítio SL1/2 da proteína quitinase, com o valor do coeficiente de Spearman igual a 0,50.....**38**
- Gráfico 5.** Correlação entre os valores da concentração do pesticida que induz metade do efeito máximo (pEC_{50}) e Moldock Score, obtida no ancoramento molecular para os inibidores em estudo, para o sítio SL2, com o sítio SL1 da proteína quitinase ocupado. Coeficiente de Pearson é de 0,86.....**39**
- Gráfico 6.** Correlação de Spearman, para sítio SL2, com a o sítio SL1 da proteína quitinase ocupado. Coeficiente de Spearman igual a 0,93.....**39**
- Figura 6.** Representação dos dois sítios da quitinase contendo as conformações dos inibidores, obtidas no estudo de ancoramento molecular.....**41**
- Figura 7.** A esquerda, conformações obtidas para o composto **8n** nos sítios SL1 e SL2 e resíduo Trp137 entre eles. A direita, a sobreposição das duas (cinza e preta) conformações obtidas do composto **8n** no sítio SL2.....**41**
- Figura 8.** Sobreposição dos compostos **8b**, **8c** e **8d** no sítio SL1. Os valores correspondem à distância (Å) entre os átomos e entre parênteses a carga parcial do átomo.....**43**

- Figura 9.** Sobreposição dos compostos **8o**, **8p** e **8q** no sítio SL2. Os valores correspondem à distância (Å) entre os átomos.....**43**
- Figura 10.** Representação das ligações de hidrogênio entre os compostos **8n** e **8r**, no interior do sítio SL1.....**44**
- Figura 11.** Representação das ligações de hidrogênio entre os compostos **8o**, **8n** e **8r**, no interior do sítio SL2.....**45**
- Figura 12.** Conformações obtidas do ancoramento molecular para o tiadinil no interior dos sítios SL1 e SL2. Ligações de hidrogênio estão representadas em tracejado.....**46**

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS.....	12
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
3.1	Reino Fungi.....	13
3.2	Fungicida.....	14
3.3	Quitinases.....	17
3.4	Química Computacional.....	20
4	METODOLOGIA.....	23
4.1	Dados Biológicos.....	23
4.2	Ancoramento Molecular.....	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	30
5.1	Estudos de ancoramento molecular.....	30
6	Considerações finais.....	47
7	Perspectivas.....	47
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
	Anexo.....	55

1. INTRODUÇÃO

O aumento da população mundial e o consumo crescente de alimentos, faz com que a agricultura e a pecuária sejam uma das atividades econômicas mais importantes de vários países, incluindo o Brasil, dessa forma para chegar nas metas de produção faz se necessário o uso de grandes quantidades de pesticidas nas plantações, com a intenção de prevenir ou combater pragas, visando assegurar maior produtividade (MELLO; SILVEIRA, 2012).

Muitos produtos são utilizados para eliminar formas de vida vegetal ou animal indesejáveis nas culturas agrícolas e na pecuária. As primeiras substâncias utilizadas para combater pragas ou doenças foram o enxofre, a cal e alguns sais de arsênio. Após a Segunda Guerra Mundial, o número de substâncias novas e o uso extensivo dessas na agricultura aumentaram significativamente (GONÇALVES, 2016).

Fungicidas são produtos químicos capazes de prevenir infecção de tecido de plantas vivas, causada por fungos fitopatogênicos. O conceito mais abrangente de fungicidas são compostos químicos empregados no controle de doenças causadas por fungos, bactérias e algas. Em alguns casos, esses compostos químicos não eliminam os fungos, apenas inibem temporariamente a germinação dos esporos. O fenômeno de inibição temporária da germinação ou do crescimento fúngico é denominado "Fungistase" e os produtos com essas propriedades são "Fungistáticos". Em outros casos, os compostos químicos de ação fungitóxica inibem ou previnem a produção de esporos, sem afetar o crescimento vegetativo do micélio do fungo. Fungicidas deste tipo são denominados "Anti-esporulantes". Cada produto fungicida é constituído por duas partes distintas: o ingrediente e o princípio ativo, que é responsável pela ação do produto, e o ingrediente inerte, que serve de veículo e diluente para o ingrediente ativo (GARCIA, 1999).

O desenvolvimento de novos fungicidas pode se dar devido a resistência desenvolvida, em alguns casos por causa de mutação, do patógenos aos fungicidas (BRENT, 1999)

Valsa é um gênero de fungos da família *Valsaceae*, existem cerca de 70 espécies no gênero, sendo que *Valsa mali* é uma das espécie do gênero que infecta maçãs, trazendo prejuízos as plantações (ABE et al., 2011). No ciclo de vida da *Valsa mali* detectou-se a enzima quitinase, desempenhando um papel fundamental na reprodução do fungo (SCHÜTTELKOPF et al., 2010).

Em estudos de atividades antifúngicas, *in vitro*, análogos tiadiazóis foram testados com sucesso contra quatro fungos fitopatogênicos, incluindo *Phytophthora capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Valsa mali* e *Alternaria alternate*. A fim de entender como estes inibidores atuam no sítio de interação, a proteína quitinase foi escolhida para os estudos de ancoramento molecular (ZHANG et al., 2016).

2. OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivos descrever as interações entre os inibidores derivados do Tiadinil e a proteína quitinase, através do uso da técnica de ancoramento molecular (*Docking*).

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Reino Fungi

O reino Fungi é um grupo de organismos eucariotas que crescem como leveduras unicelulares se reproduzindo por gemulação ou por fissão binária. A parede celular é formada por quitina e glucanos (LOGUERCIO-LEITE et al., 2006). A *Valsa* é um gênero de fungos da família Valsaceae, responsável pelo apodrecimento precoce das maçãs (Figura 1) (ABE et al., 2011). Um estudo mostrou que *V. mali* tem virulência baixa e que feridas causadas por atritos mecânicos, frio e queimaduras solares, favorecem a infecção na maçã (ADAMS; ROUX; WINGFIELD, 2006). Uma vez dentro do tecido hospedeiro, o fungo pode induzir a dilaceração do tecido e a morte celular (KE et al., 2013).

Figura 1. Fungo *Valsa Mali* na maçã e no tronco da macieira.



Fonte: plantix.net

O fungo *V.mali* em troncos de macieira causa extensa lesões necróticas podendo causar até a morte de toda a árvore como mostra a Figura 1. Para controlar essa doença, a casca infectada é raspada e fungicidas são aplicados nos sítios infectados. Não é estabelecida uma estratégia de gestão eficaz da doença devido à falta de informação sobre o mecanismo de resistência. Portanto, é urgente investigar as respostas do hospedeiro, identificar genes de resistência contra *V. mali* e como inibi-lo (YIN, 2016).

3.2 Fungicidas

Fungicidas são produtos químicos capazes de prevenir infecção por fungos, bactérias e algas. Todo fungicida deve ser inócuo ao homem, animais, plantas e a microorganismos benéficos ao meio ambiente. Porém, isso nem sempre é verdade. A toxidez de fungicidas é tão grave, que nos países desenvolvidos existem leis que controlam rigorosamente as tolerâncias e limitações dos resíduos nos diversos produtos de origem agrícola para o consumo humano e de animais, no Brasil a lei que regulamenta os pesticidas é a lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, regulamentado pelo decreto de nº 4.074/2002. A fitotoxidez é influenciada principalmente pela concentração do fungicida e pela temperatura do ambiente (GARCIA, 1999). Atualmente, existem no mercado fungicidas das mais variadas classes químicas, como carbamatos, fenólicos, fenilpirrólicos, anilino pirimidinas, e análogos da estrobilurina, os quais são utilizados no controle de pragas (GONÇALVES, 2016). No Anexo 1 encontra-se uma lista dos fungicidas divididos em grupos de acordo com o sítio de ação.

Os carbamatos são derivados do ácido carbâmico e, assim como os organofosforados, inibem a acetilcolinesterase, porém, a reação é reversível (WARE; WHITACRE, 2004). Alguns compostos (Maneb ®, Dithane ®) contêm

manganês, que pode desencadear o mal de Parkinson. Além disso a presença de etileno-etilureia (ETU), como impureza de fabricação, tem efeitos carcinogênicos (adenocarcinoma de tireóide), teratogênicos e mutagênicos em animais de laboratório. Os dinotrofenóis (ex.: Binapacril), por sua vez, são desacopladores da fosforilação oxidativa na mitocôndria. Atualmente, eles são usado por atletas de fisiculturismo para perda rápida de peso, porém é muito tóxico (WARE; WHITACRE, 2004).

Hexaclorobenzeno (HCB) é um fungicida organoclorado de uso proibido na maioria dos países por ser neurotóxico. Porém, ele pode ser gerado como subproduto durante a fabricação de solventes clorados e agrotóxicos, como tetracloroetileno, tricloroetileno, tetracloreto de carbono, cloreto de vinila, atrazina, propazina, simazina, pentaclorofenol, clorotalonil e pentacloronitrobenzeno. No Brasil, a maioria do HCB existente tem origem nos processos de produção em indústrias químicas de grande porte (RODRIGUES et al., 2007).

Organoestânicos (OTs, do inglês "*organotins*") são caracterizados pela presença de uma ou mais ligações estanho-carbono e apresentam a fórmula geral R_nSnX_{4-n} , onde R é um grupo alquil ou aril, X é uma espécie aniônica, como cloreto, óxido, hidróxido ou outro grupo funcional, e n varia de 1 a 4³ (GODOI; FAVORETO; SANTIAGO-SILVA, 2003).

Triazóis pertencem ao grupo dos inibidores de biossíntese de esteróis, o qual constitui o maior e o mais importante grupo de compostos já desenvolvidos para o controle de doenças fúngicas de plantas e animais, exibindo vários graus de sistemicidade e, frequentemente, altíssima potência antifúngica (SANTOS; SANTOS; FARIA, 2018).

Estrobilurinas inibem a respiração mitocondrial pelo bloqueio da transferência de elétrons no complexo citocromo-bc1. O sítio de ligação é a oxireductase ubihidroquinona citocromo-c, a qual impede a chegada de oxigênio

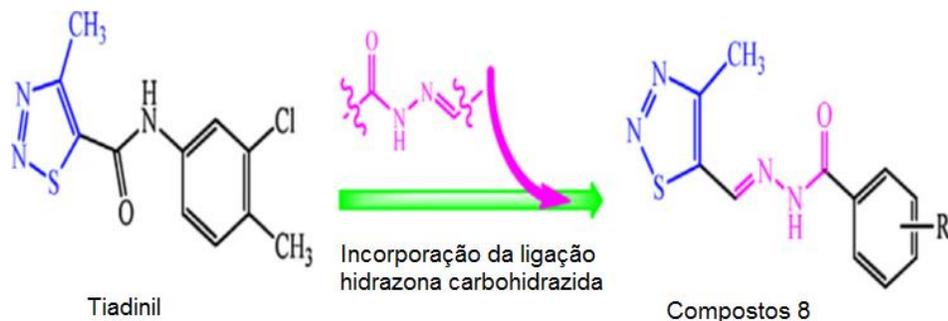
na célula. Essa ação interfere na formação de ATP, que é a energia vital para o crescimento dos fungos. Algumas das estrobilurinas mais comuns são a azoxistrobina, metil-cresoxima, picoxistrobina, fluoxastrobina, orizastrobina, dimoxystrobina, piraclostrobina e trifloxistrobina. A descoberta do poder fungicida das estrobilurinas representou um significativo desenvolvimento na produção de fungicidas baseados em compostos derivados de fungos (SANTOS; SANTOS; FARIA, 2018).

As Carboximidas, assim como as estrobilurinas, atuam interrompendo o processo em complexos proteicos, privando o patógeno de ATP. Tem efeito inibidor sobre a produção da enzima succinato desidrogenase (SDHI), impedindo a oxidação de succinato para fumarato (CECHINEL FILHO et al., 2003).

Os tiadiazóis são citados na literatura como um agente ativador dos mecanismos de defesa de plantas, protegendo-as sistemicamente contra uma larga gama de doenças causadas por fungos (TSUBATA et al., 2006). O tiadinil (1,2,3-tiadiazole) é um tiadiazol desenvolvido pela Nihon Nohyaku Co. Ltd., sendo muito estudado por causa da sua baixa toxicidade em animais (TSUBATA et al., 2006).

Através das pesquisas realizadas com o tiadinil, novos compostos com alta atividade biológica foram sintetizados, como o 4-metil-1,2,3-tiadiazóli-5, derivado de carboxaldeído benzil hidrazona, o qual é sintetizado introduzindo hidrazona de carbo-hidrazida na estrutura do tiadinil para substituir a ligação amida, como mostra a Figura 2 (ZHANG et al., 2017).

Figura 2. Rota sintética do 4-metil-1,2,3-tiadiazóli-5 a partir do tiadinil.



Fonte. (ZHANG et al., 2017).

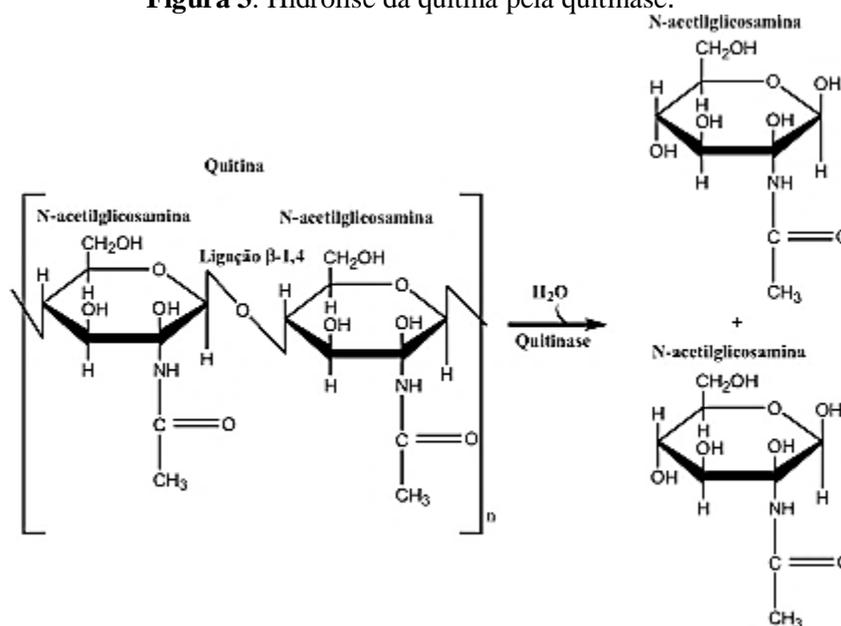
Os compostos sintetizados mostraram atividades fungicidas de amplo espectro contra *Valsa mali*, *Botrytis cinerea*, *Pythium Aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium moniliforme* e *Alternaria solani*. A análise entre a estrutura e a atividade do composto 4-metil-1,2,3-tiadiazole (Figura 2) e seus derivados indicaram que a posição do substituinte R no anel benzeno teve um papel importante nas atividades fungicidas: posição *-meta* exibiu atividade mais fraca do que a posição *-para*, no entanto, melhor do que a posição *-orto*. Além disso, os grupos retiradores de elétrons são mais favoráveis à atividade do que os grupos doadores de elétrons na mesma posição (ZHANG et al., 2017). Estudos mostraram que análogos tiadiazóis podem atuar como inibidores da enzima quitinase controlando a proliferação de fungos em plantas (SCHÜTTELKOPF et al., 2010; XU et al., 2011).

3.3 Quitinases

Quitinases (EC 3.2.1.13) são enzimas amplamente encontradas na natureza, existindo em uma grande diversidade de organismos, tanto eucariotos como procariotos, estando incluso entre estes os fungos (WANG et al., 2012). Quitinases catalisam reações de hidrólise da quitina (β -(1-4) N-

acetilglicosamina) e de quitodextrinas através de um sistema quitinólico no qual atua de maneira sinérgica e consecutiva (Figura 3) (FLEURI; SATO, 2005). A quitina está presente no esqueleto de artrópodes, crustáceos, parede celular de fungos e na casca de ovo de nematóides (SCHÜTTELKOPF et al., 2010).

Figura 3. Hidrólise da quitina pela quitinase.

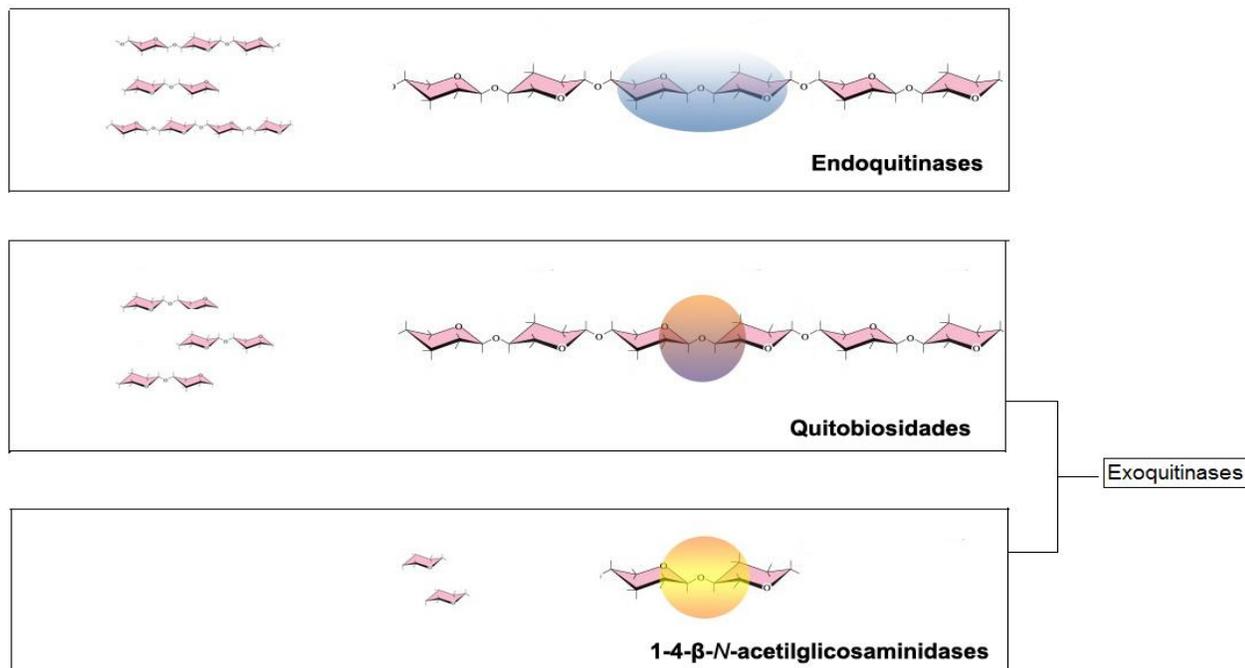


Fonte. (FLEURI; SATO, 2005).

As quitinases são divididas em duas classes principais, as endoquitinases e as exoquitinases (Figura 4). As endoquitinases clivam a quitina em sítios aleatórios no interior do polímero, liberando quito-oligossacarídeos (quitotetraose, quitotriose). As exoquitinases clivam a quitina a partir da sua extremidade não redutora, liberando dímeros de (GlcNAc)₂ (DUO-CHUAN, 2006). Também foram descritas as endo-exoquitinases, que apresentam as duas atividades (SILVA et al., 2005). As duas classes principais de quitinases são

distintas das β -(1,4) N-acetilglicosaminidases, que atuam sobre os produtos da ação das quitinases, convertendo-os em N-acetilglicosaminas.

Figura 4. Classificação das quitinases.



Fonte. (POLLA, 2010).

As quitinases pertencem a duas famílias dentro de glicosil hidrolases (GH), a família 18 e 19. A família 18 GH é encontrada em grande parte das quitinases procariontes e eucariontes, sendo utilizada no mecanismo de catálise auxiliada por substrato, degradam a quitina que desempenha papéis-chave nos ciclos de vida de fungos patogênicos, nematóides, malária e insetos. A família 19 GH engloba quitinases de plantas e de bactérias GRAM positivas que demonstram catálise ácida (WANG et al., 2012).

Na maioria dos fungos, a quitina é o maior componente estrutural da parede celular. É o segundo biopolímero mais abundante depois da celulose e

está geralmente ligada a outros polissacarídeos e proteínas (XU et al., 2011). A quitina também é encontrada em volta do círculo de constrição entre a célula mãe e a jovem do fungo (FLEURI; SATO, 2005). Assim, a inibição da quitinase levará a morte do fungo (ZHANG et al., 2016).

3.4 Química Computacional

A modelagem molecular engloba principalmente o planejamento racional de novos compostos bioativos, envolvendo a síntese e modificação molecular de substâncias, o isolamento de princípios ativos naturais, a compreensão em nível molecular de processos bioquímicos/farmacológicos, toxicológicos e farmacocinéticos (do AMARAL; MONTANARI, 2002).

A combinação de bancos de dados em rede como o *Protein Data Bank* (PDB), *Royal Society of Chemistry* (RSC) entre outros, e de programas computacionais de química são ferramentas elementares para a descoberta e planejamento de fármacos, pesticidas, herbicidas e outras moléculas. Com estas informações, pode ser feita uma investigação das interações entre ligante e receptor, elucidação de mecanismos de reação assim como a relação entre a estrutura química e atividade biológica (CARVALHO et al., 2003).

Os modelos moleculares gerados pelo computador são resultantes de equações matemáticas que estimam as posições e propriedades dos elétrons e núcleos, os cálculos realizados exploram, de forma experimental, as características de uma estrutura, fornecendo uma molécula sob nova perspectiva (CARVALHO et al., 2003). O ponto de partida para esse tipo de estudo é a estrutura tridimensional do alvo molecular escolhido.

O ancoramento molecular é uma técnica computacional que tem como objetivo estabelecer uma relação entre ligantes e um alvo biológico (biomacromolécula) que é muito utilizada no desenvolvimento de novos compostos

(DE OLIVEIRA, R. G.; ALENCAR-FILHO, E. B.; VASCONCELLOS, M. L., 2014), pois envolve a predição da conformação do ligante e sua orientação dentro do sítio de interação da macromolécula.

Com o objetivo de entender o mecanismo de interação de um inibidor, é essencial saber o posicionamento tridimensional para a sua interação molecular com a o alvo. A predição da geometria e da energia de interação é de grande interesse para o planejamento de novos compostos (IWATA et al., 2000).

Esse processo de predição da conformação do ligante dentro do sítio de interação da proteína é conhecido mais comumente como *Docking*. Através de cálculos de energia das conformações geradas, a conformação mais estável é aquela energeticamente mais favorável quando está ligada ao receptor. A hipótese geral é que, valores mais baixos de energia representam melhores interações entre proteína-ligante em comparação com valores mais elevados de energia (THONSEN; CHRISTENSEN, 2006). No entanto, para encontrar a estrutura do complexo proteína-ligante mais estável é necessário analisar todos os modos de interação, considerando a flexibilidade conformacional do ligante. (MIZUTANI et al., 1994).

As conformações estruturais mais confiáveis da proteína são obtidas por análise de raios-X de cristais do complexo proteína-ligante, entretanto não é fácil obter tais dados experimentalmente. A simulação computacional é uma das mais importantes técnicas de investigação das interações moleculares entre a proteína e o ligante nos casos em que a estrutura 3D da macromolécula já foi elucidada (GUIMARAES, 2010; SILVEIRA, 2003).

O Molegro Virtual Docker é uma plataforma integrada para prever as interações proteína-ligante, trata se de todos os aspectos do processo de acoplamento desde a preparação das moléculas até a determinação dos potenciais locais de ligação da proteína alvo e previsão dos modos de ligação

dos ligantes. (DE OLIVEIRA, R. G.; ALENCAR-FILHO, E. B.; VASCONCELLOS, M. L., 2014).

Os valores da função do ancoramento (Docking Scoring Function), E_{score} , usados pelo programa Molegro Virtual Docker (MVD), são definidos pela Equação 1.

$$E_{score} = E_{inter} + E_{intra} \quad \text{Equação 1}$$

Em que o termo E_{inter} corresponde à energia de interação ligante-proteína, definido de acordo com a Equação 2

$$E_{inter} = \sum_{i \in \text{ligante}} \sum_{j \in \text{proteína}} \left[E_{PLP}(r_{ij}) + 332.0 \frac{q_i q_j}{4r_{ij}^2} \right] \quad \text{Equação 2}$$

O primeiro termo E_{PLP} , representado na Equação 2, é um termo de energia potencial do ligante, sendo usado dois conjuntos diferentes de parâmetros, em que o primeiro é uma aproximação do termo estérico (van der Waals) entre átomos, e outro, um potencial para a ligação de hidrogênio. O segundo termo descreve as interações eletrostáticas entre átomos carregados, sendo o potencial de Coulomb com uma constante dielétrica dependente da distância ($D(r) = 4r$). O valor numérico de 332,0 fixa as unidades de energia eletrostática para kcal mol^{-1} (THONSEN; CHRISTENSEN, 2006).

O termo E_{intra} corresponde a energia interna do ligante e é definido de acordo com a Equação 3.

$$E_{intra} = \sum_{i \in \text{ligante}} \sum_{j \in \text{ligante}} E_{PLP}(r_{ij}) + \sum_{\text{ligações flexíveis}} A[1 - \cos(m \cdot \theta - \theta_0)] + E_{penalizada}$$

$$\text{Equação 3}$$

As duas primeiras somatórias representam todos os pares de átomos do ligante, excluindo os pares de átomos que estão conectados por duas ligações. O segundo termo é a energia de torção, em que θ é o ângulo de torção da ligação. A média da contribuição de torção da ligação da energia é usada se várias

torções são determinadas. O último termo, $E_{\text{penalizada}}$, é um termo de correção no qual designa uma penalidade de 1.000 se a distância entre dois átomos pesados (mais de duas ligações distantes) for menor que 2,0 Å, punindo conformações inexistentes do ligante. Logo, essas funções são usadas para ancorar automaticamente uma molécula flexível em uma molécula molde (proteína). (RAMALHO et al., 2009; THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

A flexibilidade da cadeia lateral dos resíduos de aminoácidos próximos à cavidade pode ser considerada. Para tal, um potencial “soft” é utilizado, onde pequenas sobreposições de Van der Waals na superfície da proteína é permitida. Ao final, minimizações de energia são realizadas para ajustar as posições dos átomos.

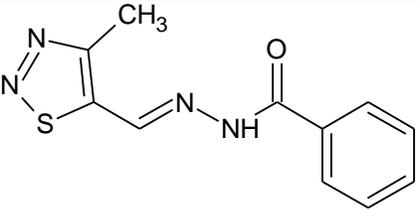
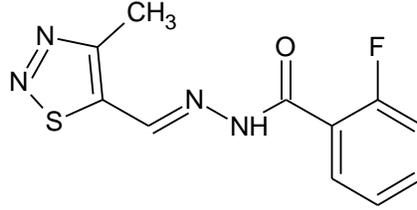
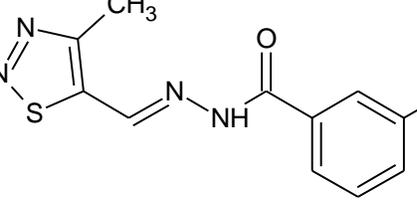
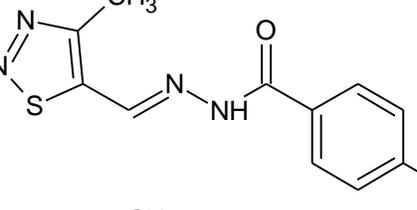
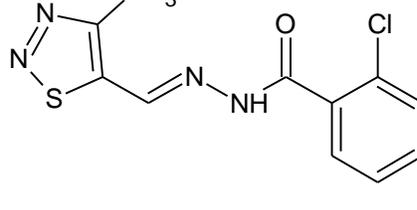
As múltiplas conformações obtidas no ancoramento são selecionadas usando um agrupamento de algoritmos. O conjunto de soluções é escolhido de acordo com o escore de energia. O primeiro membro é adicionado ao primeiro cluster e ele será o representante, os demais serão adicionados ao cluster mais semelhante usando a medida do RMSD (do inglês *Root Mean Square deviation*).

4. METODOLOGIA

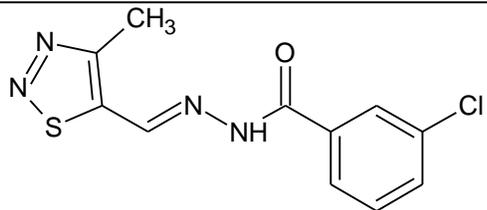
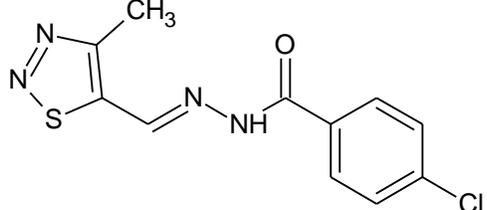
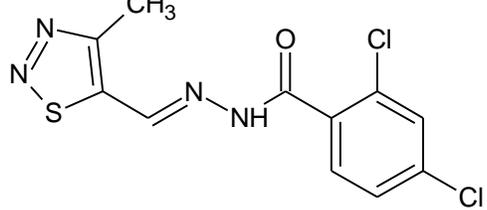
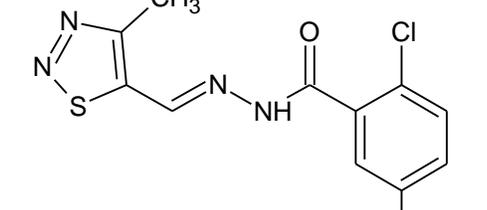
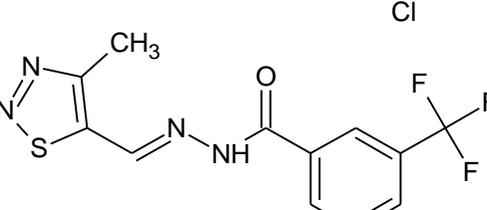
4.1. Dados Biológicos

Na Tabela 1 estão apresentadas as estruturas do 4-metil-1,2,3-tiadiazole-5 carboxaldeído benzoil hidrazona e dos seus derivados, inibidores da família 18 quitinase, utilizados nesse trabalho e seus respectivos valores de EC_{50} , concentração necessária para induzir 50% de resposta. Os compostos foram sintetizados e avaliados biologicamente por Jing-Peng Zhang e colaboradores.

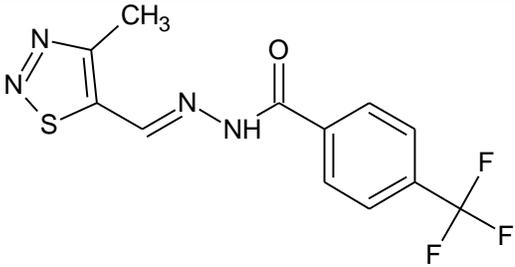
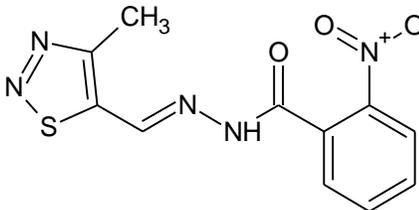
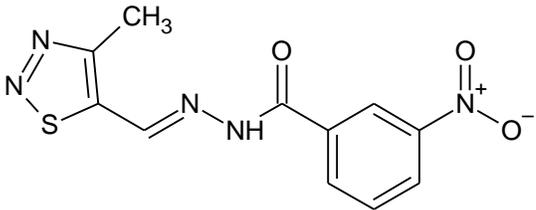
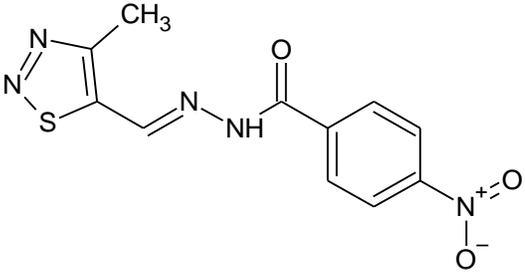
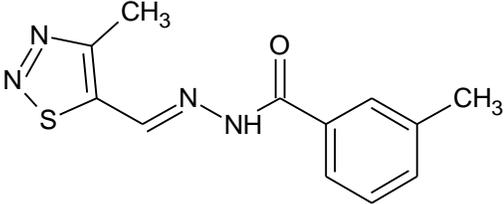
Tabela 1. Estruturas do 4-metil-1,2,3-tiadiazole-5 carboxaldeído benzoil hidrazona e dos seus derivados e suas respectivas atividades biológicas (ZHANG et al., 2017).

Composto	Estrutura	EC ₅₀ (μg mL ⁻¹)
8a		15,0
8b		50,0
8c		9,4
8d		7,1
8h		19,4

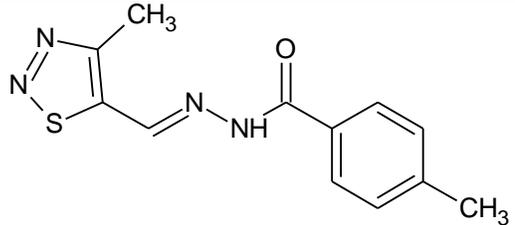
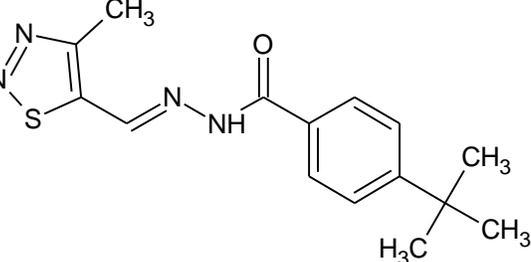
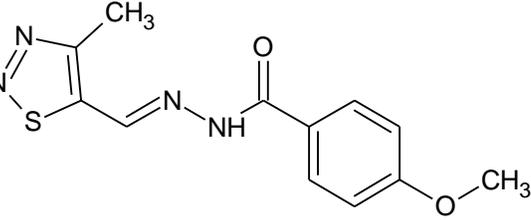
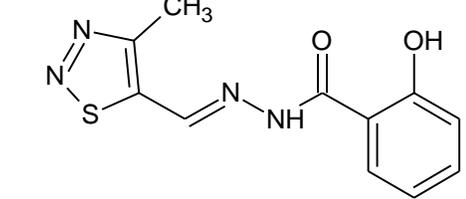
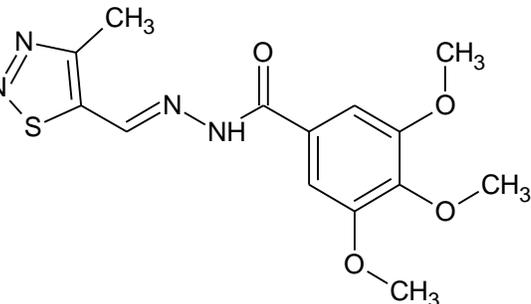
“Tabela 1, continuação”

Composto	Estrutura	EC ₅₀ (µg mL ⁻¹)
8i		3,8
8j		2,8
8k		8,2
8l		36,9
8m		7,9

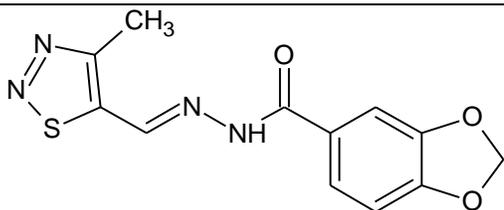
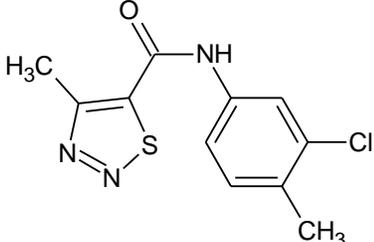
“Tabela 1, continuação”

Composto	Estrutura	EC ₅₀ (µg mL ⁻¹)
8n		1,9
8o		50
8p		46,8
8q		10,2
8r		50

“Tabela 1, continuação”

Composto	Estrutura	EC ₅₀ (µg mL ⁻¹)
8s		10,9
8t		9,4
8u		25,2
8v		20,8
8w		10,9

“Tabela 1, conclusão”

Composto	Estrutura	EC ₅₀ (µg mL ⁻¹)
8x		50
Tiadinil		7,6

4.2. Ancoramento Molecular

Atualmente, no banco de dados de proteínas não é possível encontrar a estrutura da quitinase para o *V. mali* por Raios-X ou RMN. Então, após uma busca por sequências similares em outros fungos, o estudo de ancoramento molecular foi utilizado com a estrutura tridimensional (3D) da proteína da Família 18 quitinase, obtida por difração de raio-X, disponível no PDB sob o código 2A3C com resolução de 2,07 Å. Essa estrutura está complexada com o inibidor pentoxifilina [3,7-dimethyl-1-(5-oxohexyl)-3,7-dihydro-1H-purine-2,6-dione] (RAO et al., 2005).

As estruturas 3D dos potenciais inibidores foram construídas, otimizadas e as cargas parciais calculadas através do programa Gaussian 09W utilizando o método DFT ωB97XD 6-31G (GAUSSIAN 09, Revision A.02; GAUSSIAN, Inc.: Wallingford, CT, 2016.). Esse processo é necessário para obter a conformação inicial dos compostos para o estudo de ancoramento molecular.

As cargas parciais dos átomos da proteína foram calculadas através do programa Discovery Studio 2016, utilizando o método de Gasteiger-Marsili, é um algoritmo de Equalização Parcial de Eletronegatividade Orbital (PEOE) usa um algoritmo iterativo para calcular cargas parciais em átomos para uma ampla gama de elementos comuns (MITTAL et al., 2009). Tal procedimento foi necessário para que os átomos dos resíduos da proteína tivessem cargas parciais mais confiáveis, possibilitando um estudo mais fino da interação dos ligantes com a proteína.

Após a preparação da proteína, a mesma foi importada para o *workspace* do programa MVD, onde as cavidades (possíveis sítios de interação) foram calculadas usando um algoritmo, o qual cria uma caixa gradeada com resolução de 0,8 Å, simulando a proteína. Em cada ponto, uma esfera de raio de 1,4 Å é criada. O volume inacessível é verificado quando a esfera se sobrepõe aos átomos (raio de van der Waals) da proteína. Os pontos restantes são considerados volumes acessíveis. Dentre as várias cavidades calculadas, as duas onde se encontrava o ligante pentoxifilina cristalizado serviram como base para a seleção.

Em seguida, os ligantes foram importados também para o programa MVD, de forma que suas cargas parciais atômicas não fossem recalculadas. O ancoramento foi realizado para determinar as melhores conformações entre proteína e ligante, sendo necessário dividi-lo em três partes. Na primeira parte cada ligante foi ancorado na cavidade 1 enquanto a cavidade 2 permanecia vazia, na segunda parte cada ligante foi ancorado na cavidade 2 enquanto a cavidade 1 permanecia vazia e na terceira e última parte as melhores poses de cada ligante da primeira parte foi escolhida e permaneceram na cavidade 1 enquanto na cavidade 2 ocorriam os ancoramentos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudos de ancoramento molecular

Os inibidores foram ancorados em dois sítios de ligação da quitinase (Figura 5). O primeiro (SL1) apresenta um volume de 85.50 \AA^3 e é delimitado pelos resíduos de aminoácidos: Tyr48, Trp52, Arg 57, Phe76, Gly136, Trp137, Thr138, Tyr245, Asp246, Tyr299, Arg301, Glu322 e Trp384. O segundo (SL2) apresenta um volume de 136.192 \AA^3 e é delimitado pelos resíduos de aminoácidos: Trp137, Tyr178, Ala220, Gly221, Lys224, Met243, Asp246, Tyr247, Ser250, Phe251, Phe273, Arg301 e Glu322. O resíduo Trp137 separa os dois sítios. A pesquisa conformacional foi realizada considerando-se o inibidor dentro de cada sítio, individualmente, e em ambos, mantendo uma conformação no sítio SL1 e pesquisando a outra no sítio SL2. Os resíduos de aminoácidos Trp384, Glu322, Arg301, Tyr299, Asp246, Tyr245, Thr138, Trp137, Gly136, Phe76, Arg57, Trp52 e Tyr48, tiveram suas cadeias laterais mantidas flexíveis durante a execução do ancoramento. As energias do MolDock Score, interação intermolecular e de ligação de hidrogênio entre os ligantes e os sítios foram calculados e estão apresentadas nas Tabelas 2 (sítio de ligação SL1), 3 (sítio de ligação SL2) e 4 (os dois sítios, SL1/2).

Figura 5 Estrutura secundária da quitinase 2A3C com os dois sítios de ligação separados pelo resíduo Trp137.

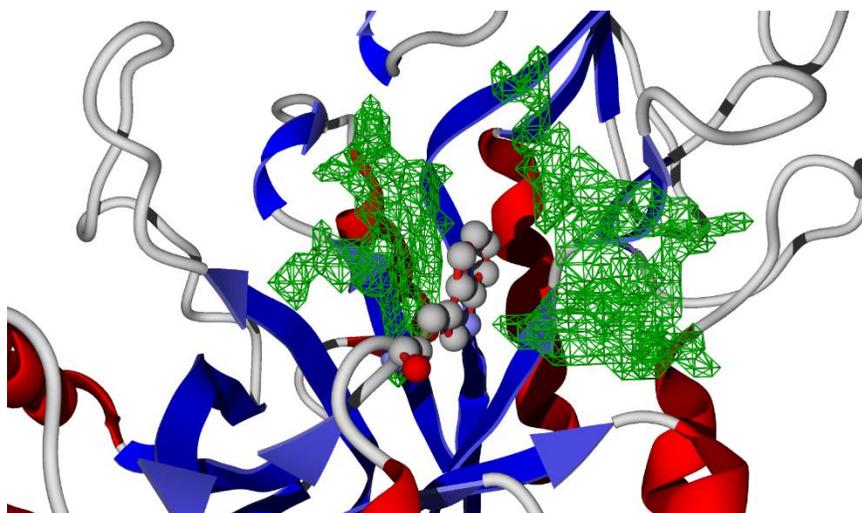


Tabela 2. Valores de MolDock Score (kcal mol^{-1}), energia intermolecular (kcal mol^{-1}) e de ligação de hidrogênio (kcal mol^{-1}) e pEC_{50} ($-\log\text{EC}_{50}$), para os compostos ancorados no sítio SL1 da proteína quitinase.

Composto	MolDock Score	Energia intermolecular	Ligação de Hidrogênio	pEC_{50}
8a	-115,12	-117,42	-4,13	4,22
8b	-109,82	-114,82	-7,00	3,72
8c	-118,89	-126,74	-7,43	4,45
8d	-121,97	-128,50	-5,78	4,57
8h	-116,72	-122,15	-3,11	4,16
8i	-124,91	-136,33	-3,39	4,87

8j	-123,70	-124,78	-7,84	5,00
8k	-119,63	-126,57	-4,72	4,58

“Tabela 2, conclusão”

Composto	MolDock Score	Energia intermolecular	Ligação de Hidrogênio	pEC₅₀
8l	-113,50	-118,93	-3,41	3,93
8m	-120,46	-131,60	-5,97	4,60
8n	-129,38	-134,62	-7,42	5,22
8o	-114,00	-121,52	-10,49	3,77
8p	-114,53	-125,18	-14,82	3,79
8q	-120,11	-126,22	-9,11	4,46
8r	-105,59	-112,06	-11,41	3,72
8s	-117,78	-122,86	-8,06	4,38
8t	-119,76	-128,43	-7,71	4,51
8u	-114,54	-118,33	-11,38	4,04
8v	-116,94	-122,64	-12,32	4,10
8w	-118,12	-131,42	-3,56	4,49
8x	-111,49	-117,23	-8,90	3,76

Tiadinil	-117,29	-125,83	-6,69	4,55
----------	---------	---------	-------	------

Tabela 3. Valores de MolDock Score (kcal mol^{-1}), energia intermolecular (kcal mol^{-1}) e de ligação de hidrogênio (kcal mol^{-1}) e pEC_{50} , para os compostos ancorados no sítio SL2 da proteína quitinase.

Composto	MolDock Score	Energia intermolecular	Ligação de hidrogênio	pEC_{50}
8a	-100,62	-102,63	-7,93	4,22
8b	-98,37	-103,67	-5,58	3,72
8c	-97,66	-102,53	-7,64	4,45
8d	-95,40	-102,60	-10,92	4,57
8h	-99,48	-108,06	-3,71	4,16
8i	-100,35	-99,93	-13,05	4,87
8j	-107,47	-111,66	-8,08	5,00
8k	-89,00	-95,68	-4,02	4,58
8l	-97,42	-101,60	-11,00	3,93
8m	-99,56	-111,33	-7,90	4,60
8n	-101,95	-103,63	-7,74	5,22
8o	-96,06	-105,45	-5,09	3,77
8p	-96,29	-96,70	-0,65	3,79
8q	-100,59	-102,41	-6,36	4,46

8r	-78,63	-80,19	-2,44	3,72
8s	-94,34	-99,33	-7,65	4,38

“Tabela 3, conclusão”

Composto	MolDock Score	Energia intermolecular	Ligação de hidrogênio	pEC ₅₀
8t	-100,01	-102,63	-9,31	4,51
8u	-95,66	-99,04	-4,67	4,04
8v	-98,18	-100,62	-3,63	4,10
8w	-96,38	-102,53	-7,47	4,49
8x	-95,55	-99,51	-7,32	3,76
Tiadinil	-85,68	-86,89	-3,62	4,55

Tabela 4. Valores de MolDock Score (kcal mol⁻¹), energia intermolecular (kcal mol⁻¹) e de ligação de hidrogênio (kcal mol⁻¹) e pEC₅₀, para os compostos ancorados no sítio SL1/2 da proteína quitinase.

Composto	MolDock Score	Energia intermolecular	Ligação de hidrogênio	pEC ₅₀
8a	-97,54	-106,30	-7,33	4,22
8b	-93,89	-94,77	-5,66	3,72
8c	-97,69	-99,49	-9,05	4,45
8d	-102,86	-105,36	-3,50	4,57
8h	-94,13	-101,54	-10,58	4,16
8i	-105,55	-115,23	-4,03	4,87

8j	-107,28	-108,07	-6,98	5,00
8k	-101,87	-106,06	-8,18	4,58

“Tabela 4, conclusão”

Composto	MolDock Score	Energia intermolecular	Ligação de hidrogênio	pEC₅₀
8l	-93,54	-95,78	-2,42	3,93
8m	-104,45	-105,54	-4,73	4,60
8n	-109,06	-111,25	-8,76	5,22
8o	-79,69	-81,25	-3,04	3,77
8p	-88,16	-94,05	-2,99	3,79
8q	-101,83	-10,50	-7,31	4,46
8r	-79,44	-85,81	-1,23	3,72
8s	-97,11	-101,01	-6,72	4,38
8t	-100,76	-102,54	-7,96	4,51
8u	-99,45	-103,46	-7,78	4,04
8v	-100,19	-103,50	-8,75	4,10
8w	-98,07	-106,45	-4,16	4,49
8x	-89,31	-94,78	-6,01	3,76
Tiadinil	-86,3713	-87,0254	-3,6741	4.55

Baseando-se nos resultados das tabelas 2, 3 e 4, análises de correlação usando o coeficiente de Pearson (r_p) e de Spearman (r_s) foram utilizadas para

representar os valores de energia e as atividades ($pEC_{50} = -\log EC_{50}$). Ao contrário do coeficiente de Pearson, o coeficiente de Spearman não exige a suposição de que a relação entre as variáveis seja linear, nem requer que as mesmas sejam quantitativas.

Observando os resultados obtidos dos gráficos, três tópicos foram formulados:

- i) Os gráficos 1 e 2 referem-se ao ancoramento dos inibidores somente no sítio SL1. Um coeficiente r_p de 0,93 foi observado. Uma interpretação usual de r_p é elevá-lo ao quadrado, para medir a porcentagem de viabilidade de uma variável explicada pela outra. Um R^2 de 0,81 é considerado satisfatório, significando que 81% da variância de uma das variáveis é explicada pela outra. O gráfico de Spearman apresentou $r_s = 0,97$ e, pela disposição dos pontos, pode-se confirmar que a relação entre as variáveis é linear.
- ii) Os gráficos 3 e 4 referem-se ao ancoramento dos inibidores somente no sítio SL2. Um r_p menor que o encontrado no sítio SL1 foi observado, indicando que a correlação entre as variáveis foi menor em 0,37. Isso significa que o modelo não conseguiu explicar os valores observados no ancoramento. Além disso, no gráfico 4 é possível visualizar melhor essa tendência, visto que os pontos estão muito espalhados.
- iii) Os gráficos 5 e 6 referem-se ao ancoramento dos inibidores nos dois sítios SL1/2. A conformação de cada inibidor obtida no sítio SL1 foi mantida e a pesquisa conformacional foi realizada no sítio SL2. Os r_p e r_s obtidos foram de 0,86 e 0,93. Diante desses valores pode-se dizer que a inibição da quitinase pode ocorrer quando os dois sítios estão ocupados.

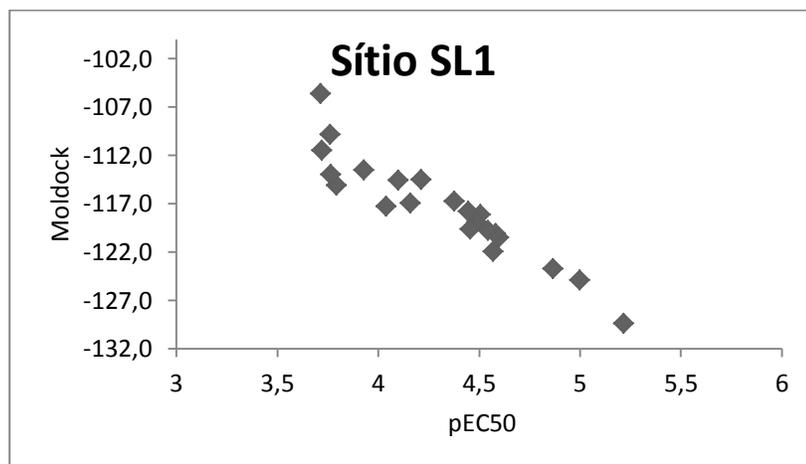


Gráfico 1. Correlação entre os valores da concentração do fungicida que induz metade do efeito máximo (pEC_{50}) e Moldock Score, obtida no ancoramento molecular para os inibidores em estudo, para o sítio SL1 da proteína quitinase. Coeficiente de Pearson é de 0,93.

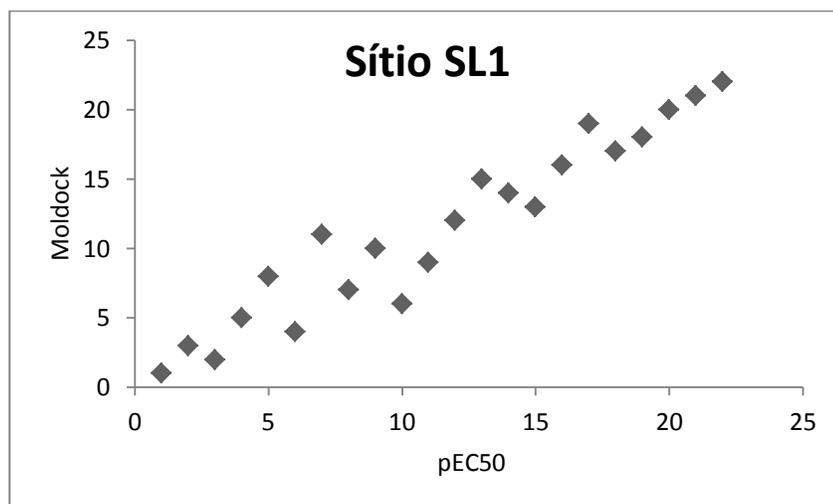


Gráfico 2. Correlação de Spearman, para a o sítio SL1 da proteína quitinase, com o valor do coeficiente de Spearman igual a 0,97.

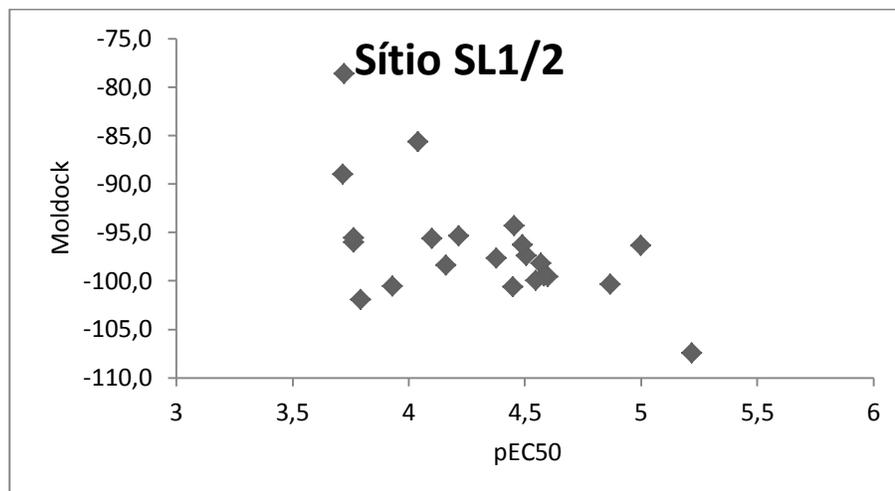


Gráfico 3. Correlação entre os valores da concentração do fungicida que induz metade do efeito máximo (pEC_{50}) e Moldock Score, obtida no ancoramento molecular para os inibidores em estudo, para o sítio SL1/2 da proteína quitinase. Coeficiente de Pearson é de 0,61.

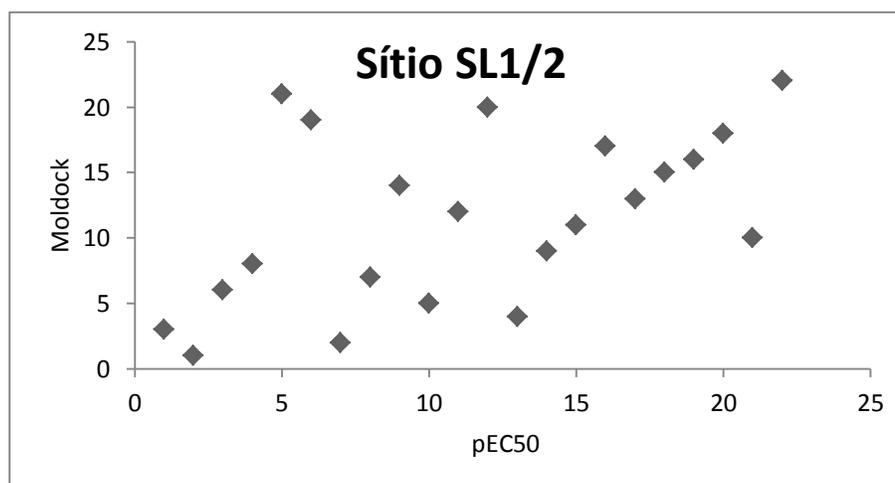


Gráfico 4. Correlação de Spearman, para no sítio SL1/2 da proteína quitinase, com o valor do coeficiente de Spearman igual a 0,50.

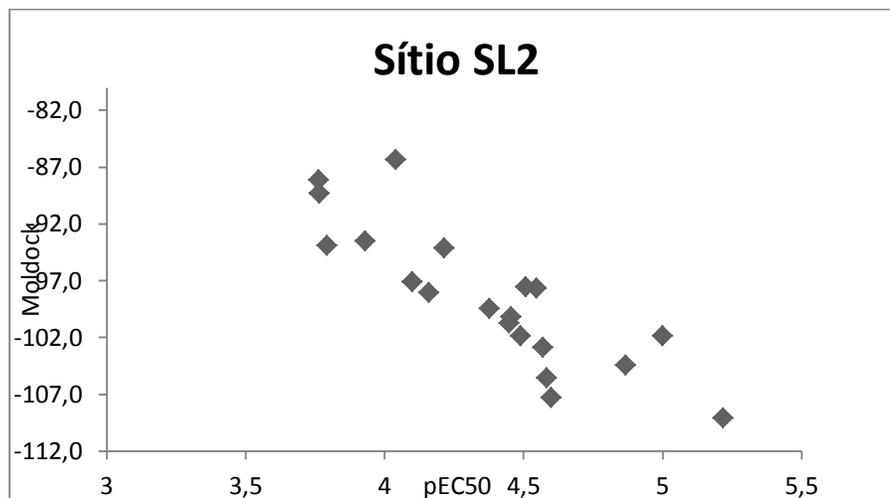


Gráfico 5. Correlação entre os valores da concentração do pesticida que induz metade do efeito máximo (pEC_{50}) e Moldock Score, obtida no ancoramento molecular para os inibidores em estudo, para o sítio SL2, com o sítio SL1 da proteína quitinase ocupado. Coeficiente de Pearson é de 0,86.

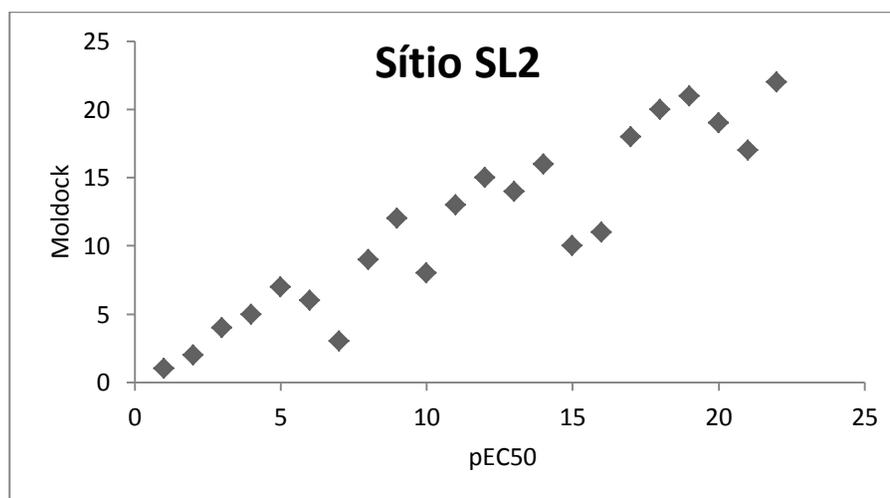


Gráfico 6. Correlação de Spearman, para sítio SL2, com a o sítio SL1 da proteína quitinase ocupado. Coeficiente de Spearman igual a 0,93.

Sobrepondo todas as conformações obtidas de cada inibidor no interior dos sítios, foi possível observar que:

- i) No sítio SL1 todos os ligantes apresentaram posicionamento espacial similar, onde o núcleo benzênico interagiu através de interações π - π *stacking* com o anel dos resíduos Trp137 e Trp384 (Figura 6).
- ii) No sítio SL2, por apresentar um volume maior que SL1, as possibilidades de conformações foram maiores. Então partiu-se de uma seleção onde conformações mais estáveis e com o mesmo perfil espacial foram selecionadas. Na figura 7 pode-se observar a sobreposição das conformações obtidas para cada inibidor. Todos os compostos apresentaram interação tipo π - π *stacking* entre o núcleo benzênico e o anel do resíduo Trp137.
- iii) No sítio SL1/2, o qual se manteve a conformação obtida no SL1, pôde-se observar que, para a maioria dos compostos, a conformação mais estável obtida em SL2 foi similar àquela obtida quando somente o sítio SL2 estava sendo considerado. Um exemplo é o composto **8n**, na Figura 7.

Figura 6. Representação dos dois sítios da quitinase contendo as conformações dos inibidores, obtidas no estudo de ancoramento molecular.

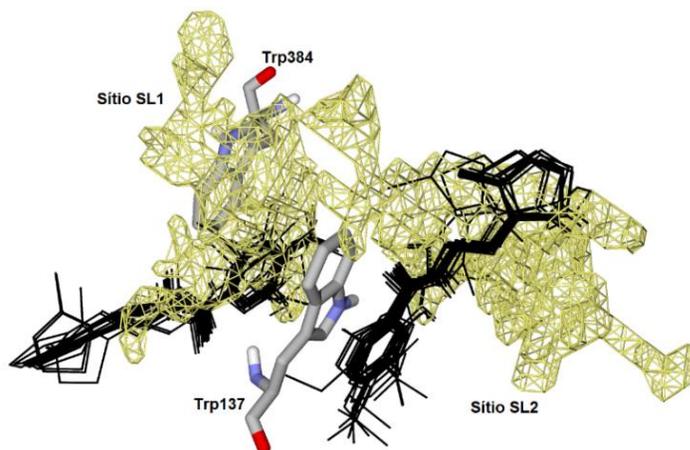
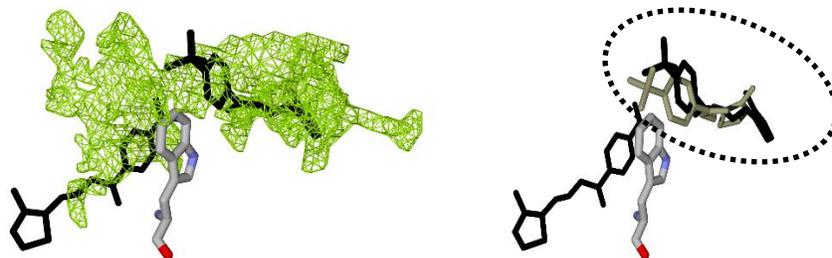


Figura 7. A esquerda, conformações obtidas para o composto **8n** nos sítios SL1 e SL2 e resíduo Trp137 entre eles. A direita, a sobreposição das duas (cinza e preta) conformações obtidas do composto **8n** no sítio SL2.



Para entender melhor o efeito dos inibidores no interior do sítio de ligação dividiu-se o conjunto de treinamento levando-se em consideração as substituições no núcleo benzênico.

- i) Compostos **8b**, **8c** e **8d**, diferenciam-se na posição em que o átomo de flúor se encontra. A atividade é preferencial para a posição *-para* dirigente e, da mesma maneira, os valores de

- energia Moldock Score (Tabela 2) acompanharam esta tendência.
- ii) Compostos **8h**, **8i** e **8j**, diferenciam-se na posição em que o átomo de cloro se encontra. Semelhantemente ao flúor, a posição preferencial é a *-para*, experimentalmente e teoricamente.
 - iii) Compostos **8o**, **8p** e **8q**, diferenciam-se na posição em que o substituinte NO₂ se encontra. Semelhantemente ao flúor e ao cloro, os dados teóricos corroboraram com os dados experimentais.
 - iv) Compostos **8a**, **8d**, **8j**, **8n**, **8q**, **8s**, **8t** e **8u**, se diferenciam na posição *para* do núcleo benzênico. O mais ativo apresentou o complexo mais estável energeticamente, dentre os demais.
 - v) A partir dos tópicos i-iv, pode-se concluir que a posição *-para* dirigente é fundamental para a atividade destes compostos. Isto pode ser explicado através da densidade eletrônica dos átomos ligados ao anel aromático (Figura 8). É encontrado um valor de carga parcial maior para o átomo ligado nesta posição, possivelmente devido a efeitos indutivos, os quais estão viabilizando interações eletrostáticas com a quitinase. No sítio SL1, a distância entre os átomos eletronegativos do anel benzênico e a hidroxila do resíduo Tyr245 é menor nesta posição (Figura 8), estabilizando o complexo. Já no sítio SL2, há o resíduo Tyr178 com a hidroxila voltada na direção do anel benzênico dos inibidores. Diferentemente do sítio SL1, a hidroxila está mais próxima do substituinte na posição *-orto* (Figura 9).

Figura 8. Sobreposição dos compostos **8b**, **8c** e **8d** no sítio SL1. Os valores correspondem à distância (Å) entre os átomos e entre parênteses a carga parcial do átomo.

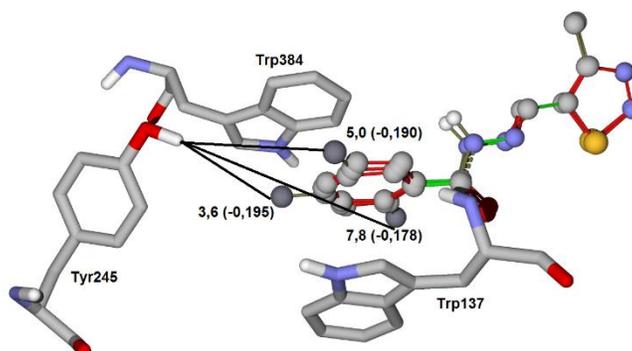
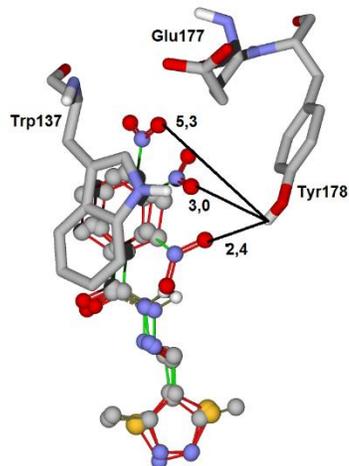


Figura 9. Sobreposição dos compostos **8o**, **8p** e **8q** no sítio SL2. Os valores correspondem à distância (Å) entre os átomos.



Como os resultados de correlação do ancoramento no sítio SL2 foram inferiores aos encontrados nos sítios SL1 e SL1/2, serão apresentadas a seguir as observações com relação às interações tipo ligação de hidrogênio, para os sítios que apresentaram correlação energia-atividade favorável.

- i) No sítio SL1, todos compostos interagiram com Tyr139 e Thr138. Na Figura 10 estão representados os compostos mais e menos ativos da série estudada.
- ii) No sítio SL1/2, todos compostos interagiram com Gly249, Ser252 e Phe251; somente os compostos 8o e 8p interagiram com Tyr178. Na Figura 11 estão representados os compostos **8o**, **8n** e **8r**, da série estudada.

Figura 10. Representação das ligações de hidrogênio entre os compostos **8n** e **8r**, no interior do sítio SL1.

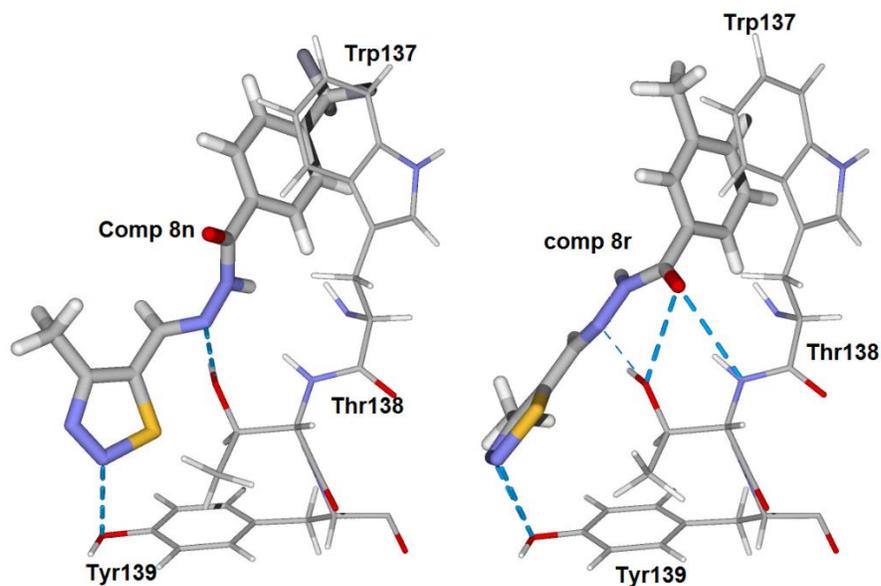
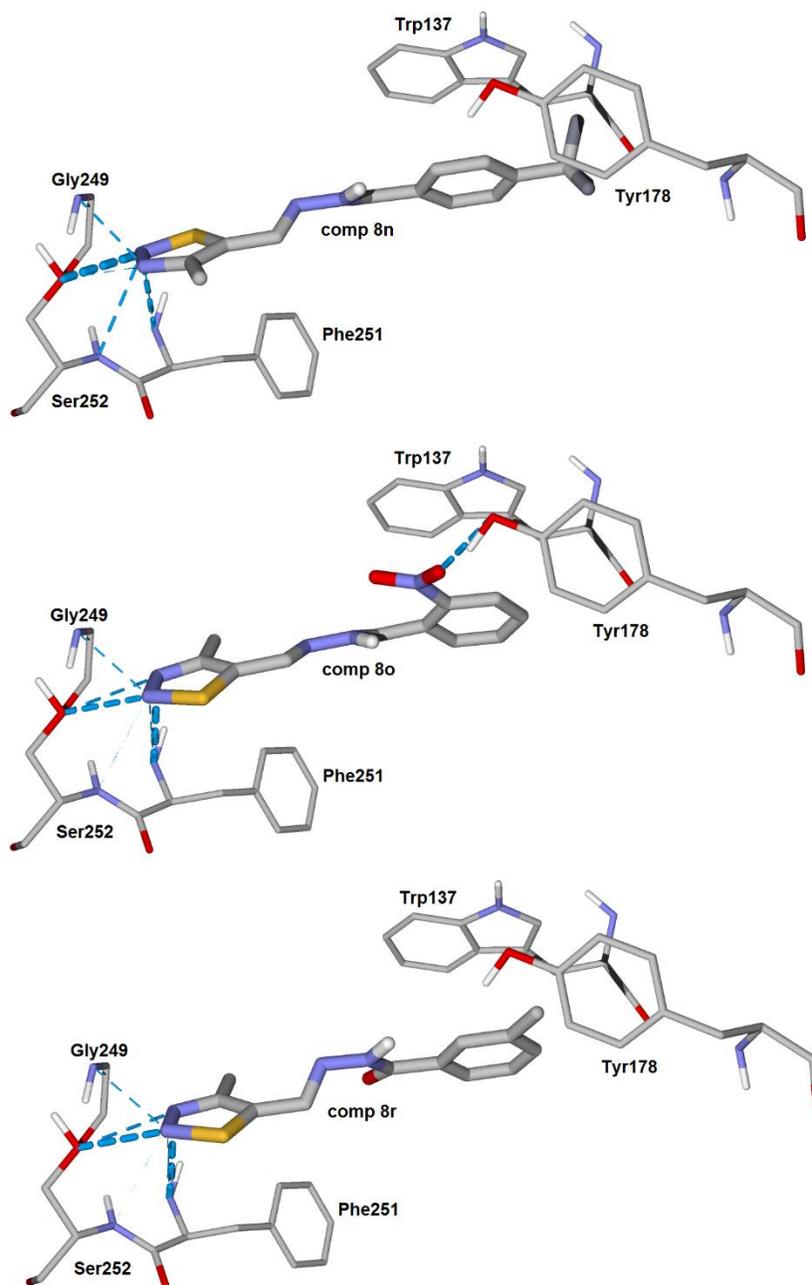
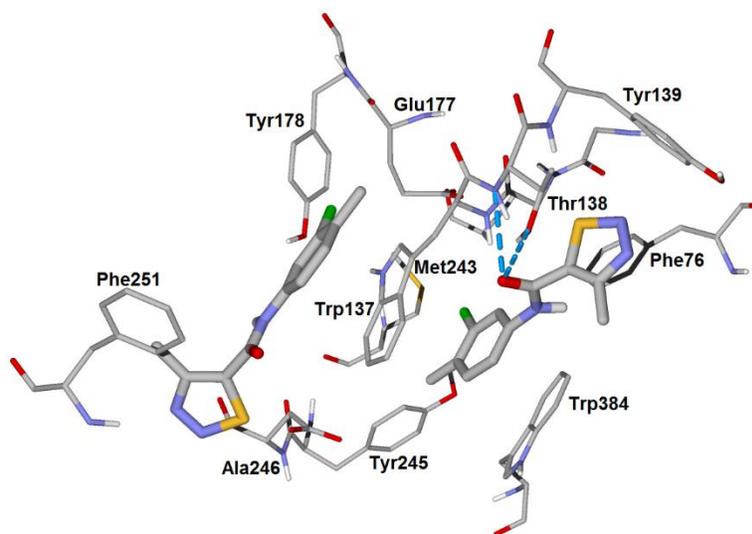


Figura 11. Representação das ligações de hidrogênio entre os compostos 8o, 8n e 8r, no interior do sítio SL1/2.



As interações do fungicida tiadinil com a quitinase também foi analisada, uma vez que o mesmo serve de ponto de partida para síntese dos compostos em estudo e suas interações servem de parâmetro para os demais compostos. O tiadinil apresentou atividade biológica mediana, sendo ela de 4,55 (Tabela 2). No sítio SL1 (Figura 12), o composto realizou interações tipo ligação de hidrogênio com o resíduo Thr138, além das interações π - π *stacking* com os resíduos Trp384 e Trp137. No sítio SL2 não foi observada interações tipo ligação de hidrogênio, porém a núcleo benzênico continua realizando interações π - π *stacking* com o resíduo Trp137.

Figura 12. Conformações obtidas do ancoramento molecular para o tiadinil no interior dos sítios SL1 e SL2. Ligações de hidrogênio estão representadas em tracejado



6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia utilizada no ancoramento molecular foi eficiente para demonstrar a relação existente entre os valores de EC_{50} dos análogos tiadinil e a energia Moldock Score. Através dos gráficos de correlação pode-se concluir que o efeito inibitório será efetivo se a estrutura do inibidor conseguir interagir favoravelmente nos dois sítios de interação, ou seja, o composto protótipo deve formar um complexo estável no sítio SL1/2.

Os aminoácidos que apresentaram maior importância no sítio SL1 foram Tyr139 e Thr138, uma vez que interagiram através de ligação hidrogênio ou π - π *stacking* com a maioria dos compostos. No sítio SL1/2, os aminoácidos que apresentaram maior importância foram Gly249, Ser252 e Phe251.

7. PERSPECTIVA

Uma vez que os compostos que apresentaram os substituintes na posição *-para* tiveram melhores resultados, tanto experimentalmente como teoricamente, o planejamento de novos inibidores com substituinte nessa posição, de preferência aqueles que retiram densidade eletrônica, favorecendo assim a inibição da quitinase.

Para, além disso, novos inibidores da quitinase tem que possuir uma boa interação com o sítio SL1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, Kazuyuki et al. Genetic studies on resistance to Valsa canker in apple: genetic variance and breeding values estimated from intra- and inter-specific hybrid progeny populations. **Tree Genetics & Genomes**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.363-372, 2 out. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11295-010-0337-3>.

ADAMS, G. C.; ROUX, J.; WINGFIELD, M. J. Cytosporaspecies (Ascomycota, Diaporthales, Valsaceae): introduced and native pathogens of trees in South Africa. **Australasian Plant Pathology**, [s.l.], v. 35, n. 5, p.521-548, 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1071/ap06058>.

BRENT, Keith J. RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS EM PATÓGENOS DE PLANTAS CULTIVADAS: COMO MANEJÁ-LA? [s.i]: Global Crop Protection Federation, 1999.

CARVALHO, I. et al. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**, v.26, n. 3, p. 428-438, 2003.

CECHINEL FILHO, Valdir et al. Aspectos químicos e potencial terapêutico de imidas cíclicas: Uma revisão da literatura. **Química Nova**, [s.i], v. 26, n. 2, p.230-241, jan. 2003.

DE OLIVEIRA, R. G.; ALENCAR-FILHO, E. B.; & VASCONCELLOS, M. L. A influencia da piperina na disponibilidade de fármacos: uma abordagem molecular. **Química Nova**, Vol. 37, No. 1, p.69-73, 2014.

DO AMARAL, A. T., & MONTANARI, C. A., Química medicinal: 25 anos de planejamento racional de fármacos. **Química Nova**, v.25, Supl 1, p:39-44, 2002.

DUO-CHUAN, Li. Review of Fungal Chitinases. **Mycopathologia**, [s.l.], v. 161, n. 6, p.345-360, jun. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-006-0024-y>.

FLEURI, Luciana Francisco; SATO, Hélia Harumi. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, Campinas, v. 28, n. 5, p.871-879, out. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422005000500026>.

GARCIA, A. Fungicidas I: utilização no controle químico de doenças e sua ação contra os fitopatógenos. Porto Velho: EMBRAPA-CPAF Rondônia, 1999. 32p.

Gaussian 09, Revision A.02, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.

GODOI, Ana Flavia Locateli; FAVORETO, Rodrigo; SANTIAGO-SILVA, Mary. Contaminação ambiental por compostos organoestênicos. *Química Nova*, [s.l.], v. 26, n. 5, p.708-716, out. 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422003000500015>.

GONÇALVES, Márcia dos Santos. **Uso sustentável de pesticidas. Análise comparativa entre a União Europeia e o Brasil.** 2016. 170 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências do Ambiente, Departamento de Biologia Vegetal, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2016.

GUIMARÃES, A. P. Estudos por ancoramento e dinâmica molecular de potenciais inibidores da nucleosídeo hidrolase de bacillus anthracis. 2010. 170 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

IWATA, Y. et al. Conformational analysis and docking study of potent factor XIII a inhibitors having a cyclopropenone ring. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, New York, v. 18, n. 6, p. 591-599, Dec. 2000.

KE, Xiwang et al. Histological and cytological investigations of the infection and colonization of apple bark by *Valsa mali* var. *mali*. **Australasian Plant Pathology**, [s.l.], v. 42, n. 1, p.85-93, 25 jul. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13313-012-0158-y>.

LOGUERCIO-LEITE, Clarice et al. A particularidade de ser um fungo – I. Constituintes celulares. **Revista Biotemas**, [s.i], v. 19, n. 2, p.17-27, jun. 2006.

MELLO, Ingrid Ney Kramer de; SILVEIRA, Wendeo Ferreira da. Resíduos de agrotóxicos em produtos de origem animal. **Acta Veterinaria Brasilica**, [s.i], v. 6, n. 2, p.94-104, 2012.

MITTAL, Ruchi R. et al. Partial Charge Calculation Method Affects CoMFA QSAR Prediction Accuracy. *Journal Of Chemical Information And Modeling*, [s.l.], v. 49, n. 3, p.704-709, 25 fev. 2009. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ci800390m>.

MIZUTANI, M. Y.; TOMIOKA, N.; ITAI, A. Rational automatic search method for stable docking models of protein and ligand. *Journal of molecular biology*, v.243, n.2, p. 310-326, 1994.

POLLA, Daniel Lôpo. **Otimização de ensaio para detecção de atividade quitinolítica em bibliotecas**. 2010. 34 f. Monografia (Especialização) - Curso de Biomedicina Bacharel, Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2010.

RAMALHO, T. C. et al. Construction and assessment of reaction models of class I EPSP synthase: Molecular docking and density functional theoretical calculations. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v.27, n.2, p. 195-207, 2009.

RAO, et al., 2005 - RAO, Francesco V. et al. Methylxanthine Drugs Are Chitinase Inhibitors: Investigation of Inhibition and Binding Modes. **Chemistry & Biology**, [s.l.], v. 12, n. 9, p.973-980, set. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.07.009>.

RODRIGUES, Marili V.n. et al. GC-MS Determination of Organochlorine Pesticides in Medicinal Plants Harvested in Brazil. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**. Campinas, p. 135-142. 2007.

SANTOS, Felipe Hipólito dos; SANTOS, Leandro Alvarenga; FARIA, Cacilda Márcia Duarte Rios. Translocação de triazóis e estrobilurinas no controle do oídio da soja. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.87-92, 2018. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/paet.v11.n1.10>.

SCHÜTTELKOPF, Alexander W. et al. Acetazolamide-based fungal chitinase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 18, n. 23, p.8334-8340, dez. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2010.09.062>.

SILVA, Márcia Vanusa da et al. Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. **Research In Microbiology**, [s.l.], v. 156, n. 3, p.382-392, abr. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2004.10.013>.

SILVEIRA, R. L. V. de A. Fitotoxicidade de glifosato em *Eucalyptus*. *Addubare*, Piracicaba, v. 2, n. 9, p. 4-7, out./dez. 2003.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: a new technique for highaccuracy molecular docking. *Journal of Medicinal Chemistry*, Washington, v. 49, n. 11, p. 3315-3332, June 2006.

TSUBATA, Kenji et al. Development of a novel plant activator for rice diseases, tiadinil. **Journal Of Pesticide Science**, [s.l.], v. 31, n. 2, p.161-162, 2006. Pesticide Science Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.1584/jpestics.31.161>.

WANG, Qinghua et al. Purification, characterization of a CkChn134 protein from *Cynanchum komarovii* seeds and synergistic effect with CkTLP against *Verticillium dahliae*. **Protein Science**, [s.l.], v. 21, n. 6, p.865-875, 24 abr. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/pro.2073>.

WARE, George W.; WHITACRE, David M. (Org.). An Introduction to Insecticides (4th edition). 2004. Disponível em: <<https://ipmworld.umn.edu/ware-intro-insecticides>>. Acesso em: 12 out. 2018.

XU, Weiming et al. Synthesis and bioactivity of novel sulfone derivatives containing 2,4-dichlorophenyl substituted 1,3,4-oxadiazole/thiadiazole moiety as chitinase inhibitors. **Pesticide Biochemistry And Physiology**, [s.l.], v. 101, n. 1, p.6-15, set. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.05.006>.

YIN, Zhiyuan et al. Apple resistance responses against *Valsa mali* revealed by transcriptomics analyses. **Physiological And Molecular Plant Pathology**, [s.l.], v. 93, p.85-92, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2016.01.004>.

ZHANG, Jin et al. One-pot synthesis and antifungal activity against plant pathogens of quinazolinone derivatives containing an amide moiety. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 26, n. 9, p.2273-2277, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.03.052>.

ZHANG, Jing-peng et al. Synthesis and biological evaluation of 4-methyl-1,2,3-thiadiazole-5-carboxaldehyde benzoyl hydrazone derivatives. **Chinese Chemical Letters**, [s.l.], v. 28, n. 6, p.1238-1242, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccllet.2017.02.002>.

Anexo

Anexo 1 – Dados retirados de FRAC-BR

Os modos de ação dos fungicidas são divididos em grupos de acordo com o sítio de ação, e estão identificados no banco de dados abaixo seguindo o código de cores:

■ Azul-claro: Síntese de ácidos nucleicos	■ Verde-escuro: Biossíntese da parede celular
■ Laranja: Mitose e divisão celular	■ Lilás: Síntese de melanina na parede celular
■ Verde-claro: Respiração	■ Marrom: Indutores de defesas em plantas hospedeiras
■ Rosa: Síntese de aminoácidos e proteínas	■ Cinza: Desconhecido ou inespecífico
■ Amarelo: Transdução de sinal	■ Bege: Não classificado
■ Vermelho: Síntese de lipídios e integridade da membrana	■ Azul-escuro: Atividade de contato multissítio
■ Roxo: Biossíntese de esterol em membranas	

GRUPO	SÍTIO	NOME DO GRUPO	GRUPO QUÍMICO	INGREDIENTE ATIVO
A1	RNA polimerase I	Fenilamida	Acilalanina	Benalaxil
				Benalaxil-M (=Qiralaxil)
				Furalaxil
				Metalaxil
				Metalaxil-M (=Mefenoxam)
			Butirolactona	Ofurace
			Oxazolidinona	Oxadixil
A2	Adenosina desaminase	Hidroxi- (2-amino-) pirimidina	Hidroxi- (2-amino-) pirimidina	Bupirimato Dimetirimol Etrimol
A3	Síntese de DNA e RNA (proposto)	Heteroaromático	Isotiazolona Isoxazol	Octiliona Himexazol
A4	DNA topoisomerase tipo II (girase)	Ácido carboxílico	Ácido carboxílico	Ácido oxalínico
B1	Montagem de β -tubulina na mitose	Metil benzimidazol carbamato	Benzimidazol	Benomil
				Carbendazim
				Fuberidazol
				Tiabendazol
				Tiofanato
			Tiofanato	Tiofanato-metilico
B2	Montagem de β -tubulina na mitose	N-fenil carbamato	N-fenil carbamato	Dietofencarbe
B3	Montagem de β -tubulina na mitose	Benzamida	Toluamida	Zoxamida
		Tiazol carboxamida	Etilamino-tiazol-carboxamida	Etaboxame
B4	Divisão celular (proposto)	Fenilureia	Fenilureia	Pencicuroom
B5	Deslocalização das proteínas spectrin-like	Benzamida	Piridinilmetil-benzamida	Fluopicolida
B6	Actina/ Miosina/ Fimbrina função	Cianoacrilato	Aminocianoacrilato	Fenamacril

GRUPO	SÍTIO	NOME DO GRUPO	GRUPO QUÍMICO	INGREDIENTE ATIVO
BM01	Múltiplos efeitos na parede celular, transportadores de membrana iônica; Efeitos quelantes	Polipeptídeo de extrato vegetal	Polipeptídeo (lectina)	Extrato de cotilédones de plântulas de tremoço ("BLAD")
BM02	Competição, myco-parasitismo, anti-biose, enzimas líticas e resistência induzida	Microbiana (<i>Trichoderma</i> spp.)	<i>Trichoderma</i> spp. e metabolitos fungicidas produzidos	Trichoderma atroviride strain SC01
C1	Complexo I: NADH Óxido-reductase	Pirazol-MET1	Pirazol-5-carboxamida	Tolfenpirade
		Primidinamina	Primidinamina	Diflometorin
C2	Complexo II: succinato-desidrogenase	SDHI (Inibidores de succinato-desidrogenase)	Fenil-benzamida	Benodanil Flutolanil Mepronil
			Fenil-oxo-etil tiofeno amida	Isofetamida
			Furan-carboxamida	Fenfuram
			N-metoxi-(fenil-etil)-pirazol-carboxamida	Pidiflumetofeno
			Oxatin-carboxamida	Carboxina Oxicarboxina
			Pirazol-4-carboxamida	Benzovindiflupir
				Bixafem
				Fluxapiraxade
				Furametpir
				Isopirazam
				Penflufem
			Pentiopirade	
			Sedaxano	
Piridina-carboxamida	Boscalida Piraziflumida			
Piridinil-etil benzamida	Fluopirame			
Tiazol-carboxamida	Tifluzamida			
C3	Complexo III: citocromo bc1 (ubiquinol oxidase) no sítio Qo	QoI-fungicidas (Inibidores extracelulares de Quinona)	Benzil-carbamato	Piribencarbe
			Dihidro-dioxazina	Fluoxastrobina
			Imidazolinona	Fenamidona
			Metoxi-acetamida	Mandestrobina
			Metoxi-acrilato	Azoxistrobina
				Coumoxistrobina
				Enoxastrobina
				Flufenoxistrobina
				Picoxistrobina
			Piraoxistrobina	
			Metoxi-carbamato	Piraclostrobina
				Pirametostrobina
				Triclopiricarbe
Oxazolidina-diona	Famoxadona			

GRUPO	SÍTIO	NOME DO GRUPO	GRUPO QUÍMICO	INGREDIENTE ATIVO
C3	Complexo III: citocromo bc1 (ubiquinol oxidase) no sítio Qo	QoI - fungicidas (Inibidores extracelulares de Quinona)	Oximino-acetamida	Dimoxistrobina
			Oximino-acetato	Fenaminstrobina Metominostrobina Orisastrobina Cresoxim-metil Trifloxistrobina
C4	Complexo III: citocromo bc1 (ubiquinona redutase) no sítio Qi	QiI - fungicidas (Inibidores intracelulares de Quinona)	Ciano-imidazol	Ciazofamida
C5	Desacoplador de fosforilação oxidativa		Sulfamoil-triazol	Amisulbrom
		2,6-dinitro-anilina	Fluazinam	
C6	Fosforilação oxidativa, ATP sintase	Organoestânico	Compostos de trifeniltin	Binapacril
				Dinitrofenil crotonato
C7	Produção de ATP (proposto)	Tiofeno-carboxamida	Tiofeno-carboxamida	Acetato de fentina Cloreto de fentina Hidróxido de fentina
C8	Complexo III: citocromo bc1 (ubiquinol redutase) no sítio Qo, stigmatellin ligação subsítio	QoSI fungicidas (Inibidores extracelulares de Quinona, ligação do tipo stigmatellin)	Triazol-pirimidilamina	Siltiofame Ametoctradin
D1	Biossíntese de metionina (proposto)	AP - fungicida (Anilino pirimidina)	Anilino pirimidina	Ciprodinilo Mepanipirim Pirimetanil
D2	Síntese de proteína	Ácido enopiranurônico	Ácido enopiranurônico	Blasticidina-S
D3	Síntese de proteína	Antibiótico hexopiranosil	Antibiótico hexopiranosil	Casugamicina
D4	Síntese de proteína	Antibiótico glicopiranosil	Antibiótico glicopiranosil	Estreptomicina
D5	Síntese de proteína	Antibiótico tetraciclina	Antibiótico tetraciclina	Oxitetraciclina
DESC	Citocromo bc1, local de ligação desconhecido (proposto)	4-quinolil-acetato	4-quinolil-acetato	Tebufluoquina
		Ácido ftalâmico	Ácido ftalâmico	Tecloftalame (Bactericida)
	Desconhecido	Benzeno-sulfonamida	Benzeno-sulfonamida	Flusulfamida
		Benzotriazina	Benzotriazina	Triazóxido
		Cianoacetamida-oxima	Cianoacetamida-oxima	Cimoxanil
		Fenil-acetamida	Fenil-acetamida	Ciflufenamida
		Fosfonato	Etil fosfonato Fosfonato	Fosetil alumínio Ácido fosforoso e sais
		Piridazinona	Piridazinona	Diclomezina
Pirimidinona-hidrazona	Pirimidinona-hidrazona	Ferimzone		

GRUPO	SÍTIOS	NOME DO GRUPO	GRUPO QUÍMICO	INGREDIENTE ATIVO
DESC	Desconhecido	Tetrazoiloxima	Tetrazoiloxima	Picarbutrazox
		Tiazolidina	Ciano-metileno-tiazolidina	Flutianil
		Tiocarbamato	Tiocarbamato	Metasulfocarbe
	Desconhecido (Inibição da trealase)	Antibiótico glicopiranosil	Antibiótico glicopiranosil	Validamicina
	Ruptura da membrana plasmática (proposto)	Guanidina	Guanidina	Dodina
		Arlifenil cetona	Benzofenona	Metrafenone
Benzoilpiridina	Priofenona			
E1	Transdução de sinal (mecanismo desconhecido)	Aza-naftalina	Arlotoxiquinolona	Quinoxifeno
			Quinazolinona	Proquinazida
E2	MAP/Histidina-cinase na transdução do sinal osmótico (os-2, HOG1)	Fenilpirrol (PP-fungicidas)	Fenilpirrol	Fenpiclonil Fludioxonil
E3	MAP/Histidina-cinase na transdução do sinal osmótico (os-1, Daf1)	Dicarboximida	Dicarboximida	Clozolinato
				Dimetaclona
				Iprodiona
				Procimidona
				Vinclozolina
F1	Anteriormente Dicarboximida	Anteriormente Dicarboximida	Anteriormente Dicarboximida	Anteriormente Dicarboximida
F2	Biossíntese de fosfolípido, metiltransferase	Fosforotiolato e Ditiolano	Ditiolano	Isoprotilane
			Fosforotiolato	Edifenfós
				Iprobenfós Pirazofós
F3	Peroxidação lipídica (proposto)	AH-fungicidas (Hidrocarbonetos aromáticos) (clorofenilos, nitroanilinas)	Hidrocarboneto aromático	1,2,4-tiadiazol
				Etridiazol
				Bifenil
				Cloronebe
				Diclorana
				Quintozeno (PCNB) Tecnazeno (TCNB) Tolclofós-metil
F4	Permeabilidade da membrana celular, ácido graxo (proposto)	Carbamato	Carbamato	Iodocarbe
				Propamocarbe
				Proticarbe
F5	Anteriormente Amida do Ácido Carboxílico (CAA-fungicida)	Anteriormente Amida do Ácido Carboxílico (CAA-fungicida)	Anteriormente Amida do Ácido Carboxílico (CAA-fungicida)	Anteriormente Amida do Ácido Carboxílico (CAA-fungicida)
F6	Desreguladores microbianos das membranas celulares do patógeno	Microbiana (<i>Bacillus</i> sp.)	<i>Bacillus</i> sp. e os lipopéptidos de fungicidas produzidos	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> estirpes: D747
				<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> estirpes: FZB24
				<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> estirpes: MBI600
				<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> estirpes: QST 713

GRUPO	SÍTIO	NOME DO GRUPO	GRUPO QUÍMICO	INGREDIENTE ATIVO
F7	Ruptura da membrana celular (proposto)	Extrato de planta	Hidrocarbonetos terpênicos e álcoois terpênicos	Melaleuca alternifolia Óleos vegetais (misturas): Eugenol, Geraniol, Timol
F8	Ligação de Ergosterol	Polieno	Antibiótico macrólido anfotérico antifúngico <i>Streptomyces natalensis</i> o <i>S. chattanoogensis</i>	Natamicina (Piramicina)
F9	Homeostase lipídica e transferência/ armazenamento	Inibição do homólogo da proteína de ligação a oxysterol OSBPI	Piperidinil-tiazole-isoxazolina	Oxatiapiprolin

G1	C14- desmetilase na biossíntese de esterol (erg11/cyp51)	DMI-fungicidas (inibidores da desmetilação) (SBI: Classe I)	Imidazol	Imazalil
				Oxpoconazol
				Pefurazoate
				Procloraz
				Triflumizol
			Piperazina	Triforina
			Piridina	Pirifenox
				Pirisoaxazol
			Pirimidina	Fenarimol
				Nuarimol
			Triazol	Azaconazol
				Bitertanol
				Bromuconazol
				Ciproconazol
				Difenoconazol
				Diniconazol
				Époxiconazol
				Etaconazol
				Fenbuconazol
				Fluquinconazol
				Flusilazol
				Flutriafol
				Hexaconazol
				Imibenconazol
				Ipconazol
				Meticonazol
				Miclobutanil
Penconazol				
Propiconazol				
Simeconazol				
Tebuconazol				
Tetraconazol				
Triadimefon				
Triadimenol				
Triticonazol				
Triazolintiona	Protioconazol			

GRUPO	SÍTIO	NOME DO GRUPO	GRUPO QUÍMICO	INGREDIENTE ATIVO
G2	Δ14-redutase e Δ8 -> Δ7- isomerase na biossíntese de esterol (erg24, erg2)	Amina ("morfolina") (SBI: Classe II)	Espirocetal-amina	Espiroxamina
			Morfolina	Aldimorfe
				Dodemorfe
				Fenpropimorfe
G2	Δ14-redutase e Δ8 -> Δ7- isomerase na biossíntese de esterol (erg24, erg2)	Amina ("morfolina") (SBI: Classe II)	Piperidina	Fenpropidin Piperalin
			G3	3-keto-redutase em C4-demetilação (erg27)
Hidroxiânilina	Fenhexamida			
G4	Esqualeno- -epoxidase em biossíntese de esterol (erg1)	SBI: Classe IV	Alilamina	Naftifina (antimicótico) Terbinafina (antimicótico)
			Tiocarbamato	Pributicarbe
H3	Anteriormente Antibiótico glicopiranosil	Anteriormente Antibiótico glicopiranosil	Anteriormente Antibiótico glicopiranosil	Anteriormente Antibiótico glicopiranosil
H4	Síntese de quitina	Polioxina	Nucleosídeo de peptidil pirimidina	Polioxina
H5	Síntese de celulose	Amida do Ácido Carboxílico (CAA-fungicida)	Amidas de ácido mandélico	Mandipropamida
			Amidas do ácido cinâmico	Dimetomorfe
				Flumorfe
				Primorfe
			Valinamida carbamato	Bentiavalicarbe Iprovalicarbe Valifenalato
I1	Redutase na biossíntese de melanina	Inibidores da biossíntese de melanina-redutase (MBI-R)	Isobenzofuranone	Ftalida
			Pirrolo-quinolinona	Piroquitona
			Triazolobenzo-tiazol	Triciclazol
I2	Desidratase na biossíntese de melanina	Inibidores da biossíntese de melanina- -desidratase (MBI-D)	Carboxamida	Diclocimet
			Ciclopropano carboxamida	Carpropamida
I3	Síntese de policétido na biossíntese de melanina	Inibidores da biossíntese de melanina- -Polyketide synthase (MBI-P)	Propionamida	Fenoxanil
			Trifluoroetilcarba- mato	Tolprocarbe
M1	Atividade de contato multissítio	Inorgânico	Inorgânico (Cobre)	Cobre
M2	Atividade de contato multissítio	Inorgânico	Inorgânico (Enxofre)	Enxofre
M3	Atividade de contato multissítio	Ditiocarbamatos e relativos	Ditiocarbamatos e relativos	Ferbame
				Mancozebe
				Manebe
				Metiram
				Propinebe
Tiram				

GRUPO	SÍTIO	NOME DO GRUPO	GRUPO QUÍMICO	INGREDIENTE ATIVO
M3	Atividade de contato multissítio	Ditiocarbamatos e relativos	Ditiocarbamatos e relativos	Zinco tiazol
				Zinebe
				Ziram
M4	Atividade de contato multissítio	Ftalimida	Ftalimida	Captafol
				Captana
				Folpete
M5	Atividade de contato multissítio	Cloronitrila (ftalonitrila)	Cloronitrila	Clorotalonil
M6	Atividade de contato multissítio	Sulfonamida	Sulfonamida	Diclofluanida
				Tolilfluanida
M7	Atividade de contato multissítio	Bis-guanidina	Guanidina	Guazatina
				Iminoctadina
M8	Atividade de contato multissítio	Triazina	Triazina	Anilazina
M9	Atividade de contato multissítio	Quinonas (Antraquinona)	Antraquinona	Ditianona
M10	Atividade de contato multissítio	Quinoxalina	Quinoxalina	Quinometinato
M11	Atividade de contato multissítio	Maleimida	Maleimida	Fluoroimida
NC	Desconhecido	Diverso	Diverso	Bicarbonato de potássio
				Materiais de origem biológica
				Óleos minerais
				Óleos orgânicos
P1	Via salicílica	Benzotiadiazol BTH	Benzotiadiazol BTH	Acibenzolar-S-metil
P2	P2	Benzisotiazol	Benzisotiazol	Probenazol
P3	P3	Tiadiazol-carboxamida	Tiadiazol-carboxamida	Isotianil
				Tiadinil
P4	P4	Composto natural	Polissacarídeo	Laminarina
P5	P5	Extrato de planta	Mistura complexa, Extrato de etanol	Extração de <i>Reynoutria sachalinensis</i>
P6	P6	Microbiana	Grupo <i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus mycoides</i>