

**ANÁLISE DO MODO DE AÇÃO BIOCIDA DE
COMPOSTOS ORGANOESTÂNICOS:
ENSAIOS A PARTIR DE MODELOS
TEÓRICOS E EXPERIMENTAIS**

MARCUS VINÍCIUS JULIACI ROCHA

2010

MARCUS VINÍCIUS JULIACI ROCHA

**ANÁLISE DO MODO DE AÇÃO BIOCIDA DE COMPOSTOS
ORGANOESTÂNICOS: ENSAIOS A PARTIR DE MODELOS
TEÓRICOS E EXPERIMENTAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agroquímica, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador
Prof. Teodorico de Castro Ramalho

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Rocha, Marcus Vinícius Juliaci.

Análise do modo de ação biocida de compostos organoestênicos:
ensaios a partir de modelos teóricos e experimentais / Marcus
Vinícius Juliaci Rocha. – Lavras : UFLA, 2010.

98 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Teodorico de Castro Ramalho.

Bibliografia.

1. Fungicidas. 2. DFT. 3. Modelagem molecular. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 546.6862

MARCUS VINÍCIUS JULIACI ROCHA

**ANÁLISE DO MODO DE AÇÃO BIOCIDA DE COMPOSTOS
ORGANOESTÂNICOS: ENSAIOS A PARTIR DE MODELOS
TEÓRICOS E EXPERIMENTAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agroquímica, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 25 de Fevereiro de 2010.

Prof. Dr. Luciano Tavares da Costa UNIFAL

Prof. Dr. Ênio Nazaré de Oliveira Júnior UFSJ

Prof. Dr. Walclée de Carvalho Melo UFLA

Prof. Teodorico de Castro Ramalho
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me guiou e tornou-me perseverante para chegar a este momento.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química, pela disponibilização da infraestrutura.

Ao Prof. Teodorico de Castro Ramalho, pela orientação e, sobretudo, pela amizade construída durante esse período.

Aos professores Elaine F. F. da Cunha, Matheus Puggina de Freitas e Luiz Carlos Alves de Oliveira, pelas sugestões e auxílios prestados durante a execução deste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Química Computacional, pela convivência, cooperação e principalmente pela amizade ao longo desse período.

Ao CNPq, pelo financiamento dos recursos necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

*Aos meus pais, Flávio e Rosemere, e
aos meus irmãos, Elísia e Flávio Jr.*

com carinho e dedicação, ofereço

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE QUADROS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Considerações iniciais.....	3
2.1.1. Brasil, uma potência agrícola do Século XXI.....	3
2.1.2 O desafio atual.....	3
2.2 Agroquímicos: do estanho aos organoestânicos.....	4
2.3 Estanho.....	5
2.3.1 Histórico.....	5
2.3.2 Características gerais.....	6
2.3.3 Aplicações.....	8
2.4 Compostos Organoestânicos.....	9
2.4.1 Histórico.....	9
2.4.2 Propriedades químicas.....	11
2.4.3 Aplicações.....	11
2.4.4 Toxicidade e modo de ação em sistemas biológicos.....	13
2.5 F ₁ F ₀ -ATP Sintase.....	17
2.5.1 Características Gerais.....	17
2.5.2 Subunidade α : estrutura e características.....	19
2.6 Aspectos da Química Computacional.....	21

2.6.1 Considerações Gerais.....	21
2.6.2 O método DFT.....	23
2.6.3 O método semiempírico.....	27
2.6.4 Ancoramento Molecular.....	28
3 OBJETIVOS.....	31
4 METODOLOGIA.....	32
4.1 Cálculos de otimização das estruturas.....	32
4.2 Perfil dos estados de transição.....	35
4.3 Cinética de reação através de um composto-modelo.....	36
4.3.1 Síntese do complexo-modelo.....	36
4.3.2 Análise por Espectrometria de Massas.....	36
4.4 Estudo de Ancoramento Molecular.....	36
4.4.1 Tratamento da proteína.....	36
4.4.2 Ancoramento com as estruturas neutras e cátions.....	37
4.5 Estudo do mecanismo de reação na enzima.....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1 Perfil da energia de ativação.....	39
5.2 Estudo da cinética da reação.....	47
5.3 Estudo do Ancoramento Molecular.....	54
5.3.1 Ancoramento com o derivado da hidrólise da reação-modelo.....	54
5.3.2 Ancoramento com compostos neutros.....	60
5.3.3 Ancoramento com os cátions.....	71
5.4 Mecanismo de interação com a subunidade <i>a</i>	79
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1	Dependência da atividade biológica de compostos organoestânicos em relação à natureza do grupo alquila para diferentes espécies..... 14
FIGURA 2	Modelo proposto do modo de ação de compostos organoestânicos..... 16
FIGURA 3	Modelo estrutural de F ₁ F ₀ -ATP Sintase de <i>Escherichia coli</i> 17
FIGURA 4	Modelo estrutural da fração F ₀ onde está localizada a subunidade <i>a</i> da enzima F ₁ F ₀ -ATP Sintase..... 19
FIGURA 5	Modelo estrutural da subunidade <i>a</i> da enzima F ₁ F ₀ -ATP Sintase de <i>Escherichia coli</i> 20
FIGURA 6	Fração F ₀ completa obtida do PDB e a subunidade <i>a</i> recortada para o ancoramento..... 37
FIGURA 7	Gráfico do perfil de energia potencial do composto 6 43
FIGURA 8	Gráfico da correlação linear entre os valores de LogP experimental e LogP calculado 45
FIGURA 9	Espectros de massas no modo íon positivo para o acompanhamento da reação química em diferentes instantes na reação..... 49
FIGURA 10	Intensidade relativa dos principais intermediários formados ao longo da reação..... 50
FIGURA 11	Mecanismo de proposto para a reação de hidrólise do dicloreto de difenilestanho em ácido acético..... 52

FIGURA 12	Intermediário dentro da cavidade correspondente ao sítio ativo.....	55
FIGURA 13	Ligações hidrogênio entre o intermediário com a subunidade <i>a</i> da F ₁ F ₀ -ATP Sintase.....	58
FIGURA 14	Superfície eletrostática da região do sítio ativo da subunidade <i>a</i> da F ₁ F ₀ -ATP Sintase de <i>Escherichia coli</i> . Em vermelho, regiões hidrofílicas e em azul, regiões hidrofóbicas.....	59
FIGURA 15	Interações dos compostos 3 (A) e 4 (B) com o sítio da subunidade <i>a</i>	68
FIGURA 16	Interações dos compostos 7 (A) e 8 (B) com o sítio da subunidade <i>a</i>	69
FIGURA 17	Interações do cátion Trifenilestanho com o sítio da subunidade <i>a</i>	74
FIGURA 18	Interações do cátion Tricicloexilestanho com o sítio da subunidade <i>a</i>	75
FIGURA 19	Interações dos cátions Tributilestanho (A) e Dibutilestanho (B) com o sítio da subunidade <i>a</i>	76
FIGURA 20	Mecanismo de reação para a reação do cátion R _n Sn ⁺ na subunidade <i>a</i>	80
FIGURA 21	Gráfico das curvas de energias calculadas em função do comprimento da ligação de todos os cátions envolvidos no mecanismo da reação com a subunidade <i>a</i> da enzima F ₁ F ₀ -ATP Sintase.....	83

LISTA DE QUADROS

	Página
QUADRO 1 Propriedades atômicas do estanho.....	7
QUADRO 2 Compostos organoestânicos utilizados neste trabalho com respectivo número de identificação, sua nomenclatura IUPAC e estrutura molecular.....	32

LISTA DE TABELAS

	Página	
TABELA 1	Energias dos estados transição calculados pelos métodos DFT e semiempírico (PM3) em espécies neutras e protonadas dos compostos organoestânicos estudados e algumas das respectivas atividades biológicas.....	40
TABELA 2	LogP de alguns organoestânicos obtidos experimentalmente (Powers & Beavis, 1991) e calculados pelo programa ADME/Tox Web.....	44
TABELA 3	LogP de alguns organoestânicos obtidos experimentalmente (Powers & Bavies, 1991) e calculados pelo programa ADME/Tox Web e suas respectivas atividades biológicas.....	46
TABELA 4	Principais ligações hidrogênio (distância em Å e energia em kcal/mol) entre o ligante e a F ₁ F ₀ -ATP Sintase, os valores de energia eletrostática intermolecular (kcal/mol) e de ligação hidrogênio total (kcal/mol).....	56
TABELA 5	Interações hidrofóbicas (distância em Å e energia em kcal/mol) entre o ligante e o resíduo de His 132.....	57
TABELA 6	Principais interações eletrostáticas e hidrofóbicas (distância em Å e energia em kcal/mol) entre os ligantes e a subunidade <i>a</i> da F ₁ F ₀ -ATP Sintase e os valores de energia intermolecular (kcal/mol).....	60
TABELA 7	Principais ligações hidrogênio (distância em Å e energia em kcal/mol) entre os ligantes e a subunidade <i>a</i> da F ₁ F ₀ -ATP Sintase e de ligação hidrogênio total (kcal/mol).....	66

TABELA 8	Principais interações hidrofóbicas (distância em Å e energia em kcal/mol) entre os ligantes e a subunidade <i>a</i> da F ₁ F ₀ -ATP Sintase, os valores de energia eletrostática intermolecular (kcal/mol).....	71
TABELA 9	Distância do nitrogênio do anel imidazólico do resíduo de His 132 em relação ao átomo de Sn dos cátions.....	78
TABELA 10	Energias de transição e seus comprimentos de ligação e frequências imaginárias respectivamente, correspondente aos cátions estudados no mecanismo de reação com o sítio ativo da enzima F ₁ F ₀ -ATP Sintase.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADP	Adenosina Difosfato;
AM1	Austin Model 1;
Asn	Asparagina;
ATP	Adenosina Trifosfato;
BLYP	Becke-Lee-Yang-Parr;
CNDO	Complete Neglect of Differential Overlap;
DDBT	4-[3-(Trifluorometil)-3H-Diazirin-3-yl]Benziloximetil Dibutilestanho;
DDBT-Cl	Cloreto de 4-[3-(Trifluorometil)-3H-Diazirin-3-yl]Benziloximetil Dibutilestanho;
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano;
DFT	Density Functional Theory;
ESI-MS	Electrospray Ionization Mass Spectrometry;
FAO	Food and Agriculture Organization;
FAOSTAT	Food and Agriculture Organization Statistics;
Gln	Glutamina;
Glu	Glutamato;
HCTH	Hamprecht, Cohen, Tozer, and Handy;
His	Histidina;
HF	Hartree-Fock;
INDO	Intermediate Neglect of Differential Overlap;
IUPAC	International Union Pure Applied Chemistry;
LANL2DZ	Los Alamos National Laboratory 2-double-zeta;
Leu	Leucina;
LYP	Lee-Yang-Parr;
MM	Molecular Mechanics;

MVD	Molegro Virtual Docker;
NDDO	Neglect of Diatomic Differential Overlap;
PDB	Protein Data Bank;
P _i	Fosfato Inorgânico;
PM3	Parametrized Model 3;
PM3-tm	Parametrized Model 3-tm;
PM5	Parametric Method number 5;
QM	Quantum Mechanic;
Ser	Serina;
TBT-CI	Cloreto de Tributilestanho;

RESUMO

ROCHA, Marcus Vinícius Juliaci. **Análise do modo de ação biocida de compostos organoestânicos:** ensaios a partir de modelos teóricos e experimentais. 2010. 98p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

A alta frequência de contaminação por pesticidas sugere a necessidade de agrotóxicos mais ativos e seletivos. Compostos organoestânicos são uma classe de fungicidas, que também são potentes inibidores da F_1F_0 -ATP Sintase. Essa é uma enzima-chave, porque a produção de ATP é uma das principais reações químicas nos organismos vivos. Assim, a ATP Sintase é considerada um alvo para os compostos organoestânicos. Nesta linha, estudos de modelagem molecular e cálculos de DFT foram realizados a fim de compreender o comportamento molecular desses compostos em solução. Além disso, investigou-se nesta pesquisa o mecanismo de reação por análise de ESI-MS do dicloreto de difenilestanho, e pelos resultados, infere-se que um intermediário chave instável é gerado in situ e poderá ter lugar na reação com a ATP Sintase.

Palavras-chave: organoestânicos, F_1F_0 -ATP Sintase, DFT

Orientador: Teodorico de Castro Ramalho – UFLA.

ABSTRACT

ROCHA, Marcus Vinícius Juliaci. **Analysis of biocide action from organotin compounds:** insights from theoretic and experimental models. 2010. 98p. Dissertation (Master in Agrochemistry) - Federal University of Lavras, Lavras.

The high frequency of contamination by pesticides suggests the need for more active and selective agrochemicals. Organotin compounds are the fungicides class, which are also potent inhibitors of the F_1F_0 -ATP Synthase. That is a key enzyme, because the ATP production is one of the major chemical reactions in living organisms. Thus ATP Synthase is regarded as a prime target for organotin compounds. In this line, molecular modeling studies and DFT calculations were performed in order to understand the molecular behavior of those compounds in solution. In addition, we investigated the reaction mechanism on-line by ESI-MS analyses of the diphenyltin dichloride. Our findings indicate that an unstable key-intermediate generated *in situ* might take place in the reaction with ATP Synthase.

Key words: organotin, F_1F_0 -ATP Synthase, DFT

Adviser: Teodorico de Castro Ramalho – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

Os primeiros estudos acerca dos compostos de estanho foram realizados a partir de 1778 por Bayer e Charlard, os quais substituíam o chumbo e o cobre pelo estanho nos vasilhames de leite e nos revestimentos de balcões dos comerciantes de vinho, visando a diminuir os efeitos tóxicos desses metais na população francesa (Filgueiras, 2002). De fato, o primeiro organoestânico foi sintetizado por Frankland, em 1849, mas somente ganhou projeção mundial quando se descobriu, em 1940, que esses compostos poderiam ser usados como estabilizadores do PVC (cloreto de polivinila) (Blunden & Evans, 1990; Davies, 2004).

Há diversas aplicações desses compostos na indústria, na agricultura e na medicina, especialmente na agricultura, em razão de duas características fundamentais: em primeiro lugar, a grande afinidade do estanho por um átomo doador de Lewis, tal como um átomo de oxigênio, nitrogênio, fósforo ou enxofre e, em segundo, as propriedades biocidas contra bactérias, fungos, insetos, moluscos e pequenos animais. Essa última conferiu aos organoestânicos seu uso em larga escala como fungicidas em diversas culturas do setor agrícola (Omae, 1989; Filgueiras, 1998).

Apesar de o estanho ser considerado um metal pesado, a vantagem do uso desses compostos como pesticida é a sua degradação em dióxido de estanho (SnO_2), um composto insolúvel em pH fisiológico que o torna atóxico para o meio ambiente, ao contrário do que ocorre com biocidas cúpricos, mercuriais ou fosfóricos (Omae, 1989; Filgueiras, 1998; Dias, 2005).

Nos últimos anos vêm se intensificando estudos relacionados ao processo bioquímico ao qual a molécula biocida interage com seu alvo. Segundo Ballmoos et al. (2004), os compostos organoestânicos agem, principalmente na

inibição da enzima F_1F_0 -ATP Sintase, que promove a síntese do ATP, que é vital para a produção de energia dos organismos vivos em geral. Entretanto, o mecanismo é quase totalmente desconhecido, sendo várias hipóteses levantadas, mas sem um consenso científico acerca do assunto. Com isso, pretende-se neste trabalho utilizar a química computacional no intuito de auxiliar na compreensão do mecanismo de ação dos organoestânicos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Considerações iniciais

2.1.1. Brasil, uma potência agrícola do Século XXI

Segundo dados da FAOSTAT em 2007, o Brasil lidera a produção de diversos gêneros agrícolas como feijão, café e cana-de-açúcar, além de estar entre os primeiros na produção de soja, arroz e milho.

O país possui a maior reserva de terras disponíveis para a agricultura no planeta. Mesmo países que têm extensão territorial maior que o Brasil, como o Canadá, Estados Unidos, Índia, China e Rússia, enfrentam severas limitações climáticas e geográficas para ampliar a produção e precisam também de altos investimentos para preparar o solo. No caso dos chineses e Europa, atender à alta demanda interna de alimentos é um desafio, pois as áreas agrícolas já estão completamente ocupadas. Diante disso, resta ao Brasil uma posição de destaque no cenário de agronegócios, pois é o único do mundo com largas extensões de terras para plantio já mapeadas e disponíveis para uso imediato (Secco, 2004).

Ainda segundo a edição da Revista Veja de 2004 (Secco, 2004), o Brasil dispõe de 106 milhões de hectares para incorporar ao mapa agrícola, área equivalente ao território da França e ao da Espanha somados. Desses 106 milhões de hectares, 90 milhões são áreas que podem produzir, mas ainda não foram desbravadas; os outros 16 milhões estão improdutivos.

2.1.2. O desafio atual

Desde o início de seu desenvolvimento, a produção agrícola está diretamente relacionada com a aplicação de agroquímicos para controlar as

pestes que atacam os produtos agrícolas, prejudicando as colheitas. Entretanto, esses produtos geram, comumente, grandes problemas, pois os herbicidas, muitas vezes, são tóxicos, podendo ser cancerígenos, mutagênicos e teratogênicos (Primel et al., 2005).

Atualmente um dos maiores problemas com o qual se deparam os agricultores é conciliar o aumento da produtividade de biomassa com a demanda de energia e alimentos, decorrentes do crescimento das populações consumidoras. Até o presente momento, uma resposta economicamente viável para se reduzirem perdas na produção ainda é o emprego de agroquímicos, apesar de todos os problemas ambientais e de saúde listados anteriormente (Fitzpatrick, 2006). Portanto, o desenvolvimento de novos agroquímicos que sejam eficazes e, ao mesmo tempo, tenham o mínimo de impacto ao meio ambiente é o desafio neste século.

2.2 Agroquímicos: do enxofre aos organoestânicos

Os seres humanos usam pesticidas para impedir danos às suas colheitas desde aproximadamente 500 a.C., sendo o enxofre o primeiro pesticida utilizado. Por volta do século XV, começaram a utilizar elementos químicos tóxicos, como o arsênio, mercúrio e cobre no combate a pragas em colheitas. No século XVII, o sulfato de nicotina foi extraído das folhas de tabaco para ser usado como pesticida (Caetano, 2009).

Produtos inorgânicos, como o cobre e o enxofre, ainda estavam em uso há mais de cem anos, quando o primeiro produto sintético, o dinitro cresol, foi colocado no mercado em 1892 sob a marca Antinonnin. O primeiro fungicida para tratamento de sementes, à base de mercúrio orgânico, foi descoberto no início do século XX (Santini, 2003).

Em 1939, Paul Müller descobriu que o DDT é um inseticida muito eficaz, transformando-o rapidamente no pesticida mais usado no mundo (Caetano, 2009). De 1945 a 1950, após a II Guerra Mundial, o Japão experimentou condições sanitárias precárias e várias doenças proliferaram, devido à destruição causada pela guerra. A fim de controlar os artrópodes vetores de doenças transmitidas por insetos, cerca de 4 milhões de cidadãos de Tóquio foram tratados com DDT (Mori, 2007; Stenersen, 2004).

A partir da segunda metade do século XX, uma nova classe de agroquímicos entrava no mercado: os organoestânicos (Filgueiras, 1998).

2.3 Estanho

2.3.1. Histórico

Estudos arqueológicos realizados no domínio interfluvial dos rios Tigre e Eufrates, antiga Mesopotâmia, hoje Iraque, revelaram que o estanho foi utilizado inicialmente, entre 3500 a 3200 a.C, na forma de liga com o cobre, denominado bronze. Portanto, o estanho foi um dos primeiros metais a ser trabalhado pelo homem, para manufatura de armas e ferramentas, caracterizando um marco da evolução tecnológica das civilizações, a denominada Idade do Bronze (Omae, 1989).

Quando o Império Romano era governado por Júlio César, registrou-se a presença de estanho na região onde hoje é chamada de Formações Geológicas de Cornwall, na Inglaterra. Aliás, essa região foi a maior produtora de estanho da Europa até o século XIX (Greenwood & Earnshaw, 1984).

No final do século XVIII, várias providências de proteção à população, em vista da contaminação por chumbo e cobre, levaram a monarquia francesa a uma consulta ao Colégio de Farmácia para saber sobre a viabilidade ou não da

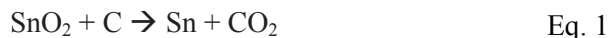
substituição destes metais por estanho. Bayer e Charlard, responsáveis pelos estudos, acabaram por transformar a consulta governamental em um verdadeiro projeto de pesquisa engenhoso e crítico. A partir daí, houve um salto em relação à pesquisa com compostos de estanho (Filgueiras, 2002).

A primeira referência histórica sobre a descoberta de estanho no Brasil data de 1625, em São Paulo. Porém, somente no século XIX iniciou-se o processo extrativista do metal no estado do Rio Grande do Sul (Brasil, 2001).

Nas décadas de 40 e 50 do século XX, descobriram-se reservas de cassiterita em São João Del Rei, Minas Gerais e em Rondônia. A partir da década de 80, com a descoberta de jazidas no estado do Amazonas, o país tornou-se um dos maiores exportadores de estanho metálico. Dados do Departamento Nacional de Produção Mineral de 2005 estimam que o Brasil concentre 11% das reservas de estanho no mundo (Brasil, 2001; Brasil, 2006).

2.3.2. Características gerais

Pertencente ao Grupo 14 da Tabela Periódica, ao qual também fazem parte o carbono, silício, germânio e chumbo, o estanho é um metal branco-prateado, brilhante, muito mole, mas que possui considerável dutibilidade (Ohlweiler, 1973). É o 48º elemento em abundância no planeta e sua principal fonte é o mineral cassiterita, SnO_2 , que pode ser facilmente reduzido pelo carvão, conforme mostra a equação 1. (Filgueiras, 1998).



Outras propriedades do estanho são apresentadas no quadro a seguir:

QUADRO 1 Propriedades atômicas do estanho (Greenwood & Earnshaw, 1989).

Propriedade	Valor
Número atômico	50
Estrutura eletrônica	[Kr] 4d ¹⁰ 5s ² 5p ²
Ponto de fusão (°C)	232
Ponto de ebulição (°C)	2623
Isótopos estáveis naturais (%)	10: Sn ¹¹² (0,95), Sn ¹¹⁴ (0,65), Sn ¹¹⁵ (0,34), Sn ¹¹⁶ (14,24), Sn ¹¹⁷ (7,57), Sn ¹¹⁸ (24,0), Sn ¹¹⁹ (8,58), Sn ¹²⁰ (32,97), Sn ¹²² (4,71), Sn ¹²⁴ (5,98)
Peso atômico	118,69 (±3)
Energia de Ionização /kJ mol ⁻¹	1 ^a = 708,4 2 ^a = 1411,4 3 ^a = 2492,2 4 ^a = 3929,3
Eletronegatividade	1,8
Formas alotrópicas	Forma α (cinza): cúbica, tipo diamante. Forma β (branca): tetragonal Forma γ: rômica

O estanho é estável ao ar e à água à temperatura ambiente. Entretanto, é oxidado a temperaturas elevadas com formação de dióxido. Combina-se com os halogênios, formando tetra-haletos: com o cloro e bromo, à temperatura ambiente, e com o iodo, aquecendo-se moderadamente. Também por aquecimento, reage energeticamente com não metais, como enxofre, selênio, telúrio e fósforo e não se combina diretamente com nitrogênio. Possui relativa facilidade em se ligar com outros metais (Ohlweiler, 1973).

Os estados de oxidação mais comuns do estanho são o Sn^{+2} e Sn^{+4} . Porém, os compostos de estanho (II) são menos estáveis que os de estanho (IV), em razão, principalmente, da sensibilidade de compostos de Sn (II) frente ao ar e umidade. Essa maior sensibilidade está relacionada com a facilidade do Sn (II) em ser oxidado a Sn (IV) pela ação do O_2 ou hidrolisado na presença de umidade (Lima, 1999).

2.3.3. Aplicações

O óxido de estanho (IV), SnO_2 , tem sido usado há milênios como opacificador em cerâmicas e em esmaltes vítreos. Outros compostos inorgânicos são utilizados como pigmentos, possuindo destaque o azul cerúleo, nome tradicional do estanato de cobalto (II), CoSnO_3 . Os íons de Co^{2+} , responsáveis pela cor azul, alojam-se na rede dos contra-íons SnO_3^{2-} (Filgueiras, 1998).

Na indústria, o estanho é usado no revestimento de placas metálicas (estanhagem), atribuindo aos produtos finais propriedades antioxidantes. Esse processo resulta na fabricação da folha-de-flandres, que é o revestimento do aço laminado por uma fina película de estanho. Estima-se que cerca 90% das folhas-de-flandres sejam destinadas às indústrias de embalagens (latas de cerveja, refrigerantes, óleos comestíveis e tintas) (Hanan, 1983).

Outra aplicação industrial do estanho consiste na fabricação de ligas com outros metais, sendo a mais importante é a liga para solda (estanho/chumbo). A solda contém cerca de 33% de estanho em massa, mas pode variar entre 2 e 63%, dependendo do uso. Além da solda, há outras ligas, incluindo o bronze (cobre/estanho), “bronze duro” (“gun metal”) (cobre/estanho/chumbo/zinco) e peltre (antimônio/estanho/cobre) (Lee, 1997; Greenwood & Earnshaw, 1984).

Filmes de óxido de estanho (IV) são aplicados em janelas de aviões, pois ele conduz eletricidade, produzindo calor, evitando a deposição de gelo no vidro (Filgueiras, 1998).

2.4 Compostos organoestânicos

2.4.1. Histórico

O primeiro composto organoestânico foi preparado por Frankland em 1849, utilizando como precursores o iodeto de etila e estanho metálico. O produto obtido foi o diiodeto de dietilestanho, como mostra a equação 2 (Davies, 2004).



Quando a indústria de plásticos iniciou sua expansão em meados do século passado, o PVC (cloreto de polivinila) passou ter maior importância. Porém, esse polímero, exposto ao calor ou à luz degradava-se, descolorindo. Para eliminar esse problema, inúmeras pesquisas foram feitas, descobrindo-se que os compostos orgânicos à base de estanho possuíam uma poderosa ação estabilizante. Foram então introduzidos para esse propósito nos Estados Unidos, no final dos anos 40, e na Europa, em meados dos anos 50 (Blunden & Evans, 1990; Godoi et al., 2003).

A partir de 1950, investigações sistemáticas pelo Conselho Internacional de Pesquisas sobre Tintas no Instituto de Química Orgânica em Utrecht demonstraram a ação de compostos organoestânicos, especialmente trialkilestânicos e triarilestânicos, em relação a fungos e bactérias, organismos marinhos, vermes parasíticos, insetos e caracóis aquáticos, entre outros (Kumari

et al., 1994; Luijten, 1987; Barbieri et al., 2006). Então, as propriedades biocidas desses compostos foram descobertas e passaram a ser exploradas comercialmente.

Na década de 60, a companhia alemã Aventis S.A. produziu e preparou o acetato de trifenilestanho, chamado comercialmente de Brestan e a Philips Dufan introduziu no mercado o Duter, baseado no hidróxido de trifenilestanho, que são usados em culturas de trigo, café, batata, amendoim, cacau e feijão. A Dow Chemical, por sua vez, lançou o acaricida Plictran, em 1967, baseado no hidróxido de tricicloexilestanho (cyhexatin). O grupo Royal Dutch/Shell produziu o Vendex, baseado no óxido de fenbutatina e a alemã Bayer AG produziu o Peropal, baseado no tricicloexilestanho-1,2,4-triazol (azocyclotin), usado principalmente em culturas de feijão no combate à antracnose (Godoi et al., 2003).

Paralelamente, o Cloreto de Tributilestanho entrava no mercado como um agente capaz de evitar a incrustação de organismos marinhos no casco de navios, sendo, portanto, adicionado às tintas utilizadas na pintura desse meio de transporte. Entretanto, nos anos 80, verificou-se que esse organoestânico, ao ser liberado no mar, causava mutações em organismos que viviam próximos aos portos. Com isso, medidas legais surgiram para limitar, e até mesmo em alguns países como a Inglaterra, proibir o uso desse composto em tintas para navios (Fernandez et al., 2005; Dias, 2005).

No mesmo período em que houve a descoberta da contaminação do cloreto de tributilestanho nas regiões costeiras, os primeiros registros de estudos sobre as atividades antitumorais dos compostos organoestânicos foram divulgados e, desde então, centenas de compostos têm sido testados para verificação dos seus efeitos sobre sistemas biológicos (Crowe et al., 1984; Pellerito et al., 2006).

2.4.2. Propriedades químicas

Os compostos organoestânicos são caracterizados pela presença de pelo menos uma ligação covalente Sn-C. Esses compostos contêm centros tetravalentes e são classificados em mono, di, tri e tetraorganoestânicos (IV), dependendo do número de grupos alquilas e arilas. Os ânions são geralmente Cl^- , F^- , O^{2-} , OH^- , $-\text{COO}^-$ ou $-\text{S}^-$. Estudos mostram que a natureza do grupo aniônico tem apenas importância secundária na atividade biológica (Pellerito et al., 2006).

A ligação Sn-C é estável na água e ao oxigênio atmosférico em temperatura ambiente e é bastante estável ao calor. Ácidos fortes, halogênios e outros agentes eletrofílicos quebram facilmente a ligação carbono-estanho. O estanho forma predominantemente ligações covalentes com outros elementos, mas essas ligações exibem um alto grau iônico, com o estanho usualmente agindo como membro eletropositivo (Godoi, 2001).

O número de ligações Sn-C tem um grande efeito sobre as propriedades dos organoestânicos, permitindo uma série de aplicações. Os compostos tetraorganoestânicos R_4Sn não possuem atividade biológica significativa e sua maior aplicação comercial é como precursor para outros compostos organoestânicos (Godoi et al., 2003).

2.4.3. Aplicações

Como mencionado anteriormente, a primeira síntese de um composto organoestânico ocorreu em meados do século XIX. Entretanto, somente 100 anos depois apareceram as primeiras aplicações industriais (Filgueiras, 1998).

A mais importante aplicação comercial dos organoestânicos ocorre nos estabilizadores de PVC, do qual o Brasil é um dos maiores produtores mundiais (Omae, 1989).

SnCl_4 e Me_2SnCl_2 são utilizados para depositar filmes muito finos de SnO_2 sobre vidro. Assim, o vidro torna-se mais resistente, o que o torna útil na fabricação de lentes e frascos de menor espessura. Películas pouco mais espessas são depositadas sobre vidros planos, para reduzir a perda de calor. (Filgueiras, 1998).

Um outro largo espectro de aplicações de organoestânicos, resultante de suas características biocidas, tem sido muito utilizado. Apesar de o estanho ser um metal pesado, ele ocorre na natureza, sobretudo na forma de SnO_2 , um composto insolúvel no pH fisiológico e, em consequência, praticamente não é tóxico (Greenwood & Earnshaw, 1984). Se a degradação de organoestânicos levar rapidamente a SnO_2 , então o uso de pesticidas baseados nessas substâncias seria bem mais interessante que compostos de mercúrio ou outros compostos orgânicos tóxicos (Filgueiras, 1998).

Os compostos organometálicos de estanho também são usados como tintas anti-incrustantes em navios. Essa tinta é colocada nos cascos dos navios evitando o ataque de organismos incrustantes, como cracas, mexilhões e algas, que causavam aumento dos custos operacionais, principalmente o de combustível (Godoi, 2001).

Dois tipos principais de películas protetoras têm sido utilizados nos últimos 20 anos para prevenir o crescimento de colônias de organismos marinhos nos cascos. A primeira dessas películas consiste em um copolímero de acrilato e metacrilato de tributilestanho, que sofre hidrólise pela água do mar, liberando lentamente a espécie tributilestanho, especialmente tóxica contra animais marinhos. O segundo tipo de película usado nessa situação foi introduzido na década de 80 e consiste numa espécie triorganoestânica ancorada a um polissiloxano, formando uma estrutura tridimensional rígida, mais resistente que aquela do tipo anterior (Filgueiras, 1998).

Na medicina, os compostos organoestânicos, principalmente os diorganoestânicos, vêm ganhando destaque devido à sua ação em células humanas portadoras de câncer (Crowe, 1984; Pellerito et al., 2006).

Mais recentemente, Jan et al. (2002) vêm estudando os efeitos de compostos trialkilestânicos em células cancerígenas da próstata. Foi verificado também que compostos de estanho mostraram-se eficazes contra leucemia linfocítica, sendo os derivados diorganoestânicos mais ativos que os triorganoestânicos (Dias, 2005).

2.4.4. Toxicidade e modo de ação em sistemas biológicos

A toxicologia dos compostos organoestânicos é muito complexa, mas, de forma geral, os compostos trialkil e triarilestanho (IV) são mais tóxicos que os compostos dissubstituídos, enquanto os monosubstituídos são os menos tóxicos. Compostos R_4Sn são tóxicos somente se forem metabolizados para triorganoestânicos. Entre os trisubstituídos, os compostos n-propil, n-butil, n-pentil, fenil e cicloexil (IV) são geralmente os mais tóxicos para microorganismos (Baul, 2008). Omae (2006) mostrou em um gráfico (Figura 1) que a dependência da atividade biológica de compostos organoestânicos em relação à natureza do grupo alkila é a mesma em fungos e bactérias e diferem se comparadas a insetos e mamíferos.

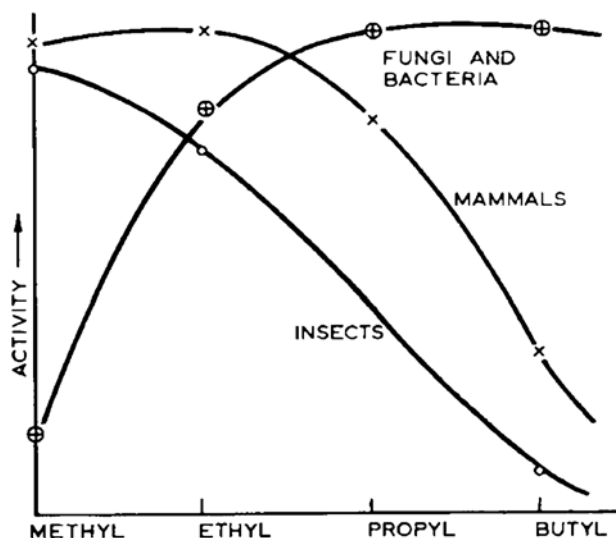


FIGURA 1 Dependência da atividade biológica de compostos organoestânicos em relação à natureza do grupo alquila para diferentes espécies (Omae, 2006).

A toxicidade em compostos R_3Sn^+ pode estar relacionada também com seu coeficiente de partição água-octanol, K_{ow} , que é uma medida de hidrofobicidade; um elevado K_{ow} indica maior hidrofobicidade e, por consequência, pode predizer maior toxicidade (Baul, 2008; Conney & Wuertz, 1989).

Recentemente, Ballmoos et al. (2004) propuseram um modelo de inibição dos compostos organoestânicos. Em seus estudos, pode-se concluir que eles agem na interrupção da produção de ATP, inibindo a enzima F_1F_0 -ATP Sintase, mais precisamente na subunidade a , que é uma espécie de canal formado por proteínas que se localiza na interface da mitocôndria, e que é o responsável pela passagem de prótons que ativam a enzima (Figura 2). O trabalho propõe que os organoestânicos interagem com a entrada dessa subunidade, impedindo a entrada desses prótons, porém, não aponta qual seria

essa interação; uma ligação química entre o organoestânico com algum resíduo de aminoácido, ou tão somente algumas interações mais fracas, mas que devido ao tamanho da molécula a bloquearia, dificultando, assim, a passagem de qualquer espécie, inclusive um próton. Além disso, não se tem certeza se quem participa da inibição é a molécula neutra, um cátion, ou mesmo algum intermediário. Ingham e colaboradores, já em 1960, inferiram que poderia ser o cátion, formado a partir da saída da espécie aniônica, ou até mesmo algum intermediário a partir da hidrólise desse composto, visto que o meio celular é composto majoritariamente por água. Mais recentemente, Pellerito et al. (2006) propuseram que seria um cátion o responsável pela inibição, ou mesmo a espécie neutra (R_nSnX_{4-n}), sem determinar, entretanto, as bases moleculares dessa ação devido à complexidade do sistema. O mecanismo mais detalhado de como a enzima é ativada por prótons será visto no tópico seguinte.

Os compostos organoestânicos, especialmente os do tipo R_3SnX , podem se ligar pelo enxofre em resíduos de cisteína ou em resíduos de histidina pelo anel imidazólico. Interferência com a função mitocondrial parece ser o modo de ação bioquímico que conduz a reações tóxicas (Manahan, 2003).

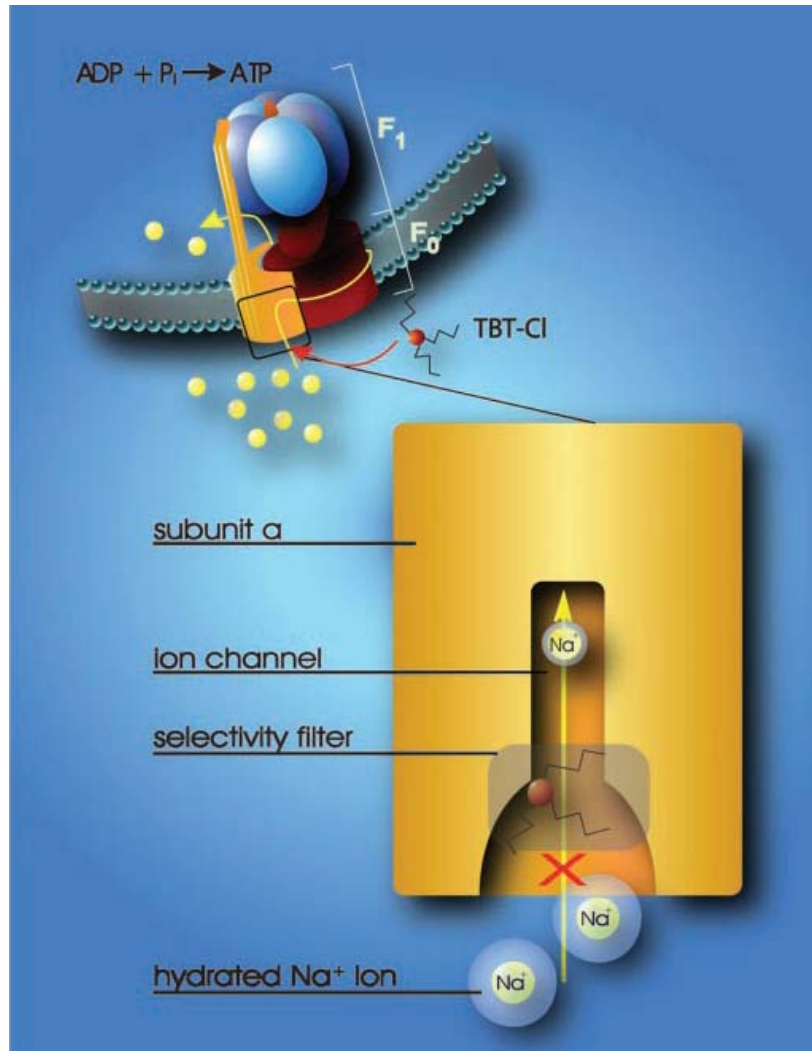


FIGURA 2 Modelo proposto do modo de ação de compostos organoestânicos (Ballmoos et al., 2004).

2.5 F₁F₀-ATP Sintase

2.5.1. Características Gerais

A F₁F₀-ATP Sintase é um grande complexo proteico constituído por pelo menos 22 subunidades, estando mais da metade estão na fração F₀. É responsável pela síntese do ATP durante o processo de fosforilação e fotofosforilação oxidativa, sua estrutura e mecanismos permaneceram conservados durante toda a evolução (Nakamoto et al., 2008).

Segundo Cain (2000), independentemente da origem biológica, todas as F₁F₀-ATP Sintases possuem atividade *in vitro*, tanto na síntese quanto na hidrólise do ATP. As semelhanças funcionais das ATP sintases estão refletidas na similaridade de suas arquiteturas moleculares. Um modelo da F₁F₀-ATP Sintase está representado abaixo (Figura 3).

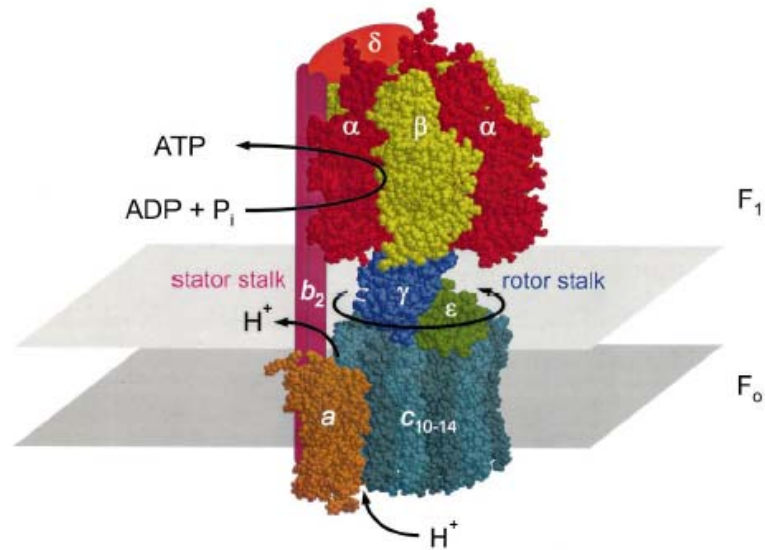


FIGURA 3 Modelo estrutural de F₁F₀-ATP Sintase de *Escherichia coli* (Senior et al., 2002).

Em *Escherichia coli*, a fração F_0 é composta de três subunidades com a estequiometria $a_1b_2c_{10-14}$. As subunidades a e c estão em contato e os prótons translocam-se através da interface entre elas. Essas subunidades estão presentes em todas as ATP Sintases (Stock et al., 2000).

O ATP (adenosina trifosfato) é sintetizado pelo processo de fosforilação oxidativa e é fundamental para a produção de energia em células de praticamente todos os seres vivos. A fotossíntese de plantas também requer ATP, que é gerado por fotofosforilação. Tanto a fosforilação oxidativa quanto a fotofosforilação na fotossíntese ocorre na enzima F_1F_0 -ATP Sintase, e é uma das mais frequentes reações enzimáticas em sistemas biológicos (Senior et al., 2002).

A ativação da enzima ocorre na subunidade a , onde os prótons provindos da Cadeia de Transporte de Elétrons entram no canal proteico. Esses prótons estão envoltos por moléculas de água, e dentro da subunidade, uma rede de aminoácidos rompe essa estrutura de solvatação e o próton (ou um cátion, por exemplo, Na^+) pode atravessar livremente a fração F_0 (Ballmoos et al., 2004).

À medida que os prótons atravessam a membrana através do canal da ATP Sintase, a matriz F_0 entra em movimento de rotação (Noji & Yoshida, 2001). Essa rotação poderá ser causada por mudanças no estado de ionização de aminoácidos na subunidade c , o que poderá causar interações eletrostáticas que propulsionam o anel (Capaldi & Aggeler, 2002). Esse anel em rotação, por sua vez, força a rotação do eixo central (subunidade γ) dentro das subunidades α e β ; essas não entram em rotação por se encontrarem fixas pelo braço lateral, que atua como um estator. É o movimento da subunidade γ que providencia a energia necessária para os centros ativos das subunidades β sofrerem alterações que permitam a produção e libertação de ATP (Dimroth et al., 2000).

Essa reação de síntese de ATP é designada em inglês como *binding change mechanism* (algo como "mecanismo de ligação-modificação") e consiste

na modificação cíclica do centro ativo de cada subunidade β em três estados (Gresser et al., 1982). No estado "aberto", o ADP e o fosfato entram no centro ativo. A proteína muda de conformação capturando as moléculas e liga-as de forma fraca (estado de ligação fraca). A enzima muda então novamente de conformação e força o encontro entre essas moléculas (estado "fechado"), em que o centro ativo liga a recém-produzida molécula de ATP com alta afinidade. O centro ativo volta, então, ao estado "aberto", permitindo a liberação da molécula de ATP e podendo voltar a ligar ADP e fosfato (Capaldi & Aggeler, 2002).

2.5.2. Subunidade a : estrutura e características

A subunidade a da enzima F_1F_0 -ATP Sintase localiza-se na fração F_0 , na interface das membranas externa e interna da mitocôndria. É aqui que de fato há a ativação da enzima para a produção de ATP pelo bombeamento de prótons ou íons, oriundos da Cadeia de Transporte de Elétrons (Figura 4).

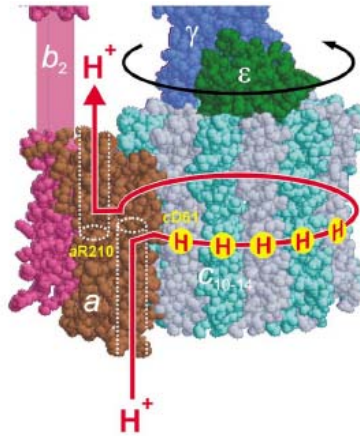


FIGURA 4 Modelo estrutural da fração F_0 onde está localizada a subunidade a da enzima F_1F_0 -ATP Sintase (Weber & Sênior, 2003).

Essa subunidade é hidrofóbica e provavelmente envolvida por cinco α -hélices transmembranosas. Contêm resíduos ácidos e básicos (Arg 210, His 245, Glu 196, Glu 219), que são essenciais para a translocação do próton (Figura 5). A subunidade *c* também é hidrofóbica (Stock et al., 2000).

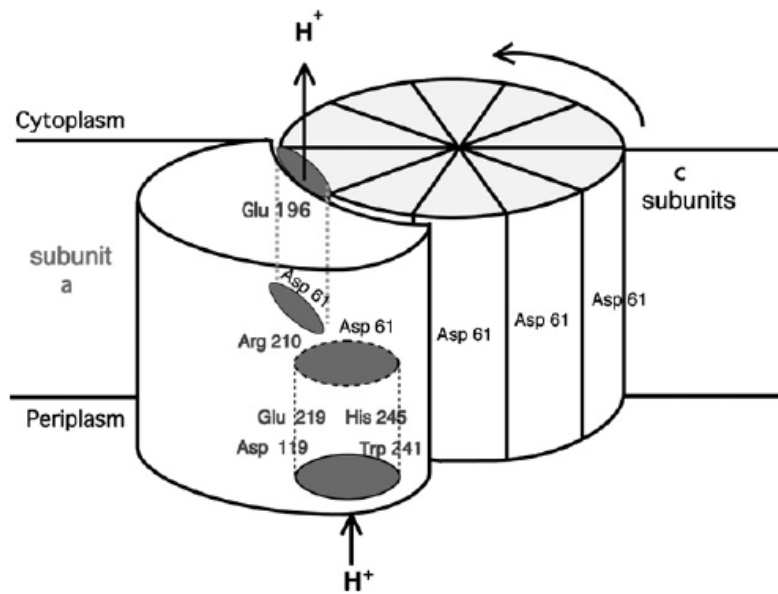


FIGURA 5 Modelo estrutural da subunidade *a* da enzima F_1F_0 -ATP Sintase de *Escherichia coli* (Vik & Ishmukhametov, 2005).

A subunidade *a* é composta por 271 resíduos e está presente na estequiometria de uma subunidade por enzima (Cain, 2000).

2.6 Aspectos da Química Computacional

2.6.1 Considerações gerais

Com o avanço e sofisticação da informática nos últimos anos, grande quantidade de informações tem sido cada vez mais rapidamente processadas e, com o auxílio de novas ferramentas e metodologias computacionais, resultados melhores e mais precisos vêm sendo obtidos na tentativa de simular uma variedade de parâmetros químicos e correlatos. Uma das grandes vantagens dos métodos computacionais é seu baixo custo frente a métodos experimentais, uma vez que evitam repetição de análises e reações, além de gastos com reagentes e materiais, visto que simulações podem ser feitas para aperfeiçoar e compreender processos, reações, interações, etc. A aplicação de métodos computacionais para solucionar problemas químicos estende-se às áreas onde a química desempenha um importante papel. Nesse contexto, conhecimentos mais detalhados sobre processos biológicos, como interação entre agroquímico e receptor, deve ser avaliada, predita e simulada utilizando métodos de química computacional. Seguindo essa mesma linha de aplicação em biotecnologia, novos compostos podem ser modelados e propostos como potenciais princípios ativos (agroquímicos) (Caetano, 2009).

As bases que regem a química computacional estão na química quântica, que começou a ser “escrita” por Max Planck em 1900, a partir de seus estudos sobre a radiação do corpo negro e a quantização de energia. Em 1905, Albert Einstein, com o efeito fotoelétrico, aplica as hipóteses sugeridas por Planck. A partir de então, vários brilhantes cientistas ajudaram a edificar a mecânica quântica e, assim, foi possível chegar à nossa atual capacidade de cálculo de propriedades de átomos e moléculas (Trsic & Pinto, 2009).

Os postulados e teoremas da mecânica quântica formam um fundamento rigoroso para a predição de propriedades químicas observáveis segundo os

primeiros princípios. De modo geral, o postulado fundamental da mecânica quântica diz que sistemas microscópicos são descritos por funções de onda que caracterizam completamente todas as propriedades físicas do sistema. Em particular, há na mecânica quântica operadores correspondentes para cada observável físico (Cramer, 2004).

Estes postulados foram introduzidos a partir de 1920 por vários físicos teóricos da época, tais como: Bohr, Einstein, Heisenberg e principalmente Schrödinger.

O objetivo central da química quântica é a resolução da Equação de Schrödinger, por meio da qual é possível obter uma função Ψ que descreve o sistema por completo. A equação pode ser descrita da seguinte forma (equação 3):

$$\hat{H}\psi = E\psi , \quad \text{Eq. 3}$$

em que o operador \hat{H} , denominado hamiltoniano, pode ser descrito como:

$$\hat{H} = -\sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{Ai}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>0}^N \frac{1}{r_{ij}} , \quad \text{Eq. 4}$$

sendo que o primeiro termo do operador \hat{H} refere-se à energia cinética dos elétrons; o segundo é o termo de atração elétron-núcleo e o terceiro termo representa a repulsão instantânea entre os elétrons. Devido a esse último termo, a solução só é exata para sistemas monoelétrônicos, havendo a necessidade do uso de métodos aproximados para a resolução da Equação de Schrödinger (Bernini, 2008; Levine, 2001). Born e Oppenheimer, no intuito de simplificar essa equação, separaram os movimentos dos núcleos e dos elétrons para o estudo de moléculas. Como a massa do elétron é ínfima em relação à do núcleo, a velocidade do elétron é muito maior que a do núcleo (Pinto & Trsic, 2009).

Dessa forma, a movimentação nuclear pode ser considerada desprezível em relação à movimentação eletrônica.

Um desses métodos de aproximação, e que é um dos mais usados hoje, é o método de Hartree-Fock (HF). Ele é capaz de fornecer uma boa solução aproximada para o problema de muitos elétrons e pode ser o ponto de partida para outros métodos, como os semiempíricos, que serão discutidos posteriormente (Castro & Canuto, 2007).

Em 1930, Hartree derivou equações para funções monoelétrônicas, levando em conta o potencial médio produzido por todos os outros elétrons. Um ano mais tarde, o físico russo Vladimir Aleksandrovitch Fock incorporou o conceito de spin nas equações de Hartree, consolidando, assim, as equações de Hartree-Fock (Trsic & Pinto, 2009).

2.6.2 O método DFT

A química quântica tem como foco utilizar aproximações que melhor descrevem a função de onda (Ψ) e, por conseguinte, obter as informações necessárias para conhecer o comportamento de um estado particular ou de um determinado sistema (Pinto, 2007). Além disso, os métodos *ab initio* partem da aproximação HF, em que as equações HF são resolvidas para obter spin-orbitais, que, por sua vez, são usados para construir funções de estado. Apesar de serem amplamente usados atualmente em Química Quântica, eles têm limitações, em particular, a dificuldade computacional para realizar cálculos precisos com conjuntos de bases grandes para moléculas que contêm muitos átomos (Andrade, 2009). No entanto, a teoria do funcional de densidade (DFT – *Density Functional Theory*) possui outra diretriz, ou seja, sua proposta consiste em obter informações sobre um dado sistema a partir de sua densidade eletrônica, $\rho(\vec{r})$ (Pinto, 2007).

O conceito de um funcional da densidade para a energia foi a base de vários modelos aproximativos já na década de 20. Entretanto, apenas em 1964 deu-se uma prova formal que a energia e todas as propriedades eletrônicas do estado fundamental são unicamente determinadas pela densidade eletrônica (Andrade, 2009).

O teorema da existência de Hohenberg-Kohn prova que existe um único funcional tal que (equação 5):

$$E[\rho(r)] = E_{elec} \quad \text{Eq. 5}$$

em que E_{elec} é a energia eletrônica exata. Além disso, demonstra-se que a densidade do elétron obedece ao teorema variacional.

A fim de resolver a energia pelo método DFT, Kohn e Shan propuseram que o funcional tem a forma, de acordo com a equação 6:

$$E[\rho(r)] = T_e[\rho(r)] + V_{ne}[\rho(r)] + V_{ee}[\rho(r)] + E_{xc}[\rho(r)] \quad \text{Eq. 6}$$

em que o termo da energia potencial de atração núcleo-elétron V_{ne} , é

$$V_{ne}[\rho(r)] = \sum_j^{nuclei} \int \frac{Z_j}{|r - r_k|} \rho(r) dr \quad \text{Eq. 7}$$

V_{ee} , é a energia potencial de repulsão elétron-elétron

$$V_{ee}[\rho(r)] = \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{|r_1 - r_2|} dr_1 dr_2 \quad \text{Eq. 8}$$

e E_{xc} , o funcional de correlação e troca, onde é geralmente escrito como uma soma de dois componentes, um componente de troca e outro de correlação. Eles são usualmente escritos em termos de uma energia de densidade ϵ ,

$$\begin{aligned}
E_{xc}[\rho(r)] &= E_x[\rho(r)] + E_c[\rho(r)] = & \text{Eq. 9} \\
&= \int \rho(r)\varepsilon_x[\rho(r)]dr + \int \rho(r)\varepsilon_c[\rho(r)]dr
\end{aligned}$$

(Bachrach, 2007; Koch & Houthausen, 2001).

A energia de troca e correlação é definida como um funcional de densidade eletrônica, e inclui todos os termos não clássicos. A correlação eletrônica introduz o termo de troca referente à correlação entre elétrons de mesmo spin e a diferença entre a energia cinética exata e a do sistema de elétrons que não interagem. Esse funcional é que torna o DFT diferencial frente aos métodos *ab initio* (Duarte & Rocha, 2007).

Várias formulações foram realizadas, dando origem aos diversos funcionais utilizados, divididos em três grupos:

- a) Métodos de densidade local: O funcional de densidade é equivalente a de um gás de elétrons uniforme e é constante em todo espaço. O termo de correlação-troca (equação 10) é obtido por uma integral em todo o espaço:

$$E_{XC}[\rho] = \int \rho(r)\varepsilon_{XC}(\rho(r))dr \quad \text{Eq. 10}$$

em que ε_{XC} é a energia de correlação e troca na função de densidade de um gás de elétrons uniforme (Trsic & Pinto, 2009).

- b) Métodos dos Gradientes Corrigidos ou não locais: O funcional de densidade depende do gradiente da densidade em um dado ponto e não do seu valor. Normalmente são separados em contribuições de troca e de correlação. Como exemplo de contribuição de troca há o funcional de

Becke (Becke, 1992) e como exemplo de contribuição de correlação, há o funcional de Lee, Yang e Par – LYP (Lee et al. 1988).

- c) Métodos Híbridos: Incorporam o termo de troca do método HF. Desse modo, o termo de correlação-troca é a soma do termo de correlação, obtido pelo método de densidade local, com o termo de troca, obtido pelos orbitais de Kohn-Shan, escritos em forma de determinante de Slater (Bernini, 2008; Trsic & Pinto, 2009).

O funcional utilizado neste trabalho foi o HCTH (Hamprecht, Cohen, Tozer, and Handy). Pertence ao Método dos Gradientes Corrigidos, também denominado GGA, em que as energias de correlação e troca são dependentes tanto da densidade eletrônica quanto do gradiente de densidade (Pinto & Trsic, 2009). Esse funcional usa o esquema de funções de ondas planas com pseudopotencial para calcular a estrutura eletrônica de sistemas periódicos. A energia de troca e correlação deve ser explicitamente construída. O funcional de energia HTCH (equação 11) é expresso em termos de densidade de spin e módulo de seus gradientes (Rushton et al., 2001).

$$E_{XC} [\rho_{\uparrow}, \rho_{\downarrow}] = \int F_{XC} (\rho_{\uparrow}, \rho_{\downarrow}, |\nabla \rho_{\uparrow}|, |\nabla \rho_{\downarrow}|) dr \quad \text{Eq. 11}$$

Esse funcional mostrou-se eficiente nos cálculos em sistemas envolvendo metais, com ênfase aos do Grupo B da tabela periódica, e também a elementos com muitos elétrons, como o estanho (Buck-Koehntop et al., 2006), em relação ao funcional BLYP, B3LYP e outros funcionais de densidade (Becke, 1988; Lee et al., 1988; Hamprecht et al., 1998).

2.6.3 O método Semi-empírico

Michael Polanyi e Henry Eyring foram os primeiros a utilizar a expressão “semiempírico” em química teórica, tentando-se de combinar cinética química, termodinâmica, mecânica quântica e a teoria da ligação de valência. Portanto, seria uma mescla de teoria com resultados experimentais (Simas & Rocha, 2007), os quais surgiram devido à dificuldade de estudar moléculas constituídas por um número de átomos relativamente grande, aliada à necessidade de compreender o comportamento das propriedades concernentes a elas (Pinto, 2007).

Os métodos semiempíricos pretendem encontrar soluções aproximadas para a equação de Schrödinger empregando parâmetros empíricos e restrições matemáticas mais drásticas do que aquelas utilizadas em métodos *ab initio*. Essas restrições, por vezes, não são muito bem fundamentadas teoricamente, mas são compensadas pelos parâmetros ajustáveis que aparecem no formalismo semiempírico específico. Esses parâmetros são variados até que se reproduzam da melhor maneira possível os valores experimentais de propriedades selecionadas (Laschuk, 2005).

Inicialmente, eram restritos a apenas no estudo do comportamento de sistemas π de moléculas planares pelo Método de Hückel em 1930. A partir da década de 60, Pople e colaboradores propuseram novos métodos com níveis de aproximações integrais diferentes, a fim de suprir as deficiências do Método de Hückel e expandir o uso dos métodos semiempíricos a qualquer tipo de molécula (Simas & Rocha, 2007). Esses métodos são:

CNDO – *Complete Neglect of Differential Overlap*

INDO – *Intermediate Neglect of Differential Overlap*

NDDO – *Neglect of Diatomic Differential Overlap*

Os dois primeiros foram introduzidos em meados da década de 60, sendo o segundo um aperfeiçoamento do primeiro, relacionados ao formalismo aplicando novas aproximações.

O método NDDO foi proposto por Pople, Santry e Segal em 1965 e é um aperfeiçoamento do INDO. Esse método considera um maior número de integrais para serem calculadas. Sendo assim, é a melhor das aproximações e é a base de todos os métodos semiempíricos utilizados atualmente (Simas & Rocha, 2007; Trsic & Pinto, 2009).

O método utilizado neste trabalho, o PM3 (*Parametrized Model 3*), baseia-se no método NDDO. Ele foi criado por James J. P. Stewart em 1989 e, juntamente com outro método, o AM1, é um dos mais populares atualmente. Os elementos que são parametrizados no método são: H, C, N, O, F, Cl, Li, Be, Mg, Al, Si, P, S, Ti, Zn, Ga, Ge, As, Se, Br, Cd, In, Sn, Sb, Te, I, Hg, Tl, Pb, Bi e Po. Há versões mais recentes do método PM3, como o PM3-tm, que introduz orbitais *d* para metais de transição e PM5, que é uma reparametrização do método PM3 (Laschuk, 2005; Trsic & Pinto, 2009).

2.6.4 Ancoramento Molecular

Uma técnica importante na modelagem estrutural é designada por “*docking*”, ou seja, “acoplamento” ou “ancoramento”. O objetivo do cálculo do tipo ancoramento molecular consiste na avaliação das interações energéticas de algumas orientações de uma molécula em relação à outra (s), em busca de interações que resultem em baixa energia (Bastos, 2006). Portanto, o ancoramento molecular pode ser formulado como uma otimização, objetivando encontrar a interação do ligante com a proteína de menor energia (Thomsen & Christensen, 2006).

O processo de reconhecimento molecular proteína-ligante é dirigido por uma combinação de efeitos entálpicos e entrópicos. Estes efeitos podem ser estimados pela energia livre de ligação de Gibbs (ΔG_{lig}) que, por sua vez, está diretamente relacionada à constante de dissociação K_i , a qual pode ser medida experimentalmente (equação 12),

$$\Delta G_{lig} = \Delta H - T\Delta S = RT \ln K_i \quad \text{Eq. 12}$$

em que ΔH é a variação de entalpia, T é a temperatura absoluta, ΔS é a variação de entropia e R é a constante universal dos gases. O sinal positivo da equação acima deve-se ao fato de que a constante medida, K_i , é uma constante de dissociação (Magalhães et al., 2007).

Os valores da função de desempenho do ancoramento (*Docking Scoring Function*) E_{score} são definidos pela equação 13 (Thomsen & Christensen, 2006).

$$E_{score} = E_{inter} + E_{intra} \quad \text{Eq. 13}$$

em que E_{inter} é a energia de interação do ligante com a proteína:

$$E_{inter} = \sum_{i \in ligand} \sum_{j \in protein} \left[E_{PLP}(r_{ij}) + 332,0 \frac{q_i q_j}{4r_{ij}^2} \right] \quad \text{Eq. 14}$$

O termo de E_{PLP} é um potencial “piecewise linear” que usa dois conjuntos diferentes de parâmetros: um para a aproximação do termo estérico (van der Waals) entre átomos e um outro potencial para a ligação hidrogênio. O segundo termo descreve as interações eletrostáticas entre átomos carregados. É um 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 em quilocalorias por mol (Thomsen & Christensen, 2006).

O termo E_{intra} é a energia interna do ligante:

$$E_{intra} = \sum_{i \in \text{ligand}} \sum_{j \in \text{ligand}} E_{PLP}(r_{ij}) + \sum_{\text{flexible-bonds}} A[1 - \cos(m\theta - \theta_0)] + E_{clash} \quad \text{Eq. 15}$$

As duas primeiras somas referem-se a todos os pares de átomos do ligante, excluindo os pares de átomos conectados por duas ligações. O segundo termo refere-se à torção da energia, em que θ é o ângulo de torção da ligação. A média da contribuição de torção da ligação da energia é usada se diversas torsões são determinadas. O último termo, E_{clash} , atribui uma penalidade de 1000 se a distância entre dois átomos pesados (mais de duas ligações distantes) for menor que 2.0 Å, punindo conformações inexistentes do ligante (Caetano, 2009).

A compreensão dos mecanismos de reconhecimento molecular receptor-ligante, além de ser um dos principais desafios da biologia molecular, é um dos aspectos centrais para o sucesso na descoberta e planejamento de novos fármacos. A obtenção de uma descrição acurada e automatizada do processo de reconhecimento molecular receptor-ligante, utilizando metodologias computacionais, é motivada pela possibilidade de redução do tempo e dos altos custos envolvidos no desenvolvimento de novos medicamentos (Magalhães et al., 2007).

3 OBJETIVOS

Devido à importância do desenvolvimento de novos herbicidas e como ainda não são conhecidos os resíduos de aminoácidos que participam do mecanismo de inibição da enzima F_1F_0 -ATP Sintase pelos compostos organoestânicos, este trabalho objetivou-se:

1) Avaliar o processo de ativação das estruturas dos compostos organoestânicos usando cálculos teóricos, envolvendo espécies neutras e protonadas.

2) Estudar a formação de intermediários a partir da hidrólise ácida por meio de uma reação modelo.

3) Realizar modelagem molecular na enzima F_1F_0 -ATP Sintase, com a finalidade de avaliar a interação desses compostos com a enzima.

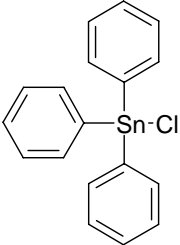
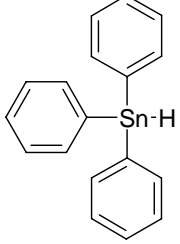
4) Propor, utilizando cálculos quânticos, uma vez que ainda estão obscuros na literatura, quais poderiam ser os aminoácidos envolvidos na interação dos compostos organoestânicos. Dessa forma, pretende-se auxiliar na elucidação do mecanismo dessa reação.

4 METODOLOGIA

4.1 Cálculos de otimização das estruturas

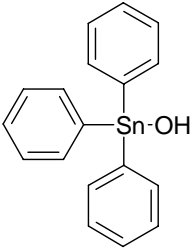
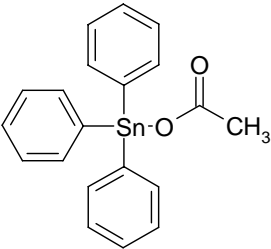
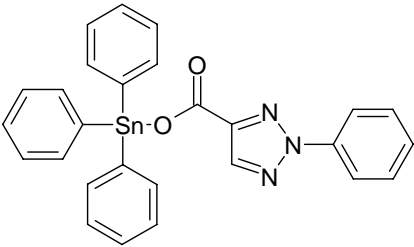
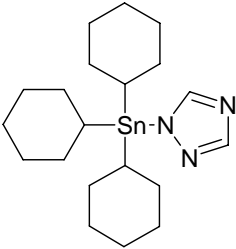
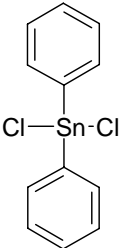
Foram selecionados 14 compostos com atividade conhecida em fungos e/ou bactérias. Os cálculos foram realizados pelo método DFT, sendo utilizado o programa Gaussian 03 (Frisch et al., 2004), com funcional de densidade HCTH (Buck-Koehntop et al., 2006) e função de base LANL2DZ (Krishnamoorthy et al., 2006). O quadro abaixo apresenta os compostos que foram utilizados neste trabalho.

QUADRO 2 Compostos organoestânicos utilizados neste trabalho com respectivo número de identificação, sua nomenclatura IUPAC e estrutura molecular.

Composto	Nome (IUPAC)	Estrutura
1	Cloreto de Trifenilestanho	
2	Hidreto de Trifenilestanho	

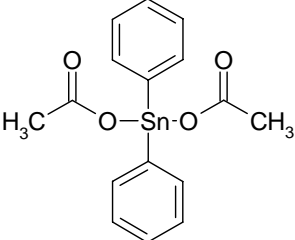
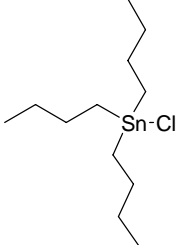
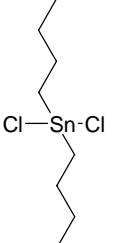
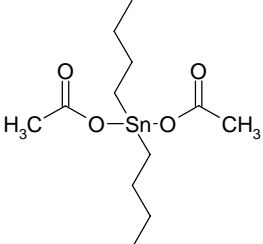
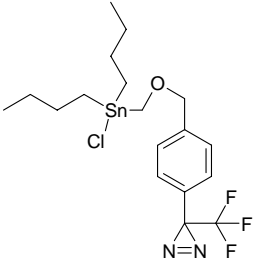
...continua...

QUADRO 2, Cont.

3	Hidróxido de Trifenilestanho	
4	Acetato de Trifenilestanho	
5	2-Fenil-1,2,3-triazolcarboxilato de Trifenilestanho	
6	1,2,4-triazol de Tricloexilestanho	
7	Dicloreto de Difenilestanho	

...continua...

QUADRO 2, Cont.

<p>8</p>	<p>Diacetato de Difenilestanho</p>	
<p>9</p>	<p>Cloreto de Tributilestanho</p>	
<p>10</p>	<p>Dicloreto de Dibutilestanho</p>	
<p>11</p>	<p>Diacetato de Dibutilestanho</p>	
<p>12</p>	<p>DDBT-Cl*</p>	

...continua...

QUADRO 2, Cont.

13	Cloreto de Trietilestanho	
14	Cloreto de Trimetilestanho	

*Cloreto de 4-[3-(Trifluorometil)-3H-Diazirin-3-yl]Benziloximetil Dibutilestanho

4.2 Perfil dos estados de transição

Os cálculos foram realizados no programa Spartan PC Pro (Hehre et al., 1999) com o método semiempírico PM3 (Alencastro et al., 2005; Stewart, 1989) e pelo método DFT no programa Gaussian 03 (Frisch et al., 2003). Todos os estados de transição, intermediários e precursores envolvidos foram calculados. Cada conformero foi totalmente otimizado pelos métodos PM3 e DFT. Utilizaram-se estruturas neutras e protonadas, ou seja, incluiu-se um próton fazendo ligação com o átomo da espécie aniônica ligado ao estanho. Os estados de transição e intermediários foram caracterizados por frequências imaginárias, baseados em cálculos de infravermelho (Baboul & Schlegel, 1997). O perfil da energia e as geometrias selecionadas ao longo do caminho da reação foram calculadas pelo método DFT com funcional HCTH utilizando e função de base LANL2DZ. Esse procedimento computacional tem sido utilizado em sistemas semelhantes com sucesso (Cunha et al., 2004; Silva et al., 2006; Buck et al., 2004).

4.3 Cinética de reação através de um composto modelo

4.3.1 Síntese do complexo modelo

Em um balão de fundo redondo de 500 mL, foram dissolvidos 2,60 mmol de dicloreto de difenilestanho em 30mL de acetonitrila e adicionados 2,60 mmol de ácido acético 0,5 mol/L. A mistura reacional foi submetida a refluxo por 4 horas a 100°C e sob agitação magnética (Cannata, 2008) .

4.3.2 Análise pela Espectrometria de massas

Os intermediários foram identificados por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI/MS) Trap (Agilent-1100). As amostras foram inseridas no aparelho por infusão a um fluxo de 15 mL min⁻¹, com controle de carga no quadrupolo (ICC) ajustado para 30.000 e modo positivo. A temperatura do gás de secagem (N₂) foi de 325 °C e fluxo de 5 L min⁻¹, com potencial de extração de íons de -3.500 V.

4.4 Estudo de Ancoramento Molecular

4.4.1 Tratamento da proteína

Através do “*Protein Data Bank*” (PDB), sob o código 1C17 (Rastogi & Girvin, 1999), foi obtida a fração F₀ da enzima F₁F₀-ATP Sintase. Essa fração corresponde às subunidades *a* e *c*. A subunidade *a*, que é o alvo deste trabalho, foi recortada para a realização dos cálculos (Figura 6). O sistema de expressão foi a *Escherichia coli*.

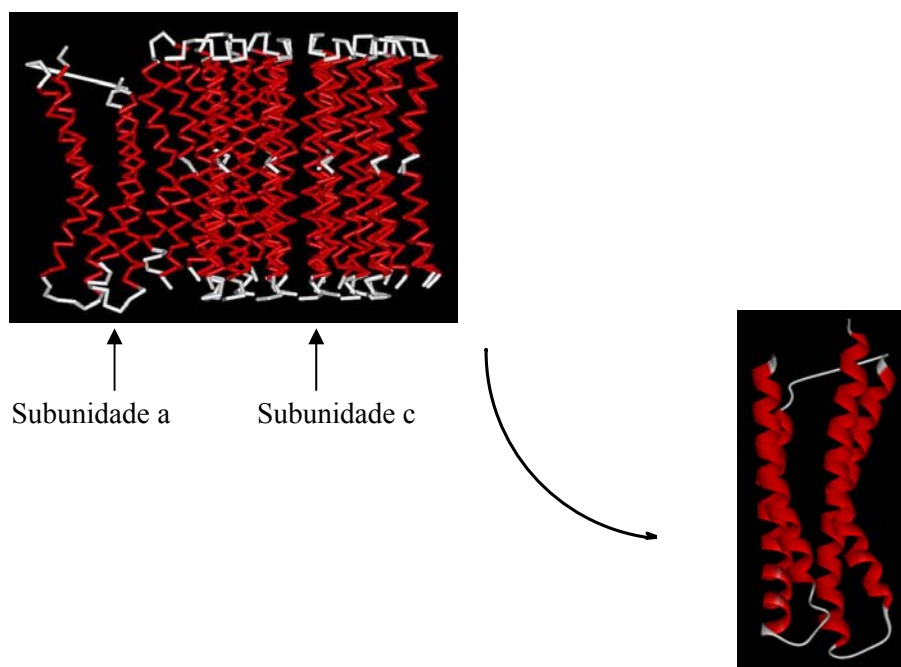


FIGURA 6 Fração F_0 completa obtida do PDB e a subunidade a recortada para o ancoramento

4.4.2 Ancoramento com as estruturas neutras e cátions

Os compostos otimizados na primeira etapa do trabalho foram exportados para o programa PC Spartan Pro (Hehre et al., 1999), para o cálculo de suas cargas parciais atômicas utilizando o método PM3.

Utilizou-se, para os cálculos das energias de ancoramento, o programa *Molegro Virtual Docker (MVD)*, em que cada ligante foi ancorado no sítio ativo da enzima. Nessa etapa, a identificação dos modos de interação do ligante é interativa e avalia um número de soluções (conformação e orientação do ligante) e estima a energia de suas interações com a proteína. As melhores soluções são retornadas para uma análise adicional (Ramalho et al., 2009).

As moléculas do ligante e de resíduos de aminoácidos perto do ligante são consideradas flexíveis durante a simulação de ancoramento. Assim, para melhores resultados, os resíduos próximos a 10 Å do ligante foram flexibilizados. Foi selecionada a melhor conformação de cada composto, conjuntamente com a energia de interação mais estável entre a posição do composto e a respectiva proteína.

4.5 Estudo do mecanismo de reação na enzima

No presente trabalho, a parte MM foi obtida dos resultados de ancoramento molecular. A conformação dos substratos e dos resíduos de aminoácidos da enzima F₁F₀-ATP Sintase obtida do ancoramento foi recortada de forma a deixar somente a parte que será utilizada nos cálculos de QM.

Os cálculos de QM foram efetuados no programa PC Spartan Pro. A região QM, a qual consiste de Ser 233, Gln 234, Asn 238, Leu 125, Leu 126 e His 132, ligações peptídicas vizinhas, átomos ligados e inibidor, tem um total de 104 átomos. As coordenadas iniciais para átomos de Ser 233, Gln 234, Asn 238, Leu 125, Leu 126 e His 132 e ligações peptídicas vizinhas foram tomadas da estrutura do cristal.

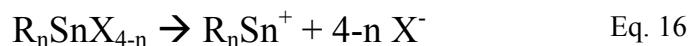
Com as conformações dos cátions provenientes dos resultados de ancoramento, a curva de energia potencial foi obtida utilizando o método PM3, variando o comprimento de ligação entre a His 132 e o átomo de estanho de cerca de 0,25 Å.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção está dividida em quatro partes: a primeira discute os perfis de energia potencial dos compostos e sua possível contribuição para a atividade biológica; a segunda parte descreve um estudo cinético de uma reação entre o dicloreto de difenilestanho e o ácido acético, com caracterização por Espectrometria de Massas. A terceira descreve modelos de ancoramento de nossos compostos com a subunidade *a* da ATP Sintase de *E.coli*; e a última trata do mecanismo de reação no sítio ativo da subunidade *a*.

5.1 Perfil da energia de ativação

A primeira parte do trabalho é baseada no estudo das superfícies de energia potencial dos compostos em estudo. A intenção é verificar se existe uma etapa de ativação associada à formação dos cátions R_nSn^+ . Essas espécies químicas poderiam ser mais bem reconhecidas pela enzima, tendo em vista que a ATP Sintase é ativada somente pela entrada de prótons na subunidade *a*. Como já foi mencionado, recentes estudos de Pellerito et al. (2006) sugerem que a espécie que causa a inibição de ATP no organismo-alvo pode ser um cátion formado a partir da dissociação do grupo de saída aniônico. Portanto, investiga-se a barreira de energia envolvida na dissociação do grupo X (Equação 16).



A etapa para a dissociação do grupo abandonador X pode ser catalisada com a protonação da ligação Sn-X, visto que a ligação Sn-X é polarizada.

Com a finalidade de avaliar o perfil cinético, foram construídas superfícies de energia potencial para os compostos organoestânicos estudados. Os cálculos foram realizados utilizando estruturas neutras e protonadas, ou seja, incluiu-se um próton fazendo ligação com o átomo da espécie aniônica ligado ao

estanho. Com isso, pode-se avaliar se ocorre um decréscimo nas energias de ativação, evidenciando a etapa de formação do cátion de interesse que pode passar pela protonação do grupo X. Os estados de transição e intermediários foram caracterizados por frequências imaginárias, baseados em cálculos de infravermelho (Baboul & Schlegel, 1997).

A Tabela 1 apresenta as energias dos estados de transição calculados nos métodos semiempírico e DFT.

TABELA 1 Energias dos estados de transição calculados pelos métodos DFT e semiempírico (PM3) em espécies neutras e protonadas dos compostos organoestânicos estudados e algumas das respectivas atividades biológicas.

Composto	$\Delta E^\#$ (kcal.mol ⁻¹)				Atividade Biológica (MIC)
	Neutro		Protonado		
	PM3	DFT	PM3	DFT	
1	44,13	29,26	9,18	-2,04	3,9 ^c
2	62,42	50,38	2,55	-0,64	
3	66,50	62,50	9,68	17,82	0,5 ^a ; 9,4 ^c
4	54,52	68,82	14,93	10,17	2 ^a
5	60,53	70,36	17,56	13,04	
6	41,40	51,61	14,99	1,39	
7	39,88	25,27	9,03	-3,02	4,3 ^c
8	55,69	41,48	13,05	8,40	
9	40,28	22,38	12,07	-5,20	10 ^b
10	47,99	33,57	12,93	2,87	16,5 ^c
11	53,67	36,65	14,15	9,89	
12	45,62	27,35	7,22	-0,21	5 ^b
13	45,06	28,76	15,11	3,44	
14	46,10	28,80	17,66	-2,46	

^a mgL⁻¹ (Wharf et al., 1997; Wharf, 2000); ^b μM (Ballmoos et al., 2004);

^c mmol⁻¹ (Hadi et al., 2008).

Krishnamoorthy et al. (2006) realizaram estudos de reações entre organoestânicos e calcularam as energias de ativação utilizando os métodos PM3

e DFT (HCTH com função de base LANL2DZ). Tanto o método PM3, quanto o DFT descreveram bem o comportamento termodinâmico e cinético da reação.

De acordo com a Tabela 1, tanto para o método PM3, quanto para o método DFT, pode-se observar claramente uma barreira de ativação menor, associada às espécies protonadas, quando se compara com os compostos neutros. Portanto, acredita-se que uma etapa de ativação poderia ocorrer, levando à formação de moléculas carregadas antes da reação com a proteína. Os valores de energia de ativação foram reduzidos, em média, cerca de 70-75%, quando comparados com os compostos neutros. Em consonância com isso, pode-se notar que uma etapa de protonação de compostos organoestânicos poderá enfraquecer a ligação Sn-X. A redução na barreira de ativação é tão drástica, que foram obtidos valores negativos para a energia de ativação. Deve-se ter em mente, contudo, que esses valores não têm significado físico, mas revelam que o processo de ativação é muito eficiente e nossa metodologia teórica utilizada não é suficientemente acurada para obter valores exatos. O modelo PM3 tem suas limitações, mas como mostrado em outras publicações, pelo menos para os complexos menores, essa metodologia não introduz quaisquer modificações no mecanismo, mas apenas estuda a energética das reações (Stewart, 1989; Mancuso & McEachern, 1997).

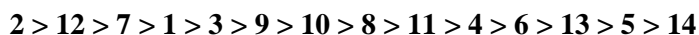
Fazendo uma correlação linear entre os dados de atividade disponíveis (Hadi et al., 2008) e as energias de ativação para os compostos neutros e protonados, pode-se observar uma melhor correlação linear entre as energias de ativação quando se protona a ligação Sn-X ($R^2 = 0,91$), em comparação às estruturas neutras ($R^2 = 0,11$).

Ao se comparar também os dados de atividade biológica dos estudos de Wharf (1997), Wharf (2000) e Ballmoos et al. (2004) com as energias de ativação das espécies protonadas pelo método PM3, verifica-se que elas também se correlacionam.

Em outro estudo, realizado por Rehman et al. (2005, 2008), verifica-se uma tendência de inibição tanto em fungos, quanto em *E. coli*. Os autores concluíram que di- e trifenilestanho (IV) são mais ativos do que os outros e os derivados trifenilestanho são mais eficazes do que os derivados difenilestanho. A tendência das atividades biológicas dos organoestânicos (IV) é mostrada a seguir:

Ph_3SnX e $\text{Ph}_2\text{SnX}_2 \gg \text{n-Bu}_3\text{SnX} > \text{n-Bu}_2\text{SnX}_2 > \text{Et}_3\text{SnX} > \text{Me}_3\text{SnX}$, sendo $\text{Ph}_3\text{SnX} > \text{Ph}_2\text{SnX}_2$

Comparando com os valores de energia apresentados na tabela 1, observa-se que, com algumas exceções, a tendência se mantém quando se atenta para as energias calculadas para os compostos protonados, o que reforça nossa hipótese de que há uma etapa de ativação envolvida na formação do cátion. A ordem das energias está mostrada a seguir:



Assim, o mecanismo da reação, bem como as energias relativas, pode ser bem estabelecidos com esse modelo teórico. O gráfico a seguir (Figura 7) mostra o perfil de energia de potencial de um de nossos compostos (6), o 1,2,4-triazol de tricloexilestanho, popularmente conhecido como Azocyclotin[®].

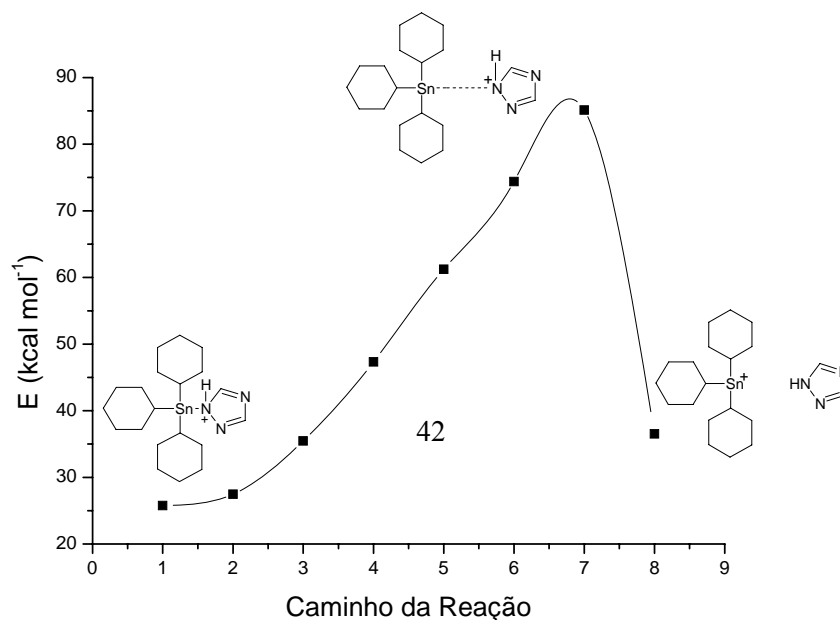


FIGURA 7 Gráfico do perfil de energia potencial do composto 6.

Na literatura, verifica-se que o grau de lipofilicidade contribui na atividade dos organoestânicos (Baul, 2008). Esse grau de lipofilicidade pode ser determinado pelo coeficiente de partição octanol: água (LogP). Com isso, foram feitas predições de valores de LogP para os compostos utilizando o software online ADME/Tox Web (Didziapetris et al., 2006). Em um primeiro momento, foram feitos alguns cálculos de logP (coeficiente de partição) para os compostos organoestânicos, a fim de compará-los com resultados experimentais e validar a estratégia teórica utilizada. A comparação entre os dados teóricos e experimentais do coeficiente de partição (Powers & Beavis, 1991) indica que o software pode ser usado para calcular os parâmetros de hidrofobicidade dos compostos organoestânicos. O coeficiente de correlação (R^2) obtido entre os dados experimentais e teóricos foi igual a 0,997 (Tabela 2 e Figura 8).

TABELA 2 LogP de alguns organoestânicos obtidos experimentalmente (Powers & Beavis, 1991) e calculados pelo programa ADME/Tox Web.

Composto	LogP (Experimental)^a	LogP (Calculado)
Cloreto de Trimetilestanho	-0,30	-0,79
Cloreto de Trietilestanho	0,57	0,65
Cloreto de Tripropilestanho	1,72	2,12
Cloreto de Tributilestanho	3,11	3,58
Cloreto de Trifenilestanho	4,08	5,10

^a Powers & Beavis, 1991

Os compostos utilizados como conjunto de teste representam de forma significativa toda a classe dos organoestânicos, visto que os derivados de

trimetil, trietil, tripropil, tributil e trifenilestanho são os mais comercializados hoje. Além disso, servem como ponto de partida para a síntese de outros complexos. O objetivo foi, também, avaliar a influência do aumento do número de carbonos na hidrofobicidade sem alterar a natureza do grupo aniônico, o que se verifica é que aumentando o número de carbonos, aumenta o valor de LogP, e conseqüentemente, o grau de hidrofobicidade. Isso considerando que todos eles são derivados de organoestânicos trissubstituídos.

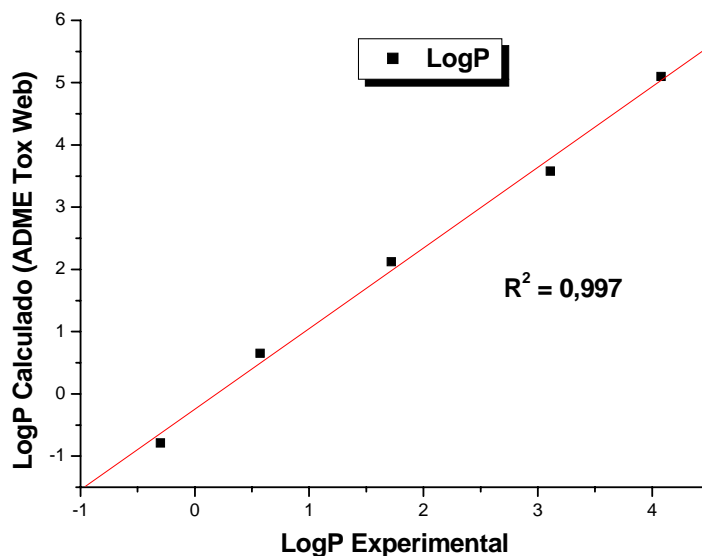


FIGURA 8 Gráfico da correlação linear entre os valores de LogP experimental e LogP calculado

Na tabela 3 apresentam-se os valores do coeficiente de partição com alguns dados de atividade biológica.

Pode-se verificar que os compostos que possuem maiores coeficientes de partição são aqueles que possuem somente anéis aromáticos em sua estrutura, o que corrobora com o fato de que quanto mais carbonos, maior o caráter hidrofóbico (Baul, 2008). O composto **6** é formado por três anéis cicloexilas. Portanto, poderia prever que ele possuiria um coeficiente semelhante aos compostos **1-5**.

TABELA 3 LogP de alguns organoestânicos obtidos experimentalmente (Powers & Beavis, 1991) e calculados pelo programa ADME/Tox Web e suas respectivas atividades biológicas.

Composto	Atividade Biológica (MIC)	LogP	
		Experimental	Teórico
1	3,9 ^c	4.08 ^d	5.10
2			4.93
3	0,5 ^a ; 9,4 ^c		5.00
4	2 ^a		5.14
5			6.12
6			5.80
7	4,3 ^c		3.55
8			3.63
9	10 ^b	3.11 ^d	3.58
10	16,5 ^c		0,90
11			3.80
12	5 ^b		3.33
13		0.57 ^d	0.65
14		-0.30 ^d	-0.79

^a mgL⁻¹ (Wharf et al., 1997; Wharf, 2000); ^b μM (Ballmoos et al., 2004);
^c mmol⁻¹ (Hadi et al., 2008).

Comparando-se com valores de atividade, observa-se que há algumas discordâncias, como, por exemplo, entre os compostos **9** e **12**. Os dois possuem coeficientes parecidos; entretanto o **12** apresenta uma atividade maior. Com esses dados, pode-se dizer que os dois compostos podem ter absorção semelhante pelo organismo; porém, a formação da espécie ativa de um é mais rápida ou mais eficiente que o outro.

Em face disso, pode-se inferir que a hidrofobicidade pode contribuir de alguma forma para a atividade, mas somente em termos de absorção pelo organismo. Na verdade, a hidrofobicidade tratada isoladamente não determina a atividade biológica.

5.2 Estudo da cinética de reação

De modo a identificar o comportamento dos compostos organoestânicos em solução, foi realizada uma reação-modelo entre o dicloreto de difenilestanho (**7**) e ácido acético. O ácido acético foi escolhido, pois sendo ele um ácido orgânico, simularia resíduos de aminoácidos presentes na entrada da subunidade *a*.

De acordo com os espectros da Figura 9, pode-se observar que, após 15 minutos de reação, um forte sinal correspondente à razão $m/z = 309$ foi detectado devido à reação de hidrólise. Pode-se assim, identificar um intermediário formado pela reação entre as moléculas de solvente e os organoestânicos. Pelos resultados deste trabalho, infere-se que a ruptura da ligação Sn-X resulte em vacâncias no átomo de Sn, as quais podem ser ocupadas por moléculas de água. O complexo organoestânico com novas moléculas de solvente é instável ($m/z = 309$), pois as moléculas de água são bastante lábeis. Na verdade, é evidente que os complexos de estanho dessa natureza têm uma forte tendência a perder as moléculas de água, a fim de, eventualmente, obter a situação mais estável, por exemplo, o fragmento $m/z = 333$. Um exame mais detalhado das geometrias resultantes mostrou que o complexo de Sn com água

foi deformado com moléculas de água mais distantes do átomo de Sn, aumentando o grau de polaridade.

O sinal correspondente a $m/z = 333$ (acetato de difenilestanho) foi detectado principalmente até 2 horas de reação, sugerindo uma ligeira remoção desse composto. Portanto, a reação de hidrólise leva a maior atividade catalítica para os organoestânicos. Na verdade, a partir da Figura 9, o aumento do número de intermediários de reação pode ser claramente observado após 4 horas. Em contrapartida, a reação química entre organoestânicos e ácido acético só ocorre após a formação de $m/z = 309$. Com base nos resultados, propõe-se que a reação seja iniciada com a ativação dos compostos organoestânicos por moléculas de água, seguida pela formação de um intermediário-chave, que reage com ácido acético. O método ESI-MS, que raramente é usado para o estudo de soluções aquosas de compostos inorgânicos, possibilita uma maior especificidade sobre a natureza das espécies contidas na solução, bem como sobre o seu mecanismo de fragmentação. Esse método também identifica a espécie intermediária com um tempo de vida muito curto, como os complexos ativados, tais como espécies $m/z = 309$. Salienta-se também que testes de acidez com o sobrenadante do meio reacional indicaram um ligeiro abaixamento do pH, o que pode ser HCl formado na síntese.

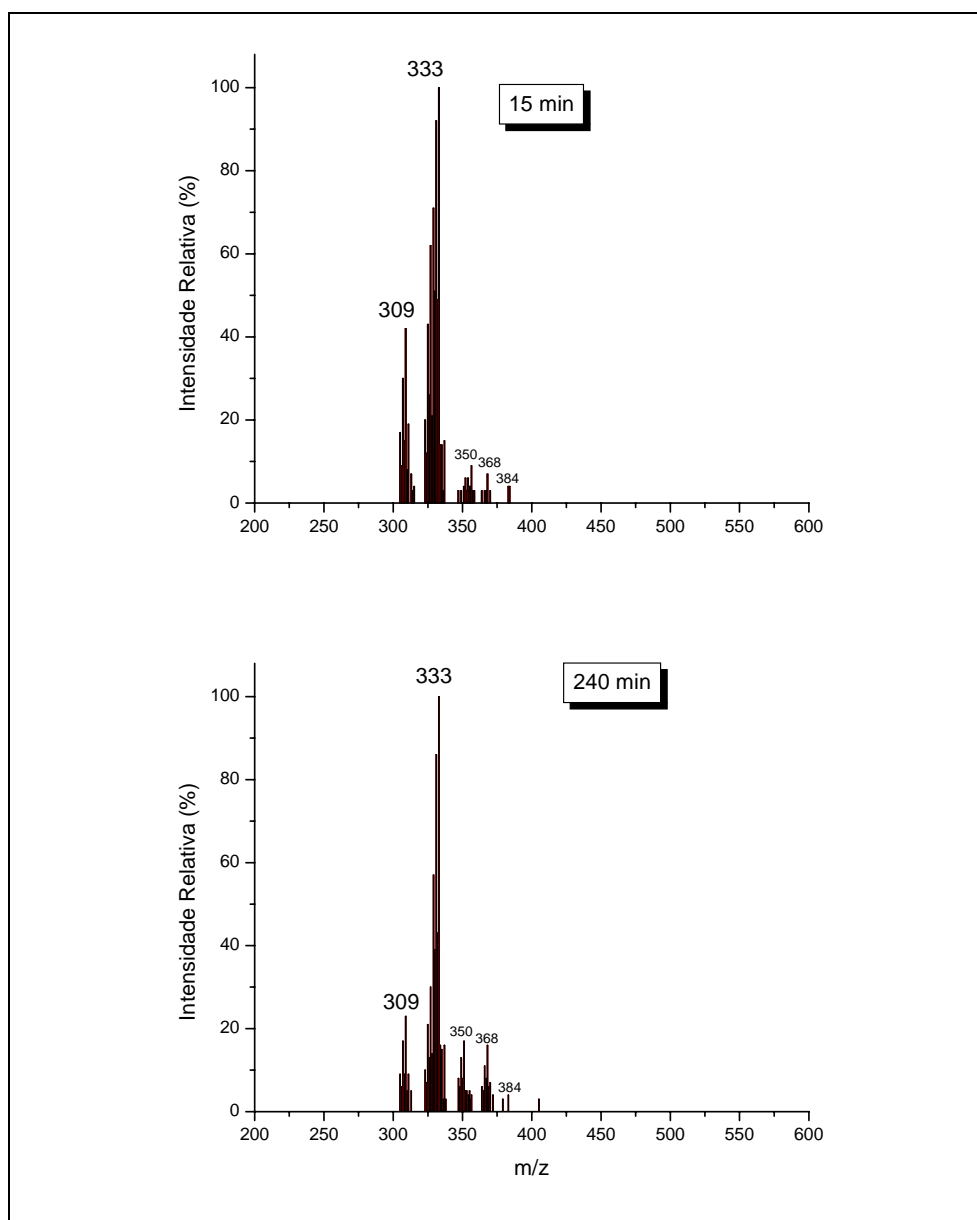


FIGURA 9 Espectros de massas no modo íon positivo para o acompanhamento da reação química em diferentes instantes na reação.

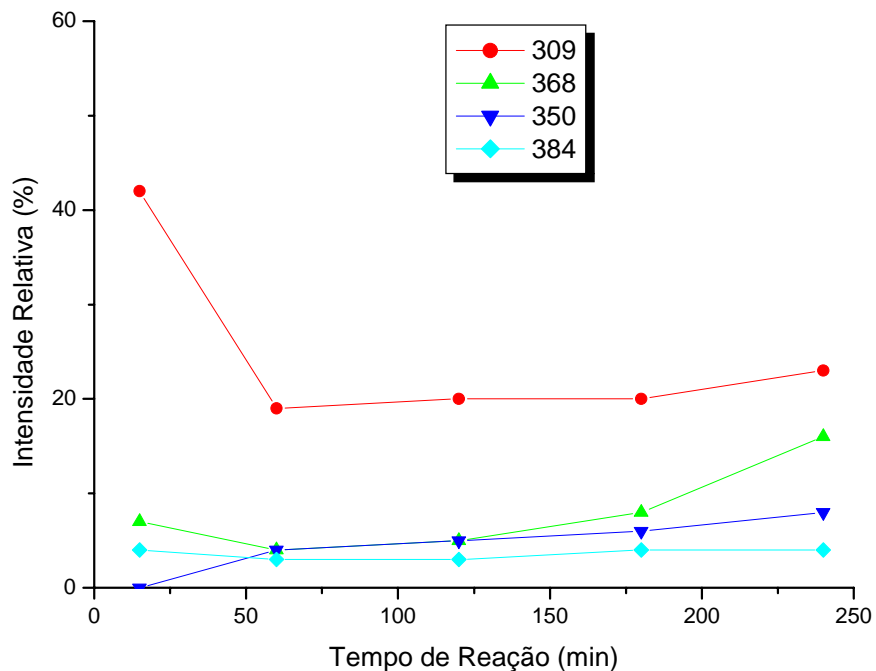


FIGURA 10 Intensidade relativa dos principais intermediários formados ao longo da reação

O gráfico acima (Figura 10) corresponde aos intermediários que possuíram maiores intensidades nos espectros de massas ao longo do tempo. Pode-se notar que o intermediário principal ($m/z = 309$), aos 15 minutos de reação, apresenta intensidade relativamente grande, se comparado aos outros, e que, a partir da primeira hora de reação, começa a cair e ficar constante, ao passo que os intermediários ($m/z = 350$ e $m/z = 368$) vão aumentando ao longo da reação. Com isso, infere-se que esses três intermediários correlacionam-se de forma que para se chegar ao produto, passa pelo intermediário-chave ($m/z = 309$), que após essa etapa, passa pelo intermediário $m/z = 350$, que conduz ao

intermediário $m/z = 368$. Pode-se notar também que a reação entre o ácido acético e o dicloreto de difenilestanho parece ocorrer bem rapidamente, visto que o intermediário de razão $m/z = 350$ já aparece nos primeiros 15 minutos, mesmo com uma intensidade de 1%. Também surge um pico na região de $m/z = 384$, que pode ser um caminho alternativo da reação. Entretanto, como esse sinal aparece com baixa intensidade, a reação não ocorre majoritariamente por esse caminho. O mecanismo proposto, baseado nessas informações, está representado a seguir (Figura 11).

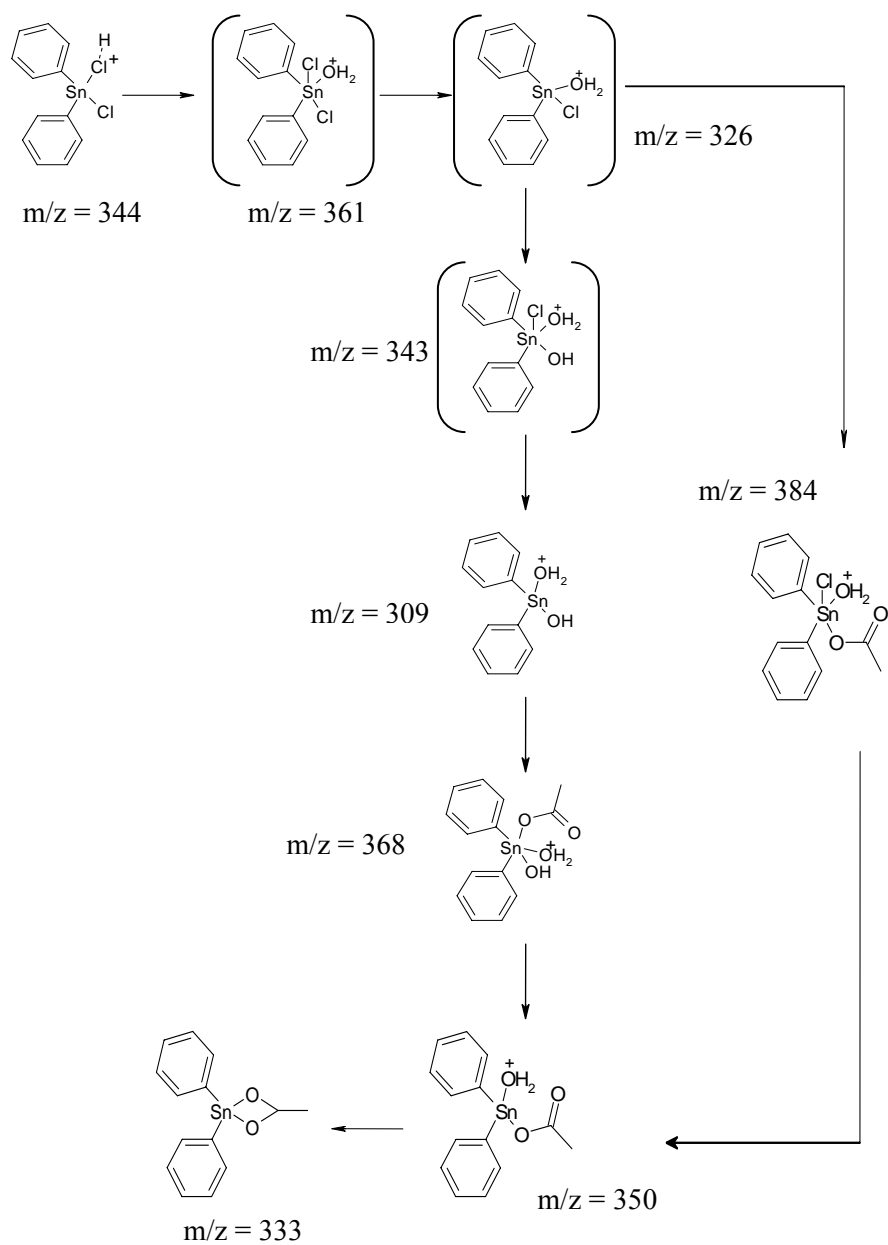


FIGURA 11 Mecanismo de proposto para a reação de hidrólise do dicloreto de difenilestanho em ácido acético.

O mecanismo proposto assemelha-se a um mecanismo de substituição bimolecular (Domingos et al., 2003). Como se trata de compostos organometálicos, esse mecanismo é denominado de mecanismo associativo, ou seja, a espécie formada no ataque do nucleófilo sobre o átomo de estanho tetraédrico é pentacoordenada com geometria do tipo bipirâmide trigonal, sendo essa espécie um intermediário ou um estado de transição. Como os compostos organoestânicos pentacoordenados são relativamente estáveis, pode haver essa alternância entre as geometrias tetraédricas e bipiramidais.

Como foi explicado, pode-se ter dois caminhos distintos para essa reação, sendo um majoritariamente devido à proporção dos sinais dos intermediários. O intermediário de razão $m/z = 384$ possui um impedimento estérico maior, se comparado aos outros, visto que há a entrada de um grupo acetato e a presença do cloro pronto para sair da molécula. Assim, o mecanismo associativo foi observado experimentalmente com os resultados de espectrometria de massas.

Dessa forma, pelos resultados, infere-se que os compostos organoestânicos em solução podem sofrer hidrólise, formando um intermediário-chave.

5.3 Estudo do Ancoramento Molecular

5.3.1 Ancoramento com o derivado da hidrólise da reação modelo

Com base no trabalho de Ballmoos et al. (2004), que sugere que a ação de compostos organoestânicos ocorre na enzima F_1F_0 -ATP Sintase. Nesse trabalho, os autores também afirmam que os prótons que ativam a enzima entram solvatados e que essa estrutura de solvatação seria quebrada por uma rede de aminoácidos, ainda desconhecidos. Portanto, diante disso, fez-se o ancoramento do produto de hidrólise gerado pela reação entre o ácido acético e o dicloreto de difenilestanho, no intuito de sugerir alguns aminoácidos que podem participar dessa rede. Levou-se em consideração a proximidade do resíduo com o ligante e as ligações hidrogênio presentes.

Um algoritmo de predição da cavidade baseado em uma caixa 3D foi usado para gerar o sítio de ligação da F_1F_0 -ATP Sintase usando o programa *Molegro Virtual Docker* (Thomsen & Christensen, 2006). O volume calculado da cavidade foi de $209,82 \text{ \AA}^3$ e está representada na Figura 12, juntamente com o derivado da hidrólise da reação do composto modelo.

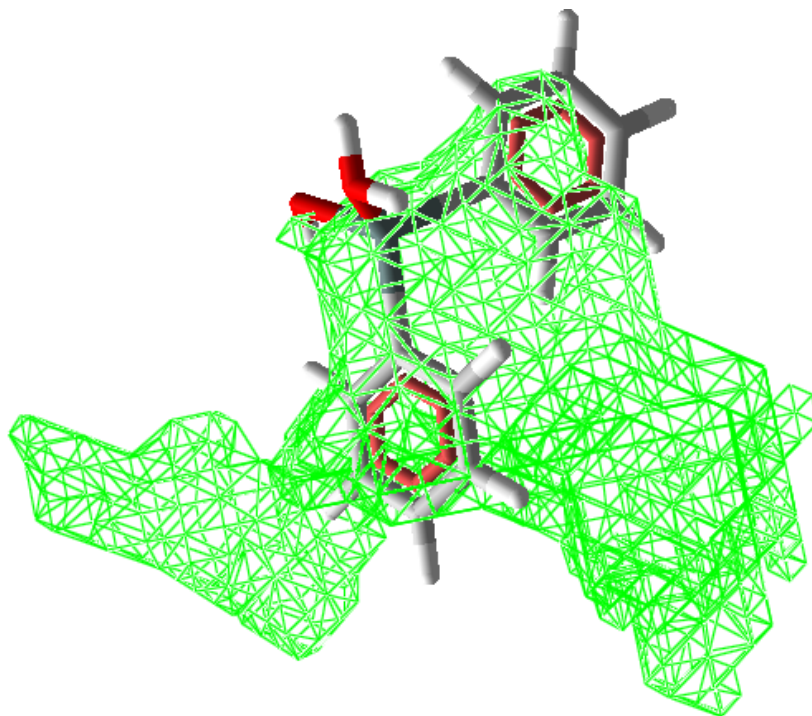


FIGURA 12 Intermediário dentro da cavidade correspondente ao sítio ativo

Pode-se verificar que o estanho localiza-se dentro da cavidade com os grupos hidrofílicos orientados para fora da cavidade. Como poderá ser visto adiante, esses grupos estão localizados próximos a aminoácidos de alta hidrofílicidade. Os dois anéis aromáticos também estão orientados a ficar para fora da cavidade e estão localizados próximos à região de alta hidrofobicidade.

As interações que esse intermediário realizou com a enzima estão apresentadas na tabela 4.

TABELA 4 Principais ligações hidrogênio (distância em Å e energia em kcal/mol) entre o ligante e a F₁F₀-ATP Sintase, os valores de energia eletrostática intermolecular (kcal/mol) e de ligação hidrogênio total (kcal/mol).

Resíduos	Distância (Å)	Energia (kcal/mol)	Energia ligação hidrogênio total (kcal/mol)	Energia Intermolecular (kcal/mol)
Ser 233	2,76	-2,5		
Gln 234	2,41	-0,93	-3,81	-95,60
Asn 238	2,82	-0,38		

Verificou-se que a molécula de água e a hidroxila que coordenam com o átomo de Sn interagem por meio de ligações hidrogênio com os resíduos de aminoácidos Ser 233, Asn 238 e Gln 234. Como foi dito, esses grupos estão orientados para fora da cavidade. Com isso, além de estarem voltados para uma região fortemente hidrofílica, favorecem essas interações. Além disso, a parte hidrofóbica (anel aromático) do intermediário m/z = 309 (Figura 11) interage com a nuvem π do anel imidazólico da His 132. Essas interações podem ser atrativas ou repulsivas. A seguir, a tabela 5 apresenta, quantitativamente, essas interações do ligante com a histidina.

TABELA 5 Interações hidrofóbicas (distância em Å e energia em kcal/mol) entre o ligante e o resíduo de His 132.

Resíduo	Distância (Å)	Energia (kcal/mol)
His 132	4,21	-0,18
	3,43	-0,27
	3,92	0,086
	3,84	0,09
	4,30	0,073

Deve-se ressaltar que moléculas de água coordenadas ao estanho são lábeis. Assim, os resíduos de aminoácidos Ser 233, Asn 238 e Gln 234 podem estar envolvidos no processo de remoção dessas moléculas de água, gerando espécies químicas, tais como R_3Sn^+ . Posteriormente, essas espécies podem interagir com os resíduos de aminoácidos presentes no filtro de seletividade do canal iônico de uma subunidade da ATP sintase. Nota-se também uma proximidade do ligante com resíduos de leucina (Leu 125 e Leu 126), que são hidrofóbicos. Não ocorre nenhuma interação eletrostática entre o ligante com esses aminoácidos (Figura 13). Mas devido à proximidade entre eles, sugere-se que há uma participação no que se diz respeito ao impedimento estérico, por exemplo.

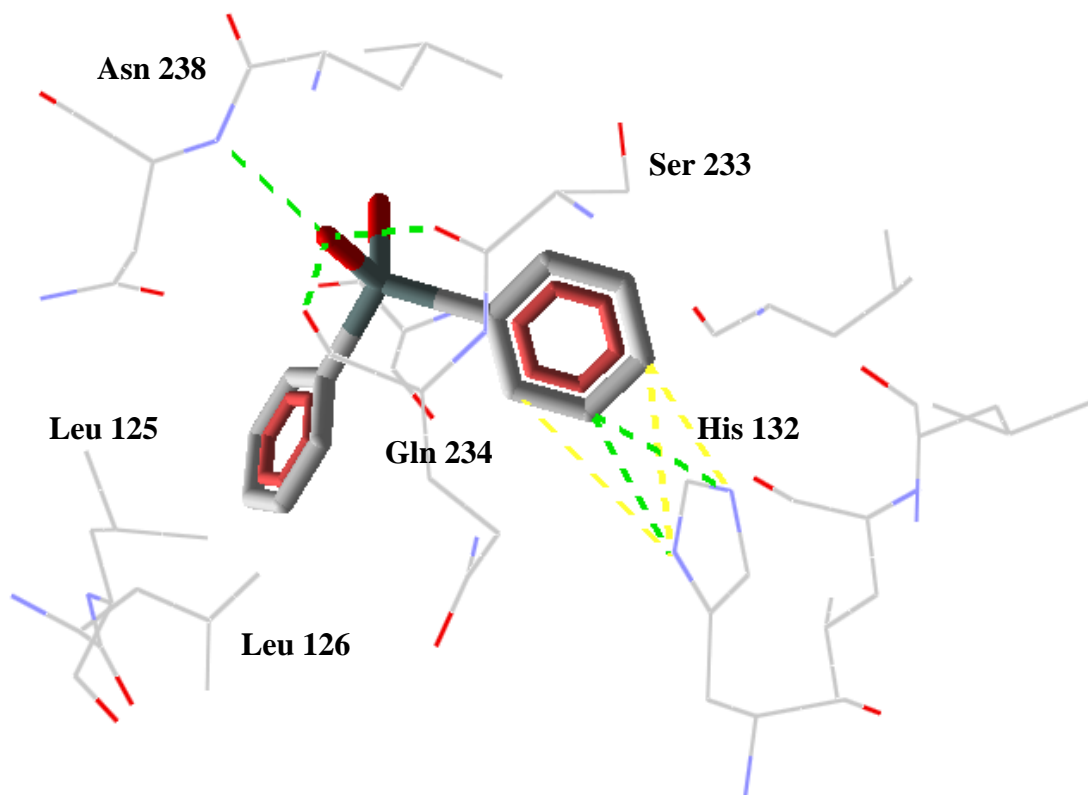


FIGURA 13 Ligações hidrogênio entre o intermediário com a subunidade *a* da F₁F₀-ATP Sintase.

Também foram feitos cálculos para determinar a superfície eletrostática no sítio ativo, no intuito de saber se o ligante localiza-se em uma região de alta hidrofiliabilidade ou hidrofobicidade. Analisando a superfície eletrostática da subunidade *a*, verifica-se que próximo ao sítio ativo, há regiões hidrofílicas, mas há a predominância de regiões hidrofóbicas. O ligante encontra-se na interface entre essas regiões, com o grupo hidroxila e as moléculas de água voltadas para

a região hidrofílica e a cadeia carbônica voltada para região hidrofóbica (Figura 14).

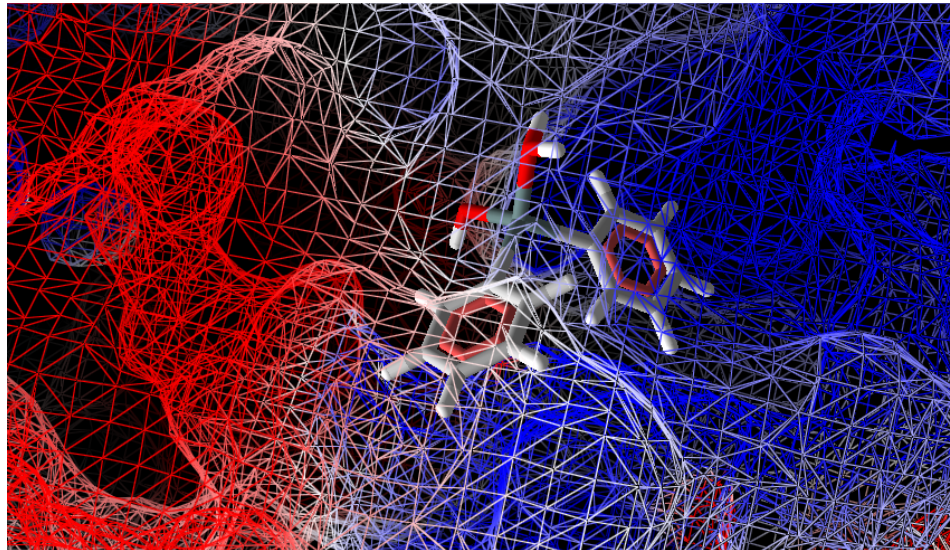


FIGURA 14 Superfície eletrostática da região do sítio ativo da subunidade *a* da F_1F_0 -ATP Sintase de *Escherichia coli*. Em vermelho, regiões hidrofílicas e em azul, regiões hidrofóbicas.

A região hidrofóbica próxima ao sítio ativo da subunidade *a* é composta por resíduos dos aminoácidos Leucina (Leu 125, 126, 134, 136 e 237), Isoleucina (Ile 129 e 223), Valina (Val 133 e 141) e Glicina (Gly 135). Já a região hidrofílica é composta pelos resíduos dos aminoácidos Prolina (Pro 122 e 137), Tirosina (Tyr 128), Alanina (Ala 130 e 138), Glutamato (Glu 131), Histidina (His 132), Arginina (Arg 140), Serina (Ser 144 e 233), Glutamina (Gln 234) e Asparagina (Asn 238). Interessante ressaltar que, somente próximo ao sítio ativo, há uma região fortemente hidrofílica. Além disso, os resíduos de Glu 131, His 132 e Ala 130 estão orientados no que seria a entrada do canal. Como são aminoácidos carregados negativamente, podem iniciar o processo de translocação do próton na enzima (Dimroth et al., 2000).

5.3.2 Ancoramento com compostos neutros

Foram feitos cálculos de ancoramento molecular com os compostos envolvidos neste estudo, a fim de verificar as interações que fazem com a proteína, para poder sugerir um modelo teórico de inibição. A tabela a seguir apresenta todas as interações que foram encontradas nos cálculos para os 14 compostos deste estudo:

TABELA 6 Principais interações eletrostáticas e hidrofóbicas (distância em Å e energia em kcal/mol) entre os ligantes e a subunidade *a* da F₁F₀-ATP Sintase e os valores de energia intermolecular (kcal/mol).

Composto	Resíduos	Distância (Å)	Energia (kcal/mol)	E. Inter. (kcal/mol)	Atividade Biol.
1	His 132	4,18	-0,087	-111,61	3,9 ^e
		2,70	-2,78		
		4,18	-0,83		
		3,54	-0,31		
		4,24	-1,13		
		3,87	-0,86		
		4,22	-0,10		
		4,01	3,05		
		Glu 131	4,42		
	3,59		0,17		
	4,18		0,087		
	2	His 132	3,68	-0,22	-110,28
3,62			-0,29		
4,15			-0,17		
3,74			-0,27		
4,30			-0,04		
4,17			-0,56		
3,00			-0,09		
3,12			-0,53		

...continua...

TABELA 6, Cont.

		4,33	-0,09		
		3,98	-0,25		
		3,53	-0,044		
		4,44	-0,80		
		4,21	-1,81		
	His 132	3,57	-0,043		
		4,06	-0,96		
		2,58	-4,84		
3		4,27	-1,15	-117,6	0,5 ^a ; 9,4 ^c
		3,76	3,95		
		3,93	0,20		
		4,29	-0,17		
	Glu 131	4,41	0,32		
		3,63	0,47		
		4,39	0,022		
		4,10	-0,30		
		4,46	-0,25		
		3,78	-0,011		
		3,49	-0,012		
	His 132	4,13	-0,91		
		4,14	-1,67		
		2,56	-4,38		
4		2,96	-2,95	-134,98	2 ^a
		4,17	-0,025		
		3,99	3,2		
		3,15	3,57		
		4,22	0,025		
	Glu 131	4,39	0,056		
		3,57	0,36		
		3,97	-0,086		
		3,82	-0,25		
5		3,80	-0,094	-186,2	
	His 132	4,46	-0,24		
		3,25	-0,035		

...continua...

TABELA 6, Cont.

		3,49	-0,031		
		4,21	-0,91		
	Arg 140	3,95	-0,41		
		4,31	-0,022		
		3,25	-0,039		
		2,74	-4,05		
	His 132	4,19	-1,75		
		4,26	0,24		
6		3,94	0,28		
		3,96	0,42		-127,61
		2,96	3,38		
		3,56	-0,29		
	Glu 131	4,45	0,069		
		4,10	0,12		
		4,08	-0,1		
		3,97	-0,15		
		3,81	-0,11		
	His 132	4,30	-0,14		
		3,38	-0,21		
		4,42	-0,014		
		3,52	-0,17		
		4,06	-0,98		
		2,69	0,14		
7		3,75	1,15		
		3,88	0,076		-91,7
	Glu 131	3,98	0,064		4,3 ^c
		4,49	0,80		
		4,36	0,06		
		3,90	0,17		
	Arg 140	3,79	-0,24		

...continua...

TABELA 6, Cont.

8	His 132	3,97	-0,48				
		3,86	-0,51				
		3,94	-1,64				
		4,26	-1,52				
		3,71	-0,44				
		4,24	-1,46				
		2,15	-5,71				
		4,03	0,38				
		3,17	0,61				
		4,31	3,89			-121,0	
	3,16	3,15					
	Glu 131	3,75	-0,02				
		3,17	-0,21				
2,65		0,70					
4,49		1,18					
Arg 140	4,49	0,014					
9	His 132	4,10	-1,07				
		3,52	-1,45				
		4,39	-0,41				
		2,92	-0,93				
		3,95	1,85			-82,32	<i>10^b</i>
	4,25	0,33					
	Glu 131	4,44	-0,097				
3,33		-0,087					
10	His 132	4,44	-0,05				
		4,27	-0,11				
		3,81	-0,14			-69,71	<i>16,5^c</i>
		3,64	-0,86				
		4,19	0,47				
		3,75	0,58				
11		3,75	-0,49				
		2,44	-4,46				

...continua...

TABELA 6, Cont.

		3,54	-2,53		
		3,84	-1,82		
	His 132	4,20	-1,51	-97,9	
		4,24	-1,77		
		4,35	-1,42		
		3,49	2,69		
		3,92	3,78		
		4,14	2,10		
		4,29	-0,79		
		3,29	-1,29		
		4,14	-0,002		
12	His 132	4,02	-0,86	-120,85	5 ^b
		4,18	-0,002		
		3,35	0,54		
		3,30	1,82		
		4,23	1,11		
		4,30	-0,97		
13	His 132	3,88	0,096	-50,65	
		4,39	0,075		
		3,85	-1,18		
14	His 132	3,39	-0,75	-32,1	
		4,32	1,4		

^a mgL^{-1} (Wharf et al., 1997; Wharf, 2000); ^b μM (Ballmoos et al., 2004);
^c $mmol^{-1}$ (Hadi et al., 2008).

Analisando o ancoramento com as espécies neutras, verificou-se que quanto maior for o grupo X, ou quando esse grupo for composto por átomos aceptores de ligação hidrogênio, a energia intermolecular é mais intensificamente minimizada e, conseqüentemente, apresenta maior estabilidade dentro da proteína. Isso é verificado de forma mais evidente nos compostos **4**, **5**, **11** e, principalmente, o **8**, a presença de 2 grupos acetatos diminui consideravelmente a energia, devido à formação de ligações hidrogênios entre ligante-proteína. Também se pode verificar que há uma predominância das interações eletrostáticas e hidrofóbicas sobre as ligações hidrogênio. Isso é fato, pois a subunidade *a* é praticamente hidrofóbica, exceto em uma pequena região próxima ao sítio ativo. Além disso, todos os compostos fazem interações eletrostáticas com o resíduo de His 132, o que sugere que ele seja um dos aminoácidos-chave para a inibição dos organoestânicos, juntamente com os outros que participam da quebra da estrutura de solvatação.

Alguns compostos também realizaram ligações hidrogênio com os aminoácidos do sítio ativo: Leu 126, His 132, Ala 138, Ser 233 e Gln 234. As energias das ligações de hidrogênio dos compostos com as respectivas distâncias em relação aos aminoácidos estão indicadas na tabela 7.

TABELA 7 Principais ligações hidrogênio (distância em Å e energia em kcal/mol) entre os ligantes e a subunidade α da F₁F_o-ATP Sintase e de ligação hidrogênio total (kcal/mol).

Composto	Resíduos	Distância (Å)	E. Interações de hidrogênio (kcal/mol)	E. ligação hidrog. total (kcal/mol)
3	His 132	2,55	-1,14	-1,14
	His 132	2,56	-1,04	
4		2,96	-2,05	-4,65
	Gln 234	3,43	-0,18	
		3,07	-1,38	
8	His 132	2,15	-1,30	
	Gln 234	3,34	-0,61	-2,04
	Leu 126	3,27	-0,13	
11	His 132	3,54	-0,027	
		2,44	-0,6	
	Ser 233	3,34	-1,28	-2,05
	Ala 138	3,03	-0,14	

Fazendo a correlação entre as energias de ancoramento com dados de atividade biológica segundo Hadi et al. (2008), verificamos um $R^2 = 0,64$.

Analizando os outros estudos, foram observadas discordâncias. Nos estudos de Wharf (2000) e Rehman et al. (2005, 2008), o composto **3** mostrou-se mais ativo que o **4**; entretanto, as energias de ancoramento mostram o contrário,

ou seja, o composto **4** mostrou-se mais estável que o **3** (Figura 15). O composto **8** possui 3 interações a mais com His 132 do que seu análogo (composto **7**), além de ter ligações hidrogênio (Figura 16). Também verificamos que ele apresenta mais ou o mesmo número de interações eletrostáticas e hidrofóbicas que os compostos trissubstituídos (compostos **1-5**). Isso pode ser explicado pela presença de 2 grupos acetatos ligados à sua estrutura. Consequentemente, a energia de ancoramento foi superior que outros derivados trifenilestanho, apresentando uma diferença de energia de 3,4 kcal/mol maior que o hidróxido de trifenilestanho (**3**) e 10,72 kcal/mol para o hidreto de trifenilestanho (**2**). Outra discordância ocorre com o composto **11**. O diacetato de dibutilestanho possui uma diferença de energia de cerca de 6,2 kcal/mol mais estável que o dicloreto de difenilestanho (**7**) e 14,78 kcal/mol mais estável que o cloreto de tributilestanho (**9**) e 28,1 kcal/mol de um análogo, o dicloreto de dibutilestanho (**10**). A explicação para isso é a presença de 2 grupos acetatos, que faz aumentar o número de interações com os aminoácidos e apresenta também 4 ligações hidrogênios.

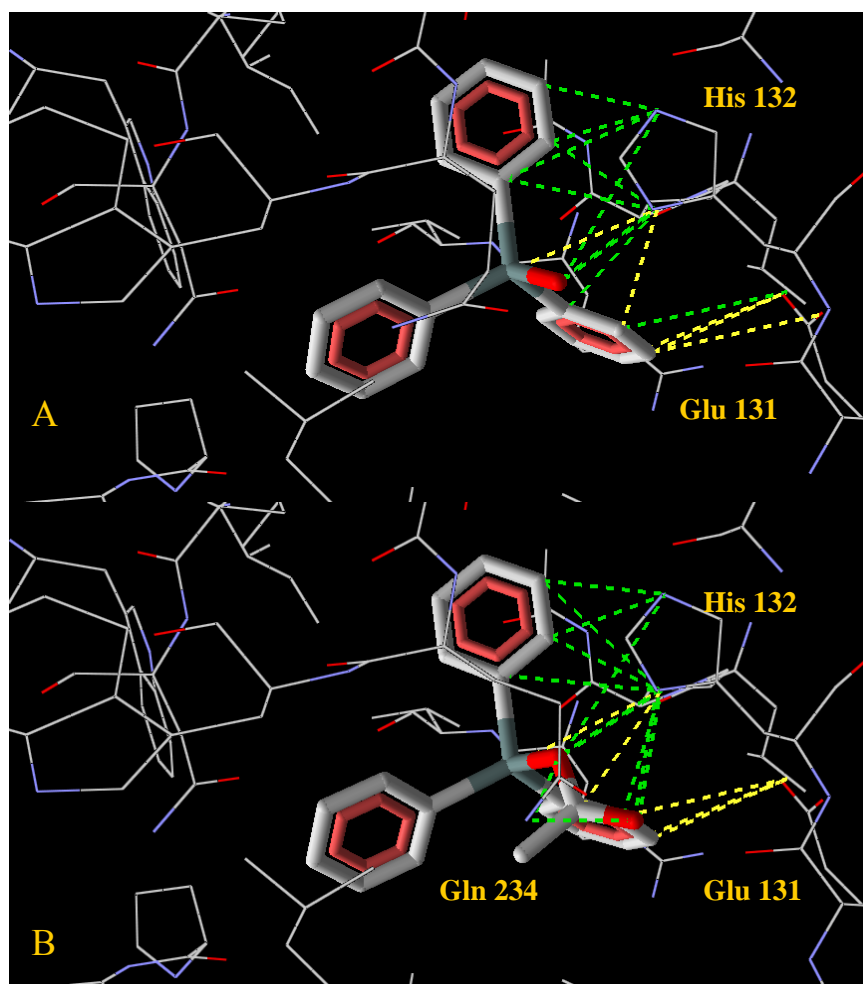


FIGURA 15 Interações dos compostos **3** (A) e **4** (B) com o sítio da subunidade *a*.

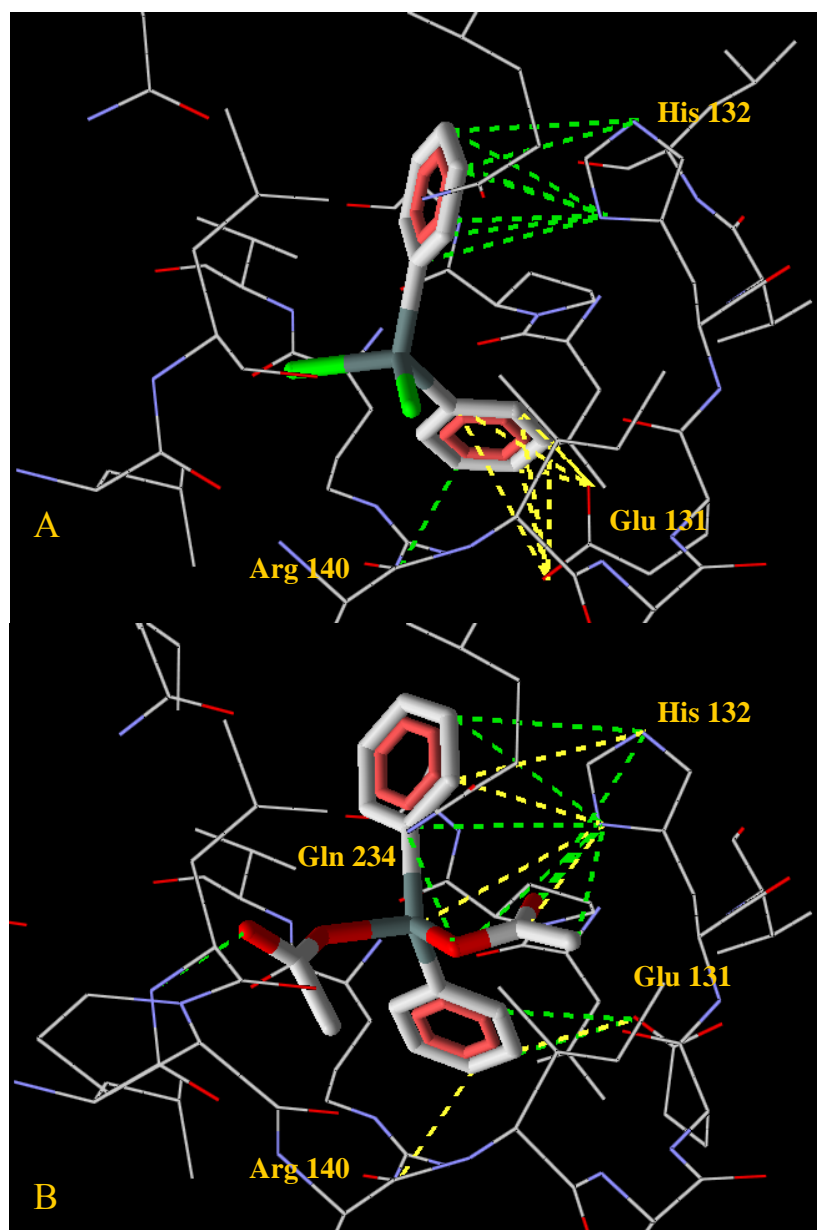


FIGURA 16 Interações dos compostos **7** (A) e **8** (B) com o sítio da subunidade *a*.

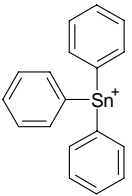
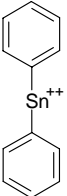
De acordo com propostas na literatura do comportamento de organoestânicos, espera-se que o grupo X não interfira na atividade biológica ou tenha influência secundária (Pellerito et al., 2006; Pellerito & Nagy, 2002). Entretanto, observa-se uma grande diferença de energia de ancoramento entre os grupos de compostos que possuem o mesmo R: **8** e **7**; **10** e **11**, demonstrando, assim, que o grupo X pode interferir de forma significativa na atividade desses compostos.

Portanto, não se observou para os compostos neutros (Tabela 8) uma coerência entre os valores calculados de energia de ancoramento e a tendência experimental observada.

5.3.3 Ancoramento com os cátions

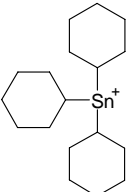
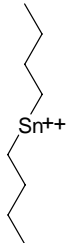
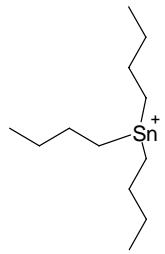
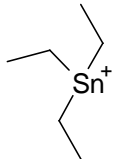
Com base nos resultados descritos e discutidos no que se respeito ao ancoramento com as espécies neutras, realizou-se o ancoramento somente com os cátions, a fim de verificar se eles corroboram com a tendência de inibição (Rehman et al., 2005, 2008; Wharf et al., 1997; Wharf, 2000; Ballmoos et al., 2004; Hadi et al., 2008).

TABELA 8 Principais interações hidrofóbicas (distância em Å e energia em kcal/mol) entre os ligantes e a subunidade *a* da F₁F_o-ATP Sintase, os valores de energia eletrostática intermolecular (kcal/mol).

Cátion	Resíduos	Dist. (Å)	Energia (kcal/mol)	E. Intermol. (kcal/mol)
 Trifenilestanho	His 132	3,88	-0,29	-109,7
		4,17	-0,25	
		3,21	-0,44	
		4,18	-1,12	
		3,84	0,13	
		3,63	0,14	
		4,30	0,065	
		2,97	0,14	
 Difenilestanho	His 132	3,56	-0,29	-89,3
		4,26	0,26	
		4,44	0,48	
		3,47	-1,33	
		4,26	0,08	
		3,30	0,46	
	His 132	4,11	0,18	

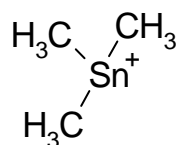
...continua...

TABELA 8, Cont.

 Tricicloexilestanho		3,55	0,39	
		3,53	0,25	
	Arg 140	4,41	0,43	-106,6
		4,5	0,029	
	Glu 131	3,05	-0,89	
	3,88	-0,04		
	3,47	0,40		
<hr/>				
 Dibutilestanho		4,02	-0,17	
		4,00	-0,18	
	His132	3,88	0,26	-60,0
		3,42	0,34	
		4,32	0,24	
<hr/>				
 Tributilestanho		3,71	-0,27	
		4,09	-0,21	-80,2
	His 132	4,15	-0,65	
		3,52	-0,90	
		4,21	0,18	
<hr/>				
 Trietilestanho	His 132	4,25	-0,14	-50,9
		4,43	-0,13	

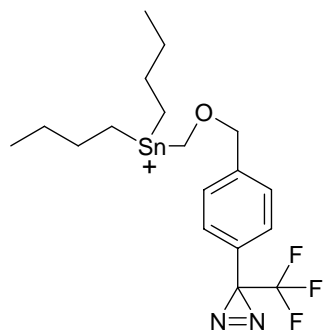
...continua...

TABELA 8, Cont.



His 132	3,39	-1,24	-30,28
---------	------	-------	--------

Trimetilestanho



His 132	4,18	-0,66	-123,53
	3,61	-1,19	
	3,79	-0,55	
	2,64	-2,33	

DDBT*

*4-[3-(Trifluorometil)-3H-Diazirin-3-yl]Benziloximetil Dibutilestanho

Com exceção do DDBT, que será explicado posteriormente, o cátion que apresentou melhor interação com o sítio ativo foi o trifenilestanho (Tabela 8). A ordem de interação obtida teoricamente é dada a seguir:



O trifenilestanho realiza o maior número de interações hidrofóbicas com o resíduo de His 132 em relação aos restantes cátions. Outro detalhe interessante é que o trifenilestanho adota uma conformação quase planar dentro do sítio ativo, o que provavelmente o acomoda melhor dentro do canal (Figura 17).

Aliado ao seu tamanho, ele poderia funcionar bloqueando a translocação dos prótons para dentro da enzima. Isso explicaria porque os compostos cujo R = Ph são mais ativos.

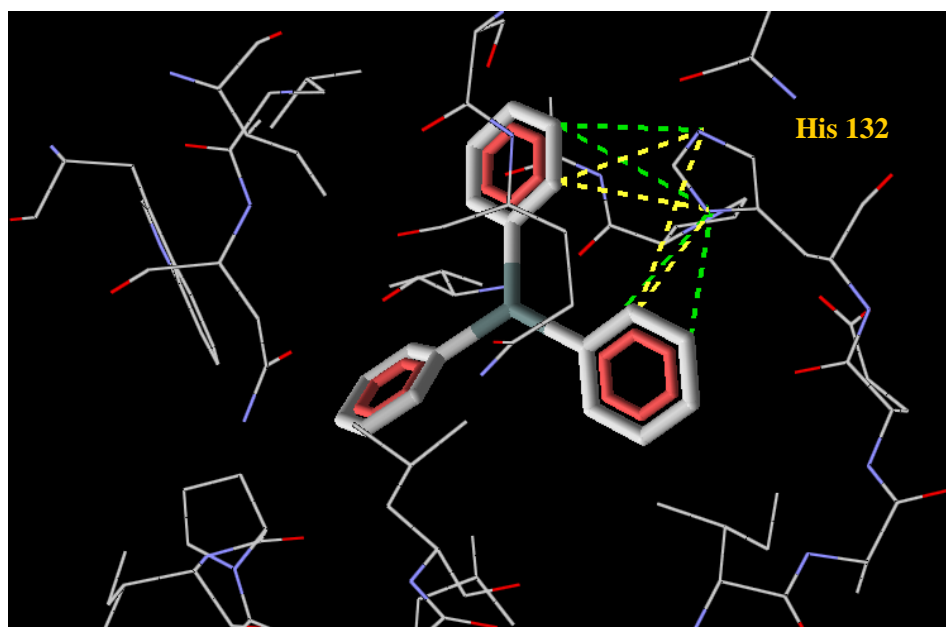


FIGURA 17 Interações do cátion Trifenilestanho com o sítio da subunidade α

Curiosamente, o cátion Tricicloexilestanho (Figura 18) possuiu, além de interações com o resíduo de His 132, algumas interações hidrofóbicas com os resíduos de Arg 140 e Glu 131. Apesar de possuir o mesmo número de carbonos que o trifenilestanho, o fato de não adotar uma conformação planar dentro do sítio ativo, minimiza as interações com os resíduos hidrofóbicos.

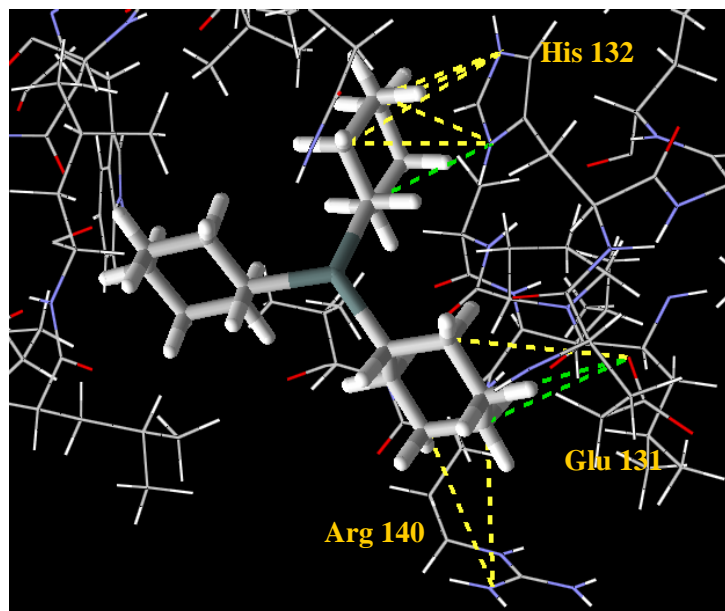


FIGURA 18 Interações do cátion Tricicloexilestanho com o sítio da subunidade *a*.

À medida que o cátion apresenta menor número de grupos arilas, ou o tamanho da cadeia alifática vai diminuindo, o número de interações hidrofóbicas também diminui. Com isso, ele se torna menos efetivo no bloqueio da subunidade *a*. Porém, o número de carbonos presentes ou a diferença de grupos alquila ou arila do organoestânico também é determinante para a minimização da energia de ancoramento e, conseqüentemente, a sua estabilidade dentro da subunidade *a*.

Fazendo-se a comparação entre o cátion Trifenilestanho e o cátion Difenilestanho, verifica-se que o primeiro possui cinco interações com a His 132 a mais que o segundo. Com isso, a diferença de energia de ancoramento é cerca de 20 kcal/mol.

Os cátions tributilestanho e dibutilestanho possuem o mesmo número de interações hidrofóbicas (Figura 19) com o resíduo de His 132 (cinco interações); entretanto, o que vai determinar a conformação favorável ao primeiro é o fato de ele possuir um grupo alquila a mais. Sendo assim, a energia do cátion tributilestanho diminui em 20,2 kcal/mol em relação ao cátion dibutilestanho.

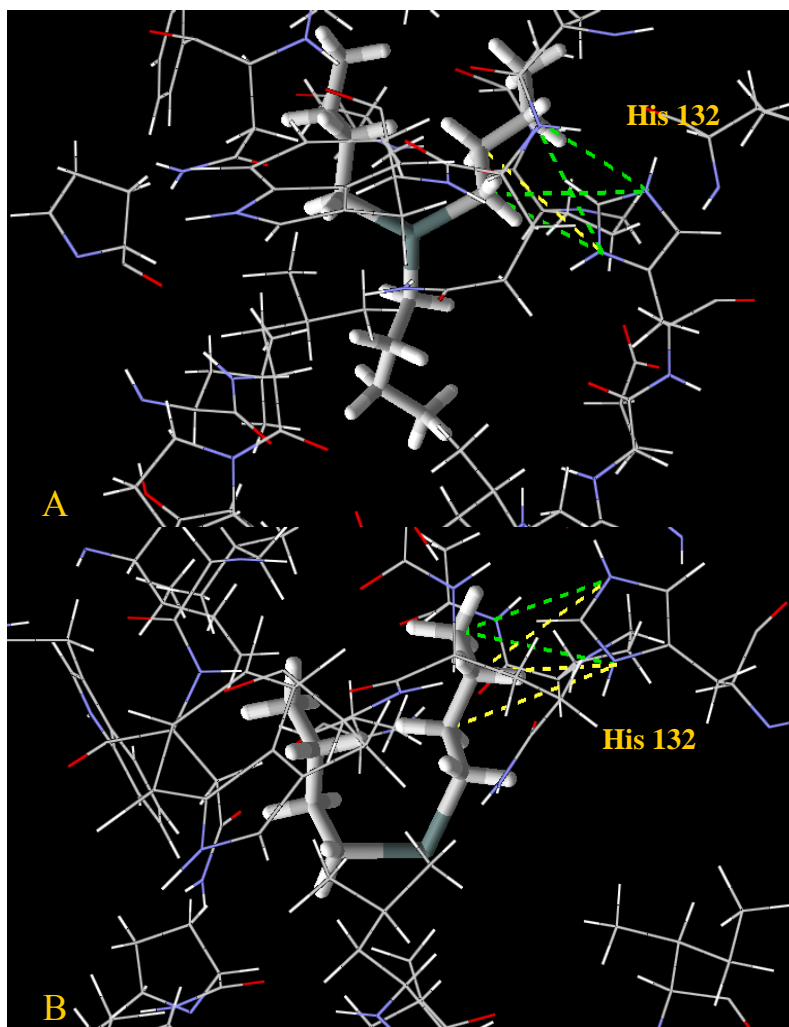


FIGURA 19 Interações dos cátions Tributilestanho (A) e Dibutilestanho (B) com o sítio da subunidade α .

Outra comparação que se pode fazer é entre os cátions Difenilestanho e Tributilestanho. Os dois compostos possuem o mesmo número de carbonos: doze. Entretanto, o segundo tem um grupo catiônico a mais. Portanto, era de se esperar uma energia de ancoramento menor que o primeiro; entretanto, isso não ocorre. A explicação disso é que mesmo o Difenilestanho tendo um grupo a menos, o fato de possuir anéis aromáticos em sua estrutura ajuda a estabilizar o cátion melhor que o Tributilestanho. A diferença de energia é de 9,1 kcal/mol favorável ao Difenilestanho.

Por enquanto, somente foram discutidas as interações entre cátions de estruturas semelhantes; entretanto, o cátion que possuiu a melhor energia de ancoramento foi o DDBT. Esse composto foi utilizado nos estudos de Ballmoos et al. (2004), na tentativa de propor um modelo de inibição dos compostos organoestânicos. O que determina sua melhor energia em relação aos outros cátions é a presença de uma ligação hidrogênio entre o oxigênio do grupo R substituído com o resíduo de histidina (energia -2,5 kcal/mol). Um detalhe interessante é que ele possui uma interação eletrostática a menos que seus análogos tributilestanho e dibutilestanho. A partir disso, pode-se considerar que a troca de um grupo substituinte apolar por um ligante formado por um substituinte polar faz criar ligações hidrogênios que ajudam a minimizar a energia de ancoramento; porém, sem aumentar as interações eletrostáticas com a histidina.

A correlação entre os dados experimentais (Hadi et al., 2008) com as energias de ancoramento dos cátions apresentou um $R^2 = 0,75$, ou seja, melhor do que a verificada nos compostos neutros.

Fazendo uma comparação dos valores de energia de ancoramento com a tendência de inibição observada diretamente na enzima F_1F_0 -ATP Sintase de *Escherichia coli* (Rehman et al., 2005, 2008; Hadi et al., 2008), verificou-se que elas corroboram melhor do que os compostos neutros. Com isso, pode-se supor

que é o cátion que pode interagir com a subunidade *a* da enzima F₁F₀-ATP Sintase.

Como houve interação de todos os cátions com resíduo de His 132, analisou-se também a distância do átomo de nitrogênio desse resíduo com o átomo de estanho. A tabela a seguir apresenta as distâncias do estanho com o resíduo de histidina em cada cátion.

TABELA 9 Distância do nitrogênio do anel imidazólico do resíduo de His 132 em relação ao átomo de Sn dos cátions.

Cátion	Distância em relação ao Sn (Å)
Trifenilestanho	5,07
Difenilestanho	6,93
Tricicloexilestanho	4,53
Dibutilestanho	6,53
Tributilestanho	5,04
Trietilestanho	6,13
Trimetilestanho	5,18
DDBT*	5,52

***4-[3-(Trifluorometil)-3H-Diazirin-3-yl]Benziloximetil Dibutilestanho**

Nota-se uma distância considerável do átomo de estanho em todos os cátions. Com isso, não se pode afirmar que ocorra uma ligação química de fato entre Sn e o N do anel imidazólico da histidina. Portanto, o comportamento dos organoestânicos dentro do canal provavelmente é semelhante ao próton que ativa a enzima, ou seja, ele atravessa o canal sem reagir com nenhum aminoácido. Como os organoestânicos são moléculas formadas de vários átomos, o tamanho é suficientemente grande para bloquear o canal, impedindo a entrada de novos prótons solvatados e, conseqüentemente a interrupção da produção de ATP.

5.4 Mecanismo da interação com a subunidade *a*

Sabe-se que os organoestânicos podem interromper o processo de produção do ATP pela interação na subunidade *a* da enzima F₁F₀-ATP Sintase (Ballmoos et al., 2004). Entretanto, é ainda desconhecido se esse processo ocorre por meio de interações ou de alguma ligação química com resíduos de aminoácido. Tanto um mecanismo quanto o outro resultariam no bloqueio do canal, impedindo a passagem de prótons (ou cátions) responsáveis pela ativação da enzima. Sendo assim, aplicou-se o método semiempírico em combinação com métodos de modelagem molecular com uma tentativa de mapear quais os resíduos de aminoácido que participam do mecanismo dessa reação.

Nesta etapa do trabalho, investigou-se um caminho de reação entre os cátions dos compostos organoestânicos estudados e o nitrogênio do anel imidazol do resíduo de His 132. Esse resíduo foi selecionado de acordo com os resultados verificados nos estudos de ancoramento molecular. Em todos os cátions, ocorreram interações predominantemente com o resíduo de His 132. O provável caminho de reação está mostrado a seguir (Figura 20).

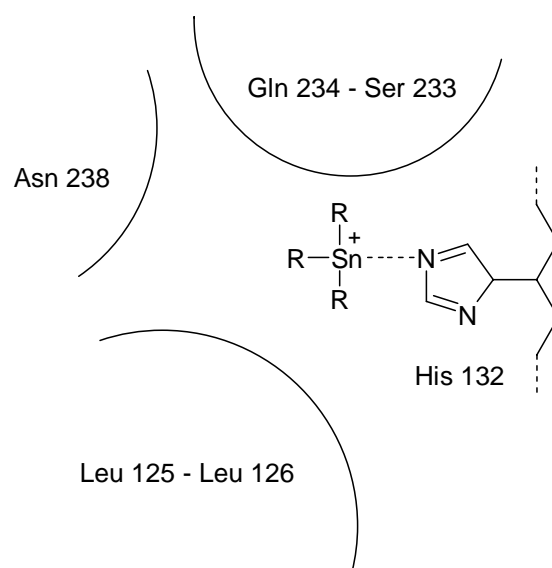


FIGURA 20 Mecanismo de reação para a reação do cátion R_nSn^+ na subunidade α

A His 132 seria o primeiro aminoácido que os organoestânicos teriam algum tipo de interação de acordo com sua posição na estrutura cristalográfica da subunidade α obtida do PDB (1c17) (Figura 6).

De acordo com a Tabela 10, os cátions trifenilestanho e tricicloexilestanho apresentam ΔE^\ddagger relativamente próximos. Isso pode ser devido ao fato de as moléculas terem volumes semelhantes. O que diferencia os dois compostos, sendo um ΔE^\ddagger favorável ao trifenilestanho, é o fato de ele ser formado por grupos aromáticos e, conseqüentemente, possuir interações do tipo empilhamento π - π entre os anéis aromáticos e o anel imidazol do resíduo de histidina.

Podemos observar também uma tendência de aumento do ΔE^\ddagger de acordo com o aumento da cadeia carbônica. A tendência observada é:



TABELA 10 Energias de transição e seus comprimentos de ligação e frequências imaginárias respectivamente, correspondente aos cátions estudados no mecanismo de reação com o sítio ativo da enzima F₁F₀-ATP Sintase.

Cátion	Freq. Imag.	Comp. (Å)	ΔE^\ddagger (kcal/mol)
Trifenilestanho	419,55	1,75	71,26
Tricicloexilestanho	331,20	2,75	81,11
Difenilestanho	1066,30	3,00	63,42
DDBT	-	1,75	1632,66
Tributilestanho	884,91	2,5	656,75
Dibutilestanho	529,27	2,25	109,11
Trietilestanho	307,02	2,00	59,94
Trimetilestanho	398,00	3,00	34,39

O trimetilestanho apresentou a menor das energias de transição. Isso significa que o estanho se liga ao nitrogênio mais facilmente, evidenciando um menor impedimento estérico. Para o tributilestanho, o ΔE^\ddagger calculado foi altíssimo (Tabela 12) e, praticamente, não ocorre a ligação química.

Em linha com esses resultados, considera-se que o organoestânico pode-se ligar a His 132; entretanto, o impedimento estérico para que ocorra a ligação é grande suficientemente para que ele somente se acomode no sítio ativo, comportando-se como um agente que bloqueia a passagem dos prótons, de forma semelhante ao trifenilestanho.

Até agora discutiu-se se os cátions podem se ligar ou não a algum aminoácido de acordo com a caracterização de um estado de transição por meio de frequências imaginárias ou pelo impedimento estérico resultante das conformações adotadas nos cálculos de ancoramento molecular. Essas frequências imaginárias são fundamentais para caracterizar se pode ocorrer ou não uma ligação química e se há estados de transição envolvidos. O cátion DDBT não apresentou frequências imaginárias em nenhum comprimento de ligação, assim pode-se afirmar que não há a ligação química entre o estanho e o nitrogênio, mas somente o bloqueio no sítio ativo. Entretanto, o elevado ΔE^\ddagger encontrado mostra um grande impedimento estérico com os resíduos de aminoácidos Ser 233 e His 132, o que pode gerar a instabilidade do organoestânico dentro da enzima. No gráfico a seguir (Figura 21), verificam-se as curvas de energias calculadas para os cátions.

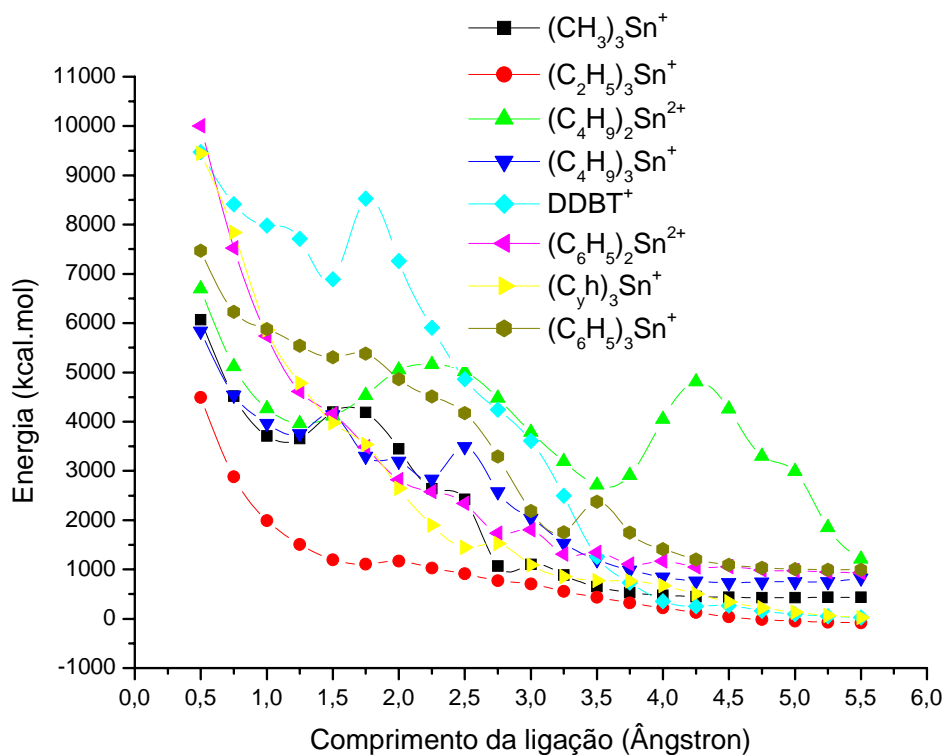


FIGURA 21 Gráfico das curvas de energias calculadas em função do comprimento da ligação de todos os cátions envolvidos no mecanismo da reação com a subunidade *a* da enzima F₁F₀-ATP Sintase.

O gráfico indica uma tendência semelhante a partir 3,5 Å, exceto para o cátion dibutilestanho. O comprimento médio calculado para a ligação Sn-N é de 2,27 Å. Esse comprimento de ligação está em boa concordância com o comprimento cristalográfico médio entre Sn e nitrogênio de cerca de 2,25 Å (Sousa et al., 2005). As energias permanecem praticamente constantes, o que indica que o impedimento estérico é pequeno ou não existe. Para o dibutilestanho, a conformação adotada dentro da enzima pode ser suficiente para

que o impedimento estérico dos grupos para outros resíduos possa aumentar de acordo com ele se afasta do resíduo de His 132.

Analisando a curva do cátion trifenilestanho no gráfico, observaram-se dois estados de transição, o primeiro em torno de 1,75 Å e o outro, em 3,50 Å. Entretanto, como o segundo apresenta uma distância relativamente alta entre o estanho e o nitrogênio, considerou-se apenas o primeiro. É importante notar que o comprimento de ligação médio entre estanho e nitrogênio é cerca de 2,10 Å. Mas, a energia do estado de transição no comprimento alto leva a crer que o impedimento estérico é elevado. Portanto, a ligação pode não acontecer e o trifenilestanho acomoda-se no sítio ativo de acordo com os nossos resultados de ancoramento.

Isso deveria ter sido observado igualmente para o tricicloexilestanho, porém foi observado um estado de transição em uma energia muito menor que o trifenilestanho e um comprimento de ligação em torno de 2,75 Å. Essa diferença pode ser explicada de acordo com a sua conformação adotada no sítio ativo na etapa de ancoramento.

Curiosamente, a curva do cátion dibutilestanho apresentou uma curva intensa na região entre 3,75 e 4,75 Å. Esse aumento de energia pode ser racionalizado pelo fato de haver uma aproximação desse cátion com o resíduo de aminoácido Ser 233, próximo a His 132, fazendo com que o impedimento estérico seja grande. O cátion DDBT não apresentou frequência imaginária na curva de energia potencial estudada, o que não caracteriza a presença de um estado de transição. Um pico na região de 1,75 Å mostra um aumento do impedimento estérico entre o DDBT e o resíduo de His 132. Com isso, pode-se dizer que a partir de uma distância mínima entre o estanho e o anel imidazol, o cátion pode se estabilizar dentro do sítio ativo. Assim, esse composto pode funcionar como um agente que bloqueia a passagem dos prótons.

De acordo com os nossos cálculos, o tamanho do cátion pode determinar se ocorre a ligação química e/ou bloqueio do canal da subunidade *a*. Foi observado que quanto menor o cátion, menor o seu impedimento estérico dentro da enzima; portanto, ele pode se ligar mais facilmente ao resíduo de His 132. Entretanto, um cátion muito grande faz aumentar o impedimento estérico, a energia do estado de transição se eleva e, conseqüentemente, dificulta a ligação com o aminoácido. Portanto, quando o cátion for muito volumoso, ele pode apenas bloquear o sítio ativo, sem ligar-se com nenhum aminoácido próximo a ele.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, analisou-se o modo de ação dos compostos organoestânicos com o meio biológico, na tentativa de apontar caminhos para, assim, auxiliar em futuros estudos acerca do desenvolvimento de complexos mais seletivos.

Pode-se verificar que, provavelmente, há uma etapa de ativação envolvida na dissociação dos compostos organoestânicos *in situ* e que essa dissociação passa pela formação de intermediários produzidos durante o processo de hidrólise. Esse intermediário interage com os resíduos de His 132, Ser 233, Asn 238 e Gln 234 na subunidade *a* da enzima F₁F₀-ATP Sintase; esses três últimos podem estar associados à remoção da camada de solvatação, deixando o cátion livre para interagir com o resíduo de His 132. De acordo com os nossos cálculos, se não ocorrer a etapa de hidrólise, as espécies neutras poderão interagir com a proteína.

As espécies cujo grupo catiônico é um anel aromático mostraram-se mais estáveis, adotando melhores conformações dentro do sítio ativo em relação a estruturas com cadeias alifáticas. A conformação e energia das estruturas com cadeias carbônicas alifáticas são melhores à medida que aumenta o número de carbonos.

O mecanismo de reação na enzima indica que a dependência do tamanho da molécula está intimamente relacionada à possibilidade de reação com algum resíduo de aminoácido. Pode-se observar também que os compostos organoestânicos, cuja cadeia carbônica possua mais de quatro carbonos, atuam bloqueando a subunidade *a*, tendo em vista as altas energias de transição encontradas caracterizadas pelo impedimento estérico.

Apesar dos resultados encontrados neste trabalho apontando algumas informações importantes para o modo de ação dos compostos organoestânicos e os possíveis resíduos de aminoácido que participam do mecanismo de reação, pretende-se dar sequência a este trabalho, utilizando de ferramentas e técnicas no âmbito computacional:

- Estudos de dinâmica molecular, a fim de verificar o comportamento dos compostos organoestânicos dentro da subunidade *a*.

- Realizar sínteses utilizando outros compostos, no intuito de buscar outros intermediários de estrutura semelhante à encontrada neste trabalho, além de utilizar outras técnicas de caracterização, como o RMN, por exemplo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCASTRO, R. B.; BOMFIM, J. A. S.; FILGUEIRAS, C. A. L.; HOWIE, R. A.; WARDELL, J. L. Evaluation of PM3 calculations applied to organotin compounds: crystal structure of $[\text{Ph}_2\text{SnCl}_2(1,10\text{-phenanthroline-5,6-dione})]\cdot 2\text{Me}_2\text{CO}$. **Applied Organometallic Chemistry**, West Sussex, v. 19, n. 4, p. 479-487, Apr. 2005.

ANDRADE, S. G. **Fatores de escala para frequências vibracionais fundamentais e energias de ponto-zero obtidos a partir de frequências harmônicas HF, MP2 e DFT/DZP e TZP**. 2009. 77 p. Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

BABOUL, A. G.; SCHLEGEL, H. B. Improved method for calculating projected frequencies along a reaction path. **Journal of Chemical Physics**, New York, v. 107, n. 22, p. 9413-9417, Dec. 1997.

BACHRACH, S. M. **Computational organic chemistry**. New Jersey: J. Wiley, 2007.

BALLMOOS, C. von; BRUNNER, J.; DIMROTH, P. The ion channel of F-ATP synthase is the target of toxic organotin compounds. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 31, p. 11239-11244, Aug. 2004.

BARBIÉRI, R. S.; LIMA, E. P.; SILVA, S. F.; DIAS, A. K. C.; CARDOSO, M. G.; TERRA, V. R. Síntese e caracterização de um novo composto obtido pela reação entre hidreto de trifenilestanho e ácido (\pm)-mandélico e avaliação de seu potencial biocida sobre o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 3, p. 467-473, maio/jun. 2006.

BASTOS, D. **A estrutura do *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase e os mecanismos de ação da isoniazida**: um estudo para novos ligantes. 2006. 152 p. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) – Universidade de Brasília, Brasília.

BAUL, T. S. B. Antimicrobial activity of organotin (IV) compounds: a review. **Applied Organometallic Chemistry**, West Sussex, v. 22, n. 4, p. 195-204, Apr. 2008.

BECKE, A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correction asymptotic behavior. **Physical Review A**, New York, v. 38, n. 6, p. 3098-3100, Sept. 1988.

BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry: (I) the effect of the exchange-only gradient correction. **Journal of Chemical Physics**, New York, v. 96, n. 3, p. 2155-2160, Feb. 1992.

BERNINI, R. B. **Fragmentação iônica da molécula do isopreno induzida pela luz síncrotron**. 2008. 109 p. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

BLUNDEN, S. J.; EVANS, C. J. Organotin compounds. In: HUTZINGER, O. (Ed). **The handbook of environmental chemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 1990. v. 3, pt. E.

BRASIL. Departamento Nacional de Produção Mineral. **Anuário mineral brasileiro**. Brasília: DNPM, 2006.

BRASIL. Departamento Nacional de Produção Mineral. **Balanco mineral brasileiro**. Brasília: DNPM, 2001.

BUCK, B. A.; MASCIANI, A.; CRAMER, C. J.; VEGLIA, G. Interactions of alkyltin salts with biological dithiols: dealkylation and induction of a regular β -turn structure in peptides. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 126, n. 44, p. 14400-14410, Nov. 2004.

BUCK-KOEHNTOP, B. A.; PORCELLI, F.; LEWIN, J. L.; CRAMER, C. J.; VEGLIA, G. Biological chemistry of organotin compounds: interactions and dealkylation by dithiols. **Journal of Organometallic Chemistry**, Lausanne, v. 691, n. 8, p. 1748-1755, Apr. 2006.

CAETANO, M. S. **Análise das estruturas nativa e mutante gli96ala da 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase via ancoramento molecular *in silico* com inibidores e estudo mecanístico**. 2009. 103 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CAIN, B. D. Mutagenic analysis of the F_0 stator subunits. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, New York, v. 32, n. 4, p. 365-371, Sept. 2000.

CANNATA, M. G. **Síntese e caracterização do complexo formado através da reação entre o dicloreto de difenilestanho e ácido cítrico e sua atividade fungicida**. 2008. 51 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CAPALDI, R.; AGGELER, R. Mechanism of the F_1F_0 -type ATP synthase, a biological rotary motor. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 27, n. 3, p. 154-160, Mar. 2002.

CASTRO, M. A.; CANUTO, S. O método hartree-fock. In: MORGON, N. H.; COUTINHO, K. (Ed.). **Métodos de química teórica e modelagem molecular**. São Paulo: Livraria da Física, 2007. p. 1-27.

COONEY, J. J.; WUERTZ, S. Toxic effects of tin compounds on microorganisms. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 4, n. 5, p. 375-402, Sept. 1989.

CRAMER, C. J. **Essentials of computational chemistry: theory and models**. 2. ed. West Sussex: J. Wiley, 2004.

CROWE, A. J.; SMITH, P. J.; CARDIN, C. J.; PARGE, H. E.; SMITH, F. E. Possible pre-dissociation of diorganotin dihalide complexes relationships between antitumor activity and structure. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 24, n. 1, p. 24-45, Aug. 1984.

CUNHA, E. F. F.; ALENCASTRO, R. B.; RAMALHO, T. C. Theoretical study of adiabatic and vertical electron affinity radiosensitizers in solution part 2: analogues of tirapazamine. **Journal of Theoretical & Computational Chemistry**, New Jersey, v. 3, n. 1, p. 1-9, Mar. 2004.

DAVIES, A. G. **Organotin chemistry**. 2. ed. New York: Basel, 2004.

DIAS, A. K. C. **Efeito inibitório de compostos organoestânicos sobre fungos isolados de câmaras de maturação**. 2005. 93 p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

DIDZIAPETRIS, R.; REYNOLDS, D. P.; JAPERTAS, P.; ZMUIDINAVICIUS, D.; PETRAUSKAS, A. *In silico* technology for identification of potentially toxic compounds in drug discovery. **Current Computer Aided Drug Design**, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. 95-103, June 2006.

DIMROTH, P.; KAIM, G.; MATTHEY, U. Crucial role of the membrane potential for ATP synthesis by F_1F_0 ATP synthases. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 203, n. 1, p. 51-59, Jan. 2000.

DOMINGOS, J. B.; LONGHINOTTI, E.; MACHADO, V. G.; NOME, F. A química dos ésteres de fosfato. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 745-753, set./out. 2003.

DUARTE, H. A.; ROCHA, W. R. Teoria do funcional de densidade. In: MORGON, N. H.; COUTINHO, K. (Ed.). **Métodos de química teórica e modelagem molecular**. São Paulo: Livraria da Física, 2007. p. 73-111.

FERNANDEZ, M. A.; WAGENER A. L. R.; LIMAVERDE A.; SCOFIELD, A. L.; PINHEIRO F. M.; RODRIGUES, E. Imposex and surface sediment speciation: A combined approach to evaluate organotin contamination in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. **Marine Environmental Research**, Amsterdam, v. 59, n. 5, p. 435-452, June 2005.

FILGUEIRAS, C. A. L. A nova química do estanho. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 176-192, mar./abr. 1998.

FILGUEIRAS, C. A. L. A química do estanho no século 18, ou como uma consulta se transformou num projeto de pesquisa. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6b, p. 1211-1219, nov./dez. 2002.

FITZPATRICK, D. Evolution and chaos in property rights systems: the third world tragedy of contested access. **Yale Law Journal**, New Haven, v. 115, n. 5, p. 996-1048, Mar. 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT**. Rome, 2009. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 15 jun. 2009.

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; MONTGOMERY JUNIOR, J. A.; VREVEN, T.; KUDIN, K. N.; BURANT, J. C.; MILLAM, J. M.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; COSSI, M.; SCALMANI, G.; REGA, N.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; KLENE, M.; LI, X.; KNOX, J. E.; HRATCHIAN, H. P.; CROSS, J. B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERTS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; AYALA, P. Y.; MOROKUMA, K.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; ZAKRZEWSKI, V. G.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; STRAIN, M. C.; FARKAS, O.; MALICK, D. K.; RABUCK, A. D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CUI, Q.; BABOUL, A. G.; CLIFFORD, S.; CIOSLOWSKI, J.; STEFANOV, B. B.; LIU, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; MARTIN, R. L.; FOX, D. J.; KEITH, T.; AL-LAHAM, M. A.; PENG, C. Y.; NANAYAKKARA, A.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P. M. W.; JOHNSON, B.; CHEN, W.; WONG, M. W.; GONZALEZ, C.; POPLE, J. A. **Gaussian 03, Revision D.01**. Wallingford: Gaussian, 2004.

GODOI, A. F. L. **Estudo sobre a ocorrência de compostos organoestânicos em sedimentos marinhos superficiais na costa do Estado de São Paulo**. 2001. 131 p. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

GODOI, A. F. L.; FAVORETO, R.; SANTIAGO SILVA, M. Contaminação ambiental por compostos organoestânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 708-716, set./out. 2003.

GREENWOOD, N. N.; EARNSHAW, A. **Chemistry of the elements**. 4. ed. Oxford: Pergamon, 1984.

GRESSER, M. J.; MYERS, J. A.; BOYER, P. D. Catalytic site cooperativity of beef heart mitochondrial F₁ adenosine triphosphatase. Correlations of initial velocity, bound intermediate, and oxygen exchange measurements with an alternating three-site model. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 257, n. 20, p. 12030-12038, Oct. 1982.

HADI, S.; IRAWAN, B.; EFRI. Antifungal activity test of some organotin: (IV) carboxylates. **Journal of Applied Sciences Research**, Faisalabad, v. 4, n. 11, p. 1521-1525, Nov. 2008.

HAMPRECHT, F. A.; COHEN, A. J.; TOZER, D. J.; HANDY, N. C. Development and assessment of new exchange-correlation functionals. **Journal of Chemistry Physics**, New York, v. 109, n. 15, p. 6264-6271, Oct. 1998.

HANAN, S. A. **Panorama da mineração e metalurgia do estanho no Brasil e no mundo**: subsídios para a elaboração da política setorial do país. Rio de Janeiro: SNIEE, 1983.

HEHRE, W. J.; DEPPMEIER, B. J.; KLUNZINGER, P. E. **PC Spartan Pro 1.0.5**: program for molecular mechanics and quantum chemical calculations. Irvine: Wavefunction, 1999.

INGHAM, R. K.; ROSENBERG, S. D.; GILMAN, H. Organotin compounds. **Chemical Reviews**, Washington, v. 60, n. 5, p. 459-539, Oct. 1960.

JAN, C. R.; JIANN, B. P.; LIU, Y. C.; CHANG, H. T.; SU, W. R.; CHEN, W. C.; YU, C. C.; HUANG, J. K. Effect of the organotin compound diethyltin on Ca^{2+} handling in human prostate cancer cells. **Life Sciences**, Oxford, v. 70, n. 11, p. 1337-1345, Feb. 2002.

KOCH, W.; HOLTHAUSEN, M. C., **A chemist's guide to density functional theory**. 2. ed. Weinheim: J. Wiley, 2001.

KRISHNAMOORTHY, B. S.; RAVICHANDRAN LALITHA, R.; PANCHANATHESWARAN, K.; CHATTARAJ, P. K. Intermolecular ligand exchange in alkyltin trihalides: semiempirical and density functional theory calculations. **Journal of Molecular Structure**, Amsterdam, v. 761, n. 1/3, p. 89-95, Mar. 2006.

KUMARI, A.; SINGH, I.; TANDON, J. P. Coordination behavior and microbial studies of organotin: (IV) complexes of biologically active heterocyclic benzothiazolines. **Main Group Metal Chemistry**, London, v. 17, n. 5, p. 347-361, Mar. 1994.

LASCHUK, E. F. **Novo formalismo semi-empírico para cálculos químico-quânticos**. 2005. 127 p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

LEE, J. D. **Química inorgânica não tão concisa**. 4. ed. São Paulo: E. Blücher, 1997.

LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Physical Reviews B**, New York, v. 37, n. 2, p. 785-789, Jan. 1988.

LEVINE, I. N. **Química cuantica**. 5. ed. Madrid: Pearson Educación, 2001.

LIMA, G. M. Síntese e caracterização de compostos organometálicos de estanho (IV). **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 178-181, mar./abr. 1999.

LUIJTEN, J. G. A. Applications and biological effects of organotin compounds. In: SAWYER, A. K. (Ed.). **Organotin compounds**. New York: Dekker, 1987. v. 3, p. 931-974.

MAGALHÃES, C. S.; BARBOSA, H. J. C.; DARDENNE, L. E. Métodos de *docking* receptor-ligante para o desenho racional de compostos bioativos. In: MORGON, N. H.; COUTINHO, K. (Ed.). **Métodos de química teórica e modelagem molecular**. São Paulo: Livraria da Física, 2007. p. 489.

MANAHAN, S. E. **Toxicological chemistry and biochemistry**. 3. ed. New York: Lewis, 2003.

MANCUSO, J.; MCEACHERN, R. J. Applications of the PM3 semiempirical method to the study of triethylenediamine. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, Amsterdam, v. 15, n. 2, p. 82-90, Apr. 1997.

MORI, K. Searching environmentally benign methods for pest control: reflections of a synthetic chemist. In: OHKAWA, H.; MIYAGAWA, H.; LEE, P. W. (Ed.). **Pesticide chemistry - crop protection, public health, environmental safety**. Weinheim: J. Wiley, 2007. p.13-22.

NAKAMOTO, R. K.; SCANLON, J. A. B.; AL-SHAWI, M. K. The rotary mechanism of the ATP synthase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Amsterdam, v. 476, n. 1, p. 43-50, Aug. 2008.

NOJI, H.; YOSHIDA, M. The rotary machine in the cell, ATP synthase. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 276, n. 3, p. 1665-1668, Jan. 2001.

OHLWEILER, O. A. **Química inorgânica**. São Paulo: E. Blücher, 1973. v. 1, p. 292.

OMAE, I. Chemistry and fate of organotin antifouling biocides in the environment. **The Handbook Environmental Chemistry**, Heidelberg, v. 50, p. 17-50, Sept. 2006.

OMAE, I. **Organotin chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 1989.

PELLERITO, C.; NAGY, L. Organotin(IV)ⁿ⁺ complexes formed with biologically active ligands: equilibrium and structural studies, and some biological aspects. **Coordination Chemistry Reviews**, Amsterdam, v. 224, n. 1/2, p. 111-150, Jan. 2002.

PELLERITO, C.; NAGY, L.; PELLERITO, L.; SZORCSIK, A. Biological activity studies on organotin (IV)ⁿ⁺ complexes and parent compounds. **Journal of Organometallic Chemistry**, Amsterdam, v. 691, n. 2, p. 1733-1747, Apr. 2006.

PINTO, M. F. S. **Estudo químico-quântico de propriedades estruturais e eletrônicas de oligofluorenos com potenciais aplicações tecnológicas**. 2007. 83 p. Tese (Doutorado em Ciências/Físico-Química) – Universidade de São Paulo, São Carlos.

POWERS, M. F.; BEAVIS, A. D. Triorganotins inhibit the mitochondrial inner membrane anion channel. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 266, n. 26, p. 17250-17256, Sept. 1991.

PRIMEL, E. G.; ZANELLA, R.; KURZ, M. H. S.; GONÇALVES, F. F.; MACHADO, S. O.; MARCHEZAN, E. Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil: predição teórica e monitoramento. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 605-609, ago. 2005.

RAMALHO, T. C.; CAETANO, M. S.; CUNHA, E. F. F.; SOUZA, T. C. S.; ROCHA, M. V. J. Construction and assessment of reaction models of class I EPSP synthase: molecular docking and density functional theoretical calculations. **Journal of Biomolecular Structure & Dynamics**, New York, v. 27, n. 2, p.195-208, Oct. 2009.

RASTOGI, V. K.; GIRVIN, M. E. Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase. **Nature**, London, v. 402, n. 6759, p. 263-268, Nov. 1999.

REHMAN, W.; BALOCH, M. K.; BADSHAH, A. Comparative study of structure: activity relationship of di and triorganotin, (IV) complexes of monomethyl glutarate. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 16, n. 4, p. 827-834, jul./ago. 2005.

REHMAN, W.; BALOCH, M. K.; BADSHAH, A. Synthesis, spectral characterization and bio-analysis of some organotin: (IV) complexes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Amsterdam, v. 43, n. 11, p. 2380-2385, Nov. 2008.

RUSHTON, P. P.; CLARK, S. J.; TOZER, D. J. Density-functional calculations of semiconductor properties using a semiempirical exchange-correlation functional. **Physical Review B**, New York, v. 63, n. 11, p. 115206-115210, Mar. 2001.

SANTINI, A. **Ação fungicida do acaricida azocyclotin sobre a antracnose do feijoeiro**. 2003. 45 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agronômico, Campinas.

SECCO, A. Brasil, a última fronteira agrícola. **Veja**, São Paulo, v. 27, n. 9, p. 78-84, 3 mar. 2004.

SENIOR, A. E.; NADANACIVA, S.; WEBER, J. The molecular mechanism of ATP synthesis by F_1F_0 -ATP synthase. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1553, n. 3, p. 188-211, Feb. 2002.

SILVA, R. R.; RAMALHO, T. C.; SANTOS, J. M.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. On the Limits of Highest-Occupied Molecular Orbital Driven Reactions: the frontier effective-for-reaction molecular orbital concept. **Journal of Physical Chemistry A**, Washington, v. 110, n. 3, p. 1031-1040, Jan. 2006.

SIMAS, A. M.; ROCHA, G. B. Métodos semi-empíricos de estrutura eletrônica em química quântica. In: MORGON, N. H.; COUTINHO, K. (Ed.). **Métodos de química teórica e modelagem molecular**. São Paulo: Livraria da Física, 2007. p. 29- 71.

- SOUZA, G. F.; LANG, L. S.; MANSO, L. C. C.; DEFLON, V. M.; FILGUEIRAS, C. A. L.; NIQUET, E. Mono-organotin(IV) complexes with 2-acetylpyridine 3-hexamethyleneiminylthiosemicarbazone (HACHexim). The crystallographic structures of $[\text{SnX}(\text{Ahexim})\text{Cl}_2]$ (X=Me, Ph). **Journal of Molecular Structure**, Amsterdam, v. 753, n. 1/3, p. 22-26, Oct. 2005.
- STENERSEN, J. Translocation and degradation of pesticides. In: STENERSEN, J. (Ed.). **Chemical pesticides: mode of action and toxicology**. Boca Raton: CRC Press, 2004. cap. 8, p. 155-186.
- STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods: (1) method. **Journal of Computational Chemistry**, West Sussex, v. 10, n. 2, p. 209-220, Mar. 1989.
- STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods: (2) applications. **Journal of Computational Chemistry**, West Sussex, v. 10, n. 2, p. 221-264, Mar. 1989.
- STOCK, D.; GIBBONS, C.; ARECHAGA, I.; LESLIE, A. G. W.; WALKER, J. E. The rotary mechanism of ATP synthase. **Current Opinion in Structural Biology**, Amsterdam, v. 10, n. 6, p. 672-679, Dec. 2000.
- THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 49, n. 11, p. 3315-3321, Apr. 2006.
- TRSIC, M.; PINTO, M. F. S. **Química quântica: fundamentos e aplicações**. Barueri: Manole, 2009.
- VIK, S. B.; ISHMUKHAMETOV, R. R. Structure and function of subunit *a* of the ATP synthase of *Escherichia coli*. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, New York, v. 37, n. 6, p. 445-449, Dec. 2005.
- WEBER, J.; SENIOR, A. E. ATP synthesis driven by proton transport in F_1F_0 -ATP synthase. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 545 n. 1, p. 61-70, June 2003.
- WHARF, I. Studies in aryltin chemistry: part 13, spectroscopic and fungicidal studies of some m- and o-substituted triaryltin acetates, oxides and hydroxides. **Applied Organometallic Chemistry**, West Sussex, v. 14, n. 1, p. 34-39, 2000.

WHARF, I.; LAMPARSKI, H.; REELEDER, R. Studies in aryltin chemistry: part 7, spectroscopic and fungicidal studies of some *p*-substituted tri-aryltin acetates, oxides and hydroxides. **Applied Organometallic Chemistry**, West Sussex, v. 11, n. 12, p .969-976, Dec. 1997.