



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**SÉRGIO XAVIER BARBOSA ARAÚJO**

***VIRTUAL SCREENING DE POSSÍVEIS INIBIDORES DA TRANS-ENOIL-ACP-REDUTASE DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS****

**FORTALEZA**

**2013**

SÉRGIO XAVIER BARBOSA ARAÚJO

*VIRTUAL SCREENING DE POSSÍVEIS INIBidores DA TRANS-ENOIL-ACP-  
REDUTASE DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Tese apresentada ao Curso de Doutorado  
em Química do Departamento de Química  
Orgânica e Inorgânica da Universidade  
Federal do Ceará como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
Doutor em Química. Área de  
Concentração: Química Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga de  
França Lopes.

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

---

A691v Araújo, Sérgio Xavier Barbosa.  
Virtual screening de possíveis inibidores de trans-enoil-acp-redutase de *Mycobacterium tuberculosis* / Sérgio Xavier Barbosa. – 2013.  
139 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2013.

Área de Concentração: Química Inorgânica.

Orientação: Prof. Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes.

1. Triagem virtual. 2. Inibidores. 3. Nicotinamida. 4. Cianoferratos. I. Título.

SÉRGIO XAVIER BARBOSA ARAÚJO

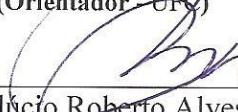
**VIRTUAL SCREENING DE POSSÍVEIS INIBidores DA TRANS-ENOIL-ACP-  
REDUTASE DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**

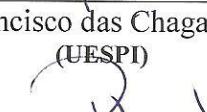
Esta Tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Química, área de concentração Química Inorgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e em cuja Biblioteca Central encontra-se à disposição dos interessados.

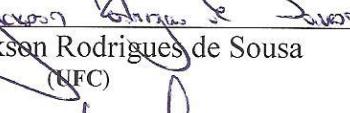
  
\_\_\_\_\_  
Sérgio Xavier Barbosa Araújo

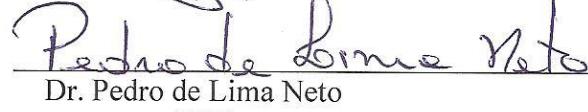
Tese aprovada em: 12/07/2013

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes  
(Orientador - UFC)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Carlúcio Roberto Alves  
(UECE)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Francisco das Chagas Alves Lima  
(UESPI)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Jackson Rodrigues de Sousa  
(UFC)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Pedro de Lima Neto  
(UFC)

## **AGRADECIMENTOS**

A meu orientador, Luiz Gonzaga de França Lopes, pela orientação, ensinamentos e paciência durante estes anos de orientação desde a graduação;

Ao professor Walter Filgueira de Azevedo Junior pela contribuição inestimável ao projeto e por me receber em seu laboratório na PUCRS;

Aos demais professores do Laboratório de Bioinorgânica pela convivência, exemplos e ensinamentos no dia-a-dia;

A todos que fizeram ou fazem parte do Laboratório de Bioinorgânica, pela companhia, amizade ou discussões (científicas ou não) neste longo tempo desde minha iniciação científica;

Aos alunos do Laboratório de Bioquímica Estrutural (Labioquest) pelos conhecimentos sem os quais seria inviável o desenvolvimento do projeto, bem como a convivência nos três meses que passei no mesmo, em especial a Rafael Andrade Caceres, Luís Fernando Saraiva Macedo Timmers, Ivani Pauli pelas discussões a respeito dos mais diversos assuntos que aprofundaram a visão do trabalho em si;

Aos meus amigos que ajudaram a relaxar nos momentos de estresse deste bem longo doutoramento e por compreender minha ausência em vários momentos;

Aos órgãos financiadores CNPQ e CAPES pela bolsa e auxílios concedidos;

E por fim, mas de maior importância, a minha família por tudo.

## RESUMO

A tuberculose é uma das principais causas de mortalidade no mundo, porém é uma doença negligenciada por ser endêmica de países em desenvolvimento. Um dos principais pontos de tratamento da tuberculose é a morte do bacilo causador, o *Mycobacterium tuberculosis*, através da interrupção da produção de ácidos micólicos, componentes da parede celular do bacilo, usando como um dos alvos a enzima InhA, porém esta rota também é a principal causa de resistência. O presente trabalho se propõe a estudar a enzima InhA, realizando modelagens *in silico* de interações entre a enzima e ligantes selecionados. Os ligantes estudados fazem parte de duas bibliotecas distintas, sendo uma de compostos orgânicos selecionados por sua similaridade com o substrato da enzima. A outra biblioteca é composta de complexos metálicos com o núcleo pentacianoferrato, variando-se o ligante auxiliar. A justificativa para esta classe de compostos ser utilizada se dá pelo fato de o complexo pentacianoisoniazidaferato (II) ter apresentado atividade anti-tuberculose tanto *in vitro* como por via oral em ratos. Os ensaios de *docking* foram realizados utilizando-se duas abordagens, uma completamente rígida e outra em que a proteína era rígida e o ligante era flexível. Ambos os ensaios apresentaram boa correlação entre os seus resultados, independentemente da função de avaliação utilizada. Observou-se que as melhores estruturas em termos de inibição possuíam uma quantidade razoável de interações hidrofóbicas, de modo a manterem-se estáveis no sítio de ligação da enzima que possui baixa polaridade.

**Palavras-chave:** InhA, docking, cianoferratos, nicotinamida

## ABSTRACT

Tuberculosis is found among the main causes of mortality in the World, although is a neglected disease since it is endemic in developing countries. The main route of therapy of tuberculosis is the inhibition of InhA, enzyme that catalyses the production of mycolic acids, which is a component of bacillus cellular wall. This reaction also is the main point of resistance against TB drugs. In this work proposed the study of InhA enzyme, working specifically *in silico* modeling of enzyme-ligand interactions. These ligands distinguish themselves between two distinct libraries, one of them containing organic compounds selected by its structural similarity with the enzyme substrate, NADH. Due *in vitro* and orally activity in murine model against tuberculosis exhibited by the compound pentacianoisoniazideferrate (II), another library, containing the pentacianoferrate II moiety bind to an auxiliary ligand studied against que InhA target. The essays realized using ligand rigid and flexible *docking* both, although the protein always considered rigid. Both essays had acceptable correlation within its results, regardless the scoring function used. The leading inhibitors structures had in common a high stabilization of ligand-enzyme complex due hydrophobic interactions, something expected due polarity of the enzyme binding site

**Keywords:** InhA, docking, cyanoferates, nicotinamide.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estruturas dos fármacos de primeira linha para tratamento da tuberculose.	19
Figura 2 - Esquema de reações do complexo enzimático de síntese de ácidos graxos tipo II.	20
Figura 3 - Mecanismo de ação e resistência à isoniazida no bacilo <i>M tuberculosis</i> ....	21
Figura 4 - Estruturas simplificadas do complexo pentacianoisoniazidaferrato após oxidação do centro metálico (a) e após transferência eletrônica de esfera interna (b).	22
Figura 5 - Estrutura cristalográfica da enzima 2AQ8 complexada ao NADH, cadeia A.	30
Figura 6 – Superfícies de potencial eletrostático na enzima 2AQ8, obtida com o programa pymol 0.99 e com a posição do sítio ativo destacada. (potencial positivo em azul e negativo em vermelho, neutro em branco).	31
Figura 7 – Dessenho esquemático fornecido pelo programa LIGPLOT a partir do arquivo pdb dos aminoácidos que interagem com o ligante NADH na estrutura cristalográfica da enzima 2AQ8.....	32
Figura 8 – Distribuição dos valores de RMSD e pKd para os <i>dockings</i> de validação da enzima 2AQ8.....	34
Figura 9 – Relação de acertos pelo total de <i>dockings</i> para um limiar de 2Angstrom na validação da enzima 2AQ8.....	35
Figura 10 - Estrutura da enzima 2AQ8 utilizada para os ensaio de <i>docking</i> com o programa <i>Molegro Virtual Docker</i> destacando-se a esfera de busca e as cavidades encontradas.....	37
Figura 11 - Dispersão dos valores de pK <sub>D</sub> em função do código ZINC.....	39
Figura 12 - Posicionamento do ligante 110486 (azul) em relação ao NADH da estrutura cristalográfica (laranja) no sítio ativo da enzima InhA.....	40
Figura 13 - Desenho esquemático das interação do ligante 110486 com a enzima de estrutura 2AQ8 calculada por <i>docking</i> com o programa ZDOCK e função score XSCORE.....	41
Figura 14 - Estrutura resultante do <i>docking</i> do ligante 110486 à enzima 2AQ8.....	43

Figura 15 - Estruturas e $pK_D$ dos ligantes 110874, 110877, 110881 e 110884 obtidos no <i>docking</i> com o programa ZDOCK e função <i>score XSCORE</i> .....	44
Figura 16 - Resultados de <i>docking</i> dos ligantes 110874 (laranja), 110877 (amarelo), 110881 (cinza) e 110884 (azul) com a estrutura 2AQ8 usando o programa ZDOCK.....	45
Figura 17 - Estruturas e $pK_D$ dos ligantes 106506, 106516 e 108543 obtidos no <i>docking</i> com o programa ZDOCK e função <i>score XSCORE</i> .....	47
Figura 18 - Resultados de <i>docking</i> dos ligantes 10506 (azul claro), 106516 (amarelo) e 108543 (azul) com a estrutura 2AQ8 usando o programa ZDOCK.....	48
Figura 19 - Estruturas e $pK_D$ dos ligantes 43036, 66894 e 87863 obtidos no <i>docking</i> com o programa ZDOCK e função <i>score XSCORE</i> .....	49
Figura 20 - Resultados de <i>docking</i> dos ligantes 43036 (azul claro), 66894 (amarelo) e 87863 (azul) com a estrutura 2AQ8 usando o programa ZDOCK.....	50
Figura 21 - Estruturas e $pK_D$ dos ligantes 77423 e 77428 obtidos no <i>docking</i> com o programa ZDOCK e função <i>score XSCORE</i> .....	51
Figura 22 - Resultados de <i>docking</i> dos ligantes 77428 (azul claro) e 77423 (amarelo) com a estrutura 2AQ8 usando o programa ZDOCK.....	51
Figura 23 - Dispersão dos valores de energia calculados pelo <i>Moldock score</i> em função do código ZINC.....	53
Figura 24 - Estrutura do ligante 112428 utilizado para <i>docking</i> com a enzima 2AQ8 com o programa MVD e função <i>moldock score</i> .....	55
Figura 25 - Estruturas e valores de energias calculadas pelo <i>moldock score</i> para os ligantes 27840, 44269, 61891 e 112728 após o <i>docking</i> com a enzima 2AQ8 com p programa MVD.....	56
Figura 26 - Resultados de <i>docking</i> dos ligantes 27840 (amarelo), 44369 (laranja), 61891 (cinza) e 112728 (azul claro) com a estrutura 2AQ8 usando o programa MVD e função <i>score moldock</i> .....	57
Figura 27- Estruturas e valores de energias calculadas pelo <i>moldock score</i> para os ligantes 63210 e 73286 após o <i>docking</i> com a enzima 2AQ8 utilizando o programa MVD. ....	58
Figura 28 - Resultados de <i>docking</i> dos ligantes 63210 (azul claro) e 73286 (amarelo) com a estrutura 2AQ8 usando o programa MVD e função <i>score moldock</i> .....	59

Figura 29- Estruturas e valores energias calculadas pelo de moldock score para os ligantes 110299 e 111670 após o <i>docking</i> com a enzima 2AQ8 utilizando o programa MVD.....	60
Figura 30 - Resultados de <i>docking</i> dos ligantes 111670 (azul claro) e 110299 (amarelo) com a estrutura 2AQ8 usando o programa MVD e função score <i>moldock</i> .....	61
Figura 31 - Dispersão dos valores de energias calculadas pelo <i>rerank score</i> em função do código ZINC.....	62
Figura 32 - Estrutura do ligante de código 59087, que possuiu maior valor de energia calculada pelo <i>rerank score</i> dentre os avaliados para a enzima 2AQ8 com o programa MVD.....	64
Figura 33 - Interação do ligante 59087 com a enzima 2AQ8 utilizando o programa MVD e a função <i>rerank score</i> .....	64
Figura 34 - Estruturas dos ligantes 58693, 59036 e 59083.....	65
Figura 35 - Resultados de <i>docking</i> dos ligantes 59083 (azul claro), 59036 (amarelo) e 58693 (cinza) com a estrutura 2AQ8 usando o programa MVD e função score <i>rerank</i> .....	65
Figura 36 - Dispersão dos valores de $pK_D$ em função do código ZINC .....	67
Figura 37 - Estrutura, valor de $pK_D$ e interação com enzima 2AQ8 para o ligante 110874 utilizando o programa MVD e a função score XSCORE.....	68
Figura 38 - Estruturas e valores de $pK_D$ para os ligantes 110874, 110877, 110881 e 110884 para <i>dockings</i> com a enzima 2AQ8, utilizando o programa MVD e a função score XSCORE.....	70
Figura 39 - Resultados de <i>docking</i> dos ligantes 110874 (azul claro), 110877 (amarelo), 110881 (cinza) e 110884 (laranja) com a estrutura 2AQ8 usando o programa MVD e função score XSCORE.....	71
Figura 40 - Estruturas dos ligantes 74038 e 99341.....	72
Figura 41 - Resultados de <i>docking</i> dos ligantes 74038 (azul claro) e 99341 (amarelo) com a estrutura 2AQ8 usando o programa MVD e função score XSCORE.....	72
Figura 42 - Estruturas dos ligantes 106512 e 111670.....	73
Figura 43 - Resultados de <i>docking</i> dos ligantes 106512 (azul claro) e 111670 (amarelo) com a estrutura 2AQ8 usando o programa MVD e função score XSCORE.....	74
Figura 44 - Correlação entre os resultado obtidos com a função XSCORE, utilizando as abordagens de ligante rígido (ZDOCK) e flexível (MVD).....	75

Figura 45 - Correlação entre os resultados obtidos com o uso do programa MVD com as funções XSCORE e as energias obtidas pelo <i>rerank score</i> .....	76
Figura 46 - Correlação entre os resultados obtidos com o uso do programa MVD com as funções XSCORE e as energias obtidas pelo <i>moldock score</i> .....	76
Figura 47 - Correlação entre as energias obtidas com as funções <i>moldock score</i> e <i>rerank score</i> .....	77
Figura 48 - Estrutura de <i>docking</i> obtida no ensaio utilizando e ligante IA4CN e a eznima 2AQ8, com o programa ZDOCK e a função XSCORE .....	81
Figura 49 - Resultados de <i>docking</i> dos complexos 024 (azul claro), 025 (amarelo), 026 (cinza) e 023 (laranja) com a estrutura 2AQ8 usando o programa ZDOCK .....	83
Figura 50 - Resultados de <i>docking</i> do complexo 032 (azul claro) com a estrutura 2AQ8 usando o programa ZDOCK.....	85
Figura 51 - Resultados de <i>docking</i> do complexo 030 (amarelo) com a estrutura 2AQ8 usando o programa ZDOCK.....	86
Figura 52 - Resultados de <i>docking</i> do complexo 043 (azul claro) com a estrutura 2AQ8 usando o programa ZDOCK.....	88
Figura 53 - Resultados de <i>docking</i> dos complexos 028 (cinza), 034 (laranja) e 051 (amarelo) com a estrutura 2AQ8 usando o programa ZDOCK.....	89
Figura 54 - Resultados de <i>docking</i> dos complexos 027 (roxo) e 036 (cinza) com a estrutura 2AQ8 usando o programa ZDOCK.....	90
Figura 55 - Resultados de <i>docking</i> dos complexos 016 (laranja), 037 (amarelo) e 038 (azul claro) com a estrutura 2AQ8 usando o programa ZDOCK .....	91
Figura 56 - Resultados de <i>docking</i> dos complexos 017 (azul claro), 018 (amarelo), 019 (cinza) e 020 (laranja) com a estrutura 2AQ8 usando o programa ZDOCK .....	92
Figura 57 - Resultados de <i>docking</i> dos complexos 002 (azul claro), 004 (amarelo) e 001 (cinza) com a estrutura 2AQ8 usando o programa ZDOCK .....	94
Figura 58 - Resultados de <i>docking</i> dos complexos 056 (azul claro), 007 (amarelo), 055 (laranja) e 014 (marrom) com a estrutura 2AQ8 usando o programa ZDOCK .....	96
Figura 59 - Resultados de <i>docking</i> dos complexos 056 (azul claro), 005 (cinza), 013 (verde oliva) e 010 (roxo) com a estrutura 2AQ8 usando o programa ZDOCK .....	97
Figura 60 - Resultados de <i>docking</i> dos complexos 053 (azul claro), 009 (amarelo), 054 (laranja), 003 (cinza) e 006 (roxo) com a estrutura 2AQ8 usando o programa ZDOCK.	
.....	99

Figura 61 - Estrutura obtida do <i>docking</i> utilizando o programa MVD do ligante NA4CN na enzima 2AQ8, função <i>moldock score</i> .....	102
Figura 62 - Resultados de <i>docking</i> dos complexos 025 (azul claro), 023 (amarelo), 026 (laranja) e 024 (cinza) com a estrutura 2AQ8 usando o programa MVD e função <i>score moldock</i> .....	103
Figura 63 - Resultados de <i>docking</i> dos complexos 021 (azul claro), 046 (amarelo), 044 (laranja) e 051 (cinza) com a estrutura 2AQ8 usando o programa MVD e função <i>score moldock</i> .....	105
Figura 64 - Resultados de <i>docking</i> dos complexos 033 (azul claro), 042 (amarelo), 035 (laranja) e 052 (cinza) com a estrutura 2AQ8 usando o programa MVD e função <i>score moldock</i> .....	107
Figura 65 - Resultados de <i>docking</i> dos complexos 016 (azul claro) e 027 (amarelo) com a estrutura 2AQ8 usando o programa MVD e função <i>score moldock</i> .....	108
Figura 66 - Resultados de <i>docking</i> dos complexos 018 (azul claro), 017 (amarelo), 021 (laranja) e 020 (cinza) com a estrutura 2AQ8 usando o programa MVD e função <i>score moldock</i> .....	110
Figura 67 - Resultados de <i>docking</i> dos complexos 001 (azul), 004 (amarelo), 011 (laranja), 002 (cinza) e 008 (marrom) com a estrutura 2AQ8 usando o programa MVD e função <i>score moldock</i> .....	111
Figura 68 - Resultados de <i>docking</i> dos complexos 013 (azul claro), 010 (amarelo) e 005 (cinza) com a estrutura 2AQ8 usando o programa MVD e função <i>score moldock</i> . ....	113
Figura 69 - Resultados de <i>docking</i> dos complexos 006 (azul claro) e 054 (amarelo) com a estrutura 2AQ8 usando o programa MVD e função <i>score moldock</i> .....	114
Figura 70 - Estrutura obtida do <i>docking</i> utilizando o programa MVD do ligante NA4CN na enzima 2AQ8, função <i>rerank score</i> .....	117
Figura 71 - Estrutura obtida com o <i>docking</i> do complexo 049 com a enzima 2AQ8 utilizando o programa MVD.....	119
Figura 72 - Correlação entre os resultado obtidos com a função XSCORE, utilizando as abordagens de ligante rígido (ZDOCK) e flexível (MVD).....	120
Figura 73 - Correlação entre os resultados obtidos com o uso do programa MVD com as funções XSCORE e <i>rerank score</i> .....	121

Figura 74 - Correlação entre os resultados obtidos com o uso do programa MVD com as funções XSCORE e <i>moldock score</i> .....	121
Figura 75 - Correlação entre os resultados obtidos com as funções <i>moldock score</i> e <i>rerank score</i> .....	122
Figura 76 - Gráfico de valores da constante cinpetica de inibição da enzima InhA versus o valor de $pK_D$ observado pelos <i>docking</i> dos compostos com o programa ZDOCK e função score XSCORE .....	124

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de aminoácidos não bloqueados .....	26
Tabela 2 – Valores de pKD para os melhores inibidores da enzima 2AQ8 para tratamento com a função XSCORE.....	42
Tabela 3 - Valores de energia para os melhores inibidores da enzima 2AQ8 para tratamento com a função <i>Moldock score</i> .....	54
Tabela 4 - Valores de energia para os melhores inibidores da enzima 2AQ8 para tratamento com a função <i>rerank score</i> .....	63
Tabela 5 - Valores de pKD para os melhores inibidores da enzima 2AQ8 para tratamento com a função XSCORE.....	68
Tabela 6 - Valores de pKD para os ensaios de <i>docking</i> com a enzima 2AQ8 com o programa ZDOCK e função XSCORE.....	80
Tabela 7 - Resultados para o grupo selecionado para os ensaios de <i>docking</i> com o programa ZDOCK e a função <i>score XSCORE</i> .....	84
Tabela 8 - Resultados para o grupo selecionado para os ensaios de <i>docking</i> com o programa ZDOCK e a função <i>score XSCORE</i> .....	84
Tabela 9 - Resultados para o grupo selecionado para os ensaios de <i>docking</i> com o programa ZDOCK e a função <i>score XSCORE</i> .....	87
Tabela 10 - Resultados para o grupo selecionado para os ensaios de <i>docking</i> com o programa ZDOCK e a função <i>score XSCORE</i> .....	90
Tabela 11 - Resultados para o grupo selecionado para os ensaios de <i>docking</i> com o programa ZDOCK e a função <i>score XSCORE</i> .....	91
Tabela 12 - Resultados para o grupo selecionado para os ensaios de <i>docking</i> com o programa ZDOCK e a função <i>score XSCORE</i> .....	93
Tabela 13 - Resultados para o grupo selecionado para os ensaios de <i>docking</i> com o programa ZDOCK e a função <i>score XSCORE</i> .....	95
Tabela 14 - Resultados para o grupo selecionado para os ensaios de <i>docking</i> com o programa ZDOCK e a função <i>score XSCORE</i> .....	98
Tabela 15 - Valores de energias obtidas pelo <i>moldock score</i> para os ensaios de <i>docking</i> utilizando o programa MVD.....	100

Tabela 16 - Resultados para o grupo selecionado para os ensaios de <i>docking</i> com o programa MVD e a energia calculada pela função <i>moldock score</i> .....	103
Tabela 17 - Resultados para o grupo selecionado para os ensaios de <i>docking</i> com o programa MVD e a energia calculada pela função <i>moldock score</i> .....	104
Tabela 18 - Resultados para o grupo selecionado para os ensaios de <i>docking</i> com o programa MVD e a energia calculada pela função <i>moldock score</i> .....	106
Tabela 19 - Resultados para o grupo selecionado para os ensaios de <i>docking</i> com o programa MVD e a função <i>moldock score</i> .....	108
Tabela 20 - Resultados para o grupo selecionado para os ensaios de <i>docking</i> com o programa MVD e a energia calculada pela função <i>moldock score</i> .....	109
Tabela 21 - Resultados para o grupo selecionado para os ensaios de <i>docking</i> com o programa MVD e a energia calculada pela função <i>moldock score</i> .....	111
Tabela 22 - Resultados para o grupo selecionado para os ensaios de <i>docking</i> com o programa MVD e a energia calculada pela função <i>moldock score</i> .....	112
Tabela 23 - Resultados para o grupo selecionado para os ensaios de <i>docking</i> com o programa MVD e a energia calculada pela função <i>moldock score</i> .....	114
Tabela 24 - Valores de energias obtidos pelo <i>rerank score</i> com o uso do programa MVD para o <i>docking</i> da biblioteca inorgânica. ....	116
Tabela 25 - Valores de $pK_D$ obtidos com o uso do programa MVD com a função XSCORE para o <i>docking</i> da biblioteca inorgânica. ....	118
Tabela 26 - Dados experimentais de cinética de inibição e resultados das funções score das simulações de <i>docking</i> realizadas. ....	123

## SUMÁRIO

1	Introdução .....	18
1.1	Tuberculose .....	18
1.2	<i>Virtual screening e docking</i> .....	22
2	Justificativas e Objetivos .....	25
3	Metodologia.....	26
3.1	Protocolo de validação para modelo de <i>docking</i> rígido-rígido com o programa ZDOCK .....	26
3.2	Protocolo testes para modelo de <i>docking</i> rígido-rígido com o programa ZDOCK .....	27
	Protocolo de <i>docking</i> rígido-flexível com o programa Molegro Virtual Docker .....	27
4	Enzima InhA de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> : características estruturais, estrutura cristalográfica utilizada para estudos e validação dos protocolos de <i>docking</i> .....	29
4.1	A Estrutura Cristalográfica do Alvo .....	29
4.2	Validação para o Protocolo de <i>Docking</i> com o Programa ZDOCK .....	33
4.3	Validação do Protocolo com o Programa <i>Molegro Virtual Docker</i> (MVD) .....	36
5	Biblioteca de derivados de nicotinamida versus InhA (2AQ8) .....	38
5.1	Descrição da biblioteca .....	38
5.2	<i>Docking</i> rígido-rígido com o programa ZDOCK e função <i>score XSCORE</i> .....	38
5.2.1	ZINC 110486 .....	42
5.2.2	Ligantes 110874, 110877, 110881 e 110884 .....	43
5.2.3	Ligantes 106506, 106516 e 108543 .....	47
5.2.4	Ligantes 43036, 66894 e 87863 .....	49
5.2.5	Ligantes 77423 e 77428 .....	50
5.3	<i>Docking</i> rígido-flexível com o programa Molegro Virtual Docker(MVD) e função <i>score Moldock</i> .....	52

5.3.1 Substância 112428.....	54
5.3.2 Substâncias 27840, 44369, 61891 e 112428 .....	55
5.3.3 Substâncias 63210 e 73286.....	58
5.3.4 Substâncias 110299 e 111670.....	59
<i>5.4 Docking rígido-flexível com o programa Molegro Virtual Docker e função score rerank.....</i>	<i>62</i>
5.4.1 Substância 59087.....	63
5.4.2 Substâncias 58693, 59036 e 59083 .....	65
<i>5.5 Docking rígido-flexível com o programa Molegro Virtual Docker e função score XSCORE .....</i>	<i>66</i>
5.5.1 Ligante 110874 .....	68
5.5.2 Ligantes 110874, 110877, 110881 e 110884 .....	69
5.5.3 Ligantes 74038 e 99341 .....	72
5.5.4 Ligantes 106512 e 111670.....	73
5.6 Comparação de Resultados Entre as Metodologias .....	74
5.6.1 Estruturas de destaque para potenciais testes de inibição .....	77
6 Biblioteca de derivados pentacianoferratos versus InhA (2AQ8) .....	79
<i>6.1 Docking rígido-rígido com o programa ZDOCK e função score XSCORE .....</i>	<i>79</i>
6.1.1 Complexo com o ligante auxiliar IA4CN (056).....	81
6.1.2Ligantes Simples .....	82
6.1.3 Ligantes Piridínicos Substituídos na Posição 3 .....	84
6.1.4 Ligantes Piridínicos Substituídos na Posição 4 .....	86
6.1.5 Ligantes Pirazínicos .....	89
6.1.6 Ligantes Quinolínicos .....	91
6.1.7 Ligantes Oxadiazóis .....	93
6.1.8 Ligantes do tipo Metileno-hidrazidas do Ácido Isonicotílico .....	94
6.1.9 Ligantes do tipo Metileno-hidrazidas do Ácido Nicotílico .....	98

6.2 <i>Docking</i> rígido-flexível com o programa Molegro Virtual Docker e função <i>score Moldock</i> .....	99
6.2.1 Complexo com o ligante auxiliar NA4CN(053) .....	101
6.2.2 Ligantes Simples .....	102
6.2.3 Ligantes Piridínicos Substituídos na Posição 3 .....	104
6.2.4 Ligantes Piridínicos Substituídos na Posição 4 .....	106
6.2.5 Ligantes Pirazínicos .....	107
6.2.6 Ligantes Quinolínicos .....	109
6.2.7 Ligantes Oxadiazóis .....	110
6.2.8 Ligantes do tipo Metileno-hidrazidas do Ácido Isonicotínico .....	112
6.2.9 Ligantes do tipo Metileno-hidrazidas do Ácido Nicotínico .....	113
6.3 <i>Docking</i> rígido-flexível com o programa Molegro Virtual Docker e as funções <i>score rerank</i> e <i>XSCORE</i> .....	115
6.3.1 Complexo NA4CN – melhor resultados com <i>rerank score</i> .....	117
6.3.2 Complexo 049 – melhor resultados com <i>XSCORE</i> .....	119
6.4 Comparação de Resultados Entre as Metodologias .....	119
6.5 Comparação com resultados experimentais e proposição de complexos para teste .....	122
7 Conclusões.....	126
Referências .....	127

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Tuberculose

A tuberculose é a doença responsável pelo maior número de mortalidade causada por um único patógeno. Estima-se que ela foi responsável por cerca de 1,4 milhões de óbitos em 2011, sendo sua mortalidade potencializada pela condição de imunodeficiência causada pelo HIV (cerca de 30% dos óbitos no mesmo período). <sup>(1)</sup>

No Brasil em 2011 foram notificados cerca de oitenta mil novos casos, sendo dez mil deles casos de retratamento por reincidência da doença e havendo aproximadamente 5,6 mil óbitos, excluindo-se os casos de infecção simultânea com o HIV.<sup>(1)</sup> O causador da doença é o bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, o qual se estima que infecte um terço da população mundial. <sup>(1, 2)</sup>

A doença é transmitida por via aérea, através da inalação de núcleos de gotículas exalados contendo o bacilo. Estas gotículas permanecem no ar por várias horas e a faixa de concentração necessária para a dose infecciosa é próxima a apenas uma bactéria. <sup>(3)</sup> O primeiro ponto comum de infecção são os alvéolos pulmonares, onde os bacilos são fagocitados, porém ocorre um princípio de processo inflamatório que leva a formação dos granulomas, que é a característica patológica da doença. <sup>(3)</sup>

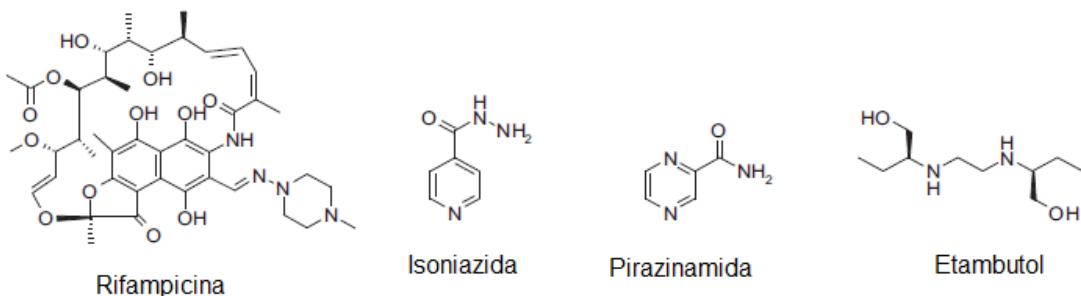
Uma característica da doença é que podem ser formados granulomas em diferentes regiões, com desenvolvimento independente entre si. Este não está condicionado a nenhuma condição específica como um todo do organismo, mas sim a uma condição local onde este se encontra. <sup>(3)</sup>

A doença não se manifesta em todos os organismos infectados, e sim em apenas 5% destes. <sup>(4)</sup> Nos demais o bacilo encontra-se em um estágio latente, porém uma mudança de condições pode convertê-lo a forma ativa. <sup>(3)</sup>

O tratamento de primeira linha para a tuberculose consiste no DOTS (*directly observed treatment short-course*) havendo a administração de um coquetel de rifampicina, etambutol, isoniazida e pirazinamida (estruturas apresentadas na Figura

1) durante dois meses e após este período o uso de um coquetel de isoniazida e rifampicina por quatro meses. <sup>(5)</sup>

**Figura 1 - Estruturas dos fármacos de primeira linha para tratamento da tuberculose.**



**Fonte:**Referência 5

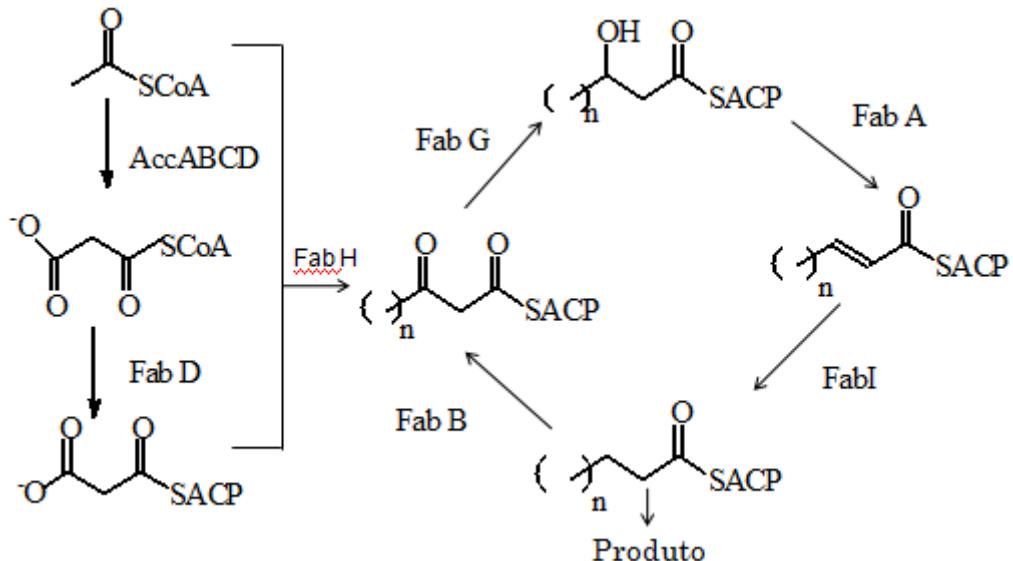
Embora seja a principal terapia recomendada pela OMS, a eficiência do DOTS para o tratamento da tuberculose é menor que 85% no mundo e menor que 75% na África, uma das regiões onde a doença é endêmica. <sup>(6)</sup> Motivos apontados para a eficiência abaixo de 85% é a resistência (que abrange cerca de 5% dos casos), a longa duração do tratamento, que leva indivíduos após a remissão dos sintomas a abandonarem-no por se acharem “curados”, de modo que a cura não se dá, podendo a doença ressurgir, a presença de efeitos colaterais em alguns pacientes que leva a interrupção do tratamento, entre outros.

As drogas de primeira linha foram descobertas entre os anos de 1950 e 1960, sendo a ação da isoniazida baseada na inibição da síntese de ácidos micólicos, componente da parede celular do bacilo. <sup>(7)</sup> A ação da pirazinamida se dá pela sua conversão a ácido pirazólico e consequente liberação de prótons e desbalanceamento do pH da bactéria. <sup>(8, 9)</sup> A ação do etambutol se dá impedindo a reação de polimerização das arabinogalactanas e lipoarabinomananas, componentes da parede celular do bacilo<sup>(10)</sup>. A Ação da rifampicina se dá pelo impedimento da replicação de DNA, ligando-se à subunidade β da DNA polimerase do bacilo. <sup>(11)</sup>

Destas drogas, a ação da isoniazida se dá especificamente em uma rota sintética específica do bacilo e não presente no ser humano, o sistema de síntese de ácidos graxos tipo II. <sup>(12)</sup> O complexo enzimático de síntese de ácidos graxos tipo I, presente na maioria dos eucariontes à exceção das plantas consiste em um único domínio proteico que catalisa as reações por completo. <sup>(13)</sup> Em um sistema de tipo II,

presente em plantas e bactérias, cada etapa do processo é catalisada por uma enzima específica, codificada por seu próprio gene. <sup>(13)</sup> A Figura 2 apresenta as reações de um sistema do tipo II.

Figura 2 - Esquema de reações do complexo enzimático de síntese de ácidos graxos tipo II.



**Fonte:** Referência <sup>(12)</sup>

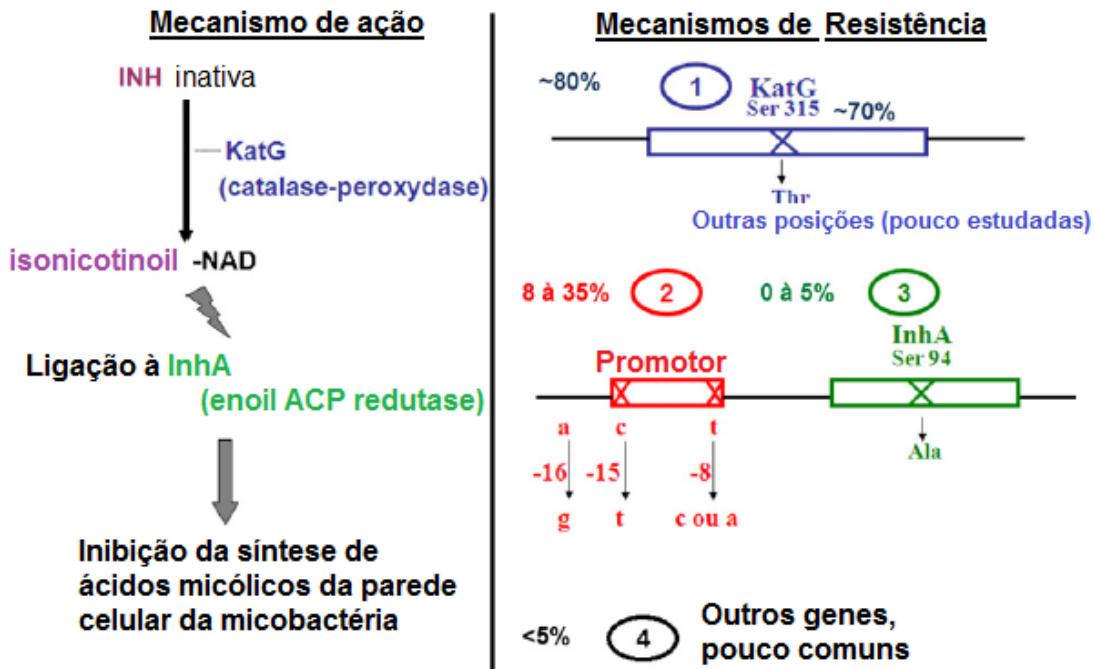
A enzima que sofre a ação da isoniazida é a *trans*-2-enoil-ACP-redutase (InhA), identificada como FabI na Figura 2, responsável pela polimerização de ácidos graxos entre 12 e 24 átomos de carbono <sup>(14)</sup> (uma cadeia de ácido micólico possui entre 50 e 60 átomos de carbono <sup>(15)</sup>).

O mecanismo de inibição através da isoniazida se dá com a ativação desta pela enzima KatG, uma peroxidase, em presença de íons manganês e oxigênio <sup>(16)</sup>, formando o radical isonicotinoil, que reage com o NADH, um redutor biológico presente no meio intracelular, que se liga de maneira extremamente inerte à enzima InhA, causando a interrupção da síntese de ácidos micólicos. <sup>(16)</sup>

Embora a doença em sua comum esteja controlada em um grande número de países, a crescente resistência dos bacilos aos fármacos faz com que ela continue sendo uma ameaça tanto nos países com pouca incidência como onde ela é endêmica. Cerca de 5% dos casos de tuberculose são do tipo multirresistente (MDR-TB) <sup>(1, 13)</sup>, onde o tratamento se dá com um coquetel de 8 a 10 drogas de segunda linha em um intervalo de tempo de 18 a 24 meses. <sup>(4)</sup>

Os possíveis mecanismos para resistência da isoniazida deve-se a pelo menos três frentes principais, apresentadas na Figura 3, havendo ainda outras rotas de resistência. <sup>(17)</sup>

Figura 3 - Mecanismo de ação e resistência à isoniazida no bacilo *M. tuberculosis*.



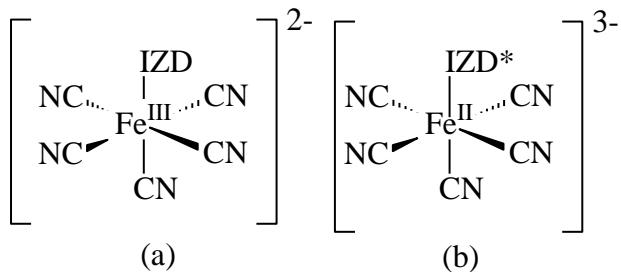
**Fonte:** Referência 17

Como observado na Figura 3, o principal mecanismo de resistência é a mutação da enzima KatG (em 70% das mutações ocorre a substituição da serina 315 pela tirosina) <sup>(17)</sup>. O segundo meio de resistência mais comum é a mutação do promotor do gene responsável pela expressão da InhA, levando a um aumento de sua síntese e consequente necessidade de maiores concentrações de inibidores para impedimento da síntese de ácidos micólicos. <sup>(17)</sup> O terceiro mecanismo de resistência é ocasionado pela mutação da própria enzima InhA, normalmente na posição 94 com a substituição de uma serina por uma alanina, que impossibilita a ligação estável do aduto à enzima. <sup>(17)</sup>

Como alternativa à resistência causada pela mutação da enzima KatG, foi proposta a coordenação da isoniazida a um centro metálico, no caso formando um complexo tipo pentacianoferrato, de sigla IQG-607, onde o potencial de oxidação do ferro é acessível em meio biológico, causando a oxidação do centro metálico. Este pode então reduzir-se através de um processo de esfera interna, onde há a oxidação

do ligante isoniazida formando então a espécie ativada do mesmo.<sup>(13, 18)</sup> As estruturas simplificadas das espécies encontram-se na Figura 4.

**Figura 4 - Estruturas simplificadas do complexo pentacianoisoniazidaferroto após oxidação do centro metálico (a) e após transferência eletrônica de esfera interna (b).**



**Fonte:** Elaborada pelo autor.

O composto proposto possuiu a capacidade e inibir a InhA na presença ou ausência de KatG e mesmo na presença ou ausência de NADH. O complexo InhA-pentacianoisoniazidaferroto, possui capacidade de inibição da enzima InhA tanto *in vitro*<sup>(13, 18, 19)</sup> como administrado por via oral em ratos.<sup>(19)</sup> Além disso, o composto de coordenação citado possuiu a capacidade de inibir *in vitro* a enzima análoga do principal agente causador da malária, o *Plamodium falciparum*.<sup>(20)</sup>

## 1.2 Virtual screening e docking

Para a descoberta de um possível fármaco várias abordagens são amplamente utilizadas, desde o teste de substâncias isoladas de produtos naturais até a modelagem computacional de interações enzima-substrato.

O *virtual screening* compreende este segundo tipo de abordagem onde, uma biblioteca de compostos passa por uma bateria de testes *in silico* que possuem como característica simular a interação existente entre o alvo molecular e as substâncias propostas.

Embora não tenha havido a descoberta de nenhuma droga utilizando apenas o método de *virtual screening*, cerca de 10 fármacos foram obtidos tendo como parte de seu desenvolvimento o *virtual screening*. Durante este mesmo período de tempo,

apenas três drogas aprovadas para uso foram descobertas com o uso do *high-throughput screening*, método no qual bibliotecas de substâncias são testadas *in vitro*, demandando a síntese da cada possível inibidor e grandes quantidades do alvo molecular a ser utilizado. (21-23)

Ambos os métodos, o *virtual screening* e o *high-throughput screening*, são passíveis de falsos positivos e negativos, sendo aconselhado então uma mistura dos dois procedimentos para uma melhor confiabilidade dos resultados.

O *virtual screening* inicia-se com a seleção de um alvo molecular, que deve ter sua estrutura 3D determinada por técnicas experimentais (cristalografia ou RMN). A partir da seleção do alvo molecular, são propostas modificações ao substrato que possam ligar-se de maneira a tornar inerte o alvo frente ao substrato.

A segunda etapa do *virtual screening* corresponde às simulações de interação entre o inibidor proposto e o alvo, utilizando uma metodologia computacional apropriada, que consiga simular a interação existente entre ambos. Métodos que podem ser utilizados para tal fim são o *docking*, a dinâmica molecular, entre outros. (24)

O *docking* é um método de análise onde a interação entre alvo e ligante é simulada na ausência de solvente ou vibrações térmicas. Os parâmetros utilizados para a obtenção das estruturas de *docking* são os volumes de átomos e cavidades, assim como cargas envolvidas nos átomos presentes.

Para um *docking*, podem-se considerar dois tipos de situação: o modo rígido, onde as moléculas que interagem não possuem alteração de conformação e o modo flexível, onde durante a análise feita pelo programa são induzidas alterações de comprimentos de ligações e ângulos de ligação e diedros levando a novas conformações sendo testadas.

O custo computacional envolvido na operação depende diretamente do tipo de análise realizada. Um *docking* com ligante a alvos rígidos por necessitar de um menor número de variáveis demanda menos tempo ou capacidade de processamento que um *docking* com alvo e ligantes flexíveis. Uma condição intermediária é a análise com

alvo rígido e ligante flexível, uma vez que a molécula de ligante é muito menor que a molécula alvo na maior parte das vezes.

Uma etapa fundamental é o conhecimento do alvo molecular utilizado.<sup>(25)</sup> Esta estrutura deve não só ser determinada com boa resolução em 3D como é necessário o conhecimento do sítio ativo e substrato, de modo a avaliar corretamente as interações.

Os resultados obtidos durante uma análise de *docking* são apenas coordenadas atômicas, sem qualquer tipo de informação energética ou termodinâmica, estes devem ser tratados de modo a extrair este tipo de informação. O tratamento se dá com o uso de funções *score*.

Funções *score* são funções que utilizando de algum tipo de parametrização convertem a informação de distâncias e cargas atômicas em termos de energias de interações. Estas são frequentemente divididas em termos de ligações de hidrogênio e outros tipos de interações intermoleculares (van der Waals).<sup>(24)</sup>

O modo como as funções *score* são implementadas varia desde a aplicação direta de um campo de força (como o GROMOS<sup>(26)</sup>, AMBER<sup>(27)</sup>, UNICCHARMM<sup>(28)</sup>, MMFF94<sup>(29)</sup>) ao uso de funções empíricas caracterizadas pela aplicação de pesos aos fatores de interação de modo a extrair valores o mais próximos possíveis para um dado conjunto de alvos e ligantes.

## 2 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

O desenvolvimento de possíveis fármacos é algo que leva um grande período de tempo, havendo diversas etapas de teste, até que haja aprovação para seu uso.

Como tal processo é dispendioso em termos de trabalho, tempo e recursos, a racionalização de métodos de pesquisa é importante para que se possa obter um melhor aproveitamento na pesquisa.

O uso de *virtual screening* como primeira etapa para o desenvolvimento de fármacos é um modo de se reduzir os compostos alvo ou testar possíveis modificações, sem que haja o experimento real.

Assim, é possível pré-selecionar possíveis candidatos com base em propriedades encontradas no alvo, melhor utilizando o tempo gasto durante a pesquisa e minimizando o custo.

Como objetivos deste trabalho têm-se os seguintes:

- Estudar a enzima *trans*-enoil-ACP-redutase, com o intuito de utilizá-la como alvo de um *virtual screening*;
- Preparar uma biblioteca de possíveis inibidores e realizar ensaios de *docking* para avaliar a capacidade dos mesmos;
- Buscar, com o emprego dos resultados de *docking*, propriedades que possam levar a uma tendência de desenvolvimento de inibidores;
- Fazer correlações estrutura-reatividade de modo a desenvolver substâncias que quando complexadas a centros metálicos possuam capacidade de ligação à enzima alvo.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Protocolo de validação para modelo de *docking* rígido-rígido com o programa ZDOCK

Para o *docking* rígido-rígido com o programa ZDOCK<sup>(30)</sup>, a validação seguiu os seguintes passos:

- 1) Retirou-se do arquivo PDB as coordenadas de ligante (NADH) e proteína, retirando-se as informações desnecessárias e moléculas de água existentes.
- 2) Transladou-se do ligante para uma posição externa ao sítio de ligação utilizando-se o módulo Isqkab<sup>(31)</sup> do CCP4.
- 3) Uma vez que no arquivo original do ligante encontravam-se apenas as coordenadas atômicas, deve-se ter executado o programa mark\_sur (incluído no pacote do programa ZDOCK). O objetivo era incluir no arquivo parâmetros de cada átomo existente (tipo de átomo, raio, superfície acessível ao solvente) de modo a permitir que o ZDOCK busque a posição de *docking*.
- 4) Para restringir o espaço de busca de posições de ligação, buscando diminuição do tempo computacional, aplicou-se um bloqueio de porções da proteína, para aumentar a prioridade de busca em aminoácidos pertencentes ao sítio ativo, levando a resultados mais rápidos. A escolha dos aminoácidos foi feita de acordo com o LIGPLOT da enzima, onde foram bloqueados os aminoácidos que não fizessem ligações de hidrogênio com o NADH. A lista dos aminoácidos não bloqueados pode ser encontrada na Tabela 1.

**Tabela 1 - Lista de aminoácidos não bloqueados.**

Aminoácidos não bloqueados						
SER20	ILE21	ASP64	VAL65	ILE95	LYS165	ILE194

- 5) Foi utilizado do programa ZDOCK, em um universo de 100 tentativas de posições no sítio restringido e rotações de ângulo de 6°. A partir das poses obtidas calculou-se o RMSD.
- 6) Para as estruturas obtidas foi aplicada a função score XSCORE <sup>(32)</sup>, obtendo-se valores de pK<sub>D</sub>. Este último é feito uma vez que os resultados para os ligantes serão em termos desta variável e é necessário avaliar o quanto bem o protocolo a determina.
- 7) Utilizou-se a função de Spearman para determinar a correlação entre pK<sub>D</sub> e RMSD.

### **3.2 Protocolo testes para modelo de *docking* rígido-rígido com o programa ZDOCK**

Os testes para as bibliotecas montadas para o programa ZDOCK se deram de maneira semelhante à validação, com as moléculas dos ligantes sendo preparadas com os parâmetros necessários.

As estruturas de ligantes utilizadas neste trabalho obtidas diretamente da biblioteca no ZINC, então foi feita uma minimização de energia utilizando mecânica molecular (PM3) e então com os módulos incluídos no ZDOCK acresceu-se as informações de volume atômico e cargas necessárias para o cálculo. Foi utilizado o modelo do átomo unido, descontando-se os átomos de hidrogênio.

Para a estrutura da proteína, foi utilizada a mesma estrutura da etapa de validação. Os ensaios foram realizados com um número de tentativas estabelecido durante a validação.

As estruturas obtidas durante o *docking* foram então avaliadas com a função score XSCORE, para determinação dos valores de pK<sub>D</sub>.

### **Protocolo de *docking* rígido-flexível com o programa Molegro Virtual Docker**

O *docking* utilizando os ligantes iniciou-se com a importação da proteína para o programa e detecção das cavidades existentes. A partir daí, foram importados as moléculas dos ligantes e realizado o *docking*, com o espaço de trabalho definido como uma esfera de 15 Angstroms centrada na cavidade onde se encontrava o ligante NADH na estrutura cristalográfica.

A função *score* utilizada foi o *moldock score [GRID]*, com uma resolução de 0,3 Angstroms e utilizando o algoritmo MOLDOCK SE com 10 corridas. Foram obtidos como resultados as 5 melhores estruturas em termos de *moldock score* para cada ligante, respeitando a limitação de que estruturas únicas deveriam ter um RMSD maior que 1,0 Angstrom.

Além da análise com o *moldock score*, as cinco estruturas obtidas como resultado foram analisadas com o *rerank score* e o resultados validados pela comparação da estrutura do complexo enzima-NADH obtido no *docking* com o inicialmente observado na estrutura cristalográfica.

## **4 ENZIMA INHA DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*: CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS, ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA UTILIZADA PARA ESTUDOS E VALIDAÇÃO DOS PROTOCOLOS DE DOCKING**

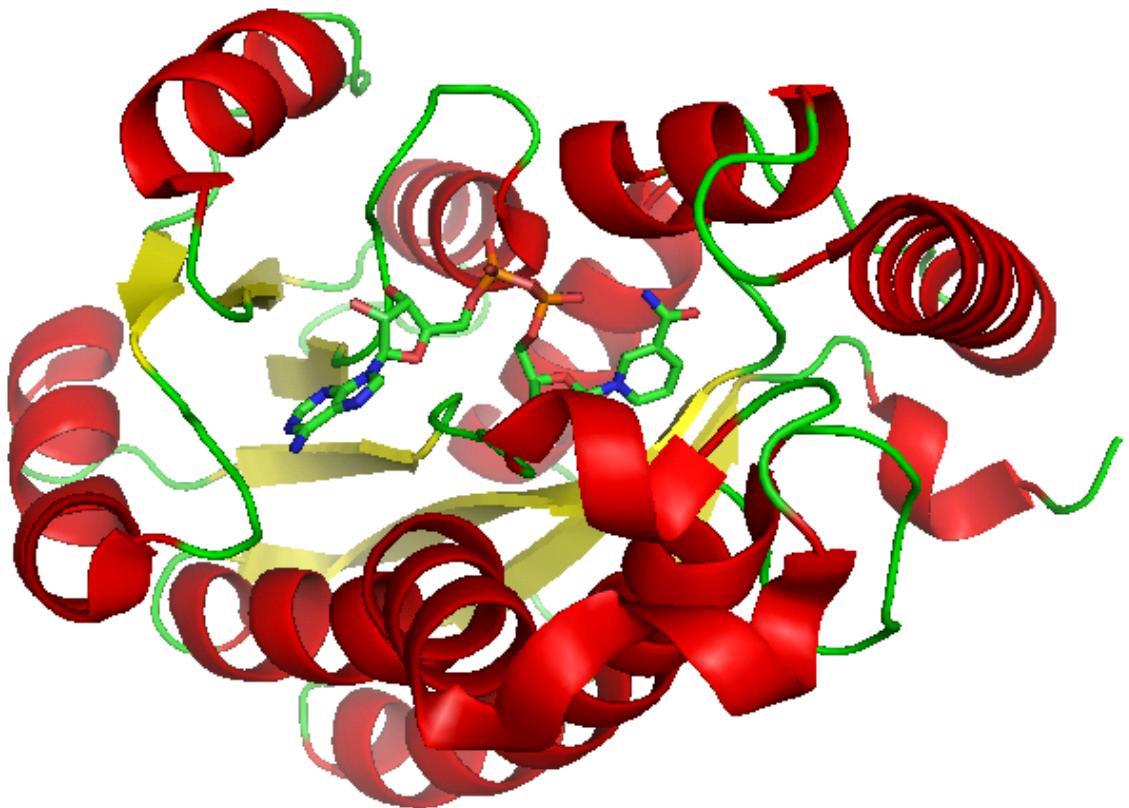
### **4.1 A Estrutura Cristalográfica do Alvo**

Para os estudos da enzima InhA de *M. tuberculosis* foi utilizada a estrutura cristalina depositada no *Protein Data Bank* com código 2AQ8<sup>(33)</sup>, a qual possui determinada a cadeia de uma unidade da proteína em quase toda sua totalidade, iniciando-se do aminoácido 3 e com o NADH complexado a mesma.

Uma característica relevante para o estudo realizado é a resolução do cristal, de 1,92 Å<sup>(33)</sup> que fornece uma boa confiabilidade para os estudos a serem realizados. É importante ressaltar que embora a unidade biologicamente ativa seja um tetrâmero, com o objetivo de acelerar os estudos computacionais, em função do tamanho das bibliotecas utilizadas, apenas uma das cadeias foi utilizada.

A estrutura da proteína 2AQ8 é mostrada na Figura 5, onde se pode observar que o NADH ocupa uma posição no centro da cavidade da proteína.

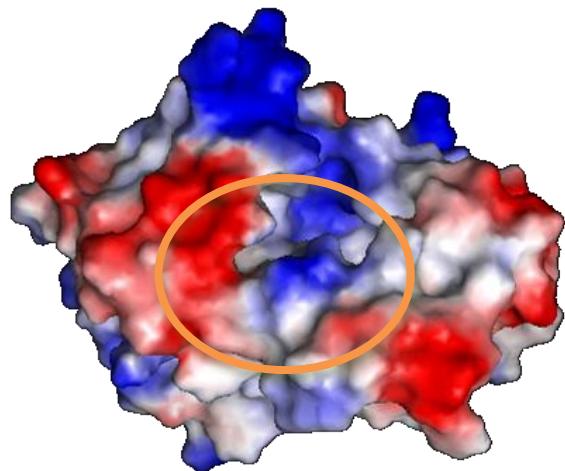
Figura 5 - Estrutura cristalográfica da enzima 2AQ8 complexada ao NADH, cadeia A.



**Fonte:** referência 33

Para que uma seleção mais efetiva de compostos seja realizada, é preciso caracterizar o sítio ativo da enzima em termos de cargas, aminoácidos e interações com o substrato que ocorrem, de modo a poder atacar o problema de maneira mais efetiva. A Figura 6 mostra uma distribuição de potencial eletrostático na enzima, com um destaque para a região ocupada pelo NADH.

**Figura 6 – Superfícies de potencial eletrostático na enzima 2AQ8, obtida com o programa pymol 0.99 e com a posição do sítio ativo destacada. (potencial positivo em azul e negativo em vermelho, neutro em branco).**



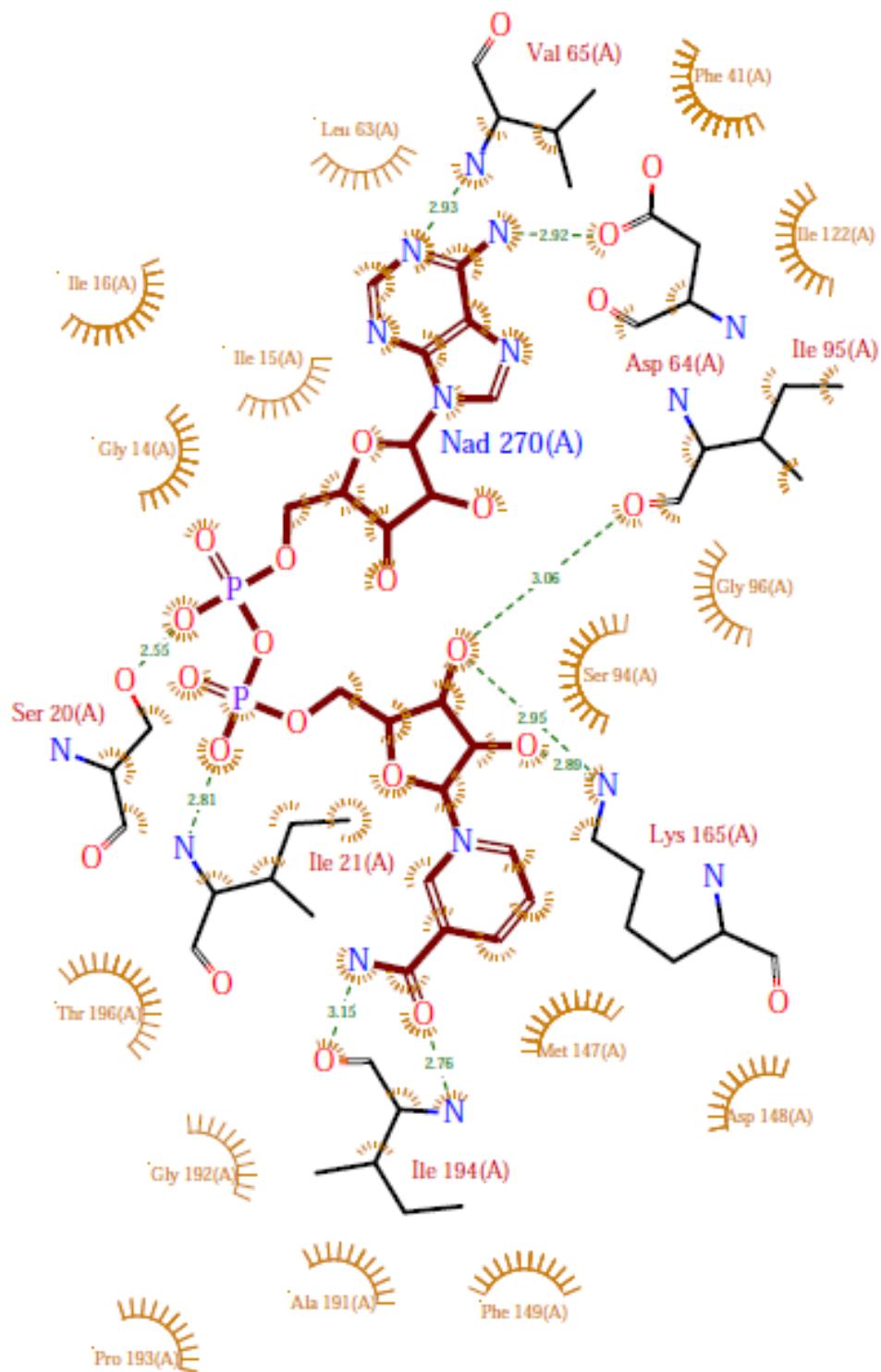
**Fonte:** referência 33

A partir da Figura pode-se perceber que a cavidade do sítio ativo (posição onde originalmente se encontrava o ligante NADH, e de volume definido com o programa *Molegro Virtual Docker*) possui regiões neutras e carregadas positivamente. Estas regiões neutras possuem capacidade de interagir hidrofobicamente com o substrato, que possui uma longa cadeia apolar, enquanto a região carregada positivamente é primariamente o ponto de interação da enzima com os fosfatos existentes no NADH.

A caracterização do sítio ativo da enzima pode ser realizada através da identificação dos aminoácidos responsáveis pelas interações cofator-enzima. Para tal fim foi utilizado o programa LIGPLOT<sup>(34)</sup>, que a partir do arquivo de estrutura descreve tal informação. Sua parametrização contempla forças intermoleculares em geral, destacando as ligações de hidrogênio.

O resultado é apresentado na Figura 7, onde é observado que a interação do NADH com a enzima 2AQ8 se dá por meio de ligações de hidrogênio entre os aminoácidos VAL65, ASP64, ILE95, SER20, ILE21, LYS165 e ILE194 e o NADH e com diversos outros aminoácidos formando interações intermoleculares com o NADH.

Figura 7 – Dessenho esquemático fornecido pelo programa LIGPLOT a partir do arquivo pdb dos aminoácidos que interagem com o ligante NADH na estrutura cristalográfica da enzima 2AQ8.



Fonte: referência 33

Observa-se que as interações de aminoácidos apolares de dá preferencialmente com os anéis que compõem o sistema  $\pi$  das bases nitrogenadas, região de pouca polaridade, enquanto aminoácidos polares interagem com os grupos hidroxila, fosfato entre outros.

Juntando esta informação com o potencial eletrostático observado anteriormente, pode-se concluir que tanto interações polares como apolares são determinantes na interação do substrato com a enzima, não apenas a complementaridade de cargas. Assim ligantes com potencial para interação com este sítio ativo deverão possuir capacidade de realizar ambas as interações, hidrofílicas e hidrofóbicas.

#### 4.2 Validação para o Protocolo de *Docking* com o Programa ZDOCK

A validação é uma etapa importante uma vez que se o protocolo utilizado não for capaz de reproduzir com relativa confiança a estrutura cristalográfica, os resultados de quaisquer estudos posteriores não terão relevância.

Os *dockings* de validação foram basicamente ensaios de *redocking*, onde o ligante era retirado da posição onde ele se encontra na estrutura cristalográfica e o programa utilizado busca achar possíveis posições, com a eficiência máxima a total reprodução da mesma.

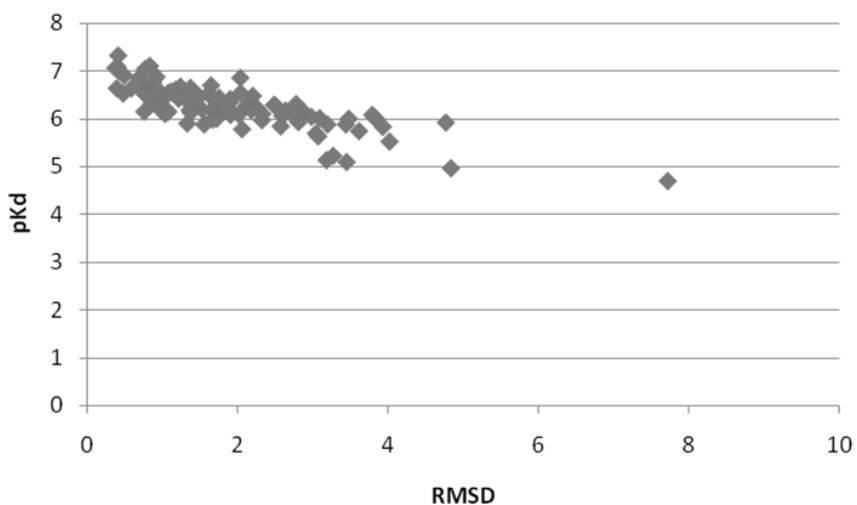
Os resultados foram então avaliados segundo duas características: a estrutural, utilizando o RMSD (Root Mean Square Deviation, raiz do desvio quadrático médio) que avalia a diferença entre as coordenadas atômicas do ligante na estrutura original e nas poses geradas pelo *docking* e a aplicação de ua função *score* a ser utilizada como parâmetro para o *docking* dos ligantes. No caso da função XSCORE, o valor a ser obtido com a função *score* é o  $pK_D$ ,  $-\log(K_D)$ , a constante de equilíbrio de dissociação do complexo ligante enzima, conforme equação 1 a seguir:



A validação realizada foi capaz de encontrar estruturas com baixos valores de RMSD, com o menor deles sendo 0,370, e com uma concentração de estruturas entre

RMSD 0 e 4 Angstroms, que aliada a uma inspeção visual, indica a ligação apenas ao sítio previamente caracterizado e com orientação semelhante à estrutura cristalográfica, à exceção do que possui RMSD próximo a 8, que possui orientação aproximadamente perpendicular. A dispersão dos valores de  $pK_D$  em função do RMSD pode ser vista na Figura 8.

**Figura 8 – Distribuição dos valores de RMSD e  $pK_D$  para os *dockings* de validação da enzima 2AQ8.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

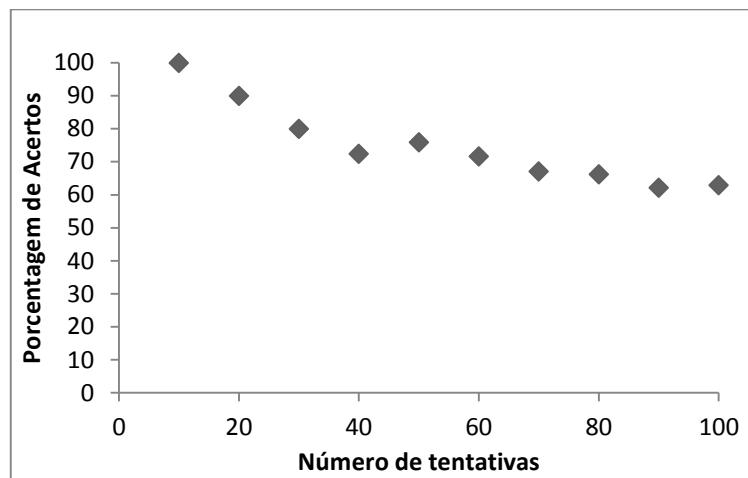
O valor máximo de  $pK_D$  encontrado foi de 7,33, valor bastante superior ao experimental (5,69<sup>(35)</sup>), o que pode ser explicado pelo fato de a presença do cofator no cristal selecionar uma conformação para o centro ativo da enzima diferente da conformação mais estável em solução<sup>(36)</sup>.

A definição de um resultado aceitável (acerto) para o *docking* do NADH foi um RMSD de 2,0 Angstroms, valor aceitável para *redockings*<sup>(37)</sup> e ligeiramente superior a resolução do cristal (1,92 Å), porém ambos os valores inferiores ao de uma ligação de hidrogênio no modelo utilizado (3,5 Angstrom) de modo que estes tipos de interação podem ser bem caracterizados.

Uma possibilidade que pode acontecer durante a utilização deste protocolo é que um maior número de tentativas não necessariamente está atrelado a uma maior taxa de sucesso. Uma vez que o *redocking* inicia-se buscando posições o mais próximo possível dos aminoácidos não bloqueados, então passando a outras possibilidades em suas proximidades.

O aumento do número de tentativas concomitantemente aumenta o porcentagem de resultados sem informação válida. A validação é realizada com um valor alto de tentativas (100) que esperasse ser menor que o limiar de confiança. Para esta validação, a Figura 9 mostra a porcentagem de acertos em função das primeiras N tentativas.

**Figura 9 – Relação de acertos pelo total de *dockings* para um limiar de 2Angstrom na validação da enzima 2AQ8.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

É visto na Figura 10 que o percentual de acertos cai com o aumento do número de tentativas, deste modo devendo haver algum controle deste para aperfeiçoar a análise dos ligantes. Para tal é empregada um procedimento estatístico, a função de Spearman (38, 39), apresentada na Equação 2, a partir da qual duas grandezas não diretamente relacionadas podem ser estudadas e a partir de determinado coeficiente de correlação ( $\sigma$ ) e grau de confiança. Ao se determinar as duas grandezas e sabendo a correlação existente, é possível saber qual o número N de tentativas que deve ser feito.

$$\rho = 1 - \frac{6 \sum_{j=1}^N [r(\text{RMSD}_j) - r(\Delta G_{\text{binding}})]^2}{N^3 - N} \quad (\text{Equação 2})$$

**Fonte:** Referências 38 e 39

Dentro do universo de 100 tentativas o grau de correlação encontrado entre os valores de RMSD e  $pK_D$  foi de 0,78. Utilizando-se um grau de confiança de 0,001 para

o RMSD e de 0,005 para o valor de  $pK_D$ , obtém-se que um total de 16 tentativas deve ser utilizado para os *dockings* das bibliotecas com a enzima 2AQ8 como alvo.

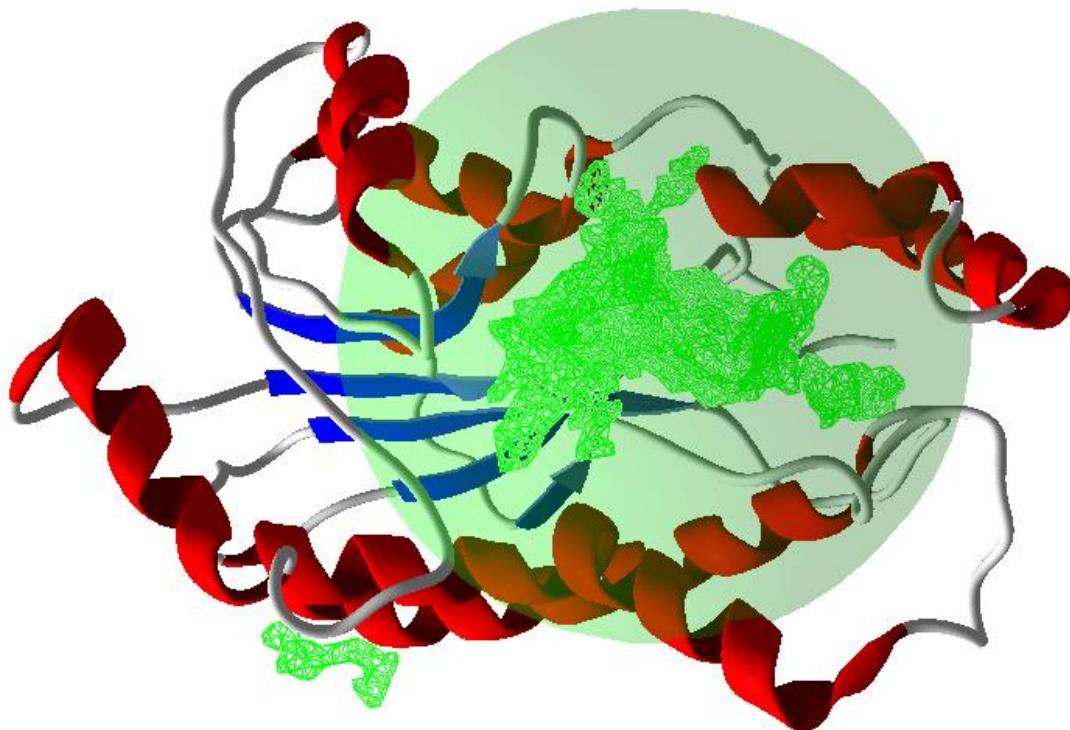
#### **4.3 Validação do Protocolo com o Programa *Molegro Virtual Docker(MVD)***

O programa MVD é um programa que se utiliza de um algoritmo de busca evolucionário, nos quais a modificação de características como distâncias de ligação, ângulos de ligação e ângulos diedros do ligante são variados, permitindo assim uma análise do tipo rígido-flexível.

A cada resultado possível são calculados RMSD em relação à estrutura anterior, energia e valor de *moldock score*. Para as condições incluídas no cálculo realizado, só seriam consideradas como resultados individuais poses com RMSD maior que 1,0 Å.

A busca foi realizada em uma esfera de 15 Angstroms centrada na cavidade de maior volume, ponto onde o substrato NADH foi encontrado na estrutura cristalográfica 2AQ8, que pode ser visualizada na Figura 10.

Figura 10 - Estrutura da enzima 2AQ8 utilizada para os ensaios de *docking* com o programa *Molegro Virtual Docker* destacando-se a esfera de busca e as cavidades encontradas.



**Fonte:** Elaborada pelo autor

As validações para o programa MVD resultaram em estruturas com o NADH ocupando a cavidade do sítio ativo da enzima, com valores de RMSD de 6,84 Angstroms (avaliação com a função *moldock score*) e 11,12 Angstroms (avaliação com a função *rerank score*).

Os maiores valores de RMSD para esta abordagem podem ser justificados em função desta abordagem de *docking* considerar o NADH flexível, com a alteração de conformação levar a melhores resultados para a interação ligante-proteína e distanciamento da conformação original.

## 5 BIBLIOTECA DE DERIVADOS DE NICOTINAMIDA VERSUS INHA (2AQ8)

### 5.1 Descrição da biblioteca

A biblioteca de derivados de nicotinamida foi montada utilizando-se o banco de dados ZINC<sup>(40)</sup>, disponível gratuitamente, realizando-se a busca a partir do fragmento estrutural da nicotinamida, restringindo-se os resultados a substâncias que possuíssem um coeficiente de Tanimoto (que mede a semelhança estrutural a partir de um algoritmo de busca) superior a 60%<sup>(41)</sup>.

O motivo da utilização da nicotinamida como estrutura base da biblioteca se deu por um cofator necessário à reação de redução catalisada pela enzima InhA de *Mycobacterium tuberculosis*, o NADH, possuir um fragmento nicotínico, deste modo havendo um sítio de ligação para estruturas derivadas, tornando-as potenciais ligantes para a enzima e por conseguinte, potenciais inibidores.

Como resultados da busca, foram obtidas 545 possíveis substâncias a serem testadas *in silico*, havendo a utilização de duas abordagens distintas: O *docking* rígido-rígido com uma função *score* bem estabelecida na literatura, XSCORE, e o *docking* rígido flexível, para avaliar de modo mais abrangente a biblioteca, com o uso de duas funções *score* distintas, *moldock* e *rerank*.

Os resultados de *docking* obtidos foram confrontados com os valores do ligante NADH, cofator natural da enzima de modo a estimar a afinidade dos ligantes em relação a este.

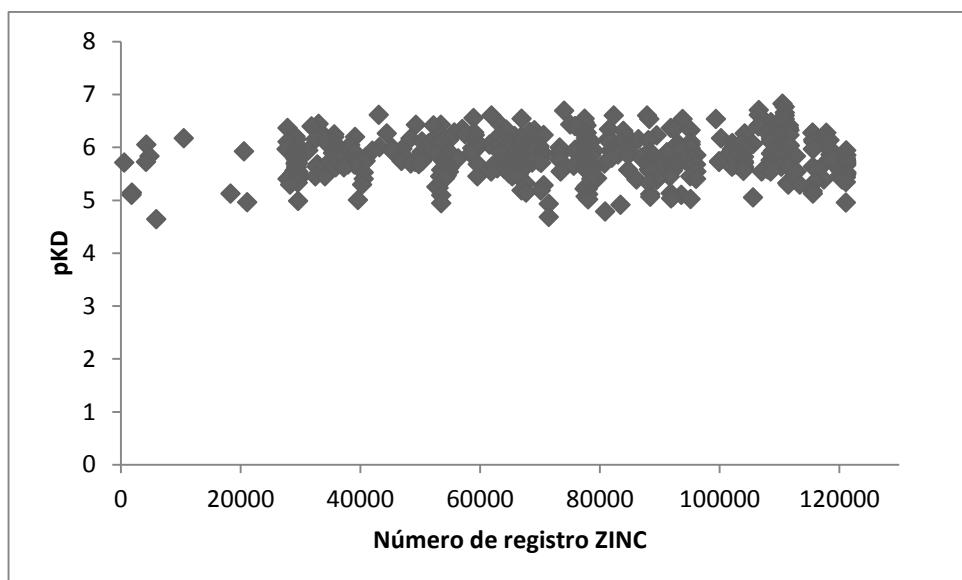
### 5.2 *Docking* rígido-rígido com o programa ZDOCK e função *score* XSCORE

A abordagem de *docking* rígido-rígido foi utilizada primeiramente em relação à abordagem rígido-flexível por haver um menor número de variáveis a serem controladas pelo protocolo, uma vez que ao fixar ângulos e distâncias interatômicas, pode-se reduzir o tempo de cálculo devido à simplificação do sistema. Como desvantagens, incluem-se a possibilidade de falsos positivos e negativos, devido ao fato da conformação estudada não necessariamente reproduzir uma conformação

energeticamente favorecida (originando resultados classificados como falsos positivos) ou a de melhor capacidade de ligação ao alvo (originando falsos negativos).

Observou-se para a biblioteca estudada que os compostos apresentaram afinidade ao sítio de ligação do NADH, com os valores de  $pK_D$  teóricos dispersos de 63 a 92% em relação a afinidade do substrato NADH (mostrados na Figura 11). Os valores observados com grau de interação com a enzima mais próximos ao NADH (maiores que 90%) permitem afirmar que os critérios utilizados para a criação da biblioteca foram suficientes para a determinação de possíveis antagonistas.

**Figura 11 - Dispersão dos valores de  $pK_D$  em função do código ZINC.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

O mecanismo de inibição da enzima pela isoniazida se dá pela formação de um aduto entre o radical isonicotinil e o NADH, desta forma a avaliação de possíveis inibidores para a InhA deve-se levar em consideração não só a constante de dissociação com o NADH mas também a do aduto formado.

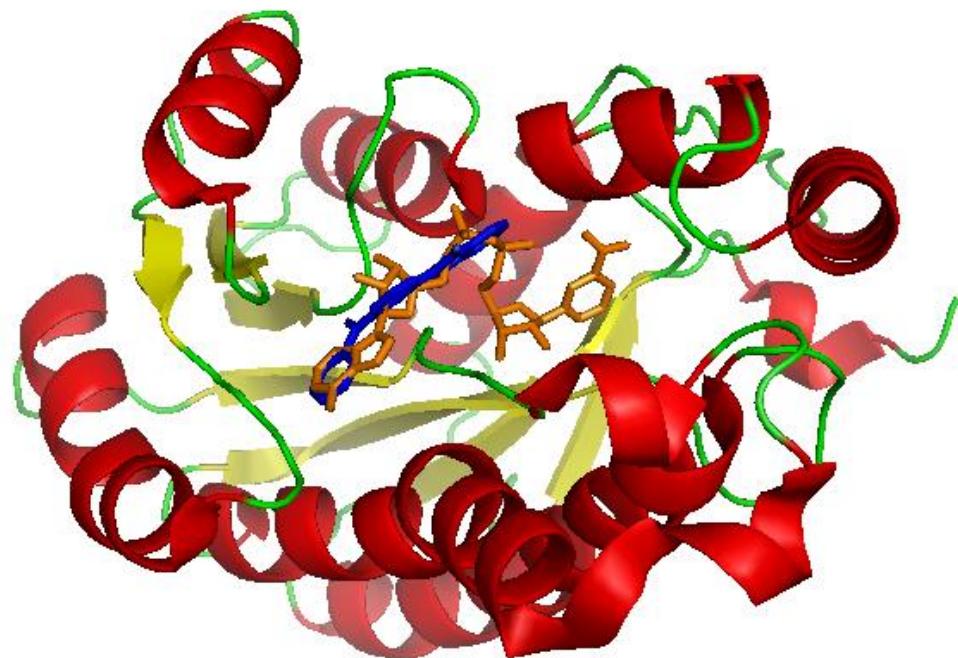
Para o NADH o valor experimental encontrado para o valor de  $K_D$  é de  $2 \times 10^{-6}$  ( $pK_D$  igual a 5,70), enquanto para o aduto formado este é menor que  $0,75 \times 10^{-9}$  ( $pK_D$  igual a 9,12).<sup>(35)</sup>

No caso dos resultados obtidos, deve-se observar que embora os resultados apresentem valores inferiores ao valor de  $pK_D$  do substrato da enzima, o NADH que possuiu um valor de 7,33 obtido na validação, foram observados compostos com

capacidade de ligação maior que o aduto izoniazida-NAD simulado nas mesmas condições, inibidor da enzima (4,98-5,79, dependendo da estereoquímica) e que o triclosan (outro inibidor da enzima<sup>(42)</sup>, com  $pK_D$  calculado de 6,19), o que pode sugerir a realização de testes experimentais com os melhores resultados. Explicação para tal fato está novamente no fato de a presença no NADH na estrutura do cristal de proteína utilizado como base dos estudos selecionar uma conformação que não é a mais estável em solução<sup>(36)</sup>.

A análise visual das estruturas de *docking* mostrou que as substâncias possuíram maior afinidade pelo sítio de ligação da porção adenina do NADH, o que indica um direcionamento causado pela porção hidrofóbica das moléculas ligantes. Isto pode ser observado na Figura 12, uma sobreposição da posição ocupada pelo ligante 110486 (azul) e o NADH (laranja) mostrando tal posicionamento.

**Figura 12 - Posicionamento do ligante 110486 (azul) em relação ao NADH da estrutura cristalográfica (laranja) no sítio ativo da enzima InhA.**

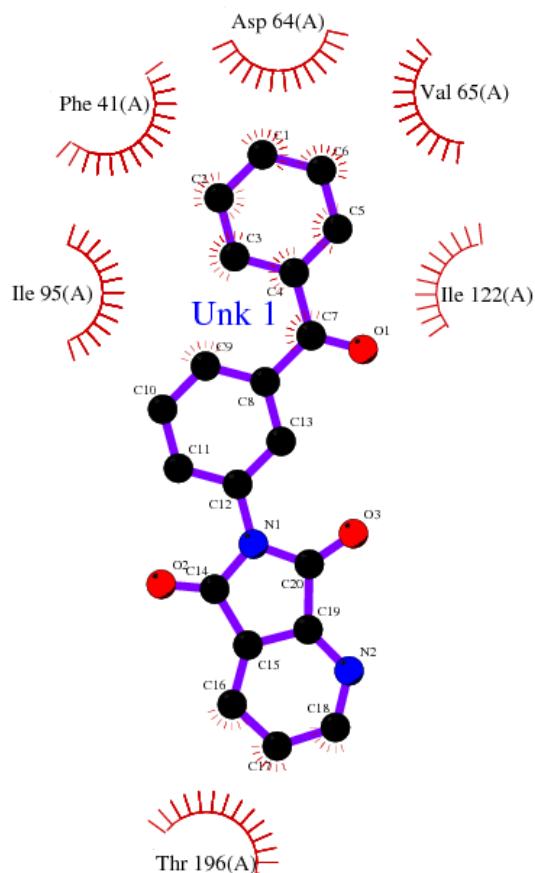


**Fonte:** Elaborada pelo autor

A razão para este posicionamento pode ser explicada pela menor contribuição de ligações de hidrogênio e estabilização da estrutura por outras forças

intermoleculares, conforme pode ser observado na Figura 13 com o desenho esquemático do LIGPLOT para o ligante 110486.

**Figura 13 - Desenho esquemático das interação do ligante 110486 com a enzima de estrutura 2AQ8 calculada por docking com o programa ZDOCK e função score XSCORE.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

Para uma análise mais detalhada das interações presentes foram selecionados os ligantes com os 20 maiores valores de  $pK_D$  e observados os aminoácidos da proteína que desempenhavam algum papel na interação com estas substâncias, o tipo de interação presente, e dentre os ligantes se existia alguma similaridade estrutural que pudesse indicar a causa de um valor de constante maior ou menor.

Os valores de  $pK_D$  e a indicação do código ZINC para estes ligantes são mostrados na Tabela 2.

**Tabela 2 – Valores de  $pK_D$  para os melhores inibidores da enzima 2AQ8 para tratamento com a função XSCORE.**

Código ZINC	$pK_D$	Código ZINC	$pK_D$
110486	6,83	110874	6,61
110881	6,77	58902	6,56
106506	6,71	66894	6,55
74038	6,70	77423	6,55
110884	6,66	88263	6,54
43036	6,62	93791	6,54
106516	6,62	99341	6,54
61891	6,61	110877	6,54
82310	6,61	77428	6,48
87863	6,61	108543	6,48

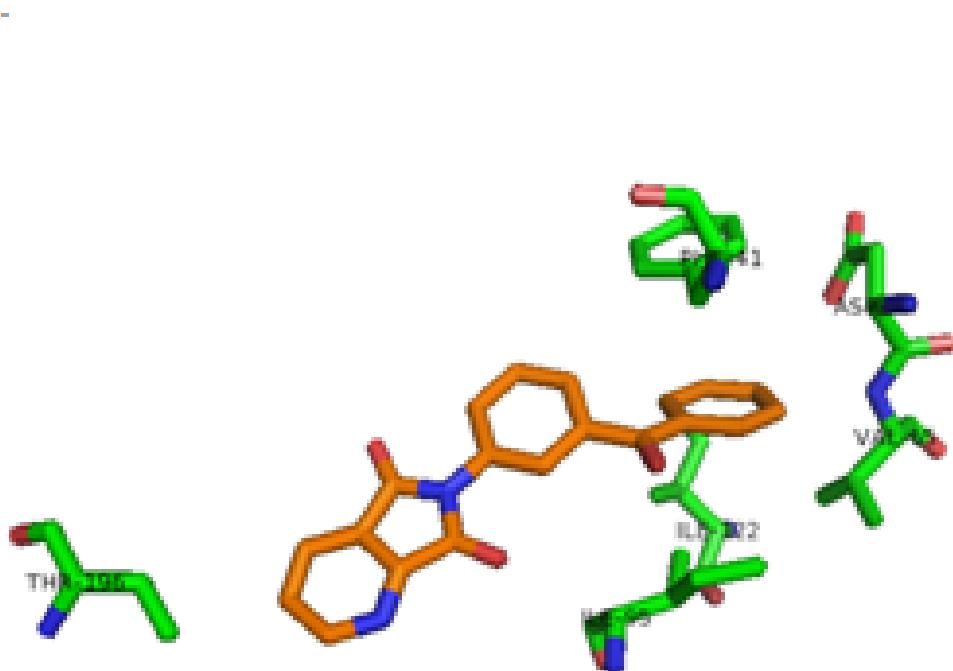
**Fonte:** Elaborada pelo autor

Observa-se que os valores de  $pK_D$  para estes ligantes encontram-se próximos, com o vigésimo ligante possuindo um valor de  $pK_D$  de aproximadamente 95% do valor do ligante de maior afinidade (uma vez que a escala é logarítmica, a afinidade é de 50%). O ligante de maior afinidade é aquele que possuir o maior valor de  $pK_D$  sendo o ligante 110486 conforme dito anteriormente.

### **5.2.1 ZINC 110486**

A substância de código 110486 foi a que mostrou maior afinidade teórica pela enzima 2AQ8. Com um  $pK_D$  teórico de 6,83 exibiu como complexo de maior afinidade a seguinte estrutura (Figura 14), destacando-se os aminoácidos que interagem com a molécula ligante.

**Figura 14 - Estrutura resultante do *docking* do ligante 110486 à enzima 2AQ8.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

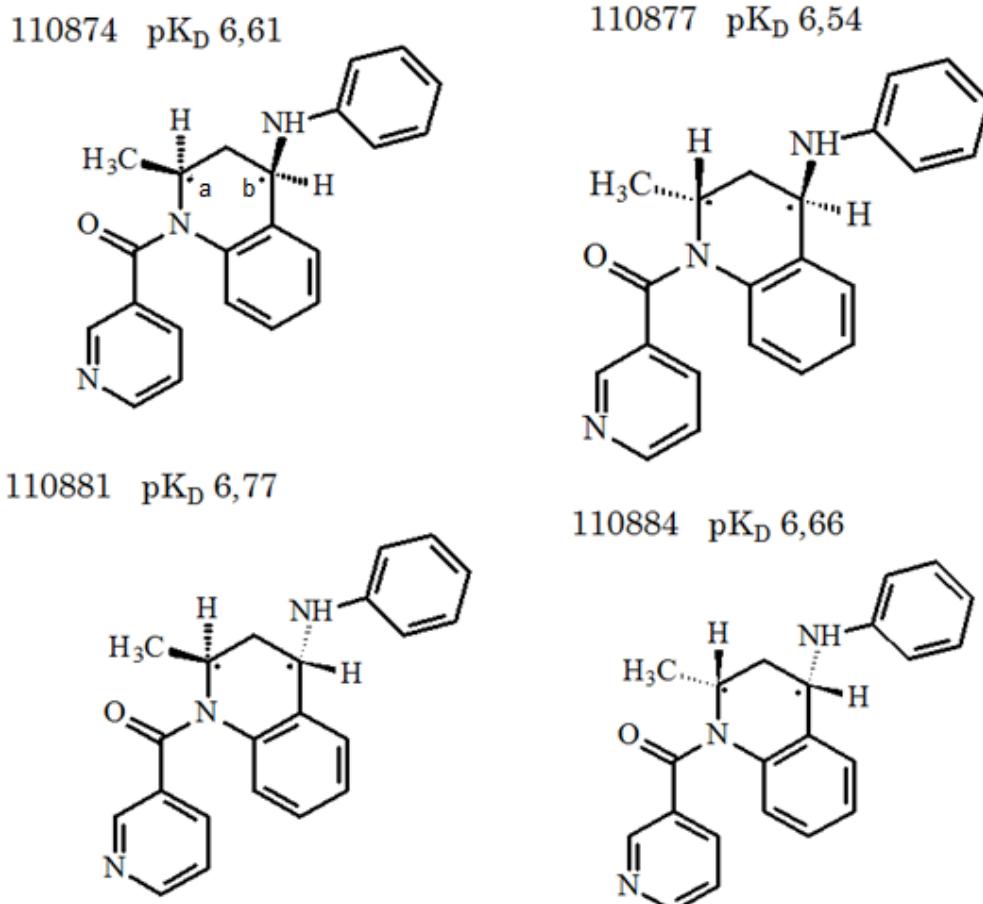
Observa-se que os aminoácidos existentes na Figura 14 interagem com o composto sem a presença de ligações de hidrogênio, havendo maior aproximação das cadeias laterais dos aminoácidos apolares aos anéis aromáticos existentes nas extremidades da molécula. Mesmo um aminoácido polar como a asparagina (ASP64) interage de forma hidrofóbica devido ao ligante estar posicionado próximo à sua cadeia carbônica, e não aos grupos polares carregados.

A interação  $\pi$ -stacking com o aminoácido PHE41 contribui fortemente para a estabilização da ligação deste ligante, conforme encontrado em outros compostos na literatura<sup>(35)</sup>.

### 5.2.2 Ligantes 110874, 110877, 110881 e 110884

As substâncias deste grupo possuem mesma estrutura plana, diferenciando-se apenas nas configurações dos carbonos quirais destacados na Figura 15.

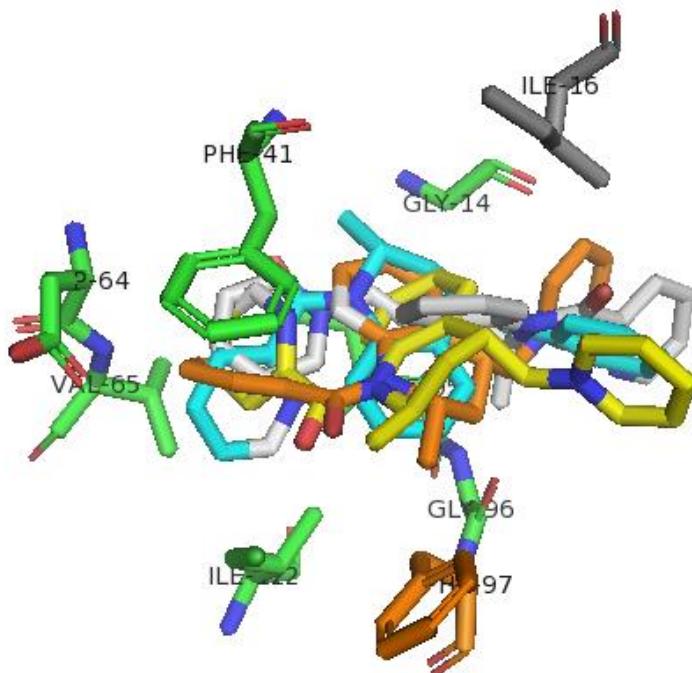
Figura 15 - Estruturas e  $pK_D$  dos ligantes 110874, 110877, 110881 e 110884 obtidos no *docking* com o programa ZDOCK e função *score* XSCORE.



**Fonte:** Elaborada pelo autor

Os ensaios de *docking* levaram a estruturas onde as posições dos ligantes sejam semelhantes dentro do sítio ativo da enzima embora a orientação das mesmas sejam diversas, conforme apresentado na Figura 16.

**Figura 16 - Resultados de *docking* dos ligantes 110874 (laranja), 110877 (amarelo), 110881 (cinza) e 110884 (azul) com a estrutura 2AQ8 usando o programa ZDOCK.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

No ligante 110881 a posição do grupo carbonila da nicotinamida encontra-se em posição oposta em relação aos demais ligantes (partir da direita, verifica-se o átomo de oxigênio, indicado em vermelho, do grupo carbolina na estrutura cinza, porém as demais estruturas o possuem próximos ao aminoácido PHE141, em verde). Conforme obtido a partir do uso do programa LIGPLOT, a grande maioria destas interações se dá de modo hidrofóbico, algo esperado pelo caráter apolar do sítio ativo da InhA.

Na Figura 16 estão também destacados os aminoácidos mais comuns em interações com estas estruturas, sendo mais relevantes: GLY14, PHE41, ASP64, VAL65, ILE95, GLY96 e ILE122. De um modo geral a interação realizada entre estes aminoácidos e os ligantes é de modo hidrofóbico, exceção feita a GLY96 que faz ligações de hidrogênio com os Ligantes 110874 e 110877.

Como um adicional observa-se que a ILE16 possui interações com todas as substâncias, exceto a 110877 e a PHE97 com todos exceto 110874, que reflete mudanças de configuração causando diferenças na posição de *docking*.

A predominância de outras forças intermoleculares, especialmente interações hidrofóbicas são condizentes com a caracterização destes aminoácidos, uma vez que glicina, valina, isoleucina e fenilalanina são classificados como apolares devido a sua cadeia lateral existente. Embora o ASP seja um aminoácido polar carregado negativamente, a interação deste com o ligante de modo hidrofóbico é explicada por sua cadeia carbônica estar voltada para o sítio ativo da enzima e seus grupos polares em direção oposta.

Os valores de  $pK_D$  dos ligantes, como os esperado mostraram-se dependentes da configuração dos centros assimétricos. Para os compostos que possuem o carbono quiral **a** (indicado na Figura 15) com a configuração S, foram observados os maiores valores de  $pK_D$ , 6,77 para o composto 110881 e 6,66 para o composto 110884.

Caso a configuração do carbono quiral **a** seja R, tanto a configuração R quanto a configuração S do carbono quiral **b** resultam valores de  $pK_D$  inferiores (compostos 110874 com  $pK_D$  6,61 e 110877 com  $pK_D$  6,54) aos compostos onde o carbono **a** possui configuração S.

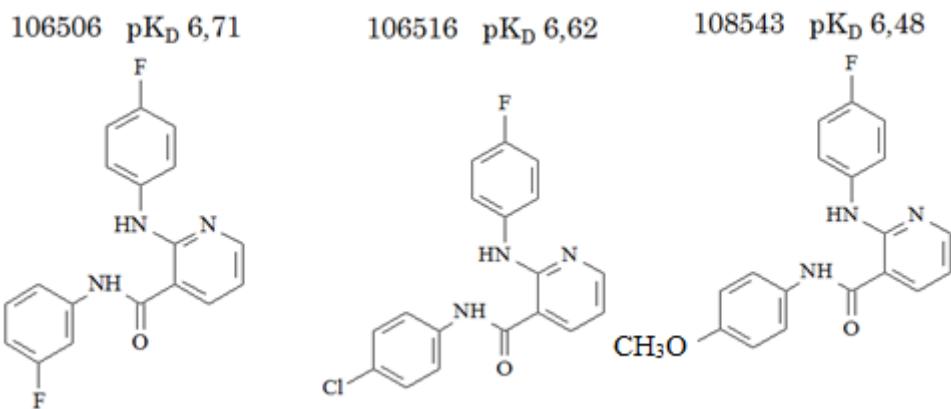
A inversão deste centro quiral modifica as possíveis interações que o ligante pode possuir com a cadeia peptídica, de modo que os compostos com configuração S orientam-se de modo a maximizar as interações intermoleculares, enquanto os com configuração R orientam-se de modo a formar uma ligação de hidrogênio com o resíduo de GLY96. Conforme observado pelos valores de  $pK_D$ , esta ligação de hidrogênio formada não é suficiente para compensar as interações hidrofóbicas perdidas ou menos efetivas.

Deste modo, porém em menor escala, a configuração do carbono quiral causa efeito similar: as moléculas com o carbono em configuração S (110881 com  $pK_D$  6,77 e 110874 com  $pK_D$  6,61) possuem maiores valores de  $pK_D$  que as com o carbono R (110884 com  $pK_D$  6,66 e 110877 com  $pK_D$  6,54), desde que a configuração do carbono quiral **a** seja mantida constante. Este efeito se dá novamente pela orientação onde os grupos metila possuirão interações mais fortes, porém uma vez que este grupo é bem menor que os grupos fenil ou nicotinamida este efeito é menos pronunciado.

### 5.2.3 Ligantes 106506, 106516 e 108543

As substâncias 106506, 106516 e 108543 possuem um esqueleto em comum, com a diferenciação entre elas ocorrendo na mudança de posição e tipos de substituintes nos anéis aromáticos. A Figura 17 mostra as estruturas dos três ligantes, e seus respectivos valores de  $pK_D$ .

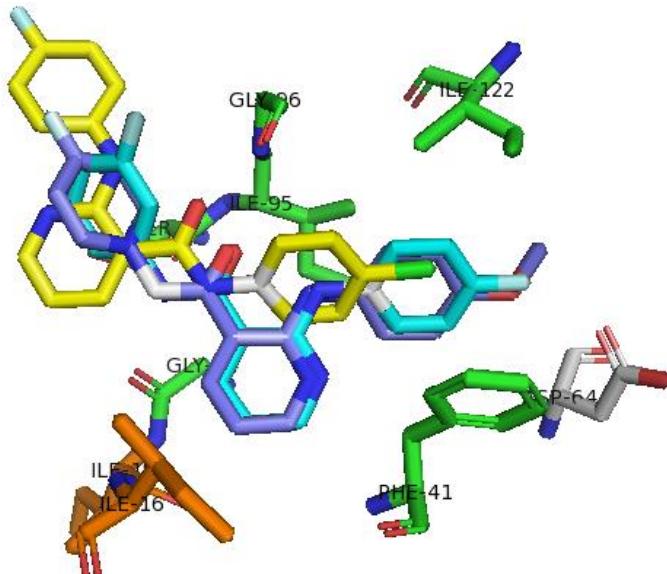
**Figura 17 - Estruturas e  $pK_D$  dos ligantes 106506, 106516 e 108543 obtidos no *docking* com o programa ZDOCK e função *score* XSCORE.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

As estruturas encontradas no estudo de *docking* podem ser vistas sobrepostas na Figura 18.

**Figura 18 - Resultados de docking dos ligantes 10506 (azul claro), 106516 (amarelo) e 108543 (azul) com a estrutura 2AQ8 usando o programa ZDOCK.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

A observação da Figura 18 indica que a estrutura 106516 possui uma conformação diferente das estruturas 106506 e 108543, provavelmente pelo o maior volume do átomo de cloro inviabilizar a mesma conformação observada para as moléculas apenas com átomos de flúor. Além disso, pela não dispersão das estruturas, que os ligantes ocupam praticamente uma mesma posição no sítio ativo, interagindo principalmente com os aminoácidos GLY14, PHE41, SER94, ILE95, GLY96 e ILE122. Estes aminoácidos interagem sem formar ligações de hidrogênio, à exceção da GLY96.

Os aminoácidos com cadeia carbônica indicada em cor laranja na Figura 18 (ILE15, ILE16) interagem apenas com os ligantes 106506 e 108543 por estes possuírem o anel aromático em sua proximidade, havendo assim o contato hidrofóbico. O Aminoácido ASP64, marcado em cinza, interage somente com o ligante 106506, formando uma ligação de hidrogênio com o átomo de flúor, sendo talvez um dos responsáveis diretos pelo valor de  $pK_D$  apresentado por este ligante.

O composto de melhor afinidade pela enzima foi 106506, que contou com dois átomos de flúor como substituintes, onde além de ligações de hidrogênio com o oxigênio da carbonila, o nitrogênio amídico e o flúor em posição para em relação ao

nitrogênio, existe uma grande estabilização por parte de interações hidrofóbicas com a isoleucina e a fenilalanina.

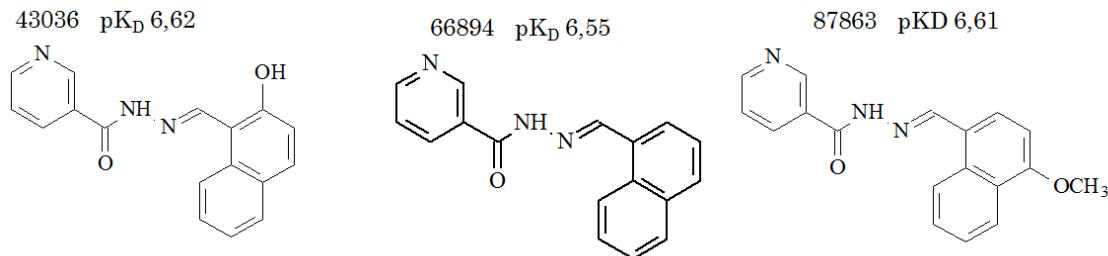
Para o ligante 106516, a troca de um flúor na posição 3 do anel benzênico por um cloro na posição 4 alterou as características da substância de tal modo que houve uma inversão dos anéis fenilas em relação aos aminoácidos de interação hidrofóbica quando ao ligante 106506. Esta nova conformação causou interações menos efetivas, perda da ligação de hidrogênio com o nitrogênio amídico e um decréscimo no valor de  $pK_D$  (de 6,71 para 6,62).

Já o ligante 108543, quando comparado ao ligante 106506, possui uma metoxila em substituição ao átomo de flúor na posição 4 ao nitrogênio e a troca do outro átomo de flúor da posição 3 para a posição 4. A orientação observada para este ligante foi quase igual ao ligante 106506, embora os novos substituintes ocasionassem um decréscimo nas interações levando o valor do  $pK_D$  a diminuir (de 6,77 para 6,48).

#### 5.2.4 Ligantes 43036, 66894 e 87863

As substâncias 43036, 66894 e 87863 diferem somente no tipo e na posição do substituinte no anel de naftalênico existente nas moléculas. As estruturas destes ligantes bem como seus valores de  $pK_D$  podem ser encontrados na Figura 19.

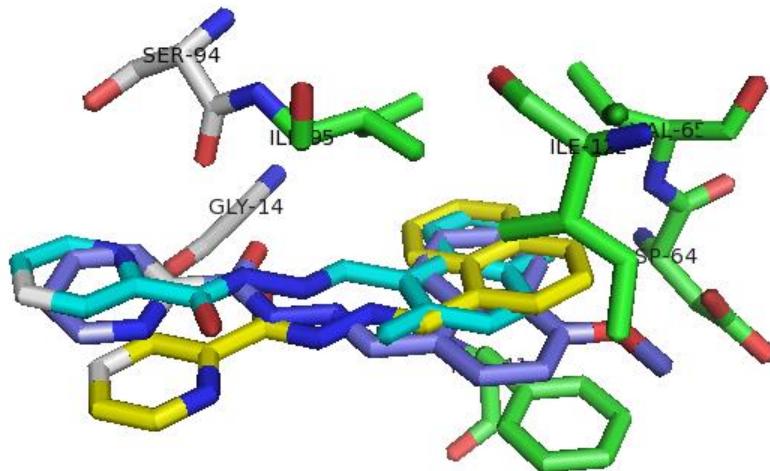
**Figura 19 - Estructuras e  $pK_D$  dos ligantes 43036, 66894 e 87863 obtidos no docking com o programa ZDOCK e função score XSCORE.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

As estruturas obtidas do *docking* podem ser observadas na Figura 20 onde se pode ver que embora as posições dos anéis de piridina e naftaleno sejam próximas, o ligante 66894 possui uma orientação diferente da carbonila.

Figura 20 - Resultados de *docking* dos ligantes 43036 (azul claro), 66894 (amarelo) e 87863 (azul) com a estrutura 2AQ8 usando o programa ZDOCK.



**Fonte:** Elaborada pelo autor

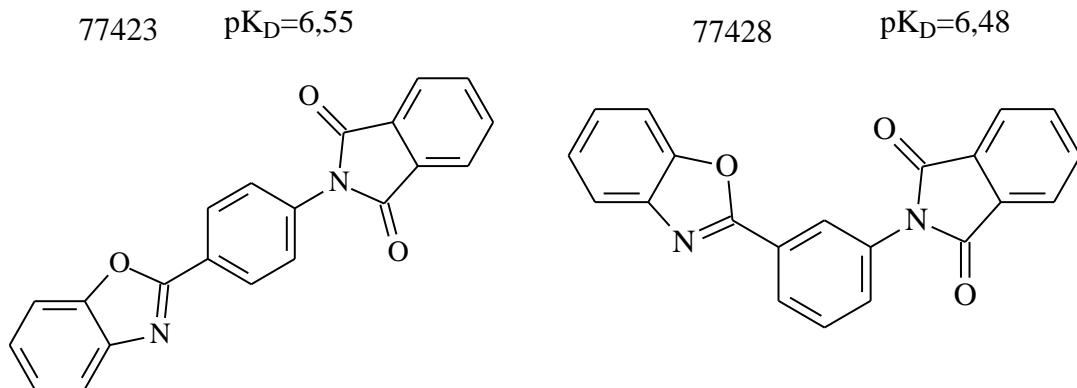
Observa-se que os aminoácidos PHE41, ASP64, VAL65, ILE95 e ILE122 que interagem com todas as três substâncias estão interagindo de forma hidrofóbica com o grupo naftil existente na molécula, sendo então o grande ponto de estabilização deste tipo de substâncias.

Os aminoácidos GKY14 e SER 94 interagem com o anel da nicotinamida das substâncias 43036 e 87863, com o valor ligeiramente superior de  $pK_D$  do 43036 (6,62 contra 6,61) podendo ser explicado pela existência de ligações de hidrogênio entre a SER94 e o ligante. Tais interações estabilizam ambos os ligantes em relação à substância 66894 que por possuir orientação diversa, possui interações mais fracas e, portanto menor  $pK_D$ .

### 5.2.5 Ligantes 77423 e 77428

As substâncias 77423 e 77428 diferem apenas no padrão de substituição do anel aromático central (1,4 na molécula de 77423 e 1,3 na molécula de 77428), conforme pode ser observado na Figura 21.

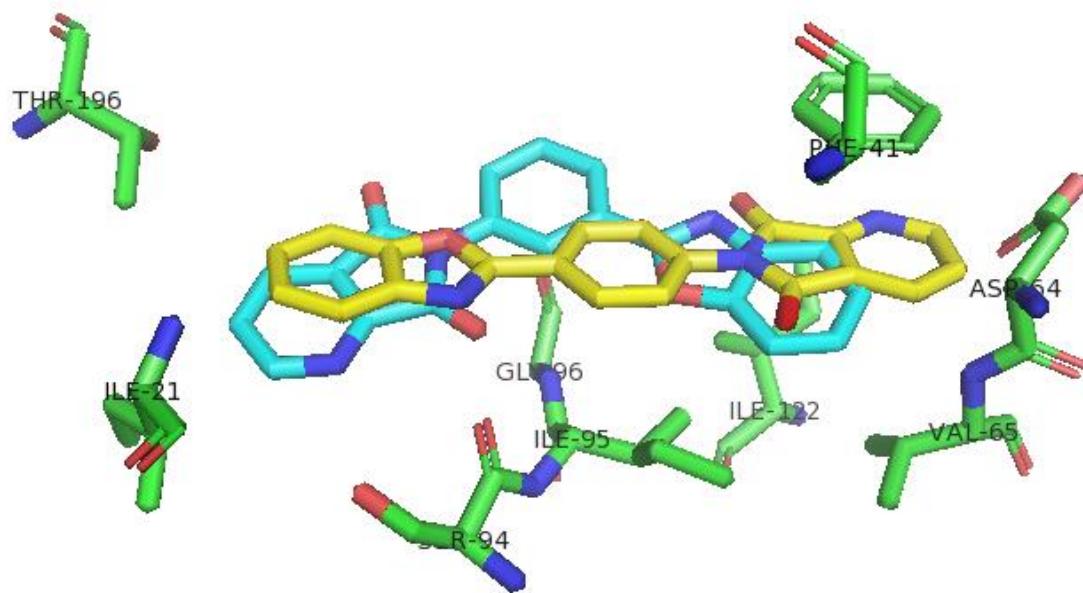
**Figura 21 - Estruturas e  $pK_D$  dos ligantes 77423 e 77428 obtidos no *docking* com o programa ZDOCK e função *score* XSCORE.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

As estruturas de *docking* mostraram-se semelhantes, embora a orientação do ligante no sítio ativo tenha se mostrado diversa, como apresentado na Figura 22.

**Figura 22 - Resultados de *docking* dos ligantes 77428 (azul claro) e 77423 (amarelo) com a estrutura 2AQ8 usando o programa ZDOCK.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

As duas estruturas possuem como pontos de interação em comum os aminoácidos ILE21, PHE41, ASP64, VAL65, SER94, ILE95 GLY96, ILE122 e

THR196. As interações foram prioritariamente hidrofóbicas, embora a SER 94 faça ligações de hidrogênio com ambas substâncias e a GLY96 com a 77428.

A seleção da orientação da substância 77428 pode ser justificada a partir do ponto que a geometria da molécula permite tanto a estabilização por interações hidrofóbicas com os aminoácidos à direita na Figura 21, como a formação das pontes de hidrogênio com a GLY96.

A substituição em 1,4 não torna as distâncias favoráveis para ambas as interações (hidrofóbicas e ligação de hidrogênio com a GLY96), forçando uma nova orientação, que possui uma nova ligação de hidrogênio, com a GLY14, e as interações hidrofóbicas com o aminoácido PHE41 se dão de modo mais efetivo de modo que o valor de  $pK_D$  é superior para a estrutura 77423.

### **5.3 Docking rígido-flexível com o programa Molegro Virtual Docker(MVD) e função score Moldock**

A seguir a análise do *docking* rígido foi feito um estudo considerando o ligante flexível e a proteína rígida. O objetivo deste tipo de análise consiste em simular um sistema mais próximo do real onde tanto as conformações de ligante e proteína são variáveis, buscando assim comparar os resultados das duas metodologias e, onde houver concordância, fundamentar ainda mais um possível candidato a testes.

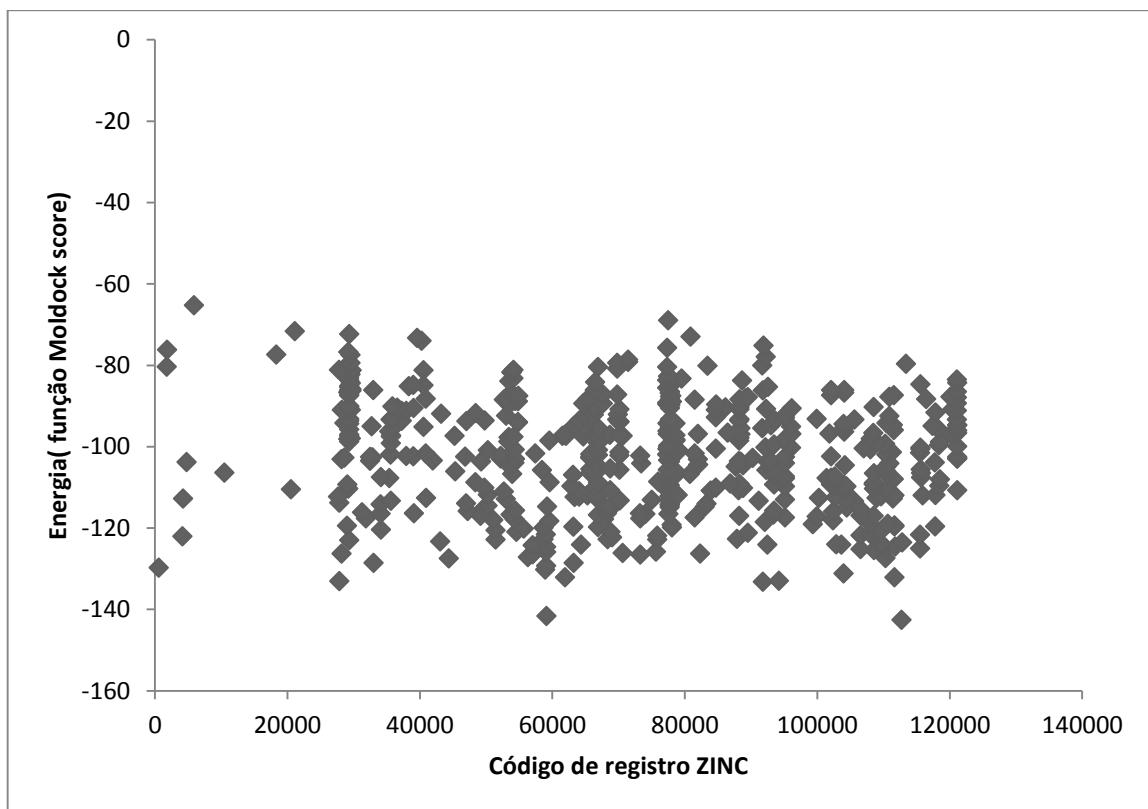
O procedimento de análise do MVD consiste em uma verificação da interação das possíveis conformações do ligante com a proteína, sendo utilizada a função *score Moldock* para seleção das melhores estruturas, havendo após cada tentativa de *docking*, o cálculo de RMSD (para caso seja maior de 1,0 Angstroms levar a uma pose válida) e de *moldock score* (para avaliação de para determinação se consiste em uma estrutura de maior afinidade. Caso as condições de término sejam satisfeitas, o programa cessa a rotina. Então as estruturas obtidas são reordenadas em termos da função *score rerank*, e de acordo com a metodologia empregada as 5 melhores estruturas de cada ligante foram salvas.

Uma vez que a estimativa inicial do programa se dá pelo uso da função *Moldock*, os resultados observados para a biblioteca foram primeiramente estudados em função desta.

A função é composta de dois termos para o cálculo da energia de interação entre ligante e proteína, um termo dependente da interação ligante-proteína e outro termo dependente da característica do ligante e de sua conformação analisada. <sup>(14)</sup>

O resultado da aplicação é um valor de energia em uma escala arbitrária de energia livre, com os valores de energia menores correspondendo a uma maior afinidade. Os valores observados podem ser observados na dispersão mostrada na Figura 23.

**Figura 23 - Dispersão dos valores de energia calculados pelo *Moldock score* em função do código ZINC.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

Observa-se que os valores encontrados estão bastante dispersos nos valores de energia entre 33 e 72% dos valores encontrados para o NADH como ligante. Assim, todos os valores encontrados para a biblioteca foram superiores aos encontrados para

o NADH (-196,0 unidades arbitrárias de energia), que seriam um indicativo de afinidade mais baixa que este.

Para uma análise mais detalhada foram selecionados os 20 ligantes que resultaram nos menores valores de energia, que podem ser encontrados na Tabela 3.

**Tabela 3 - Valores de energia para os melhores inibidores da enzima 2AQ8 para tratamento com a função *Moldock score***

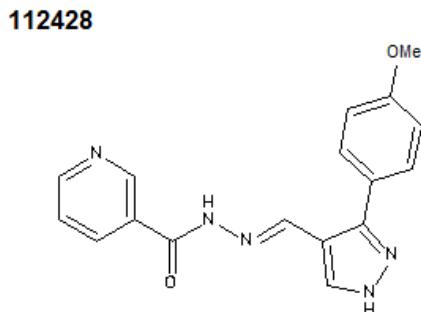
Código ZINC	Energia (ua)	Código ZINC	Energia (ua)
112428	-142,5	59083	-129,3
59087	-141,6	63210	-128,6
91805	-133,2	33020	-128,5
27840	-133,0	44369	-127,4
94203	-133,0	110299	-127,4
111670	-132,1	56305	-127,1
61891	-132,1	73286	-126,5
103983	-131,2	57037	-126,5
58902	-130,2	28184	-126,3
544	-129,7	82310	-126,3

**Fonte:** Elaborada pelo autor

### **5.3.1 Substância 112428**

O melhor resultado obtido com o uso da função *moldock score* foi a de código 112728, com um valor equivalente a 72% da afinidade do NADH. A estrutura da substância é mostrada na Figura 24 e os detalhes de sua interação são discutidos na seção a seguir.

Figura 24 - Estrutura do ligante 112428 utilizado para *docking* com a enzima 2AQ8 com o programa MVD e função *moldock score* .

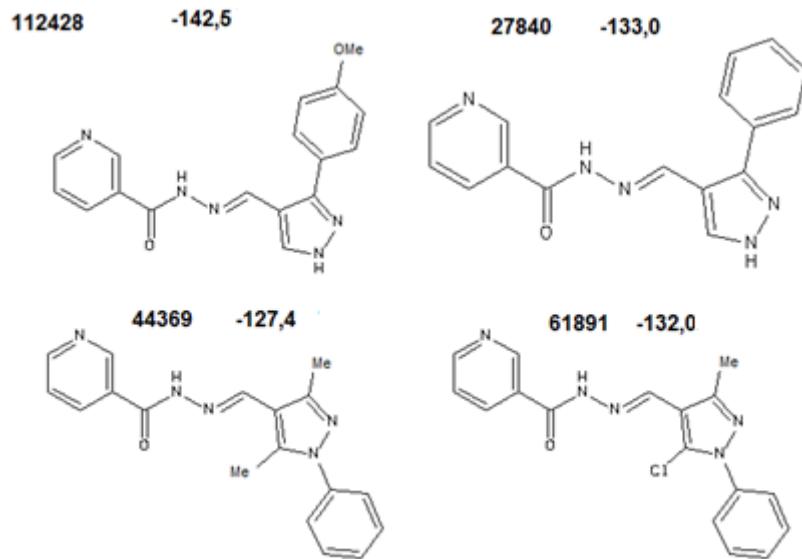


**Fonte:** Elaborada pelo autor

### 5.3.2 Substâncias 27840, 44369, 61891 e 112428

As substâncias 44369, 61891 e 112728 são derivadas da substância 27840 a partir de modificações no anel diazólico ou fenila, conforme mostrado na Figura 25, juntamente com os valores de energias calculadas pelo *moldock score* .

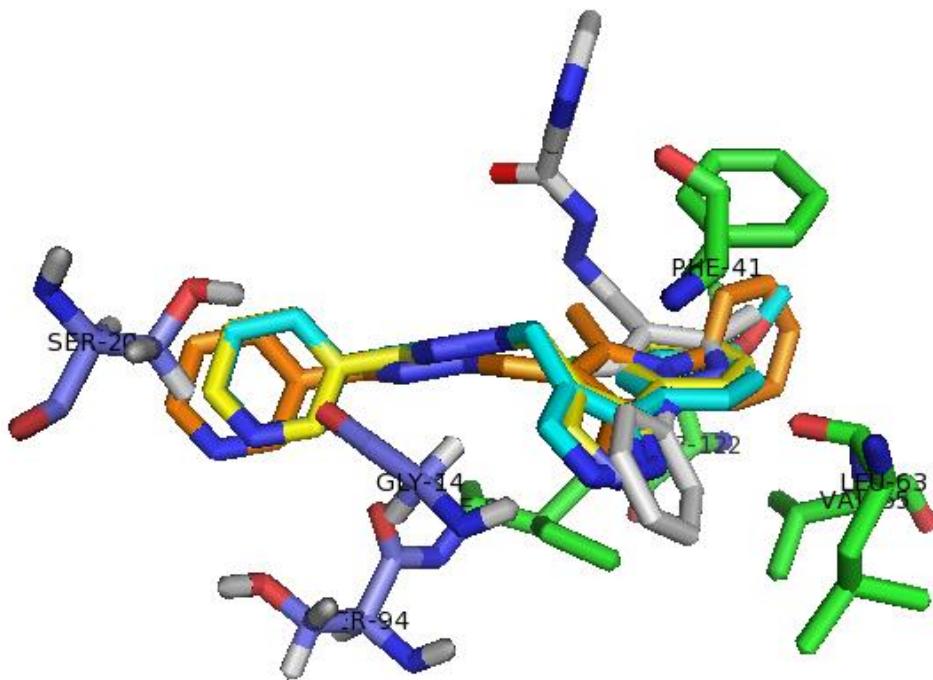
Figura 25 - Estruturas e valores de energias calculadas pelo *moldock score* para os ligantes 27840, 44269, 61891 e 112428 após o *docking* com a enzima 2AQ8 com o programa MVD.



**Fonte:** Elaborada pelo autor

Os resultados de *docking* mostraram que embora as moléculas ocupassem a mesma posição no sítio, o ligante 61891 possui o anel piridínico em posição diversa dos demais ligantes, conforme observado na Figura 26.

**Figura 26 - Resultados de docking dos ligantes 27840 (amarelo), 44369 (laranja), 61891 (cinza) e 112728 (azul claro) com a estrutura 2AQ8 usando o programa MVD e função score moldock.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

Os aminoácidos marcados em verde são os que interagem com todas as quatro substâncias, com suas cadeias apolares realizando interações hidrofóbicas com a parte fenila dos ligantes.

A diferente conformação da substância 61891 é sustentada principalmente pela ligação de hidrogênio formada entre o nitrogênio piridínico e a PHE41 e pelo fato do anel imidazólico possuir polaridade modificada com a adição do átomo de cloro, que tornou as interações hidrofóbicas que estabilizam os demais ligantes do grupo mais fracas.

Os aminoácidos marcados em azul são os que causam a estabilização do anel piridínico dos ligantes 27840, 44369 e 112728. O ligante 44369 por possuir duas metilas no anel imidazólico possui uma orientação diferente dos outros dois ligantes.

Já as substâncias 27840 e 112728, que diferem apenas por um grupo metóxido na última possuem uma orientação que praticamente se sobrepõe e o melhor

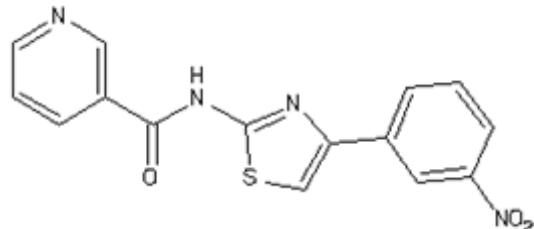
resultado observado se deve a interações hidrofóbicas extras com os aminoácidos ILE122 e PHE41.

### 5.3.3 Substâncias 63210 e 73286

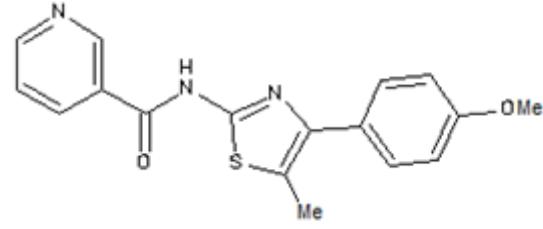
As substâncias 63210 e 73286 possuem a mesma cadeia carbônica e diferenciam-se pelos substituintes existentes na mesma, conforme observado na Figura 27.

**Figura 27- Estruturas e valores de energias calculadas pelo moldock *score* para os ligantes 63210 e 73286 após o *docking* com a enzima 2AQ8 utilizando o programa MVD.**

**63210 -128,5**



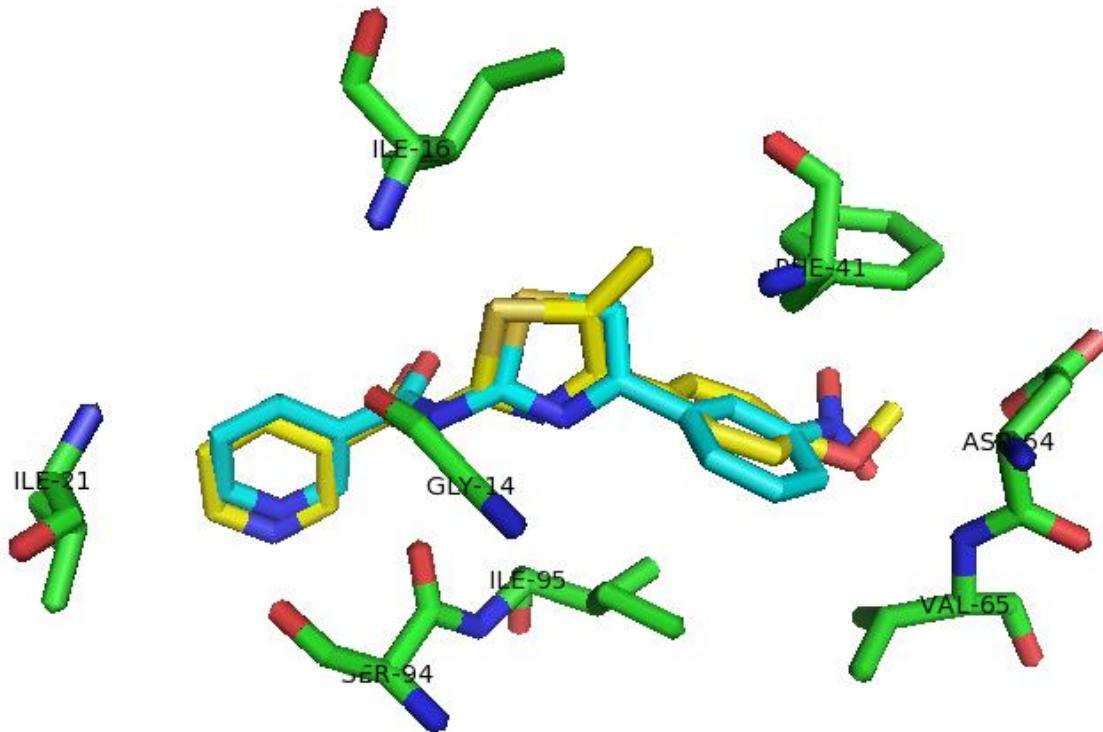
**73286 -126,5**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

As estruturas de *docking* encontradas refletem esta diferença no padrão de substituição, onde a posição do grupo polar (nitro ou metoxila) no anel benzênico causa uma modificação na orientação do ligante no sítio ativo, conforme mostrado na Figura 28.

Figura 28 - Resultados de *docking* dos ligantes 63210 (azul claro) e 73286 (amarelo) com a estrutura 2AQ8 usando o programa MVD e função *score moldock*.



**Fonte:** Elaborada pelo autor

Devido à alta semelhança estrutural das duas moléculas e as orientações encontradas, os aminoácidos que interagem com as duas substâncias são praticamente os mesmos, GLY14, ILE16, ILE21, PHE41, ASP64, VAL65, SER94 e ILE95. Os aminoácidos GLY14 e SER94 formam ligações de hidrogênio com o nitrogênio amídico, a VAL65 com o grupo polar do anel (nitro ou metoxila) enquanto os demais formam interações do tipo hidrofóbicas. O ligante 73286 possui ainda interações hidrofóbicas com o aminoácido ILE122.

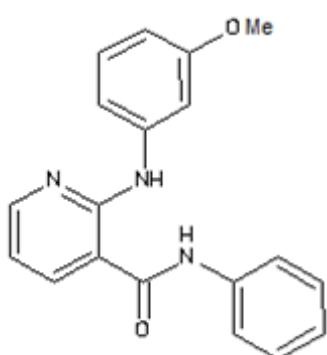
A pequena diferença nos valores de *moldock score* observada se dá por a mudança do grupo substituinte polar da fenila, da posição 3 para a posição 4, juntamente com a necessidade da formação da ligação de hidrogênio, causa uma mudança na posição dos demais ligantes, levando a uma soma de interações ligeiramente menos efetivas.

#### 5.3.4 Substâncias 110299 e 111670

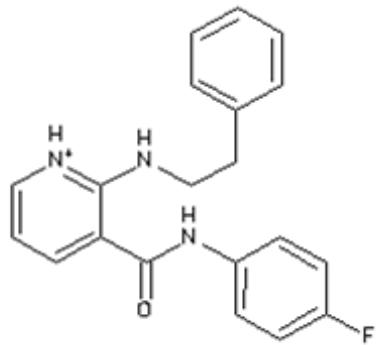
As substâncias 110299 e 111670 se diferem em posições de substituintes e na carga das espécies, sendo a 110299 neutra e a 111670 carregada positivamente, com suas estruturas podendo ser vistas na Figura 29.

**Figura 29- Estruturas e valores energias calculadas pelo de moldock score para os ligantes 110299 e 111670 após o docking com a enzima 2AQ8 utilizando o programa MVD.**

**110299 -127,4**



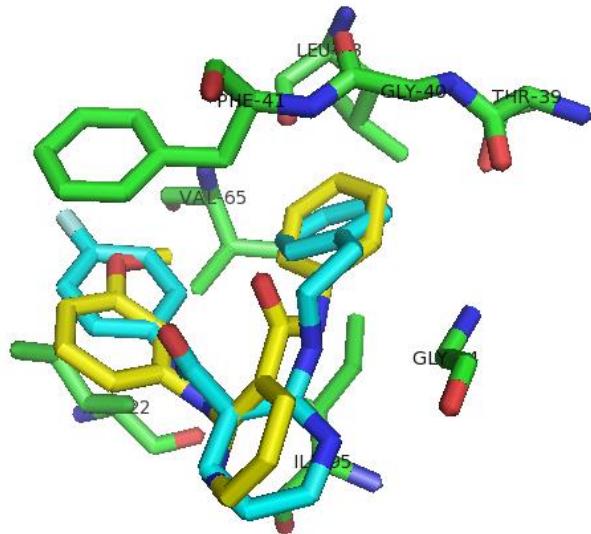
**111670 -132,1**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

Os ensaios de *docking* mostraram as moléculas em um mesmo ponto do sítio ativo, porém com posições reversas, conforme observado na Figura 30.

**Figura 30 - Resultados de docking dos ligantes 111670 (azul claro) e 110299 (amarelo) com a estrutura 2AQ8 usando o programa MVD e função *score moldock*.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

Os aminoácidos que possuem interações com ambas as moléculas são GLY14, THR39, GLY40, PHE41, LEU63, VAL65, ILE95, ILE12. Estas interações possuem um caráter predominantemente hidrofóbico e deste modo o ligante que possuir estas interações de modo mais efetivo será a melhor qualificada como ligante.

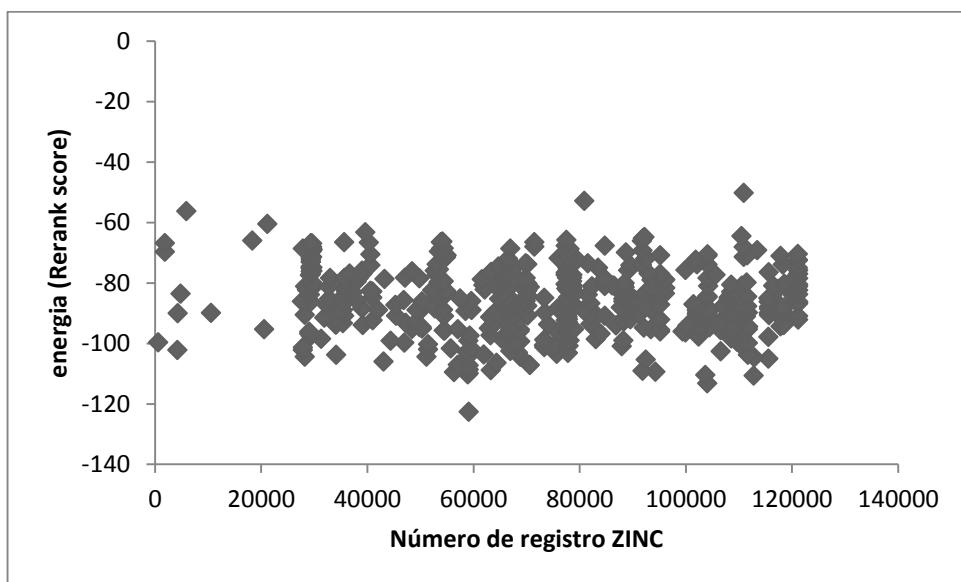
A diferença entre as conformações das duas moléculas é forçada pela existência de ligações de hidrogênio, o ligante 110299 possui duas entre o aminoácido GLY 96 e os nitrogênios piridínico e o da amina, enquanto o ligante 111670 possui entre o átomo de flúor e o aminoácido ASP64. Estas ligações de hidrogênio estão fortemente relacionadas com a posição diversa ocupada pelas duas moléculas, porém a substância 111670 mesmo possuindo menos ligações de hidrogênio ainda assim possui um melhor valor de *moldock score* por possuir uma soma de interações mais forte, altamente influenciada pelas interações hidrofóbicas mais efetivas especialmente com a PHE41.

#### 5.4 Docking rígido-flexível com o programa Molegro Virtual Docker e função *score rerank*

A função *rerank*, como o nome sugere é um reordenamento das energias obtidas com a função *Moldock*, porém com diferentes pesos para cada contribuição energética. É observado na literatura que esta abordagem pode levar a melhores resultados, deste modo ambos os resultados, com a função *Moldock* e com a função *rerank* estão sendo mostrados, para haver uma comparação mais abrangente de abordagens.

Assim como na função *Moldock*, os resultados são ordenados em uma escala arbitrária de energia, com os menores valores correspondendo a uma maior afinidade. Os valores podem ser observados em função do código ZINC na Figura 31.

**Figura 31 - Dispersão dos valores de energias calculadas pelo *rerank score* em função do código ZINC.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

Também como na função *Moldock*, os valores encontram-se espalhados na faixa entre 32 e 78% em relação ao valor de energia obtido pelo NADH nas mesmas condições, podendo indicar que os ligantes possuiriam afinidade menor que o mesmo.

Assim como nos demais casos foram selecionados os 20 ligantes de maior afinidade estimada para uma observação detalhada das estruturas obtidas. Os valores de energia destes encontram-se na Tabela 4.

**Tabela 4 - Valores de energia para os melhores inibidores da enzima 2AQ8 para tratamento com a função *rerank score***

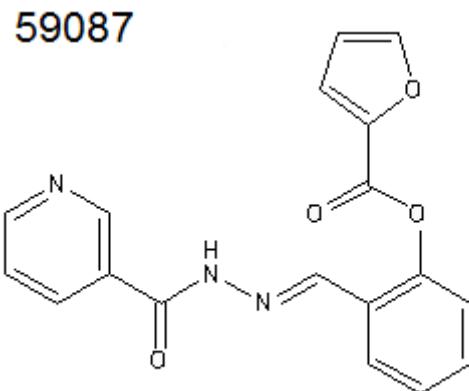
Código ZINC	Energia (ua)	Código ZINC	Energia (ua)
59087	-122,6	59036	-108,6
103983	-113,1	59057	-107,2
112728	-110,6	70599	-107,1
103637	-110,4	57037	-107,0
58902	-110,2	64323	-106,4
59083	-109,8	43036	-106,0
56305	-109,5	92438	-105,3
94203	-109,3	115522	-105,0
91805	-109,1	58693	-104,7
63210	-108,8	112835	-104,6

**Fonte:** Elaborada pelo autor

#### **5.4.1 Substância 59087**

O melhor resultado obtido com o uso da função *score rerank* foi a de código 59087, de estrutura mostrada na Figura 32. Ainda assim seu valor observado para a energia calculada pelo *rerank score* foi bastante superior ao encontrado para o NADH, indicando uma interação mais fraca.

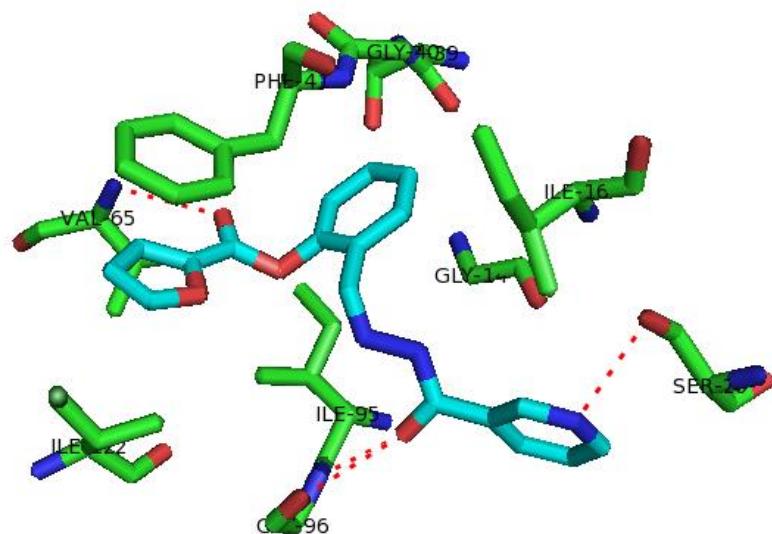
**Figura 32 - Estrutura do ligante de código 59087, que possui maior valor de energia calculada pelo *rerank score* dentre os avaliados para a enzima 2AQ8 com o programa MVD.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

As interações encontradas são quase em sua totalidade de origem hidrofóbica, exceção feita às ligações de hidrogênio encontradas com os aminoácidos GLY96 e VAL65 com as carbonilas existentes e SER20 com o nitrogênio piridínico. Observa-se ainda uma interação  $\pi$  stacking<sup>(35)</sup> com do anel de furano com a PHE41, conforme observado na Figura 33.

**Figura 33 - Interação do ligante 59087 com a enzima 2AQ8 utilizando o programa MVD e a função *rerank score*.**

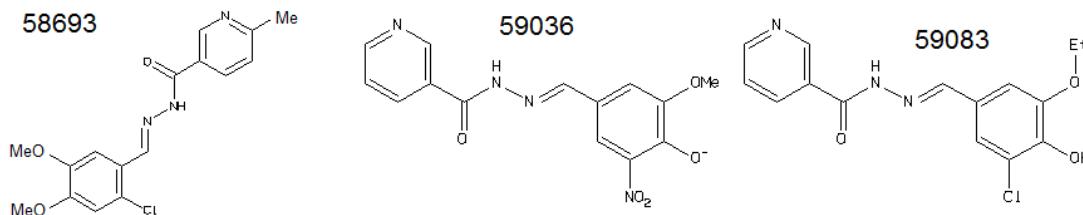


**Fonte:** Elaborada pelo autor

#### **5.4.2 Substâncias 58693, 59036 e 59083**

As substâncias 58693, 59036 e 59083 diferenciam-se basicamente pelos grupos substituintes e suas posições no anel fenílico além do fato da substância 58693 possuir um grupo metila no anel piridínico, conforme mostrado na Figura 34.

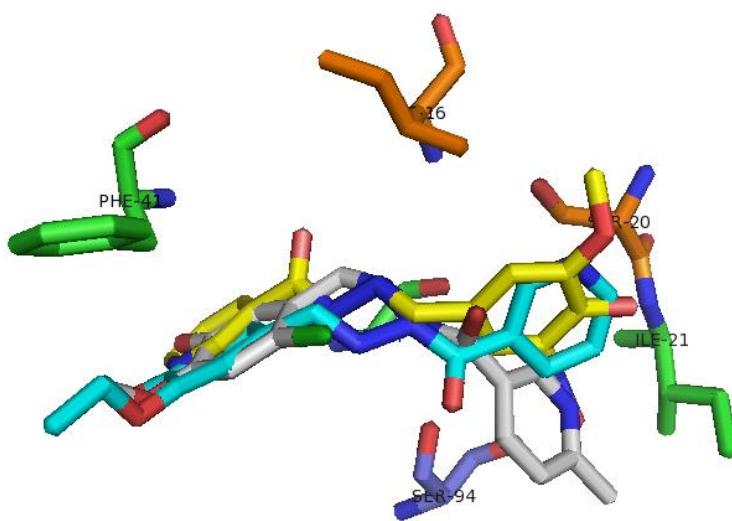
**Figura 34 - Estruturas dos ligantes 58693, 59036 e 59083.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

A partir dos ensaios de *docking* destes ligantes com a estrutura 2AQ8, foram obtidas estruturas nas quais tanto fatores hidrofóbicos como polares (incluindo ligações de hidrogênio) influenciaram no posicionamento das moléculas, conforme mostrado na Figura 35.

**Figura 35 - Resultados de docking dos ligantes 59083 (azul claro), 59036 (amarelo) e 58693 (cinza) com a estrutura 2AQ8 usando o programa MVD e função score rerank.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

Os aminoácidos marcados em verde (GLY14, ILE21, PHE41) na Figura 34 são aminoácidos que interagem com todas as três substâncias. Estas interações são

predominantemente hidrofóbicas. Os aminoácidos marcados em laranja, ILE16 e SER20, interagem com as substâncias 59083 e 59036 enquanto a SER94 (em roxo) interage com as substâncias 59036 e 58693.

Ao se observar a orientação das moléculas no sítio ativo se verifica que o ligante 59036 possui o anel piridínico em posição oposta às demais moléculas. Esta é justificada pela estabilização causada pela formação de três ligações de hidrogênio entre o ligante e a proteína, através dos grupos polares substituintes do anel fenil, que seriam perdidas, caso nesta posição se encontrasse o anel piridínico.

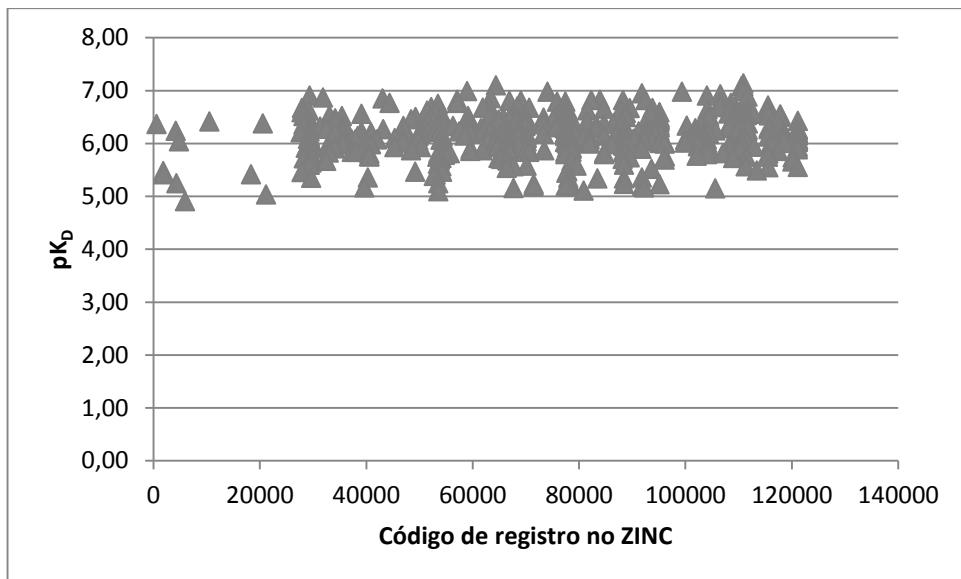
A orientação diversa da porção piridínica do ligante 58693 em relação aos demais ligantes também pode ser explicada por motivo semelhante. Embora a porção fenólica ocupe uma posição semelhante às demais moléculas para maximizar a interação hidrofóbica do grupo aromático com a PHE41, a porção piridínica sofre uma torção no sítio se modo a realizar duas ligações de hidrogênio com a SER94 e uma interação hidrofóbica do grupo metila do anel piridínico com a ILE21.

Ainda assim, o melhor resultado foi obtido pela substância 59083, cuja orientação não só possui um melhor conjunto de interações hidrofóbicas, como também é estabilizada pela formação de ligações de hidrogênio com os aminoácidos SER20, VAL65 e GLY96.

### **5.5 Docking rígido-flexível com o programa Molegro Virtual Docker e função score XSCORE**

Uma terceira análise dos resultados obtidos com o programa Molegro *Virtual Docker* foi aplicar para as estruturas obtidas de melhor ranking para o MVD a função score XSCORE, de modo a fornecer uma comparação mais direta entre os resultados obtidos com a abordagem de ligante rígido e ligante flexível. A dispersão dos valores de  $pK_D$  obtidos pode ser vista na Figura 36.

**Figura 36 - Dispersão dos valores de  $pK_D$  em função do código ZINC**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

Os resultados encontrados em termos de valores de  $pK_D$  variaram entre 66 e 96% ao do NADH, com valores de  $pK_D$  superiores aos da abordagem rígida para 529 das 545 substâncias, mostrando assim que a biblioteca tratada de forma rígida não foi capaz de expressar a conformação de melhor interação para a grande maioria das substâncias.

Ainda assim, os valores foram inferiores ao valor de  $pK_D$  do NADH nas mesmas condições de cálculo (7,44), embora a diferença percentual tenha sido reduzida (92 para 96%).

Para uma análise mais detalhada foram selecionadas as 20 moléculas que resultaram nos maiores valores de  $pK_D$ , cujos valores e código de identificação no banco de dados ZINC são mostrados na Tabela 5.

**Tabela 5 - Valores de pKD para os melhores inibidores da enzima 2AQ8 para tratamento com a função XSCORE.**

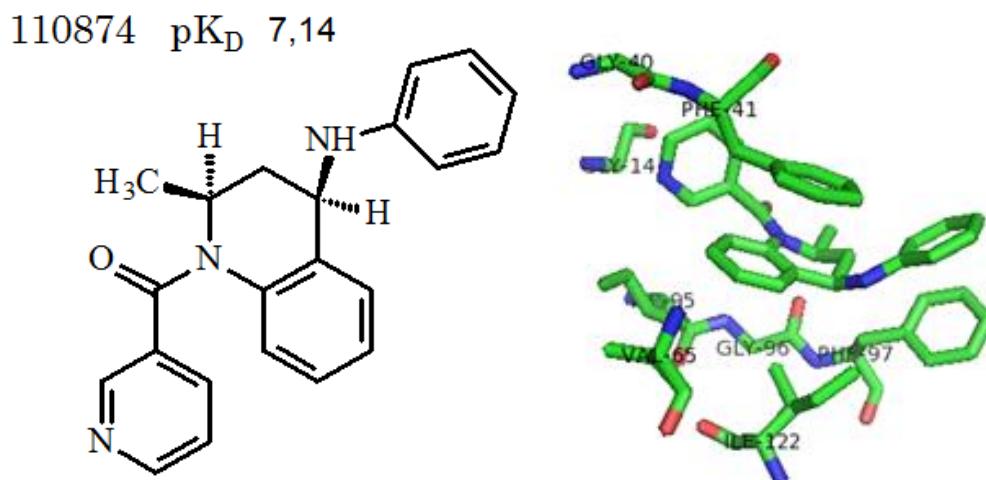
Código ZINC	pKD	Código ZINC	pKD
110874	7,14	106512	6,93
64323	7,10	29330	6,91
110486	7,08	103983	6,91
110877	7,08	111670	6,89
110881	7,01	31848	6,87
58902	6,99	63384	6,86
110884	6,99	43036	6,85
74038	6,98	57037	6,83
99341	6,98	83910	6,83
91805	6,95	82310	6,82

**Fonte:** Elaborada pelo autor

### 5.5.1 Ligante 110874

O melhor resultado observado foi para o ligante de código ZINC 110874, que apresentou um valor de pKD de 7,14. A estrutura do ligante e os aminoácidos que interagem com ele são mostrados na Figura 37.

**Figura 37 - Estrutura, valor de pKD e interação com enzima 2AQ8 para o ligante 110874 utilizando o programa MVD e a função score XSCORE.**



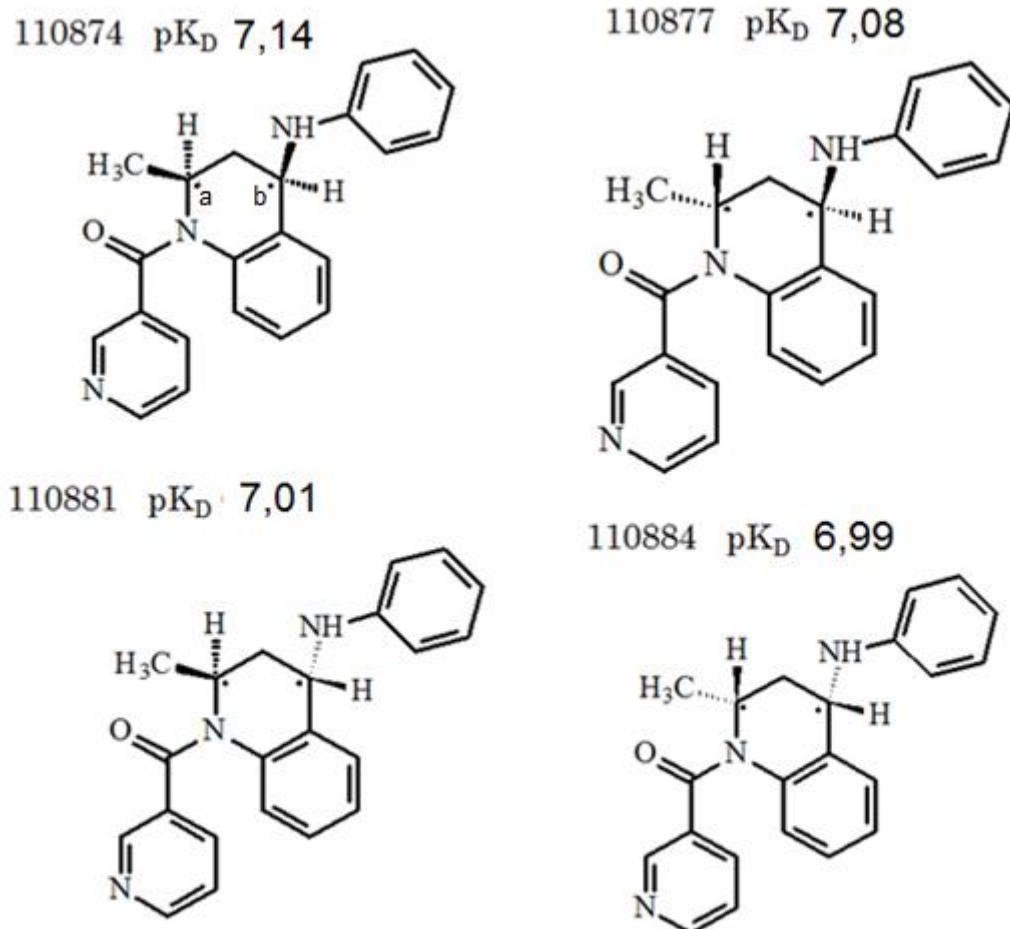
**Fonte:** Elaborada pelo autor

Observa-se que ocorre uma sobreposição dos anéis aromáticos de PHE41 e PHE97 com os do ligante 110874 e as cadeias laterais dos demais aminoácidos mostrados complementando as interações hidrofóbicas. Existe ainda uma ligação de hidrogênio com o aminoácido GLY14.

### **5.5.2 Ligantes 110874, 110877, 110881 e 110884**

Os ligantes 110877, 110881 e 110884, conforme já discutido anteriormente, são isômeros óticos do composto 110874, diferindo na configuração dos centros assimétricos existentes. As estruturas podem ser encontradas na Figura 38.

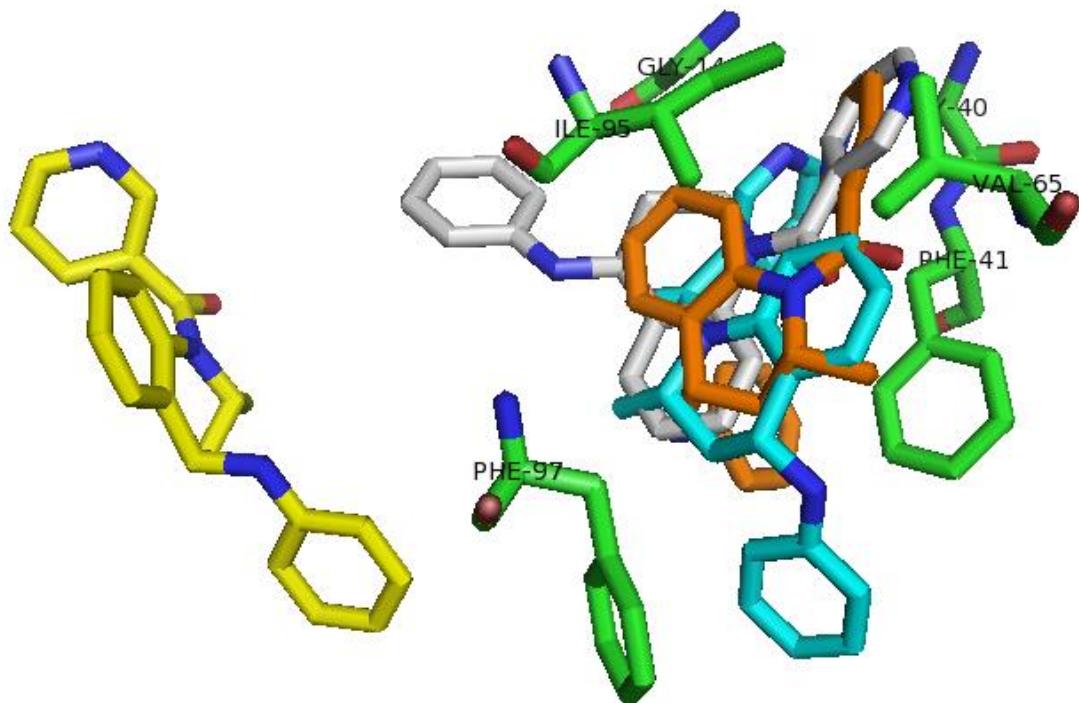
Figura 38 - Estruturas e valores de  $pK_D$  para os ligantes 110874, 110877, 110881 e 110884 para *dockings* com a enzima 2AQ8, utilizando o programa MVD e a função *score* XSCORE.



**Fonte:** Elaborada pelo autor

A partir da Figura 39, mostrada abaixo, pode-se observar que todos os ligantes, à exceção do ligante 110877, ocuparam as mesmas posições no sítio ativo da estrutura 2AQ8.

Figura 39 - Resultados de *docking* dos ligantes 110874 (azul claro), 110877 (amarelo), 110881 (cinza) e 110884 (laranja) com a estrutura 2AQ8 usando o programa MVD e função *score* XSCORE.



**Fonte:** Elaborada pelo autor

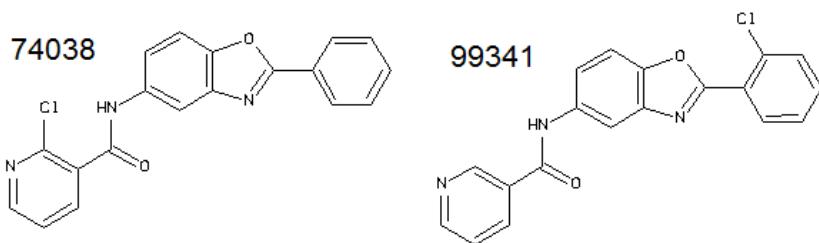
A partir da flexibilização dos ligantes, permitida com o MVD, verifica-se que os melhores resultados de interação ligante-proteína se dão com as substâncias que possuem o carbono quiral **a** com configuração R (110874 e 110877) possuem valores de  $pK_D$  mais altos que os com configuração S (110881 e 110884.) Ainda assim, por o ligante 110877 estar em sítio alternativo, não se pode explicar a maior estabilidade apenas devido a este fato.

O que se observa para o carbono quiral **b** é o mesmo comportamento anterior, onde os compostos com configuração S (110874 e 110881) possuem maiores valores de  $pK_D$  que os de configuração R (110877 e 110884), devendo porém fazer as mesmas restrições, de manter o centro quiral **a** constante e de o ligante 110877 estar em uma posição diversa.

### 5.5.3 Ligantes 74038 e 99341

Os ligantes 74038 e 99341 diferem pela posição do átomo de cloro presente na estrutura, conforme mostrado na Figura 40. Ambos os ligantes possuíram o mesmo valor de  $pK_D$ , 6,98.

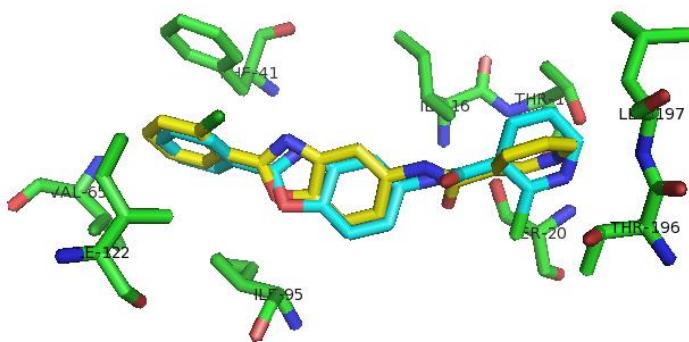
Figura 40 - Estruturas dos ligantes 74038 e 99341.



**Fonte:** Elaborada pelo autor

A observação das estruturas provenientes dos *dockings*, Figura 41, permite concluir que a igualdade de valores de  $pK_D$  se dá pela proximidade encontrada nas duas estruturas, onde as maiores variações de posição podem ser observadas no anel piridínico e na carbonila.

Figura 41 - Resultados de *docking* dos ligantes 74038 (azul claro) e 99341 (amarelo) com a estrutura 2AQ8 usando o programa MVD e função *score XSCORE*.



**Fonte:** Elaborada pelo autor

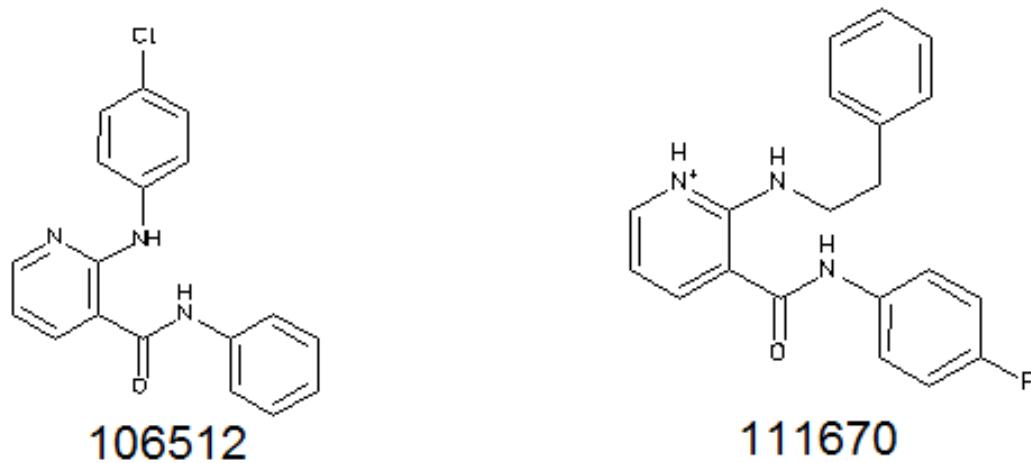
As duas estruturas compartilham interações com praticamente o mesmo conjunto de aminoácidos (ILE16, THR17, SER20, PHE41, VAL65, ILE95, ILE122,

THR196 e THR197) e embora o ligante 99341 interaja ainda com mais dois aminoácidos e faça duas ligações de hidrogênio a mais (com o nitrogênio piridínico envolvido, o que justifica a orientação do anel), as interações hidrofóbicas menos efetivas compensam a estabilização extra, tornando o valor de  $pK_D$  igual.

#### 5.5.4 Ligantes 106512 e 111670

Os ligantes 106512 e 111670 diferenciam-se pelo tipo e posição de grupo substituinte e por um possuir carga e o outro não, conforme pode ser verificado na Figura 42.

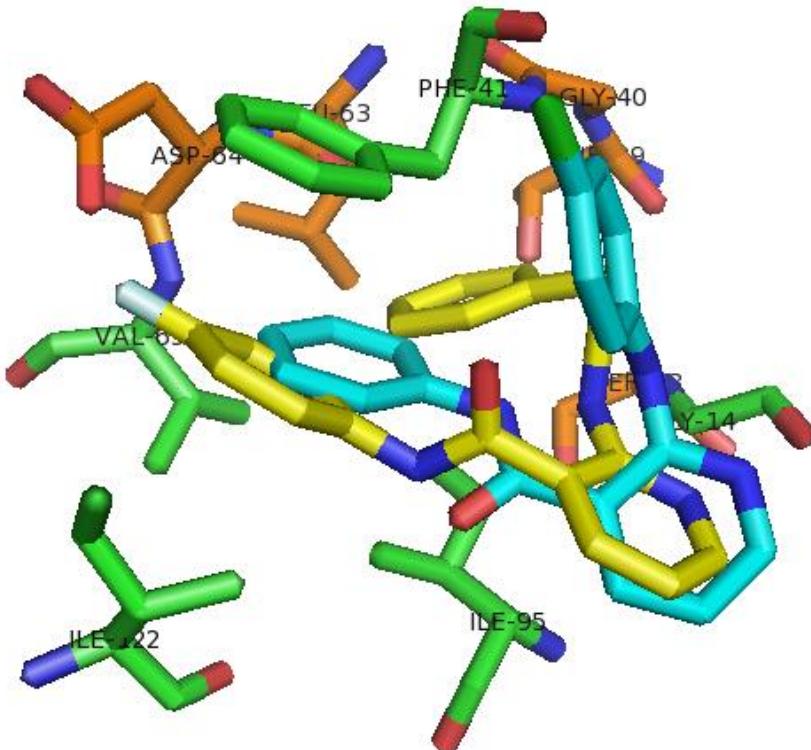
**Figura 42 - Estruturas dos ligantes 106512 e 111670.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

Os dois ligantes apresentaram posicionamento bastante diverso durante os ensaios de *docking*, conforme pode ser verificado na Figura 43.

**Figura 43 - Resultados de docking dos ligantes 106512 (azul claro) e 111670 (amarelo) com a estrutura 2AQ8 usando o programa MVD e função score XSCORE.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

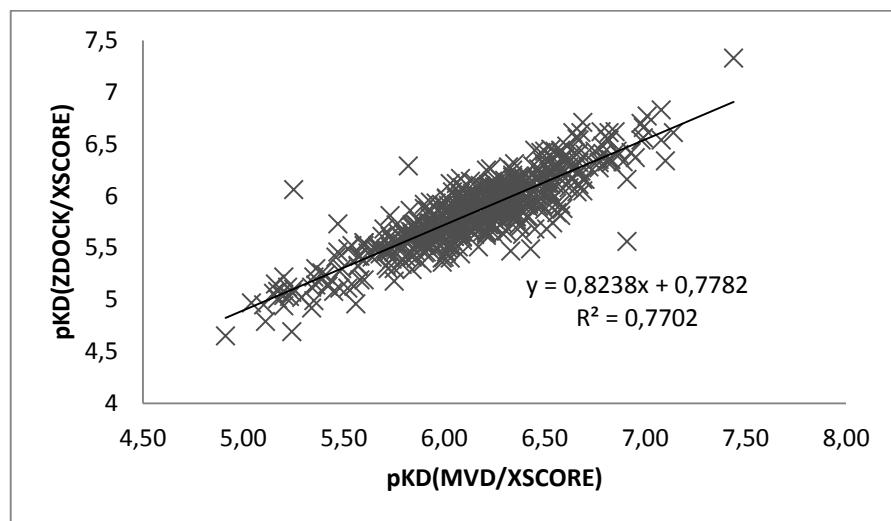
Os aminoácidos apresentados em verde na Figura (GLY14, PHE41, VAL65, ILE95 e ILE122) interagem com ambos os ligantes, enquanto os marcados em laranja (SER13, THR39, GLY40, LEU63 e ASP64) interagem apenas com o ligante 111670. Mesmo com uma maior número de interações, este possuiu um menor valor de  $pK_D$ , o que pode ser em parte justificado por interações menos efetivas no sítio de ligação diverso e em parte pela carga positiva, que pode ter enfraquecido as interações intermoleculares.

## 5.6 Comparação de Resultados Entre as Metodologias

As diferentes abordagens da avaliação da interação foram comparadas de modo a verificar a influência da função score e do tratamento da flexibilidade do ligante em relação aos resultados obtidos.

A primeira e mais importante comparação é a se os resultados obtidos com a abordagem rígida (programa ZDOCK) e flexível (programa MVD) da conformação do ligante foram concordantes. Para excluir erros causados pela diferente parametrização da função score, os resultados para as duas abordagens foram comparados com em termos de valores para a função XSCORE. Tal correlação é encontrada na Figura 44.

**Figura 44 - Correlação entre os resultado obtidos com a função XSCORE, utilizando as abordagens de ligante rígido (ZDOCK) e flexível (MVD).**



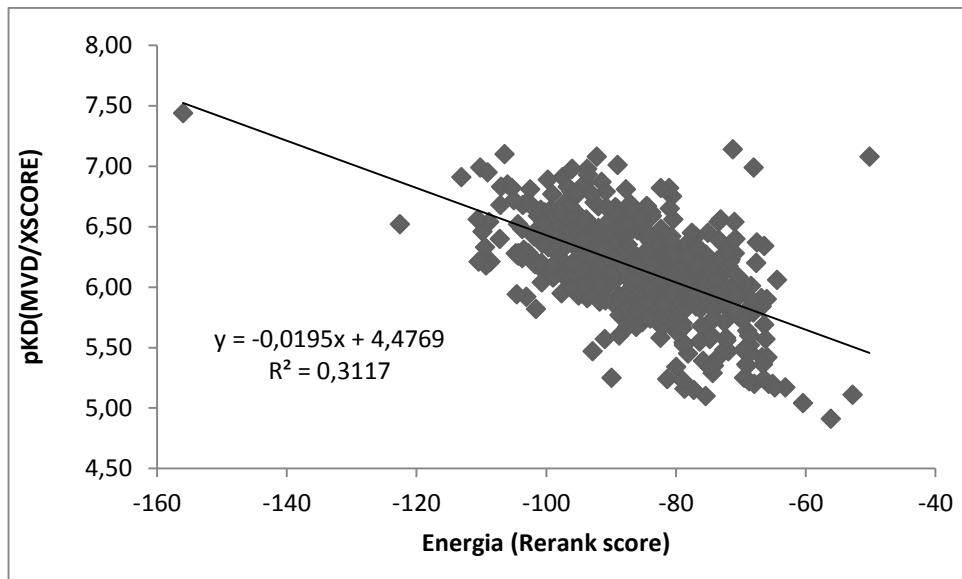
**Fonte:** Elaborada pelo autor

A partir da Figura 44 pode-se concluir que houve uma correlação mediana dos valores de  $pK_D$ , com um valor de  $r^2$  de 0,77. Este valor pode ser justificado devido a correlação existir, porém a grande diversidade estrutural da biblioteca faz com que a ligação dos ligantes não se dê de uma forma uniforme ao sítio ativo, causando uma razoável dispersão.

A inclinação da reta da regressão linear inferior a unidade indica que os valores obtidos para a abordagem rígida é, em geral, inferior aos obtidos para a abordagem flexível. Isto pode ser explicado pelo fato de durante abordagem rígida não se haver utilizado a conformação de melhor interação com a enzima. A possibilidade de novas conformações serem testadas da abordagem flexível tornou possível seu teste.

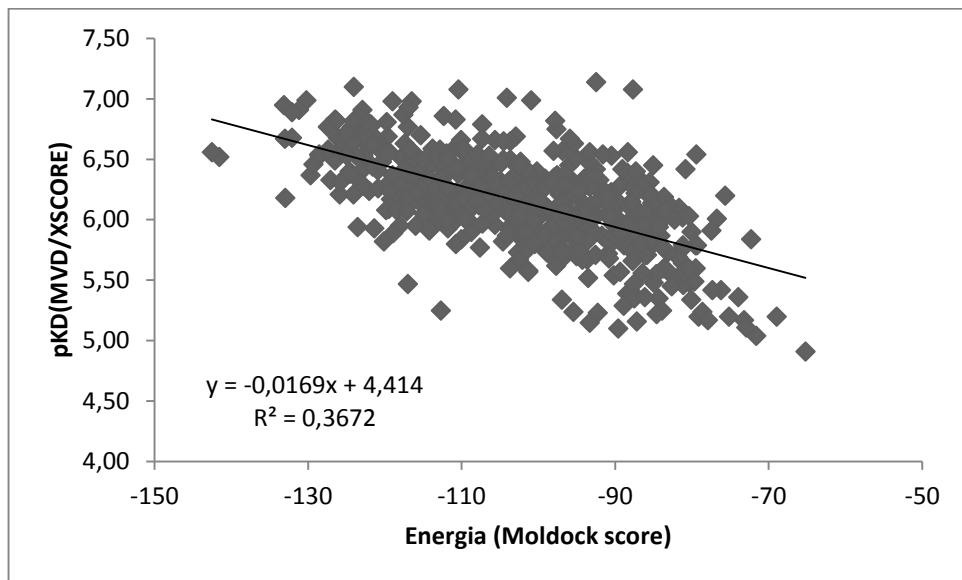
A correlação existente entre as funções score XSCORE e as energias encontradas pelas funções originalmente encontradas no programa MVD (*moldock score* e *rerank score*) pode ser encontrada nas Figuras 45 e 46.

**Figura 45 - Correlação entre os resultados obtidos com o uso do programa MVD com as funções XSCORE e as energias obtidas pelo *rerank score*.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

**Figura 46 - Correlação entre os resultados obtidos com o uso do programa MVD com as funções XSCORE e as energias obtidas pelo *moldock score* .**



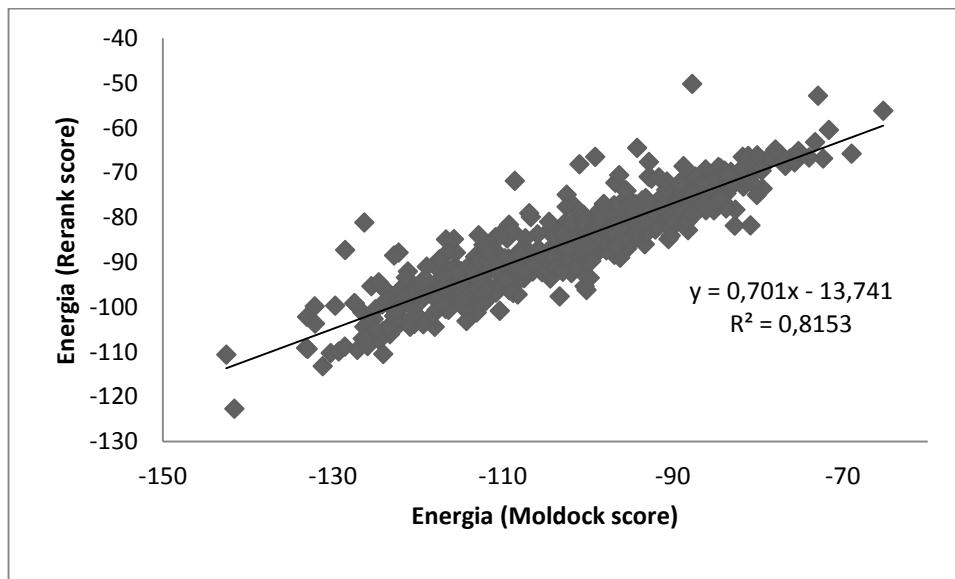
**Fonte:** Elaborada pelo autor

São observadas para ambas as comparações que os valores encontram-se extremamente espalhados, o que é evidenciado pelos baixos valores de  $r^2$ , 0,311 e 0,367. Esta alta dispersão é consequência direta da alta variação estrutural dentro da biblioteca, onde moléculas existentes possuem maior afinidade por interações de característica polar enquanto outras possuem uma maior característica de interações

apolares. Desta maneira, como as funções XSCORE e as encontradas no programa MVD tratam estas interações de forma e com pesos bastante diferentes, a baixa correlação é justificada.

A correlação entre os resultados de energia obtidas com as funções encontradas no MVD (*moldock score* e *rerank score*) pode ser observada na Figura 47.

**Figura 47 - Correlação entre as energias obtidas com as funções *moldock score* e *rerank score* .**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

Observa-se que houve boa correlação dos valores ( $r^2$  igual a 0,815), melhor que a encontrada na comparação entre as diferentes abordagens (rígida e flexível), e as diferenças mostradas deve-se aos diferentes pesos utilizados para cada tipo de interação durante a análise da biblioteca. Como as duas funções são muito mais próximas entre si que com a função XSCORE, a dispersão dos valores foi muito menor.

### **5.6.1 Estruturas de destaque para potenciais testes de inibição**

Para os testes de inibição da enzima InhA propõe-se utilizar como ligantes as estruturas de destaque para as metodologias abordadas. Algumas delas como as 110874 e seus isômeros espaciais podem ser um empecilho por a atividade biológica

poder ser alterada profundamente com a modificação da configuração dos carbonos nos isômeros.

Além disso, propõe-se a coordenação dos ligantes 27840, 43036, 44369, 61891, 63210, 73286, 87863, 66894 e 112728 ao centro metálico pentacianoferrato (II). Tal fato se deve a melhoria da interação observada tanto experimentalmente quanto nos ensaios de docking para a isoniazida e o complexo IQG-607, onde houve uma melhoria considerável da interação enzima-ligante após a coordenação do mesmo.

Ainda nesta linha de pensamento, os ligantes 106506, 106512, 106516, 108543 e 111670, por possuírem o nitrogênio piridínico estericamente impedido podem ser utilizados como base para derivação, sem o grupo substituinte na posição 2 do anel piridínico, e posterior coordenação ao centro metálico citado anteriormente para avaliação das capacidades de inibição.

## 6 BIBLIOTECA DE DERIVADOS PENTACIANOFERRATOS VERSUS INHA (2AQ8)

### 6.1 *Docking* rígido-rígido com o programa ZDOCK e função score XSCORE

Além da biblioteca de derivados da nicotinamida foi preparada uma biblioteca de complexos pentacianoferratos para busca de inibidores tão bons ou melhores quanto o complexo pentacianoisoniazidaferro. A primeira abordagem utilizada para pesquisa de tais complexos foi o *docking* rígido-rígido com o programa ZDOCK.

Os resultados de *docking* obtidos foram confrontados com os valores do ligante NADH, cofator natural da enzima de modo a estimar a afinidade dos ligantes em relação a este.

A biblioteca consistiu de 57 complexos, e para esta abordagem foram preparados conformeros com base na estrutura dos ligantes. O total de estruturas da biblioteca foi de 3093. Estas estruturas foram montadas em um programas de estrutura, havendo a minimização da energia do ligante orgânico por PM3 e a partir de então a montagem com o grupo pentacianoferrato.

Os *dockings* utilizando como alvo a enzima 2AQ8, analisados com a função XSCORE, produziram valores de  $pK_D$  variando entre 60 e 91% em relação ao valor observado para o NADH, cofator natural da enzima, durante a validação. Os valores podem ser encontrados na Tabela 6, que traz os códigos dos compostos e a correlação código-estrutura pode ser vista no apêndice 2.

**Tabela 6 - Valores de  $pK_D$  para os ensaios de *docking* com a enzima 2AQ8 com o programa ZDOCK e função XSCORE.**

Código	$pK_D$	Código	$pK_D$	Código	$pK_D$
1	6,3	20	6,15	39	5,32
2	5,42	21	5,09	40	5,39
3	6,55	22	4,65	41	5,77
4	5,66	23	4,46	42	5,35
5	6,54	24	4,40	43	5,42
6	6,44	25	4,44	44	5,35
7	6,46	26	4,44	45	5,36
8	5,49	27	4,72	46	5,41
9	6,46	28	5,15	47	5,31
10	5,86	29	5,21	48	6,44
11	5,42	30	4,96	49	6,57
12	5,03	31	5,20	50	6,37
13	5,60	32	5,23	51	5,43
14	5,85	33	5,05	52	5,48
15	5,90	34	5,26	53	6,54
16	5,10	35	5,25	54	6,38
17	6,15	36	4,97	55	6,45
18	5,94	37	4,95	56	6,69
19	6,08	38	5,32	58	5,53

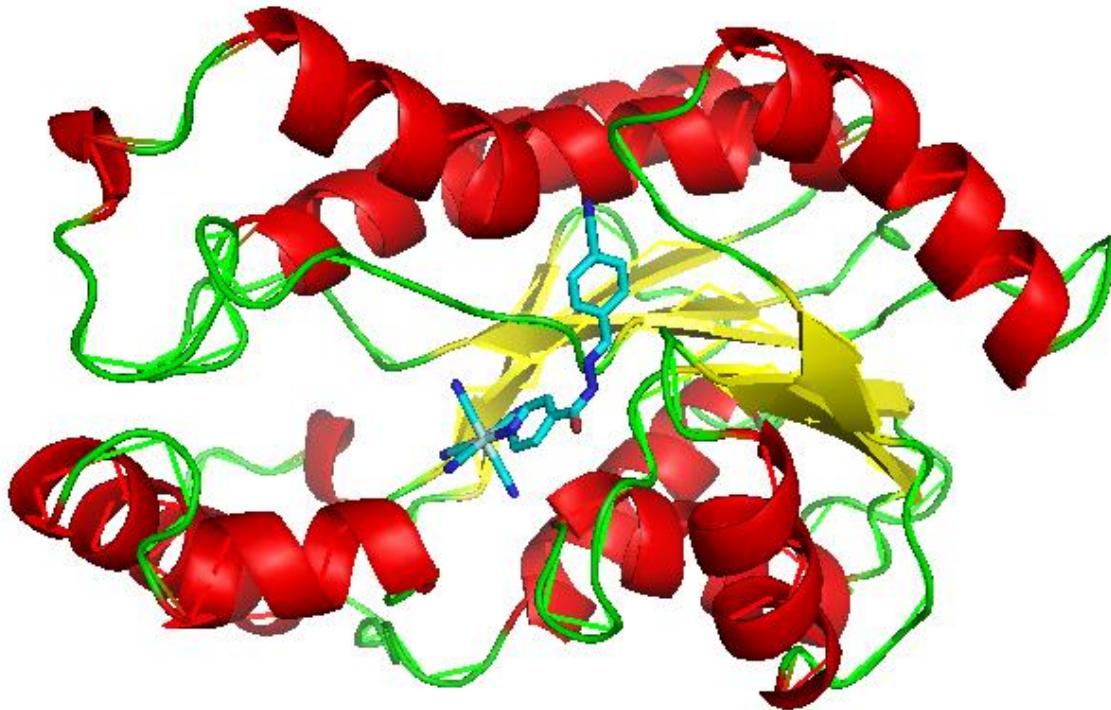
**Fonte:** Elaborada pelo autor

Ao agrupar-se complexos de ligantes semelhantes estruturalmente observa-se que os valores de  $pK_D$  são próximos e a análise visual das estruturas de *docking* mostra, em geral, os ligantes em posição semelhante dentro do sítio da enzima. Ao compararem-se diferentes grupos de ligantes, observa-se que a posição no sítio da enzima é dependente do volume dos átomos do ligante e dos tipos de interação possíveis.

### 6.1.1 Complexo com o ligante auxiliar IA4CN (056)

Dentre todos os complexos estudados o de melhor resultado foi o complexo com o ligante auxiliar IA4CN, com a estrutura obtida do *docking* e os aminoácidos do sítio que interagem com o complexo sendo representados na Figura 48.

**Figura 48 - Estrutura de *docking* obtida no ensaio utilizando o ligante IA4CN e a enzima 2AQ8, com o programa ZDOCK e a afunção XSCORE.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

Seu valor de  $pK_D$  (6,69) é inferior ao observado durante a validação para o NADH (7,33), porém vale ressaltar que a conformação do sítio ativo na estrutura determinada por cristalografia 2AQ8 não corresponde necessariamente à

conformação em solução, devido ao fato do cofator NADH modificar a conformação da enzima, indicando que seria possível o teste deste como inibidor.

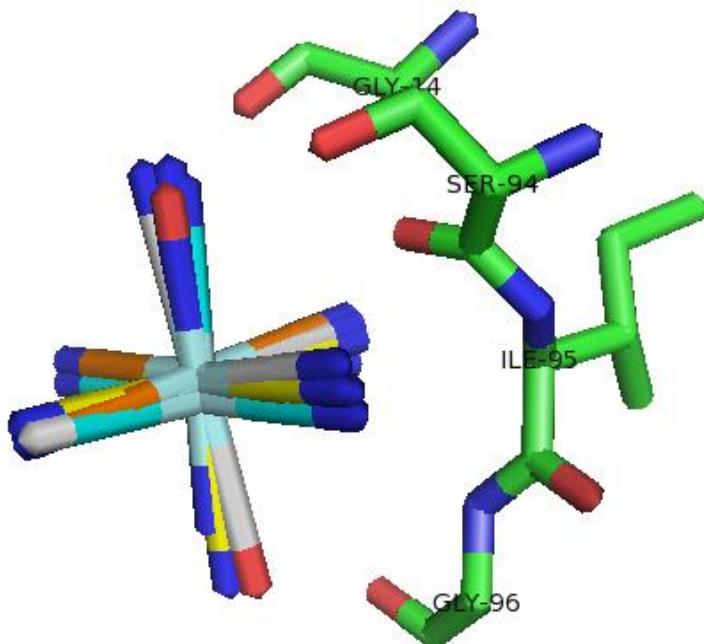
Para uma discussão mais aprofundada foram selecionados os complexos que possuíam uma identidade estrutural semelhante em termos de grupos e ligações, de modo a poder, com a comparação dentro do conjunto, mostrar e tentar explicar as diferenças de resultados em termos estruturais dos ligantes do complexo.

### **6.1.2Ligantes Simples**

O primeiro conjunto a ser estudado é o grupo formado pelos ligantes mais simples,  $\text{NH}_3$  (código do composto na tabela: 024),  $\text{CN}^-$  (025),  $\text{CO}$  (026) e  $\text{NO}^+$  (023). Uma vez que estes ligantes são muito pequenos em relação ao grupo pentacianoferrato, espera-se que os modos de interação do complexo com a enzima sejam fortemente determinados pelo grupo pentacianoferrato.

A Figura 49 mostra as estruturas de *docking* obtidas sobrepostas, bem como os aminoácidos mais comuns dentre os que interagiram com as substâncias.

Figura 49 - Resultados de *docking* dos complexos 024 (azul claro), 025 (amarelo), 026 (cinza) e 023 (laranja) com a estrutura 2AQ8 usando o programa ZDOCK.



**Fonte:** Elaborada pelo autor

Pela Figura 49 observa-se certa uniformidade da posição dos complexos no sítio ativo da enzima, com as interações existentes entre os complexos e a proteína sendo comum a todos os complexos a presença de ligações de hidrogênio com os aminoácidos GLY14, SER94.

Os valores de  $pK_D$  encontrados refletem a semelhança estrutural e de posicionamento no sítio ativo, apresentando valores extremamente próximos, mostrados na Tabela 7.

**Tabela 7 - Resultados para o grupo selecionado para os ensaios de docking com o programa ZDOCK e a função score XSCORE.**

Código	Ligante auxiliar	pK <sub>D</sub>
026	CO	4,44
023	NO <sup>+</sup>	4,46
025	CN <sup>-</sup>	4,44
024	NH <sub>3</sub>	4,40

**Fonte:** Elaborada pelo autor

### **6.1.3 Ligantes Piridínicos Substituídos na Posição 3**

Os complexos pertencentes a este conjunto possuem além do grupo cianoferrato um anel piridínico que passa a direcionar o modo como o complexo metálico irá interagir com a enzima. Os complexos e seus valores de pK<sub>D</sub> podem ser encontrados na Tabela 8.

**Tabela 8 - Resultados para o grupo selecionado para os ensaios de docking com o programa ZDOCK e a função score XSCORE.**

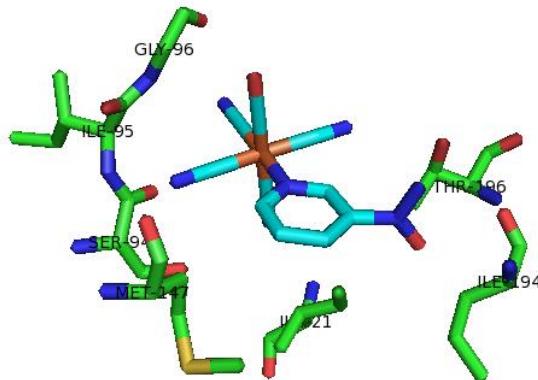
Código	Ligante auxiliar	pK <sub>D</sub>
051	Hidrazida do ácido tionicotínico	5,48
046	Ácido nicotínico	5,41
045	Nicotinamida	5,36
044	Tionicotinamida	5,35
032	3-nitropiridina	5,23
029	3-cianopiridina	5,21
031	3-metilpiridina	5,20
030	3-aminopiridina	4,96

**Fonte:** Elaborada pelo autor

A partir da tabela pode-se ver que apenas o complexo apresentando o ligante 3-aminopiridina possuiu um valor de  $pK_D$  inferior ao da piridina não substituída (021,  $pK_D$  igual a 5,09). Também pode-se notar que grupos substituintes mais volumosos têm em geral maiores valores de  $pK_D$ .

Os complexos deste conjunto apresentaram-se basicamente em três tipos de posicionamento dentro da enzima, conforme mostrado nas Figuras 50 e 51.

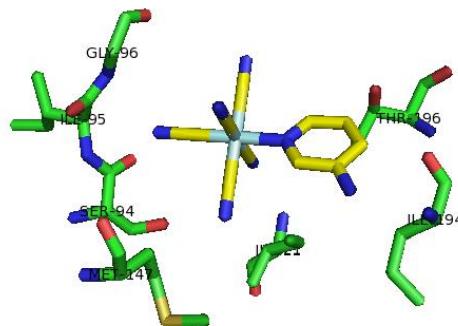
**Figura 50 - Resultados de *docking* do complexo 032 (azul claro) com a estrutura 2AQ8 usando o programa ZDOCK.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

Os complexos 029, 032, 045 e 051 possuem posicionamento praticamente igual ao da Figura 50, onde a formação de ligações de hidrogênio com a GLY192 ou ILE194 ou THR196 estabiliza o complexo nesta posição do sítio. O complexo 051 foi o que apresentou o maior valor de  $pK_D$  dentre os deste grupo, igual 5,48.

**Figura 51 - Resultados de *docking* do complexo 030 (amarelo) com a estrutura 2AQ8 usando o programa ZDOCK.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

A Figura 51 retrata o posicionamento dos complexos 030 (ligante 3-animo-piridina) e 031 (ligante 3-metilpiridina).onde estes praticamente se sobrepõem. A diferença básica em termos de interações entre os dois complexos e a enzima é uma ligação de hidrogênio que é feita com o complexo 030 e não é encontrada com o complexo 031. Uma vez que o sítio ativo possui caráter apolar, interações hidrofóbicas mais fortes levam ao maior valor de  $pK_D$  do complexo 031;

Existem ainda dois posicionamentos possíveis, um para os complexos 021 e 046 e outro para o complexo 044.

#### **6.1.4 Ligantes Piridínicos Substituídos na Posição 4**

Os complexos pertencentes a este conjunto assemelham-se ao grupo anterior, diferenciando-se na posição de substituição do anel piridínico. São mostradas as composições dos complexos e os valores de  $pK_D$  na tabela 9.

**Tabela 9 - Resultados para o grupo selecionado para os ensaios de *docking* com o programa ZDOCK e a função *score* XSCORE.**

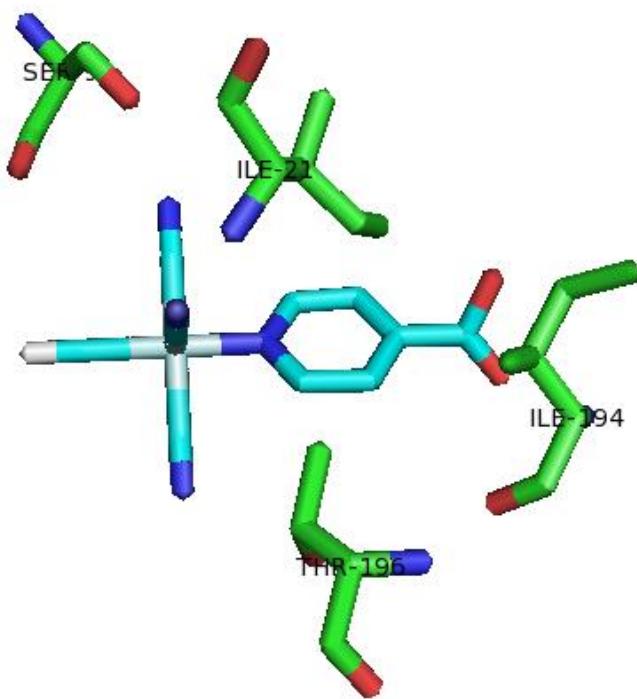
Código	Ligante auxiliar	pK <sub>D</sub>
052	Hidrazida do ácido isonicotínico	5,43
041	Isotionicotinamida	5,35
042	Nicotinamida	5,39
035	4-nitropiridina	5,25
043	Ácido isonicotínico	5,42
033	4-aminopiridina	5,05
028	4-cianopiridina	5,15
034	4-metilpiridina	5,26

**Fonte:** Elaborada pelo autor

Assim como no conjunto anterior, apenas o complexo com a 4-aminopiridina apresentou pK<sub>D</sub> inferior à piridina não substituída. Os valores de pK<sub>D</sub> no geral foram superiores aos do conjunto anterior, ao se comparar os mesmos substituintes.

Para os complexos 043, 033, 035, As Figuras 52 e 53 mostram as estruturas de *docking* sobrepostas.

**Figura 52 - Resultados de *docking* do complexo 043 (azul claro) com a estrutura 2AQ8 usando o programa ZDOCK.**



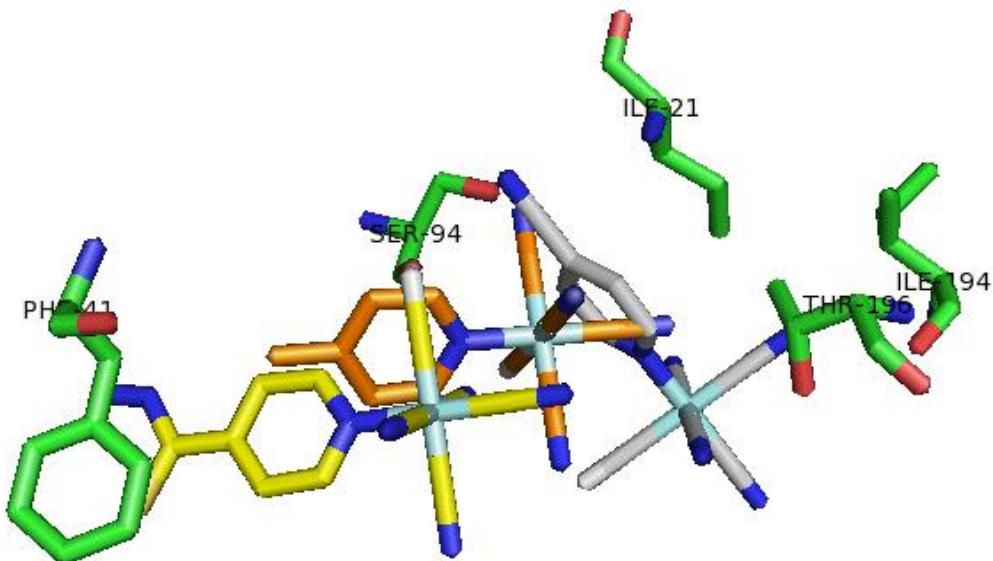
**Fonte:** Elaborada pelo autor

A estrutura mostrada na Figura 52 representa a orientação básica para os complexos 021, 033, 035, 041, 042 e 043, que possuem posicionamento praticamente igual no sítio ativo.

Os complexos 035, 041, 042 e 043 possuem estruturas bastante semelhantes, com um grupo polar de geometria trigonal planar, o que torna suas interações bem próximas, justificando a disposição espacial. A formação de ligações de hidrogênio destas moléculas com os aminoácidos ILE194 ou THR196 torna estas estruturas estáveis, levando a melhores valores de  $pK_D$ .

O complexo contendo a 4-aminopiridina, embora tenha mesma orientação do anel piridínico que o complexo mostrado na Figura 52, possui um maior distanciamento para os aminoácidos ILE194 e THR196. Por conta deste fato, não são formadas ligações de hidrogênio e ocorre uma grande diminuição da força de interação e do  $pK_D$  em relação aos demais.

Figura 53 - Resultados de *docking* dos complexos 028 (cinza), 034 (laranja) e 051 (amarelo) com a estrutura 2AQ8 usando o programa ZDOCK.



**Fonte:** Elaborada pelo autor

Os três complexos mostrados na Figura 53 são os que possuem orientação diversa. Destes o complexo 051 possui melhor resultado geral dentro do conjunto ( $pK_D$  igual a 5,43), que pode ser justificada tanto em termos de uma interação hidrofóbica mais efetiva do anel piridínico com a PHE41, como na formação de uma ligação de hidrogênio envolvendo o nitrogênio da azida e a LEU63.

#### 6.1.5 Ligantes Pirazínicos

Os compostos pirazínicos assemelham-se aos piridínicos e assim como eles, a posição ocupada por estes dentro do sítio ativo foi dependente do substituinte encontrado no anel pirazínico. Os compostos estudados encontram-se na Tabela 10.

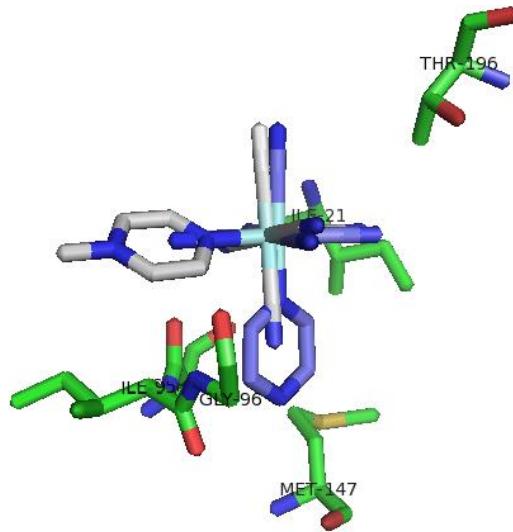
**Tabela 10 - Resultados para o grupo selecionado para os ensaios de *docking* com o programa ZDOCK e a função *score* XSCORE.**

Código	Ligante auxiliar	pK <sub>D</sub>
016	Pirazinamida	5,10
038	3,5-dimetilpirazina	5,32
036	N-metilpirazínio	4,97
027	Pirazina	4,72
037	3-metilpirazina	4,95

**Fonte:** Elaborada pelo autor

As estruturas de *docking* para os complexos derivados e pirazina foram completamente diferentes. Como exemplos mostram-se as estruturas dos complexos 027 (ligante pirazina) e 036 (ligante N-metilpirazínio) conforme visto na Figura 54.

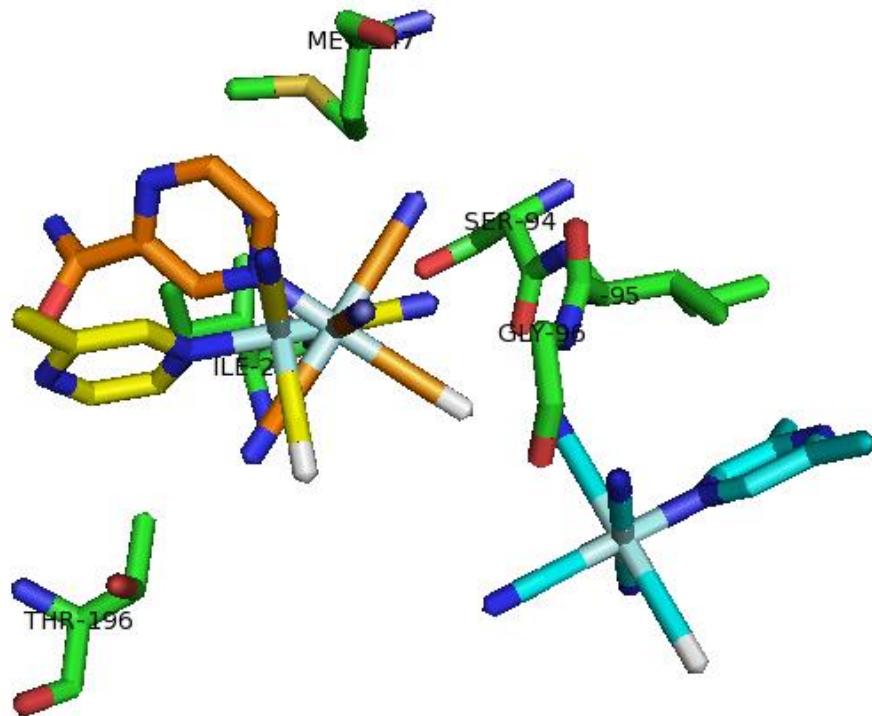
**Figura 54 - Resultados de *docking* dos complexos 027 (roxo) e 036 (cinza) com a estrutura 2AQ8 usando o programa ZDOCK.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

As demais estruturas de *docking* podem ser observadas na Figura 55, onde as diferenças se dão pela presença de alguma ligação de hidrogênio que oriente a geometria ou pela melhor capacidade de interações hidrofóbicas.

Figura 55 - Resultados de *docking* dos complexos 016 (laranja), 037 (amarelo) e 038 (azul claro) com a estrutura 2AQ8 usando o programa ZDOCK.



**Fonte:** Elaborada pelo autor

#### 6.1.6 Ligantes Quinolínicos

Os quatro complexos que compõem este conjunto podem ser pareados, uma vez que são dois substituintes em duas posições específicas do anel heterocíclico da quinolina, conforme mostrado na Tabela 11.

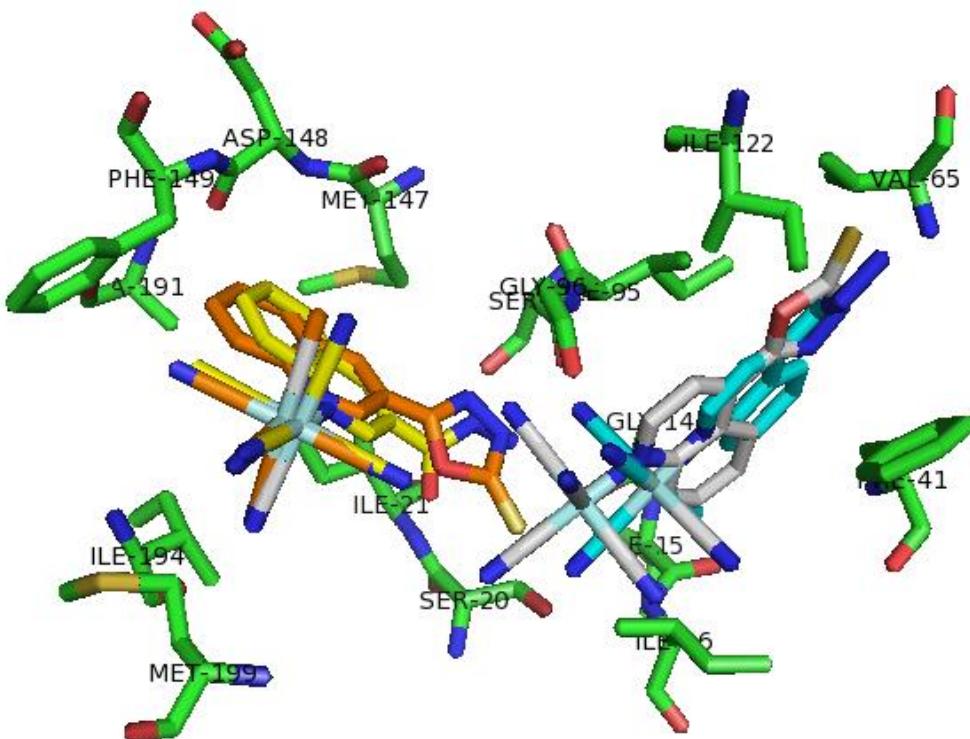
**Tabela 11 - Resultados para o grupo selecionado para os ensaios de *docking* com o programa ZDOCK e a função *score* XSCORE.**

Código	Ligante auxiliar	pK <sub>D</sub>
19	4CQO3SH	6,08
20	3CQO3SH	6,15
18	HA3CQ	5,94
17	HA4CQ	6,15

**Fonte:** Elaborada pelo autor

As estruturas de *docking* mostraram claramente uma separação dos compostos pareados: os compostos com ligantes substituídos na posição 3 possuíram maior afinidade por uma porção do sítio ativo da enzima enquanto os substituídos na posição 4 ligaram-se a outra posição, conforme mostrado na Figura 56.

**Figura 56 -** Resultados de *docking* dos complexos 017 (azul claro), 018 (amarelo), 019 (cinza) e 020 (laranja) com a estrutura 2AQ8 usando o programa ZDOCK.



**Fonte:** Elaborada pelo autor

Uma vez que o anel de quinolina é maior e mais hidrofóbico que o de piridina ou pirazina, este terá um papel maior na orientação do complexo na enzima que o grupo pentacianoferrato. Observou-se que o padrão de substituição também é importante.

Em um mesmo grupo os anéis de quinolina possuem orientação semelhante, embora para os complexos substituídos na posição 4, o melhor resultado foi com a hidrazida, enquanto para o substituído na posição 3 o de maior  $pK_D$  foi o substituído com o anel de oxadiazol.

### 6.1.7 Ligantes Oxadiazóis

Os complexos com ligantes oxadiazóis possuem uma estrutura em comum a partir da qual um substituinte em uma posição específica é trocado, formando assim cinco complexos. Estes se encontram juntamente com os valores de  $pK_D$  na Tabela 12.

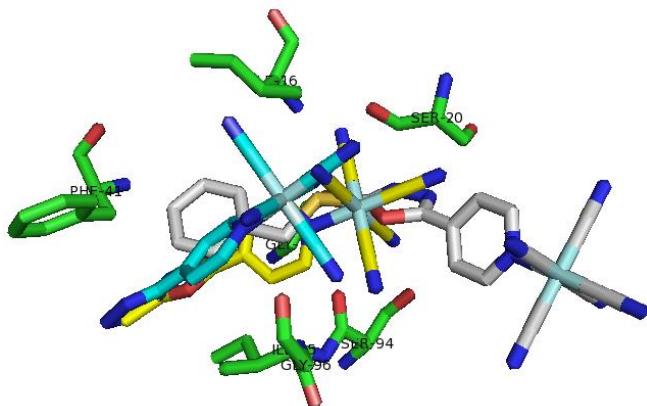
**Tabela 12 - Resultados para o grupo selecionado para os ensaios de *docking* com o programa ZDOCK e a função *score* XSCORE.**

Código	Ligante auxiliar	$pK_D$
001	IO3SBz	6,30
008	IO3SMet	5,49
011	IO3SH	5,42
004	IO3Met (IQG639)	5,66
002	IO3H	5,42

**Fonte:** Elaborada pelo autor

As estruturas obtidas a partir do *docking* destes complexos possuíram três possíveis orientações, uma para o complexo 001, uma para o complexo 002 e outra para os complexos 004, 008 e 011. Estas podem ser vistas na Figura 57.

**Figura 57 - Resultados de *docking* dos complexos 002 (azul claro), 004 (amarelo) e 001 (cinza) com a estrutura 2AQ8 usando o programa ZDOCK.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

O complexo 001 por possuir uma maior quantidade de grupos hidrofóbicos possui uma maior interação com a enzima, obtendo assim o maior valor de  $pK_D$ . O complexo 002 devido a sua forma de orientação possui uma menor quantidade de ligações de hidrogênio que os demais, possuindo assim um dos valores mínimos de  $pK_D$ .

Os demais complexos, por possuírem mesma orientação e posição dos anéis de oxadiazol, piridina e do grupo pentacianoferrato, possuem como diferenciador em suas estruturas a capacidade de interações hidrofóbicas do substituinte do oxadiazol, com o metil possuindo um maior valor de  $pK_D$  que o grupo  $-\text{SCH}_3$  e o grupo tiol.

#### **6.1.8 Ligantes do tipo Metileno-hidrazidas do Ácido Isonicotínico**

As estruturas dos ligantes auxiliares ao grupo penacianoferrato diferem no composto utilizado para a condensação na reação de síntese do ligante. As estruturas destes encontram-se na Tabela 13.

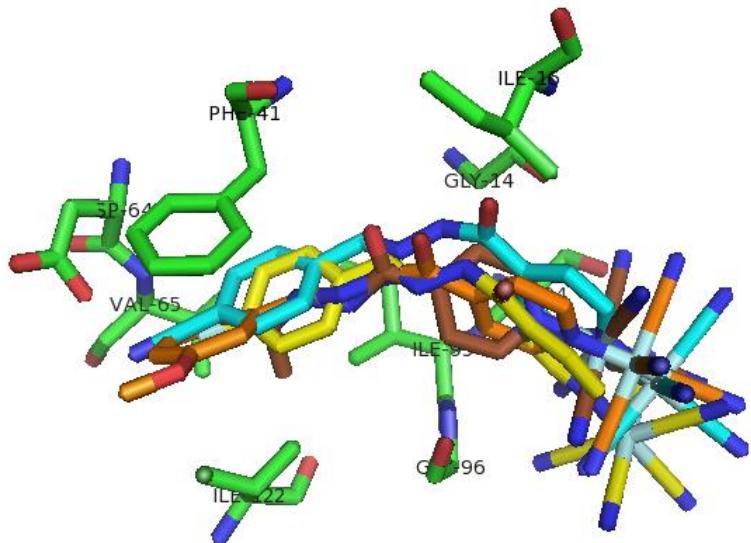
**Tabela 13 - Resultados para o grupo selecionado para os ensaios de *docking* com o programa ZDOCK e a função *score* XSCORE.**

Código	Ligante auxiliar	pK <sub>D</sub>
55	IA4(3'-OMet)	6,45
56	IA4CN	6,96
7	IA4F	6,46
10	IA4OMet	5,86
05	IA4H	6,54
14	IA4(CMe <sub>2</sub> )	5,85
13	IA4(CH <sub>2</sub> )	5,60

**Fonte:** Elaborada pelo autor

Nas estruturas que foram resultado dos estudos de *docking*, observa-se que o principal ponto de interações em comum dos complexos com a proteína é exatamente o grupo ligado ao metileno, embora sejam observadas em muitos casos ligações de hidrogênio com os cianetos principalmente dos aminoácidos SER94 e GLY96. Estas estruturas podem ser encontradas nas Figuras 58 e 59.

**Figura 58 - Resultados de *docking* dos complexos 056 (azul claro), 007 (amarelo), 055 (laranja) e 014 (marrom) com a estrutura 2AQ8 usando o programa ZDOCK.**

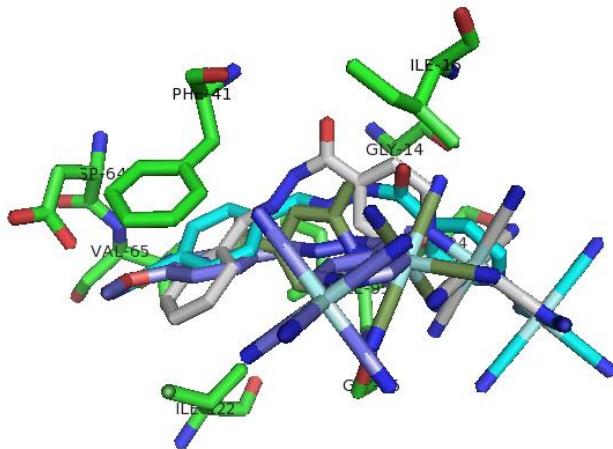


**Fonte:** Elaborada pelo autor

Pode-se observar na Figura 58 um subconjunto de substâncias onde os grupos pentacianoferrato, piridínico, carbolina e substituinte do metileno encontram-se bem próximos entre si. Estes complexos possuem valores destoantes de  $pK_D$ , embora possa-se observar que o aumento da cadeia carbônica do ligante influencie positivamente no valor do  $pK_D$ , conforme a comparação do complexo 014 com os demais.

Além disso, a posição do substituinte do grupo fenil influencia no valor de  $pK_D$ , onde vemos os substituídos com flúor (007) e nitrila (056) em para possuindo maior valor de  $pK_D$  que o anel benzênico substituída em meta com a metoxila (055).

**Figura 59 - Resultados de *docking* dos complexos 056 (azul claro), 005 (cinza), 013 (verde oliva) e 010 (roxo) com a estrutura 2AQ8 usando o programa ZDOCK.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

Na Figura 59 estão mostrados os demais complexos do conjunto, com o complexo 056 sendo mostrado novamente para padrão de comparação. A posição do grupo pentacianoferrato varia bastante de um complexo para os demais do conjunto, mostrando uma grande variação dos ângulos diedros dos conformeros para a maior afinidade encontrada.

Observa-se que o complexo 005 que se assemelhe estruturalmente aos mostrados na Figura anterior, porém com seu anel benzênico não é substituído. Isso levou a uma maior aproximação da fenila para manter as interações hidrofóbicas e, por conseguinte a posição do centro metálico deslocada.

O complexo 013 é um caso extremo onde a cadeia carbônica é a mais curta possível, com o grupo metileno não sendo substituído. Não por acaso ele possui o pior resultado dentro deste conjunto de complexos.

Utilizando a generalização de que um substituinte em para no anel benzênico aumenta o  $pK_D$ , o complexo 010 deveria possuir um  $pK_D$  maior que o complexo 055, que possui o mesmo substituinte em meta. Porém, a posição diversa do centro metálico levou a perda das ligações de hidrogênio que estabilizavam o mesmo, levando a um pior  $pK_D$ .

### 6.1.9 Ligantes do tipo Metileno-hidrazidas do Ácido Nicotínico

Este conjunto assemelha-se ao anterior, porém com uma piridina substituída na posição 3 e não 4. A Tabela 14 mostra os valores de  $pK_D$  para os complexos.

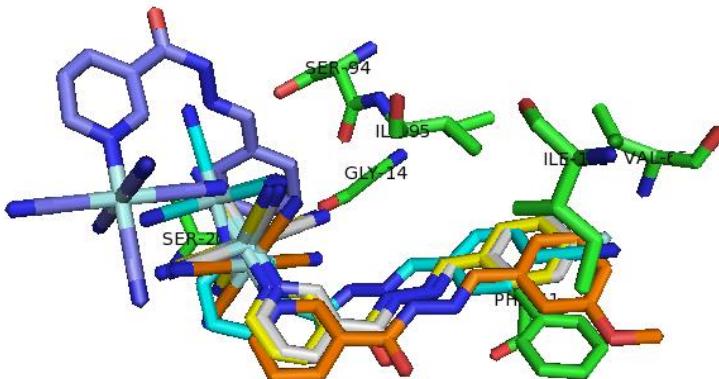
**Tabela 14 - Resultados para o grupo selecionado para os ensaios de *docking* com o programa ZDOCK e a função *score* XSCORE.**

Código	Ligante auxiliar	$pK_D$
53	NA4CN	6,54
54	NA4(3'-OMet)	6,44
09	NA4F	6,46
06	NA4OMet	6,44
03	NA4H	6,55

**Fonte:** Elaborada pelo autor

Uma vez que este conjunto possui uma uniformidade estrutural maior que o grupo anterior, os valores de  $pK_D$  observados foram mais uniformes. As estruturas obtidas dos *dockings* podem ser observadas na Figura 60.

Figura 60 - Resultados de *docking* dos complexos 053 (azul claro), 009 (amarelo), 054 (laranja), 003 (cinza) e 006 (roxo) com a estrutura 2AQ8 usando o programa ZDOCK.



**Fonte:** Elaborada pelo autor

A partir da Figura 60 pode ser visto que os complexos ocuparam praticamente a mesma posição no sítio ativo, exceção feita ao complexo 006, análogo ao complexo 010, onde o conformero selecionado possui uma geometria diferente dos demais.

A mudança da posição 3 para a posição 4 do substituinte do anel benzênico levou a maiores valores de  $pK_D$  assim como no conjunto anterior, que neste caso pode ser justificada com a mudança da posição do anel fenila, que levou a interações com a PHE41 e a ILE122 menos efetivas.

Uma observação importante para este conjunto é que o anel benzênico não substituído possuiu uma maior valor de  $pK_D$ , provavelmente associado aos outros complexos possuírem grupos polares nesta região de interação predominantemente hidrofóbica.

## 6.2 Docking rígido-flexível com o programa Molegro Virtual Docker e função score Moldock

Os 57 complexos foram submetidos para o cálculo de *docking* rígido-flexível com o programa Molegro Virtual Docker, com os mesmos parâmetros utilizados na validação do métodos de *docking*. Os resultados foram analisados com a função *Moldock*, na qual os melhores resultados possuem menores valores de energia. Foram encontrados valores entre 37e 81% em relação ao NADH, que podem ser encontrados na Tabela 15.

**Tabela 15 - Valores de energias obtidas pelo *moldock score* para os ensaios de *docking* utilizando o programa MVD.**

Código	Energia	Código	Energia	Código	Energia
1	-146,4	20	-120,1	39	-107,7
2	-107,8	21	-89,0	40	-101,8
3	-140,8	22	-74,1	41	-104,3
4	-113,4	23	-78,6	42	-103,6
5	-131,4	24	-72,3	43	-99,8
6	-142,8	25	-77,2	44	-104,6
7	-140,2	26	-78,7	45	-104,7
8	-123,0	27	-87,4	46	-106,1
9	-146,0	28	-95,2	47	-73,5
10	-138,3	29	-102,2	48	-136,5
11	-116,4	30	-95,4	49	-140,3
12	-95,2	31	-95,7	50	-122,3
13	-112,9	32	-104,5	51	-111,1
14	-129,4	33	-97,0	52	-111,7
15	-128,8	34	-91,8	53	-151,35
16	-104,1	35	-100,4	54	-149,5
17	-109,1	36	-90,5	55	-145,0
18	-113,6	37	-96,6	56	-141,6
19	-122,5	38	-93,7	58	-106,5

**Fonte:** Elaborada pelo autor

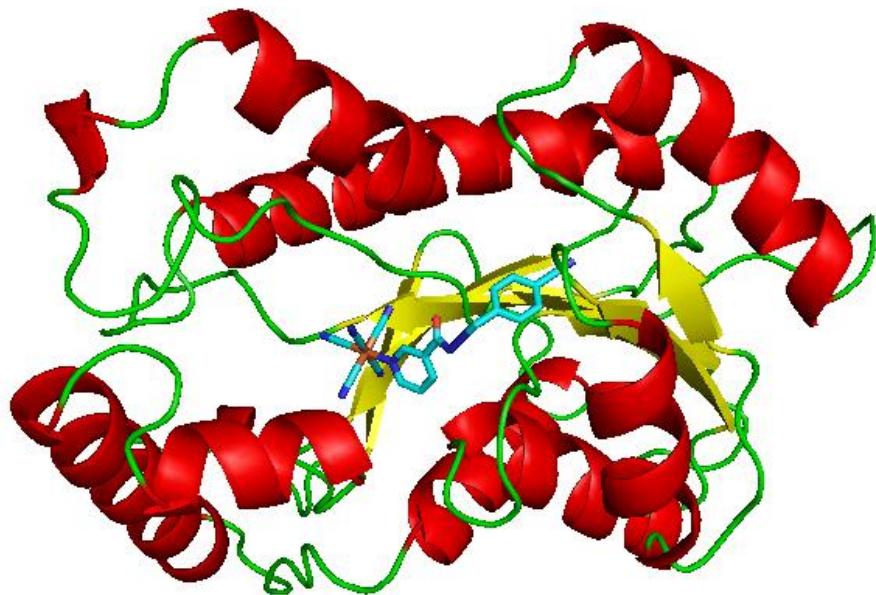
Os 20 melhores valores obtidos encontram-se entre 62 e 81% do valor de interação obtido para o NADH na validação (-185,9).

Ao agrupar complexos de ligantes semelhantes estruturalmente observa-se que os valores de  $pK_D$  possuem são próximos. A análise visual das estruturas de *docking* mostra, em geral, os ligantes em posição semelhante dentro do sitio da enzima. Ao compararem-se diferentes grupos de ligantes, observa-se que a posição no sítio da enzima é dependente do volume dos átomos e dos tipos de interações possíveis.

#### **6.2.1 Complexo com o ligante auxiliar NA4CN(053)**

Dentre todos os complexos estudados o de melhor resultado foi o complexo com o ligante auxiliar NA4CN, com a estrutura obtida do *docking* e a enzima sendo representados na Figura 61.

Figura 61 - Estrutura obtida do *docking* utilizando o programa MVD do ligante NA4CN na enzima 2AQ8, função *moldock score*.



**Fonte:** Elaborada pelo autor

Para uma discussão mais aprofundada foram selecionados os complexos que possuíam uma identidade estrutural compartilhada por outros complexos, de modo a poder, com a comparação dentro do grupo, mostrar e tentar explicar as diferenças de resultados em termos estruturais dos ligantes do complexo.

### 6.2.2 Ligantes Simples

Os complexos deste conjunto possuíram resultados de *moldock score* bastante semelhantes, conforme pode ser verificado na Tabela 16.

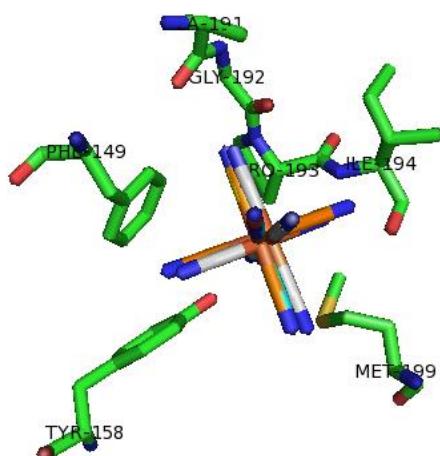
**Tabela 16 - Resultados para o grupo selecionado para os ensaios de *docking* com o programa MVD e a energia calculada pela função moldock score .**

Código	Ligante auxiliar	Energia
26	CO	-78,7
23	NO <sup>+</sup>	-78,6
25	CN <sup>-</sup>	-77,2
24	NH <sub>3</sub>	-72,3

**Fonte:** Elaborada pelo autor

Devido à alta semelhança estrutural dos complexos deste conjunto, observou-se que os mesmos ocuparam uma mesma posição na enzima, conforme pode ser visto na Figura 62.

**Figura 62 - Resultados de *docking* dos complexos 025 (azul claro), 023 (amarelo), 026 (laranja) e 024 (cinza) com a estrutura 2AQ8 usando o programa MVD e função score moldock.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

Como um dado interessante, pode-se ver a partir dos aminoácidos indicados na Figura 62 que a posição dos complexos no sitio foi bastante diferente da abordagem com o programa ZDOCK.

### 6.2.3 Ligantes Piridínicos Substituídos na Posição 3

Para este conjunto de ligantes piridínicos, todos os valores de *moldock score* indicam uma maior afinidade pela enzima que o complexo com piridina, conforme pode ser observado nos dados da Tabela 17.

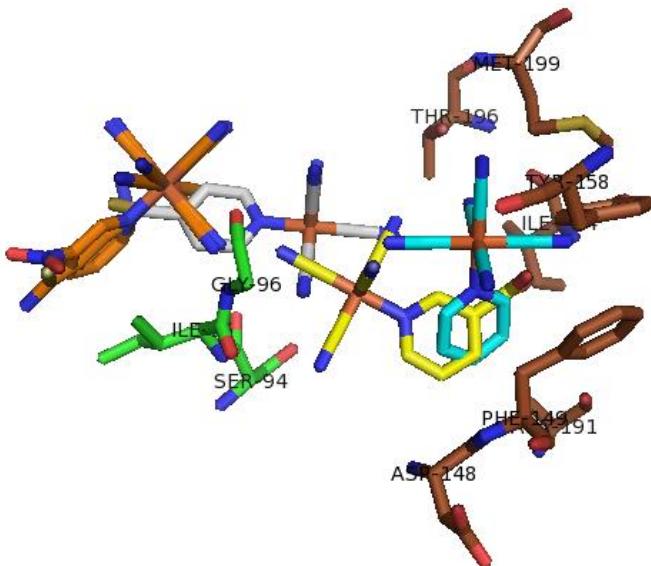
**Tabela 17 - Resultados para o grupo selecionado para os ensaios de *docking* com o programa MVD e a energia calculada pela função *moldock score* .**

Código	Ligante auxiliar	Energia
51	Hidrazida do ácido tionicotínico	-111,7
46	Ácido nicotínico	-106,1
45	Nicotinamida	-104,7
44	Tionicotinamida	-104,6
32	3-nitropiridina	-104,5
29	3-cianopiridina	-102,1
31	3-metilpiridina	-95,7
30	3-aminopiridina	-95,5

**Fonte:** Elaborada pelo autor

Embora pelos valores de *moldock score* apenas três complexos destoem dos demais (030 e 031, acima de -100 e 051, abaixo de -110), pelo posicionamento dentro do sítio ativo da enzima podem separar os complexos em quatro subconjuntos, conforme pode ser visto na Figura 63.

**Figura 63 - Resultados de *docking* dos complexos 021 (azul claro), 046 (amarelo), 044 (laranja) e 051 (cinza) com a estrutura 2AQ8 usando o programa MVD e função *score moldock*.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

O primeiro subconjunto é formado pelos complexos mais simples com piridina (021), 3-metilpiridina (031) e 3-animopiridina (030). Conforme observado anteriormente com o programa ZDOCK, embora ocupem as mesmas posições na enzima o complexo 031 possui maior energia de interação que o complexo 030, provavelmente devido à maior polaridade do segundo reduzir as interações hidrofóbicas.

O segundo subconjunto é formado pelos complexos de nicotinamida (045) e ácido nicotínico (046). Estes possuem o grupo piridina em posição próxima ao subconjunto anterior, o que garante estabilização hidrofóbica, porém com o grupo pentacianoferrato formando ligações de hidrogênio com os aminoácidos SER94, ILE95 e GLY96, o que confere maior estabilidade que o anterior.

O terceiro subconjunto é formado pelos complexos de 3-nitropiridina (032), 3-cianopiridina (029) e tionicotinamida (044), provavelmente por seus substituintes de polaridade intermediária entre os dois grupos citados anteriormente. E o último é composto apenas pelo complexo 051, que possuiu o melhor resultado neste conjunto.

### 6.2.4 Ligantes Piridínicos Substituídos na Posição 4

Assim como no conjunto anterior, a afinidade de todos os complexos de derivados piridínicos foi superior à da piridina. Os valores podem ser encontrados na Tabela 18.

**Tabela 18 - Resultados para o grupo selecionado para os ensaios de *docking* com o programa MVD e a energia calculada pela função *moldock score* .**

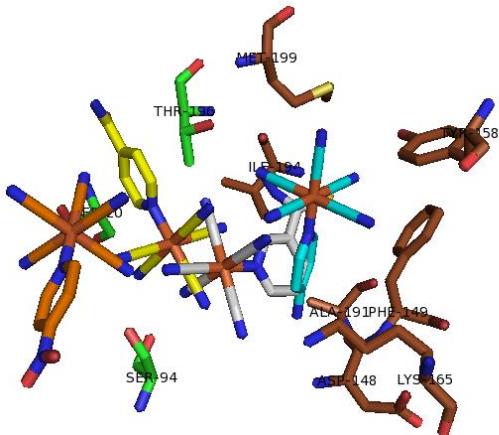
Código	Ligante auxiliar	Energia
52	Hidrazida do ácido isonicotínico	-111,1
41	Isotionicotinamida	-104,3
42	Nicotinamida	-103,6
35	4-nitropiridina	-100,4
44	Ácido isonicotínico	-99,8
33	4-aminopiridina	-97,0
28	4-cianopiridina	-95,2
34	4-metilpiridina	-91,0

**Fonte:** Elaborada pelo autor

Uma característica que pode ser observada em relação ao uso do programa ZDOCK é que o uso do *moldock* mostrou maior afinidade dos ligantes com substituinte na posição 3, enquanto o ZDOCK mostrou para os na posição 4.

Assim como no conjunto anterior, pode-se dividir em quatro subconjuntos a partir das posições encontradas no sítio ativo, conforme mostrado na Figura 64.

**Figura 64 - Resultados de *docking* dos complexos 033 (azul claro), 042 (amarelo), 035 (laranja) e 052 (cinza) com a estrutura 2AQ8 usando o programa MVD e função *score moldock*.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

O melhor resultado foi do complexo 052, que é análogo ao complexo 051 do grupo anterior, e também possui um posicionamento completamente diferente dos demais subconjuntos.

O segundo subconjunto em termos de afinidade é composto pelos complexos de isotionicotinamida (041), isonicotinamida (042) e 4-cianopiridina, que apesar de ocupar a mesma posição, possui uma afinidade muito abaixo dos outros dois complexos pela ausência de uma ligação de hidrogênio da LEU197 com a função amida ou tioamida dos demais.

O terceiro subconjunto é composto pelos complexos de 4 nitropiridina (035) e ácido isonicotínico (044), de estruturas semelhantes. O quarto grupo é composto pelos complexos de piridina, 4-metilpiridina e 4-aminopiridina. Uma diferença marcante é o fato de neste tipo de função a 4-aminopiridina possuir uma maior afinidade que a 4-metilpiridina.

### 6.2.5 Ligantes Pirazínicos

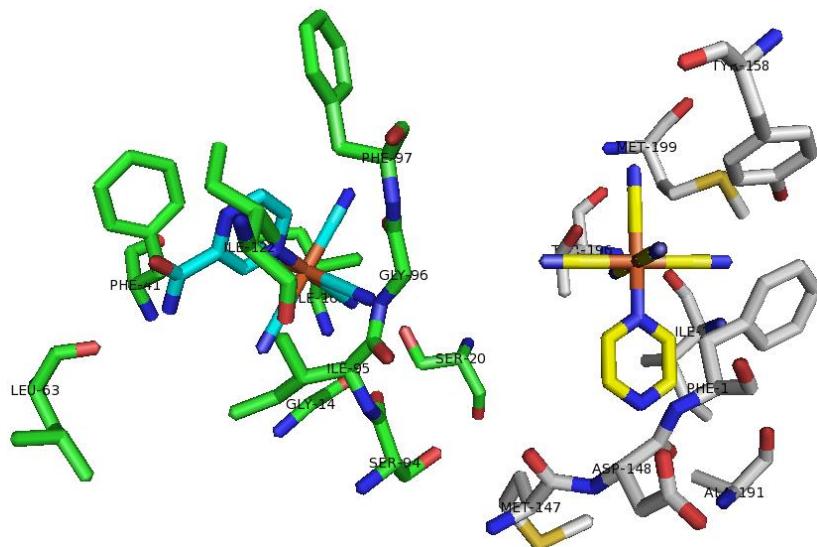
Os ligantes pirazínicos podem ser divididos entre a pirazinamida e os demais compostos tanto em termos de valores de *moldock score* como em posicionamento. A Tabela 19 mostra os valores obtidos e a Figura 65 as posições obtidas nos *dockings*.

**Tabela 19 - Resultados para o grupo selecionado para os ensaios de *docking* com o programa MVD e a função moldock score .**

Código	Ligante auxiliar	Energia
16	Pirazinamida	-104,1
38	3,5-dimetilpirazina	-93,7
36	N-metilpirazínio	-90,5
27	Pirazina	-87,5
37	3-metilpirazina	-69,7

**Fonte:** Elaborada pelo autor

**Figura 65 - Resultados de *docking* dos complexos 016 (azul claro) e 027 (amarelo) com a estrutura 2AQ8 usando o programa MVD e função *score moldock*.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

Observa-se que enquanto o complexo de pirazinamida (016) encontra-se em uma posição bastante próxima da encontrada pelo programa ZDOCK, os demais complexos encontram-se na posição e orientação representada na Figura pelo complexo de pirazina (027). Neste sítio alternativo os complexos possuem afinidade bem mais baixa.

### 6.2.6 Ligantes Quinolínicos

Para os complexos de quinolina, as estruturas contendo o anel de oxadiazol possuíram afinidade maior que os demais complexos, conforme pode ser visto na Tabela 20.

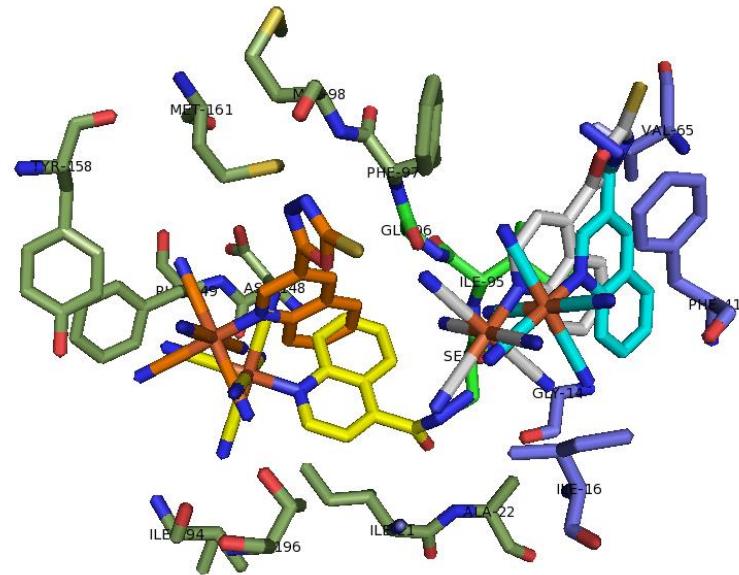
**Tabela 20** - Resultados para o grupo selecionado para os ensaios de *docking* com o programa MVD e a energia calculada pela função *moldock score* .

Código	Ligante auxiliar	Energia
19	4CQO3SH	-122,5
20	3CQO3SH	-120,1
18	HA3CQ	-113,6
17	HA4CQ	-109,1

**Fonte:** Elaborada pelo autor

A partir das estruturas de *docking*, observadas na Figura 66, pode-se verificar que ao contrário do *docking* com o programa ZDOCK, embora os complexos dividam o mesmo sítio dois a dois, estes não possuem o mesmo padrão de substituição do anel quinolínico.

Figura 66 - Resultados de *docking* dos complexos 018 (azul claro), 017 (amarelo), 021 (laranja) e 020 (cinza) com a estrutura 2AQ8 usando o programa MVD e função *score moldock*.



**Fonte:** Elaborada pelo autor

O melhor complexo, 019 está em um sítio muito semelhante ao pior, 017, o que pode ser explicado pela diferença de posição dos anéis da quinolina, que são responsáveis por boa parte da interação hidrofóbica da molécula. Já os complexos 018 e 020 possuem posições e orientações parecidas e a maior área de contato hidrofóbico do complexo com o anel oxadiazólico explica porque este possui afinidade superior ao complexo 018.

#### 6.2.7 Ligantes Oxadiazóis

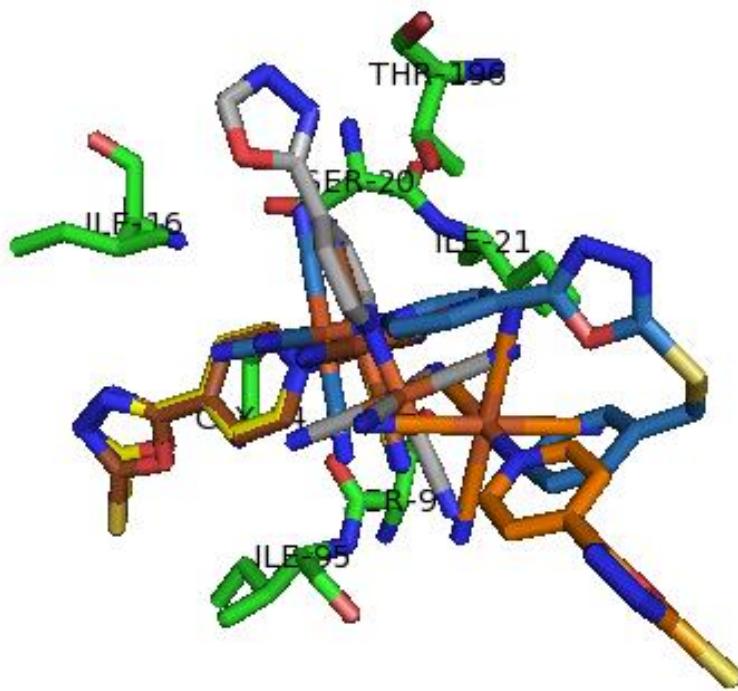
Para ligantes auxiliares do tipo oxadiazóis, os resultados da função *moldock score*, pode ser observado na Tabela 21. Para um melhor compreensão dos valores, a estrutura com os ligantes sobrepostos pode ser observada na Figura 67.

**Tabela 21 - Resultados para o grupo selecionado para os ensaios de *docking* com o programa MVD e a energia calculada pela função *moldock score* .**

Código	Ligante auxiliar	Energia
001	IO3SBz	-146,4
008	IO3SMet	-122,9
011	IO3SH	-116,5
004	IO3Met (IQG639)	-113,5
002	IO3H	-107,8

**Fonte:** Elaborada pelo autor

**Figura 67 - Resultados de docking dos complexos 001 (azul), 004 (amarelo), 011 (laranja), 002 (cinza) e 008 (marrom) com a estrutura 2AQ8 usando o programa MVD e função *score moldock*.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor.

Pode ser visto na Figura 66 que os dois ligantes com maior semelhança estrutural, os complexos 008 e 004 podem ser encontrados praticamente sobrepostos. O composto 002 assumiu uma conformação diferente em virtude da ausência de grupos substituintes ao anel de oxadiazolíco favorecer a formação de ligações de

hidrogênio entre este anel e os aminoácidos THR17 e SER19, estabilizando esta conformação.

As diferentes conformações dos complexos 001 e 011 se dão por o seu sítio alternativo criar um favorecimento às interações hidrofóbicas existentes entre a proteína e os sistemas aromáticos destes compostos.

### **6.2.8 Ligantes do tipo Metileno-hidrazidas do Ácido Isonicotínico**

Os complexos contendo metileno hidrazidas do ácido isonicotínico estão entre os de maior afinidade pela estrutura 2AQ8. Os valores de *moldock score* obtidos para este conjunto de ligantes encontram-se na Tabela 22.

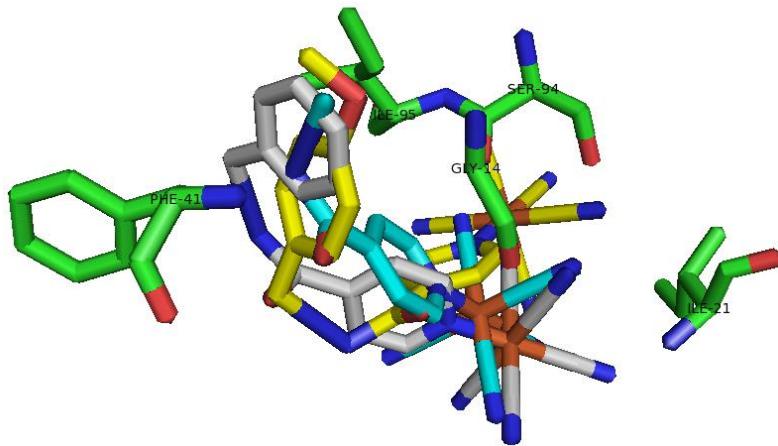
**Tabela 22 - Resultados para o grupo selecionado para os ensaios de *docking* com o programa MVD e a energia calculada pela função *moldock score* .**

Código	Ligante auxiliar	Energia
55	IA4(3'-OMet)	-145,1
56	IA4CN	-141,6
7	IA4F	-140,2
10	IA4OMet	-138,3
05	IA4H	-131,4
14	IA4(CMe <sub>2</sub> )	-129,4
13	IA4(CH <sub>2</sub> )	-113,0

**Fonte:** Elaborada pelo autor

Pode-se observar novamente a tendência geral de o aumento na cadeia carbônica levar a um incremento na afinidade do ligante por melhorar os contatos hidrofóbicos. As estruturas obtidas podem ser observadas na Figura 68.

Figura 68 - Resultados de *docking* dos complexos 013 (azul claro), 010 (amarelo) e 005 (cinza) com a estrutura 2AQ8 usando o programa MVD e função *score moldock*.



**Fonte:** Elaborada pelo autor

Pode-se dividir este conjunto em três partes em função das orientações dos complexos. Os que pertencem a um mesmo grupo possuem seus átomos muito próximos ou sobrepostos.

O grupo de mais baixa afinidade é o composto pelos complexos 013 e 014, onde a baixa interação hidrofóbica de sua relativamente pequena cadeia carbônica não promove uma boa ligação com o sítio.

O grupo de afinidade intermediária é formado pelos complexos 05 e 07, que possuem o anel benzênico não substituído ou com um átomo de flúor. O terceiro grupo é composto pelos complexos 010, 055 e 056, com substituintes maiores no anel benzênico, tornando mais estável uma posição diferente do centro metálico.

Esta é a característica que pode ser ressaltada deste conjunto: o grupo substituinte do metileno possui uma posição quase constante embora a posição do centro metálico varie, e isto influencia fortemente a afinidade.

#### **6.2.9 Ligantes do tipo Metileno-hidrazidas do Ácido Nicotínico**

Os complexos contendo ligantes do tipo metileno-hidrazidas do ácido nicotínico estão entre as de maior afinidade na biblioteca, de acordo com a função *score moldock*. Os valores e estruturas podem ser encontrados na Tabela 23.

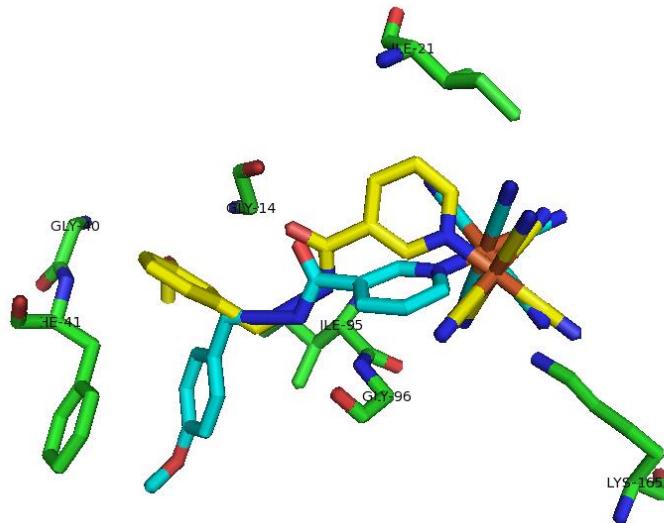
**Tabela 23 - Resultados para o grupo selecionado para os ensaios de *docking* com o programa MVD e a energia calculada pela função moldock score .**

Código	Ligante auxiliar	Energia
53	NA4CN	-151,3
54	NA4(3'-OMet)	-149,5
09	NA4F	-146,0
06	NA4OMet	-142,8
03	NA4H	-140,8

**Fonte:** Elaborada pelo autor

A análise das estruturas de *docking* revelou a existência de dois subconjuntos distintos: O complexo 006 possui um posicionamento e os demais um segundo tipo de posicionamento, conforme visto na Figura 69.

**Figura 69 - Resultados de *docking* dos complexos 006 (azul claro) e 054 (amarelo) com a estrutura 2AQ8 usando o programa MVD e função *score moldock*.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

Observa-se que apenas o complexo que possui o grupo fenila não substituído (003) possui afinidade menor que o complexo 006. O complexo de maior afinidade, 053, além das interações existentes nos demais complexos, possui ainda duas

ligações de hidrogênio do nitrogênio da nitrila com os aminoácidos THR39 e LEU63, o que leva a uma estabilização extra.

### **6.3 Docking rígido-flexível com o programa Molegro Virtual Docker e as funções *score rerank* e *XSCORE***

A utilização do programa MVD para realização dos *dockings* mostra seus resultados não só em função dos valores de *moldock score*. O programa MVD inclui ainda a função *rerank score* que possui melhor parametrização <sup>(43)</sup> sendo melhor sua correlação a resultados experimentais de inibição.

Uma vez que as estruturas são bastante semelhantes com as já discutidas para a função *moldock score*, serão apresentados os valores de *rerank score* e  $pK_D$  para as estruturas na tabela 24 para o *rerank score*.

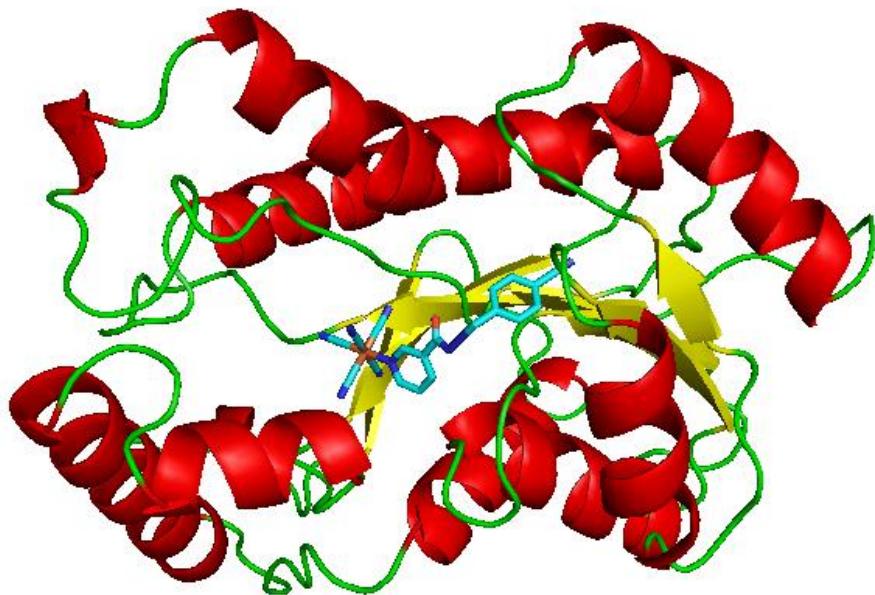
**Tabela 24 - Valores de energias obtidos pelo rerank score com o uso do programa MVD para o docking da biblioteca inorgânica.**

Código	Energia (ua)	Código	Energia (ua)	Código	Energia (ua)
1	-99,2	20	-84,1	39	-79,2
2	-76,9	21	-67,6	40	-74,1
3	-106,8	22	-57,1	41	-77,3
4	-80,8	23	-57,0	42	-78,2
5	-98,4	24	-54,9	43	-74,5
6	-110,1	25	-55,4	44	-77,0
7	-103,6	26	-56,1	45	-78,2
8	-83,3	27	-65,7	46	-78,2
9	-109,2	28	-67,2	47	-43,9
10	-105,9	29	-72,8	48	-102,2
11	-76,2	30	-71,9	49	-101,6
12	-68,7	31	-71,5	50	-96,0
13	-85,7	32	-77,4	51	-81,2
14	-96,6	33	-73,7	52	-83,7
15	-92,8	34	-67,6	53	-119,0
16	-74,0	35	-71,9	54	-116,4
17	-81,6	36	-65,3	55	-113,0
18	-74,3	37	-71,0	56	-105,2
19	-83,4	38	-65,3	58	-76,0

### 6.3.1 Complexo NA4CN – melhor resultados com rerank score

Dentre todos os complexos estudados o de melhor resultado foi o complexo NA4CN, com a mesma estrutura já observada anteriormente para o *moldock score*, apresentada na Figura 70.

**Figura 70** - Estrutura obtida do *docking* utilizando o programa MVD do ligante NA4CN na enzima 2AQ8, função *rerank score*.



**Fonte:** Elaborada pelo autor

Além disso, para que houvesse uma fácil correção entre os resultados encontrados entre o programa MVD e o programa ZDOCK, as estruturas obtidas com o uso da função *moldock score* foram também avaliadas com a função XSCORE. Os valores de  $pK_D$  encontram-se na Tabela 25.

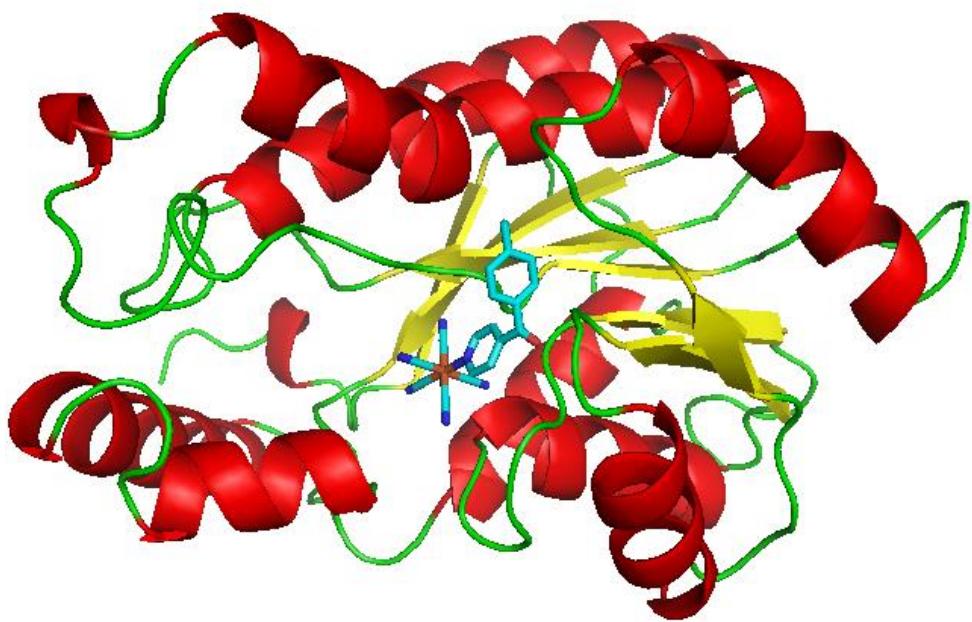
**Tabela 25 - Valores de  $pK_D$  obtidos com o uso do programa MVD com a função XSCORE para o docking da biblioteca inorgânica.**

Código	$pK_D$	Código	$pK_D$	Código	$pK_D$
1	6,69	20	6,30	39	5,65
2	5,38	21	5,29	40	5,31
3	6,68	22	4,73	41	5,43
4	5,65	23	4,70	42	5,46
5	6,63	24	4,54	43	5,27
6	6,55	25	4,72	44	5,41
7	6,54	26	4,71	45	5,47
8	5,65	27	4,96	46	5,63
9	6,53	28	5,37	47	5,46
10	6,55	29	5,45	48	6,44
11	5,83	30	5,34	49	6,76
12	5,46	31	5,51	50	6,52
13	5,54	32	5,46	51	5,54
14	6,04	33	5,42	52	5,52
15	6,07	34	5,37	53	6,74
16	5,19	35	5,68	54	6,53
17	6,14	36	5,05	55	6,40
18	6,34	37	5,19	56	5,59
19	6,45	38	5,37	58	5,63

### 6.3.2 Complexo 049 – melhor resultados com XSCORE

Dentre todos os complexos estudados o de melhor resultado foi o complexo 049, com a estrutura obtida do *docking* sendo representada na Figura 71.

**Figura 71** - Estrutura obtida com o *docking* do complexo 049 com a enzima 2AQ8 utilizando o programa MVD.



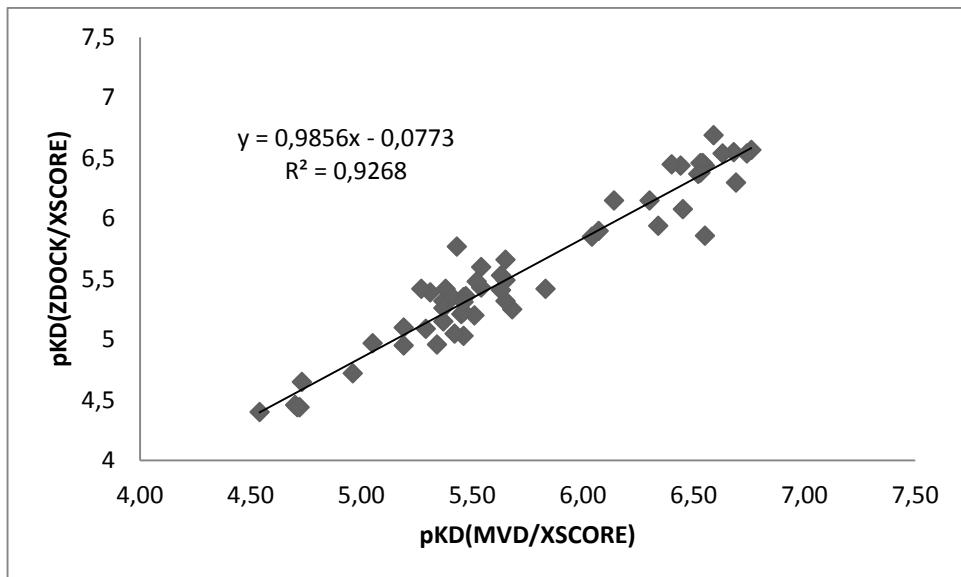
**Fonte:** Elaborada pelo autor

## 6.4 Comparação de Resultados Entre as Metodologias

Do mesmo modo que com a biblioteca orgânica, também foi realizada a comparação dos métodos para avaliação da concordância de predição dos dois modelos de *docking* utilizados e com as três funções *score* utilizadas. Desta vez, devido à maior uniformidade da biblioteca os coeficientes de correlação foram superiores aos encontrados com a biblioteca de derivados da nicotinamida.

Para a análise entre a correlação entre as abordagens de ligante rígido (usando o programa ZDOCK) e ligante flexível (programa MVD), foram novamente utilizados os valores de  $pK_D$  obtidos com a função XSCORE, conforme observado na Figura 72.

**Figura 72 - Correlação entre os resultado obtidos com a função XSCORE, utilizando as abordagens de ligante rígido (ZDOCK) e flexível (MVD).**



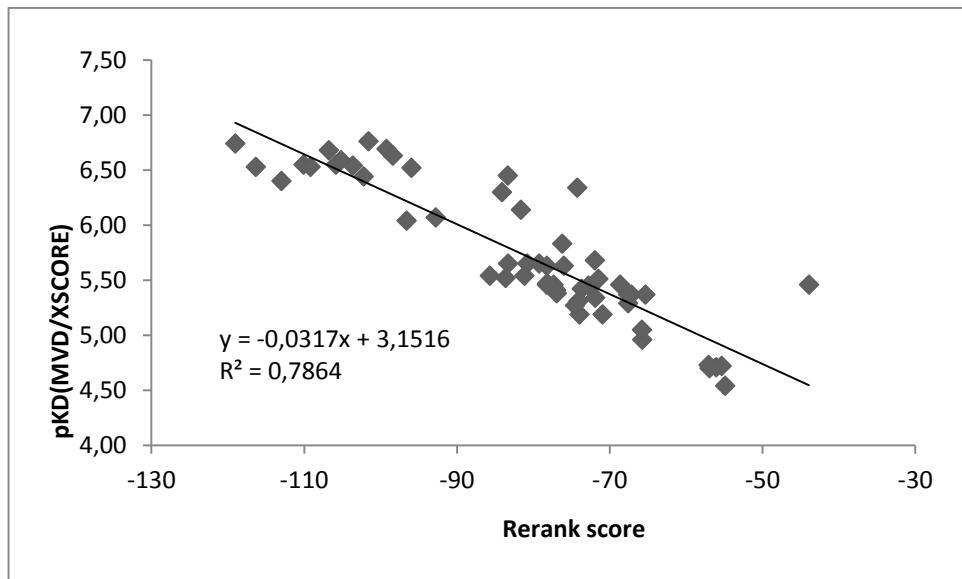
**Fonte:** Elaborada pelo autor

O valor de  $r^2$  desta vez foi de 0,92 indicando uma correlação mais confiável, o que pode ser justificado pela maior identidade estrutural desta biblioteca em relação à biblioteca anterior.

O coeficiente angular próximo a unidade mostra que desta vez, em relação ao observado para a biblioteca orgânica, os resultados previstos pelas duas abordagens foram bastante semelhantes, o que é justificado pelo fato de a biblioteca para o uso com o ZDOCK ter levado em consideração a possibilidade de conformeros diferentes e, portanto, uma aproximação do realizado durante o *docking* flexível.

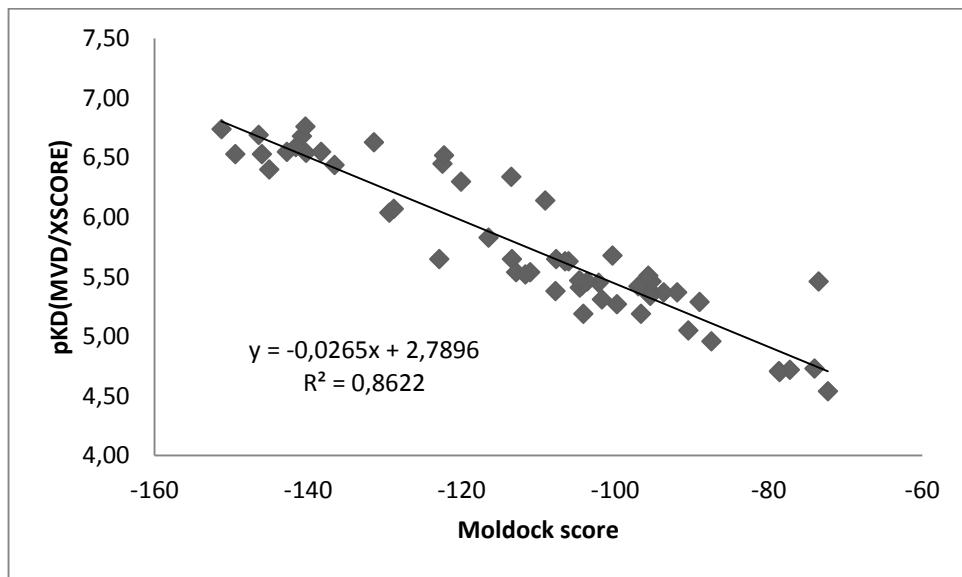
Para a correlação utilizando o programa MVD e as diferentes funções *score*, pode-se observar as Figuras 73 a 75.

**Figura 73 - Correlação entre os resultados obtidos com o uso do programa MVD com as funções XSCORE e rerank score .**



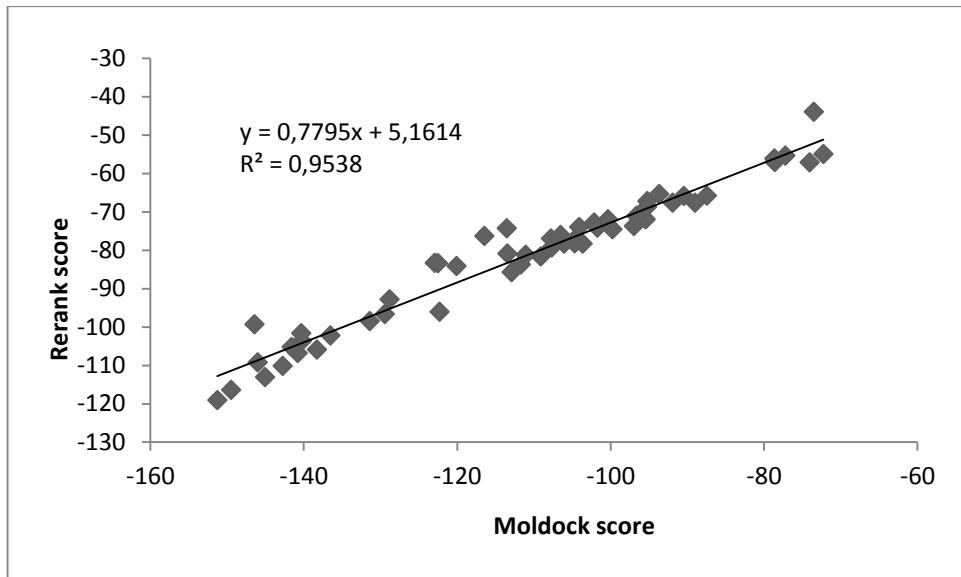
**Fonte:** Elaborada pelo autor

**Figura 74 - Correlação entre os resultados obtidos com o uso do programa MVD com as funções XSCORE e moldock score .**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

**Figura 75 - Correlação entre os resultados obtidos com as funções *moldock score* e *rerank score* .**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

Observa-se, tal qual para a biblioteca anterior que a correlação existente entre a função *moldock score* e a função *rerank score* é alta, porém a correlação destas com a função XSCORE é bem menor, devido a diferente parametrização de cada função *score*.

## 6.5 Comparação com resultados experimentais e proposição de complexos para teste

Os resultados encontrados para o aduto dentre o radical isonicotinil e o NADH, quando submetido às mesmas condições de *docking* mostraram uma interação ainda mais forte entre o aduto que o NADH, ainda que a estrutura cristalográfica tenha possuído uma interação enzima NADH mais alta que o esperado pela literatura. <sup>(35)</sup>

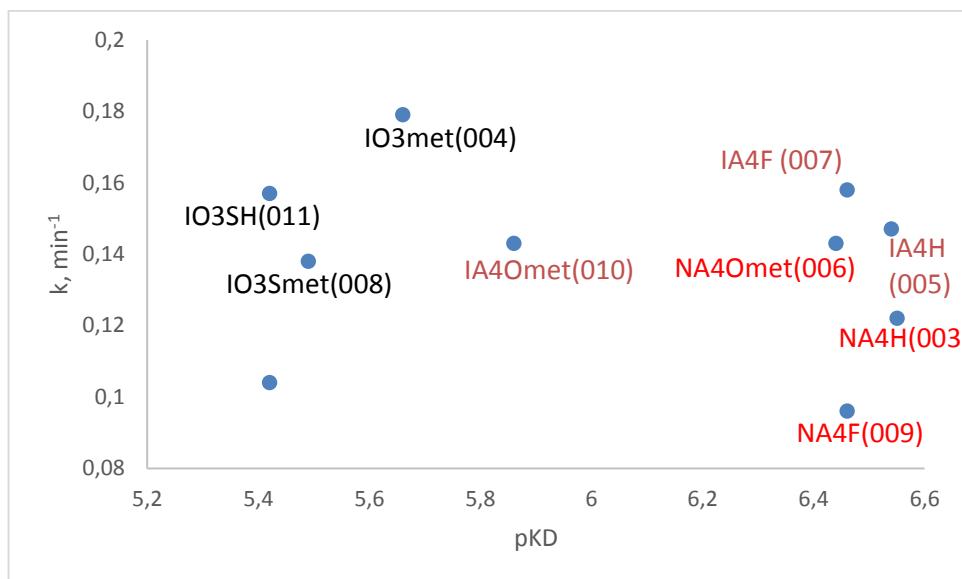
Alguns dos complexos cuja simulação de interação foi realizada neste trabalho já possuíam constantes cinéticas de inibição da enzima InhA encontradas na literatura. <sup>(44)</sup> A Tabela 26 e a Figura 75 resumem os valores de constante cinética de inibição, realizado com a enzima selvagem, NADH em concentração  $10 \mu\text{molL}^{-1}$  e o inibidor.

**Tabela 26 - Dados experimentais de cinética de inibição e resultados das funções *score* das simulações de docking realizadas.**

Complexo	k(min <sup>-1</sup> )	pK <sub>D</sub> (ZDOCK)	pK <sub>D</sub> (MVD)	Energia (Moldock)	Energia (Rerank)
002	0,104	5,42	5,38	-107,9	-76,9
003	0,122	6,55	6,68	-140,8	-106,8
004	0,179	5,66	5,65	-113,5	-80,8
005	0,147	6,54	6,63	-131,4	-98,4
006	0,143	6,44	6,55	-142,8	-110,1
007	0,158	6,46	6,54	-140,3	-103,6
008	0,138	5,49	5,65	-122,9	-83,3
009	0,096	6,46	6,53	-146,0	-109,2
010	0,143	5,86	6,55	-138,3	-105,9
011	0,157	5,42	5,83	-116,5	-76,2

**Fonte:** Elaborada pelo autor

**Figura 76 - Gráfico de valores da constante cinética de inibição da enzima InhA versus o valor de  $pK_D$  observado pelos docking dos compostos com o programa ZDOCK e função score XSCORE.**



**Fonte:** Elaborada pelo autor

A partir da observação da Figura 76 verifica-se que existe um agrupamento dos resultados experimentais de acordo com o tipo de ligante. Por exemplo, Ligantes oxadiazólicos estão agrupados à esquerda, evidenciados por seu baixo valor de  $pK_D$  em relação aos demais. Observa-se também, que as hidrazidas do ácido isonicotínico possuem tanto um maior valor de  $pK_D$  como de constante cinética de velocidade.

A não linearidade entre o valores de  $pK_D$  e constante de inibição pode ser justificado por o primeiro ser derivado de um parâmetro termodinâmico e o segundo um parâmetro cinético. O melhor exemplo para isto é o complexo 004, que possui o melhor resultado de cinética de inibição, mesmo tendo valores de afinidade relativamente baixos dentro do conjunto. Este complexo é reportado na literatura por possuir atividade *in vitro*, embora sua atividade *in vivo* em ratos não tenha sido observada<sup>(19)</sup>.

O fato dos valores obtidos para os complexos não possuírem valores de interação obtidos pelos dockings superior ao do NADH não invalida os Tess com os melhores candidatos da biblioteca, pois o já citado complexo 004 exibiu atividade de inibição *in vitro*.

A mais simples possibilidade para tal ocorrência é a limitação da conformação fixa da enzima, uma vez que em solução a conformação pode alterar-se significativamente de modo a que ligantes possam interagir melhor.

Outra possibilidade pode ser sugerida a partir de ensaio de dinâmica molecular do complexo IQG-607 realizadas por da Costa <sup>(14)</sup>, onde mesmo com diferentes conformação observadas e efeito de temperatura, a ligação do complexo IQG-607 com a enzima InhA se dava de forma reversível, com o ligante retornando ao seio da solução simulada. Deste modo, pode-se concluir que o meio de inibição ao metabolismo da bactéria ainda não é completamente compreendido e necessita-se de maiores estudos a fim de determinar a correta interação do IQG-607 com a bactéria.

Deste modo, ainda que a interação dos complexos em geral seja mais baixa que o observado por *docking* para o NADH, ainda existe a possibilidade dos melhores complexos possuírem capacidade de inibição devido a isto acontecer também com o IQG-607.

Dentre os resultados observados, algumas tendências podem auxiliar em testes de novas estruturas:

- Foi observado que o volume dos átomos e quantidade de grupos apolares ligados ao centro metálico pentacianoferrato influencia diretamente na interação, com a presença de anéis benzênicos auxiliando a interação com a parte hidrofóbica da sítio ativo;
- Resultados observados com a comparação entre os complexos com oxadiazóis e os com hidrazidas mostraram que a presença da carbonila da hidrazida é importante para interação. Deste modo, ligantes que possuam a carbonila ligada ao anel piridínico são preferidos;
- A posição de substituição do anel piridínico influenciou na interação obtida, com os ligantes substituídos na posição 4 possuindo melhores valores de interação que os substituídos na posição 3 para a grande maioria dos casos. Além disso, praticamente todos os ligantes substituídos possuíram melhores interações que a piridina.

## 7 CONCLUSÕES

Com a metodologia proposta foi possível o estudo detalhado da enzima InhA e seus substratos, sendo assim possível a elaboração de bibliotecas para ensaios de *docking*.

A rotina de trabalho pôde verificar que as interações hidrofóbicas são de fundamental importância para a estabilização do complexo ligante-enzima, devendo a elaboração de um possível inibidor levar em consideração este tipo de interação.

Para a biblioteca de complexos metálicos, observou-se que os melhores resultados foram obtidos com a intercalação de dois grupos aromáticos por uma carbonila ou grupo de polaridade semelhante, com os compostos do tipo hidrazona possuindo as maiores atividades, tanto *in silico* quanto nos ensaios *in vitro* encontrados na literatura.

## REFERÊNCIAS

1. ORGANIZATION, W. H., *Global tuberculosis report 2012*. 2012, World Health Organization: Geneva.
2. MENENDEZ, C., et al. *Chemical synthesis and biological evaluation of triazole derivatives as inhibitors of InhA and antituberculosis agents*. European Journal of Medicinal Chemistry, **52**(0): 275-283, 2012.
3. RUSSELL, D. G., et al. *Tuberculosis: What we don't know can, and does, hurt us*. Science, **328**(5980): 852-856, 2010.
4. KOUL, A., et al. *The challenge of new drug discovery for tuberculosis*. Nature, **469**(7331): 483-490, 2011.
5. VILLEMAGNE, B., et al. *Tuberculosis: The drug development pipeline at a glance*. European Journal of Medicinal Chemistry, **51**: 1-16, 2012.
6. WILLAND, N., et al. *Synthetic EthR inhibitors boost antituberculous activity of ethionamide*. Nature Medicine, **15**(5): 537-544, 2009.
7. TIMMINS, G. S.; DERETIC, V. *Mechanisms of action of isoniazid*. Molecular Microbiology, **62**(5): 1220-1227, 2006.
8. ZHANG, Y.; MITCHISON, D. *The curious characteristics of pyrazinamide: a review*. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, **7**(1): 6-21, 2003.
9. ZHANG, Y., et al. *Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **52**(5): 790-795, 2003.
10. BELANGER, A. E., et al. *The embAB genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol*. Proceedings of the National Academy of Sciences, **93**(21): 11919-11924, 1996.
11. LIBERMANN, D., et al. *Preparation of new pyridinic thioamides active in experimental tuberculosis*. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences, **242**: 2409-2412, 1956.
12. ANDRADE, C. H., et al. *Abordagem racional no planejamento de novos tuberculostáticos: Inibidores da InhA, enoil-ACP redutase do *M. tuberculosis**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, **44**(2): 167-179, 2008.
13. BASSO, L. A., et al. *An Inorganic Complex that Inhibits *Mycobacterium tuberculosis* Enoyl Reductase as a Prototype of a New Class of*

- Chemotherapeutic Agents to Treat Tuberculosis.* Journal of Brazilian Chemical Society, **21**(7): 1384-1389, 2010.
14. DA COSTA, A. L. P., et al. *Conformational changes in 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase (InhA) from M. tuberculosis induced by an inorganic complex: A molecular dynamics simulation study.* Journal of Molecular Modeling, **18**(5): 1779-1790, 2012.
  15. LU, X.-Y., et al. *Discovery of potential new InhA direct inhibitors based on pharmacophore and 3D-QSAR analysis followed by in silico screening.* European Journal of Medicinal Chemistry, **44**(9): 3718-3730, 2009.
  16. BASSO, L. A., et al. *Mechanisms of isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis: enzymatic characterization of enoyl reductase mutants identified in isoniazid-resistant clinical isolates.* J Infect Dis, **178**(3): 769-75, 1998.
  17. BROSSIER, F. *Mécanismes d'action et de résistance de l'isoniazide, un antituberculeux de première ligne.* Journal des Anti-infectieux, **13**(4): 217-227, 2011.
  18. SOUSA, E. H. S., et al. *Isoniazid metal complex reactivity and insights for a novel anti-tuberculosis drug design.* Journal of Biological Inorganic Chemistry, **17**(2): 275-283, 2012.
  19. RODRIGUES-JUNIOR, V. S., et al. *Activity of IQG-607, a new orally active compound, in a murine model of Mycobacterium tuberculosis infection.* International Journal of Antimicrobial Agents, **40**(2): 182-185, 2012.
  20. DE MARIA DE MEDEIROS, P. S., et al. *Enzyme mechanism and slow-onset inhibition of Plasmodium falciparum enoyl-acyl carrier protein reductase by an inorganic complex.* Enzyme Research, **2011**(1), 2011.
  21. EKINS, S., et al. *Computational databases, pathway and cheminformatics tools for tuberculosis drug discovery.* Trends in Microbiology, **19**(2): 65-74, 2011.
  22. KOLB, P., et al. *Docking and chemoinformatic screens for new ligands and targets.* Current Opinion in Biotechnology, **20**(4): 429-436, 2009.
  23. HERT, J., et al. *Quantifying biogenic bias in screening libraries.* Nature Chemical Biology, **5**(7): 479-483, 2009.
  24. *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular.* 1<sup>a</sup> edição. ed. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2007. 539p.
  25. KLEBE, G. *Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations.* Drug Discovery Today, **11**(13/14): 580-594, 2006.
  26. GUNSTEREN, W. F. v.; BERENDSEN, H. J. C. *Groningen Molecular Simulation(GROMOS) Library Manual.* ed., 1987. p.
  27. WEINER, S. J., et al. *Journal of American Chemical Society,* **106**: 765-784, 1984.

28. BROOKS, B. R., *et al.* *Journal of Computational Chemistry*, **4**(2): 187-217, 1983.
29. HALGREN, T. A. *Journal of Computational Chemistry*, **4**(2): 490-519, 1996.
30. CHEN, R., *et al.* *Proteins*, **52**(1): 80-87, 2003.
31. CCP4 *Acta Cristallographica*, **50**: 760-763, 1994.
32. WANG, R., *et al.* *Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction*. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **16**: 11-26, 2002.
33. OLIVEIRA, J. S., *et al.* *Crystallographic and Pre-steady-state Kinetics Studies on Binding of NADH to Wild-type and Isoniazid-resistant Enoyl-ACP(CoA) Reductase Enzymes from Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Molecular Biology*, **359**(3): 646-666, 2006.
34. WALLACE, A. C., *et al.* *LIGPLOT: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions*. *Protein Engeneering*, **8**: 127-134, 1995.
35. STIGLIANI, J.-L., *et al.* *Binding of the tautomeric forms of isoniazid-NAD adducts to the active site of the Mycobacterium tuberculosis enoyl-ACP reductase (InhA): A theoretical approach*. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, **27**(4): 536-545, 2008.
36. COHEN, E. M. L., *et al.* *Effect of the explicit flexibility of the InhA enzyme from Mycobacterium tuberculosis in molecular docking simulations*. *BMC Genomics*, **12**(SUPPL. 4), 2011.
37. WAHAB, H. A., *et al.* *Elucidating isoniazid resistance using molecular modeling*. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **49**(1): 97-107, 2009.
38. ZAR, J. H. *Significance Testing of the Spearman Rank Correlation Coefficient*. *Journal of the American Statistical Association*, **67**(339): 578-580, 1972.
39. DIAS, R., *et al.* *Evaluation of Molecular Docking Using Polynomial Empirical Scoring Functions*. *Current Drug Targets*, **9**: 1062-1070, 2008.
40. IRWIN, J. J.; SHOICHE, B. K. *ZINC - A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening*. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **45**: 177-182, 2005.
41. DUCATI, R. G., *et al.* *Crystallographic and docking studies of purine nucleoside phosphorylase from Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **18**(13): 4769-4774, 2010.
42. GURVITZ, A. *Triclosan inhibition of mycobacterial InhA in Saccharomyces cerevisiae: yeast mitochondria as a novel platform for in vivo antimycobacterial assays*. *Letters in Applied Microbiology*, **50**(4): 399-405, 2010.

43. THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. *MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking*. *Journal of Medical Chemistry*, **49**: 3315-3321, 2006.
44. SALES, F. A. M. *Investigação da Atividade de Complexos Inorgânicos Inibidores da trans-2-Enoil Redutase*. 2008. - Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará,