

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

MARIANA CÔRTEZ DE SOUSA

**ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR PARA PREVISÃO *IN SILICO* DOS
PROVÁVEIS METABÓLITOS DE FASE I DE FLAVONÓIDES**

Goânia
2012

MARIANA CÔRTEZ DE SOUSA

**ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR PARA PREVISÃO *IN SILICO* DOS
PROVÁVEIS METABÓLITOS DE FASE I DE FLAVONÓIDES**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Prof. Dr. Carolina Horta Andrade.

Goiânia

2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG**

S725e Sousa, Mariana Côrtes de.
Estudos de modelagem molecular para previsão *In Silico* dos prováveis metabólitos de Fase I de flavonóides [manuscrito] / Mariana Côrtes de Sousa. – 2012.
77f. : il., fig., tab.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carolina Horta Andrade.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,
Faculdade de Farmácia, 2012.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

1. Flavonóides – Análise. 2. Metabólitos. I. Título.

CDU:547.972

MARIANA CÔRTEZ DE SOUSA

**ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR PARA PREVISÃO *IN SILICO* DOS
PROVÁVEIS METABÓLITOS DE FASE I DE FLAVONÓIDES**

Dissertação defendida no Curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, para a obtenção do grau de Mestre, aprovada em _____ de _____ de _____, pela banca Examinadora constituída pelos seguintes professores.

Prof. Dra. Carolina Horta Andrade – UFG
Presidente da Banca

Prof. Dr. Vinícius Barreto da Silva – FF - UFG

Prof. Dr. José Ricardo Sabino – IF - UFG

Prof. Dra. Valéria de Oliveira – FF - UFG

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que me deram suporte e amparo nesses momentos tão atribulados, durante o percurso da minha formação enquanto mestre.

Gostaria de agradecer a DEUS que me direcionou, incentivou e acreditou que eu era capaz de vencer mais essa batalha, me lançando ao desafio; aos MEUS PAIS e IRMÃO, que mesmo distantes fisicamente foram tão presentes nessa longa caminhada, dando não só apoio moral, mas emocional, sempre acreditando na minha capacidade (mesmo quando às vezes até eu duvidava!); ao GRANDE HOMEM que tem participado intensamente das minhas conquistas e me afagado com sua experiência, simplicidade e mansidão, dividindo comigo momentos espetaculares e únicos, que são os primeiros de muitos; aos FAMILIARES que entenderam todas as ausências e explicações; aos AMIGOS que aguardaram comigo, ansiosamente, a chegada de mais uma etapa cumprida; aos COLEGAS DE TRABALHO que entenderam e acompanharam o dilema entre trabalho e Universidade; aos COLEGAS DO MESTRADO que me ajudaram em diversos aspectos de crescimento, pessoal e didático; e, por fim, à extraordinária ORIENTADORA que me direcionou durante todo esse trajeto, sempre incentivando e motivando o meu progressivo crescimento.

Á todos fica uma enorme gratidão, pois sem as conversas, encontros, discussões, interações, trocas, sorrisos e lágrimas, eu nada seria.

Vocês, juntos, formam meu porto seguro!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	8
ABREVIATURAS E SIGLAS.....	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Desenvolvimento de novos fármacos e estudos de modelagem molecular	12
1.2. Estudos de metabolismo	16
1.4. Estudos de docking na PREVISÃO de rotas metabólicas	23
1.5. A importância dos flavonóides como candidatos a novos fármacos	28
2. OBJETIVOS	33
2.1. Objetivos Específicos.....	33
3. METODOLOGIA.....	34
3.1. Previsão do metabolismo utilizando MetaPrint2D	34
3.2. Preparo das proteínas e dos ligantes para os estudos de docking	34
3.3. Estudos de docking.....	35
3.4. Minimização de energia	36
4. ANEXO	37
5. CONCLUSÕES.....	38
6. PERSPECTIVAS	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Etapas do processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. NDA (*New Drug Application*) (LOMBARDINO e LOWE, 2004).....12
- Figura 2** – Representação esquemática do metabolismo de fármacos (xenobióticos), com mecanismos de fase I (CYP) e fase II, bem como os metabólitos obtidos.....18
- Figura 3** – Versão simplificada do ciclo catalítico do citocromo P450 (STJERNSCHANTZ, VERMEULEN e OOSTENBRINK, 2008).....20
- Figura 4** – Variação da energia de ligação do substrato para formação de produto mediado por citocromo P450. Uma combinação de *docking*, dinâmica molecular e cálculo de química quântica proposta para previsão de metabolismo *in silico* (SUN e SCOTT, 2010).....24
- Figura 5** – Crescimento do conteúdo do *Protein Data Bank* nos últimos anos. Número de estruturas depositadas anualmente e número total presente no banco de dados do PDB (PROTEIN DATA BANK, 2011).....25
- Figura 6** – Programas utilizados em estudos de *docking* e número de citações de cada programa, analisado pela *ISI Web of Science* (2005), considerando qualquer referência original (SOUSA, FERNANDES e RAMOS, 2006).....28
- Figura 7** – Estrutura molecular padrão dos flavonóides.....29
- Figura 8** – Reação de transformação do Benzo[a]Pireno (ou B[a]P) em B[a]P-7,8-diol-9,10-epóxidos.....31
- Figura 9** - Estrutura dos flavonóides quercetina, rutina, naringina e naringenina.....32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estruturas disponíveis de citocromo P450 humano de acesso público, determinado por cristalografia de raios-X (SUN e SCOTT, 2010).....	19
Tabela 2 – Classificação dos flavonóides e suas fontes alimentares (HEIM, TAGLIAFERRO e BOBILYA, 2002).....	30

ABREVIATURAS E SIGLAS

ADME/Tox - absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade

CADD – *Computer Assisted Drug Design*; planejamento de fármacos auxiliado por computador

CLH - *clearance* hepático

CYP - enzimas da superfamília do citocromo P450

DM - Dinâmica Molecular

EH - extração hepática

HOMO - *Highest Occupied Molecular Orbital*

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*

LBDD - *Ligand-Based Drug Design*; Planejamento Baseado na Estrutura do Ligante

LUMO - *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*

MM - Modelagem Molecular

MQ - Mecânica Quântica

P&D - Pesquisa e Desenvolvimento

PDB - *Protein Data Bank*; banco de dados com estruturas cristalográficas, ou estruturas de RMN, de proteínas ou ácidos nucleicos.

REA - relação estrutura-atividade

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

SBDD - *Structure-Based Drug Design*; Planejamento Baseado na Estrutura do Receptor

RESUMO

Os flavonóides representam uma importante classe de produtos naturais candidatos à fármacos, sendo polifenóis de baixo peso molecular, amplamente distribuídos no reino vegetal. Investigações sobre suas atividades, nos últimos 30 anos, demonstraram uma prevenção potencial de diversas patologias, dentre elas doenças cardiovasculares, desordens inflamatórias, infecções virais, diabetes e desordens neurológicas, além de sua conhecida ação antioxidante. A família do citocromo P450 (CYP) é composta de monooxigenases, que desempenham um papel crucial no metabolismo de substâncias endógenas e exógenas, e participa do metabolismo de flavonóides. Neste trabalho, descrevemos a aplicação de uma metodologia *in silico* combinada para explorar a previsão dos sítios de metabolismo dos flavonóides quercetina, rutina, naringenina e naringina, encontrados em abundância na natureza. Utilizou-se uma metodologia baseada nos ligantes (LBDD) para previsão dos sítios de metabolismo (SOM) pelo programa MetaPrint2D e previsão dos metabólitos mais prováveis, combinado à metodologia baseada na estrutura do receptor (SBDD) através da utilização de *docking* molecular e minimização de energia, para prever a interação de quercetina, rutina, naringenina e naringina com as isoformas CYP2C9 e CYP1A2. Foram encontrados diversos metabólitos de Fase I, com distâncias cataliticamente ativas ($< 5 \text{ \AA}$) e sítios de interação descritos na literatura, apresentando reações de hidroxilação alifática, hidroxilação aromática, desalquilação e *O*-desalquilação. Os metabólitos propostos *in silico* correspondentes à hidroxilação na posição C3' foram com coerentes com estudos *in vitro* e *in vivo* descritos na literatura para naringenina e naringina. Aminoácidos do sítio ativo das isoformas de CYP foram identificados como importantes no posicionamento dos flavonóides quercetina, rutina, naringenina e naringina em direção ao heme, confirmando a participação dessas isoformas no metabolismo de flavonóides.

Palavras-chave: metabolismo, flavonóides, citocromo P450, estudos de docking.

ABSTRACT

Flavonoids are an important class of natural products candidate drugs, and low molecular weight polyphenols, widely distributed throughout the plant kingdom. Investigations on its activities over the past 30 years, demonstrated a potential to prevent several diseases, among them cardiovascular diseases, inflammatory disorders, viral infections, diabetes and neurological disorders, in addition to its known antioxidant. The family of cytochrome P450 (CYP) is composed of monooxygenases, which play a crucial role in the metabolism of endogenous and exogenous substances, and participates in the metabolism of flavonoids. In this paper we describe the application of a methodology for exploring combined *in silico* prediction of sites of metabolism of quercetin, rutin, naringin and naringenin, found in abundance in nature. A methodology used was ligand based drug design (LBDD) to predict the sites of metabolism (SOM) and the program MetaPrint2D most likely estimate of the metabolites, combined with the method structure based drug design (SBDD) by using molecular docking and energy minimization, to predict the interaction of quercetin, rutin, naringin and naringenin with the isoforms CYP2C9 and CYP1A2. Metabolites were found several Phase I with catalytically active distance ($<5 \text{ \AA}$) and interaction sites described in the literature, with hydroxylation reactions of aliphatic, aromatic hydroxylation, dealkylation and O-dealkylation. The proposed *in silico* metabolic hydroxylation at the position corresponding to the C3' were consistent with studies *in vitro* and *in vivo* experiments described in the literature for naringin and naringenin. Amino acids of the active site of CYP isoforms have been identified as important in the positioning of the flavonoids quercetin, rutin, naringin and naringenin toward the heme, confirming the involvement of these isoforms in the metabolism of flavonoids.

Keywords: Metabolism; Flavonoids; Cytochrome P450; Docking Studies.

1. INTRODUÇÃO

1.1. DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS E ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR

A descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos consistem em um processo complexo, em que é necessária a integração de vários aspectos como inovação, conhecimento, tecnologia, gerenciamento e altos investimentos em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) (Figura 1) (BERNDT et al., 2005; GUIDO, OLIVA e ANDRICOPOULO, 2008).

Nos últimos anos ocorreram mudanças significativas nesse processo, principalmente no que diz respeito à determinação de propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e toxicológicas. Na visão atual, parâmetros relacionados à absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade (ADME/Tox) devem ser determinados na fase inicial de pesquisa, para que se torne possível uma avaliação antecipada dos recursos necessários para o desenvolvimento do novo candidato a fármaco. Medida que proporciona economia de investimentos (estratégia de “*fail early, fail cheap*” ou falha cedo, falha barato) e também o conhecimento de parâmetros relevantes para futura otimização (CZODROWSKI et al., 2009).

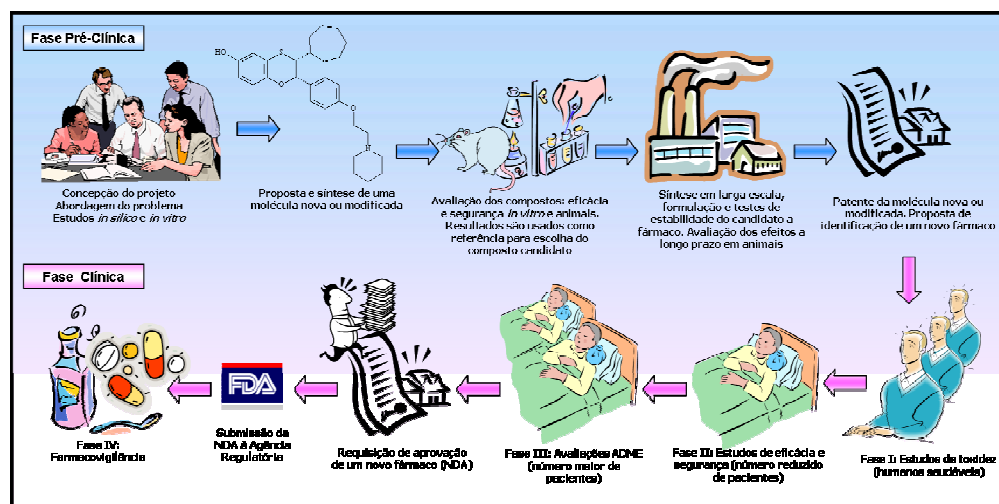


Figura 1 - Etapas do processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. NDA (New Drug Application) (LOMBARDINO e LOWE, 2004).

Muitas vezes, porém, as propriedades farmacocinéticas e toxicológicas são difíceis e complexas de serem determinadas e, portanto, demandam um alto investimento. Assim, com

os avanços recentes nos ensaios para determinação de propriedades farmacocinéticas e metabólicas com médio e alto rendimento (JENKINS, ANGELES e QUINTOS, 2004; ANSEDE e THAKKER, 2004; ZLOKARNIK, GROOTENHUIS e WATSON, 2005), tem-se obtido um perfil experimental completo da relação estrutura-atividade (REA) para compostos sintetizados. A seleção desse grupo necessita de uma atenção cuidadosa, com possibilidade de priorização de moléculas através da utilização de métodos *in silico*. Dessa forma, o desenvolvimento de novos compostos pode ser influenciado por métodos computacionais para previsão de propriedades ADME/Tox, seja para evitar potenciais problemas relacionados com essas propriedades ou para alertar que problemas potenciais devem ser verificados experimentalmente (CZODROWSKI et al., 2009).

Os estudos clássicos de REA exigiam a síntese de diversos análogos, estruturalmente relacionados a um composto protótipo, e a realização de sucessivos testes de atividade biológica. Após décadas de investigações de REA, foi possível estabelecer algumas generalizações sobre a influência de mudanças estruturais específicas nos efeitos biológicos, incluindo o tamanho e formato da cadeia carbônica, a natureza e o grau de substituição e a estereoquímica de um composto protótipo. As técnicas tradicionais de modificação molecular e REA são, ainda, importantes na descoberta de novos fármacos, no entanto, são dispendiosas e requerem extenso período de investigação, eventualmente bem sucedido (THOMAS, 2000).

No processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos a taxa de sucesso de novos candidatos selecionados para desenvolvimento clínico é de aproximadamente 20% (DIMASI, 2001), com a maioria das dificuldades atribuídas a propriedades farmacocinéticas inviáveis. Propriedades como baixa taxa de absorção, altas taxas de extração hepática (EH) e *clearance* hepático (CLH) - que ocasionam baixa e variável biodisponibilidade; interações medicamentosas e metabolismo realizado por enzimas polimórficas, podem ser previstas nos estudos de metabolismo *in silico* e *in vitro*, proporcionando direcionamento para os posteriores estudos clínicos (MINERS et al., 2004).

Um dos principais pilares desse processo concentra-se na aplicação da Química Farmacêutica Medicinal na geração de inovações terapêuticas (LOMBARDINO e LOWE, 2004; MCGEE et al., 2006). A validação de um novo alvo molecular é fundamental para estabelecer a sua relevância no processo fisiopatológico em questão (WERMUTH, 2003; KLEBE, 2006). O estudo de metabolismo *in silico*, através da aplicação de técnicas computacionais de Modelagem Molecular (MM), apresenta-se como uma das ferramentas mais amplamente utilizadas no processo de desenvolvimento de novos fármacos (SINGH, MALIK e SHARMA, 2006; EKINS, MESTRES e TESTA, 2007). A MM é definida pela

IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) como a investigação das estruturas e das propriedades moleculares, através do uso da química computacional e técnicas de visualização gráfica, visando fornecer uma representação tridimensional, sob um dado conjunto de circunstâncias (SANT'ANNA, 2002). Assim, através da MM é possível a construção de modelos químicos e/ou biológicos, os quais, submetidos a programas computacionais específicos, permitem visualizar, simular e interpretar sistemas inter-relacionados, como os envolvidos na interação fármaco-receptor, de acordo com a relação estrutura-atividade (HENCKEL e BILLINGS, 1995).

A MM aplicada ao planejamento racional e definição das rotas de metabolismo de candidatos a fármacos, está relacionada com o desenvolvimento baseado em uma abordagem fisiopatológica e de efeito, envolvendo um composto-protótipo, seu alvo terapêutico e sua ação farmacológica. Desta forma, auxilia no processo de descoberta de novos fármacos através da elucidação de diversas propriedades como potencial eletrostático, densidade eletrônica, calor de formação, energia de ionização, energia dos orbitais de fronteira HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) e LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*), que podem proporcionar uma visualização mais completa do sistema fármaco-receptor. A otimização de um protótipo existente também pode ser realizada com as ferramentas de MM, além, também, da comparação estrutural entre moléculas diferentes, que fornecem a relação de determinada atividade biológica (RODRIGUES, 2001; CARVALHO et al., 2003).

As abordagens *in silico* para previsão de rotas metabólicas abrangem uma série de diferentes aspectos: eles vão desde a previsão da estabilidade metabólica global de um composto, até a avaliação da energia de ligação das enzimas metabolizadoras, para o cálculo de barreiras de reação (CZODROWSKI et al., 2009). Algumas previsões mais complexas de comportamento molecular podem ser utilizadas através de modelos computacionais, tais como previsão do destino metabólico do fármaco (BOYER et al., 2007), da penetração na pele (SANTOS-FILHO, HOPFINGER e ZHENG, 2004) e da identificação de toxicóforos - características estruturais de moléculas indicando provável toxicidade (SANDERSON e EARNSHAW, 1991; PRIVAL, 2001; WILLIAMS e FEELY, 2002).

A MM pode ser aplicada por diferentes técnicas, de acordo com o objetivo final da pesquisa e as informações disponíveis para as estruturas dos ligantes e das proteínas. Abordagens baseadas no conhecimento da estrutura do ligante consideram que o destino metabólico de um composto é exclusivamente uma consequência de sua estrutura química e características. Estas abordagens incluem métodos de Mecânica Quântica (MQ), em que vários descritores são estabelecidos baseados em métodos específicos (por exemplo,

classificadores, relações estrutura-atividade/propriedades quantitativas ou QSAR/QSPR e 3D-QSAR), e elucidação dos grupos farmacofóricos. Os métodos de MQ utilizam cálculos teóricos, em vários níveis, para descrever a estrutura eletrônica de ligantes e para calcular as energias de várias espécies ao longo de um caminho de reação específico (LIVINGSTONE, 2000; TODESCHINI e CONSONNI, 2000).

O conhecimento da estrutura molecular do alvo receptor ou do complexo ligante/alvo permite o planejamento e desenvolvimento de inibidores enzimáticos ou agonistas/antagonistas de receptores, através do processo de complementaridade molecular (estéreo/eletrostática). Neste processo, planeja-se um candidato com propriedades estruturais adequadas para o reconhecimento molecular e aumento da afinidade pelo receptor biológico. Esta estratégia é conhecida como Planejamento Baseado na Estrutura do Receptor (SBDD, *Structure-Based Drug Design*) (KLEBE, 2006; GUIDO, OLIVA e ANDRICOPULO, 2008). O SBDD é também chamado de planejamento direto, ferramenta do CADD, considerado quando existe situação ideal ao planejamento e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos *in silico*, já que se tem disponível a estrutura 3D referência do complexo fármaco/ligante-biomacromolécula alvo. Além disso, o SBDD permite também a seleção virtual de ligantes não-testados (LIU et al., 2005). Métodos baseados no conhecimento da estrutura da proteína utilizam as informações fornecidas por resultados experimentais em 3D (geralmente cristalografia de raios-X e RMN).

Estas informações podem ser utilizadas em estudos de MM com simulações de encaixe da molécula no sítio de ligação da proteína (KIRTON, MURRAY e VERDONK, 2005) e, posterior avaliação da afinidade de ligação com uma pontuação empírica ou baseada na literatura (GOHLKE e KLEBE, 2002; JONES, WILLETT e GLEN, 1997; FRIESNER, MURPHY e REPASKY, 2006; SOTRIFFER, SANSCHAGRIN e MATTER, 2008). Embora estes métodos geralmente sejam bastante rápidos, simplificações comuns são utilizadas com a estrutura da proteína rígida e omissão de moléculas de água no sítio de ligação. Porém, atualmente estudos mais complexos têm sido realizados no intuito de suprir erros provenientes das técnicas simplificadas, com utilização de proteínas flexíveis e moléculas de água consideradas estruturais, ou seja, participantes no processo de metabolismo realizado pela proteína (KROEMER, 2007). Outra ferramenta bastante utilizada para correção de erros é a de simulações de Dinâmica Molecular (DM), embora aumente significativamente no custo dos sistemas computacionais necessários (BRUICE, 2006).

Em contraste, a estrutura macromolecular do alvo terapêutico eleito pode não ser conhecida. Neste caso, o processo de planejamento inicia-se pelo estudo das características

multifuncionais dos ligantes conhecidos ou do ligante endógeno envolvido na fisiopatologia/farmacologia do processo sob investigação. Esta estratégia é conhecida como Planejamento Baseado no Ligante (LBDD, *Ligand-Based Drug Design*). Em muitos casos, o uso combinado das duas estratégias mencionadas, SBDD e LBDD, pode ser útil no processo de descoberta de novos fármacos, gerando informações adicionais fruto do sinergismo entre as técnicas (BARREIRO e FRAGA, 2001; KUBINYI, 1993; SMITH, 2007).

1.2. ESTUDOS DE METABOLISMO

Substâncias xenobióticas, como fármacos, ao serem administradas ao organismo, por uma das vias de administração, são submetidas a reações de biotransformação como mecanismo de defesa contra substâncias invasivas. Para catalisar essa reação, o organismo aciona os sistemas enzimáticos, que facilitam o aumento da solubilidade das substâncias em líquidos corporais e proporcionam maior excreção, por exemplo, no fígado. A cinética de formação e excreção dos metabólitos, a partir de fármacos, é fator importante para previsão da atividade terapêutica e determinação dos mecanismos de toxicidade de um fármaco (PEREIRA, 2006).

A definição do sítio de metabolismo (SOM, do inglês *Site of Metabolism*) de um novo candidato a fármaco é um dos pontos determinantes para elucidação e disposição de seu perfil farmacocinético. Na maioria dos casos, a fase de transformação metabólica de uma substância xenobiótica engloba todo o processo de eliminação do organismo. Assim, qualquer fator modulador da velocidade e da extensão do metabolismo pode alterar a disposição geral do xenobiótico. Na maioria dos casos, o metabolismo de fármacos leva à sua inativação e eliminação. No entanto, o metabolismo também pode, por vezes, levar à geração de um metabólito ativo, que pode ser exclusivo ou parcialmente responsável pela resposta farmacológica obtida. Em alguns casos, a transformação metabólica pode também produzir intermediários reativos, tóxicos ou metabólitos com potenciais implicações toxicológicas, fator que torna imprescindível a boa compreensão do metabolismo de um novo candidato a fármaco no início do processo de desenvolvimento do mesmo (GONDI e SEKHAR, 2001).

Dentre as propriedades ADME/Tox, o metabolismo é provavelmente a mais complexa, porque é um processo biológico que envolve uma série de mecanismos e sistemas enzimáticos, muitas vezes concorrentes. Fatores como a reatividade do substrato, interação entre ligante e enzima metabolizadora, e variações genotípicas e fenotípicas contribuem para

a complexidade do processo de elucidação do metabolismo (KIRCHHEINER e SEERINGER, 2007; EVANS e RELING, 1999).

Outro fator determinante na utilização de ferramentas computacionais para estudos de metabolismo é a formação de intermediários reativos, resultantes do metabolismo por enzimas polimórficas. Essa informação é muito importante no processo de descoberta de novos candidatos a fármacos e conformações moleculares de cada estrutura envolvida, devido à previsão de variabilidade metabólica. Além, também, da avaliação do potencial de interações medicamentosas, no que se refere à inibição ou indução da enzima participante, bem como o efeito competidor da molécula pelo mesmo sítio ativo da enzima (GONDI e SEKHAR, 2001).

As reações de metabolismo são divididas basicamente em duas etapas: as reações de Fase I e de Fase II. As reações de Fase I são reações de funcionalização, que introduzem um grupo funcional polar à molécula. Alguns exemplos de reações de Fase I são a hidrólise de grupos éster ou amida para os seus respectivos ácido e álcool/aminas, hidroxilação de carbonos aromáticos e alifáticos, desalquilação de heteroátomo (aminas secundárias/terciárias, éteres e tioéteres) e oxidação de heteroátomo (*N*- e *S*-oxidação). As enzimas mais importantes envolvidas no metabolismo de Fase I são as enzimas da superfamília do citocromo P450 (CYP), contendo flavina monooxigenases, esterases, e amidases, sendo encontradas abundantemente no fígado e presentes em outros órgãos como, intestino, rins, pulmões e cérebro. Em alguns casos, os metabólitos de Fase I são excretados diretamente ou, em outros, são submetidos ao metabolismo de Fase II antes da eliminação. A Figura 2 apresenta um esquema geral do caminho metabólico que um fármaco pode sofrer no organismo, evidenciando as reações de Fase I e II, assim como os possíveis produtos obtidos dessas reações.

Reações de Fase II são geralmente reações de conjugação, que introduzem uma função polar tanto na molécula original, como no metabólito de Fase I. Os metabólitos conjugados, resultantes, geralmente são mais polares que a molécula original e, portanto, mais susceptíveis à eliminação (Figura 2). As reações de Fase II de maior prevalência incluem as vias metabólicas de glucuronidação, sulfatação e conjugação de glutatona (GONDI e SEKHAR, 2001).

[CHA1] Comentário:

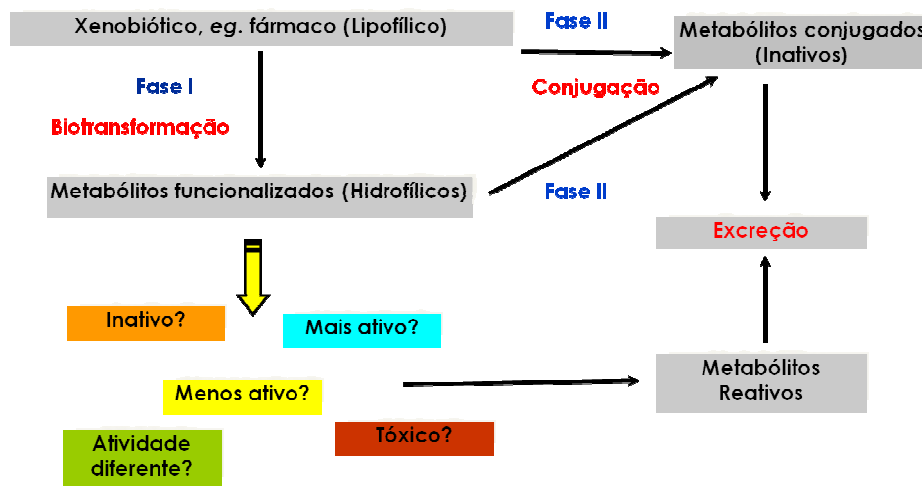


Figura 2 – Representação esquemática do metabolismo de fármacos (xenobióticos), com mecanismos de fase I (CYP) e fase II, bem como os metabólitos obtidos.

Aproximadamente 75% dos fármacos disponíveis no mercado são metabolizados pelas isoformas de CYP: 1A2, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1 e 3A4 (STJERNSCHANTZ, VERMEULEN e OOSTENBRINK, 2008) (Tabela 1). Cabe ressaltar que CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, e 3A4/5 são as principais isoformas utilizadas nos estudos *in vitro* de metabolismo dos fármacos desenvolvidos atualmente. Essas isoformas contribuem para um metabolismo combinado de mais de 90% de todos os fármacos no mercado, e sua contribuição individual, no que se refere à expressão hepática do citocromo P450, é de aproximadamente, 15%, 20%, 5%, 10%, 10% e 30% , respectivamente (ORTIZ DE MONTELLANO, 2010).

Diversos métodos têm sido desenvolvidos para previsão da interação entre fármacos e as isoformas CYP (VAN DE WATERBEEMD e GIFFORD, 2003). A MM que envolve correlações estatísticas entre descrição molecular e estrutural, através da previsão *in silico*, promove uma triagem computacional prévia, no descobrimento de novos fármacos (EKINS, STRESSER e WILLIAMS, 2003). A obtenção de estruturas tridimensionais de proteínas do citocromo P450 associadas a candidatos a novos fármacos favorece os estudos de modelagem molecular, em que é possível observar, em detalhes, a interação entre macro e micromolécula (enzima e ligante). Os recentes avanços na compreensão da expressão e regulação do CYP e outros sistemas enzimáticos têm melhorado significativamente a previsão do metabolismo no processo de desenvolvimento de novos candidatos a fármacos (GONDI e SEKHAR, 2001).

Tabela 1 – Estruturas tridimensionais de citocromo P450 humano disponíveis, determinadas por cristalografia de raios-X (SUN e SCOTT, 2010).

CYPs	Código PDB	Resolução (Å)	Observações
CYP1A2	2HI4	1.95	Co-cristalizado com alfa-naftoflavona
CYP2A6	1Z10, 1Z11	1.90, 2.05	Co-cristalizado com cumarina e metoxsalen
	2FDU, 2FDV, 2FDW, 2FDY	1.65 - 2.05	Co-cristalizado com N,N-dimetil(5-(piridin-2-il)furan-2-il)metanamina, N-metil(5-(piridin-3-il)furan-2-il)metanamina, (5-(piridin-3-il)furan-2-il)metanamina e Adritiol
	2PG6, 2PG7, 2PG5	1.95 - 2.80	2A6 mutantes L240C;N297Q, N297Q/I300V e N297Q
CYP2A13	2P85	2.35	Co-cristalizado com Indol
CYP2C8	1PO2	2.7	Sem substrato co-cristalizado
	2NNI, 2NNJ, 2NNH	2.28 - 2.80	Co-cristalizado com montelucaste, felodipina e 9-cis-ácido retinóico
CYP2C9	10G2, 10G5	2.55, 2.60	Co-cristalizado com varfarina
	1R90	2	Co-cristalizado com flurbiprofeno
CYP2D6	2F9Q	3	Sem substrato co-cristalizado
CYP2E1	3E4E, 3E6I	2.60, 2.20	Co-cristalizado com 4-metilpirazol e indazol
CYP3A4	1TQN	2.05	Sem substrato co-cristalizado
	1W0E, 1W0F, 1W0G	2.65 - 2.80	Sem substrato co-cristalizado e Co-cristalizado com metirapona e progesterona
	2J0D, 2V0M	2.75, 3.80	Co-cristalizado com eritromicina e cetoconazol

As isoformas de CYP possuem no centro catalítico o grupamento heme, com diversas especificidades de substrato (NELSON et al., 1993; RENDIC e DI CARLO, 1997). As enzimas CYP catalisam a biotransformação de vários substratos endógenos (por exemplo, ácidos biliares, esteróides e colesterol), bem como xenobióticos (fármacos, poluentes e componentes da dieta). Enzimas CYP também são responsáveis por mediar reações de hidroxilação de carbono alifático e aromático, epoxidação de duplas ligações aromáticas ou olefínicas, oxidação e desalquilação de heteroátomo, e desidrogenação (RENDIC e DI CARLO, 1997; SHIMADA, YAMAZAKI e MIMURA, 1994). Com base na homologia de seqüência de aminoácidos, os membros da superfamília CYP são divididos em várias subfamílias (NELSON et al., 1993).

O ciclo catalítico do CYP (Figura 3) envolve a ligação de uma molécula de oxigênio ao átomo de ferro no centro do grupo heme. A redução da molécula de oxigênio, com a formação de água, e a transferência de elétrons levam à formação de um único radical de oxigênio. Este radical pode reagir com o substrato da enzima em diferentes pontos da molécula, conduzindo a uma variedade de produtos. A regioseletividade do CYP na catálise de reações é determinada por uma série de fatores: a energia necessária para remover um átomo de hidrogênio do substrato (energia de abstração de hidrogênio), a estabilidade da molécula após a formação dos radicais de carbono e a conformação do sítio de ligação variável do CYP (BREINHOLT et al., 2002).

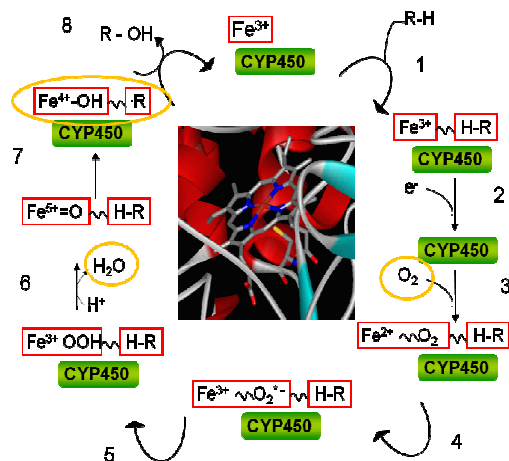


Figura 3 – Versão simplificada do ciclo catalítico do citocromo P450 (STJERNSCHANTZ, VERMEULEN e OOSTENBRINK, 2008).

Os citocromos P450 que metabolizam fármacos estão confinados às subfamílias 1, 2, 3 e 4, que são divididas em isoformas. Além da variabilidade de expressão entre diferentes isoformas de CYP (por exemplo, CYP3A4 e CYP2E1), algumas (por exemplo, CYP2C9, CYP2C19 e CYP2D6) também são expressas polimorficamente, contribuindo para a acentuada diversidade no metabolismo de fármacos pelo organismo (WRIGHTON e STEVENS, 1992; INGELMAN-SUNDBERG, OSCARSON e MCLELLAN, 1999). O polimorfismo apresentado por algumas isoformas de CYP pode levar ao fracasso terapêutico ou efeitos adversos em uma sub-população, o que representa um enorme problema na farmacoterapia.

A isoforma CYP2C9 metaboliza fármacos como fenitoína, tolbutamida e losartana. Como CYP2C9 é polimorfo, diversos experimentos de genotipagem indicaram dois alelos mutantes, com maior frequência de mutação ocorrendo em caucasianos (cerca de 10%), quando comparado com chineses ou populações afro-americanas (<2%). O polimorfismo de CYP2C9 causou complicações durante o desenvolvimento da losartana, resultando em farmacocinética anômala em pacientes com alelo 3 de CYP2C9. O significado clínico desse polimorfismo é a redução da depuração do fármaco e uma longa meia-vida em metabolizadores fracos, quando comparados com metabolizadores normais. Geralmente, CYP2C9 metaboliza fármacos caracterizados como ácidos fracos. Alguns dos fármacos metabolizados por CYP2C9 possuem estreita janela terapêutica (por exemplo, fenitoína e tolbutamida). Assim, a inibição do CYP2C9 pode resultar sérias complicações clínicas por interações fármaco-fármaco. Sulfafenazol, fluconazol e amiodarona apresentaram grande

potencial inibitório para o metabolismo de *S*-varfarina mediado por CYP2C9. Da mesma forma, a indução de CYP2C9 por fármacos como a rifampicina e o fenobarbital, têm apresentando grande significância clínica, devido a possível redução da eficácia do medicamento pela depuração crescente (STEARNS et al., 1995).

Os principais sítios de metabolismo de moléculas suscetíveis à CYP1A2 são aqueles que apresentam estruturas planares, basicidade moderada e volume médio. Já para moléculas mediadas por CYP2C9 são caracterizadas por acidez fraca, lipofílicas, com até duas ligações doadoras/receptoras de elétrons, com distância de 5 a 8 Å do sítio de metabolismo. Técnicas de modelagem molecular e relações estrutura-atividade têm mostrado que a maioria dos substratos aromáticos contém regiões planas capazes de formar empilhamento π com resíduos aromáticos no sítio ativo das diversas isoformas da enzima CYP (SMITH, ACKLAND, JONES, 1997).

A isoforma CYP1A2 está envolvida na ativação de agentes mutagênicos heterocíclicos, arilaminas, alimentos e substâncias cancerígenas, tais como 2-acetilaminofluoreno (GUENGERICH, 2000). A CYP1A2 metaboliza também fármacos e ingredientes alimentares, tais como a cafeína e a fenacetina. Essa isoforma tem apresentado indução por um grupo diversificado de substâncias, tais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, sendo considerados indutores protótipos desta isoenzima (EATON et al., 1995). A indução é geralmente mediada pelo receptor de hidrocarboneto aromático (AhR), embora substâncias independentes de vias AhR também estão presentes no processo de indução.

Alguns compostos com anéis heterocíclicos, tais como piridina e tiazol, possuem alta afinidade com o grupamento ferro do heme. Estes compostos foram estudados com o objetivo de se tornarem potentes inibidores de enzimas CYP. Este efeito foi determinado como sendo devido à interação entre o par de elétrons do heteroátomo e o átomo de ferro do heme, como resultado da transição do estado de maior energia (*high-spin*, interação do tipo I) para o estado de menor energia (*low-spin*, tipo II) de interação do CYP. A redução de CYP no estado de menor energia, pela enzima redutase, é dificultado, o que gera maior potência inibitória (KUMAR et al., 1996; KEMPF et al., 1997).

Interações metabólicas entre flavonóides e as diversas isoformas de citocromos P450 são complexas e discutidas em diversos trabalhos encontrados na literatura. A maioria dos flavonóides encontrados nos alimentos são *O*-glicosídeos (HAMMERSTONE, LAZARUS, SCHMITZ, 2000). A unidade glicosídica mais comum é a glicose, porém incluem-se também a glucoramnose, galactose, arabinose e ramnose (COOK, SAMMAN, 1996). A ligação β desses açúcares resiste à hidrólise por enzimas pancreáticas, porém, estudos mostram que as

responsáveis pela hidrólise das moléculas de açúcar são as enterobactérias produtoras de glicosidasas (HOLLMAN, KATAN, 1997; RICE-EVANS, 2001; HEIM, TAGLIAFERRO, BOBILYA, 2002; HODEK, TREFIL, STIBOROVA, 2002).

Duas β -endoglucosidasas capazes de hidrolisar flavonóides glicosídicos têm sido caracterizadas no intestino delgado de humanos, incluindo a hidrolase florizina lactase (DAY et al., 2000). Acredita-se que enzimas citosólicas inespecíficas também são responsáveis pela deglicosilação de flavonóides, permitindo a formação de um sítio de conjugação (GOPALAN et al., 1992).

Estudos de metabolismo *in vitro* e *in vivo* mostram que as interações entre isoformas do citocromo P450 e flavonóides tem como principais reações a hidroxilação e a desmetilação (NIELSEN et al., 1998; HOLLMAN et al., 1999; HODEK, TREFIL, STIBOROVA, 2002; BREINHOLT et al., 2002; BREINHOLT et al., 2003). Alguns autores defendem que a seletividade das isoformas de P450 no metabolismo de flavonóides é direcionada por substituições de hidroxilação e metilação nas posições 3' e 4' do anel B (DOOTSDAR, BURKE, MAYER, 2000; NIELSEN et al., 1998; KASAI et al., 2009). A adição de hidroxilas nessas posições favorece o aumento da capacidade antioxidante dos flavonóides, sendo a hidroxila aromática um determinante crítico na doação de hidrogênio a radicais livres de compostos fenólicos (NG, LIU, WANG, 2000).

Estudos evidenciam a hidrólise de rutina em quercetina, e subsequente absorção pelo organismo, por ação de enterobactérias do intestino delgado. Após administração oral de rutina, a quercetina é gradualmente recuperada em plasma de indivíduos com o cólon intacto (OLTHOF et al., 2000), mas não é detectável no plasma de pacientes com ileostomia (HOLLMAN et al., 1995). Rice-Evans e colaboradores propuseram um esquema metabólico da quercetina em que o heterociclo da flavona é clivado em ácidos fenólicos sujeitos à subsequente desidroxilação, *O*-metilação, ou oxidação a derivados do ácido benzóico (EVANS, MILLER, PAGANGA, 1996).

Estudos *in vitro* do metabolismo de flavonóides, dentre eles a naringenina, com microsomas de fígado humano em presença de NADPH resultaram na produção de uma série de produtos desmetilados e hidroxilados. A seletividade das isoformas de P450 por hidroxilação e demetilação nas posições 3' e 4' foram registradas. Achados similares foram observados em microsomas de fígado de ratos fêmeas, sugerindo a presença de uma rota preferencial para a biotransformação de flavonóides em várias espécies diferentes. Os estudos mostram que as isoformas CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4 participam do metabolismo de flavonóides, com diferentes afinidades (NIELSEN et al., 1998).

1.4. ESTUDOS DE *DOCKING* NA PREVISÃO DE ROTAS METABÓLICAS

O *docking* é o método mais utilizado com a finalidade de simular a atividade enzimática que ocorre no organismo humano, com ferramentas computacionais que possibilitam a previsão do sítio de metabolismo do substrato, baseando-se na observação de quais átomos estão expostos ou próximos ao centro catalítico, o átomo de ferro do heme (STJERNSCHANTZ, VERMEULEN e OOSTENBRINK, 2008; VAN DIJK, BOELENS e BONVIN, 2005). Nestes experimentos, informações importantes como distância de ligação e aspectos estruturais envolvidos na interação entre os resíduos da enzima e do ligante, bem como a orientação do substrato dentro do sítio ativo da enzima, são fornecidos através do *docking* de moléculas de interesse (JULSING et al., 2008). Além disso, o *docking* é útil na determinação da regioseletividade das reações catalisadas por CYP.

O *docking* é composto por um conjunto de previsões baseadas no ranqueamento das melhores poses ou *cluster* de ocupação do substrato, ancoradas no sítio ativo da proteína alvo. A afinidade de ligação pode ser prevista através da comparação de quão efetivamente os ligantes se ligam à proteína (funções de pontuação e ranqueamento). O ranqueamento ou classificação é estabelecido com a priorização das poses energeticamente favorecidas e com orientações de ligação efetiva à proteína, determinada por algoritmo computacional. Essa priorização é definida por diferentes funções de cálculo da energia de interação, tais como eletrostática, ligação de hidrogênio, van der Waals, entropia e solvatação explícita, descritos como uma combinação de algoritmo de busca associado à função de pontuação (*scoring*) = *ranqueamento* (KROEMER, 2007).

A análise conformacional de uma molécula é realizada pela rotação de uma ligação, com mudança paralela dos ângulos torcionais ou diédricos das ligações, e cálculos correspondentes de energia estérica, decorrente da sobreposição espacial de átomos não-ligados e barreiras torcionais de rotação. Em abordagens de mecanismos moleculares e bioativação, a análise conformacional compreende um processo de três etapas distintas. Primeiro, os substratos são acoplados no sítio ativo da proteína, com seleção das poses favoráveis energeticamente. Em segundo lugar, as poses de *docking* escolhidas são submetidas à minimização de energia, utilizando campo de forças específicos, para simulação de dinâmica molecular com análise da orientação do substrato de ligação e a distância do ferro do grupo heme. E em terceiro, a abstração átomo de hidrogênio de fragmentos selecionados de ambos os substratos é calculada pelo método de química quântica (Figura 4). Esta estratégia de previsão tem sido gradualmente aceita e adotada por diversos pesquisadores de

química computacional para realizar a previsão do metabolismo de fármacos (SUN e SCOTT, 2010). De modo geral, a escolha entre as aproximações propostas por análise conformacional depende das propriedades que se deseja avaliar, da precisão desejada e da capacidade computacional disponível para a realização dos cálculos (ANDRADE, TROSSINI e FERREIRA, 2010).

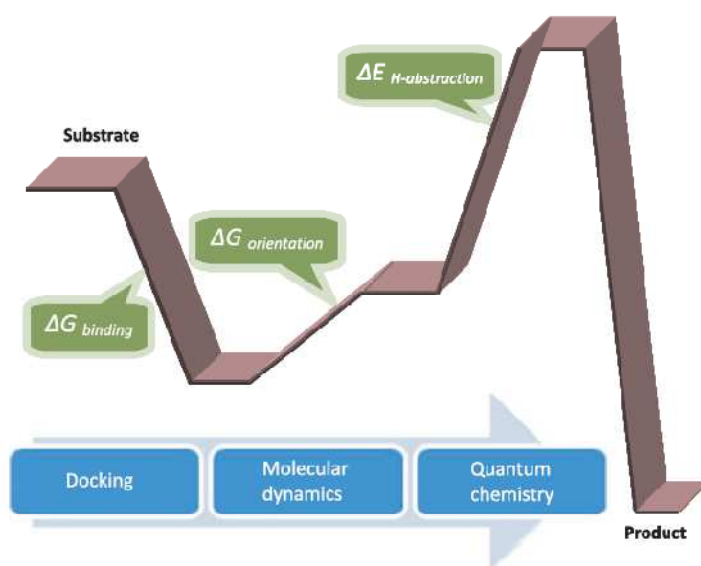


Figura 4 – Variação da energia de ligação do substrato para formação de produto mediado por citocromo P450. Uma combinação de *docking*, dinâmica molecular e cálculo de química quântica proposta para previsão de metabolismo *in silico* (SUN e SCOTT, 2010).

Existem atualmente mais de 80.000 estruturas de proteínas ou ácidos nucleicos, (MILLER et al., 1994) ou sequência do genoma humano para aplicação de genômica estrutural (SOUSA, FERNANDES e RAMOS, 2006), obtidas por cristalografia de raios-X e por ressonância magnética nuclear (RMN), disponíveis no banco de dados de proteínas *Protein Data Bank* (PDB) (www.rcsb.org/) (Figura 5).

Muitas dessas macromoléculas, elucidadas estruturalmente, desempenham um papel vital em vias metabólicas críticas e podem ser consideradas como potenciais alvos terapêuticos, oferecendo oportunidades para a descoberta e desenvolvimento de fármacos com SBDD. Neste contexto, a exata previsão do ligante, bem como a forma de interação com as macromoléculas de estrutura tridimensional conhecida, é uma solução de fundamental importância no planejamento racional de medicamentos.

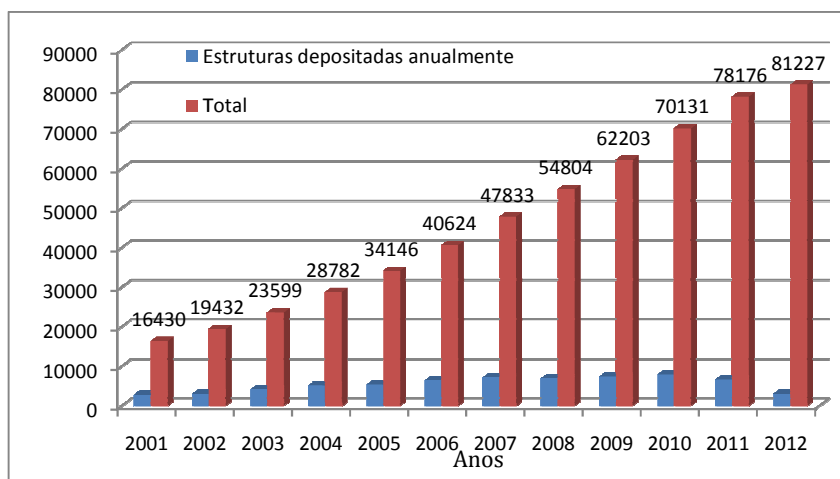


Figura 5 – Crescimento do conteúdo do *Protein Data Bank* nos últimos anos. Número de estruturas depositadas anualmente e número total presente no banco de dados do PDB (PROTEIN DATA BANK, 2012).

Um crescente número de algoritmos de busca e funções de pontuação ou *scoring* estão disponíveis. O algoritmo de busca deve permitir que os graus de liberdade do sistema proteína-ligante a ser amostrado seja suficiente para incluir as verdadeiras formas de interação. Naturalmente, os dois elementos críticos de um algoritmo de busca são a velocidade e eficácia na cobertura do espaço conformacional relevante. Entre outros requisitos, a função de pontuação deve representar a termodinâmica de interação do sistema proteína-ligante adequadamente, bem como distinguir as verdadeiras formas de interação de todos os demais sítios explorados, e classificá-los de forma ordenada. Além disso, ele deve ser rápido o suficiente para permitir sua aplicação a um grande número de possíveis soluções (SOUSA, FERNANDES e RAMOS, 2006).

A solução ideal seria combinar o algoritmo de busca com a função de pontuação mais adequados para determinado problema. No entanto, diversos estudos têm mostrado que o desempenho das ferramentas de *docking* é altamente dependente das características específicas de cada sítio de ligação e sua interação com o ligante, e que a avaliação de qual método seria o mais adequado, de maneira precisa, é quase impossível (KUNTZ et al., 1982; SCHULZ-GASCH e STAHL, 2003; CHARIFSON et al., 1999; CLARK et al., 2002; STAHL e RAREY, 2001; HALPERIN, WOLFSON e NUSSINOV, 2002; BISSANTZ, FOLKERS e ROGNAN, 2000).

Em estudos de *docking* são utilizados algoritmos extremamente rápidos, que demonstram certa precisão. Devido à vasta quantidade de dados pesquisados, isso é necessário para se obter uma técnica com o menor tempo possível de análise para cada

molécula. Uma das grandes vantagens observadas na utilização de técnicas de modelagem molecular baseadas na estrutura do receptor é a possibilidade de visualizar as diversas alterações que ocorrem na molécula. Algumas alterações que podem ser evidenciadas são: o posicionamento correto dos hidrogênios receptores e doadores de elétrons, sítios ativos da proteína que foram ocupados pelo substrato, dentre outros (YOUNG, 2009).

O sucesso de um algoritmo de *docking* na previsão de interações do ligante é normalmente medido em termos de desvio da raiz quadrada média (*root-mean-square deviation*, RMSD) entre o observado experimentalmente para as posições dos átomos dos ligantes e aquela(s) previstas pelo algoritmo. A flexibilidade do sistema é um grande desafio na busca das poses corretas. O número de graus de liberdade incluídos na pesquisa conformacional é aspecto central e determinante na eficiência da pesquisa (MUEGGE e RAREY, 2001).

Dentre os diversos algoritmos utilizados, destacam-se os algoritmos genéticos. Algoritmos genéticos são modelados com traços genéticos ideais, sendo obtidos em uma população através da análise de mutação, herança, elitismo, etc. Assim, quando utilizado esse tipo de algoritmo, inicialmente, o cálculo gera uma população aleatória (cada membro em uma posição ligante particular). Em seguida, gerações sucessivas de moléculas são experimentadas, mantendo principalmente os traços considerados superiores ("sobrevivência do mais apto"), por combinação dos resultados encontrados de pais e mutações aleatórias. Depois de várias gerações, os mais aptos, ou seja, com melhor pontuação/energia, são escolhidos para otimização. Algoritmos genéticos podem realizar simulações completas em um determinado estudo de *docking*, podendo ser executados rapidamente quando os parâmetros são escolhidos de forma racional e direcionada (YOUNG, 2009; TSAI, 2002).

Ao iniciar estudos de *docking*, o pesquisador deve executar uma validação dos testes realizados, com estruturas já conhecidas na literatura, para se certificar de que os parâmetros utilizados resultarão em interações, do substrato com a proteína, possíveis e aplicáveis. A validação prévia dos parâmetros pode significar definir o número de interações, as dimensões da área a ser pesquisada, tamanho do *grid*, ou qualquer outro parâmetro ajustável. Como exemplo de considerações paramétricas a serem avaliadas temos que o número necessário de interações será maior para moléculas maiores e mais flexíveis, ou maiores sítios ativos (WANG, LAI e WANG, 2002; THOMAS, 2000).

Um número significativo de artigos têm sido publicados com comparações sobre o desempenho de programas de *docking*. No entanto, estas publicações não são necessariamente comparáveis entre si, porque não há nenhuma medida universalmente estabelecida de

desempenho de *docking*. A maioria das publicações utilizam-se dos seguintes parâmetros comparativos: (1) a capacidade de reproduzir a posição ligante identificado a partir de experimentos de cristalografia de raios X e RMN (2) a precisão da previsão de vínculo das energias livres, no ranking de ensaios bioquímicos semelhantes, e (3) a capacidade de discriminar os inibidores conhecidos de outros fármacos. Felizmente, acredita-se haver uma correlação bastante elevada entre essas métricas (VAN DIJK, BOELEN e BONVIM, 2005; SUN e SCOTT, 2010).

Dentre os programas mais utilizados para estudos de *docking*, o AutoDock é o mais citado na literatura (Figura 6). Essa ampla utilização pode ser devido à disponibilidade do programa, que é gratuito para acadêmicos, enquanto a maioria dos pacotes de *docking* são vendidos comercialmente. O AutoDock possui um conjunto de ferramentas automatizadas de *docking* desenvolvido no *The Scripps Research Institute* (<http://autodock.scripps.edu/>). Ele foi projetado para prever como pequenas moléculas, tais como substratos ou candidatos à fármaco, se ligam a um receptor de estrutura 3D conhecida. Distribuições atuais de AutoDock consistem de duas gerações de software: AutoDock 4 e AutoDock Vina. O AutoDock 4 na verdade consiste de dois programas principais: o AutoDock que realiza o acoplamento do ligante a um conjunto de *grids* ou caixas descrevendo o alvo da proteína; e o AutoGrid que pré-calcula esses *grids*. Além de usá-los para os estudos de *docking*, *grids* de afinidade atômica podem ser visualizados. Isso pode ajudar, por exemplo, no direcionamento dos químicos orgânicos sintéticos no desenvolvimento do melhor ligante.

O AutoDock Vina não requer escolha dos tipos de átomo e/ou mapas de pré-cálculo de *grids* para eles. Em vez disso, ele calcula os *grids* internamente, para os tipos de átomos que são necessários, e faz isso quase instantaneamente. Existe disponível, também, uma interface gráfica chamada AutoDockTools, ou ADT, que ajuda na definição de quais ligações serão tratadas como rotativas para o ligante e como serão feitas as análises de escala, dentre outras coisas.

As principais aplicações do AutoDock podem ser: cristalografia de raios X; estrutura baseada em desenho de fármacos; otimização molecular; triagens virtuais (*High Throughput Screening* - HTS); projeto combinatorial de biblioteca de moléculas; *docking* de proteína-proteína; estudos de mecanismos físico-químicos. O AutoDock 4 é gratuito e está disponível sob a *General Public License* (GNU), enquanto que o AutoDock Vina está disponível sob a licença Apache, permitindo uso comercial e não comercial e redistribuição (<http://autodock.scripps.edu/>).

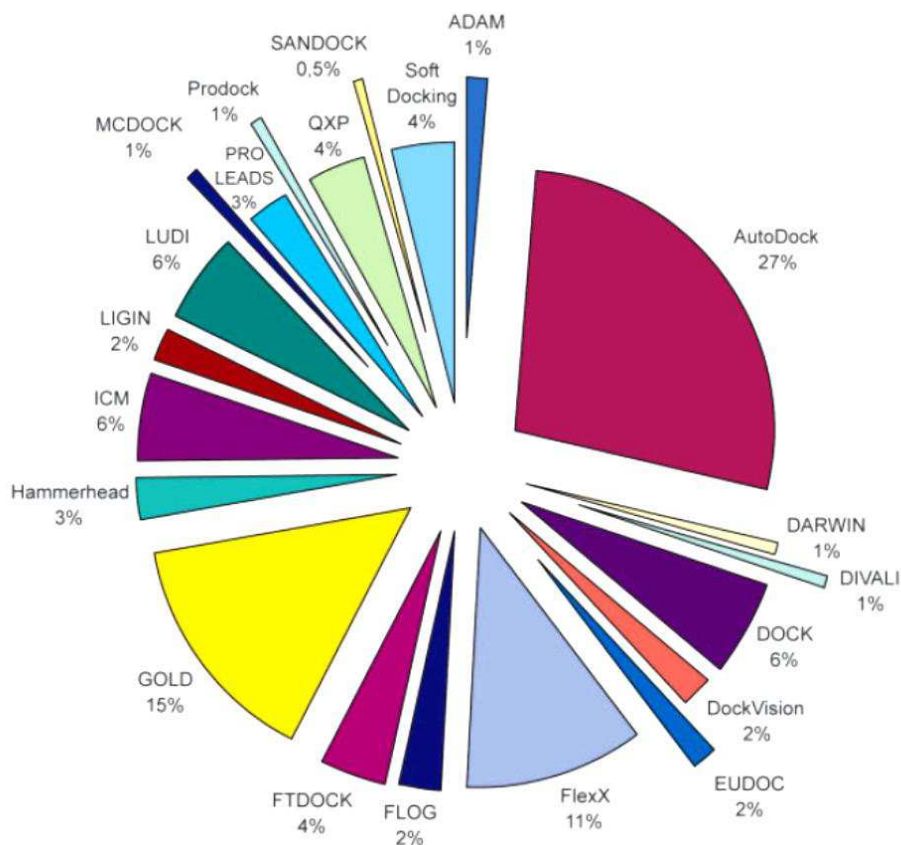


Figura 6 – Programas utilizados em estudos de *docking* e número de citações de cada programa, analisado pela *ISI Web of Science* (2005), considerando qualquer referência original (SOUSA, FERNANDES e RAMOS, 2006).

1.5. A IMPORTÂNCIA DOS FLAVONÓIDES COMO CANDIDATOS A NOVOS FÁRMACOS

Os flavonóides são compostos naturais polifenólicos que constituem a classe mais abundante de produtos naturais e dietéticos, presentes em frutas (frutas cítricas, cereja, uva, maçã), verduras (cebola, pimenta verde, brócolis, tomate, espinafre), bebidas (chás de folhas e grãos), suplementos dietéticos e medicamentos fitoterápicos, como *Gingo biloba*, sendo que mais de 6.000 tipos diferentes de flavonóides foram identificados e classificados (HODEK, TREFIL e STIBOROVA, 2002). Os flavonóides possuem uma estrutura molecular padrão (Figura 7) e dividem-se em seis grandes classes, como mostrado na Tabela 2.

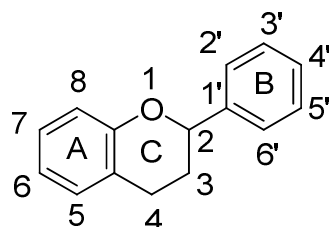


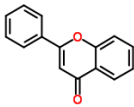
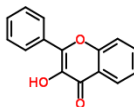
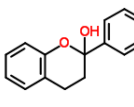
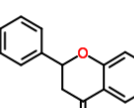
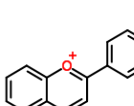
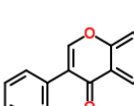
Figura 7 – Estrutura molecular padrão dos flavonóides (ANDROUTSPOULOS e PAPAKY, 2010).

Extensas investigações de sua atividade nos últimos 30 anos demonstraram a sua potencial capacidade preventiva de várias doenças, tais como doença cardiovascular, doenças inflamatórias, infecções virais, diabetes e desordens neurológicas (SCALBERT e WILLIAMSON, 2000; VAOUZOUR et al, 2008.; RATHEE et al, 2009;. ANDRES, DONOVAN e KUHLENSCHMIDT, 2009). Dentre as diversas propriedades bioquímicas e farmacológicas, uma das atividades mais investigadas é a sua contribuição para prevenção do câncer. Flavonóides podem inibir a formação de tumores e proliferação de células cancerosas através de vários mecanismos biológicos de ação.

Os flavonóides ingeridos na dieta são inicialmente metabolizados no intestino por enterobactérias, sendo que flavonóides glicosídicos são frequentemente clivados em flavonóides livres (agliconas) e ambos glicosídeos e agliconas são absorvidos (HOLLMAN, KATAN, 1997). Após absorção, os flavonóides são submetidos a outro importante local de biotransformação, o fígado, que contém ampla variedade de enzimas metabolizadoras de fase I e II. Os flavonóides são gradualmente hidroxilados e / ou *O*-desmetilados por citocromo P450 (Fase I) e, em seguida, submetidos a reações de conjugação (glicuronidação, sulfatação e *O*-metilação) catalisadas por enzimas de fase II (RICE-EVANS, 2001).

Os efeitos enzimáticos de ativação procarcinogênica, presente na família CYP1 do citocromo P450, associados à rota metabólica de flavonóides, tem sido importante foco de estudo para prevenção de câncer durante a última década (KHAN et al., 1992; LE MARCHAND, 2002; ANDROUTSPOULOS e PAPAKY, 2010).

Tabela 2 – Classificação dos flavonóides e suas fontes alimentares (HEIM, TAGLIAFERRO e BOBILYA, 2002).

Subclasses	Estrutura Principal	Flavonóides	Fontes alimentares
Flavonas		Apigenina, luteolina, rutina	Casca de maçã, aipo, vinho tinto, pele do tomate
Flavonóis		Quercetina, kaempferol	Cebola, maçã, chás
Flavanóis		Catequina, epicatequina	Chás
Flavanonas		Hesperitina, naringenina, naringina	Frutas cítricas, <i>grapefruit</i>
Antocianinas		Cianidina	Cerejas
Isoflavonas		Genisteína, daidzeína	Soja

As enzimas CYP1A1 e CYP1B1 têm mostrado expressão excessiva em tumores e metabolização de pró-carcinógenos epóxido intermediários, que são ativados para diol-epóxidos pela enzima epóxido hidrolase (MURRAY et al, 1995;. MURRAY et al, 1997.; SHIMADA e FUJII-KURIYAMA, 2004). O produto químico mais comum, extensivamente estudado por sua carcinogenicidade, é o Benzo[a]Pireno (ou B[a]P). A formação de B[a]P-7,8-diol-9,10-epóxidos, conhecido como região da baía de epóxidos, causa aceleração nas mutações do DNA, devido à alta reatividade destes produtos químicos (Figura 8). Qualquer composto capaz de interferir neste processo, bloqueando a formação de intermediários

reativos, pode potencialmente prevenir a iniciação da carcinogênese. A capacidade dos flavonóides em inibir a atividade enzimática de CYP1, e como resultado a formação de produtos carcinogênicos mediados por CYP1, tem sido defendida por vários grupos de pesquisa (CIOLINO, WANG e YEH, 1998; CIOLINO, DASCHNER e YEH, 1999; CIOLINO e YEH, 1999; WEN e WALLE, 2005). Além disso, é cada vez mais aceito que os flavonóides podem ser, por si mesmos, substratos para enzimas CYP1, podendo causar a inibição do crescimento de células tumorais pela formação de produtos de conversão farmacologicamente mais ativos (ARROO et al., 2008; ARROO et al., 2009; ANDROUTSOPOULOS et al., 2009).

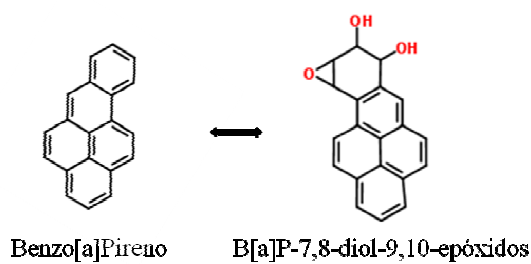


Figura 8 – Reação de transformação do Benzo[a]Pireno (ou B[a]P) em B[a]P-7,8-diol-9,10-epóxidos.

Estudos recentes confirmaram que o metabolismo oxidativo de flavonóides por CYPs ocorre em microsomas do fígado humano, enzimas humanas recombinantes e Aroclor 1254-induzida de microsomas de fígado de rato (BREINHOLT et al., 2002; BREINHOLT et al., 2003). O envolvimento de CYP1A2 como um dos principais contribuintes no metabolismo de flavanonas (naringenina e hesperitina), flavonóis (tamarixetin) e flavonas (kaempferol, apigenina e tangeretinas) verificado por estudos de inibição, potencializados por fluvoxamina, um inibidor seletivo do CYP1A2, resultou em formação reduzida dos metabólitos correspondentes hidroxilados. CYP3A4, CYP2C9 e CYP2D6 também foram capazes de catalisar o metabolismo oxidativo de alguns dos flavonóides testados, embora em quantidades consideravelmente menores do que CYP1A2. As principais vias metabólicas envolvidas no processo de oxidação, catalisada por CYP1A2, são a 3'-hidroxilação e 4'-O-desmetilação do anel B. No entanto, essas reações também foram observadas apenas quando os flavonóides sofreram metabolismo por CYP3A4 (BREINHOLT et al., 2002; BREINHOLT et al., 2003).

Os flavonóides quercetina e naringina também demonstraram característica inibitória de CYP3A4, o que contribuiu para a supressão dessa enzima (MUTO et al., 2001; HO e

SAVILLE, 2001). CYP3A4 é a enzima mais abundante dentre as isoformas de CYP no fígado, e metaboliza um número significativo de agentes cancerígenos e medicamentos. Estudos em animais, além de estudos *in vitro*, têm mostrado que as catequinas presentes em chás e extratos “desintoxicantes” aumentam a atividade de várias enzimas antioxidantes, como a glutatona redutase, glutatona peroxidase, glutatona S-redutase, catalase, e quinona reductase (KHAN et al., 1992; VALERIO JR et al., 2001; BORRADAILE et al., 2003; EDENHARDER et al., 2002).

Os flavonóides quercetina, rutina, naringina e naringenina (Figura 9) são representantes bastante estudados por apresentarem-se abundantemente na dieta da maioria dos indivíduos, e se destacam não apenas pelas propriedades terapêuticas antioxidantes e redutoras de colesterol, mas também por modular o metabolismo de diversos xenobióticos, tornando-se foco de diversas pesquisas.

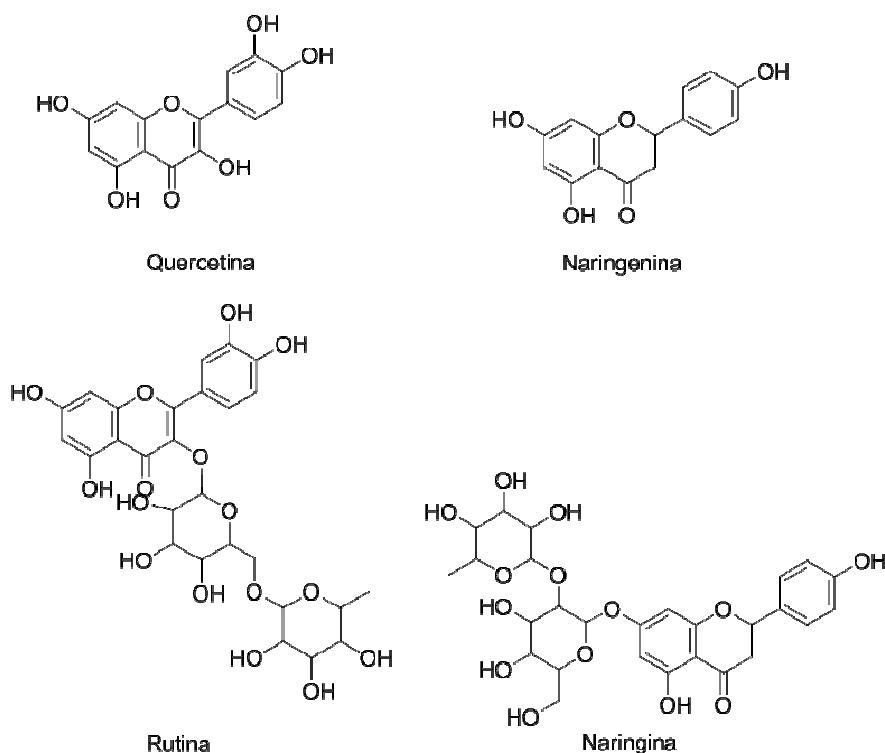


Figura 9 - Estrutura dos flavonóides quercetina, rutina, naringina e naringenina.

2. OBJETIVOS

Face ao exposto, o objetivo geral deste trabalho é o estudo do metabolismo de alguns dos flavonóides mais abundantes na alimentação, quercetina, rutina, naringenina e naringina, através do emprego de ferramentas de modelagem molecular.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Prever os principais sítios de metabolismo dos flavonóides em estudo, utilizando ferramentas baseada no ligante, como o Metaprint2D;
- Realizar estudos de *docking* entre quercetina, rutina, naringina e naringenina, com as isoformas CYP1A2 e CYP2C9;
- Propor os principais sítios de metabolismo destes candidatos a novos fármacos via citocromo P450;
- Comparar os metabólitos obtidos para os flavonóides quercetina, rutina, naringina e naringenina.

3. METODOLOGIA

Os estudos *in silico* do metabolismo de flavonóides foram realizados em estações computacionais disponíveis no LabMol (Laboratório de Planejamento de Fármacos e Estudos de Metabolismo utilizando Modelagem Molecular) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, operando em sistema Linux Ubuntu.

3.1. PREVISÃO DO METABOLISMO UTILIZANDO METAPRINT2D

Para previsão dos sítios de metabolismo (SOM) e dos metabólitos dos flavonóides em estudo, foi utilizado o programa MetaPrint2D. O MetaPrint2D é uma nova ferramenta, que implementa uma abordagem de cruzamento de dados para a previsão dos sítios de metabolismo dos xenobióticos presentes na literatura. O algoritmo é baseado em uma análise estatística das ocorrências do átomo central, avaliando a correlação em ambos os substratos e metabólitos, como impressões digitais circulares. Esta abordagem foi avaliada exaustivamente e apresentada com uma precisão comparável às ferramentas experimentais atuais. Além disso, o MetaPrint2D é capaz de fazer previsões muito mais rápidas, permitindo que os químicos medicinais explorem os efeitos das modificações estruturais no metabolismo de um composto de uma maneira altamente responsiva e interativa. O MetaPrint2D é capaz de atribuir uma pontuação de confiança para as previsões que gera, com base na disponibilidade de dados relevantes e no grau em que um composto é modelado pelo algoritmo (CARLSSON et al., 2010).

O software Metaprint2D foi utilizado na plataforma web (<http://www-metaprint2d.ch.cam.ac.uk/metaprint2d/>), inserindo o código *SMILES* de cada flavonóide.

3.2. PREPARO DAS PROTEÍNAS E DOS LIGANTES PARA OS ESTUDOS DE DOCKING

Para a previsão de metabolismo *in silico* utilizando as ferramentas de SBDD, foi necessária a busca das estruturas tridimensionais das isoformas de CYP determinadas experimentalmente. As estruturas cristalográficas das isoformas CYP2C9 e CYP1A2, de

melhor resolução, foram obtidas no banco de dados PDB (*Protein Data Bank*), sob os códigos 1R9O (CYP2C9 cocristalizada com flurbiprofeno, 2.00 Å de resolução) (WESTER et al., 2004) e 2HI4 (CYP1A2 complexada com alfa-naftoflavona, 1.95 Å de resolução) (SANSEN et al., 2007).

Para os estudos de *docking*, as estruturas obtidas no PDB de CYP2C9 e CYP1A2 foram preparadas: (i) a molécula do ligante foi removida do sítio ativo da proteína; (ii) as moléculas de água foram removidas, exceto as moléculas de água presentes no sítio ativo - wat600, wat819 e wat842 para CYP2C9 e wat733 para CYP1A2 (SANSEN et al., 2007); (iii) o programa *Molecular Operating Environment* (MOE), versão 2008.10 (Chemical Computing Group Inc., Montreal, Canadá), foi utilizado para adicionar os hidrogênios e realizar minimização de energia, utilizando o campo de força AMBER99 (CORNELL et al., 1995) e cargas atômicas AMBER99 (ODA, YAMAOTSU e HIRONO, 2005) até que o RMS atingisse valores inferiores a $0,01 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$, com o método truncado de Newton. O átomo de ferro do grupo heme foi modificado para apresentar carga de +3 (Fe^{3+}). Os estados de protonação foram calculados em pH=7, com o auxílio do programa MOE, com a ferramenta "Protonate 3D". Os estados de protonação das histidinas foram calculados de acordo com a presença de ligações de H.

As estruturas cristalográficas dos ligantes também foram obtidas no PDB, sendo a quercetina (código PDB: 3NVY), rutina (código PDB: 1RY8) e naringenina (código PDB: 2UXU), e tiveram suas cargas parciais calculadas utilizando o método semi-empírico AM1.

A estrutura da naringina não foi encontrada no PDB e, portanto, foi desenhada a partir da combinação da molécula de naringenina e a fração de glicose da rutina, com suas devidas modificações, na posição 7 do anel A, no programa MOE. Após o desenho, a estrutura da naringina foi minimizada utilizando o campo de força MMFF94x e suas cargas foram calculadas utilizando o método AM1.

3.3. ESTUDOS DE DOCKING

Os estudos de *docking* foram realizados com o programa AutoDock 1.5.4, versão 4.2, para previsão do metabolismo de flavonóides baseado na estrutura (SBDD), com aplicação do Algoritmo Genético Lamarckiano (GA).

As macromoléculas foram adicionadas de hidrogênios polares e as cargas Kollman foram atribuídas. O *docking* foi realizado com a estrutura da proteína rígida e os ligantes

flexíveis. A caixa de interação (*grid*) foi definida no Autogrid, com dimensões de 54 Å x 60 Å x 50 Å (eixos x, y e z) para CYP2C9 e 58 Å x 56 Å x 70 Å (x, y e z) para CYP1A2. Para determinar a eficiência do *grid* e os parâmetros de *docking*, os protocolos de *docking* para cada uma das macromoléculas foram validados (*redocking*), utilizando o receptor (citocromo P450) e o ligante original na estrutura do PDB. A melhor pontuação de *docking* foi aquela que apresentou valor de RMSD (*Root Mean Deviation Square*) igual ou inferior a 2,0 Å entre as posições da estrutura cristalográfica com as estruturas obtidas do *docking* (WANG, LAI e WANG, 2002).

3.4. MINIMIZAÇÃO DE ENERGIA

Para um refinamento dos resultados de *docking*, foram aplicadas novas abordagens nos cálculos de energia de diferentes poses. A análise foi simplificada através da seleção de uma conformação/pose de cada *cluster*, baseada no fato de que poses com posições semelhantes de pontuação têm um padrão de interação similar. Os melhores complexos (conformações ou poses) de cada flavonóide foram selecionados e submetidos à minimização de energia no programa Desmond versão 2.2, com campo de força OPLS2005, algoritmo *steepest descent*, critério de convergência por *gradient* e critério de gradiente de 0,05 Å. A fim de determinar os SOM do substrato, as distâncias entre o ferro do grupo heme (CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4 e CYP2D6) e o possível SOM dos flavonóides (previstos pelo Metaprint2D) foram medidas, e selecionadas conformações que apresentaram distâncias cataliticamente ativas, com valor igual ou inferior a 5 Å.

4. ANEXO

ARTIGO SUBMETIDO EM REVISTA
(Journal of Molecular Graphics and Modelling)

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com os métodos computacionais utilizados elucidaram as prováveis regiões de metabolismo, bem como importantes interações dos flavonóides em estudo com os resíduos de aminoácidos presentes nos sítios ativos de CYP2C9 e CYP1A2.

As interações encontradas sugerem que a presença da cadeia de açúcar exerce grande influência no posicionamento estérico, ao interagir com o sítio ativo da enzima, modificando as interações realizadas pela molécula. As enzimas CYP são responsáveis por mediar reações que exibem régio- e estereosseletividade. A regioselectividade das transformações de catálise por CYP450 - o átomo ou átomos em que a reação ocorre - é determinada por um certo número de fatores, incluindo a energia necessária para remover um átomo de hidrogênio a partir do substrato (energia abstração do hidrogênio), a estabilidade do radical de carbono resultante, e também da estrutura e da forma do sítio ativo de CYP450, com específica variação do processo de catálise. As interações de aminoácidos podem explicar a orientação do substrato dentro do sítio ativo de CYP450.

Os estudos realizados apresentaram importantes interações de resíduos de aminoácidos no metabolismo. Para a isoforma CYP2C9 foi possível observar interações dos resíduos Asn474, Ser209, Thr304 e Arg108 com participação em quase todos os processos metabolicamente ativos, sugerindo que estes resíduos são importantes para a regioselectividade e posicionamento do substrato. O mesmo foi observado para os resíduos Asp313, Phe226, Phe256 e Phe260 da isoforma CYP1A2. Porém, para os aminoácidos Phe226, Phe256 e Phe260 ocorreram também interações $-\pi$, ou empilhamento $-\pi$, sugerindo que o empilhamento dos anéis ocorre quando o anel de benzeno e o anel de pirano estão em conformação estável e favorável ao metabolismo do anel fenólico livre com o grupamento ferro do heme.

As moléculas de água estruturais apresentaram papel essencial nas cavidades de ligação dos citocromos P450, proporcionando alta mobilidade para o substrato, o que facilita a entrada e saída do ligante no sítio ativo e reduz a energia necessária para esse deslocamento.

[CHA2] Comentário:

6. PERSPECTIVAS

Os resultados aqui apresentados oferecem novas oportunidades para otimizar a aplicação de flavonóides como candidatos a novos fármacos, capazes de serem metabolizados pela família do citocromo P450.

Como perspectivas deste trabalho, estudos comparativos com métodos *in vitro* e *in vivo* devem ser feitos para verificar a correspondência com os estudos de metabolismo *in silico*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, J.; SHOICHET, B. **Virtual Screening in Drug Discovery**. 1. ed. Boca Raton: FL CRC Press, 2005.

ANDRADE, C. H., TROSSINI, G. H. G., FERREIRA, E. I. Modelagem molecular no ensino de química farmacêutica. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 7, n. 1, p. 1-23, 2010.

ANDRES, A.; DONOVAN, S. M.; KUHLENSCHMIDT, M. S. Soy isoflavones and virus infections. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, n. 8, p. 563–569, 2009.

ANDROUTSOPOULOS, V. P.; MAHALE, S.; ARROO, R. R.; POTTER, G. A. Anticancer effects of the flavonoid diosmetin on cell cycle progression and proliferation of MDA-MB 468 cells, due to CYP1 activation. **Oncology Reports**, v. 21, p. 1525–1528, 2009.

ANDROUTSPOULOS, V. P.; PAPAKY, A. Dietary flavonoids in cancer therapy and prevention: Substrates and inhibitors of cytochrome P450 CYP1 enzymes. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 126, n. 1, p. 9–20, 2010.

ANSEDE, J. H.; THAKKER, D. R. High-throughput screening for stability and inhibitory activity of compounds toward cytochrome P450-mediated metabolism. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, p. 239-255, 2004.

ARROO, R. R. J.; ANDROUTSOPOULOS, V.; BERESFORD, K.; RUPARELIA, K.; SURICHAN, S.; WILSHER, N. Phytoestrogens as natural prodrugs in cancer prevention: dietary flavonoids. **Phytochemistry Reviews**, v. 8, p. 375–386, 2009.

ARROO, R. R. J.; ANDROUTSOPOULOS, V.; PATEL, A.; SURICHAN, S.; WILSHER, N.; POTTER, G. A. Phytoestrogens as natural prodrugs in cancer prevention: a novel concept. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, p. 431–443, 2008.

AUTODOCK. The Scripps Research Institute. Disponível em: <autodock.scripps.edu/>. Acesso em: 27 out. 2011.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2001.

BERNDT, E. R.; GOTTSCHALK, A. H. B.; PHILIPSON, T. J.; STROBECK, M. W. Industry funding of the FDA: effects of PDUFA on approval times and withdrawal rates. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 545-554, 2005.

BERNSTEIN, F. C.; KOETZLE, T. F.; WILLIAMS, G. J. B.; MEYER, E. F.; BRICE, M. D.; RODGERS, J. R.; KENNARD, O.; SHIMANOUCI, T.; TASUMI, M. Protein Data Bank - computer-based archival file for macromolecular structures. **Journal of Molecular Biology**, v. 112, p. 535-542, 1977.

BISSANTZ, C.; FOLKERS, G.; ROGNAN, D. Protein-based virtual screening of chemical databases. 1. Evaluation of different docking/ scoring combinations. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 4759-4767, 2000.

BORRADAILE, L. E. de Dreu; BARRETT, P. H.; BEHRNIN, C.D.; HUFF M. W. Hepatocyte apoB-containing lipoprotein secretion is decreased by the grapefruit flavonoid, naringenin, via inhibition of MTP-mediated microsomal triglyceride accumulation. **Biochemistry**, v. 42, p. 1283-1291, 2003.

BOYER, S.; ARNBY, C. H.; CARLSSON, L.; SMITH, J.; STEIN, V.; GLEN, R. C. Reaction site mapping of xenobiotic biotransformations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 47, p. 583-590, 2007.

BREINHOLT, V. M.; OFFORD, E. A.; BROUWER, C.; NIELSEN, S. E.; BRØSEN, K.; FRIEDBERG, T. In vitro investigation of cytochrome P450-mediated metabolism of dietary flavonoids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 609-616, 2002.

BREINHOLT, V. M.; RASMUSSEN, S. E.; BRØSEN, K.; FRIEDBERG, T. H. In vitro metabolism of genistein and tangeretin by human and murine cytochrome P450s. **Pharmacology and Toxicology**, v. 93, p. 14-22, 2003.

BRUICE, T. C. Computational approaches: reaction trajectories, structures, and atomic motions. Enzyme reactions and proficiency. **ChemInform**, v. 106, p. 3119-3139, 2006.

CARLSSON, L.; SPJUTH, O.; ADAMS, S.; GLEN, R. C.; BOYER, S. Use of historic metabolic biotransformation data as a means of anticipating metabolic sites using MetaPrint2D and Bioclipse. **BMC Bioinformatics**, v. 11, p. 362-362, 2010.

CARVALHO, I.; PUPO, M. T.; BORGES, A. D. L.; BERNARDES, L. S. C. Introdução à modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**, v. 26, p. 428-438, 2003.

CHARIFSON, P. S.; CORKERY, J. J.; MURCKO, M. A.; WALTERS, W. P. Consensus scoring: a method for obtaining improved hit rates from docking databases of three-dimensional structures into proteins. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 5100–5109, 1999.

CIOLINO, H. P.; DASCHNER, P. J.; YEH, G. C. Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. **Biochemical Journal**, v. 340, p. 715–722, 1999.

CIOLINO, H. P.; WANG, T. T.; YEH, G. C. Diosmin and diosmetin are agonists of the aryl hydrocarbon receptor that differentially affect cytochrome P450 1A1 activity. **Cancer Research**, v. 58, p. 2754–2760, 1998.

CIOLINO, H. P.; YEH, G. C. The flavonoid galangin is an inhibitor of CYP1A1 activity and an agonist/antagonist of the aryl hydrocarbon receptor. **British Journal of Cancer**, v. 79, p. 1340–1346, 1999.

CLARK, R. D.; STRIZHEV, A.; LEONARD, J. M.; BLAKE, J. F.; MATTHEW, J. B. Consensus scoring for ligand/protein interactions. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 20, p. 281–295, 2002.

COOK, N.C.; SAMMAN, S. Flavonoids: Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, p. 66–76, 1996.

CORNELL, W. D.; CIEPLAK, P.; BAYLY, C. I.; GOULD, I. R.; MERZ, K. M.; FERGUSON, D. M.; SPELLMEYER, D. C.; FOX, T.; CALDWELL, J. W.; KOLLMAN, P. A. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. **Journal of American Chemical Society**, v. 117, p. 5179–5197, 1995.

CZODROWSKI, P.; KRIEGL, J. M.; SCHEUERER, S.; FOX, T. Computational approaches to predict drug metabolism. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, v. 5, n. 1, p. 15–27, 2009.

DARDEN, T. A.; PEDERSEN, L. G. Molecular modeling: an experimental tool. **Environmental Health Perspectives**, v. 101, p. 410–412, 1993.

DAY, A.J.; CANADA, F.J.; DIAZ, J.C.; KROON, P.A.; MCLAUCHLAN, R.; FAULDS, C.B.; MORGAN, M.R.; WILLIAMSON, G. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolyzed by lactase site of lactase phlorizin hydrolase. **FEBS Letters**, v. 468, p. 166–170, 2000.

DIMASI, J. A. Risks in new drug development: approval success rates for investigational drugs. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 69, p. 297–307, 2001.

DOOTSDAR, H.; BURKE, M.D.; MAYER, R.T. Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochromes P450 CYP1A and CYP1B1. *Toxicology*, v. 144, p. 31–38, 2000.

EATON, D. L.; GALLAGHER, E. P.; BAMMLER, T. K.; KUNZE, K. L. Role of cytochrome P450 1A2 in chemical carcinogenesis: implications for human variability in expression and enzyme activity. *Pharmacogenetics*, v. 5, p. 259–274, 1995.

EDENHARDER, R.; SAGER, J. W.; GLATT, H.; MUCKEL, E.; PLATT, K. L. Protection by beverages, fruits, vegetables, herbs, and flavonoids against genotoxicity of 2-acetylaminofluorene and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in metabolically competent V79 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 521, p. 57–72, 2002.

EKINS, S.; MESTRES, J.; TESTA, B. B. In silico pharmacology for drug discovery: applications to targets and beyond. *Journal of Pharmacology*, v. 152, p. 21–37, 2007.

EKINS, S.; STRESSER, D. M.; WILLIAMS, J. A. In vitro and pharmacophore insights into CYP3A enzymes. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 24, p. 161–166, 2003.

EVANS, R.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 20, p. 933–956, 1996.

EVANS, W. E.; RELING, M. V. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*, v. 286, p. 487–491, 1999.

FOYE, W.O.; LEMKE, T.L.; WILLIAMNS, D.A. *Principles of medicinal chemistry*. 4. ed. Baltimore: Williams & Wilkins Publications, 1995.

FRATEV, F.; BENFENATI, E. A combination of 3D-QSAR, docking, local-binding energy (LBE) and GRID study of the species differences in the carcinogenicity of benzene derivatives chemicals. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, v. 27, p. 147–160, 2008.

FRIESNER, R. A.; MURPHY, R. B.; REPASKY, M. P. Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 49, p. 6177–6196, 2006.

GOHLKE, H.; KLEBE, G. Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 41, p. 2644-2676, 2002.

GONDI N. K.; SEKHAR S. Role of Drug Metabolism in Drug Discovery and Development. **Medicinal Research Reviews**, v. 21, p. 397- 411, 2001.

GOPALAN, V.; PASTUSZYN, A.; GALEY, Jr.W.R.; GLEW, R.H. Exolytic hydrolysis of toxic plant glucosides by guinea pig liver cytosolic beta-glucosidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 14027–14032, 1992.

GUENGERICH, F. P. Metabolic activation of chemical carcinogens. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 345-351, 2000.

GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; ANDRICOPOULO, A. D. Virtual Screening and Its Integration with Modern Drug Design Technologies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 37-26, 2008.

HALPERIN, I.; MA, B.; WOLFSON, H.; NUSSINOV, R. Principles of docking: an overview of search algorithms and a guide to scoring functions. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 47, p. 409–443, 2002.

HAMMERSTONE, J.F.; LAZARUS, S.A.; SCHMITZ, H.H. Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2086S–2092S, 2000.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572–584, 2002.

HENCKEL, J.G.; BILLINGS, E.M. MOLECULAR MODELING. IN: FOYE, W.O.; LEMKE, T.L.; WILLIAMNS, D.A. (Eds.). **Principles of medicinal chemistry**. 4th. ed., Media: Williams & Wilkins, 1995. p.57-58.

HO, P. C.; SAVILLE, D. J. Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 217–227, 2001.

HODEK, P.; TREFIL, P.; STIBOROVA, M. Flavonoids potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. **Chemico-Biological Interactions**, Shannon, v. 139, p. 1-21, 2002.

HOLLMAN, P.C.H.; DE VRIES, J.H.M.; VAN LEEUWEN, S.D.; MENGELERS, M.J.B.; KATAN, M.B. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, p. 1276–1282, 1995.

HOLLMAN, P.C.; KATAN, M.B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 51, p. 305–310, 1997.

HOLLMAN, P.C.; BIJSMAN, M.N.; VAN GAMEREN, Y.; CNOSSEN, E.P.; DE VRIES, J.H.; KATAN, M.B. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. **Free Radical Research**, v. 31, p. 569–573, 1999.

HUANG, Z. **Drug Discovery Research: New Frontiers in the Post-Genomic Era**. 1. ed. Hoboken: NJ Wiley-Interscience, 2007.

HUEY, R.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J.; GOODSSELL, D. S. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. **Journal of Computational Chemistry**, v. 28, p. 1145–1152, 2007.

INGELMAN-SUNDBERG, M.; OSCARSON, M.; MCLELLAN, R. A. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 20, p. 42-348, 1999.

JENKINS, K. M.; ANGELES, R.; QUINTOS, M. T. Automated high throughput ADME assays for metabolic stability and cytochrome P450 inhibition profiling of combinatorial libraries. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, p. 989 -1004, 2004.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, p. 727-748, 1997.

JULSING, M. K.; VASILEV, N. P.; SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D., MUNTENDAM, R.; WOERDENBAG, H. J.; QUAX, W. J.; WOLFSON, H. J.; IONKOVA, I.; KAYSER, O. Metabolic stereoselectivity of cytochrome P450 3A4 towards deoxypodophyllotoxin: in silico predictions and experimental validation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 1171–1179, 2008.

KASAI, N.; IKUSHIRO, S.; HIROSUE, S.; ARISAWA, A.; ICHINOSE, H.; WARIISHI, H.; OHTA, M.; SAKAKI, T. Enzymatic properties of cytochrome P450 catalyzing 30-

hydroxylation of naringenin from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 387, p. 103–108, 2009.

KEMPF, D. J.; MARSH, K. C.; KUMAR, G.; RODRIGUES, A. D.; DENISSEN, J. F.; MCDONALD, E.; KUKULKA, M. J.; HSU, A.; GRANNEMAN, G. R.; BAROLDI, P. A.; SUN, E.; PIZZUTI, D.; PLATTNER, J. J.; NORBECK, D. W.; LEONARD, J. M. Pharmacokinetic enhancement of inhibitors of the human immunodeficiency virus protease by coadministration with ritonavir. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 41 p. 654-660, 1997.

KHAN, S. G.; KATIYAR, S. K.; AGARWAL, R.; MUKHTAR, H. Enhancement of antioxidant and phase II enzymes by oral feeding of green tea polyphenols in drinking water to SKH-1 hairless mice: possible role in cancer chemoprevention. **Cancer Research**, v. 52, p. 4050–4052, 1992.

KIRCHHEINER, J.; SEERINGER, A. Clinical implications of pharmacogenetics of cytochrome P450 drug metabolizing enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1770, p. 489-494, 2007.

KIRTON, S. B.; MURRAY, C. W.; VERDONK, M. L. Prediction of binding modes for ligands in the cytochromes P450 and other heme-containing proteins. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 58, p. 836-844, 2005.

KLEBE, G. Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. **Drug Discovery Today**, v. 11, p. 580-594, 2006.

KROEMER, R. T. Structure-based drug design: docking and scoring. **Current Protein and Peptide Science**, v. 8, p. 312–328, 2007.

KUBINYI, H. **3D QSAR in drug design. Theory, methods and applications**. Leiden: ESCOM, 1993.

KUMAR, G. N.; RODRIGUES, A. D.; BUKO, A. M.; DENISSEN, J. F. Cytochrome P450-mediated metabolism of the HIV-1 protease inhibitor ritonavir (ABT-538) in human liver microsomes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 277, p. 423-431, 1996.

KUMAR, G. N.; SURAPANENI, S. Role of Drug Metabolism in Drug Discovery and Development. **Pharmacokinetics and Drug Metabolism**, v. 21, n. 5, p. 397-411, 2001.

KUNTZ, I. D.; BLANEY, J. M.; OATLEY, S. J.; LANGRIDGE, R.; FERRIN, T. E. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. **Journal of Molecular Biology**, v. 161, p. 269–288, 1982.

LE MARCHAND, L. Cancer preventive effects of flavonoids—a review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, p. 296–301, 2002.

LEACH, A. R. **Molecular Modelling: principles and Applications**. 2. ed., London, UK: Pearson Prentice Hall, 2001.

LIU, J.; LI, Y.; PAN, D.; HOPFINGER, A. J. Predicting permeability coefficient in ADMET evaluation by using different membranes-interaction QSAR. **International journal of pharmaceutics**, v. 304, p. 115–123, 2005.

LIVINGSTONE, D. J. The characterization of chemical structures using molecular properties. A survey. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 40, p. 195–209, 2000.

LOMBARDINO, J. G.; LOWE III, J. A. The role of the medicinal chemist in drug discovery – then and now. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 853–862, 2004.

MCGEE, J.; GOODYEAR, R. J.; MCMILLAN, D. R.; STAUFFER, E. A.; HOLT, J. R.; LOCKE, K. G.; BIRCH, D. G.; LEGAN, P. K.; WHITE, P. C.; WALSH, E. J.; RICHARDSON, G. P. The Very Large G-Protein-Coupled Receptor VLGR1: A Component of the Ankle Link Complex Required for the Normal Development of Auditory Hair Bundles. **Journal of Neuroscience**, v. 26, p. 6543–6553, 2006.

METAPRINT2D. University of Cambridge - Unilever Centre for Molecular Science Informatics. Disponível em: < www-metaprint2d.ch.cam.ac.uk/metaprint2d/>. Acesso em: 27 out. 2011.

MILLER, M. D.; KEARSLEY, S. K.; UNDERWOOD, D. J.; SHERIDAN, R. P. FLOG: a system to select “quasi-flexible” ligands complementary to a receptor of known three-dimensional structure. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 8, p. 153–174, 1994.

MINERS, J. O.; SMITH, P. A.; SORICH, M. J.; MCKINNON, R. A.; MACKENZIE, P. I. Predicting Human Drug Glucuronidation Parameters: Application of In Vitro and In Silico Modeling Approaches. **Annual Reviews Pharmacology and Toxicology**, v. 44, p. 1–25, 2004.

MORRIS, G. M.; GOODSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, R. K.; OLSON, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, p. 1639–1662, 1998.

MUEGGE, I.; RAREY, M. Small molecule docking and scoring. **Reviews in computational chemistry**, v. 17, p. 1–60, 2001.

MURRAY, G. I.; TAYLOR, M. C.; MCFADYEN, M. C.; MCKAY, J. A.; GREENLEE, W. F.; BURKE, M. D. Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. **Cancer Research**, v. 57, p. 3026–3031, 1997.

MURRAY, G. I.; TAYLOR, V. E.; MCKAY, J. A.; WEAVER, R. J.; EWEN, S. W.; MELVIN, W. T. The immunohistochemical localization of drug-metabolizing enzymes in prostate cancer. **The Journal of Pathology**, v. 177, p. 147–152, 1995.

MUTO, S.; FUJITA, K. I.; YAMAZAKI, Y.; KAMATAKI, T. Inhibition by green tea catechins of metabolic activation of procarcinogens by human cytochrome P450. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 479, p. 197–206, 2001.

NELSON, D. R.; KAMATAKI, T.; WAXMAN, D. J.; GUENDEGRICH, F. P.; ESTABROOK, R. W.; FEYERIESEN, R.; GONZALEZ, F. J.; COON, M. J.; GUNSAUS, I. C.; GOTOH, O.; OKUDA, K.; NEBERT, D. W. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession number, early trivial names of enzyme, and nomenclature. **DNA Cell Biology**, v. 12, p. 1–51, 1993.

NIELSEN, S.E.; BREINHOLT, V.; JUSTESEN, U.; CORNETT, C.; DRAGSTED, L.O. In vitro biotransformation of flavonoids by rat liver microsomes. **Xenobiotica**, v. 28, p. 389–401, 1998.

NG, T.B.; LIU, F.; WANG, Z.T. Antioxidative activity of natural products from plants. **Life Sciences**, v. 66, p. 709–723, 2000.

ODA, A.; YAMAOTSU, N.; HIRONO, S. New AMBER force field parameters of heme iron for cytochrome P450s determined by quantum chemical calculations of simplified models. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, p. 818–826, 2005.

OLTHOF, M.R.; HOLLMAN, P.C.H.; VREE, T.B.; KATAN, M.B. Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 1200–1203, 2000.

ORTIZ DE MONTELLANO, P.R. **Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry**. 3. ed. New York: Springer, 2010.

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 2. ed., New York: Oxford University Press, 2001.

PEREIRA, D. G.. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Química Nova**, v. 30, p. 171-177, 2006.

PRIVAL, M. J. Anomalous mutagenicity profile of cyclohexanone oxime in bacteria: cell survival in background lawns **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 497, p. 1-9, 2001.

PROTEIN DATA BANK. Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB). Disponível em: <www.rcsb.org/>. Acesso em: 02 de maio de 2012.

RATHEE, P.; CHAUDHARY, H.; RATHEE, S.; RATHEE, D.; KUMAR, V.; KOHLI, K. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. **Inflamm Allergy Drug Targets**, v. 8, p. 229–235, 2009.

RENDIC, S.; DI CARLO, F. J. Human Cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions. **Drug Metabolism Review**, v. 29, p. 413-580, 1997.

RICE-EVANS, C. Flavonoid antioxidants. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 797–807, 2001.

RODRIGUES, C. R. Processos modernos no desenvolvimento de fármacos: modelagem molecular. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v. 3, p. 43-49, 2001.

SANDERSON, D. M.; EARNSHAW, C. G. Computer Prediction of Possible Toxic Action from Chemical Structure; The DEREK System. **Human and Experimental Toxicology**, v. 10, p. 261-273, 1991.

SANSEN, S.; YANO, J. K.; REYNALD, R. L.; SCHOCH, G. A.; GRIFFIN, K. J.; STOUT, C. D.; JOHNSON, E. F. Adaptations for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons

exhibited by the structure of human P450 1A2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 14348–14355, 2007.

SANT'ANNA, C. M. R. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (Recomendações da IUPAC para 1997). **Química Nova**, v. 25, p. 505-512, 2002.

SANTOS-FILHO, O. A.; HOPFINGER, A. J.; ZHENG, T. Characterization of Skin Penetration Processes of Organic Molecules Using Molecular Similarity and QSAR Analysis. **Molecular Pharmaceutics**, v. 1, p. 466–476, 2004.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of dietary polyphenols. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2073S–2085S, 2000.

SCHAMES, J. R.; HENCHMAN, R. H.; SIEGEL, J. S.; SOTRIFFER, C. A.; NI, H.; MCCAMMON, J. A. Discovery of a novel binding trench in HIV integrase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 1879–1881, 2004.

SCHULZ-GASCH, T.; STAHL M. Binding site characteristics in structure based virtual screening: evaluation of current docking tools. **Journal of molecular modeling**, v. 9, p. 47-57, 2003.

SHIMADA, T.; FUJII-KURIYAMA, Y. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. **Cancer Science**, v. 95, p. 1–6, 2004.

SHIMADA, T.; YAMAZAKI, H.; MIMURA, M. Interindividual variations in human liver cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogen, and toxic chemicals. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 270, p. 414-423, 1994.

SINGH, S.; MALIK, B. K.; SHARMA, D. K. Molecular drug targets and structure-based drug design: a holistic approach. **Bioinformatics**, v. 1, p. 314-320, 2006.

SMITH, C. Tools of the trade. **Nature**, v. 446, p. 219- 222, 2007.

SMITH, D. A.; ACKLAND, M. J.; JONES, B. C. Properties of cytochrome P450 isoenzymes and their substrates part 1: active site characteristics. **Drug Discovery Today**, v. 2, p. 406-414, 1997.

SOTRIFFER, C. A.; SANSCHAGRIN, P.; MATTER, H. SFCscore: Scoring functions for affinity prediction of protein-ligand complexes. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 73, p. 395-419, 2008.

SOUSA, S. F.; FERNANDES, P. A.; RAMOS, M. J. Protein–Ligand Docking: Current Status and Future Challenges. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 65, p. 15–26, 2006.

STAHL, M.; RAREY, M. Detailed analysis of scoring functions for virtual screening. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 1035–1042, 2001.

STEARNS, R. A.; CHAKRAVARTY, P. K.; CHEN, R.; CHIU, S. H. Biotransformation of losartan to its active carboxylic acid metabolite in human liver microsomes: role of cytochrome P4502C and 3A subfamily members. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 23, p. 207-215, 1995.

STJERNSCHANTZ, E.; VERMEULEN, N. P.; OOSTENBRINK, C. Computational prediction of drug binding and rationalization of selectivity towards cytochromes P 450. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 5, n. 4, p. 513-527, 2008.

STROUD, R. M.; FINER-MOORE, J. **Computational and Structural Approaches to Drug Discovery: Ligand–Protein Interactions**. London: Royal Society of Chemistry, 2007.

SUN, H.; SCOTT, D. O. Structure-based Drug Metabolism Predictions for Drug Design. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 75, p. 3–17, 2010.

THOMAS, G. **Medicinal Chemistry: An Introduction**. 1. ed., Leeds: Wiley-Liss, 2000.

TODESCHINI, R.; CONSONNI, V. **Handbook of molecular descriptors**. 1. ed. Weinheim (Federal Republic of Germany): Wiley-Vch, 2000.

TSAI, C. S. **Molecular modeling: molecular mechanics. An Introduction to computational biochemistry**. New York: Wiley-Liss, 2002.

VALERIO JR L. G.; KEPKA, J. K.; PICKWELL, G. V.; QUATTROCHI, L. C. Induction of human NAD(P)H:quinine-oxidoreductase (NQO1) gene expression by the flavonol quercetin. **Toxicology Letters**, v. 119, p. 49–57, 2001.

VAN DE WATERBEEMD, H.; GIFFORD, E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 192-204, 2003.

VAN DIJK, A. D. J.; BOELENS, R.; BONVIN, A. M. J. J. Data-driven docking for the study of biomolecular complexes. **Febs Journal**, v. 272, p. 293-312, 2005.

VAOUZOUR, D.; VAFEIADOU, K.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; RENDEIRO, C.; SPENCER, J. P. The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. **Genes & Nutrition**, v. 3, p. 115-126, 2008.

WANG, R.; LAI, L.; WANG, S. Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction. **Journal of Computer-aided Molecular Design**, v. 16, p. 11-26, 2002.

WEN, X.; WALLE, T. Preferential induction of CYP1B1 by benzo[a]pyrene in human oral epithelial cells: impact on DNA adduct formation and prevention by polyphenols. **Carcinogenesis**, v. 26, p. 1774-1781, 2005.

WERMUTH, C. G. Strategies in the search for new lead compounds or original working hypothesis. **Wermuth's The Practice of Medicinal Chemistry**, p. 69-87, 2003.

WESTER, M. R.; YANO, J. K.; SCHOCH, G. A.; YANG, C.; GRIFFIN, K. J.; STOUT, C. D.; JOHNSON, E. F. The structure of human cytochrome P450 2C9 complexed with flurbiprofen at 2.0-Å resolution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 35630-35637, 2004.

WILLIAMS, D.; FEELY, J. Pharmacokinetic-pharmacodynamic drug interactions with HMG-CoA reductase inhibitors. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 41, p. 343-370, 2002.

WOLF, C. R.; SMITH, G.; SMITH, R. L. Science, medicine, and the future: Pharmacogenetics. **BMJ: British Medical Journal**, v. 320, p. 987-990, 2000.

WRIGHTON, S. A.; STEVENS, J. C. The human hepatic cytochrome P450 involved in drug metabolism, **Critical Reviews in Toxicology**, v. 22, p. 1-21, 1992.

YOUNG, D. C. **Computational Drug Design. A Guide for Computational and Medicinal Chemists**. 1. ed., New Jersey: Wiley-Liss, 2009.

ZLOKARNIK, G.; GROOTENHUIS, P. D.; WATSON, J. B. High throughput P450 inhibition screens in early drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 10, p. 1443-1450, 2005.