



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ARAGUAÍNA
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

ALCEDINO VENÂNCIO DA SILVA

**ESTUDO TEÓRICO COMPUTACIONAL DA INTERAÇÃO DA
MOLÉCULA AZADIRACTINA COM O RECEPTOR ENZIMÁTICO
20-E MONOOXIGENASE**

ARAGUAÍNA

2017

ALCEDINO VENÂNCIO DA SILVA

**ESTUDO TEÓRICO COMPUTACIONAL DA INTERAÇÃO DA
MOLÉCULA AZADIRACTINA COM O RECEPTOR ENZIMÁTICO
20-E MONOOXIGENASE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Licenciatura em Química da Universidade Federal do Tocantins, como requisito parcial à obtenção do grau de licenciado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Augusto Barra de Oliveira.

ARAGUAÍNA

2017

ALCEDINO VENÂNCIO DA SILVA

**ESTUDO TEÓRICO COMPUTACIONAL DA INTERAÇÃO DA
MOLÉCULA AZADIRACTINA COM O RECEPTOR ENZIMÁTICO
20-E MONOOXIGENASE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Licenciatura em Química da Universidade Federal do Tocantins, como requisito parcial à obtenção do grau de licenciado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Augusto Barra de Oliveira.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Daniel Augusto Barra de Oliveira (Orientador)

Prof. Dr. Edenilson dos Santos Niculau (Examinador)

Prof. Msc. Taídes Tavares dos Santos (Examinador)

Dedico este trabalho a todos que
contribuíram direta ou indiretamente em
minha formação acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer o meu Deus pois sem Ele na minha vida não seria nada, a minha esposa Pollyane Gularte pela compreensão e apoio durante estes 4 anos de graduação, as minhas crianças Kelson, Israel e Larissa, aos meus pais José Venancio da Silva (*In memoriam*) e Marcelina Ribeiro de Cerqueira (*In memoriam*) pela boa educação que me deram. Aos meus irmãos e amigos de São Valério – TO, que apesar da distância, acredito que sempre torceram pela minha vitória. Ao meu colega de faculdade Renan Assis que tive o prazer de conhecer e fazer amizade desde o primeiro período. Ao meu colega de trabalho Ricardo Hugo, hoje meu Líder, por adaptar a escala de trabalho de modo que não afetasse meus estudos. Agradeço a Universidade Federal do Tocantins pela oportunidade de poder estar realizando mais um sonho em minha vida e a todos os professores do colegiado de Química, em especial ao meu orientador Prof. Dr. Daniel Augusto Barra de Oliveira pela paciência, educação, diálogo e dedicação de estar me ensinando durante todo este tempo de construção deste trabalho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO

A Azadiractina é um triterpenóide associado à inibição do crescimento de diversos tipos de insetos causadores de doenças epidêmicas como Dengue, Chinkugunia e Malária. O mecanismo de inibição do crescimento se dá pelo bloqueio da enzima 20-E monooxigenase, que catalisa a adição de um grupo hidróxido a molécula de ecdisona, a qual controla a ecdise e metamorfose de artrópodes. A interação entre essa enzima e a molécula de Azadiractina é ainda desconhecida. Neste trabalho foi utilizado o programa Dock Thor para gerar diversas conformações da molécula Azadiractina no sítio catalítico da enzima 20 E monooxigenase. As dez estruturas obtidas com menor energia foram otimizadas com a aproximação ONIOM, presente no programa Gaussian09. Os cálculos mostram que a molécula interage com os aminoácidos Thr 234, Tyr 296, Met 272, Asn 390, Thr231, His 226, Ile 227, Met 269, Tyr 276, Glu 229, Met 268. Dessa forma entendendo o modo de interação entre a azadiractina e o receptor nuclear, novos inseticidas poderão ser desenvolvidos tendo como ponto de partida a estrutura da azadiractina.

Palavras Chaves: Azadiractina, Ecdisona, Ancoramento Molecular, 20-E-monooxigenase.

ABSTRACT

The azadirachtin is a triterpenoid associated with the growth inhibition in several kinds of insects that cause epidemic sicknesses like Dengue, Chikungunya and Malaria. The growth mechanism of inhibition is given through the 20E monooxygenase blocked, that catalyzes the hydroxyl transference to ecdysone molecule, which inhibits ecdysis and metamorphosis in arthropods. However, the interaction between azadirachtin molecule and the 20-E monooxygenase is unknown. In this work it was used the program DockThor to generate several azadirachtin conformations inside 20-E-monooxygenase catalytic site. The ten most stable conformations were optimized with the ONIOM approach presented in Gaussian 09 program. The calculation shows that the azadirachtin molecule interacts with the amino-acids Thr 234, Tyr 296, Met 272, Asn 390, Thr231, His 226, Ile 227, Met 269, Tyr 276, Glu 229, Met 268. In this way understanding the interaction mode between azadirachtin and the nuclear receptor, new insecticides could be developed using the azadirachtin structure.

Keywords: Azadirachtin, Ecdysone, Molecular Docking, 20-E-monooxygenase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da molécula azadiractina.....	13
Figura 2 - Descrição dos movimentos e suas interações segundo um campo de força U.	17
Figura 3 - Diagrama esquemático do método ONIOM para uma proteína	21
Figura 4 - Numeração da molécula azadiractina para fins de medição dos ângulos diedros.....	23
Figura 5 - Ecdisona no sítio catalítico da enzima monooxigenase.....	26
Figure 6 - Ligações de hidrogênio realizadas pela molécula de azadiractina no site catalítico 20-E com base em 10 conformação.....	26
Figure 7 - Correlação entre os ângulos diedros da conformação 1 e as demais conformações.....	26
Figura 8 - Diferentes conformações geradas pelos cálculos QM/MM após o ancoramento com o programa Dock Thor.	30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. ESTADO DA ARTE	10
2.1. Inseticidas	10
2.3. Azadiractina	12
2.3.1. História	12
2.3.2. Química	13
2.3.3. Azadiractina como inseticida	14
2.3.4. Modo de Ação	15
3. OBJETIVO	15
4. MODELAGEM MOLECULAR	15
4.1. Cálculos de Estrutura Eletrônica	15
4.2. Mecânica Molecular	16
4.3. Teoria do Funcional de Densidade	18
4.4. Troca e Correlação	18
4.5. ONIOM (<i>Our own n-layered Integrated Molecular Orbital and Molecular Mechanics</i>)	20
4.6. Ancoramento molecular	21
5. METODOLOGIA	22
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
7. CONCLUSÃO	30
8. REFERÊNCIAS	31

1. INTRODUÇÃO

Recentes casos de proliferação de dengue, Zica e malária no Brasil tem causado crescentes demandas públicas para o controle dos vetores associados. O vetor *Aedes Aegypti* está intimamente ligado a transmissão das doenças citadas, se tornando dessa forma um alvo interessante para o controle de endemias.

A aplicação de inseticidas é ainda uma das melhores formas de combater o *Aedes Aegypti*. A aplicação é realizada via pulverização das afetadas pela proliferação do mosquito. Nesse sentido a química pode melhorar nos inseticidas atuais, além de propiciar um entendimento químico dos aspectos fisiológicos envolvidos.

No presente trabalho será realizado em primeiro lugar uma breve abordagem sobre os inseticidas. Depois haverá uma explanação sucinta do modo de atuação biológicos de inseticidas nos receptores nucleares. Por fim será mostrada uma proposta de interação da azadiractina como inseticida com o receptor nuclear ecdisona, destacando-se dessa forma o *modus operandi* bioquímico desse tipo de inseticida no combate de vetores¹.

Para a realização do estudo da interação da molécula azadiractina com o receptor 20-E monooxigenase foram realizados cálculos de estrutura eletrônica. As equações da mecânica foram resolvidas tendo como base a posição dos átomos no espaço. Os resultados desses cálculos foram utilizados para prever propriedades eletrônicas e estruturais que podem propiciar um entendimento da interação em estudo.

O conhecimento do mecanismo de interação fármaco-receptor de uma reação enzimática em um processo de interesse que envolve patologias, propicia o entendimento do conceito de fármacos análogos.

2. ESTADO DA ARTE

2.1. Inseticidas

O uso de inseticidas persistentes foi um dos maiores avanços agro industriais do século XX. Uns dos primeiros inseticidas foi o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), um organoclorado desenvolvido durante a segunda guerra

mundial, que quando aplicado permanecia ativo contra pragas durante vários meses². O DDT foi desenvolvido por Paul Muller em 1948 para combater os vetores da malária, febre amarela entre outras doenças³. Essa molécula geral atua sobre o sistema nervoso central dos insetos⁴⁻⁶. O inseticida atua no canal de sódio e potássio mantendo-o aberto impedindo a transmissão de impulsos nervosos em insetos e mamíferos. Estudos mostram a presença de organoclorados no leite humano quando há exposição ao inseticida. Há ainda a relação desse inseticida com o câncer de pulmão em humanos⁷⁻⁹, por isso o uso dessa molécula foi proibido no mercado.

Além dos efeitos deletérios dos inseticidas a saúde humana, os atuais inseticidas têm aumentado a resistência de determinadas pragas. Nesse sentido o uso de inseticidas que agem de modo diferenciado daqueles convencionais é de suma importância no controle de vetores.

Há muitos estudos que mostram que a resistência está vinculada ao aumento da taxa de metabolização de inseticidas. O aumento pode estar associado a alteração da enzima, tornando-a mais eficaz na degradação da molécula do inseticida. O metabolismo oxidativo aumentado está ligado ao aumento da resistência. As enzimas associadas com as monooxigenases são as responsáveis pelo metabolismo oxidativo aumentado.

Os inseticidas em geral atuam no sistema nervoso central em diferentes sítios ativos. A resistência pode estar conectada com mudanças conformacionais no sítio ativo que inviabilizam o uso de determinadas moléculas. Em vista do aumento da resistência aos inseticidas atuais, novos mecanismos de inibição devem ser procurados. Os receptores nucleares constituem uma alternativa interessante no combate de vetores transmissores de doenças endêmicas.

2.2. Receptores Nucleares

A família de receptores nucleares de proteína tem importância crucial na regra de regulação da transcrição, cujos membros incluem receptores para hormônios esteroides, vitaminas, hormônios da tireoide e ácidos da bile¹⁰. O genoma humano contém aproximadamente 40 membros dessa família, e essas tem sido estudada extensivamente como alvos terapêuticos¹¹. O filo artrópode exhibe um conjunto limitado de receptores, dos quais aproximadamente 21 ocorrem em *Drosophila*.¹² Entre esses o receptor da maioria dos artrópodes é

o hormônio esteroide, 20 –hidroxiequidisona, o qual está envolvido na regulação da muda de inseto, metamorfose e reprodução¹³⁻¹⁸. Em *Drosophila melanogaster*, um aumento na concentração de ecdisona induz a expressão de genes que codificam proteínas que a requeridas pelas larvas, e provoca bolhas cromossômicas (locais de alta expressão) para formar em cromossomos politênicos.

O receptor é ausente em mamíferos e por isso potencialmente útil como um alvo para inseticidas seguros. De fato, os membros da família da bizacilhidrazina exercem suas atividades inseticidas através da ligação com o receptor ecdisona e exibem notável seletividade taxionômica¹⁹⁻²⁰. Esses compostos agem seletivamente na Lepidóptera e certas coleópteras¹⁹, mas são ineficientes contra insetos da ordem hemíptera, e por isso não podem ser usadas para controlar certas pestes de insetos.

Um estudo de dois insetos²¹ predadores hemípteros (*Geocoris punctipes* and *Orius insidiosus*) mostraram que esses são relativamente insensíveis a bizacilhidrazina, onde pestes lepidópteras são mais susceptíveis. Um melhor entendimento da variação na estrutura do sítio do receptor ecdisona e na base da especificidade destes compostos pode auxiliar na descoberta de novos inseticidas com novos espectros de atividade.

Estudos estruturais através das famílias de receptores nucleares têm mostrado que eles compartilham uma estrutura modular comum²²⁻²⁴ com os mais conservados domínios, sendo associados com a ligação do DNA e ligação com o ligante respectivamente. Estudos demonstram ainda a adaptabilidade do sítio ativo do receptor ecdisona com alguns agonistas, os quais podem criar novos nichos de ligação diferentes daqueles do hormônio ecdisona²⁵. Tendo em vista o conhecimento do sítio catalítico é possível o estudo da interação de inibidores que no final findarão em futuros inseticidas.

2.3. Azadiractina

2.3.1. História

Desde tempos antigos é sabido que os gafanhotos do deserto espalham a maioria das plantas crescentes, mas não comem as folhas de *Azadiracta indica*. Um projeto para isolar a substância pouca atrativa foi iniciada em 1966

na Keele University como parte de um estudo sobre gafanhotos. Todavia as folhas contêm pouca azadiractina, a molécula associada a inibição do inseto. As sementes, porém, contêm uma quantidade relevante da molécula e era comercializada na Índia. Então a partir das sementes a molécula de azadiractina foi isolada.

2.3.2. Química

Azadiractina é um triperpenóide da classe dos limonóides que foi primeiramente isolado de uma árvore Indiana conhecida como *Azadirachta indica* em 1968²⁶. Desde então tem sido objeto de pesquisa devido a sua atividade biológica²⁷⁻³⁶, mas notadamente contra a disrupção de um grande espectro de insetos (>200). Todavia não possui atividade tóxica contra os organismos³⁷. Além disso, ela possui uma arquitetura molecular única, que tem atraído considerável atenção³⁸⁻⁴¹. De fato, a precisa estrutura química da azadiractina foi somente determinada em 17 anos e depois isolada seguindo um extensivo estudo entre seus grupos químicos e outros³⁹⁻⁴¹.

A molécula de azadiractina se constitui como um excepcional desafio em síntese, pois possui 16 estereoisômeros, sete dos quais são tetrasubstituídos. A Figura 1 mostra a estrutura química da molécula azadiractina.

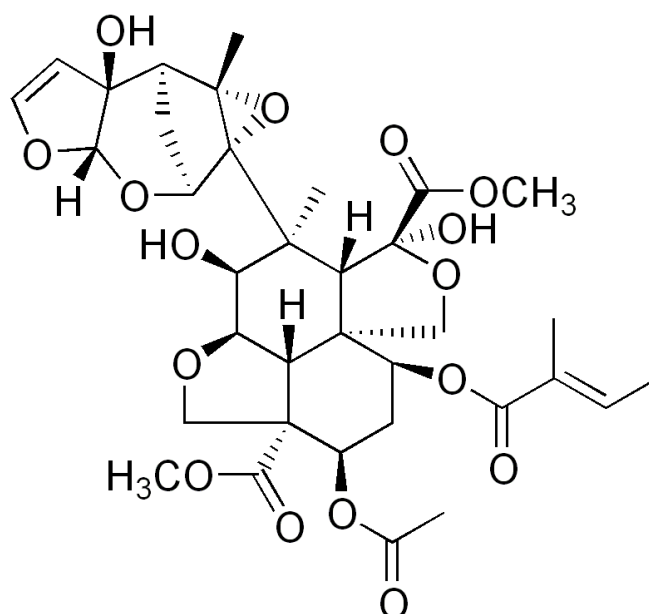


Figura 1. Estrutura química da molécula azadiractina obtida do site <https://en.wikipedia.org/wiki/Ecdysone#/media/File:Ecdysone.svg>

A molécula possui em sua estrutura 16 átomos de oxigênio, os quais estão contidos em uma variedade de grupos funcionais, incluindo éter, enol éter, tanto acetal como hemiacetal, três grupos éster distintos, dois grupos hidroxilas e um epóxi tetrasubstituído. Além disso, em solução o produto natural mantém uma rígida conformação devido as ligações de hidrogênio intermoleculares⁴¹.

2.3.3. Azadiractina como inseticida

Um dissuasor de alimentação é um produto químico que inibe a alimentação, mas não mata o inseto diretamente. O mesmo permanece junto a plantas, mas acaba morrendo de fome⁴². Embora uma centena de plantas dissuasores de alimentação de insetos tenham sido relatadas, nenhuma que tenha esta propriedade ainda foi explorada comercialmente. Os dissuasores têm sido amplamente revisados na literatura⁴²⁻⁴⁴.

O dramático efeito dissuasor da azadiractina em gafanhotos do deserto decorre da evolução do gafanhoto juntamente com a árvore neem. Enquanto a azadiractina é um dissuasor para *Schistocerca gregaria* com inibição na ordem 0,04ppm, foi observado a insensibilidade para *Schistocerca americana* e mais oito outros tipos de gafanhoto para baixas concentrações de azadiractina⁴⁵.

A real importância da azadiractina como inseticida foi reportado por Ruscoe⁴⁶. Efeitos de inseticida são encontrados em doses menores que aquelas requeridas para o efeito dissuasor⁴⁷. Os insetos ingerem a azadiractina e outros compostos correlatos do miolo da semente e não morrem imediatamente, mas logo param de se alimentar. Efeitos não letais incluem a redução da alimentação, incompleta ecdise, má formação da pupa e redução da fecundidade.

Pouco se sabe sobre a relação estrutura e atividade da azadiractina. Pequenas mudanças na estrutura diminuem a atividade da molécula⁴⁸. Quanto maior a mudança na estrutura, maiores diminuições na atividade. Os efeitos da mudança da estrutura na disrupção de insetos não foram sistematicamente estudados. A azadiractina tem sido testada em 600 ou mais espécies de insetos, nos quais tem sido encontrada atividades entre 1-10 ppm⁴¹. Mais de 500 espécies têm sido descritas como sensíveis ao extrato da semente de neem⁴⁹.

2.3.4. Modo de Ação

Em 1993 poderia se dizer que o modo de ação da azadiractina era inteiramente desconhecido⁵⁰. Ruscoe sugeriu que o efeito da azadiractina no desenvolvimento normal poderia ser a interferência com a função ecdiesteróide, devido à similaridade de estrutura⁴⁶. Este foi um mal-entendido porque há poucas semelhanças entre as estruturas. Muito dos trabalhos iniciais incidu no estudo da muda dos insetos em estado juvenil. Os efeitos observados foram o bloqueio da viteogenese e redução dos testículos. A azadiractina e outros limonóides da semente inibem a ecdisona 20-E-monooxigenase, que é a enzima que catalisa o último passo para a transformação do hormônio 20-hidroxiecdisona⁵¹. Os efeitos encontrados são muitos importantes para a definição dos efeitos visíveis em todo o animal na inibição do crescimento e defeitos de muda e esterilidade. No entanto seus efeitos são provavelmente secundários causado pelo modo de ação de divisão da célula e formação de microtubos. De todos os efeitos gravados da azadiractina na fisiologia do inseto, provavelmente o mais fundamental é aquele que se dá sobre a reprodução de células, desenvolvimento de larvas, corpo gordo, ovários e testículos. O bloqueio da proliferação celular e síntese do RNA foram também notadas depois do tratamento com azadiractina em protozoários *Tetrahymena thermophila*⁵². Os trabalhos indicam que a azadiractina age em nível celular bloqueando a formação de microtubos⁵³.

3. OBJETIVO

O trabalho tem como objetivo estudar a interação da molécula de Azadiractina com a enzima 20-E-monooxigenase utilizando técnicas de ancoramento molecular e cálculos de estrutura eletrônica.

4. MODELAGEM MOLECULAR

4.1. Cálculos de Estrutura Eletrônica

O pressuposto de qualquer cálculo de estrutura eletrônica é a resolução da equação de Schroedinger independentemente do tempo conforme a Equação 1.

$$\hat{H}\psi = E\psi \quad [1]$$

Onde \hat{H} é o operador Hamiltoniano dado por

$$H = -\sum_A \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 - \sum_i \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_i \sum_A \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_i \sum_j \frac{1}{r_{ij}} + \sum_A \sum_{B>A} \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}}$$

O primeiro termo diz respeito a energia cinética dos núcleos enquanto o segundo é a descrição da energia cinética dos elétrons. O terceiro termo é interação núcleo-elétron enquanto o quarto é a interação elétron-elétron. O último termo é interação núcleo-núcleo. A equação acima é insolúvel analiticamente para sistemas multieletrônico, por isso algumas aproximações devem ser realizadas. A primeira aproximação é a conhecida de Born Oppenheimer. Nesta aproximação o movimento do elétron é separado em relação ao movimento do núcleo. Essa aproximação se dá pelo fato dos núcleos se moverem vagarosamente em relação aos elétrons. Então a energia cinética dos núcleos entra como um parâmetro na equação 1. Em um segundo passo os movimentos translacionais, vibracionais e rotacionais são separados a partir das condições de Eckart. Todavia mesmo com tal aproximação os cálculos ainda se tornam demasiadamente complexos e caros computacionalmente. Existem no mercado de softwares computacionais diversos tipos de aproximação para cálculos de estrutura eletrônica. Neste trabalho serão utilizadas duas aproximações: a mecânica molecular e a Teoria do Funcional de Densidade.

4.2. Mecânica Molecular

Na Mecânica Molecular a equação de Schrodinger é negligenciada. Com isso os átomos são tratados como sistemas de massa-mola, onde a massa são os átomos e as molas são as ligações químicas. A descrição do sistema molecular é feita através de um campo de força clássico, cuja descrição visa modelar os movimentos moleculares e suas interações. Um exemplo de como a mecânica molecular trabalha é ilustrado abaixo.

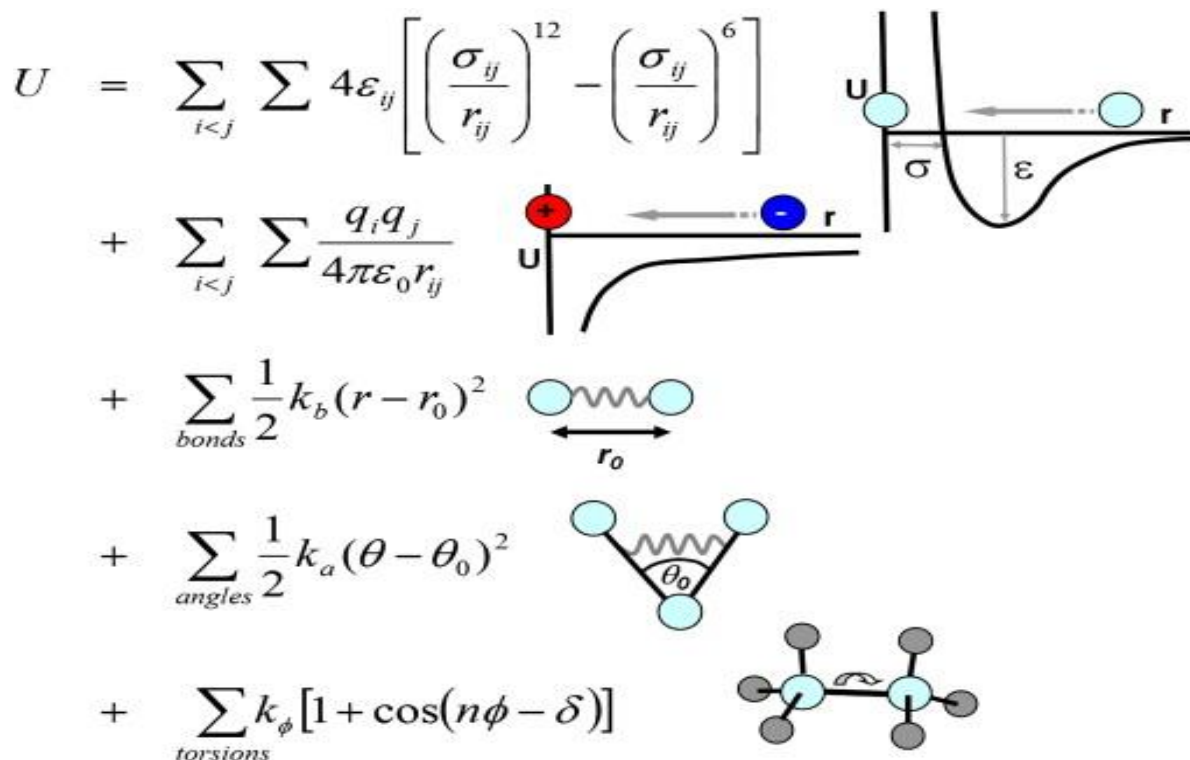


Figura 2. Descrição dos movimentos e suas interações segundo um campo de força U , retirado do site https://www.researchgate.net/figure/221892305_fig2_Fig-2-Potential-energy-function-for-molecular-interactions-in-the-molecular-mechanics

O primeiro termo do campo de força são as interações do tipo van der Waals. O segundo termo visa a simulação das interações eletrostáticas entre os átomos. O terceiro termo é a vibração da ligação química, enquanto o quarto simula a deformação angular da molécula, O quinto diz respeito a deformação dos ângulos diedros. As vibrações das ligações químicas e as deformações angulares seguem a lei de Hooke, tendo, portanto, comportamentos graficamente parabólicos.

A aplicação da mecânica molecular diminui substancialmente o tempo de cálculo computacional e permite estender as simulações a sistemas com muitos átomos como as biomoléculas. Todavia a mecânica molecular não consegue descrever propriedades químicas a nível eletrônico, simplesmente pelo fato de não existir elétrons neste tipo de aproximação. A aplicabilidade da mecânica molecular é muito útil para definir geometrias moleculares, todavia é inaplicável a sistemas onde as propriedades químicas derivem da existência de elétrons, como os casos onde haja rompimento e aparecimento de ligações

químicas. Os parâmetros utilizados para a definição de comprimento de ligação, ângulos, diedros e cargas na mecânica molecular vem de cálculos quânticos ou dados espectroscópicos.

4.3. Teoria do Funcional de Densidade

Na teoria quântica padrão, as observáveis são calculadas a partir de uma função de onda de muitos corpos. O método DFT foi submetido a um tratamento rigoroso por Hohenberg e Kohn, os quais demonstraram que para o estado fundamental, existe uma relação entre a densidade eletrônica e o potencial externo $v(r)$. Isso quer dizer que a densidade eletrônica no estado fundamental contém a informação de um sistema eletrônico.

De modo mais específico Hohenberg e Kohn mostraram que a energia é um funcional da densidade através da relação.

$$E[\rho] = F[\rho] + \int dr \rho(r)v(r) \quad [3]$$

Onde $F[\rho]$ é um potencial universal que contém a energia cinética $T[\rho]$ e a interação elétron-elétron $V_{ee}[\rho]$. Com um segundo teorema os dois demonstraram que a densidade eletrônica do estado fundamental é aquela que minimiza o funcional de energia $E[\rho]$. Do ponto de vista numérico a função de onda é um objeto muito difícil de se manipular, pois para N partículas temos uma função de N variáveis, enquanto a densidade eletrônica é mais fácil de se manejar, pois sempre é uma função de três variáveis, independentemente do número de partículas. O problema é que não se conhece a forma exata do funcional $F[\rho]$.

Kohn e Sham apresentaram uma forma de aproximar o funcional universal. Para esse fim recorreram a um sistema fictício o qual está constituído por elétrons não interagentes. Isso significa que tal sistema pode ser um determinante cujos elementos são funções de cada um dos elétrons do sistema. Com este ponto de partida a energia cinética corresponde a soma das energias cinéticas individuais.

$$T_S = \sum_{i=1}^N \int dr \phi_i^*(r) \left(-\frac{1}{2} \nabla^2 \right) \phi_i(r) \quad [4]$$

E a densidade eletrônica é a soma da densidade dos orbitais.

$$\rho(r) = \sum_i^N \rho_i(r) \sum_i^N \phi_i^*(r) \phi_i(r) \quad [5]$$

Um elemento adicional na aproximação de Kohn e Sham é a aproximação para interação elétron-elétron já que propõem como parte principal desta a interação coulômbica.

$$J[\rho] = \frac{1}{2} \int \int dr dr' \frac{\rho(r)\rho(r')}{|r-r'|} \quad [6]$$

Com isso o potencial universal pode ser escrito como.

$$F[\rho] = T[\rho] - T_s[\rho] + V_{ee}[\rho] - J[\rho] \quad [7]$$

Os orbitais de Kohn e Sham são aqueles que satisfazem a equação diferencial de Kohn e Sham.

$$\left(-\frac{1}{2} \nabla^2 + v_{eff}(r) \right) = \varepsilon_i \phi_i(r) \quad [8]$$

e que gerarão a energia do estado fundamental. O potencial $v_{eff}(r)$ inclui as interações coulombianas (elétron-elétron, núcleo-elétron) e de troca e correlação. As equações de Kohn e Sham se resolvem iterativamente e são muito similares ao método Hartree-Fock. Porém o significado físico dos métodos é diferente já que tem potenciais efetivos associados diferentes.

4.4. Troca e Correlação

Abordagem de Kohn e Sham é precisa, porém o funcional de troca e correlação é desconhecido, e, portanto, são necessárias aproximações para este funcional. A classificação destas aproximações pode ser definida segunda ordem proposta por Jacob e definida por Perdew.

A primeira aproximação para esse funcional é conhecida como aproximação de densidade local (LDA), e consiste em supor que em cada ponto a energia de troca e correlação depende somente da densidade neste ponto. Todavia existem aproximações mais sofisticadas para o funcional de troca e correlação como a do Aproximação do Gradiente Generalizado, que

consideram em cada ponto o valor da densidade e seus gradientes.

Mesmo com esta abordagem não se conhece a forma funcional para as energias de troca. Estas correspondem às interações quânticas entre os elétrons, sendo a primeira relativa devido ao princípio da exclusão de Pauli entre elétrons de mesmo spin e a segunda da parte quântica da repulsão coulombiana. Uma solução para este problema é aplicação de métodos híbridos como o B3LYP (Becke, 3-parameter, Lee-Yang-Parr).

4.5. ONIOM (*Our own n-layered Integrated Molecular Orbital and Molecular Mechanics*)

A combinação de aproximações clássicas com aproximações quânticas tem sido aplicada recentemente a sistemas biológicos. Dentro dessa perspectiva, os métodos de cálculo de estrutura eletrônica podem ser utilizados para a descrição do sítio catalítico da proteína, e os métodos clássicos provenientes de campos de força, são utilizados para tratar o resto da proteína.

O método ONIOM (*Our own n-layered Integrated Molecular Orbital and Molecular Mechanics*)⁵⁴ é um método que permite tratar o sistema em até 3 camadas, atribuindo a cada camada um grau de acurácia nos cálculos de modelagem molecular. Segundo essa metodologia, qualquer sistema molecular pode ser separado em diferentes níveis ligados de acordo com uma ordem pré-estabelecida para o tratamento do problema. Portanto o primeiro problema tratado para usar o ONIOM é a partição/corte do sistema, principalmente para ligações covalentes, onde uma partição deve ser bem analisada.

Ao integrar os resultados obtidos nas diferentes camadas, obtém-se uma extrapolação chegando-se a valores mais acurados sobre todo o sistema molecular estudado. Quando dois métodos são combinados na metodologia ONIOM, segue o modelo apresentado na Figura 3:

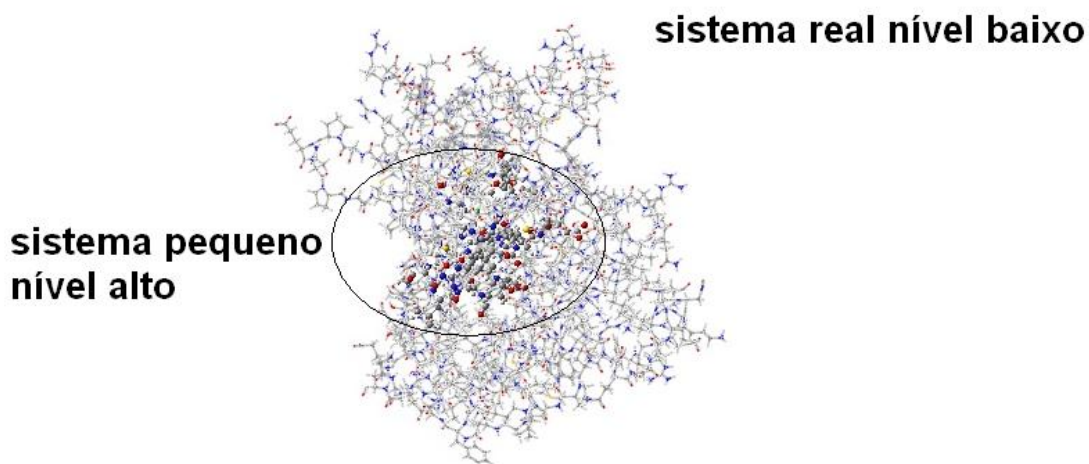


Figura 3: Diagrama esquemático do método ONIOM para uma proteína

A equação para a energia final do sistema contendo duas camadas pode ser descrita como:

$$E = E_{H,S\text{ model}} + E_{L,real} - E_{L,S\text{ model}} \quad (16)$$

Onde H (high) e L(Low) dizem respeito aos níveis de teoria alto e baixo de aproximação respectivamente, enquanto Smodel (small) e Real referem-se ao tamanho do sistema, pequeno e real respectivamente.

4.6. Ancoramento molecular

Com o avanço de novas técnicas em descobertas de drogas, várias estratégias têm sido baseadas na elucidação de novos alvos terapêuticos. Uma das mais importantes estratégias é o ancoramento molecular. A meta do ancoramento molecular é alcançar conformações otimizadas para a proteína e o ligante e a orientação relativa entre ligante e proteína tal qual tenha a menor energia livre de Gibbs.

No processo de docking a proteína e o ligante estão separados por uma distância física, e o ligante deve encontrar a sua posição no sítio ativo da proteína depois de um certo número de movimentos no espaço conformacional. Os movimentos incorporam transformações rígidas de corpo como as

translações e rotações, bem como mudanças na estrutura do ligante os quais incluem torsões e rotações de ângulos. Cada um desses movimentos no espaço conformacional do ligante induz custos na energia total do sistema calculada. A interação entre o ligante e o receptor é geralmente medida em termos da energia mínima livre com diferentes funções de pontuações baseadas em campos de força, pontuações empíricas⁵⁴.

5. METODOLOGIA

O ancoramento molecular foi realizado usando o programa Dock Thor⁵⁵⁵⁶. O receptor Hemipterano ecdisona ligado com complexo ponasterona A (1Z5X)⁵⁷ foi utilizado como receptor. A molécula de azadiractina foi usada como ligante. A geometria inicial da azadiractina, baseada na literatura recente⁵⁸, foi usada a fim de realizar o ancoramento molecular. O centro do **grid** para o estudo do ancoramento foi fixado no sítio catalítico da enzima⁵⁹. Um ancoramento flexível foi realizado com um **grid** de $\pm\Delta x=11$, $\pm\Delta y=11$, $\pm\Delta z=11$ (Å) e discretização de energia de **grid** de 0.25 (Å). Um conjunto de vários ancoramentos foram gerados. Foi decidido que aqueles dez mais estáveis, baseados no campo força do programa, seriam utilizados para ulterior tratamento com cálculos quânticos. A fim de avaliar as geometrias obtidas com o programa Dock Thor, foram calculadas energias de interação usando a aproximação QM/MM (Mecânica Quântica/ Mecânica Molecular). Os cálculos QM/MM foram feitos usando o programa Gaussian⁶⁰. Os cálculos baseados na Teoria do Funcional de Densidade (DFT) foram utilizados para descrever a interação entre a molécula azadiractina e o sítio catalítico da 20-E monooxigenases. Os cálculos DFT baseados no funcional wB97XD e na função gaussiana 6-31(pd). Foram especificamente usados na molécula de azadiractina e nos aminoácidos Glu199, His 226, Ile 227, Thr 231, Thr 234, Met 268, Met 269, Met 272, Tyr 296, Thr 304, Leu 386, Asn 390. Os restantes dos aminoácidos da enzima foram tratados com o campo de força AMBER. As ligações de hidrogênio foram medidas considerando uma distância de 3,0 (Å). As energias de interação foram calculadas usando a seguinte equação.

$$\Delta E = CE - (EE + AE)$$

Onde CE é a energia do complexo azadiractina-enzima, EE a energia da enzima isolada e AE é a energia da molécula de azadiractina isolada. Em virtude da mudança da conformação da molécula azadiractina no sítio catalítico foi desenhada a figura abaixo com o intuito de mensurar os deslocamentos dos ângulos diedros da molécula azadiractina.

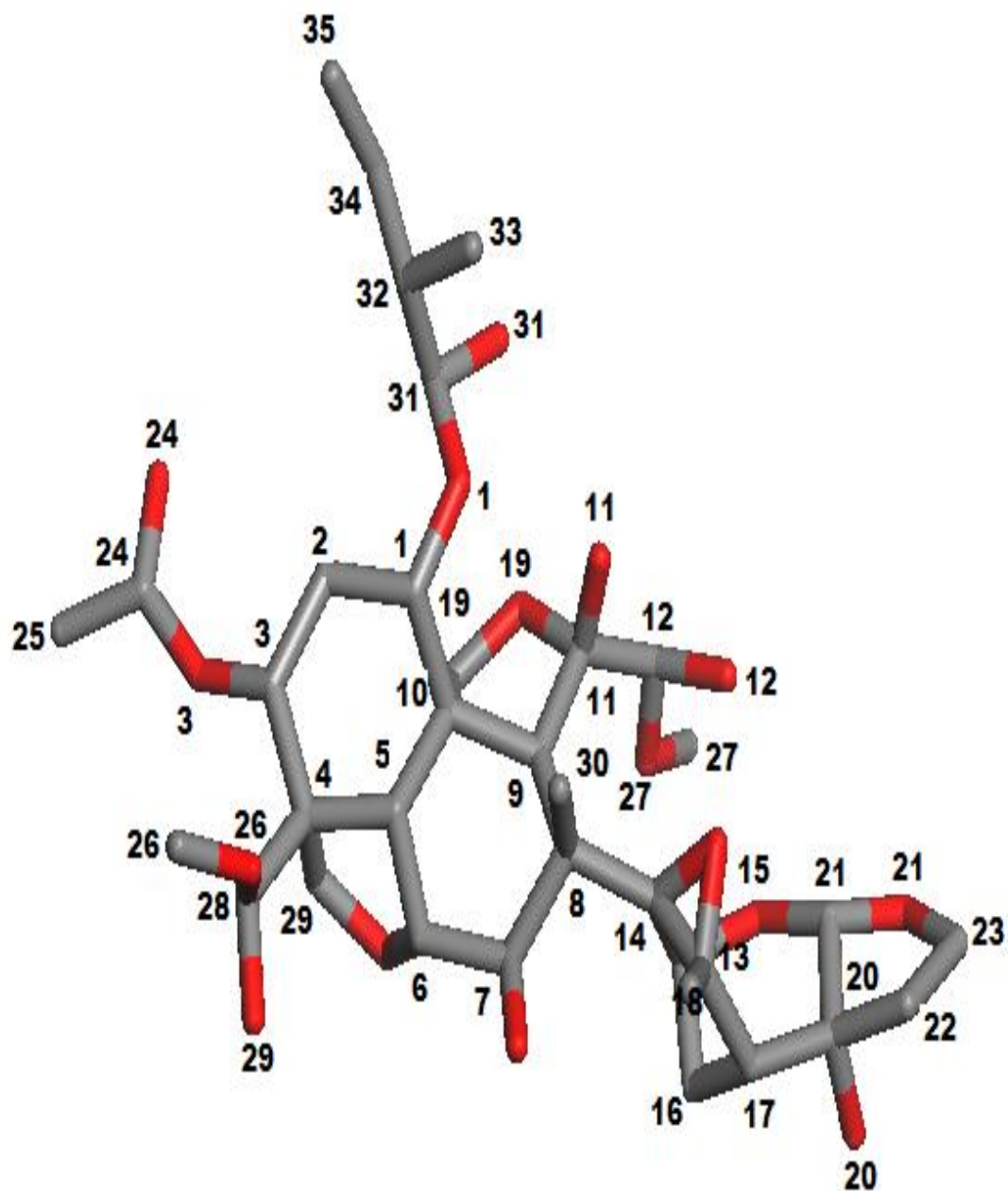


Figura 4. Numeração da molécula azadiractina para fins de medição dos ângulos diedros contruida utilizando o programa GaussView.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As energias de interação associadas com as diferentes conformações da azadiracina dentro do sítio catalítico são mostradas abaixo na Tabela 1.

Tabela 1. Energia de interação obtida para as diferentes conformações obtidas com o programa Dock Thor e calculadas com o método ONIOM (wB97xD/Amber)

Conformações	Energias (kcal)
1	-80.94
2	172.00
3	104.60
4	23.64
5	83.04
6	-78.28
7	-6.72
8	-57.41
9	-25.04
10	-77.42

A conformação mais estável é a designada como conformação 1, enquanto a menos estável é a conformação número 2 de acordo com a abordagem ONIOM. O cálculo mostra ainda uma energia repulsiva para as conformações 2,3,4,5 demonstrando que estas interações não são favoráveis energeticamente. As conformações 1, 6 e 10 possuem energias de interação semelhantes. Este fato mostra que essas conformações podem ser trocadas facilmente em temperatura fisiológica devido à pequena diferença de barreira de energética que está em torno de 2 kcal. Os resultados das ligações de hidrogênio realizadas pelas diferentes conformações são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Ligações de hidrogênio formadas entre aminoácidos do sítio catalítico e a molécula de azadiractina.

Aminoácido	Distancia em Å									
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
T234(OH)	2,14 (O-H)		2,47(O-H)		2,77(O-H)					2,65(O-H)
Y296(OH)										2,33(O-H)
M272(NH)	2,42(O-H)	2,48(O-H)	2,14(O-H)		2,22(O-H)	2,37(O-H)	2,03(O-H)	2,81(O-H)	2,88(O-H)	1,74(O-H)
N390(NH)						2,74(O-H)				
T231(NH)					2,61(O-H)				2,71(O-H)	
T231(OH)	2,71(O-H)					2,02(O-H)				1,69(O-H)
H226(OH)						2,49(O-H)				
I227(OH)				2,78(O-H)		2,49(O-H)				
M269(OH)	2,69(O-H)		2,76(O-H)					2,96(O-H)	2,65(O-H)	2,98(O-H)
M269(NH)				2,53(O-H)						
M268(OH)						2,79(O-H)		2,64(O-H)	2,94(O-H)	
E199(OH)	3,0(O-H)		2,63(O-H)					2,99(O-H)		
T304(OH)			2,43(O-H)							
L386(OH)					2,98(O-H)			2,46(O-H)		

As conformações 8 e 10 realiza cinco ligações de hidrogênio, enquanto as conformações 2 e 7 executam apenas uma ligação de hidrogênio. A conformação 10 tem a terceira energia de interação melhor, enquanto a conformação 8 possui uma energia de interação média em comparação com as outras estruturas moleculares. A conformação 2 realiza apenas uma ligação de hidrogênio, o que poderia justificar a energia de interação repulsiva. A conformação número 7 tem uma energia de interação próxima a zero, indicando uma pequena atração com o sítio da enzima 20-E. A ligação de hidrogênio com o aminoácido Met269 está presente nas conformações mais estáveis (1,8,9,10). A exceção é a conformação 3 que apresenta ligações de hidrogênio com o aminoácido Met269. No entanto, a conformação 3 tem a ligação de hidrogênio única com Thr304. A molécula de ecdisona cristalizada no local catalítico da enzima 20-E monooxigenase realiza ligação de hidrogênio com Glu199, Thr231, Arg271 e Tyr296 (figura 6). A ligação de hidrogênio com Glu199 é realizada com as conformações 1, 3 e 8. A ligação de hidrogênio com Thr231 foi encontrada nas conformações 1, 3, 5, 9 e 10. A ligação de hidrogênio com o aminoácido 296 só é encontrada na conformação 10. Não foi observada ligação com Arg271 para

as conformações estudadas. Em vista dos resultados, acreditamos que as conformações 1,6 e 10 sejam as descrições mais apropriadas da interação entre a azadiractina e a enzima 20-E monooxigenase. As ligações de hidrogênio para a molécula de ecdisona são mostradas na figura 6.

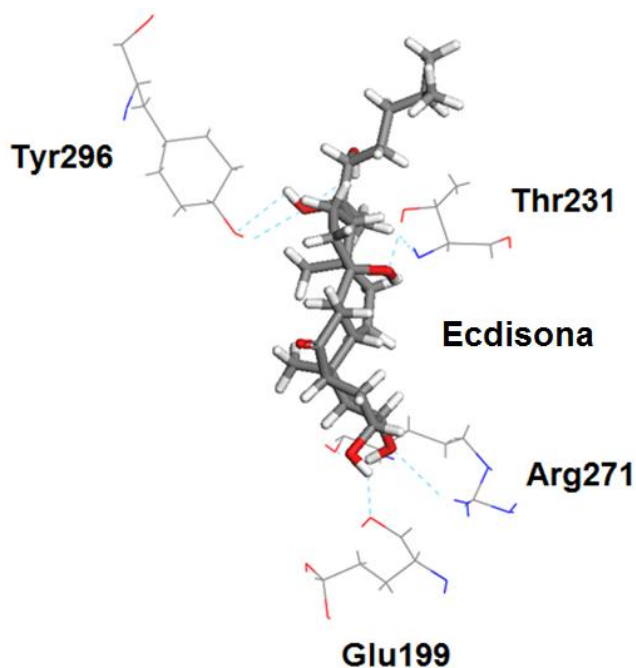


Figura 5. Ecdisona no sítio catalítico da enzima monooxigenase.

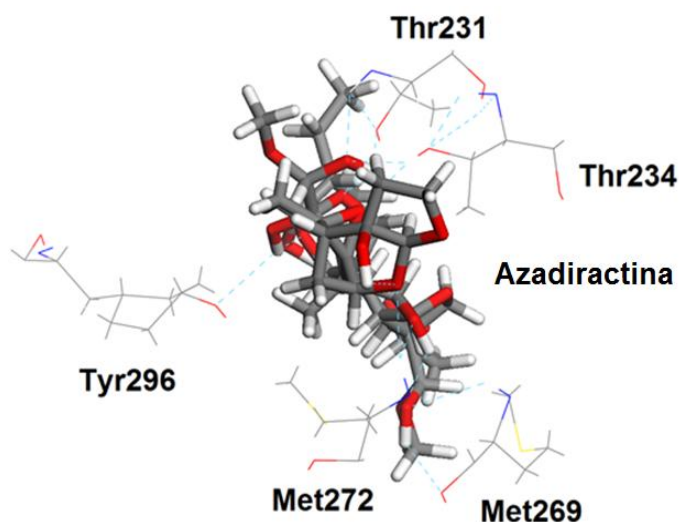


Figure 6. Ligações de hidrogênio realizadas pela molécula de azadiractina no sítio catalítico 20-E com base em 10 conformações.

As mudanças conformacionais da molécula de azadiractina dentro do sítio catalítico da enzima 20-E podem ser analisadas a luz dos deslocamentos dos ângulos diedros. A tabela relacionada com o deslocamento dos ângulos diedros da molécula de azadiractina são mostradas na Tabela 3.

Tabela 3. Ângulos diedros de Azadiractina após o encaixe em comparação com os dados experimentais antes do encaixe. A abreviatura “EXP”. é o ângulo diedro da azadiractina sem interação com a enzima obtido a partir de dados experimentais de raios-x.

Ângulos diedros	DOC 1	DOC 2	DOC 3	DOC 4	DOC 5	DOC 6	DOC 7	DOC 8	DOC 9	DOC 10	EXP
O6-C6-C7-O7	-118,57	-129,32	-140,15	-123,84	-141,73	-116,59	-103,12	-134,46	-133,48	-142,70	59,20
C7-C8-C14-C13	-77,14	-85,81	-165,01	-79,88	-174,16	-76,29	170,44	-80,01	-167,43	165,95	-110,52
C7-C8-C14-C15	54,89	49,69	-26,08	57,77	-14,91	55,88	-28,24	55,10	-27,20	-40,38	89,30
C13-C14-C15-C16	33,96	33,33	35,09	34,33	26,90	31,89	43,14	33,07	33,08	26,62	29,77
O13-C14-C15-O15	-22,68	-23,70	-22,80	-22,72	-33,70	-24,87	21,68	-25,08	-25,77	-35,31	-147,80
O13-C13-C17-C16	-94,44	-95,29	-95,59	-93,72	-100,29	-96,48	-83,95	-95,88	-95,10	-102,49	39,39
C13-C17-C20-C22	66,89	67,81	68,47	67,68	69,19	66,98	65,31	70,08	69,51	68,86	-177,48
C4-C5-C6-O6	48,75	51,57	51,31	51,29	53,81	51,57	43,36	51,61	50,41	56,28	39,74
C10-C9-C11-O19	-35,56	-35,65	-26,96	-33,15	-24,71	-37,30	-44,88	-39,03	-25,87	-24,37	14,96
O7-C7-C8-C30	-58,19	-50,04	-38,67	-53,73	-36,54	-60,06	-66,75	-42,39	-44,86	-34,76	-173,11
O20-C20-C22-C23	75,24	75,14	73,13	75,04	72,08	75,91	92,15	74,79	73,04	74,16	-108,37
C18-C13-C14-C15	-158,51	-154,82	-164,53	-159,46	-157,48	-159,70	-166,35	-158,95	-159,29	-139,51	157,95
O7-C7-C8-C9	-171,78	-164,71	-152,55	-168,26	-151,73	-173,52	175,40	158,83	-158,51	-152,70	62,60
O11-C11-C12-O12	-85,88	51,73	174,90	49,77	170,89	-91,64	153,59	-83,72	176,06	178,73	-24,71

A Figura 7 mostra a correlação entre os ângulos diedros relativos a conformação 1 e os diedros das outras conformações da molécula azadiractina.



Figura 7. Correlação entre os ângulos diedros da conformação 1 e as demais conformações.

A Figura 7 mostra a correlação entre os ângulos diedros da conformação 1 com os ângulos das demais conformações estudadas com o intuito de verificar as mudanças nos ângulos diedros dos diferentes tipos de ancoramentos. A conformação 1 foi escolhida como referência porque tem a menor energia de interação. O diedro associado aos átomos C7-C8-C14-C15 mostra uma rotação considerável para todas as conformações obtidas na ligação sigma central. O anel de Furano, que pode ser descrito pelo diedro O20-C20-C22-C23, sofre várias distorções como observáveis na Tabela 3 e na Figura 4. É observável ainda que o éster se liga ao anel de furano representado pelo diedro O11-C11-C12-O12 pode rodar dentro do sítio catalítico. Todos os ângulos diédricos moleculares obtidos do encaixe divergem da geometria molecular da azadiracina isolada. Com base no Figura 7 e na Tabela 3 é possível identificar a diferença entre o encaixe 1 e o encaixe 2 e o diedro O11-C11-C12-O12. Esta alteração permite que o encaixe 1 realize uma ligação de hidrogênio com o aminoácido Thr231 através do grupo éster. Acreditamos que essa ligação de hidrogênio diminui a energia de interação, melhorando a interação geral com a monooxigenase 20-E. Este fato é observado para o encaixe 6 e 10 que possuem a segunda e terceira energia de interação melhor, respectivamente. A Figura 7 mostra que há uma alta correlação entre os ângulos diedros da conformação 1 e aqueles da conformação 6. Ambas as conformações têm energias interativas próximas quando comparadas com outras conformações. As conformações 2, 3, 4, 5 e 7 apresentam pequena correlação dos ângulos diedros com aqueles da conformação 1 e alta energia de interação, sendo portanto conformações não favoráveis de ocorrência a temperatura ambiente. Concluímos que há ângulos diedros preferenciais na molécula de azadiractina que permitem diminuir as energias de interação. A exceção é a conformação 10 que possui pequena correlação de ângulos diédricos com a conformação 1 e a terceira energia de interação baixa. As alterações de conformação são apresentadas na Figura 8.

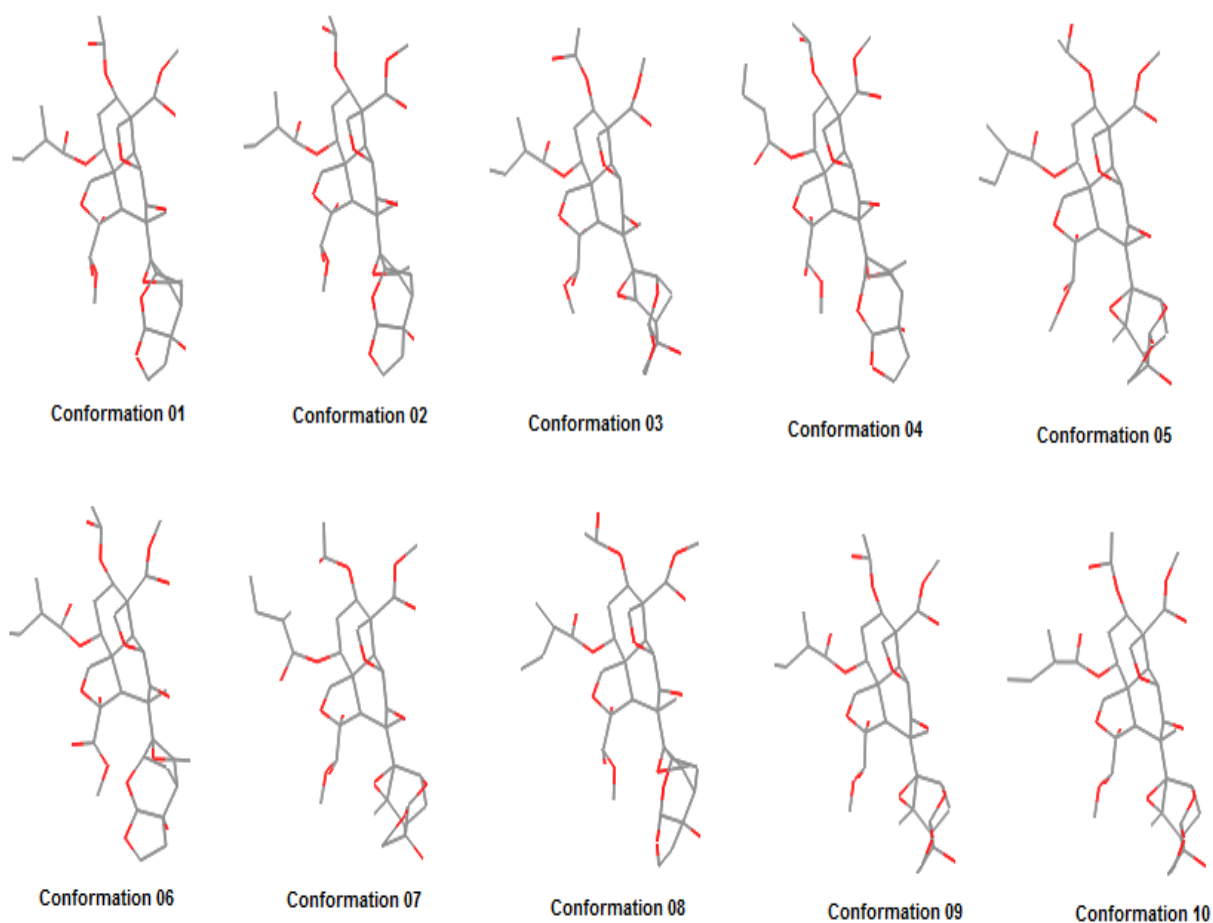


Figura 8. Diferentes conformações geradas pelos cálculos QM/MM após o ancoramento com o programa Dock Thor.

7. CONCLUSÃO

O acoplamento molecular realizado com o programa Dock Thor mostra que existem ligações de hidrogênio específicas que diminuem a energia de interação entre a azadiractina e a enzima 20-E-monooxigenase. Especificamente, a ligação de hidrogênio com o aminoácido Thr231 tem uma importância singular na interação entre a molécula azadiractina e 20-E. Foi possível observar através dos cálculos mecânico quântico que a molécula de azadiractina pode ligar-se com os mesmos aminoácidos que se encontram na molécula de ecdisona ancorada no local catalítico.

8. REFERÊNCIAS

1. FERRARI J. Insecticide resistance In: **The Biology of Disease Vectors**. Colorado: University Press of Colorado; 1996, p. 512-516.
2. ROZENDAAL J. Vector control methods for use by individuals and communities. **Geneve**: World Health Organization; 1997, disponível em <http://www.who.int/whopes/resources/vector_rozendaal/en/> acessado em setembro de 2017.
3. WARE G. An introduction to insecticides [monografia na Internet]. 3rd ed. University of Minnesota; 2000 [cited 2003 Nov 03]. Disponível em: <<http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm>>, acessado em setembro de 2017.
4. MELLON R, GEORGHIOU G. Rotational use of insecticides in mosquito control programs. **Proceedings and papers of the fifty-second annual Conference of the California and Vector Control Association**. p. 65-67, 1984.
5. RATHBURN J. Insecticide formulations – types and uses: a review. **Journal of American Mosquito Control Association** v.1, n.1, p. 80-84,1985.
6. PALCHICK S. Chemical Control of Vectors In: **The Biology of Disease Vectors**. Colorado: University Press of Colorado; 1996
7. BOUWMAN H, COOPAN Rm, REINECKE A, Becker P. Levels of DDT and metabolites in breast milk from Kwa-Zulu mothers after DDT application for malária control. **Bulletin of the World Health Organization** v. 68, p. 761-768,1990.
8. GARABRANT D, HELD J, LANGHOLZ B, PETERS J, MACK T. DDT and related compounds and risk of pancreatic cancer. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 84, p. 764-771,1992.
9. WOLFF M, TONIOLO P, LEE E, RIVERA M, DUBIN N. Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 85, n. 8, p. 648-652,1993.
10. STEINMETZ, A. C., RENAUD, J. P., and MORAS, D. Binding of ligands and activation of transcription by nuclear receptors. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.** v.30, p.329 –359, 2001.

11. GRONEMEYER, H., GUSTAFSSON, J. A., and LAUDET, Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily V. **Nat. Rev. Drug Discov.** v. 3, p. 950–964, 2004.
12. ENMARK, E., and GUSTAFSSON, J. A. Trends in Pharmacological Sciences. Comparing nuclear receptors in worms, flies and humans. *Sci.* v. 22, p. 611–615, 2001.
13. KOELLE, M. R., TALBOT, W. S., SEGRAVES, W. A., BENDER, M. T., CHERBAS, P., and HOGNESS, D. S. The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. **Cell** v. 67, p. 59–77, 1991.
14. ORO, A. E., MCKEOWN, M., and EVANS, R. M. Relationship between the product of the *Drosophila* ultraspiracle locus and the vertebrate retinoid X receptor. **Nature** v. 347, p. 298–301, 1990.
15. HENRICH, V. C., SLITER, T. J., LUBAHN, D. B., MACINTYRE, A., and GILBERT, L. I. A steroid/thyroid hormone receptor superfamily member in *Drosophila melanogaster* that shares extensive sequence similarity with a mammalian homologue. **Nucleic Acids Res.** v. 18, p. 4143–4148, 1990.
16. SHEA, M. J., KING, D. L., CONBOY, M. J., MARIANI, B. D., and KAFATOS, F. C. Proteins that bind to *Drosophila* chorion cis-regulatory elements: a new C2H2 zinc finger protein and a C2C2 steroid receptor-like component. **Genes Dev.** v. 4, p. 1128–1140, 1990.
17. YAO, T. P., FORMAN, B. M., JIANG, Z., CHERBAS, L., CHEN, J. D., MCKEOWN, M., CHERBAS, P., and EVANS, R. M. Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes **Nature** v. 366, p. 476–479, 1993.
18. RIDDIFORD, L. M., CHERBAS, P., and TRUMAN, J. W.. Ecdysone receptors and their biological actions. **Vitam Horm** v. 60, p. 1–73, 2000.
19. DHADIALLA, T. S., CARLSON, G. R., and LE, D. P. Annu. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. **Rev. Entomol.** v. 43, p. 545–569, 1998.
20. WING, K. D., SLAWECKI, R. A., and CARLSON, G. R. a nonsteroidal ecdysone agonist: effects on larval Lepidoptera. **Science** v. 241, p. 470–472, 1988.

21. ELZEN, G. W. Lethal and sublethal effects of insecticide residues on *Orius Insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae) and *Geocoris punctipes* (Hemiptera: Lygaeidae) **J. Econ. Entomol.** v. 94, p. 55–59, 2001.
22. KRUST, A., GREEN, S., ARGOS, P., KUMAR, V., WALTER, P., BORNERT, J. M., and Chambon, The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. **EMBO J.** v. 5, p. 891– 897, 1986.
23. EVANS, R. M. A Superfamília dos receptores esteroide e da hormona da tireóide. **Science** v. 240, p. 889 – 895, 1988.
24. RENAUD, J. P., and MORAS, D. Estudos estruturais sobre receptores nucleares **Cell Mol. Life Sci.** v. 57, p. 1748 –1769, 2000.
25. GRAHAM Holmwood, MICHAEL Schindler. Protein structure based rational design of ecdysone agonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry.** v. 17, p. 4064–4070, 2009.
26. BUTTERWORTH J. H., E. D. MORGAN, Chem. Isolation of a substance that suppresses feeding in locusts. **J. Chem. Soc., Chem. Commun.** p. 23 – 24, 1968.
27. BLANEY W. M., M. S. J. SIMMONDS, S. V. LEY, J. C. ANDERSON, P. L. Toogood, Efeitos antifeedantes de azadiractina e compostos estruturalmente relacionados em larvas lepidópteros. **Entomol. Exp. Appl.** v. 55, p. 149 – 160, 1990.
28. SIMMONDS M. S. J., W. M. BLANEY, S. V. LEY, J. C. ANDERSON, P. L. Toogood, Azadirachtin: Strutural requirements for reducing growth and increasing mortality in lepidóptera larvae. **Entomol. Exp. Appl.** v .55, p. 169 – 181, 1990.
29. SIMMONDS M. S. J., W. M. BLANEY, R. B. GROSSMAN, S. V. LEY, J. Respostas comportamentais de gafanhotos e *Spodoptera littoralis* a azadiractina e análogos de azadiractina contendo grupos repórteres fluorescentes e imunogênicos. **Journal of Insect Physiol.** v. 41, p. 555 – 564, 1995.
30. SIMMONDS M. S. J., W. M. BLANEY, S. V. LEY, J. C. ANDERSON, R. BNTALI, A. A. DENHOLM, P. C. W. GREEN, R. B. GROSSMAN, C. Gutteridge, L. JENNENS, S. C. SMITH, P. L. Toogood, A. Wood, Behavioral and neurophy-siological responses of *Spodoptera littoralis* to azadirachtin

- and a range of synthetic analogues. **Entomol. Exp. Appl.** v. 77, p. 69 – 80 1995.
31. NISBET A. J., A. J. MORDUE, L. M. WILLIAMS, L. HANNAH, L. JENNENS, S. V. LEY, W. MORDUE, Autoradiographic localisation of [22,23-³H₂] dihydroazadirachtin binding sites in desert locusts testes. **Tissue Cell**, v. 28, p. 725 – 729, 1996.
 32. MORDUE LUNTZ A. J., A. J. NISBET, L. JENNENS, S. V. LEY, W. MORDUE, Autoradiographic localization of [22,23-(³H)₂] dihydroazadirachtin binding sites in desert locust testes and effects of Azadirachtin on sperm motility, **Tissue Cell**. Dec; v. 28 n 6 p. 725-729, 1996.
 33. NISBET A. J., A. J. MORDUE Int. Neem Conference Luntz, R. B. Grossman, L. Jennens, S. V. Ley, W. Mordue, Arch. Characterisation of azadirachtin binding to Sf9 nuclei in vitro. Arch. **Insect Biochem. Physiol**, v. 34, p. 461 – 473, 1997.
 34. MORDUE LUNTZ A. J., M. S. J. SIMMONDS, S. V. LEY, W. M. BLANEY, W. MORDUE, M. NASIRUDDIN, A. J. Actions of azadirachtin, a plant allelochemical, against insects. **Pestic. Sci.** p. 277 – 284, 1998.
 35. SALEHZADEH A., A. JABBAR, L. JENNENS, S. V. LEY, R. S. ANNADURAI, R. ADAMS, R. H. C. STRANG, The effect of phytochemical pesticides on the growth of cultured invertebrate and vertebrate cells. **Pest. Manag. Sci.** v. 58, p. 268 – 276, 2002.
 36. ROBERTSON S. L., W. Ni, T. S. DHADIALLA, A. J. NISBET, C. MCCUSKER, S. V. LEY, W. MORDUE, A. J. MORDUE-LUNTZ, Identification of a putative azadirachtin-binding complex from *Drosophila* Kc167 cells. **Arch. Insect Biochem. Physiol.** v. 64, p. 200 – 208, 2007.
 37. MORDUE A. J., A. BLACKWELL, J. Azadirachtin: an update. **Insect Physiol.** v. 39, p. 903 – 924, 1993.
 38. KRAUS W., M. BOKEL, A. KLENK, H. POEHNL, The structure of azadirachtin and 22,23-dihydro-23 β -methoxyazadirachtin. **Tetrahedron Lett.** v. 26, p. 6435 – 6438, 1985.
 39. TURNER C. J., M. S. TEMPESTA, R. B. TAYLOR, M. G. ZAGORSKI, J. S. Termini, D. R. Schroeder, K. Nakanishi, An NMR spectroscopic study of

- azadirachtin and its trimethyl ether. **Tetrahedron**. v. 43, p. 2789 –2803, 1987
40. KRAUS W., M. BOKEL, A. BRUHN, R. CRAMER, I. KLAIBER, A. KLENK, G.NAGL, H. POEHLN, H. SADLO, B. VOLGER, Structure determination by nmr of azadirachtin and related compounds from *azadirachta indica* a. Juss (Meliaceae). **Tetrahedron**. v. 43, p. 2817 –2830, 1987.
 41. GOVINDACHARI T. R., G. GOPALAKRISHNAN, R. RAGHUNATHAN, S. S. Crystal and molecular structure of Azadirachtin-A Rajan, **Curr. Sci.** v. 66, p. 295 – 297, 1994.
 42. MUNAKATA, K. Insect antifeeding substances in plant leaves. **Pure Appl. Chem.** v. 42, p. 57, 1975.
 43. WARTHEN, J. D. In Insect Attractants and repellents; Morgan, E. D., Mandava, N.B., Eds.; **Handbook of Natural Pesticides**; CRC Press: Boca Raton. v. 6, p. 23–82, 1990.
 44. MORGAN, E. D.; WARTHEN, J. D. In Insect Attractants and Repellents; Morgan, E. D., Mandava, N. B., Eds.; **Handbook of Natural Pesticides**; CRC Press: Boca Raton. v. 6, p. 83–134, 1990.
 45. MULKERN, G. B.; MONGOLKITI, S. **ACRIDA**. v. 4, p. 95–103, 1975.
 46. RUSCOE, C. N. E. **Nature New Biol.** v. 236, p. 159, 1972.
 47. MORDUE (LUNTZ), A. J.; NISBET, A. J.; NASIRUDDIN, M.; WALKER, E. **Entomol. Exper. Appl.** v. 80, p. 69, 1996.
 48. LEY, S. V.; DENHOLM, A. A.; WOOD, A. **Nat. Prod. Rep.** v. 10, p. 109, 1993.
 49. SCHMUTTERER, H.; SINGH, R. P. In The Neem Tree *Azadirachta indica* A. Juss. And Other Meliaceous Plants, 2nd ed.; **Neem Foundation: Mumbai**, v. 2002; pp 411–456.
 50. MORDUE (LUNTZ), A.J.; BLACKWELL, A. Azadirachtin: an update. **Journal of Insect Physiology**, v.39, p.903-924, 1993.
 51. MITCHELL, M. J.; SMITH, S. L.; JOHNSON, S.; MORGAN, E. D. ARCH. Effects of the neem tree compounds azadirachtin, salannin, nimbin, and 6-desacetylnimbin on ecdysone 20-monooxygenase activity. **Insect Biochem. Physiol.** v. 35, p. 199, 1997.
 52. FRITZSCHE, U.; CLEFFMANN, G. The insecticide azadirachtin reduces predominantly cellular RNA in *Tetrahynema*. **Naturwiss.** v. 74, p.191, 1987

53. SALEHZADEH, A.; AKHKHA, A.; CUSHLEY, W.; ADAMS, R. L. P.; KUSEL, J. R.; STRANG, R.H. C. Anopheles gambiae collagen IV genes: cloning, phylogeny and midgut expression associated with blood feeding and Plasmodium infection. **Insect Biochem. Mol. Biol.** v. 33, p. 681, 2003.
54. SVENSSON, M.; HUMBEL, S.; FROESE, R. D. J.; MATSUBARA, T.; SIEBER, S.; MOROKUMA, K.; ONIOM: A Multilayered Integrated MO + MM Method for Geometry Optimizations and Single Point Energy Predictions. A Test for Diels–Alder Reactions and $\text{Pt}(\text{P}(\text{t-Bu})_3)_2 + \text{H}_2$ Oxidative Addition. **J. Phys. Chem.** v. 100, p. 19357, 1996.
55. TRIPATHI A, MISRA K Molecular Docking: A Structure-Based Drug Designing Approach. **JSM Chem** v. 5 n 2, p. 1042, 2017.
56. MAGALHÃES, Camila Silva de; ALMEIDA, Diogo Marinho; BARBOSA, Hélio José Correa; DARDENNE, Laurent Emmmanuel. A Dynamic Niching Genetic Algorithm Strategy for Docking of Highly Flexible Ligands. **Information Sciences**, v. 289, p. 206-224, 2014.
57. MAGALHÃES, Camila Silva de; ALMEIDA, Diogo Marinho; BARBOSA, Hélio José Correa; DARDENNE, Laurent Emmmanuel.. Selection-Insertion Schemes in Genetic Algorithms for the Flexible Ligand Docking Problem. **Lecture Notes in Computer Science**, v. 3102, p. 1-12, 2004.
58. CARMICHAEL, J.A., LAWRENCE, M.C., GRAHAM, L.D., PILLING, P.A., EPA, V.C., Noyce, L., Lovrecz, G., Winkler, D.A., Pawlak-Skrzecz, A., Eaton, R.E., Hannan, G.N., Hill, R.J.. The X-ray structure of a hemipteran ecdysone receptor ligand-binding domain: comparison with a lepidopteran ecdysone receptor ligand-binding domain and implications for insecticide design. **J. Biol. Chem.** v. 280, p. 22258-22269, 2005.
59. ELTON A. S. de Castro & DANIEL A. B. de OLIVEIRA & SERGIO A. S. FARIAS & RICARDO GARGANO & JOÃO B. L. Martins. Structure and electronic properties of azadirachtin. **J Mol Model.** v. 20, p. 2084, 2014.
60. 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.