

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

**DESENVOLVIMENTO DE INIBIDORES PARA ENZIMAS DO FUNGO  
*MONILIOPHTHORA PERNICIOSA* (STHAEL) (SINGER) PHILLIPS-MORA POR DE  
NOVO DESIGN**

**Renata Freitas de Araujo Oliveira<sup>1</sup> e Manoelito Coelho Santos Junior<sup>2</sup>**

1. Bolsista FAPESB, Graduanda do curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), email; [renata\\_freitas87@hotmail.com](mailto:renata_freitas87@hotmail.com)
2. Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)

**PALAVRAS-CHAVE:** Pirofosforilase, *novo design*, *Moniliophthora perniciosa*.

## INTRODUÇÃO

A vassoura de bruxa é uma praga que afeta as lavouras cacaueiras causando danos consideráveis na mesma. O patógeno causador é o fungo *Moniliophthora perniciosa* (Bastos, 1987). Para controlar sua disseminação têm-se proposto inibir a síntese de quitina, que é o principal componente da parede celular do fungo (Pirovani, 2005), como alvo nesta via de síntese da quitina tem-se a enzima pirofosforilase, que é responsável em catalizar a formação de UDP-N-acetilglicosamina, o precursor da quitina. Assim, este trabalho visa desenvolver moléculas candidatas a inibir da enzima pirofosforilase.

## METODOLOGIA

A etapa inicial para o desenvolvimento de inibidores da enzima UDP-N-acetilglicosamina pirofosforilase (UDP-GlcNAc) consistiu na análise do modelo da enzima pirofosforilase do fungo *M. perniciosa* que foi construído recentemente por Santos Junior (2007). Os inibidores protótipos foram desenhados no programa BioMedCache 6.1 e submetidos a uma análise conformacional. Para a validação do melhor método de análise conformacional um inibidor protótipo foi escolhido aleatoriamente e submetido a quatro métodos diferentes de análises conformacionais: a) Dinâmica Molecular (DM) à 300K por 600ps nos programas BioMedCache 6.1 e Amber 9.0; b) Monte Carlo no programa Titan/MMFF94; c) CONFLEX/MM3 no programa BioMedCache 6.1. Os resultados foram comparados com base na energia de formação, tempo computacional e estrutura espacial do conformero de menor energia.

Posteriormente, realizou-se uma padronização dos métodos de otimização, sendo empregados os seguintes métodos computacionais: a) AM1; b) DFT/B3LYP com conjunto de bases 6-31G; e c) UFF. Nesta etapa foram realizados cálculos *single point*, de modo, a encontrar a energia no estado conformacional determinado na etapa anterior.

Os inibidores protótipos foram então acoplados no sítio ativo do modelo 3D da enzima pirofosforilase, para isso utilizou-se o programa Autodock Vina 1.0.2. Para a realização deste estudo os ligantes foram orientados de acordo com a posição espacial dos aminoácidos importantes para a catalise enzimática (Peneff, 2001). Foram realizados dois tipos de estudo de acoplamento: rígido e o flexível. Para o método flexível foi necessário escolher um aminoácido, que neste caso foi o resíduo GLU 304, que segundo Santos Junior (2007) é o aminoácido envolvido na reação catalisada pela pirofosforilase.

## DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

Foram propostos 9 possíveis inibidores como pode ser visto na Figura 1. Um dos ligantes foi escolhido aleatoriamente, para a padronização do método de análise conformacional. O ligante escolhido foi o NAG1.

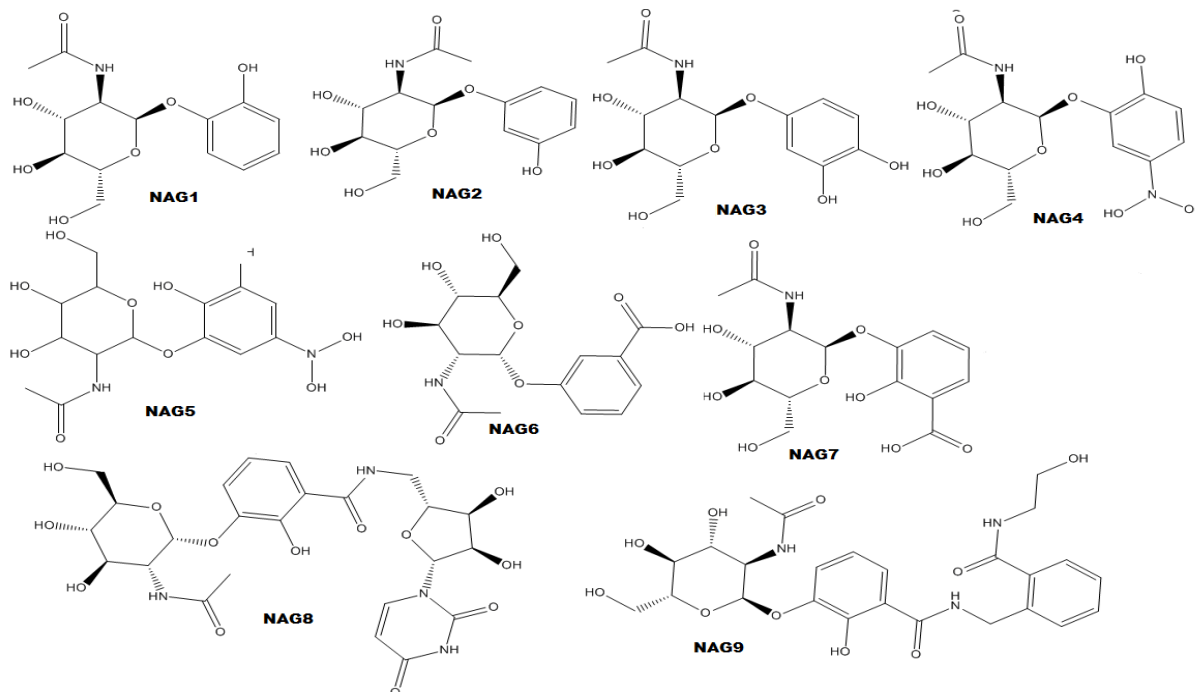


FIGURA 1: Estruturas dos 9 possíveis inibidores desenvolvidos com suas respectivas denominações (NAG1-9).

Os resultados encontrados durante a análise conformacional indicaram que os métodos de simulação DM no BioMedCache 6.1 e no Amber 9.0 foram as melhores formas de busca por confôrmeros dos ligantes desenvolvidos. A estrutura de equilíbrio gerada nestes dois métodos foi utilizada para padronização do método de otimização. O confôrmero final do NAG1 encontrado na DM do BioMedCache e a do Amber 9.0 foi submetida a um cálculo *Single Point* (SP) nos protocolos descritos para padronização do método de otimização. Os resultados descritos na tabela

TABELA 1: obtida no *Single Point*.

Método	BioMedCache (Kcal/mol)	Amber (Kcal/mol)
AM1	-0.374	-0.338
UFF	128.926	0.000
DFT/B3LYP	-111.142	-111.032

Energia  
cálculo de

Os métodos semi-empíricos (AM1 e DFT/B3LYP) encontraram os melhores resultados, o valor de energia de ambos (AM1 e DFT/B3LYP) foram inferiores ao método de mecânica molecular UFF (Tabela 1). Dos dois métodos semi-empíricos o DFT apresentou os

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

melhores valores de energia, como pode ser visto na Tabela 1, no entanto, apresentou a desvantagem de possui um maior tempo computacional.

Pode-se também inferir com base nas observações dos valores da Tabela 1, que tanto a estrutura obtida pela rotina de busca do programa BioMedCache 6.1, quanto a do Amber 9.0, obtiveram valores de energia significativamente próximas, neste sentido, pode-se considerar que tanto a DM realizada pelo BioMedCache quanto a realizada pelo Amber, fornecem conformeros de configuração espacial e energética similares. O Método AM1 foi escolhido para a otimização das estruturas dos inibidores, pois conforme visto anteriormente (Tabela 1), tanto o AM1, pois este apresenta um tempo computacional menor que o DFT/B3LYP. Com base em tais considerações, os inibidores desenvolvidos foram submetidos a uma simulação por Dinâmica Molecular no programa Amber 9.0, a estrutura de equilíbrio foi otimizada pelo método semi-empírico AM1.

Durante a etapa de otimização, os orbitais de fronteira (HOMO e LUMO) do inibidores protótipos foram localizados, com os orbitais é possível determinar em quais pontos da molécula pode ocorrer interação com sítio ativo da enzima, ou em qual parte uma reação pode se processar. Através da determinação dos orbitais HOMO e LUMO, foi possível verificar a existência desses orbitais preferencialmente em um grupamento fenólico, como pode ser visto na Figura 2. Assim, pode-se visualizar a localização dos grupamentos de maior reatividade e possivelmente, os grupamentos farmacofóricos de cada ligante.

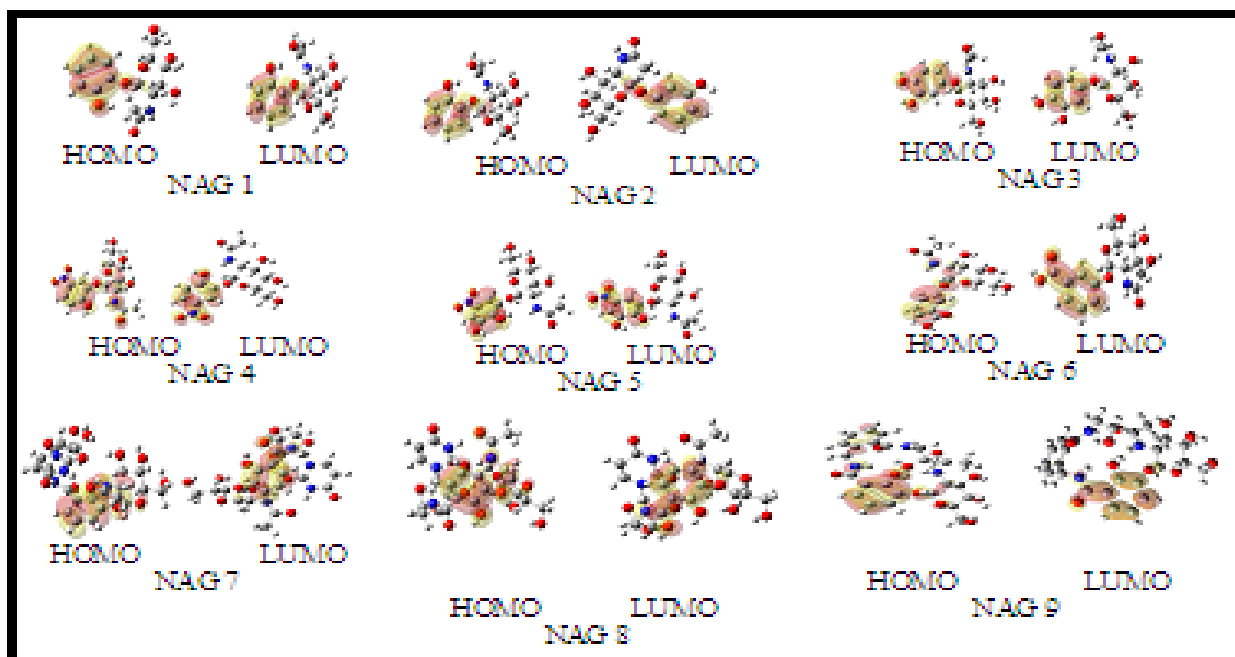


FIGURA 2: Orbitais de fronteira encontrados para os ligantes.

Na realização do cálculo da energia de afinidade, foram realizados um acoplamento rígido e outro flexível, onde os mesmos apresentaram valores energéticos semelhantes. Foi possível constatar que todos os ligante apresentaram bons resultados em relação a energia de afinidade, o que indica que houve estabilidade do sistema (tabela 2). Dentre os ligantes desenvolvidos o NAG 9 apresentou o melhor valor de energia de afinidade. Vale ressaltar,

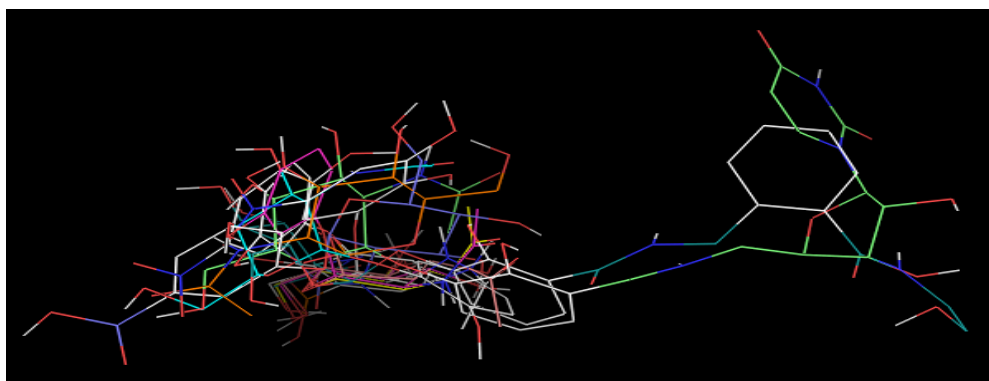
Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

que todos os ligantes testados estabilizaram o sistema melhor que o substrato natural da enzima (acetilglicosamina 1 fosfato).

**TABELA 2:** Resultado do estudo de acoplamento

Ligantes	Energia de afinidade (Kcal/mol)
NAG1	-7.5
NAG2	-7.6
NAG3	-8.1
NAG4	-8.1
NAG5	-7.9
NAG6	-8.2
NAG7	-8.1
NAG8	-9.8
NAG9	-8.0
Acetilglicosamina-1fosfato	-7.0

Na figura 3 encontra-se a disposição espacial dos inibidores protótipos no sítio ativo da enzima pirofosforilase, como pode ser visto, os inibidores encontram-se espacialmente em regiões muito próximas, indicando que há correlação em sua orientações com base nas coordenadas espaciais do sítio ativo, percebe-se também, que os compostos encontram-se no mesmo sítio que o substrato da enzima, com isso é possível notar, que os compostos propostos conseguem interagir e estabilizar o sistema. Todos os ligantes apresentaram alta afinidade a região do sítio ativo obtendo posições favoráveis, como pode ser visto na figura 3.



**FIGURA 3:** Resultados obtidos com os protótipos pelo programa Autodock Vina.

Os principais aminoácidos que realizaram ponte de hidrogênio com os ligantes foram; ASN328, LYS123, THR354, GLY381, VAL303, ARG383, LEU382 e THR115

### CONCLUSÕES

Os prováveis inibidores apresentaram bons resultados referentes aos parâmetros analisados. Assim, os ligantes podem apresentar atividade biológica, uma vez que os mesmos, através do estudo de acoplamento, apresentam energia de afinidade maior do que o ligante natural, podendo favorecer a inibição da enzima pirofosforilase.

### REFERÊNCIAS

BASTOS, E. Cacao: a riqueza agrícola da América. São Paulo: Ícone, 1987. 130p.

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

- CASE, D. A. et al. Amber 9: User Manual. San Francisco: University of California, 2004, 320 p.
- FRISCH, Æ.; FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W. Gaussian 03: User's Reference. Gaussian Inc: Carnegie, 2003, 327p
- FUJITSU. BioMedCache 6.1: User Guide. Oxford: Fujitsu Limited, 2003, 200 p.
- PENEFF, C. et al. Crystal structures of two human pyrophosphorylase isoforms in complexes with UDPGlc(Gal)NAc: role of the alternatively spliced insert in the enzyme oligomeric assembly and active site architecture. The European Molecular Biology Organization Journal, v. 20, n. 22, p. 6191-6202, 2001.
- PIROVANI, C. P. et al. Proceeding of the fourth brazilian symposium on mathematical and computacional biology, v. 1. P. 122-139, 2005.
- SANTOS JUNIOR, M. C. Determinação estrutural da enzima pirofosforilase do fungo *Moniliophthora perniciosa* (Sthael) (Singer) Phillips-Mora por modelagem comparativa. 2007. 83p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2007.