



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE
JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
CAMILO HENRIQUE DA SILVA LIMA**



**Dinâmica molecular de sistemas aquosos da enzima enoil-
ACP redutase de *Mycobacterium tuberculosis***

RIO DE JANEIRO

2015

Camilo Henrique da Silva Lima

DINÂMICA MOLECULAR DE SISTEMAS
AQUOSOS DA ENZIMA ENOIL-ACP
REDUTASE DE MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadores:

Prof.^a Dr.^a Magaly Girão Albuquerque

Dr. Marcus Vinicius Nora de Souza

Rio de Janeiro

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

L732

Lima, Camilo Henrique da Silva

Dinâmica molecular de sistemas aquosos da enzima enoil-ACP reductase de *Mycobacterium tuberculosis* / Camilo Henrique da Silva
Lima – Rio de Janeiro: UFRJ/IQ, 2015.
156f.

Orientadora: Magaly Girão Albuquerque

Co-orientador: Marcus Vinícius Nora de Souza

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, 2015.

1.Dinâmica molecular. 2.Docagem molecular 3.QSAR-3D
4.Tuberculose 5.Triagem Virtual I. Albuquerque, Magaly Girão (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Química III. Título.

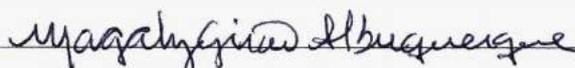
CDD: 547

CAMILO HENRIQUE DA SILVA LIMA

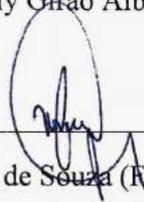
**DINÂMICA MOLECULAR DE SISTEMAS AQUOSOS DA ENZIMA
ENOIL-ACP REDUTASE DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Química).

Rio de Janeiro, 16 de dezembro de 2015.



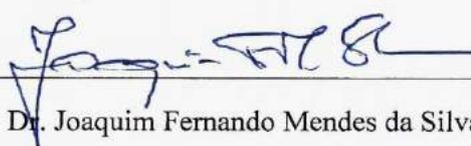
Profa. Dra. Magaly Girão Albuquerque (IQ-UFRJ) (Orientador)



Dr. Marcus Vinicius Nora de Souza (Farmanguinhos/FIOCRUZ) (Co-orientador)



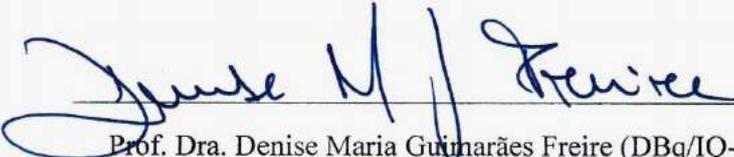
Profa. Dra. Barbara Vasconcellos da Silva (IQ-UFRJ)



Prof. Dr. Joaquim Fernando Mendes da Silva (IQ-UFRJ)



Prof. Dr. Teodorico de Castro Ramalho (UFLA)



Prof. Dra. Denise Maria Guimarães Freire (DBq/IQ-UFRJ)

AGRADECIMENTOS

O trabalho intitulado “Dinâmica molecular de sistemas aquosos da enzima enoil-ACP redutase de *Mycobacterium tuberculosis*” foi desenvolvido com a ajuda, direta ou indiretamente, de diversas pessoas.

Primeiramente, agradeço a Deus por ter permitido e me confortado nas horas mais difíceis e sombrias, onde muitas vezes tive dúvidas se seria capaz de finalizar esse trabalho. Além disso, com a permissão Dele, foi possível encontrar tantas pessoas maravilhosas que me auxiliaram nesses quatro anos de doutorado.

A seguir, agradeço aos meus pais, Maria do Carmo e Pedro, por serem meus pilares, exemplo de força e dedicação, onde o principal ensinamento foi ser sempre sincero e verdadeiro, primeiro comigo e com todos ao meu redor. Também tenho que agradecer a minha companheira, amiga e esposa, Gláucia, que aceitou caminhar ao meu lado, me dando suporte e apoio nas minhas ausências em função da dedicação que o curso de doutorado exige.

À minha orientadora, Profa. Dra. Magaly Girão Albuquerque, que durante esses anos foi exemplo de dedicação e profissionalismo, sempre presente para tirar dúvidas, discutir ideias e pelo incentivo que eu concorresse ao cargo de Professor substituto de Química Orgânica do Instituto de Química da UFRJ.

Ao Dr. Marcus Vinícius Nora de Souza e Prof. Dr. Carlos Kaiser, pela orientação, apoio, amizade, suporte financeiro e por terem me incentivado e me apoiado na minha mudança de área de estudo, terminando um Mestrado em transformações químicas e iniciando um Doutorado em modelagem molecular.

Ao Prof. Dr. Ricardo Bicca de Alencastro, pela sua incansável disposição em ajudar, seja pelo auxílio financeiro nos congressos científicos, disponibilização dos livros de seu acervo pessoal e correção dos trabalhos científicos.

À Profa. Dra. Marcelle de Lima Ferreira Bispo e do prof. Dr. Raoni Schroeder Borges Gonçalves, pela amizade que se iniciou durante a iniciação científica e por também terem me incentivado a entrar na área de modelagem molecular.

À Profa. Dra. Monique Araújo de Brito e do Prof. Dr. Jocley Queiroz Araújo pela contribuição no âmbito do QSAR-3D DR, principalmente, em relação às simulações de dinâmica molecular.

À Dra. Fernanda Guedes Oliveira, à Profa. Dra. Ana Paula Guimarães, *M.Sc.* Aline Alves Oliveira e ao *M.Sc.* Felipe Rodrigues de Souza, pela contribuição em relação às simulações de dinâmica molecular.

Ao Dr. Eugênio Furtado de Souza por ter me apresentado o “maravilhoso mundo da computação”, proporcionando um ambiente agradável, com discussões acaloradas e construtivas sobre manipulação de dados e montagem de *scripts*.

Aos meus amigos da Planta Piloto/Farmanguinhos, Alessandra Campbel, Cláudia Brandão, Thaís Nogueira, Laura Cardoso, Bernardo Reis, Emerson Teixeira, Silvio Duarte, Danrley Magalhães, João Batista, Liana Jasmim, Leidiane Araújo, Victor Luz, e do LabMmol, Bruno Horta, Lucas Hoeltz, Daniel Aguiar, Nadja Paraense, Edson Oliveira e Carlos Resende, pelos momentos de descontração, apoio, companheirismo e agradável convivência.

Aos meus professores da pós-graduação, por todo o conhecimento adquirido e aos componentes da banca por todas as contribuições dadas a este trabalho.

“...Mesmo com tantos motivos pra deixar tudo como está. Nem desistir, nem tentar, agora tanto faz, estamos indo de volta pra casa...”

Legião Urbana

“Senhor, conceda-me a serenidade para aceitar aquilo que não posso mudar, a coragem para mudar o que me for possível e a sabedoria para saber discernir entre as duas.”

Reinhold Niebuhr

RESUMO

LIMA, Camilo Henrique da Silva Lima, Dinâmica molecular de sistemas aquosos da enzima enoil-ACP redutase de *Mycobacterium tuberculosis*, Rio de Janeiro, Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, UFRJ, Rio de Janeiro, 2015.

Este trabalho descreve o estudo de modelagem molecular aplicado a 53 derivados éteres diarila enoil ACP-redutase do *Micobacterium tuberculosis*, uma enzima chave na síntese de ácidos micólicos. Foram realizados estudos de docagem molecular seguidos de dinâmica molecular, permitindo a identificação dos modos de ligação que cada composto adota no sítio ativo e das principais movimentações das estruturas secundárias do sítio ativo, bem como da influência da solvente. Para a identificar quais resíduos estariam relacionados à atividade biológica (variável dependente), foram construídos e avaliados modelos de QSAR-3D DR usando 39 derivados dessa série, divididos em conjuntos de treinamento (N=31) e teste (N=8), utilizando um método supervisionado. As variáveis independentes são as energias de interação estéricas (Lennard-Jones) e eletrostáticas (Coulomb), calculadas entre cada ligante, cofator e os resíduos da InhA do sítio ativo. O melhor modelo obtido foi a Eq. A05 ($R^2 = 0,57$; SSE = 0,32; RMSEE = 0,31; $\rho = 0,66$). Para a identificação de novos potenciais inibidores da enzima InhA, foi construído um mapa farmacofórico para fazer a triagem virtual a partir do banco de dados ZINCPharmer, que contém milhares de compostos, dos quais 100 foram submetidos ao método de docagem molecular para identificação das poses. Desse total, dois foram selecionados para os estudos de dinâmica molecular, uma chalconas (ZINC19) e uma 1,5-benzodioxepina (ZINC51). O estudo de dinâmica molecular mostrou que o composto ZINC51 apresenta manutenção da estrutura secundária de AH-6, sendo que a conformação do sítio ativo encontra-se fechada. De fato, a predição da atividade biológica, utilizando o modelo A05, gerou bom resultado para ZINC51, indicando que ele seria um bom candidato para inibir a InhA.

Palavras-chave: Dinâmica molecular, Docagem molecular, QSAR-3D, Tuberculose, Triagem Virtual

ABSTRACT

LIMA, Camilo Henrique da Silva Lima, Dinâmica molecular de sistemas aquosos da enzima enoil-ACP redutase de *Mycobacterium tuberculosis*, Rio de Janeiro, Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, UFRJ, Rio de Janeiro, 2015.

This paper describes the study of molecular modeling applied to 53 diaryl ether derivatives which have biological activity against enoyl ACP-reductase enzyme from *Mycobacterium tuberculosis*, a key enzyme in the mycolic acids synthesis. Firstly, molecular docking and molecular dynamics were conducted to identify the poses that each compound performs the binding site and the movements of secondary structures that form the binding site as well as the influence of the solvent, as function of time, respectively.

To identify which residue would be related to biological activity, we constructed and evaluated 3D-QSAR models of a series of 39 inhibitors divided in training set ($n = 31$) and test set ($N = 8$) using a supervised method. The equations were constructed using the Wolf program, and the steric (Lennard-Jones) and electrostatic (Coulomb) interaction energy were calculated between each ligand, cofactor and residues that comprise the InhA binding site, used as independent variables, the best model was Eq. A05 ($R^2 = 0.57$; $SSE = 0.32$; $RMSEE = 0.31$; $\rho = 0.66$).

To identify new inhibitors of InhA enzyme, it was performed the pharmacophore map construction to discovery new inhibitors that interact with the residues identified in the 3D-QSAR study. From the ZINCPharmer database, which contains thousands of compounds, it selected 100 candidates who were subjected to the molecular docking method to identify their poses. After that, two compounds were selected for the molecular dynamics study, belonging the chalcones (ZINC19) and 1,5-benzodioxepine (ZINC51) classes. This study showed that the ZINC51 has maintaining the secondary structure of HA-6, and the conformation of the active site is closed. Indeed, the prediction of biological activity using the A05 model generated good results for ZINC51, indicating that it would be a good candidate to inhibit the InhA enzyme.

Keywords: Molecular Dynamics, Molecular Docking, 3D-QSAR, Tuberculosis, Virtual Screening

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** (a) Micrografia eletrônica de varredura de bacilos *Mycobacterium tuberculosis* (CDC/JANICE HANEY CARR, [s.d.]) e (b) fotogravura de Robert Koch (1843-1910) [ca. 1900] (FECHNER, 1900). 19
- Figura 2.** Estimativa de incidência de novos casos de TB a cada 100 mil habitantes por país em 2014 (Adaptado de WHO, 2015). 19
- Figura 3.** Estruturas químicas dos cinco fármacos de primeira linha usados contra a tuberculose: isoniazida (H), pirazinamida (Z), etambutol (E), rifampicina (R) e estreptomicina (S) (LIMA, 2011). 21
- Figura 4.** Alguns fármacos de segunda linha utilizados no tratamento de MDR/XDR-TB. 23
- Figura 5.** Estrutura dos fármacos bedaquilina e delamanida aprovados recentemente para o combate da TB. 24
- Figura 6.** Representação da biossíntese dos ácidos micólicos. A seta interrompida indica a existência de reações bioquímicas intermediárias não representadas no esquema. (CANTALOUBE et al., 2011; SLAMA et al., 2011). 26
- Figura 7.** Provável mecanismo de ação da isoniazida. Adaptado de HEATH, WHITE, ROCK, (2001). 27
- Figura 8.** Estruturas químicas de alguns inibidores da enzima InhA (enoil-ACP redutase do *Mycobacterium tuberculosis*) (PAN, TONGE, 2012). 28
- Figura 9.** Principais modificações estruturais descritas na literatura no planejamento de análogos do aduto INH-NAD (BONNAC et al., 2007; DELAINE et al., 2010). 29
- Figura 10.** Exemplos de compostos das classes dos diazoboranos (DBN1) e éteres diarila (TCN, triclosano; 8PP) e respectivos valores de CIM nos ensaios biológicos anti-MBT (PAN, TONGE, 2012). 30
- Figura 11.** Exemplo de uma equação usada para aproximar a força atômica que governa o movimento. A força não-ligada compreende a interação estérica (van der Waals) e eletrostática (Coulomb), calculadas pelo potencial de Lennard-Jones e lei de Coulomb, respectivamente (Figura adaptada de DURRANT, MCCAMMON, 2011). 34
- Figura 12.** Esquema geral do desenvolvimento de um modelo de QSAR (Adaptado de MYINT, XIE, 2011). 36
- Figura 13.** Número de publicações contendo as palavras-chave “*Virtual Screening*” e “*Pharmacophore*” entre 2010-2015 (Total = 1703). 38
- Figura 14.** Estruturas 2D do cofator (NAI), substrato mimético (THT) e dos inibidores éteres diarilas que estão co-cristalizados com a enzima InhA e disponíveis no PDB. 46
- Figura 15.** Representação 3D da estrutura da InhA (enoil-ACP redutase do *Mycobacterium tuberculosis*) ligada ao cofator (NADH; laranja) e ao substrato mimético (THT, azul) (PDB ID: 1BVR), e uma visão próxima do sítio de ligação, mostrando as estruturas secundárias dos domínios. 58
- Figura 16.** (A) Sobreposição das estruturas 3D dos complexos 2AQ8 (vermelho) e 1BVR (azul). (B) Gráfico do fator de temperatura (fator-B) para 2AQ8 (vermelho) e 1BVR (azul). As caixas retangulares destacam as regiões dos C_α dos aminoácidos que compõem o sítio de ligação do substrato. 59

- Figura 17.** Sobreposição das estruturas 3D dos complexos 2B36, 2X23, 4OIM, 4OXY e 2B37 (A) e seus respectivos gráficos do fator de temperatura (fator-B normalizado) (B). As caixas retangulares destacam os C_α dos aminoácidos que compõem o sítio de ligação do substrato. 60
- Figura 18.** Sobreposição das estruturas 3D dos complexos 3FNH, 2FNE, EFNF, 3FNG e 2B35(A) e seus respectivos gráficos do fator de temperatura (fator-B normalizado) (B). As caixas retangulares destacam os C_α dos aminoácidos que compõem o sítio de ligação do substrato. 61
- Figura 19.** Sobreposição da melhor pose para os derivados TCU, 8PC e JUS obtidos na redocagem (verde) e das poses cristalográficas no sítio de ligação (cinza) da holoenzima dos complexos 2X23, 3FNE e 4OIM e as principais interações entre a holoenzima (InhA-NADH) e os compostos TCU, 8PC e JUS, respectivamente. 63
- Figura 20.** Representação 3D do sítio de ligação e da cavidade onde foi realizada a docagem molecular. 65
- Figura 21.** Sobreposição das cinco soluções obtidas por docagem molecular para cada composto: ATV04 (A); ATV06 (B); ATV07 (C). 65
- Figura 22.** Modo de ligação dos EDA. (A) Compostos sem substituintes no anel B, monossobstituídos, dissobstituídos e heteroaromáticos; (B) ATV44; (C) ATV19 (Moldock); (D) ATV19 (Rerank). 67
- Figura 23.** Gráfico de RMSD para os complexos 2AQ8 e 1BVR com suas respectivas representações do *cluster* mais populoso para os 5ns finais de simulação. 69
- Figura 24.** Gráfico da variação do fator-B experimental e calculado para o complexo 2AQ8. 70
- Figura 25.** Gráfico da variação do fator-B experimental e calculado para o complexo 1BVR. 70
- Figura 26.** Gráfico da diferença de variação do fator-B calculado para o complexo 2AQ8 e 1BVR. Os retângulos mostram as regiões que compõem o sítio de ligação. 71
- Figura 27.** Gráfico do RMSD espacial para os 5ns finais de simulação dos complexos (A) 2AQ8 e (B) 1BVR. Vermelho = hélice- α ; ciano = folhas- β ; cinza = alça. 72
- Figura 28.** Representação das estruturas médias para os *clusters* mais populosos dos complexos 2AQ8 (A) e 1BVR (B), destacando a tríade catalítica e as moléculas de água numa visão frontal (C) e após um giro de 180° (D). 73
- Figura 29.** Representação gráfica da mobilidade dos resíduos Phe149 e Tyr158 considerando os diedros φ , ψ , χ_1 e χ_2 nos complexos 2AQ8 (verde) e 1BVR (laranja). 75
- Figura 30.** (A) Gráfico de RMSD para o complexo 2X23 (holoenzima-ATV05) durante os 30ns de simulação. (B) Estrutura média do *cluster* mais populoso do complexo 2X23 durante os 5ns finais. (C) Representação do RMSD espacial do complexo 2X23. 77
- Figura 31.** Gráfico da diferença de variação do fator-B calculado para os complexos 2AQ8 e 2X23. 77
- Figura 32.** Representação da estrutura média para o *cluster* mais populoso do complexo InhA-NADH-ATV05 (2X23), destacando a tríade catalítica e as moléculas de água, numa visão frontal (esquerda) e após um giro de 90° (direita). 78

Figura 33. Comparação da mobilidade dos resíduos Phe149 e Tyr158 referente aos diedros φ , ψ , χ_1 e χ_2 para os complexos 2AQ8 (verde) e InhA-NADH-ATV05 (laranja).	79
Figura 34. Representação da estrutura média para o <i>cluster</i> mais populoso dos complexos holoenzima-inibidor (ATV06, ATV04 e ATV03), com suas respectivas distâncias (d, Å) do portão (LLP-4/AH-6) e da tampa (MLP-4/LP-6).	80
Figura 35. Gráfico da diferença de variação do fator-B calculado para entre os complexos 2AQ8 e holoenzima-inibidor (ATV06, ATV04 e ATV03). Os retângulos mostram as regiões que compõem o sítio de ligação.	81
Figura 36. Representação das interações por ligação hidrogênio mediadas por água entre o inibidor e a enzima no complexo holoenzima-ATV06.	82
Figura 37. Representação das interações por ligação hidrogênio mediadas por água entre o inibidor e a enzima no complexo holoenzima-ATV04.	83
Figura 38. Representação das interações por ligação hidrogênio mediadas por água entre o inibidor e a enzima no complexo holoenzima-ATV03.	83
Figura 39. Comparação da mobilidade dos resíduos Phe149 e Tyr158 referente aos diedros φ , ψ , χ_1 e χ_2 para os complexos 2AQ8 e holoenzima-inibidor (ATV06, vermelho); ATV04, verde e ATV03, azul).	85
Figura 40. Representação da estrutura média para o <i>cluster</i> mais populoso dos complexos holoenzima-inibidor (ATV33, ATV47 e ATV30) com suas respectivas distâncias (d, Å) entre o portão (LLP-4/AH-6) e da tampa (MLP-4/LP-6).	86
Figura 41. Gráfico da diferença de variação do fator-B calculado entre os complexos 2AQ8 e holoenzima-inibidor (ATV33, ATV47 e ATV30). Os retângulos mostram as regiões que compõem o sítio de ligação.	87
Figura 42. Representação das interações por ligação hidrogênio mediados por água nos complexos (A) InhA-NADH-ATV33 e (B) InhA-NADH-ATV30.	88
Figura 43. Comparação da mobilidade dos resíduos Phe149 e Tyr158 referente aos diedros φ , ψ , χ_1 e χ_2 para os complexos 2AQ8 (verde) e holoenzima ligado ao ATV33 (A, vermelho), ATV47 (B, laranja) e ATV30 (C, amarelo).	89
Figura 44. Representação da estrutura média para o <i>cluster</i> mais populoso dos complexos holoenzima ligado aos compostos ATV23 e ATV17, com suas respectivas distâncias (d, Å) do portão (LLP-4/AH-6) e da tampa (MLP-4/LP-6).	90
Figura 45. Gráfico da diferença de variação do fator-B calculado entre os complexos 2AQ8 e holoenzima ligada à ATV23 e ATV17. Os retângulos mostram as regiões que compõem o sítio de ligação.	91
Figura 46. Representação das interações por ligação hidrogênio mediadas por água entre o inibidor e a enzima no complexo InhA-NADH-ATV17.	92
Figura 47. Comparação da mobilidade dos resíduos Phe149 e Tyr158 referente aos diedros φ , ψ , χ_1 e χ_2 para os complexos 2AQ8 (verde) e holoenzima ligado ao ATV23 (A, vermelho) e ATV17 (B, azul).	93
Figura 48. Representação da estrutura média para o <i>cluster</i> mais populoso dos complexos holoenzima ligado aos compostos ATV26 e ATV27, com suas respectivas distâncias (d, Å) do portão (LLP-4/AH-6) e da tampa (MLP-4/LP-6).	93
Figura 49. Gráfico da diferença de variação do fator-B calculado entre os complexos 2AQ8 e holoenzima ligada à ATV27 e ATV26. Os retângulos mostram as regiões que compõem o sítio de ligação.	94
Figura 50. Representação das interações por ligação hidrogênio mediadas por moléculas de água nos (A) complexos holoenzima-ATV26 e (B) holoenzima-ATV27.	95

- Figura 51.** Comparação da mobilidade dos resíduos Phe149 e Tyr158 referente aos diedros φ , ψ , χ_1 e χ_2 para os complexos 2AQ8 (verde), holoenzima-ATV27 (A, vermelho) e holoenzima-ATV26 (B, azul). 96
- Figura 52.** Gráfico da distribuição dos valores de atividade biológica (pK_i , M) dos compostos dos conjuntos treinamento (N=31) e teste (N=8) obtidos pelo método Kennard-Stone com cortes de variância de 0,001 (BDA) e 0,005 (BDB). 102
- Figura 53.** Gráfico da distribuição dos valores de atividade biológica (pK_i , M) dos conjuntos treinamento (N=31) e teste (N=8) obtidos pelo método Kennard-Stone com cortes de variância de 0,01 (BDC) e 0,05 (BDD). 103
- Figura 54.** Energias de interação médias dos resíduos selecionados da Eq. A02 para o conjunto treinamento e as energias de interação ponderadas. O gráfico foi truncado em -4,0KJ/mol. O valor de energia média referente aos termos Phe149LJ, Ile202LJ e Met155 é de -12,42, -10,34 e -9,16 KJ/mol, respectivamente. 107
- Figura 55.** Representação dos resíduos selecionados na Eq. A02 para ATV06 (A; mais ativo) e ATV21 (B; menos ativo). Verde = interação por Coulomb; Vermelho = interação por Lennard-Jones e Laranja = somatório das interações. (C) Gráfico das energias de interação ponderadas para a holoenzima-ATV06 e holoenzima-ATV21. 108
- Figura 56.** Energias de interação médias dos resíduos selecionados na Eq. A03 para o conjunto treinamento e as energias de interação ponderadas. O gráfico foi truncado em -4,0KJ/mol. O valor de energia média referente aos termos Phe149LJ, Met155LJ e Ala198LJ é de -12,42, -8,63 e -9,08 KJ/mol, respectivamente. 109
- Figura 57.** Energias de interação médias entre os resíduos selecionados da Eq. A05 para o conjunto treinamento e as energias de interações ponderadas. O gráfico foi truncado em -4,0KJ/mol. O valor de energia média referente aos termos Lys165 e Ile202 é de -7,80 e -9,47 KJ/mol, respectivamente. 110
- Figura 58.** Representação dos resíduos selecionados na Eq. A05 para ATV06 (A; mais ativo) e ATV21 (B; menos ativo). Verde = interação por Coulomb; Vermelho = interação por Lennard-Jones e Laranja = somatório das interações. (C) Gráfico das energias de interação ponderadas para a holoenzima-ATV06 e holoenzima-ATV21. 112
- Figura 59.** Gráfico dos valores de pK_i experimentais *versus* os valores de pK_i calculados para o grupo de treinamento e de teste, utilizando a Eq. A02. 114
- Figura 60.** Gráfico dos valores de pK_i experimentais *versus* os valores de pK_i calculados para o grupo de treinamento e de teste, utilizando a Eq. A05. 115
- Figura 61.** Estruturas químicas, valores de pK_i experimentais, preditos e valores residuais dos compostos ATV33 e ATV34. 116
- Figura 62.** Gráfico das energias de interação ponderadas para a holoenzima-ATV33, holoenzima-ATV34 e para o conjunto treinamento. 117
- Figura 63.** Estrutura química de ATV19 e os modos de ligação obtidos por DM com seus respectivos valores de pK_i calculados e os resíduos entre parênteses. 118
- Figura 64.** Mapa farmacofórico destacando os resíduos selecionados pela Eq. A05 e as características principais desejáveis para os candidatos a inibidores da enzima InhA. 119
- Figura 65.** Estruturas químicas dos compostos ZINC 00525651 (ZINC51), ZINC 04026219 (ZINC19), ZINC 91102429 (ZINC29) e ZINC16597733 (ZINC33) selecionados por triagem virtual. 120

Figura 66. Destaque dos fragmentos que estão associados à efeitos carcinogênicos (ZINC51, ZINC33 e ZINC29) e reprodutivos (ZINC19).	121
Figura 67. Derivados aril-amidas descritos na literatura com suas respectivas atividades antimicobacterianas e o pH do teste <i>in vitro</i> .	122
Figura 68. Produtos da hidrólise grupo aril-amida e os seus respectivos mecanismos de ação.	123
Figura 69. Derivados chalconas descritos na literatura com suas respectivas atividades biológicas frente a proteína tirosina fosfatase do MTB (MtbPtpA) e humana (HumPtpA humana).	124
Figura 70. Grupo 1,5-benzodioxepina e alguns compostos com propriedades olfativas, isoflavonóide e com atividade anti-HIV.	125
Figura 71. Gráfico de RMSD para os complexos holoenzima-ZINC19 durante 30ns de simulação de DM.	126
Figura 72. Gráfico da diferença de variação do fator-B calculado para o complexo 2AQ8 e holoenzima-ZINC19. Os retângulos mostram as regiões que compõem o sítio de ligação.	127
Figura 73. Comparação das estruturas obtidas pelo (A) estudo de docagem molecular e (B) a estrutura média do <i>cluster</i> mais populoso obtido nos 5ns finais de simulação e a distância dos domínios LLP-4/AH-6 e MLP-4/LP-6.	127
Figura 74. Representação da estrutura média para o <i>cluster</i> mais populoso do complexo holoenzima-ZINC19, destacando as moléculas de água presentes no interior do sítio de ligação.	128
Figura 75. Representação gráfica da mobilidade dos resíduos Phe149 e Tyr158 referente aos diedros φ , ψ , χ_1 e χ_2 para holoenzima (verde) e holoenzima-ZINC19 (laranja).	129
Figura 76. Gráfico de RMSD para os complexos holoenzima-ZINC51 durante 40ns de simulação de DM.	130
Figura 77. Comparação das estruturas obtidas pelo (A) estudo de docagem molecular e (B) a estrutura média do <i>cluster</i> mais populoso obtido nos 5ns finais de simulação e a distância dos domínios LLP-4/AH-6 e MLP-4/LP-6.	131
Figura 78. Representação do sítio de ligação mostrando as moléculas de água dentro (A) e fora (B) da cavidade.	132
Figura 79. Gráfico da diferença de variação do fator-B calculado para entre os complexos 2AQ8 e holoenzima ligada à ZINC51. Os retângulos mostram as regiões que compõem o sítio de ligação.	133
Figura 80. Representação gráfica da mobilidade dos resíduos Phe149 e Tyr158 referente aos diedros φ , ψ , χ_1 e χ_2 para holoenzima (verde) e holoenzima-ZINC51 (laranja).	134
Figura 81. Representação 3D das principais interações no complexo holoenzima-ZINC19.	135
Figura 82. Representação 3D das principais interações no complexo holoenzima-ZINC51.	136
Figura 83. Energias de interação dos resíduos selecionados da Eq. A05 para os compostos ZINC19 e ZINC51 e as energias de interações ponderadas. O gráfico foi truncado em -4,0KJ/mol. O valor de energia para ZINC19 referente ao termo Ile202 é de -16,22 KJ/mol e para ZINC51 referentes aos termos Lys165 e Ile202 é de -14,49 e -13,97 KJ/mol, respectivamente.	138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade antimicobacteriana dos fármacos de primeira linha e algumas características (crescimento, localização e o pH do meio) do bacilo (Adaptado de ARBEX et al., 2010a; LIMA, BISPO, SOUZA, 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).	22
Tabela 2. Estruturas químicas e valores de atividade biológica (pK_i) dos éteres diarila selecionados da literatura e de acordo com as modificações nos anéis A e B.	41
Tabela 3. Códigos das estruturas 3D disponíveis no <i>Protein Data Bank</i> , da InhA na forma livre (Apo) ou co-cristalizada com ligantes, resolução e mutações.	57
Tabela 4. Códigos PDB dos ligantes e valores de pK_i (M) utilizados na redocagem, valores de RMSD (Å), número de ligações rotacionáveis (nLRot) dos ligantes, energia de interação ligante-cofator ($E_{Lig-NADH}$), ligante-enzima ($E_{Lig-InhA}$) e ligante-resíduos ($E_{lig-res}$) > 5,0Kcal/mol.	62
Tabela 5. Valores das pontuações MolDock e Rerank (Kcal/mol) obtidos para as cinco soluções para cada um dos compostos ATV04, ATV06 e ATV07.	66
Tabela 6. Interações por ligação hidrogênio e contatos hidrofóbicos entre os inibidores e a holoenzima.	98
Tabela 7. Melhor equação para cada banco de dados (BDB-A01 a BDB-A05) com o número total de variáveis independentes, número de termos selecionados, coeficiente de determinação (R^2), erro padrão da estimativa (SEE), raiz do desvio médio quadrático da estimativa (RMSEE) e a correlação de Spearman (ρ).	104
Tabela 8. Melhores equações selecionadas para BDB-A02 e BDB-A04	105
Tabela 9. Tabela da matriz de correlação cruzada dos descritores das Eq. A02 e A04.	106
Tabela 10. Tabela da matriz de correlação cruzada dos descritores da Eq. A03.	110
Tabela 11. Valores da atividade biológica experimental (Exp), predita (Pred) e os resíduos ($pK_{iExp} - pK_{iPred}$) dos compostos da classe das EDA, utilizando a Eq. A02. Os compostos do conjunto teste estão sublinhados.	113
Tabela 12. Valores da atividade biológica experimental (Exp), predita (Pred) e os resíduos ($pK_{iExp} - pK_{iPred}$) dos compostos da classe das EDA, utilizando a Eq. A05. Os compostos do conjunto teste estão sublinhados.	114
Tabela 13. Compostos selecionados após a triagem virtual e docagem molecular.	121
Tabela 14. Interações por ligação hidrogênio e contatos hidrofóbicos entre a holoenzima e os compostos ZINC19 e ZINC51.	135
Tabela 15. Valores de pK_i (M) preditos para os compostos ZINC19 e ZINC51 de acordo com a Eq.A05.	137

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDTS	Centro de Tecnologia e Desenvolvimento para a Saúde
CIM	concentração inibitória mínima
DprE1	decaprenilfosforil-D-ribose oxidase
E	Etambutol
EDA	éteres diarila
EmbC	Arabinosiltransferase
ETH	etionamida
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
H	Isoniazida
HTS	<i>high-throughput screening</i>
IC₅₀	concentração capaz de inibir 50% da atividade da enzima
InhA	enoil-ACP-redutase
KatG	catalase-peroxidase
MDR-TB	<i>multidrug-resistant tuberculosis</i> ou bacilos multirresistentes
ODM	objetivos de desenvolvimento do milénio
OPC-67683	Delamanida
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PLP	potencial linear composto
PTH	protionamida
QSAR	relação quantitativa estrutura-atividade
R	rifampicina
R²	coeficiente de Pearson
RMN	ressonância magnética nuclear
S	Estreptomina
SITE-TB	Sistema de Informação de Tratamentos Especiais de Tuberculose
TB	tuberculose
TB Alliance	Aliança global para o desenvolvimento de fármacos
TMC-207 ou B	Bedaquilina
WHO	<i>World Health Organization</i> ou Organização Mundial de saúde
XDR-TB	<i>extensively drug-resistant tuberculosis</i> ou bacilos altamente ou extremamente resistentes
Z	pirazinamida

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. TUBERCULOSE	19
1.2. TRATAMENTO	20
1.3. RESISTÊNCIA DO BACILO: MDR-TB & XDR-TB	22
1.4. NOVOS HORIZONTES NO DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS	24
1.5. BIOSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS: ENZIMAS ALVOS DE NOVOS FÁRMACOS	25
1.6. INIBIDORES DA ENZIMA INHA	27
1.7. MODELAGEM MOLECULAR NO PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS	30
1.8. DOCAGEM MOLECULAR	31
1.9. SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR	33
1.10. QSAR: CONSIDERAÇÕES GERAIS	34
1.11. TRIAGEM VIRTUAL	37
1.12. MAPA FARMACOFÓRICO	37
2. OBJETIVOS	39
3. MÉTODOS	40
3.1. SELEÇÃO DOS COMPOSTOS E DADOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA.	40
3.2. OBTENÇÃO DAS ESTRUTURAS CRISTALOGRAFICAS DA INHA	44
3.3. OBTENÇÃO E PREPARO DOS LIGANTES	44
3.4. DOCAGEM MOLECULAR	47
3.5. DINÂMICA MOLECULAR (DM)	48
3.6. ANÁLISE DAS SIMULAÇÕES POR DINÂMICA MOLECULAR	49
3.7. MAPA FARMACOFÓRICO, TRIAGEM VIRTUAL E PROPRIEDADES ADME/TOX	50
3.8. QSAR-3D RD: CONJUNTOS DE TREINAMENTO E TESTE	51
3.9. CONSTRUÇÃO DOS MOLDELOS DE QSAR-3D	51
3.10. SELEÇÃO DAS MELHORES EQUAÇÕES	52
3.11. ANÁLISE DA CORRELAÇÃO ENTRE OS DESCRITORES	52
3.12. VALIDAÇÃO EXTERNA DOS MODELOS DE QSAR-3D RD	53
3.13. ANÁLISE DOS <i>OUTLIERS</i> E DO DOMÍNIO DE APLICAÇÃO	53
3.14. CAPACIDADE PREDITIVA DO MODELO	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
4.1. DADOS BIOLÓGICOS	55
4.2. ANÁLISE DAS ESTRUTURAS CO-CRISTALIZADAS COM HOLOENZIMA (INHA-NADH)	56
4.3. DOCAGEM MOLECULAR	61

4.3.1.	VALIDAÇÃO DO PROTOCOLO DE DOCAGEM (REDOCAGEM)	61
4.3.2.	DOCAGEM MOLECULAR DOS DERIVADOS ÉTERES DIARILAS	64
4.4.	ESTUDOS POR DM	67
4.4.1.	ANÁLISE COMPARATIVA DA HOLOENZIMA (2AQ8) E DA HOLOENZIMA-SUBSTRATO (1BVR)	67
4.4.2.	ANÁLISE DAS MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS DAS SIMULAÇÕES DE DM PARA HOLOENZIMA-INIBIDORES	76
4.4.3.	ANÁLISE DAS INTERAÇÕES POR LIGAÇÃO HIDROGÊNIO E CONTATOS HIDROFÓBICOS ENTRE A HOLOENZIMA E OS INIBIDORES	97
4.5.	INTERAÇÕES ESTÉRICAS E ELETROSTÁTICAS DOS COMPLEXOS HOLOENZIMA-INIBIDORES – QSAR-3D DR	101
4.5.1.	SELEÇÃO DOS COMPOSTOS PARA OS CONJUNTOS TREINAMENTO E TESTE	101
4.5.2.	AVALIAÇÃO DOS BANCOS DE DADOS	103
4.5.3.	ANÁLISE DAS EQUAÇÕES DE QSAR-3D	104
4.5.4.	ANALISE DA EQUAÇÃO BDB-A02 e BDB-A04	105
4.5.5.	ANÁLISE DA EQUAÇÃO BDB-A03	109
4.5.6.	ANÁLISE DA EQUAÇÃO BDB-A05	110
4.5.7.	ANÁLISE DOS RESÍDUOS DAS EQUAÇÕES BDB-02 E BDB-05	112
4.5.8.	ANÁLISE DOS <i>OUTLIERS</i> E DO DOMÍNIO DE APLICAÇÃO DA EQUAÇÃO BDB-05	116
4.5.9.	CAPACIDADE DE PREDIÇÃO DA EQ.A05	117
4.5.10.	PREDIÇÃO ATIVIDADE BIOLÓGICA DO COMPOSTO ATV19	118
4.6.	PROPOSTA DE NOVOS CANDIDATOS A INIBIDOR DA INHA	119
4.6.1.	TRIAGEM VIRTUAL	119
4.6.2.	SELEÇÃO DOS COMPOSTOS OBTIDOS POR TRIAGEM VIRTUAL PARA ESTUDOS DE DINÂMICA MOLECULAR	121
4.6.3.	ANÁLISE POR DM ZINC19	126
4.6.4.	ANÁLISE POR DM ZINC51	129
4.6.5.	ANÁLISE DAS INTERAÇÕES POR LIGAÇÃO HIDROGÊNIO E CONTATOS HIDROFÓBICOS DOS COMPLEXOS HOLOENZIMA-ZINC19 E HOLOENZIMA-ZINC51	135
4.6.6.	PREDIÇÃO DA POTENCIA BIOLÓGICA DOS COMPOSTOS ZINC19 E ZINC51	137
5.	CONCLUSÕES	139
6.	PERSPECTIVAS	142
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	143

1. INTRODUÇÃO

1.1. TUBERCULOSE

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa que assola a humanidade desde tempos remotos, mas somente em 1882 foi identificado por Robert Koch o agente etiológico da TB como sendo o *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) (**Figura 1**).

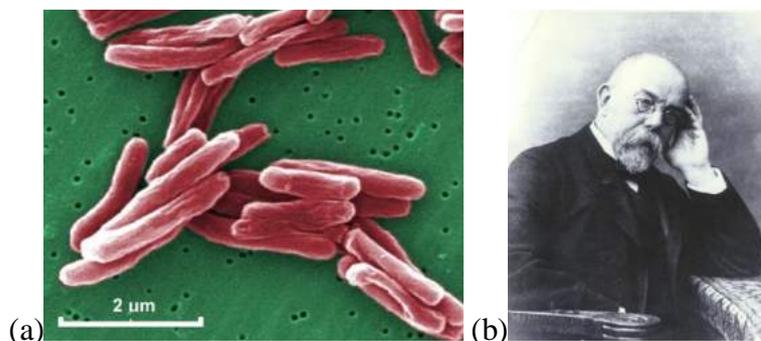


Figura 1. (a) Micrografia eletrônica de varredura de bacilos *Mycobacterium tuberculosis* (CDC/JANICE HANEY CARR, [s.d.]) e (b) fotogravura de Robert Koch (1843-1910) [ca. 1900] (FECHNER, 1900).

Mesmo 130 anos após a descoberta do agente etiológico, a TB continua assolando a humanidade. Em 2014, estima-se que 9,6 milhões de pessoas tenham contraído TB no mundo, afetando homens (5,4 milhões), mulheres (3,2 milhões) e crianças (1,0 milhão), com 1,5 milhão de óbitos (WHO, 2015) (**Figura 2**).

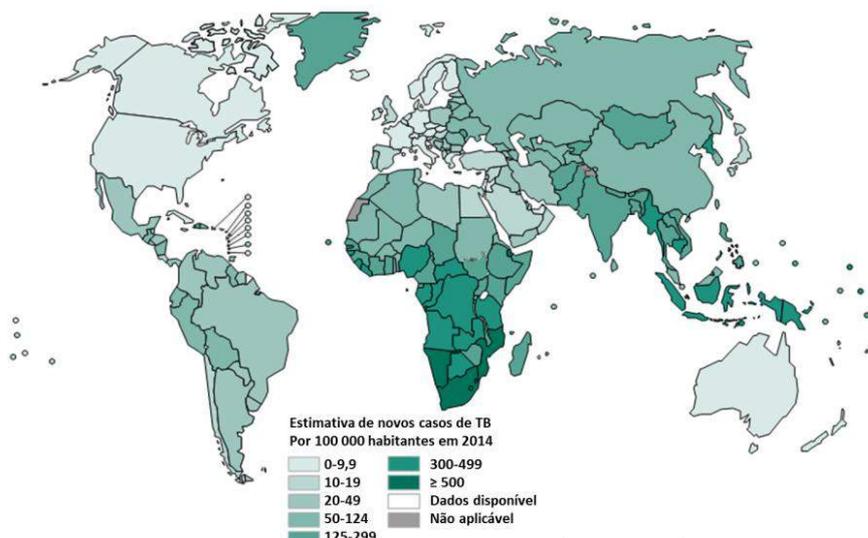


Figura 2. Estimativa de incidência de novos casos de TB a cada 100 mil habitantes por país em 2014 (Adaptado de WHO, 2015).

Apesar dos números alarmantes desde 1990, a mortalidade por TB caiu 47,0%, principalmente a partir de 2000, quando a Organização Mundial de Saúde, (OMS) (*World Health Organization*, WHO) lançou o programa “Objetivos de Desenvolvimento do Milênio” (ODM), cujos objetivos incluem: redução da fome, condições aceitáveis de trabalho, igualdade de gêneros, redução da mortalidade infantil e combate de doenças globais como AIDS, malária e TB (DUNN et al., 2015; DYE et al., 2015).

No caso da TB, os novos desafios no combate dessa doença estão relacionados ao tratamento de pacientes co-infectados com HIV e na prevenção e tratamento de pacientes infectados com bacilos multirresistentes (*multidrug-resistant tuberculosis*, MDR-TB) e bacilos altamente ou extremamente resistentes (*extensively drug-resistant tuberculosis*, XDR-TB).

Segundo dados da OMS, (WHO, 2015), de 1,5 milhão de mortes por TB, 26% ocorreram em pacientes HIV-positivos e 12,7% em pacientes com MDR-TB. Na infecção por bacilos XDR-TB, em 2014, 105 países reportaram ao menos um caso, sendo que 9,7% dos pacientes com MDR possuem bacilos XDR.

No Brasil, o quadro da TB é preocupante, uma vez que o país faz parte dos 22 países que concentram 80% de todos os casos registrados de TB no mundo, ocupando a 14ª posição. Em 2014, aproximadamente 110 mil casos foram registrados, isso equivale a 52 novos casos registrados a cada 100 mil habitantes, e desse total, mais 7,7 mil pacientes foram a óbito, sendo que aproximadamente 31% apresentavam co-infecção com HIV. Em relação aos pacientes portadores de bacilos resistentes (MDR/XDR-TB), a adoção do Sistema de Informação de Tratamentos Especiais de Tuberculose (SITE-TB), implementada em 229 unidades de referência secundárias e terciárias, permitiu a identificação em 2014 de 374 casos de MDR-TB e 56 casos de XDR-TB (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

1.2. TRATAMENTO

O tratamento padrão preconizado pela OMS (WHO, 2015) consiste na associação adequada de medicamentos, doses corretas e uso por tempo suficiente com a finalidade de evitar a persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistência aos fármacos, assegurando, assim, a cura do paciente.

Os cinco fármacos de primeira linha de qualquer esquema terapêutico no combate ao MTB são isoniazida (H ou INH), rifampicina (R), pirazinamida (Z), estreptomicina (S) e

etambutol (E) (ARBEX et al., 2010a; LIMA, BISPO, SOUZA, 2011; LIMA, 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011) (**Figura 3**). Esses fármacos atendem aos três grandes objetivos, considerando comportamento metabólico, localização do bacilo e esquema terapêutico: (1) capacidade de matar o maior número de bacilos, diminuindo a infectividade no início do tratamento, em geral, após duas ou três semanas de tratamento (H, S e R) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011, 2015); (2) prevenção à emergência de resistência por seleção natural de bacilos mutantes devido ao uso simultâneo de diferentes fármacos por um determinado período de tempo; (3) atividade esterilizante que é a capacidade de eliminar virtualmente todos os bacilos de uma lesão (ARBEX et al., 2010a; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011) (**Tabela 1**).

Entre os fármacos de primeira linha, H e R apresentam maior poder bactericida, sendo ativos contra todos os bacilos sensíveis situados em regiões intracavitárias (pulmões), granulomatosas (lesões caseosas) e intracelulares (interior de macrófagos), sendo que R apresenta o maior poder esterilizante. A atividade de Z é dependente do pH do meio no qual o bacilo se encontra, atuando, principalmente, no interior de macrófagos e granulomas, enquanto S é bactericida apenas contra bacilos de crescimento rápido, atuando nos pulmões. Por fim, E tem um papel fundamental na prevenção da emergência de bacilos resistentes, devido ao seu poder bacteriostático (ARBEX et al., 2010a; LIMA, BISPO, SOUZA, 2011; LIMA, 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

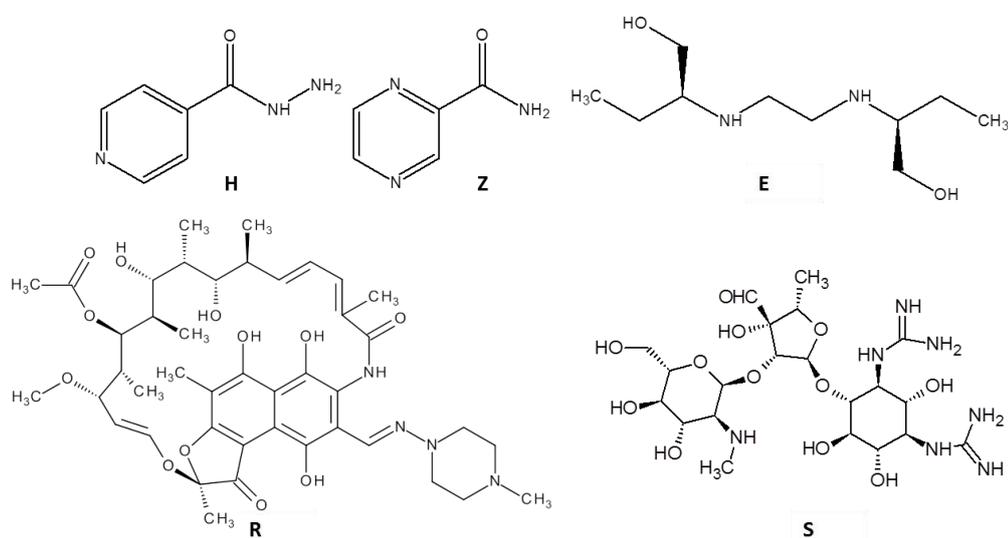


Figura 3. Estruturas químicas dos cinco fármacos de primeira linha usados contra a tuberculose: isoniazida (H), pirazinamida (Z), etambutol (E), rifampicina (R) e estreptomicina (S) (LIMA, 2011).

Tabela 1. Atividade antimicobacteriana dos fármacos de primeira linha e algumas características (crescimento, localização e o pH do meio) do bacilo (Adaptado de ARBEX et al., 2010a; LIMA, BISPO, SOUZA, 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Fármaco ^a (CIM ^b)	Bacilo		
	Crescimento	Localização	pH ^c
H (0,2) e R (40) Z (50 ^d) S (4)	Lento, intermitente ou geométrico	Macrófagos, lesão caseosa ou cavidade pulmonar	Ácido ou neutro
E (2)	Lento ou geométrico	Macrófagos e lesão caseosa Cavidade pulmonar	Ácido Neutro
		Macrófagos ou cavidade pulmonar	Ácido ou neutro

^a H = Isoniazida, R = Rifampicina, Z = Pirazinamida, S = Estreptomicina, E = Etambutol.

^b CIM = concentração inibitória mínima frente ao MTB (H37Rv) expressa em µg/mL. ^c pH do local de crescimento do bacilo. ^d pH do meio de cultura igual a 5,5.

No Brasil, o Ministério da Saúde, pelo Programa Nacional de Controle da Tuberculose, padronizou o esquema de tratamento indicado para casos novos de TB pulmonar e extrapulmonar, assim como para todos os casos de recidiva e de retorno após abandono, utilizando os fármacos R, H, Z e E, em um único comprimido, com doses fixas por dois meses e, em seguida, com os fármacos R e H por quatro meses de tratamento (esquema 2RHZE/4RH).

A utilização de fármacos combinados em um único comprimido aumenta a adesão do paciente, uma vez que diminui o número de comprimidos a serem ingeridos, garantindo a utilização da dose diária desses fármacos, diminuindo possíveis erros de prescrição (BLOMBERG et al., 2001; GEMAL et al., 2013; PARK, KWON, 2014). Entretanto, a sua eficácia é controversa, uma vez que seu uso não impede o abandono nem o uso irregular da medicação. Além disso, a associação de vários fármacos pode alterar a biodisponibilidade individual, por exemplo, há diminuição em 30% da biodisponibilidade de R devido a interações com H em condições ácidas no estômago (ALBANNA et al., 2013; MILÁN-SEGOVIA et al., 2010).

1.3. RESISTÊNCIA DO BACILO: MDR-TB & XDR-TB

Apesar do esquema de tratamento da TB ter eficácia em cerca de 95% dos casos e reduzir rapidamente a transmissão da doença, ele possui algumas limitações que contribuem para a sua baixa adesão, como longa duração e diversos efeitos colaterais dos fármacos (LIMA, BISPO, SOUZA, 2011; WHO, 2015).

De fato, o tratamento inadequado contra a TB promove a seleção de bacilos mutantes existentes em uma população selvagem, exigindo a utilização de fármacos menos potentes e mais tóxicos, chamados de segunda linha (**Figura 4**) (LIMA, BISPO, SOUZA, 2011; WHO, 2015).

De acordo com a OMS (WHO, 2015), MDR-TB é definida como resistente aos fármacos R e H, enquanto XDR-TB é resistente ainda a pelo menos uma fluoroquinolona e a um fármaco de segunda linha injetável.

Normalmente, o tempo de tratamento com fármacos de segunda linha preconizado pela OMS (WHO, 2015) para combater bacilos resistentes varia entre 18 e 24 meses. Na fase inicial, são utilizados quatro fármacos, incluindo um injetável e uma fluoroquinolona, e na fase de continuação, são empregados ao menos três fármacos que sejam mais ativos e melhor tolerados pelo paciente. No entanto, existem algumas desvantagens que contribuem para o fracasso do esquema terapêutico com fármacos de segunda linha, como extrema toxicidade, menor eficácia e maior custo, em comparação com os fármacos de primeira linha (ARBEX et al., 2010b).

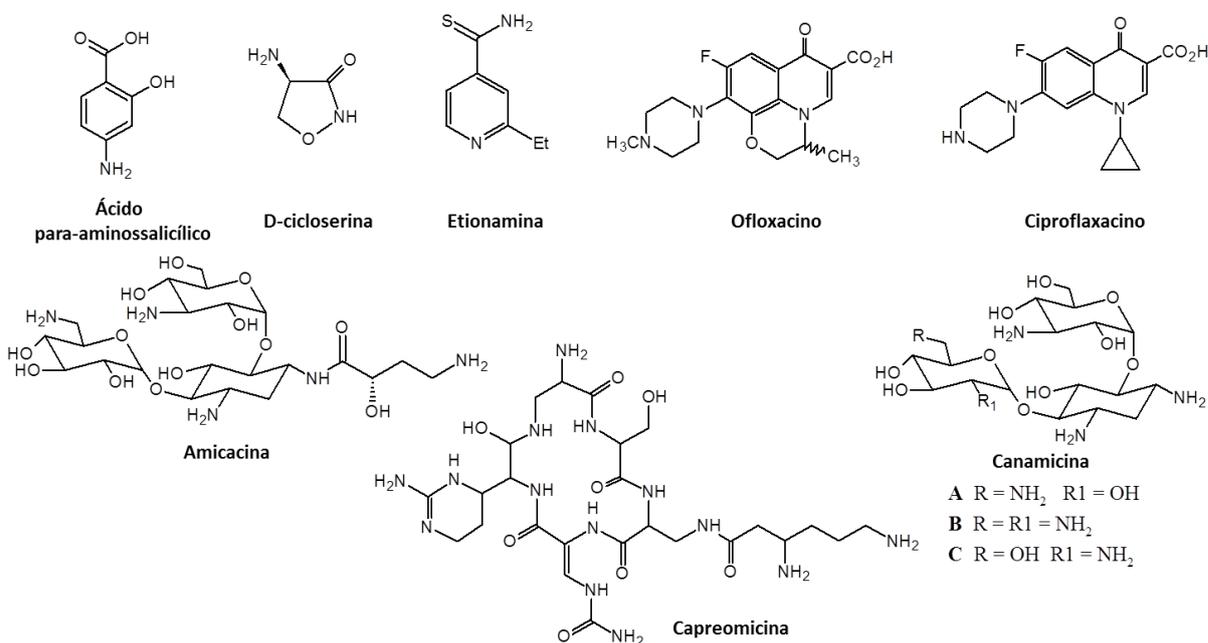


Figura 4. Alguns fármacos de segunda linha utilizados no tratamento de MDR/XDR-TB.

1.4. NOVOS HORIZONTES NO DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS

Tendo em vista o atual panorama mundial da TB, com o surgimento de cepas resistentes e os problemas associados aos tratamentos padrão e de segunda linha, faz-se necessário o desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes e seletivos a todas as formas de TB (sem e com resistência).

Assim, em 2000, visando a busca de novos compostos e esquemas de tratamento, foi estabelecida uma parceria sem fins lucrativos conhecida como “Aliança global para o desenvolvimento de medicamentos contra a Tuberculose” (*TB Alliance*), reunindo as principais universidades, indústrias, organizações governamentais e não-governamentais e grandes agências (TB ALLIANCE, [s.d.]). Entre as diversas entidades governamentais, o Brasil é representado pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), através do Centro de Tecnologia e Desenvolvimento para a Saúde (CDTS), onde as áreas de pesquisa, desenvolvimento e produção são integradas para a produção de novos fármacos, vacinas e reagentes para diagnósticos voltados para doenças negligenciadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, [s.d.]).

Após cerca de 15 anos da criação da TB Alliance, dois novos fármacos anti-TB foram lançados no mercado: bedaquilina (TMC-207 ou B) e delamanida (OPC-67683) (**Figura 5**) (WHO, 2015).

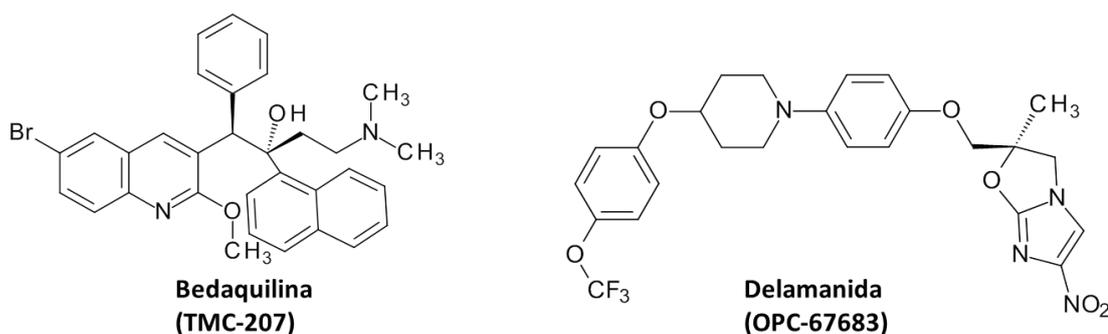


Figura 5. Estruturas químicas dos fármacos bedaquilina e delamanida aprovados recentemente para o tratamento da tuberculose.

O fármaco bedaquilina (TMC-207) é um membro da classe das diarilquinolinas, atuando na enzima ATP-sintetase, responsável pela geração do suplemento de energia do MTB (GINSBERG, 2010). Esse fármaco apresenta uma forte ação bactericida e esterilizante, combatendo bacilos susceptíveis e MDR. Atualmente, esse fármaco tem mostrado resultados promissores quando associado com pretomanida (PA-824 ou Pa), um candidato a fármaco

anti-TB, e Z, um fármaco anti-TB bem estabelecido na clínica (DIACON et al., 2015; WHO, 2015). A combinação BPaZ é um tratamento oral que remove a necessidade da utilização de fármacos injetáveis no tratamento da MDR-TB, tornando o tratamento mais acessível financeiramente do que a terapia atual.

O fármaco delamanida (OPC-67683) é um membro de uma subclasse de nitroimidazóis, sendo considerado um pró-fármaco, pois são os seus metabólitos que matam o bacilo pelo bloqueio da síntese dos ácidos micólicos e da respiração (ANG, MURIMA, PETHE, 2015; MENG et al., 2015; RUSTOMJEE, ZUMLA, 2015; SHIMOKAWA et al., 2015). O uso de delamanida é recomendado para o tratamento contra a MDR-TB em adultos quando não houver uma combinação eficiente devido a problemas de resistência e tolerância (ZUMLA et al., 2014).

Além desses fármacos, existem outros compostos em desenvolvimento pré-clínico e em testes clínicos de fases I e II (WHO, 2015), contudo, é necessário realizar uma investigação mais detalhada sobre o metabolismo do bacilo e as respostas associadas ao hospedeiro para identificar novos alvos biológicos e classes químicas, aumentando as opções para combater a TB. Nesse contexto, diversos alvos biológicos foram identificados e descritos como promissores para o desenvolvimento de novos fármacos, por exemplo, enzimas envolvidas na síntese da parede celular, como decaprenilfosforil-D-ribose oxidase (DprE1) (NERES et al., 2015), arabinosiltransferase (EmbC) (GOUDE et al., 2009) e enoil-ACP-reductase (InhA) (MANJUNATHA et al., 2015).

1.5. BIOSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS: ENZIMAS ALVOS DE NOVOS FÁRMACOS

A parede celular micobacteriana se destaca por ser um dos fatores mais importantes de virulência e resistência (FORRELLAD et al., 2013), sendo constituída por três classes de biomacromoléculas ligadas covalentemente (peptideoglicanos, arabinoglicanos e ácidos micólicos), que formam uma camada espessa, impedindo a penetração da maioria dos agentes antibacterianos (FORRELLAD et al., 2013; JACKSON, MCNEIL, BRENNAN, 2013).

Os ácidos micólicos, que desempenham função determinante na hidrofobicidade da parede celular, são provenientes da biossíntese de ácidos graxos, da qual participam complexos multi-enzimáticos, denominados em conjunto como ácido graxo sintase (*fatty acid synthase*, FAS), envolvendo ciclos repetidos de reações de condensação, ceto-redução,

desidratação e enoil-redução (HEATH, WHITE, ROCK, 2002). As micobactérias possuem dois tipos de FAS: FAS-I, responsável pela síntese de ácidos graxos contendo 16-26 átomos de carbono, e FAS-II, responsável pela extensão da cadeia dos ácidos graxos produzidos pela FAS-I em até 56 átomos de carbono, originando os precursores dos ácidos micólicos (**Figura 6**) (CANTALOUBE et al., 2011; DE SOUZA et al., 2008a; SLAMA et al., 2011).

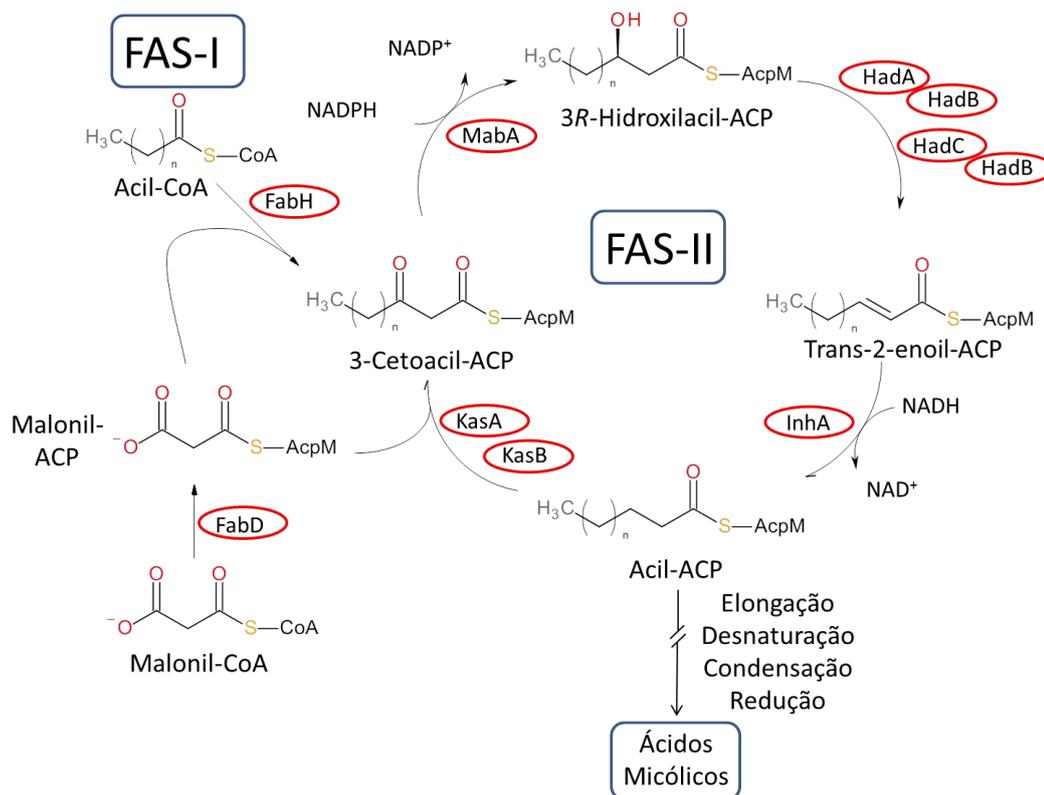


Figura 6. Representação da biossíntese dos ácidos micólicos. A seta interrompida indica a existência de reações bioquímicas intermediárias não representadas no esquema. (CANTALOUBE et al., 2011; SLAMA et al., 2011).

As enzimas envolvidas na via FAS são alvos importantes para o desenvolvimento de novos fármacos, dentre elas, a mais conhecida é a enoil-ACP redutase (ENR), denominada **InhA** no caso da ENR do MBT, que catalisa a redução estereoespecífica de ácidos graxos *trans*- α,β -insaturados ligados covalentemente à proteína carreadora de grupo acila (ACP), numa reação dependente de **NADH** (PASQUALOTO et al., 2004).

Essa enzima, inibida pela isoniazida (um importante fármaco utilizado no combate à TB descoberto em 1952), é ativa em bacilos sensíveis, perdendo sua atividade em cepas resistentes, devido a mutações na enzima catalase-peroxidase micobacteriana (**KatG**), necessária para a ativação desse fármaco, caracterizando-o como um pró-fármaco (**Figura 7**) (ZHANG et al., 1992). Por isso, substâncias que inibam diretamente a **InhA** são candidatos

promissores a fármacos contra ambos os tipos de TB (MDR-TB e XDR-TB) (LU, YOU, CHEN, 2010; PASQUALOTO et al., 2004).

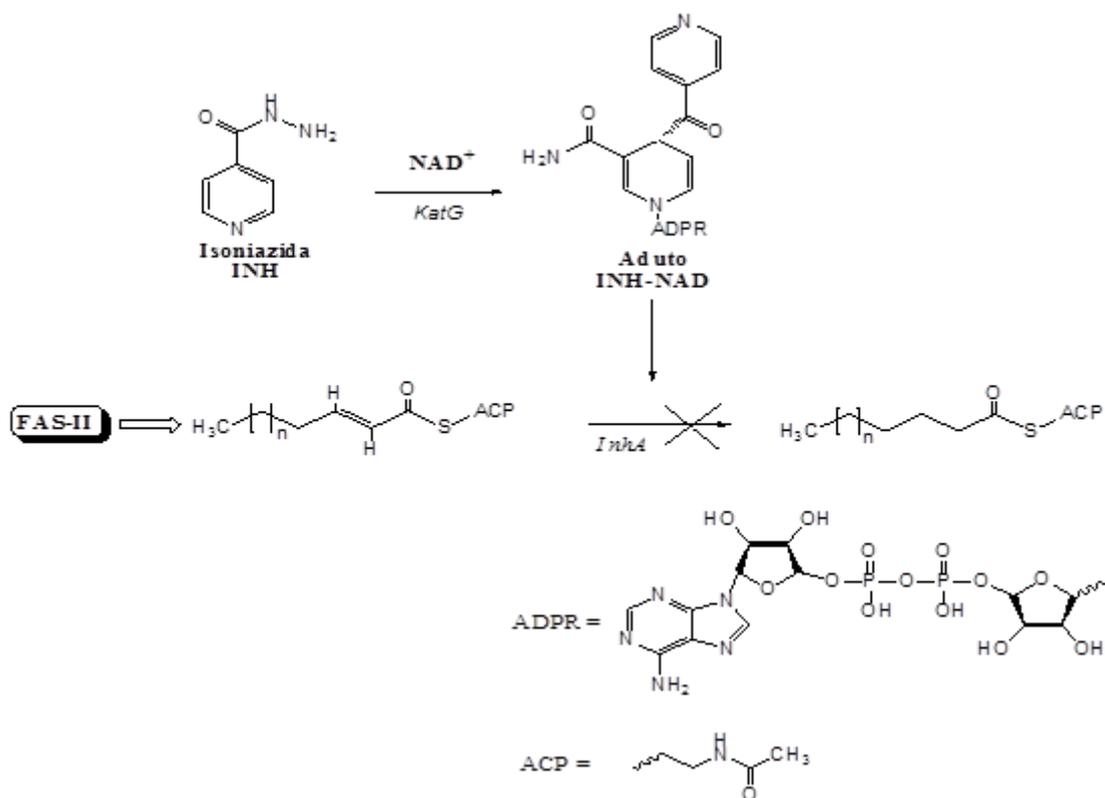


Figura 7. Provável mecanismo de ação da isoniazida. Adaptado de HEATH, WHITE, ROCK, (2001).

1.6. INIBIDORES DA ENZIMA INHA

O desenvolvimento de inibidores da enzima InhA teve início com a busca de substâncias semelhantes à H. Normalmente, esses compostos são dependentes de ativação enzimática para a formação de um aduto com o cofator NAD, e.g. etionamida (ETH) e protionamida (PTH) (**Figura 8**), que são metabolizadas pela enzima monooxigenase dependente de flavina, formando adutos que irão se ligar no mesmo sítio de ligação do aduto H-NAD (PAN, TONGE, 2012).

Nas últimas duas décadas, diversos compostos foram sintetizados com o intuito de obter inibidores da InhA que não dependessem de uma etapa de metabolização enzimática para a sua ativação. Alguns exemplos de inibidores diretos da InhA são: compostos de classes diversas obtidas por *high-throughput screening* (HTS), compostos que mimetizam o aduto H-

NAD, derivados diazoboranos e derivados de éteres diarila (EDA) (**Figura 8**) (PAN, TONGE, 2012).

No primeiro grupo estão os compostos obtidos por HTS, que compreendem as classes das pirrolidinas carboxiamidas (d12), piperazina indolformamidas (Genz-8575), pirazolas (p4) e arilamidas (a06) (**Figura 8**), os quais foram sintetizados e avaliados por diferentes grupos de pesquisas a partir de bibliotecas químicas com mais de 30.000 substâncias (HE, ALIAN, ORTIZ DE MONTELLANO, 2007; HE et al., 2006; KUO et al., 2003; PAN, TONGE, 2012). Uma característica em comum entre essas classes é que os compostos mais ativos nos testes enzimáticos apresentam valores de concentração inibitória mínima (CIM) frente a uma cepa sensível do *M. tuberculosis*, H37Rv, 50 vezes maior do que o fármaco padrão (CIM da H = 1,14µM), exceto para o composto Genz-8575 (~2,5 vezes).

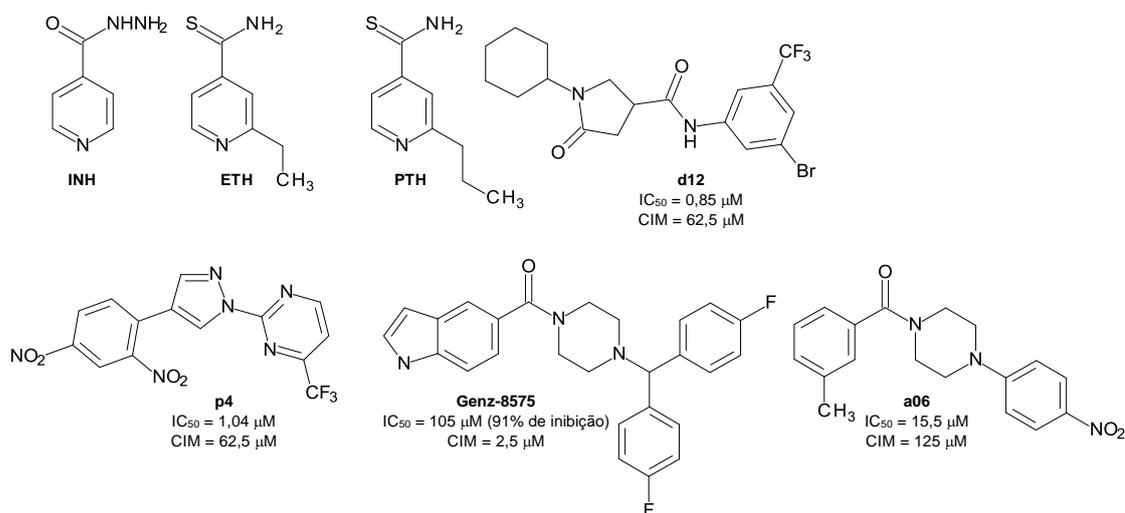


Figura 8. Estruturas químicas de alguns inibidores da enzima InhA (enoil-ACP redutase do *Mycobacterium tuberculosis*) (PAN, TONGE, 2012).

No segundo grupo estão os análogos do aduto INH-NAD, que também não requerem ativação pela enzima KatG, sendo investigados no combate às cepas de bacilos multirresistentes (BROUSSY et al., 2005). As principais modificações estruturais em relação ao aduto H-NAD estão relacionadas à adição de grupos fenoxila ou benzoíla na posição C4 do anel nicotinamida, substituição do nitrogênio do anel nicotinamida por um átomo de carbono, formação de hemicetais cíclicos ou análogos contendo resíduos lipofílicos ligados ao grupo fenila (**Figura 9**) (BONNAC et al., 2007; DELAINE et al., 2010). A partir dessas modificações estruturais, observou-se que a subunidade adenosina difosfato é importante para

a inibição da enzima, entretanto, a presença desse grupo dificulta a passagem desses compostos pela parede celular (DELAINE et al., 2010).

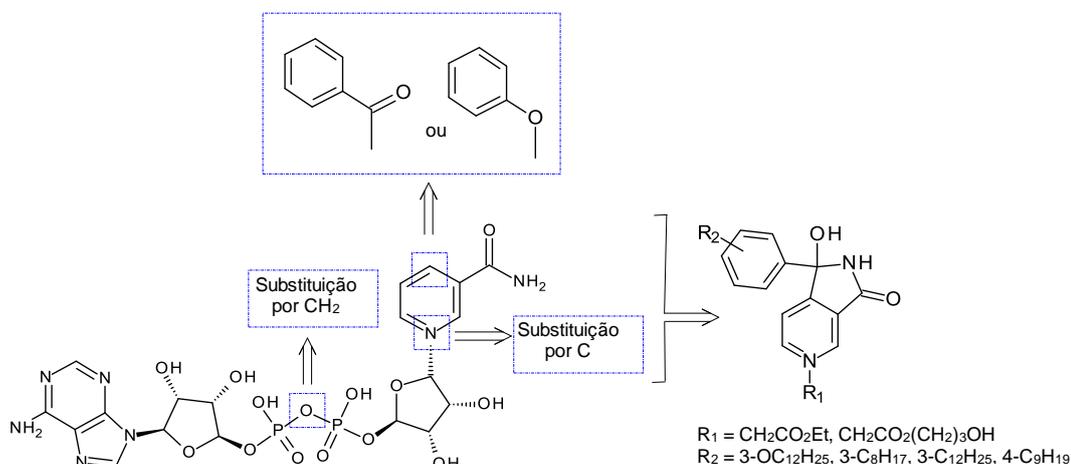


Figura 9. Principais modificações estruturais descritas na literatura no planejamento de análogos do aduto INH-NAD (BONNAC et al., 2007; DELAINE et al., 2010).

No terceiro grupo, o estudo da classe dos diazoboranos (e.g. DBN1, **Figura 10**) permitiu a investigação das possíveis conformações que o cofator pode assumir no sítio de ligação da enzima enoil-redutase, visto que esses compostos se ligam ao complexo NAD-enzima (CHAKRABORTY, RHEE, 2015; DAVIS, FRANZBLAU, MARTIN, 1998) (**Figura 10**). Entretanto, devido a alta toxicidade, esses compostos têm sido amplamente estudados no combate de zoonoses e infecções causadas por fungos que acometem a epiderme (CHAKRABORTY, RHEE, 2015).

No quarto grupo, os éteres diarila tem como principal representante o triclosano (TCN, **Figura 10**), um biocida presente em pastas de dentes e desodorantes, que inibe o crescimento de diversas bactérias (e.g. *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*), inibindo enzimas homólogas à InhA (LU, YOU, CHEN, 2010). A partir da estrutura do TCN, diversas substâncias foram sintetizadas, destacando-se o composto 8PP (**Figura 10**) que possui um grupo octila ligado ao anel aromático A, sendo 220 vezes mais ativo do que o TCN (SULLIVAN et al., 2006).

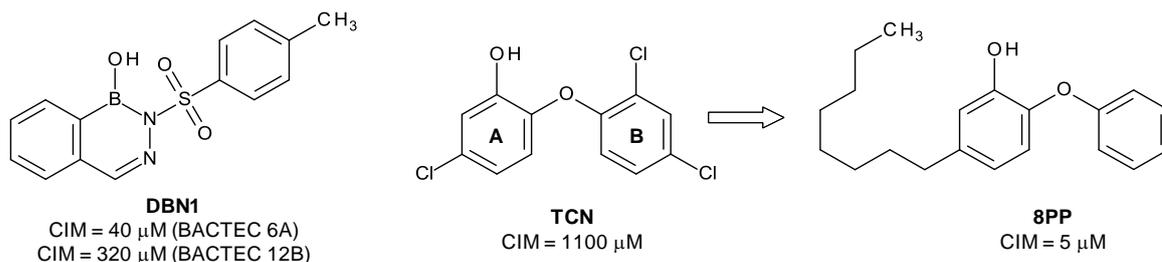


Figura 10. Exemplos de compostos das classes dos diazoboranos (DBN1) e éteres diarila (TCN, triclosano; 8PP) e respectivos valores de CIM nos ensaios biológicos anti-MBT (PAN, TONGE, 2012).

1.7. MODELAGEM MOLECULAR NO PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS

A modelagem molecular é uma poderosa ferramenta utilizada para o desenvolvimento de novos fármacos, auxiliando na redução de tempo e custo nas etapas identificação, caracterização e otimização estrutural de novas moléculas bioativas (ACHARYA et al., 2011; SLIWOSKI et al., 2014)

As abordagens principais conhecidas para a busca de novos candidatos a fármacos podem ser divididas em dois grandes grupos: abordagem direta (ou dependente da estrutura do receptor) e abordagem indireta (ou dependente da estrutura do ligante) (SLIWOSKI et al., 2014).

Na abordagem direta, o planejamento de fármacos é baseado no conhecimento da estrutura tridimensional do receptor alvo obtida por técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) ou cristalografia e difração de raios-X. Os exemplos mais comuns dessa abordagem são os estudos de docagem molecular e simulações de dinâmica molecular (FERREIRA et al., 2015; SLIWOSKI et al., 2014). A partir de um conjunto de moléculas congêneres com dados de atividade biológica para um determinado receptor, é possível determinar uma relação quantitativa estrutura-atividade (QSAR) com propriedades relacionadas à estrutura 3D do complexo ligante-receptor (SLIWOSKI et al., 2014).

Na abordagem indireta, o planejamento de novos candidatos a fármacos é baseado em processos que utilizam ligantes conhecidos, geralmente, quando não se tem informações acerca da estrutura tridimensional do receptor alvo ou na otimização de compostos que já possuam um alvo biológico (ACHARYA et al., 2011; GRINTER, ZOU, 2014; SLIWOSKI et al., 2014). Essa abordagem pode ser utilizada para avaliar bibliotecas de compostos virtuais, permitindo que a síntese seja direcionada para moléculas com potencial atividade biológica (SLIWOSKI et al., 2014).

1.8. DOCAGEM MOLECULAR

A docagem molecular (*molecular docking*) é uma técnica de modelagem molecular utilizada para prever o modo de ligação entre duas ou mais moléculas, e. g. proteína-ligante, proteína-ácido nucléico ou proteína-proteína (HALPERIN et al., 2002; HUANG, ZOU, 2010).

Em geral, um método de docagem consiste em dois componentes essenciais: algoritmo de busca ou amostragem (*search algorithm* ou *sampling*) e a função de pontuação (*scoring function*) (HUANG, ZOU, 2010; MENG et al., 2011).

O algoritmo de busca refere-se à geração pontual das conformações/orientações do ligante (modos de ligação) na proteína, podendo ser classificado em três grupos, de acordo com o método empregado na exploração da flexibilidade do ligante: algoritmos de busca sistemática, estocástica e determinística; sendo que alguns algoritmos são considerados híbridos, pois associam duas ou todas as estratégias (BROOIJMANS, KUNTZ, 2003; FERREIRA et al., 2015).

A função de pontuação determina a força da interação entre a proteína e o ligante em cada uma das poses (soluções) do ligante geradas pelo algoritmo de busca, podendo ser dividida em três tipos, de acordo com o esquema de energia utilizada: baseadas em campos de força, empíricas e baseadas em conhecimento (CHENG et al., 2009; FERREIRA et al., 2015; WANG et al., 2005). Em geral, a conformação/orientação que apresenta o menor valor de energia de pontuação é conhecida como o modo de ligação nativo mais provável.

Atualmente, diversos programas de docagem molecular estão disponíveis, sendo que eles diferem entre si em relação ao algoritmo utilizado durante a amostragem e a função de pontuação. Alguns dos programas mais utilizados são AutoDock (MORRIS et al., 1998), GOLD[®] (JONES, WILLETT, GLEN, 1995; JONES et al., 1997), e-HITS[®] (ZSOLDOS et al., 2006), Glide[®] (FRIESNER et al., 2004; HALGREN et al., 2004) e Molegro Virtual Docker (MVD, THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

Entre os diversos programas disponíveis, o MVD (CLCBIO, 2013; THOMSEN, CHRISTENSEN, 2006) é um programa para estudos de docagem que utiliza algoritmos de busca combinados com um algoritmo de predição de cavidades que identifica de forma rápida e precisa os potenciais modos de ligação entre ligante e proteína. Este programa contém três tipos de algoritmos de busca e dois tipos de funções de pontuação, que podem ser combinados para obter o melhor modo de interação que se aplica ao sistema problema. Os algoritmos de

busca inclusos no MVD são: MolDock Optimizer, MolDock *Simplex Evolution* (SE) e *Iterated Simplex*; e as funções de pontuação são: MolDock Score, PLANTS Score e Rerank Score.

O algoritmo de busca padrão do MVD é o MolDock Optimizer que é baseado em uma classe de algoritmos evolucionários conhecida como evolução diferencial, que gera soluções-filhas a partir da diferença ponderada das soluções-pais selecionadas aleatoriamente da população de soluções (CLCBIO, 2013; STORN, PRICE, 1997).

O MolDock SE é um algoritmo estocástico alternativo aplicável a ligantes com muitos graus de liberdade, funcionando em sistemas onde o algoritmo padrão falha, pois combina a construção incremental das poses com a escolha aleatória de indivíduos para o início da busca pelas soluções de menor energia. O *Iterated Simplex* gera soluções que são sucessivamente refinadas, utilizando níveis de tolerância de diferenças de energia de ligação entre as melhores e piores soluções cada vez menores até um número máximo de repetições previamente determinado (CLCBIO, 2013).

A função de pontuação MolDock Score é derivada de funções do tipo potencial linear composto (*piecewise linear potential*, PLP), definida pela **Equação 1**, correspondendo ao somatório da energia de interação (intermolecular) entre o ligante e a proteína (E_{inter}) e a energia interna do ligante (E_{intra}). A E_{inter} (**Equação 2**) pode ser decomposta em dois termos, o primeiro, E_{PLP} , usa parâmetros que aproximam o termo estérico (van der Waals) entre os átomos e um potencial que descreve a interação por ligação hidrogênio, enquanto o segundo termo descreve as interações eletrostáticas do sistema (Coulomb). Além disso, a soma do potencial de Coulomb engloba todos os átomos pesados, incluindo água e cofatores presentes no sistema, e o valor de 332 é utilizado para que a unidade de energia seja Kcal/mol (CLCBIO, 2013).

Na E_{intra} (**Equação 3**), a soma dupla no primeiro termo considera todos os pares de átomos do ligante, excluindo os pares de átomos conectados por duas ligações ou menos. O segundo termo representa a energia torsional do ligante e é parametrizado de acordo com a hibridização dos átomos que definem o ângulo de torção (θ). O terceiro termo, E_{col} , acrescenta penalidade à energia interna do ligante, quando dois átomos não ligados estão a menos de 2,0 Å entre si, evitando conformações improváveis do ligante (CLCBIO, 2013).

$$E_{score} = E_{intra} + E_{inter} \quad (\text{Eq. 1})$$

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

$$E_{intra} = \sum_{i \in \text{lig.}} \sum_{j \in \text{ptn.}} E_{PLP}(r_{ij}) + \sum_{\text{lig.simp}} [1 - \cos(m \cdot \theta - \theta_0)] + E_{col} \quad (\text{Eq. 3})$$

O Rerank Score é uma função de pontuação que recalcula os termos de energia descritos para a função MolDock Score, utilizando valores pré-calculados para sistemas conhecidos na literatura. Essa função é empregada para reclassificar as poses selecionadas para um mesmo ligante (CLCBIO, 2013).

A função de pontuação PLANTS Score, definida pela **Equação 4**, apresenta o potencial f_{PLP} semelhante ao potencial PLP da função MolDock Score, porém, contendo mais tipos de interação. Os potenciais de colisão (f_{col}) e torsional (f_{tors}) levam em consideração colisões internas e contribuições torsionais para ligações, o termo c_{esfera} aplica uma penalidade caso o ligante encontre-se fora do sítio de ligação definido por uma esfera no espaço e o último termo (-20) é necessário para que os valores desta nova função sejam comparáveis aos da função PLANTS inicial (CLCBIO, 2013).

$$E_{plantsscore} = f_{PLP} + f_{col} + f_{tors} + c_{esfera} - 20 \quad (\text{Eq. 4})$$

1.9. SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR

A simulação de dinâmica molecular (DM) é uma técnica de modelagem molecular capaz de fornecer detalhes relativos à movimentação individual de partículas em função do tempo (KARPLUS, MCCAMMON, 2002). Nesse método, as interações entre partículas são descritas empiricamente por uma função de energia potencial a partir de uma equação similar a descrita na **Figura 11** (DURRANT, MCCAMMON, 2011).

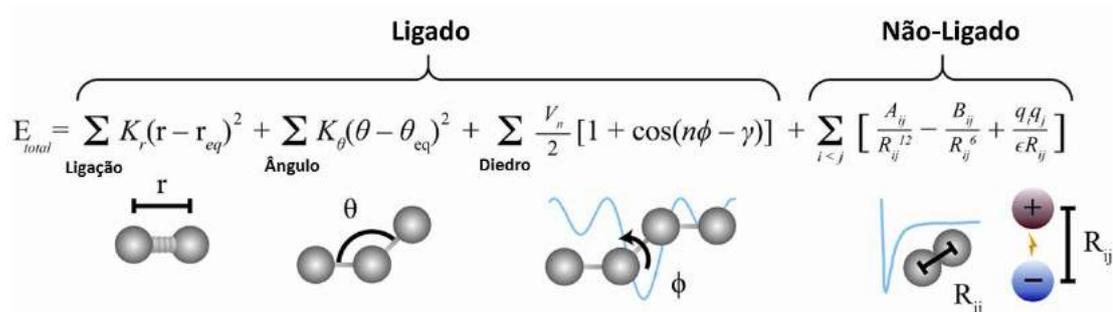


Figura 11. Exemplo de uma equação usada para aproximar a força atômica que governa o movimento. A força não-ligada compreende a interação estérica (van der Waals) e eletrostática (Coulomb), calculadas pelo potencial de Lennard-Jones e lei de Coulomb, respectivamente (Figura adaptada de DURRANT, MCCAMMON, 2011).

Existem diversos programas que realizam simulações por DM, como AMBER (*Assisted Model Building with Energy Refinement*) (CASE et al., 2005), CHARMM (*Chemistry at HARvard MacroMolecular Mechanics*) (BROOKS et al., 2009), GROMOS (*GRoningen MOlecular Simulation computer*) e GROMACS (*GRoningen MACHine for Chemical Simulation*) (VAN DER SPOEL et al., 2005).

De fato, a utilização da DM para identificar novos sítios de ligações em alvos conhecidos possibilitou o desenvolvimento do fármaco raltegravir no ano de 2004 (SCHAMES et al., 2004), uma vez que a observação das movimentações das cadeias secundárias indicou a formação de uma cavidade não reportada pela estrutura cristalográfica disponível à época.

1.10. QSAR: CONSIDERAÇÕES GERAIS

O método de QSAR é uma tentativa de criar um modelo matemático, que correlacione a resposta biológica com propriedades estruturais intrínsecas a uma série de compostos congêneres, que possa ser validado por métodos estatísticos (ESPOSITO, HOPFINGER, MADURA, 2004; VERMA, KHEDKAR, COUTINHO, 2010).

De fato, o QSAR pode ser classificado conforme as propriedades estruturais utilizadas para gerar os modelos matemáticos, sendo o QSAR-3D o mais difundido por considerar as informações tridimensionais (VERMA, KHEDKAR, COUTINHO, 2010).

Em geral, os métodos de QSAR-3D podem ser classificados em dois grupos: independente do receptor (IR, *Ligand-Based*) e dependente do receptor (DR, *Structure-Based*).

O primeiro grupo (IR) considera apenas as propriedades tridimensionais estruturais dos ligantes, sendo o método de CoMFA (*Comparative Molecular Field Analysis*) o primeiro a ser introduzido em 1988 por CRAMER, PATTERSON e BUNCE (1988) e o mais utilizado até hoje (MACALINO et al., 2015). No caso do segundo grupo (DR), a estrutura do receptor é considerada para obter as propriedades tridimensionais, sendo o método COMBINE (*Comparative Binding Energy Analysis*) um dos primeiros a ser desenvolvido com essa abordagem (ORTIZ et al., 1995).

De fato, por ser uma metodologia com bases estatísticas, a modelagem por QSAR envolve um processo sistemático com múltiplas etapas que incluem o preparo do conjunto de dados, seleção e geração dos descritores moleculares, desenvolvimento do modelo matemático e validação interna do modelo (**Figura 12**, MYINT; XIE, 2010).

A primeira etapa (**Figura 12**) define a confiabilidade do modelo de QSAR, por isso, os compostos que irão constituir o banco de dados devem advir do mesmo tipo de protocolo de ensaio biológico e é preferível utilizar dados de um único laboratório, a fim de evitar inconsistência e variabilidade interlaboratorial dos dados (MYINT, XIE, 2010). Além disso, o conjunto de dados deve conter um número mínimo de compostos para assegurar a consistência estatística; suas atividades biológicas devem cobrir uma larga faixa de valores e possuir uma boa distribuição dentro desta faixa e o mesmo deve ser dividido em grupos de treinamento e de teste (PERKINS et al., 2003b).

A segunda etapa (**Figura 12**) envolve a geração e a seleção dos descritores moleculares segundo as metodologias de QSAR discutidas anteriormente, portanto, cada técnica possui aspectos próprios que precisam ser seguidas para garantir a geração de um modelo robusto.

A partir da terceira etapa, o rigor estatístico se torna mais pertinente, uma vez que é necessário escolher o método estatístico adequado para relacionar os descritores com as atividades biológicas. Alguns modelos lineares, como a regressão linear múltipla ou o método dos mínimos quadrados parciais – do inglês *partial least squares* (PLS) ou não lineares, como as redes neurais, podem ser utilizados como funções de correlação (LEACH, 2011).

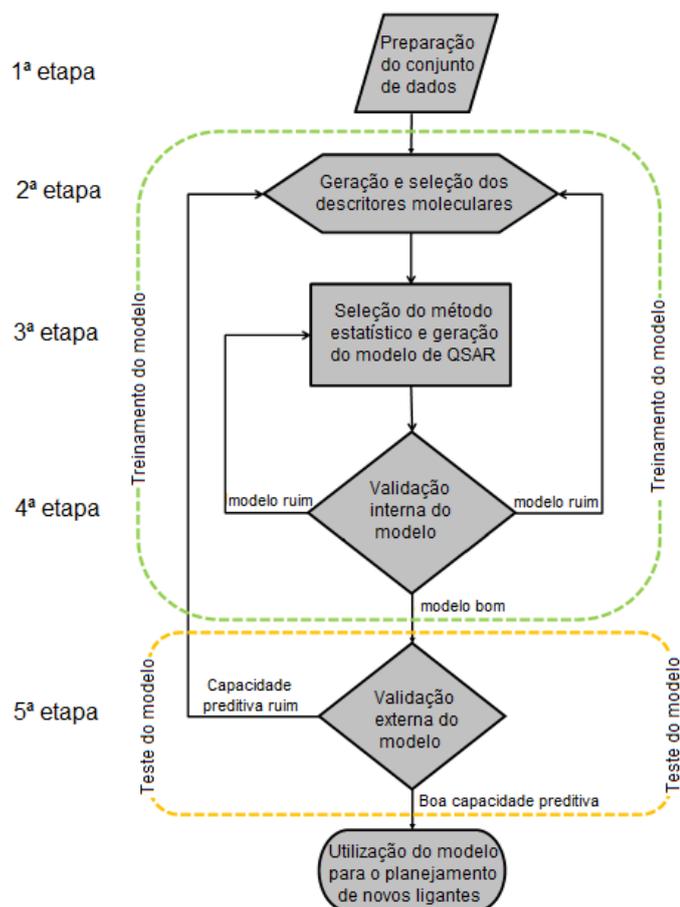


Figura 12. Esquema geral do desenvolvimento de um modelo de QSAR (Adaptado de MYINT, XIE, 2011).

Na quarta e quinta etapas, o modelo de QSAR é submetido à validação interna e externa, respectivamente. Os métodos empregados nessas etapas consideram, geralmente, a variação dos dados calculados em função da média dos valores obtidos experimentalmente, e.g. coeficiente de Pearson (R^2), validação cruzada com a remoção de um composto (*leave-one-out cross validation*, $LOOCV$) ou R^2 do conjunto teste (R^2_{pred}) (GOLBRAIKH, TROPSHA, 2002; ROY, KAR, 2014), o que na maioria dos casos não é sinônimo de confiabilidade do modelo, visto que fatores experimentais não são levados em conta.

1.11. TRIAGEM VIRTUAL

A triagem virtual (*virtual screening*, VS) é um método amplamente utilizado para a identificação de moléculas com potencial atividade a partir de grandes bibliotecas de compostos, promovendo a redução de tempo e custos nos processos de descoberta de fármacos (GAO, YANG, ZHU, 2010).

Atualmente, existem diversos bancos de dados de acesso livre ou privado, onde milhares de moléculas podem ser encontradas (KARTHIKEYAN, VYAS, 2015). Entre os bancos de dados de acesso livre podemos destacar o ZINCPharmer, uma plataforma online para busca de compostos que já foram isolados ou sintetizados, onde a busca por VS pode ser feita por métodos de docagem molecular ou mapa farmacóforo (KOES, CAMACHO, 2012).

1.12. MAPA FARMACOFÓRICO

O conceito de farmacóforo definido pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) é “o conjunto de características estéricas e eletrônicas necessário para assegurar as interações supramoleculares ótimas com um alvo biológico específico e para estimular ou bloquear a sua resposta biológica” (WERMUTH et al., 1998). Portanto, a construção de um mapa farmacofórico visa reconhecer as principais características moleculares de um conjunto de compostos ativos, representando um conceito abstrato e não uma molécula real (GAO, YANG, ZHU, 2010).

Atualmente, existem vários programas comerciais, e.g. HipHop ou GALAHAD, e acadêmicos, como PharmaGist, que apresentam como principal diferença o algoritmo desenvolvido, no qual o alinhamento das moléculas pode ser feito a partir de um receptor ou apenas utilizando as informações dos ligantes (FERREIRA et al., 2015).

O uso de mapas farmacofóricos na VS é um método atraente para identificação de compostos estruturalmente diversificados, tendo atividade biológica semelhante (GEPPERT, VOGT, BAJORATH, 2010). Ao avaliarmos as publicações a partir do ano de 2010, contendo as palavras-chave “*Virtual Screening*” e “*Pharmacophore*” no banco de dados da Scopus (ELSEVIER, [s.d.]), observamos um total de 1703 publicações, sendo que mais de 80% (N=1423) são artigos publicados em revistas indexadas (**Figura 13**).

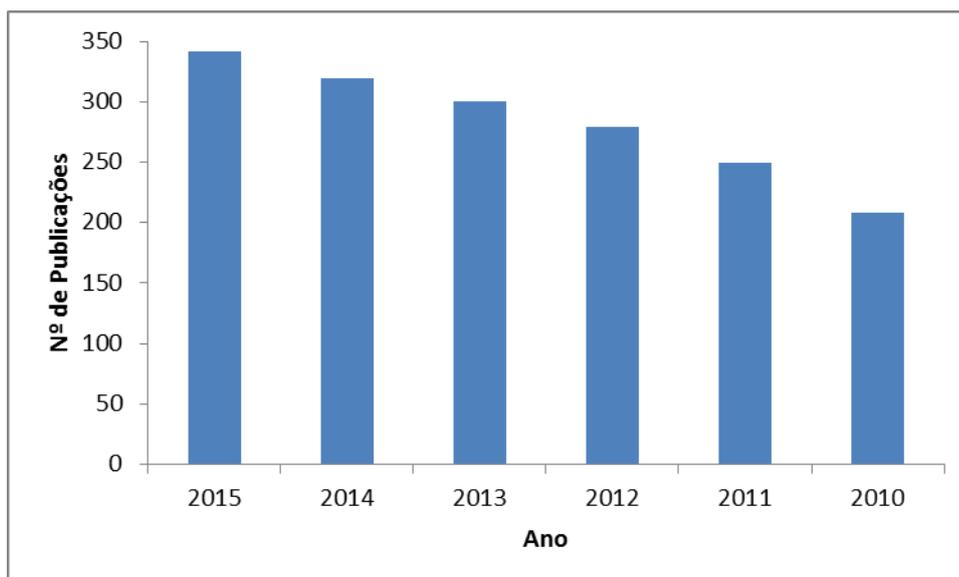


Figura 13. Número de publicações contendo as palavras-chave “*Virtual Screening*” e “*Pharmacophore*” entre 2010-2015 (Total = 1703).

2. OBJETIVOS

Esse trabalho consiste de dois estudos de modelagem molecular: avaliação do modo de ligação e variações da InhA frente a diferentes pelo método de dinâmica molecular e identificação de novos candidatos a inibidores da enzima aplicando os métodos QSAR, mapa farmacofórico e triagem virtual.

Na primeira parte, o principal objetivo é estudar o modo de ligação dos derivados éteres diarila (EDA) frente a InhA, analisando as modificações estruturais dos domínios que compõem o sítio de ligação e a influência de moléculas de água na interação inibidor-InhA.

A seguir, os objetivos foram: construir modelos de QSAR-3D dependente do receptor a partir de uma série de 39 derivados EDA; identificar quais interações são mais importantes para a inibição da enzima, buscar novos candidatos a inibidores, utilizando o banco de dados ZINCPharmer e prever a potência inibitória dos novos inibidores.

3. MÉTODOS

3.1. SELEÇÃO DOS COMPOSTOS E DADOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

Neste trabalho, foram selecionados éteres diarila obtidos de diferentes artigos, onde os valores de atividade biológica, mensurados como a concentração capaz de inibir 50% da atividade da enzima (IC_{50}), foram determinados a partir de diferentes concentrações da enzima (E) InhA, cofator (NADH) e substrato (S), um ácido graxo com 12 átomos de carbono, 2-*trans*-dodecenoil-coenzima A (DD-CoA), análogo ao substrato natural da InhA (FREUNDLICH et al., 2009; LI et al., 2014; LUCKNER et al., 2010; PAN et al., 2014; SULLIVAN et al., 2006).

Para evitar a comparação de valores de IC_{50} obtidos em condições experimentais diferentes, esses valores foram normalizados pela conversão para constante de inibição (K_i), segundo a **Equação 5** (CER et al., 2009).

$$K_i = \frac{(CI_{50} - E/2)}{(Km/S + 1)} \quad (\text{Eq.5})$$

A Eq.5 é utilizada para a conversão de IC_{50} de inibidores incompetivos, visto que os derivados EDA se ligam lentamente no mesmo local que o substrato no complexo enzima-cofator (PARIKH, XIAO, TONGE, 2000). As concentrações da InhA (E) e do DD-CoA (S) variam entre 1-100 μM e 25-300 μM , respectivamente, dependendo do método experimental descrito em cada artigo (FREUNDLICH et al., 2009; LI et al., 2012; LUCKNER et al., 2010; PAN et al., 2014; SULLIVAN et al., 2006). A constante de Michaelis-Mentem ($K_m = 29 \mu\text{M}$) foi determinada para um ensaio contendo enzima (InhA), substrato (DD-CoA) e cofator (NADH) (SULLIVAN et al., 2006). Finalmente, para realizar uma comparação linear das atividades biológicas para esses inibidores, o valor de K_i foi convertido para seu correspondente logaritmo negativo ($pK_i = -\text{Log}K_i$), expresso em unidade molar (M) (**Tabela 2**).

Tabela 2. Estruturas químicas e valores de atividade biológica (pK_i) dos éteres diarila selecionados da literatura e de acordo com as modificações nos anéis A e B.

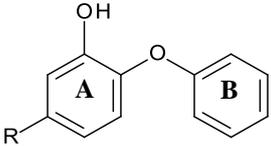
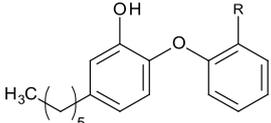
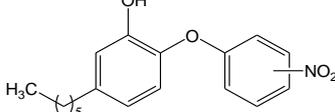
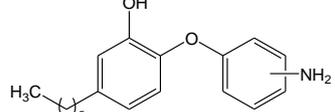
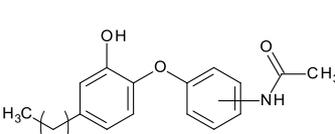
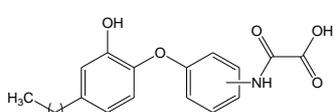
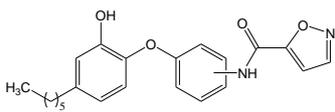
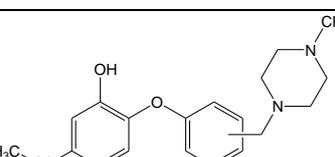
Estrutura	#	R	pK _i (M)	Ref.
	2	(CH ₂) ₃ CH ₃	7,23	(SULLIVAN et al., 2006)
	3	(CH ₂) ₄ CH ₃	7,91	
	4	(CH ₂) ₅ CH ₃	8,11	
	6	(CH ₂) ₇ CH ₃	8,47	
	7	(CH ₂) ₁₃ CH ₃	6,95	
	5	CH ₃	9,86	(LUCKNER et al., 2010)
	47	CF ₃	8,04	(PAN et al., 2014)
	50	CN	7,07	
	30	<i>o</i>	7,22	
	32	<i>p</i>	7,73	
	33	<i>o</i>	8,26	
	34	<i>m</i>	6,32	
	36	<i>o</i>	6,16	
	37	<i>m</i>	5,59	
	38	<i>p</i>	6,24	
	39	<i>o</i>	5,97	
	40	<i>m</i>	6,61	
	41	<i>p</i>	6,06	
	42	<i>o</i>	5,83	
	43	<i>m</i>	6,27	
	44	<i>p</i>	7,43	
	45	<i>o</i>	6,23	
	46	<i>p</i>	6,93	

Tabela 2. Estruturas químicas e valores de atividade biológica (pK_i) dos éteres diarila selecionados da literatura e de acordo com as modificações nos anéis A e B. (Continuação).

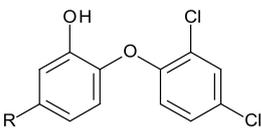
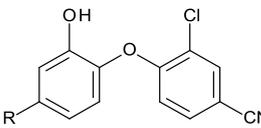
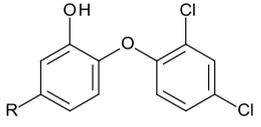
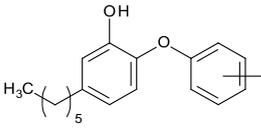
Estrutura	#	R	pK _i (M)	Ref.
	8	Cl	6,16	(FREUNDLICH et al., 2009)
	9	CH ₃	6,30	
	10	CH ₂ (ciclo-hexil)	7,17	
	11	CH ₂ CH ₃	7,13	
	12	(CH ₂) ₂ CH ₃	7,25	
	13	(CH ₂) ₃ CH ₃	7,48	
	14	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	7,23	
	15	(CH ₂) ₂ CH(CH ₃) ₂	7,42	
	16	CH ₂ CH(CH ₃)C ₂ H ₅	7,09	
	17	CH ₂ (2-piridil)	7,78	
18	CH ₂ (3-piridil)	7,60		
	19	CH ₂ (4-piridil)	7,34	
	20	<i>o</i> -CH ₃ -Ph	6,09	
	21	<i>m</i> -CH ₃ -Ph	6,26	
	22	CH ₂ Ph	7,51	
	23	(CH ₂) ₂ Ph	7,93	
	24	(CH ₂) ₃ Ph	7,52	
	51	R = 2-CH ₃ , 4-NO ₂	7,43	
	52	R = 2,6-CH ₃	5,93	
	53	R = 2,6-Cl	7,20	
	54	R = 2-F, 6-CN	7,13	
	55	R ₁ =2-F, 6-Cl;	7,23	

Tabela 2. Estruturas químicas e valores de atividade biológica (pK_i) dos éteres diarila selecionados da literatura e de acordo com as modificações nos anéis A e B. (Conclusão).

Estrutura	#	pK _i (M)	Ref.
	25	5,28	
	26	7,06	
	27	7,29	(AM ENDE et al., 2008)
	28	5,42	
	29	6,56	
	56	6,92	
	57	6,41	(PAN et al., 2014)
	58	7,06	

3.2. OBTENÇÃO DAS ESTRUTURAS CRISTALOGRÁFICAS DA INHA

Para os estudos de docagem molecular e análise comparativa das estruturas cristalográficas dos complexos InhA-cofator-inibidor, as estruturas 3D, obtidas por difração de raios-X da InhA complexada com cofator (NAD⁺ ou NADH), um substrato mimético e 10 inibidores (derivados EDA), foram selecionadas no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) do *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics* (RCSB, BERMAN et al., 2000). Os respectivos PDBs IDs e valores de resolução (R, Å) são: 2AQ8 (R=1,92Å) (OLIVEIRA et al., 2006); 1BVR (R=2,80Å) (ROZWARSKI et al., 1999); 2X23 (R=1,81Å) (LUCKNER et al., 2010); 2B35 (R=2,30Å), 2B36 (R=2,80Å), 2B37 (R=2,60Å) (SULLIVAN et al., 2006); 3FNF (R=2,30Å), 3FNG (R=1,97Å), 3FNE (R=1,98Å), 3FNH (R=2,80Å) (FREUNDLICH et al., 2009); 4OIM (R=1,85Å) (PAN et al., 2014); e 4OXY (R=2,35Å) (LI et al., 2014).

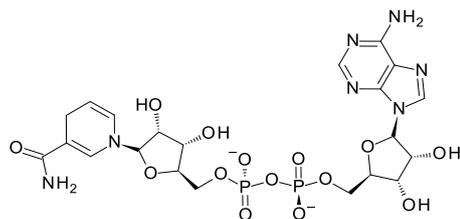
3.3. OBTENÇÃO E PREPARO DOS LIGANTES

As estruturas 3D dos ligantes (cofator, substrato mimético e inibidores) foram extraídas dos seus respectivos complexos com a InhA de acordo com os seguintes códigos PDB ID: NAI (cofator NADH na forma reduzida; 1,4-diidronicotinamida adenina dinucleotídeo), THT (substrato mimético; *trans*-2-hexadecenoil-(N-acetil-cisteamina)-tioéster), 5PP (ATV03; 2-fenóxi-5-pentil-fenol), 8PS (ATV06; 2-fenóxi-5-octil-fenol), TCU (ATV05; 5-hexil-2-(2-metil-fenóxi)fenol), JUS (ATV50; 2-(2-ciano-fenóxi)-5-hexil-fenol), 1TN (ATV30; 2-(2-nitro-fenóxi)-5-hexil-fenol), TCL (ATV08; triclosano, 5-cloro-2-(2,4-dicloro-fenóxi)fenol), JPL (ATV10; 2-(2,4-diclorofenóxi)-(5-(ciclohexil-metil)-fenol), 8PC (ATV17; 2-(2,4-diclorofenóxi)-5-(piridin-2-ilmetil)fenol); JPM (ATV22; 5-benzil-2-(2,4-diclorofenóxi)fenol) e JPJ (ATV23; 2-(2,4-diclorofenóxi)-5-fenetil-fenol) (**Figura 14**).

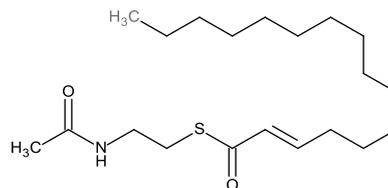
Para os cálculos de docagem molecular e simulação de dinâmica molecular, considerou-se o cofator na sua forma reduzida (NAI), visto que essa é a forma usada nos ensaios biológicos (AM ENDE et al., 2008; FREUNDLICH et al., 2009; LUCKNER et al., 2010; PAN et al., 2014; SULLIVAN et al., 2006).

As estruturas 3D dos derivados éteres diarilas ATV30 e ATV10 (AM ENDE et al., 2008; FREUNDLICH et al., 2009) foram corrigidas devido a discordâncias com os dados experimentais publicados. No inibidor ATV30, o grupo pentila foi corrigido para hexila, e no ATV10, o grupo 1,5-dien-1-il-metila foi corrigido para ciclo-hexil-metila.

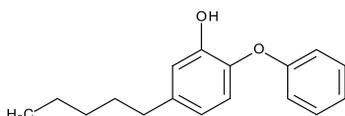
As estruturas 3D dos demais 47 inibidores éteres diarilas foram construídas a partir do inibidor ATV08, extraído do complexo 2B35, usando o programa Spartan versão 10 (Wavefunction, Inc.) (DEWAR et al., 1985). A seguir, esses ligantes foram submetidos a uma análise conformacional sistemática, em busca da conformação mais estável, usando o método semi-empírico RM1 (ROCHA et al., 2006). As conformações mais estáveis para cada ligante tiveram suas cargas atômicas parciais calculadas pelo método DFT/B3LYP, usando a função de base 6-31+G(d), disponível no programa Spartan.



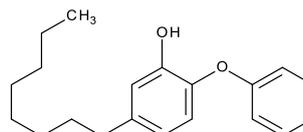
NAI (cofator NADH na forma reduzida)
(1,4-dihidronicotinamida adenina dinucleotídeo)



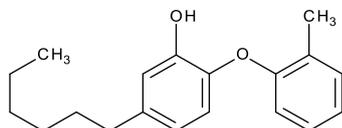
THT (substrato mimético)
(*trans*-2-hexadecenoil-(N-acetil-cisteamina)-tioester)



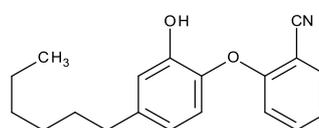
SPP (ATV03)
(2-fenóxi-5-pentil-fenol)



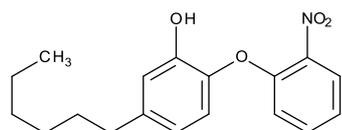
8PS (ATV06)
(2-fenóxi-5-octil-fenol)



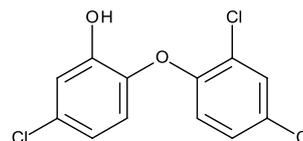
TCU (ATV05)
(5-hexil-2-(2-metil-fenóxi)fenol)



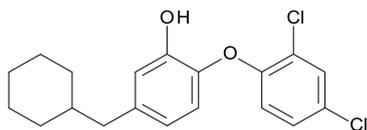
JUS (ATV50)
(2-(2-ciano-fenóxi)-5-hexil-fenol)



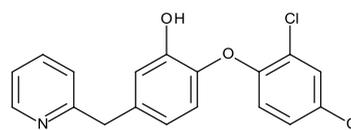
1TN (ATV30)
(2-(2-nitro-fenóxi)-5-hexil-fenol)



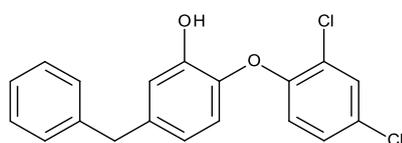
TCL (triclosano, ATV08)
(5-cloro-2-(2,4-dicloro-fenóxi)fenol)



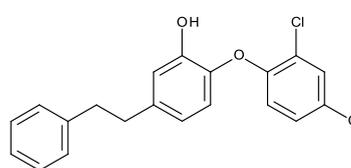
JPL (ATV10)
2-(2,4-diclorofenóxi)-(5-(ciclo-hexil-metil)-fenol)



8PC (ATV17)
2-(2,4-diclorofenóxi)-5-(piridin-2-ilmetil)fenol



JPM (ATV22)
(5-benzil-2-(2,4-diclorofenóxi)fenol)



JPJ (ATV23)
(2-(2,4-diclorofenóxi)-5-fenil-fenol)

Figura 14. Estruturas 2D do cofator (NAI), substrato mimético (THT) e dos inibidores éteres diarilas que estão co-cristalizados com a enzima InhA e disponíveis no PDB.

3.4. DOCAGEM MOLECULAR

Para as simulações de docagem molecular, utilizou-se o programa MVD, um algoritmo de busca heurístico que combina algoritmos de evolução diferencial e de predição de cavidade (THOMSEN, CHRISTENSEN, 2006). Para a enzima, os tipos de átomos e as ordens de ligação dos aminoácidos foram corrigidos automaticamente no módulo “Import molecules/Preparation”, sendo a região de ancoramento dos inibidores restrita a uma esfera de 15Å de raio centrada na cavidade do sítio de ligação (X: -21,21; Y: -9,83; Z: -31,21), abrangendo o substrato e o cofator. Os inibidores e o cofator (NADH) foram importados para o programa MVD de forma que as cargas parciais não fossem recalculadas, além disso, as ligações rotacionáveis detectadas automaticamente foram mantidas flexíveis. Durante os experimentos de docagem molecular, as moléculas de água e os íons foram excluídos.

O sítio de ligação (cavidade) foi detectado usando o algoritmo de predição de cavidade baseado em rede (*grid*), disponível no MVD. Após a identificação da cavidade, a busca por soluções (poses) foi realizada utilizando a função de busca MolDock SE (*simplex evolution*), que é usada quando o ligante apresenta muitas ligações rotacionáveis (>7). Para a utilização desse algoritmo de busca, foram definidos os valores das seguintes variáveis: tamanho da população (150), número máximo de interações (2000), fator de escalonamento (0,50) e probabilidade de mutação (*crossover*) (0,90).

Para a classificação das poses, utilizou-se duas funções de pontuação: MolDock e Rerank. A pontuação MolDock é calculada como o somatório dos potenciais lineares por partes (PLP) das energias de interações intramoleculares (E_{intra}) e intermoleculares (E_{inter}). A pontuação Rerank usa uma combinação ponderada dos termos usados na pontuação MolDock, calculando a energia estérica por um potencial de Lennard-Jones (LJ12-6).

A habilidade do programa MVD de predizer o modo de ligação observado experimentalmente do inibidor dentro do sítio ativo da enzima foi avaliada por redocagem (*re-docking*), i.e., comparou-se a pose obtida pelo programa com os dados experimentais. A redocagem é considerada bem sucedida quando a melhor solução obtida pelo programa possui um desvio da raiz média quadrática (RMSD) menor do que 2Å em relação à pose observada por difração de raios-X (FEHER, 2006).

O protocolo descrito anteriormente foi utilizado na docagem molecular, sendo executadas 100 corridas independentes, com cada corrida retornando, no mínimo, cinco

soluções, que são reclassificadas de acordo com a pontuação de Rerank para determinar qual pose é predominante no sítio ativo.

3.5. DINÂMICA MOLECULAR (DM)

Após a análise das estruturas cristalográficas dos complexos holoenzima (InhA-NADH) e holoenzima-substrato (InhA-NADH-THT) e a seleção da melhor pose para cada inibidor por docagem molecular, realizou-se simulações de DM, utilizando o programa GROMACS 4.5 (BERENDSEN, VAN DER SPOEL, VAN DRUNEN, 1995; PRONK et al., 2013; VAN DER SPOEL et al., 2005) com o campo de força OPLS/AA (KAMINSKI et al., 2001).

Para os ligantes (NADH, THT e inibidores éteres diarilas) foram criados arquivos de topologia (.itp) e coordenadas (.pdb), utilizando o programa AnteChamber PYthon Parcer InterfacE (ACPYPE). O programa MKTOP (RIBEIRO, HORTA, DE ALENCASTRO, 2008) foi utilizado para a correção de parâmetros de topologia não determinados pelo ACPYPE. Nessa etapa, as cargas atômicas parciais foram calculadas utilizando o método AM1-BCC (JAKALIAN, JACK, BAYLY, 2002), implementado no ACPYPE (WANG et al., 2004, 2006). A parametrização dos inibidores e do cofator é necessária porque o campo de forças utilizado nas simulações de DM apresenta parâmetros apenas para os aminoácidos padrões existentes nas proteínas.

Os complexos holoenzima (InhA-NADH) e holoenzima-ligante (THT ou derivados éteres diarilas) foram inseridos e centralizados dentro de uma caixa periódica triclínica e solvatados com moléculas de água do tipo SPC/E. A seguir, cada complexo foi neutralizado com seis íons sódio. Os sistemas foram simulados em condições periódicas de contorno para eliminar possíveis efeitos de superfície indesejáveis (NAMBA, SILVA, SILVA, 2008).

A seguir, os sistemas foram submetidos a etapas de minimização de energia, usando os algoritmos de máximo declive com restrição de posição para os ligantes/substrato e cofator (*steepest descent position restrained* – stpr) e critério de convergência de $1000 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-1}$, seguido por máximo declive sem restrição de posição, e gradiente conjugado (*conjugate gradient* - cg) até uma energia de $100 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-1}$.

Na etapa de termalização dos complexos minimizados, os sistemas foram submetidos a duas simulações de DM, considerando as posições restritas para todo o sistema, exceto para as moléculas de água, temperatura de 300 K e pressão de 1 bar. Na primeira simulação, foram

considerados constantes o número de partículas, o volume e a temperatura (conjunto canônico ou *ensemble* NVT). Na segunda etapa, o sistema foi considerado isotérmico-isobárico (temperatura e pressão constantes ou *ensemble* NPT).

As simulações de DM descritas anteriormente permitem que os átomos do sistema alcancem velocidades compatíveis com o equilíbrio térmico. Além disso, a restrição da posição dos átomos da enzima e dos ligantes permite que as moléculas de água se organizem de forma otimizada ao longo da superfície da proteína, formando, assim, camadas de solvatação mais estruturadas.

No controle da temperatura, utilizou-se o termostato V-rescale (BUSSI, DONADIO, PARRINELLO, 2007) e no controle da pressão, utilizou-se o barostato Parrinello-Rahman (PARRINELLO, RAHMAN, 1981). Além disso, todas as ligações que envolvem átomos de hidrogênio no complexo foram congeladas usando o algoritmo LINCS (*Linear Constraint Solver*; HESS et al., 1997). As interações eletrostáticas a longa distância foram tratadas utilizando o algoritmo PME (Particle-Mesh Ewald) (DARDEN, YORK, PEDERSEN, 1993; ESSMANN et al., 1995) e o raio de corte aplicado para as interações de van der Waals e de Coulomb foi de 1nm.

Após a termalização do sistema, realizou-se simulações de DM durante 20 e 40 ns, considerando o *ensemble* NPT, sem qualquer restrição, usando tempo de integração de 2 fs e um raio de corte para as interações a longa distância de 10 Å. As simulações de DM foram finalizadas quando os valores médios de RMSD dos átomos de carbono- α da cadeia principal da proteína e dos átomos dos ligantes/substrato, exceto os átomos de hidrogênio, não variavam mais do que 1,5 Å e 1,0 Å, respectivamente, durante 5 ns.

3.6. ANÁLISE DAS SIMULAÇÕES POR DINÂMICA MOLECULAR

Após a obtenção das trajetórias das simulações por dinâmica molecular, utilizou-se de diferentes programas para a análise desses resultados. A análise de RMSD, das populações (*cluster*) ao longo da simulação por DM, a extração de estruturas médias das trajetórias, a análise das distâncias entre os átomos dos inibidores/substrato, proteína e cofator e a variação dos ângulos diedros da proteína (φ , ψ , χ_1 e χ_2) foram realizadas pelos módulos *g_rms*, *g_cluster*, *trjconv*, *g_dist*, e *g_angle*, respectivamente, disponíveis no programa GROMACS 4.5 (BERENDSEN, VAN DER SPOEL, VAN DRUNEN, 1995; PRONK et al., 2013; VAN DER SPOEL et al., 2005).

Para a análise das ligações hidrogênio, foi utilizado o módulo *g_hbond*, disponível no GROMACS 4.6, associado ao programa *hmap2grace* (GOMES et al., 2009). O programa Visual Molecular Dynamics (VMD) foi utilizado para visualização e elaboração de figuras referentes às estruturas dos sistemas (HUMPHREY, DALKE, SCHULTEN, 1996). Os gráficos de variação de RMSD e número de *clusters* formados ao longo das simulações foram construídos no programa *Grace* (STAMBULCHIK, 1996). O gráfico da flutuação do desvio da raiz média quadrática (FRMSD) 3D, ou gráfico de salsicha, foi construído no programa MOLMOL (KORADI, BILLETER, WÜTHRICH, 1996). O cálculo do tempo médio das ligações hidrogênio ao longo da simulação e do tempo médio dos contatos hidrofóbicos foram realizados utilizando um *script* desenvolvido durante a tese, empregando a linguagem Python.

3.7. MAPA FARMACOFÓRICO, TRIAGEM VIRTUAL E PROPRIEDADES ADME/TOX

Após a avaliação das principais interações entre os derivados éteres diarilas e a holoenzima (InhA-cofator), selecionou-se 10 dos 57 inibidores, devido a similaridades estruturais, onde as estruturas 3D foram alinhadas, utilizando o servidor PharmaGist (SCHNEIDMAN-DUHOVNY et al., 2008) para criar uma hipótese farmacofórica.

Após a determinação das características essenciais que possam contribuir para a interação ligante-receptor, realizou-se a triagem virtual de novos ligantes, utilizando o banco de dados ZINC no servidor ZINCPharmer (KOES, CAMACHO, 2012). Para restringir o número de candidatos que possam satisfazer a hipótese farmacofórica, aplicou-se pré-filtros baseados nas características dos 10 inibidores selecionados. Essas restrições são: número máximo de conformações a ser avaliado para cada candidato (10), RMSD máximo da hipótese farmacofórica (1,0 Å), variação da massa molecular (300±100 Daltons), número de ligações rotacionáveis (3 a 7) e número máximo de candidatos selecionados (100) (KOES, CAMACHO, 2012).

A partir do número máximo de 100 candidatos selecionados no servidor ZINCPharmer, removeu-se todos os compostos que apresentam centros de quiralidade. Os candidatos restantes foram submetidos a cálculos de docagem molecular, seguindo o método descrito anteriormente, sendo selecionados os compostos que tiveram consenso nas pontuações de MolDock e Rerank.

Para os candidatos selecionados no estudo de docagem molecular, calculou-se as propriedades farmacocinéticas: coeficiente de partição 1-octanol/água (cLogP), no servidor Molinspiration (“Molinspiration”, [s.d.]); solubilidade em água (LogS), massa molecular (MM) e área de superfície polar topológica (TPSA) no servidor *OSIRIS Property Explorer* (“OSIRIS Property Explorer”, [s.d.]). No servidor *OSIRIS Property Explorer*, também foram calculadas as seguintes propriedades toxicológicas: mutagenicidade, tumorigenicidade, efeitos irritantes e efeitos reprodutivos.

3.8. QSAR-3D RD: CONJUNTOS DE TREINAMENTO E TESTE

Para o estudo do QSAR 3D DR, o conjunto de dados contendo os 39 compostos foi dividido em um conjunto de treinamento com 31 compostos, incluindo o mais e o menos ativo; e um conjunto de teste com 8 compostos, representando, aproximadamente, 20% do número total de compostos.

A divisão dos compostos nos conjuntos de treinamento e teste utilizou o método supervisionado de Kennard-Stone, onde os compostos que apresentam alta dissimilaridade em relação às variáveis independentes são separados como conjunto de teste (SNAREY et al., 1997). Portanto, quatro banco de dados foram criados a partir do critério de corte por variâncias BDA (variância $\geq 0,001$), BDB (variância $\geq 0,005$), BDC (variância $\geq 0,01$) e BDD (variância $\geq 0,05$) das variáveis independentes.

3.9. CONSTRUÇÃO DOS MOLDELOS DE QSAR-3D

Após a seleção do BD que apresenta a melhor distribuição dos compostos do conjunto teste, garantindo a diversidade estrutural e de atividade biológica para os dois conjuntos, realizou-se a construção de novos banco de dados com novos cortes por variância (0,03, 0,06, 0,09 e 0,12), considerando a variância da atividade biológica para os compostos do conjunto treinamento.

A seguir, esses novos BD contendo os dados de variáveis independentes em conjunto com os seus correspondentes valores de atividade biológica foram submetidos ao programa Wolf, a fim de obter equações de QSAR-3D.

Inicialmente, foram geradas populações de 600, 800 e 1000 equações, contendo quatro variáveis independentes selecionadas randomicamente do banco de dados. Em seguida,

empregando a técnica GFA-PLS, efetuou-se 50000, 100000 e 500000 operações de cruzamento (*crossover*) com probabilidade de mutação de 100 %. Para filtrar os dados, optou-se por três componentes principais para a análise por PLS. O fator de suavização (*smoothing-factor*), responsável pelo ajuste do número de variáveis independentes, foi variado em 0,1, 0,5 e 1,0.

Utilizando esse conjunto de configurações, o programa Wolf gerou 270 modelos de 3 a 10 termos (variáveis independentes), selecionando-se aquelas que o número máximo de termos por equação não foi superior a seis, valor que respeita a razão de cerca de cinco compostos do conjunto de treinamento para cada termo incluído na equação (KUBINYI, 1993).

3.10. SELEÇÃO DAS MELHORES EQUAÇÕES

As melhores equações para cada banco de dados, contendo no máximo seis termos obtidos por GFA-PLS, foram selecionadas a partir do seu coeficiente de correlação (R^2) (**Equação 6**).

$$R^2 = 1 - \frac{\sum(Y_{obs} - Y_{pred})^2}{\sum(Y_{obs} - \bar{Y}_{obs})^2} \quad (\text{Eq. 6})$$

Segundo a Equação 6, Y_{obs} , Y_{pred} e \bar{Y}_{obs} são as respostas biológicas (variável dependente) experimentais e preditas e suas médias, respectivamente.

3.11. ANÁLISE DA CORRELAÇÃO ENTRE OS DESCRITORES

Avaliou-se os coeficientes de correlação simples (r) entre as variáveis independentes (ou descritores) pelo cálculo da matriz de correlação cruzada com a finalidade de identificar se as variáveis estão intercorrelacionadas. Logo, de acordo com trabalhos recentes de QSAR, aqueles modelos altamente correlacionados são excluídos, evitando, assim, informações redundantes (ARAÚJO et al., 2011a, 2011b; LEAL et al., 2015).

3.12. VALIDAÇÃO EXTERNA DOS MODELOS DE QSAR-3D RD

A capacidade preditiva dos modelos de QSAR-3D foi avaliada a partir do conjunto teste pela raiz do desvio médio quadrático da estimativa (RMSEE), segundo a Equação 7, onde n é o número de compostos no conjunto teste.

$$RMSEE = \sqrt{\frac{(Y_{obs} - \bar{Y}_{pred})^2}{n}} \quad (\text{Eq. 7})$$

3.13. ANÁLISE DOS *OUTLIERS* E DO DOMÍNIO DE APLICAÇÃO

Os compostos *outliers*, i.e. compostos do conjunto treinamento que não são bem preditos dentro do espaço químico avaliado, e os que estão fora do domínio de aplicação, i.e., o espaço amostral para o qual o modelo obtido consegue prever a resposta biológica (conjunto teste), foram identificados a partir dos valores residuais.

Nesse trabalho, considerou-se *outliers* ou fora do domínio de aplicação todos os compostos cujo módulo do valor residual é maior do que o dobro do desvio padrão da estimativa (SEE), calculado segundo a Equação 8, onde n é o número de compostos, k é o número de termos do modelo e a expressão $(n-k-1)$ correspondente aos graus de liberdade do modelo.

$$SEE = \sqrt{\frac{\sum(Y_{obs} - Y_{pred})^2}{n - k - 1}} \quad (\text{Eq. 8})$$

3.14. CAPACIDADE PREDITIVA DO MODELO

A capacidade de predição do modelo foi realizada pela análise dos valores da correlação de Spearman (ρ), segundo a Equação 9, onde d_i^2 é a diferença entre cada classificação de valor correspondente às respostas biológicas experimentais (\mathbf{x}) e preditas (\mathbf{y}) para um determinado tamanho de amostra (\mathbf{n}).

A correlação de Spearman é classificada como não-paramétrica, pois não considera as frequências das variáveis, sendo que, em geral, valores de ρ próximos de $|1,0|$ indicam uma perfeita correlação entre o valor experimental e o predito.

$$\rho = 1 - \frac{6 \sum d_i^2}{n(n^2 - 1)} \quad \text{(Eq. 9)}$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. DADOS BIOLÓGICOS

Considerando os cinco artigos (AM ENDE et al., 2008; FREUNDLICH et al., 2009; LUCKNER et al., 2010; PAN et al., 2014; SULLIVAN et al., 2006), 79 derivados éteres diarilas foram testados frente a enzima InhA, sendo que 17 não tiveram sua atividade biológica expressa em IC_{50} , resultando em 62 compostos ativos.

Nos experimentos de IC_{50} , são usadas concentrações iniciais fixas do substrato mimético, do cofator na forma reduzida (NADH) e da enzima InhA, e a concentração dos inibidores são variadas com o intuito de inibir a transferência do hidreto do cofator para o substrato, resultando no cofator na sua forma oxidada (NAD⁺).

A falta de normatização das concentrações do substrato mimético, NADH e InhA pode induzir a interpretações equivocadas da potência do inibidor. Por exemplo, ATV05 apresenta IC_{50} de 5,3 ou 50,3 nM, dependendo da concentração da InhA, 10 e 100 nM, respectivamente (LUCKNER et al., 2010) ou ATV26, que para a mesma concentração da InhA, 100 nM, apresenta valores de IC_{50} discrepantes 236 ± 31 nM (AM ENDE et al., 2008) e 190 ± 12 nM (PAN et al., 2014).

A conversão dos valores de IC_{50} para pK_i tem como objetivo eliminar a influência das diferentes concentrações do substrato mimético, NADH e InhA durante a comparação das potências desses inibidores. Ao utilizarmos a **Eq. 5**, descrita na seção anterior, que é referente a compostos incompetivos, observamos que o valor de IC_{50} médio para seis compostos é menor do que a metade da concentração da InhA utilizada no experimento, resultando em 56 compostos.

Para facilitar a compreensão da relação estrutura-atividade, os compostos com valores de $pK_i < 6,26$ foram considerados inativos, visto que abaixo desse valor, a enzima pode estar saturada pelo composto.

4.2. ANÁLISE DAS ESTRUTURAS CO-CRISTALIZADAS COM HOLOENZIMA (InhA-NADH)

A enzima InhA apresenta um grande número de estruturas co-cristalizadas sem (holoenzima) e com substrato (substrato-holoenzima) e com diferentes inibidores (inibidor-holoenzima) (KUMAR, SOBHIA, 2013), disponíveis no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) (**Tabela 3**).

Neste trabalho, 12 complexos da InhA foram utilizados: um da holoenzima (2AQ8, R= 1,92Å), um substrato-holoenzima (1BVR, R= 2,80 Å) e 10 EDA-holoenzima cujos códigos PDB são: 2B35 (R=2,30 Å), 2B36 (R=2,80 Å), 2B37 (R=2,60 Å) (SULLIVAN et al., 2006), 3FNF (R=2,30 Å), 3FNG (R=1,97 Å), 3FNE (R=1,98 Å), 3FNH (R=2,10 Å) (FREUNDLICH et al., 2009), 4OIM (R=1,85 Å) (PAN et al., 2014), 4OXY (R=2,35 Å) (LI et al., 2014) e 2X23 (R=1,81 Å) (LUCKNER et al., 2010). Os complexos co-cristalizados com inibidores da classe EDA foram selecionados após conversão dos seus respectivos valores de IC₅₀ para pK_i, uma vez que alguns compostos apresentavam atividade biológica dentro do intervalo de confiança das medidas experimentais, dificultando a determinação do valor de pK_i.

Para facilitar a análise no sítio de ligação do substrato, ele foi dividido em oito domínios: alça-4 inferior (LLP-4, resíduos: Ser94-Pro99), alça-4 mediana (MLP-4, resíduos: Gln100-Ile105), alça-4 superior (ULP-4, resíduos: Asn106-Asp110), alça-5 (LP-5, resíduos: Phe149-Ala157), hélice- α -5 superior (UAH-5, resíduos: Tyr158-Lys165), hélice- α -6 (AH-6, resíduos: Leu197-Val203), alça-6 (LP-6, resíduos: Gly204-Gly208), e hélice- α -7 (AH-7, resíduos: Glu209-Arg225). A **Figura 15** mostra esses domínios usando a estrutura cristalográfica do complexo substrato-holoenzima (InhA-NADH-THT) (PDB ID: 1BVR).

Tabela 3. Códigos das estruturas 3D disponíveis no *Protein Data Bank*, da InhA na forma livre (Apo) ou co-cristalizada com ligantes, resolução e mutações.

Estrutura	PDB ID	R (Å)	Mutação	Estrutura	PDB ID	R (Å)	Mutação
Apo	2IED	2,14	S94A	éteres diarila	1P45	2,60	----
	4TRM	1,80	----		2B35	2,30	----
NADH	2AQ8	1,92	----		2B36	2,80	----
	2AQH	2,01	V21I		2B37	2,60	----
	2AQI	2,20	T47I		2X22	2,10	----
	2AQK	2,30	S94A		2X23	1,81	----
	3OEW	2,20	----		3FNE	1,98	----
	3OEY	2,00	E266T		3FNF	2,30	----
	3OF2	2,00	D266T		3FNG	1,97	----
	4DQU	2,45	D148G		3FNH	2,80	----
	4DRE	2,40	----		4OHU	1,60	----
	4DTI	1,90	S94A		4OIM	1,85	----
4TRN	1,95	----	4OXX		1,84	----	
Substrato mimético	1BVR	2,80	----		4OXXN	2,29	----
NAD+	1ENY	2,20	----		4OXY	2,35	----
	1ENZ	2,70	S94A		4OYR	2,30	----
	5CPB	2,00	A215I	5COQ	2,30	A203V	
INH-NAD	1ZID	2,70	----	5CP8	2,40	A215I	
	2IDZ	2,00	----	5CPF	3,41	A215I	
	2IE0	2,20	V21I	Fenil piridina	4R9R	2,90	----
	2IEB	2,20	S94A		4R9S	3,20	----
	2NV6	1,90	----	4,6-dimetil-pirimidin-2-ila	4UVD	1,82	----
	2PR2	2,50	----		4UVE	1,99	----
	4TRO	1,40	----		4UVG	1,92	----
ETH-NAD	2H9I	2,20	----		4UVH	1,89	----
PTH-NAD	2NTJ	2,50	----	4UVI	1,73	----	
Amidas	1P44	2,70	----	1,6-diidro piridazina	4D0R	2,75	----
	2NSD	1,90	----		4D0S	1,64	----
	4COD	2,40	----	Piridomicina	4BGE	2,25	S94A
	4QXM	2,20	----		4BGI	2,09	S94A
	4TRJ	1,73	----		4BII	1,95	----
	4TZK	1,62	----	Metil tiazol	4BQP	1,89	----
	4TZT	1,86	----		4BQR	2,05	----
	4U0J	1,62	----				
4U0K	1,90	----					

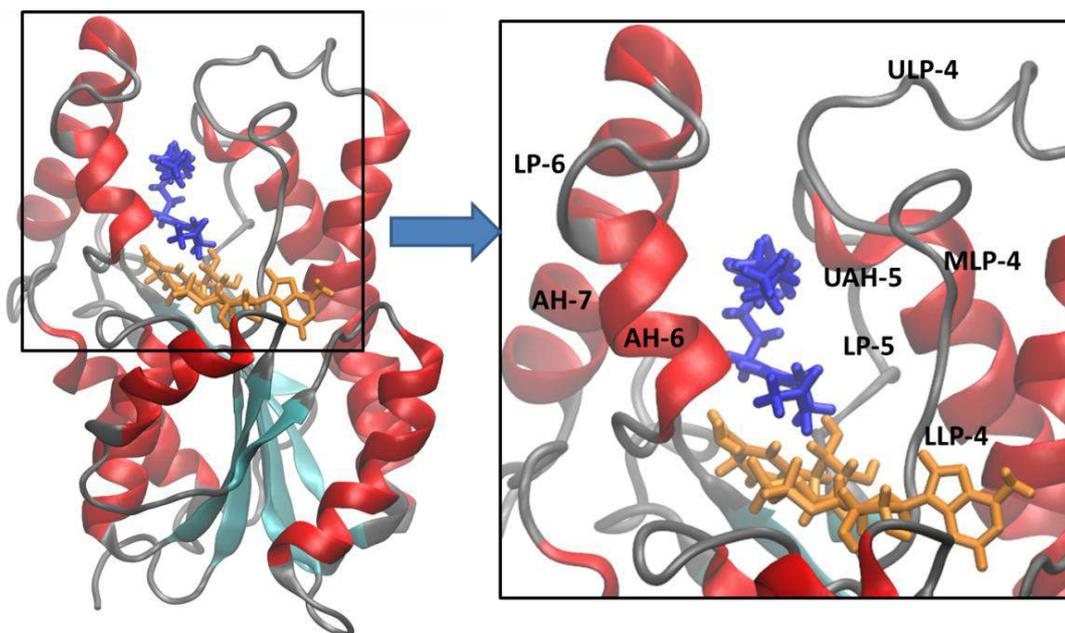


Figura 15. Representação 3D da estrutura da InhA (enoil-ACP redutase do *Mycobacterium tuberculosis*) ligada ao cofator (NADH; laranja) e ao substrato mimético (THT, azul) (PDB ID: 1BVR), e uma visão próxima do sítio de ligação, mostrando as estruturas secundárias dos domínios.

Ao compararmos as estruturas holoenzima (2AQ8) e substrato-holoenzima (1BVR) (**Figura 16**), observa-se uma aproximação dos domínios AH-6/LLP-4 e LP-6/MLP-4 na 2AQ8 e um afastamento destes mesmos domínios na 1BVR. Os domínios AH-6/LLP-4 funcionam como um portão, permitindo que o sítio de ligação adquira uma conformação aberta ou fechada, como descrito para outros inibidores da InhA (KUMAR, SOBHIA, 2013, 2014). A movimentação dos domínios LP-6/MLP-4 funciona como uma tampa, permitindo o fechamento do sítio de ligação acima do anel nicotinamida. A importância dessa movimentação para a InhA ainda não foi relatada, sendo descrita para as enzimas homólogas EcFabI e FtufabI ligadas ao triclosano (MEHBOOB et al., 2010; STEWART et al., 1999).

Para avaliar se os resíduos destas regiões realmente apresentam alta mobilidade, avaliou-se o fator de temperatura normalizado para a cadeia principal (C_{α}) da InhA (**Figura 16**). Na holoenzima, observa-se uma alta mobilidade nas regiões MLP-4 (principalmente do resíduo Met105) e LP-6 (principalmente dos resíduos Ala206 e Leu207). No complexo 1BVR, a presença do substrato estabiliza a região MLP-4 e aumenta a mobilidade das regiões AH-6 e LP-6, sendo as maiores variações nos resíduos Ala198 e Ser200. Em ambos os sistemas (2AQ8 e 1BVR), as regiões LP-5 e UAH-5 apresentam baixa mobilidade, provavelmente, por seus aminoácidos estarem menos expostos ao solvente.

Supreendentemente, a região AH-7 apresentou baixa mobilidade, apesar dos aminoácidos estarem expostos ao solvente e próximo a uma região de alta desordem.

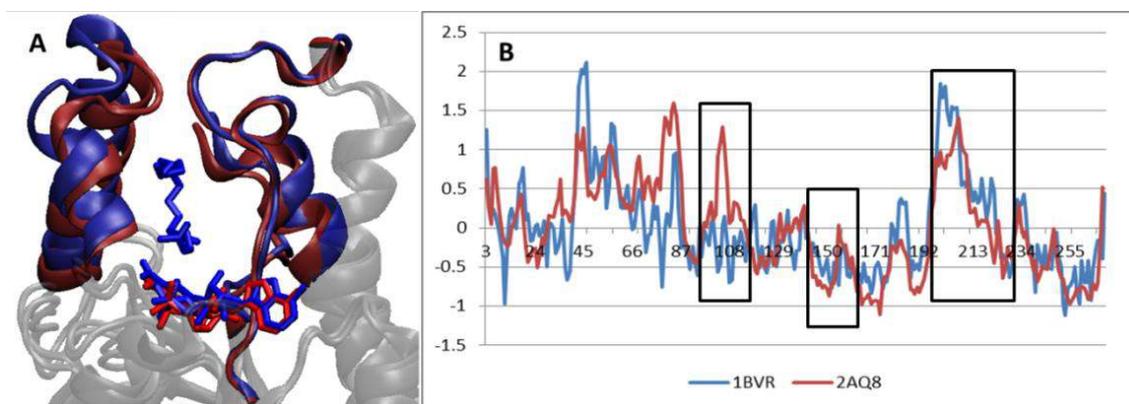


Figura 16. (A) Sobreposição das estruturas 3D dos complexos 2AQ8 (vermelho) e 1BVR (azul). (B) Gráfico do fator de temperatura (fator-B) para 2AQ8 (vermelho) e 1BVR (azul). As caixas retangulares destacam as regiões dos C α dos aminoácidos que compõem o sítio de ligação do substrato.

Os 10 complexos contendo os 10 derivados EDA (**Tabela 2** e **Figura 14**) ligados à holoenzima foram divididos em dois grupos de acordo com as características dos compostos. O grupo I contém compostos em que os substituintes alquila estão ligados ao anel fenoxila (anel B) e o grupo II contém os derivados que apresentam átomos de cloro ligados nas posições 2 e 4 do anel B.

Ao analisarmos o grupo I (**Figura 17**), observa-se que o complexo 2X23, que contém o ligante mais ativo ($pK_i = 9,86$), é a única estrutura que apresenta a região LP-6 ordenada como uma hélice- α , sendo que os resíduos Gly204 e Gly205 apresentam valores de fator-B normalizados negativos (-1,16 e -1,24, respectivamente), provavelmente, devido a interações por ligação hidrogênio que deixam esses resíduos ordenados, diminuindo, assim, a mobilidade. Os resíduos Gly208-Glu210 apresentam fator-B normalizado maior do que 1,0 (1,01, 1,41 e 1,34, respectivamente), indicando alta mobilidade desses resíduos.

O complexo 2B37, que contém o segundo composto mais ativo ($pK_i = 8,47$), apresenta uma falha na sua estrutura 3D, ocasionada pela falta de dados sobre as posições atômicas dos aminoácidos da região AH-6, provavelmente devido a alta mobilidade desses resíduos.

No complexo 2B36, contendo o terceiro composto mais ativo ($pK_i = 7,91$), a região AH-6 apresenta valores de fator-B normalizados acima de 1,0, indicando alta mobilidade, como consequência, a estrutura secundária é totalmente perdida.

No complexo 4OXY, a inspeção visual dos dados cristalográficos obtidos do PDB mostrou diferentes conformações para as cadeias laterais dos resíduos Ser152, Ile202, Val203 e Arg225, resultando em valores baixos do fator-B normalizado. Apesar disso, esses resíduos podem apresentar alta mobilidade. Outros resíduos que apresentam alta mobilidade são Met105 e os da interseção entre LP-6 (Ala206-Gly208) e AH-7 (Glu209-Gln216),

No complexo 4OIM, os resíduos Gln100-Asn106, Ser152, Arg153, Thr196-Gly208 apresentaram diferentes conformações com baixos valores de fator-B normalizado, exceto para Gly205 e Leu207 (LP-6) e Gly208 e Glu209 (AH-7), que apresentam alta mobilidade.

Ao analisarmos o grupo B (**Figura 18**), todos os complexos, com exceção do 2B35, apresentam estrutura secundária em hélice- α para Gly204-Ala206 da região LP-6 e uma região em alça compreendendo os resíduos Gly205 até Ala211 na região AH-7. Ao analisarmos o fator-B normalizado, observa-se que as regiões dos domínios AH-6, LP-6 e o início de AH-7 (Glu209-Gln216) apresentam valores maior do que 1,0, ou seja, esses resíduos apresentam alta mobilidade. Para 2B35, observa-se o mesmo comportamento descrito para 2B37, sendo que a falha da estrutura 3D da proteína compreende os resíduos Leu197 até Gln216, o que também pode indicar a alta desordem dos domínios AH-6, LP-6 e parte de AH-7.

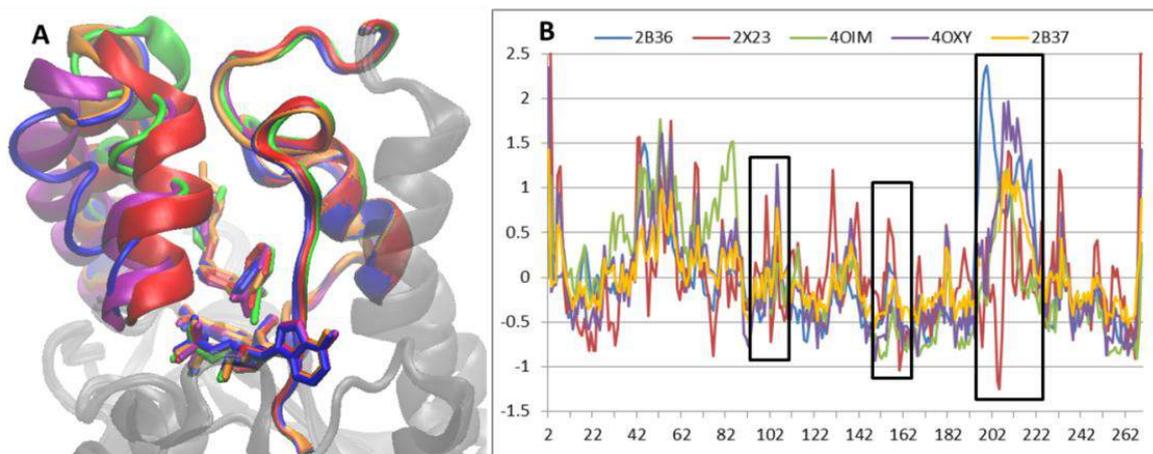


Figura 17. Sobreposição das estruturas 3D dos complexos 2B36, 2X23, 4OIM, 4OXY e 2B37 (A) e seus respectivos gráficos do fator de temperatura (fator-B normalizado) (B). As caixas retangulares destacam os C_{α} dos aminoácidos que compõem o sítio de ligação do substrato.

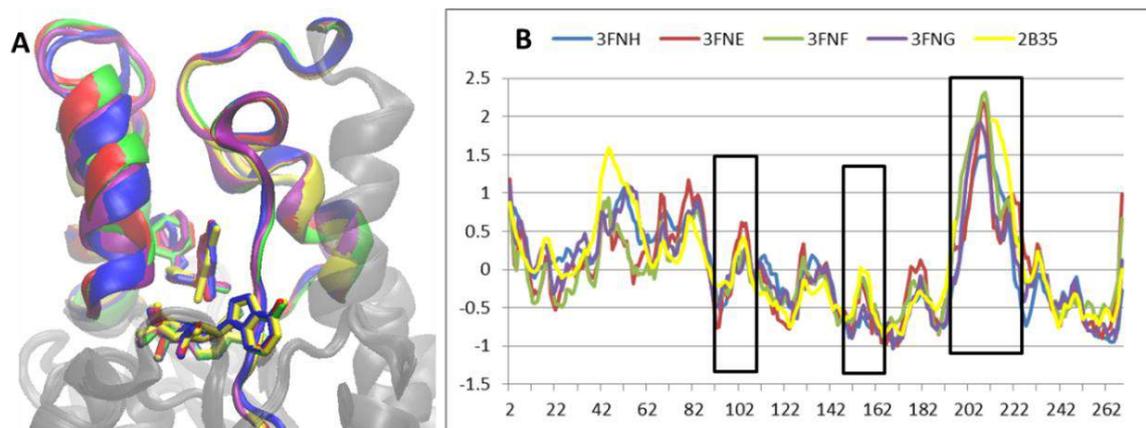


Figura 18. Sobreposição das estruturas 3D dos complexos 3FNH, 2FNE, EFNF, 3FNG e 2B35(A) e seus respectivos gráficos do fator de temperatura (fator-B normalizado) (B). As caixas retangulares destacam os C_{α} dos aminoácidos que compõem o sítio de ligação do substrato.

Em conjunto, a análise realizada para os dois grupos mostra que 2X23, 4OXY e 4OIM apresentam alta ordenação (fator-B normalizado entre -1,0 e 1,0) da região AH-6, sugerindo que o portão formado por LLP-4/AH-6 encontra-se fechado. Para 3FNH, 3FNE e 3FNG, o domínio AH-6 apresenta alta mobilidade (fator-B normalizado $< -1,0$ ou $> 1,0$), mesmo com os domínios LLP-4/AH-6 próximos, sugerindo que, apesar do portão estar fechado, a alta movimentação de AH-6 expõe a cavidade ao solvente.

O comportamento de abertura e fechamento de LLP-4/AH-6 é descrito na literatura para inibidores da InhA pela análise do fator-B (KUMAR, SOBHIA, 2013), sendo que não foi discutida a manutenção ou perda da estrutura secundária ou o aumento da flexibilidade dos domínios LP-6, AH-6 e o início da AH-7.

4.3. DOCAGEM MOLECULAR

4.3.1. VALIDAÇÃO DO PROTOCOLO DE DOCAGEM (REDOCAGEM)

Antes de realizar a docagem dos derivados EDA na enzima InhA, avaliou-se a habilidade do programa em prever a conformação e orientação pelo método de redocagem. Portanto, os complexos 2X23, 4OIM e 3FNE foram selecionados devido à alta resolução do cristal ($R \leq 2,0\text{\AA}$). O complexo 3FNG também apresenta $R < 2,0\text{\AA}$, porém ele foi descartado porque o grupo R do ligante obtido no arquivo PDB ($R = \text{ciclo-hexa-1,5-dien-ilmetila}$) é diferente do descrito no experimental ($R = \text{ciclo-hexilmetila}$).

Os complexos selecionados apresentam o cofator oxidado (NAD^+), porém, na sobreposição dos complexos 2AQ8 (holoenzima) e 1BVR (substrato-holoenzima), observa-se

que tanto NAD⁺ quanto NADH apresentam poses (conformação/orientação) similares, principalmente, próximo à região do grupo nicotinamida, por isso, na etapa de redocagem, considerou-se o cofator reduzido.

A **Tabela 4** mostra os resultados de redocagem para os ligantes TCU, 8PC e JUS: RMSD e número de ligações rotacionáveis (nLRot) dos ligantes, energia de interação ligante-cofator ($E_{\text{Lig-NADH}}$), ligante-enzima ($E_{\text{Lig-InhA}}$) e ligante-resíduos ($E_{\text{lig-res}}$) > 5,0 Kcal/mol.

De acordo com a **Tabela 4**, todos os valores RMSD são menores do que 2,0Å, indicando que o programa foi capaz de identificar a pose observada experimentalmente para cada complexo. Quando comparamos os valores de RMSD e o número de ligações rotacionáveis (NLigRot), observa-se que o programa apresenta boa predição para o ligante 8PC, sendo que ele é o que apresenta menor liberdade rotacional (NLigRot = 4). No caso dos ligantes TCU e JUS, o aumento dos valores de RMSD está relacionado ao aumento da liberdade rotacional (NLigRot = 7 e 8, respectivamente). Os valores encontrados durante a etapa de redocagem validam o protocolo de docagem, uma vez que valores de RMSD inferiores a 2,0Å são considerados aceitáveis (KONTOYIANNI, MCCLELLAN, SOKOL, 2004).

Tabela 4. Códigos PDB dos ligantes e valores de pK_i (M) utilizados na redocagem, valores de RMSD (Å), número de ligações rotacionáveis (nLRot) dos ligantes, energia de interação ligante-cofator ($E_{\text{Lig-NADH}}$), ligante-enzima ($E_{\text{Lig-InhA}}$) e ligante-resíduos ($E_{\text{lig-res}}$) > 5,0Kcal/mol.

Código (pK_i)	RMSD	nLRot	$E_{\text{Lig-NADH}}$	$E_{\text{Lig-InhA}}$	$E_{\text{lig-res}}$
TCU (9,86)	0,91	7	-50,63	-117,88	-5,55 (Gly96), -5,57 (Phe97), -13,81(Phe149), -23,27 (Tyr158), -9,21 (Met161), -9,77 (Ala198), -9,27 (Met199), -6,61 (Ile202), -9,03 (Val203)
8PC (7,78)	0,64	4	-51,63	-113,75	-6,93 (Gly96), -5,85 (Phe97), -19,57 (Phe149), -22,46 (Tyr158), -7,20 (Met161), -11,21 (Ala198), -13,85 (Met199)
JUS (7,07)	1,55	8	-51,92	-115,08	-6,71 (Gly96), -5,43 (Phe97), -15,91 (Phe149), -17,50 (Tyr158), -9,84 (Met161), -6,70 (Pro193), -12,69 (Ala198), -11,95 (Met199), -6,81(Ile202), +1,09 (Glu209)

A **Figura 19** apresenta as poses dos ligantes observadas no cristal sobrepostas à melhor pose obtida na redocagem, onde é possível observar que as maiores variações ocorrem no substituinte do anel A.

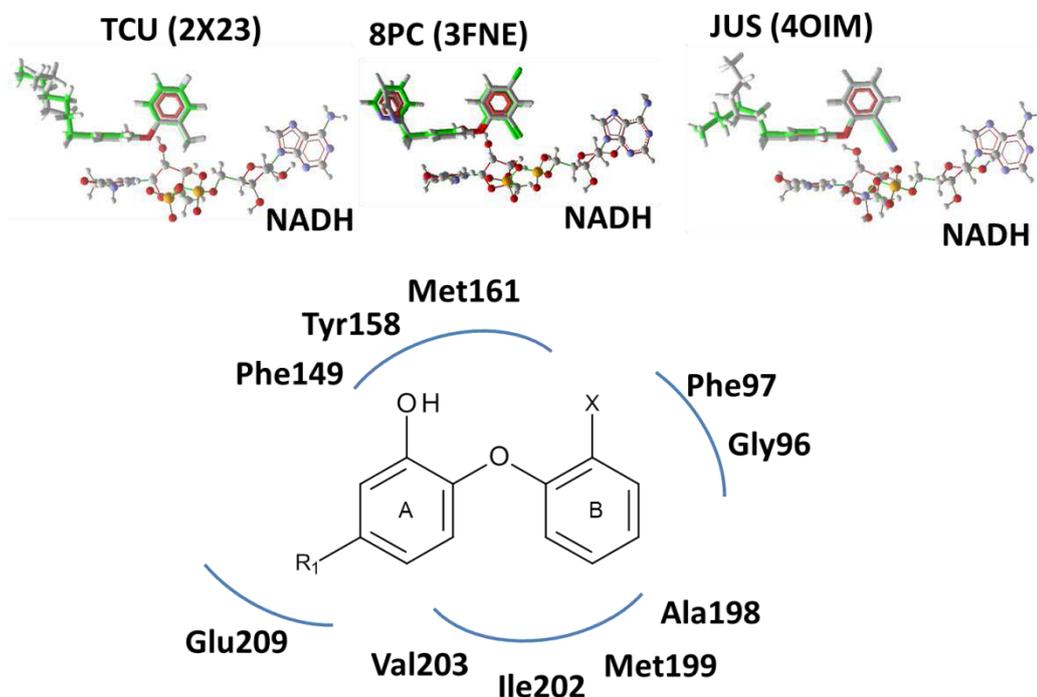


Figura 19. Sobreposição da melhor pose para os derivados TCU, 8PC e JUS obtidos na redocagem (verde) e das poses cristalográficas no sítio de ligação (cinza) da holoenzima dos complexos 2X23, 3FNE e 4OIM e as principais interações entre a holoenzima (InhA-NADH) e os compostos TCU, 8PC e JUS, respectivamente.

Para avaliar a preferência dos domínios que cada ligante interage, avaliou-se as energias de interação entre os ligantes, cofator e os resíduos do sítio de ligação (**Tabela 4** e **Figura 19**).

O composto TCU (mais ativo) é o que apresenta a menor energia de interação com o cofator e a melhor energia de interação com Tyr158, sendo que ele apresenta maior interação com os resíduos do domínio AH-6 (Ala198, Met199, Ile202 e Val203), o que diminuiria a mobilidade dessa região. Para 8PC, o substituinte $-\text{CH}_2$ (2-piridinil) aumenta, significativamente, a energia de interação com o domínio LP-5 (Phe149), mantendo a energia de interação com Tyr158 similar ao observado no composto mais ativo. O aumento da interação com o domínio LP-5 resulta numa maior aproximação do cofator e uma diminuição das interações com o domínio AH-6 (Ala198 e Met199), provavelmente, resultando no aumento da mobilidade dessa região. O composto JUS (menos ativo) apresenta a maior energia de interação com o cofator, com diminuição da energia de interação com Tyr158 e o

domínio AH-6, quando comparado com ATV05 (Ala198, Met199 e Ile202). Além disso, este composto apresenta interações hidrofóbicas desfavoráveis para Gly219 (região AH-7).

De fato, interações com resíduos pertencentes aos domínios LP-5 (Phe149-Ile157), UAH-5 (Tyr158 e Met161), AH-6 (Ala198, Met199, Ile202 e Val203) e AH-7 (Leu218 e Trp222) são importantes para a inibição da enzima (FREUNDLICH et al., 2009; SULLIVAN et al., 2006). A partir desses resultados de redocagem foi possível observar a diminuição da interação com o cofator e o aumento da interação com a Tyr158, que são importantes para a atividade biológica, enquanto que interações fortes com resíduos da região AH-6 podem aumentar a mobilidade dos resíduos, consequentemente, alterando a sua estrutura secundária.

Portanto, o complexo 2X23 foi escolhido para a etapa de docagem molecular por ser o complexo com o composto mais ativo do banco de dados deste trabalho, apresentando o sítio de ligação do substrato bem definido, com baixa variação do fator-B normalizado, quando comparado com 3FNE e 4OIM. Além disso, outras desvantagens de 3FNE e 4OIM são alta mobilidade dos resíduos que compõem o sítio ativo, resultando em baixa confiabilidade nas soluções obtidas durante a etapa de docagem.

4.3.2. DOCAGEM MOLECULAR DOS DERIVADOS ÉTERES DIARILAS

A docagem molecular dos compostos ativos descritos neste trabalho visa encontrar o melhor modo de ligação dos inibidores no sítio ativo da enzima, usando a holoenzima do complexo 2X23. No programa MVD, detectou-se a cavidade do sítio de ligação com um volume de $111,10\text{\AA}^3$ que engloba o ligante de referência e uma região próxima ao domínio AH-7 (**Figura 20**) (THOMSEN, CHRISTENSEN, 2006).

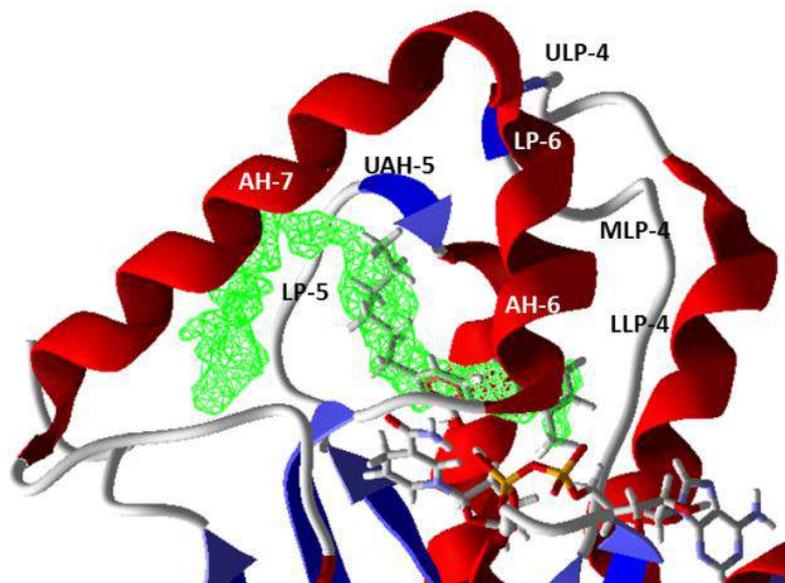


Figura 20. Representação 3D do sítio de ligação e da cavidade onde foi realizada a docagem molecular.

Na **Figura 20**, podemos observar que a cavidade se estende da região acima do grupo nicotinamida do cofator até a região compreendida entre os domínios LP-5 e AH-7. Para a escolha da pose, avaliou-se as soluções de acordo com o valor de energia de interação com a holoenzima pelas pontuações MolDock e Rerank.

Ao avaliarmos os compostos ATV04, ATV06 e ATV07, as soluções obtidas apresentam boa sobreposição no núcleo comum (**Figura 21**). Além disso, observamos que o menor valor de energia de interação com a holoenzima tanto pela pontuação MolDock quanto pela Rerank indicam a mesma solução, sendo, portanto, a pose preferencial para esses compostos (**Tabela 5**).

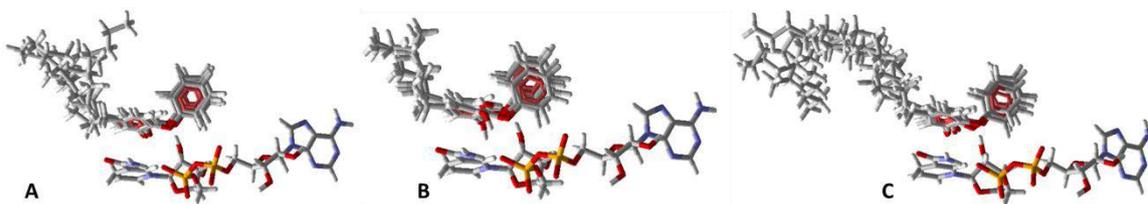


Figura 21. Sobreposição das cinco soluções obtidas por docagem molecular para cada composto: ATV04 (A); ATV06 (B); ATV07 (C).

Tabela 5. Valores das pontuações MolDock e Rerank (Kcal/mol) obtidos para as cinco soluções para cada um dos compostos ATV04, ATV06 e ATV07.

#	ATV04		ATV06		ATV07	
	MolDock	Rerank	MolDock	Rerank	MolDock	Rerank
00	-151,83	-115,77	-167,39	-128,57	-194,41	-148,03
01	-151,28	-113,26	-160,59	-119,72	-193,57	-146,63
02	-147,50	-108,51	-159,32	-118,01	-192,42	-146,09
03	-143,33	-106,54	-154,78	-114,42	-192,41	-144,94
04	-141,38	-106,27	-153,93	-94,92	-191,07	-144,57

A maioria dos compostos em que o anel B não é substituído, monossubstituído, dissubstituído ou o anel B é heteroaromático apresenta a mesma conformação e orientação dentro do sítio ativo, interagindo, principalmente, com Tyr158 e NADH e com os domínios LP-5 (Phe149, Pro156 e Ala157), UAH-5 (Met161) e AH-6 (Ala198, Met199, Ile202 e Val203) (**Figura 22**).

Para ATV44 e ATV19, observamos que o modo de ligação desses compostos é diferente dos demais da classe EDA. No caso do ATV44, a presença do anel aromático isoxazol ligado ao anel B impede que ele interaja com os resíduos próximos aos domínios LLP-4 e LP-6, alterando a orientação dentro do sítio de ligação de forma que o anel A ocupe essa região (**Figura 22**).

No caso do ATV19, a presença do grupo 4-piridina no anel A e do grupo ciano no anel B, introduz duas regiões na molécula capazes de interagir com a holoenzima como acceptor de ligação hidrogênio, resultando em dois modos de ligação distintos (**Figura 22**).

Ao analisarmos as poses obtidas pela pontuação MolDock, o inibidor está mais deslocado para as regiões AH-7 e LP-5, onde a interação por ligação hidrogênio ocorre entre o anel 4-piridina e a Tyr158 (O-H...N) e com o cofator (O-H...N). No caso da solução obtida pela pontuação Rerank, observamos que o anel 4-piridina realiza interações por ligação hidrogênio com Gln214 (N-H...N), enquanto o grupo ciano interage por ligação hidrogênio com o cofator (O-H...N). Portanto, as duas poses serão avaliadas pelo método de dinâmica molecular a fim de identificar alterações no sítio de ligação que possam indicar o modo de ligação prioritário.

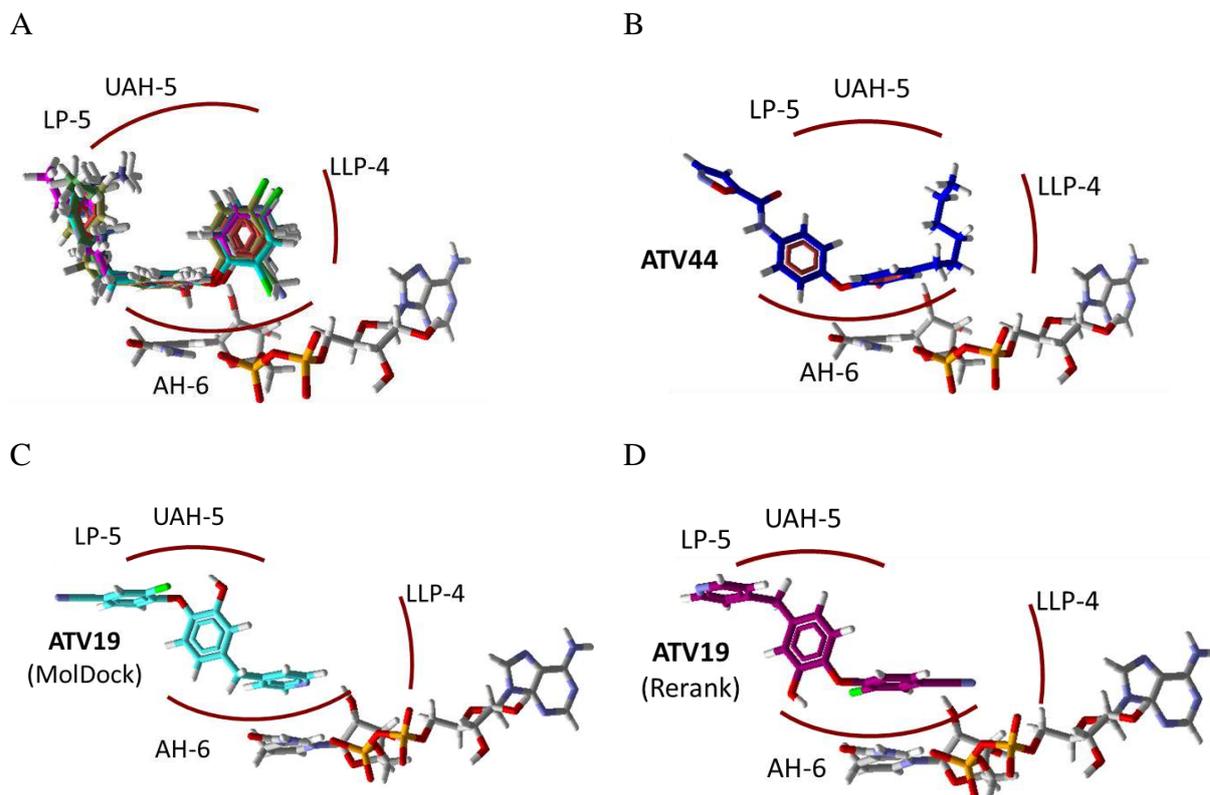


Figura 22. Modo de ligação dos EDA. (A) Compostos sem substituintes no anel B, monossubstituídos, dissustituídos e heteroaromáticos; (B) ATV44; (C) ATV19 (MolDock); (D) ATV19 (Rerank).

4.4. ESTUDOS POR DM

O estudo de docagem molecular foi importante para observar a conformação e orientação dos inibidores dentro do sítio de ligação quando a enzima está na sua forma fechada. Infelizmente, não foi possível determinar diferenças entre as interações que possam ser correlacionáveis com a atividade biológica dos inibidores, por isso, estudos de DM foram realizados com o intuito de avaliar o comportamento das poses obtidas para os complexos InhA-NADH-inibidor em função do tempo de simulação.

4.4.1. ANÁLISE COMPARATIVA DA HOLOENZIMA (2AQ8) E DA HOLOENZIMA-SUBSTRATO (1BVR)

Como a movimentação da cadeia lateral influencia a pose, iniciamos o estudo de DM comparando duas estruturas cristalográficas, uma onde a enzima apresenta uma conformação

fechada sem o ligante (2AQ8) e outra onde a enzima apresenta uma conformação aberta com o substrato mimético (1BVR).

A estabilidade estrutural dos complexos 2AQ8 e 1BVR foi avaliada de acordo com a variação do RMSD durante o tempo de simulação. Recentemente, diversos estudos de DM com a InhA tem demonstrado que tempos de simulação entre 5 e 50 ns são suficientes para obtenção de dados significativos sobre a movimentação de cadeias laterais (GAO, YANG, ZHU, 2010; KAMSRI et al., 2014a, 2014b; KUMAR, SOBHIA, 2013; NTIE-KANG et al., 2014; PUNKVANG et al., 2010; YANG et al., 2011). Nesses estudos, em geral, os autores consideram a sistema estável quando o RMSD da cadeia principal da proteína alcança um valor constante.

Após obter as trajetórias (**Figura 23**), a cadeia principal, o cofator e o substrato foram agrupados usando o algoritmo Gromos (DAURA et al., 1999), usando o valor de RMSD obtido como valor de corte. Nesta análise, a estrutura que apresenta mais vizinhos é definida como o centro do *cluster*, portanto, a interação ligante-receptor pode ser relacionada com poucos modos de ligação.

No caso da cadeia principal, $\text{RMSD} \leq 1,5 \text{ \AA}$ resulta em um baixo número de agrupamentos tanto para a holoenzima (5 grupos) quanto para o holoenzima-substrato (3 grupos), onde o *cluster* mais populoso contém mais de 80% das conformações (88,4% e 88,6%, respectivamente).

Ao compararmos as estruturas médias de 2AQ8 e 1BVR (**Figura 23**), observa-se a perda da estrutura secundária dos domínios AH-6 e AH-7 na presença do substrato mimético, que também é resultado da aproximação do grupo nicotinamida da ligação dupla (C=C) do substrato (**Figura 23**).

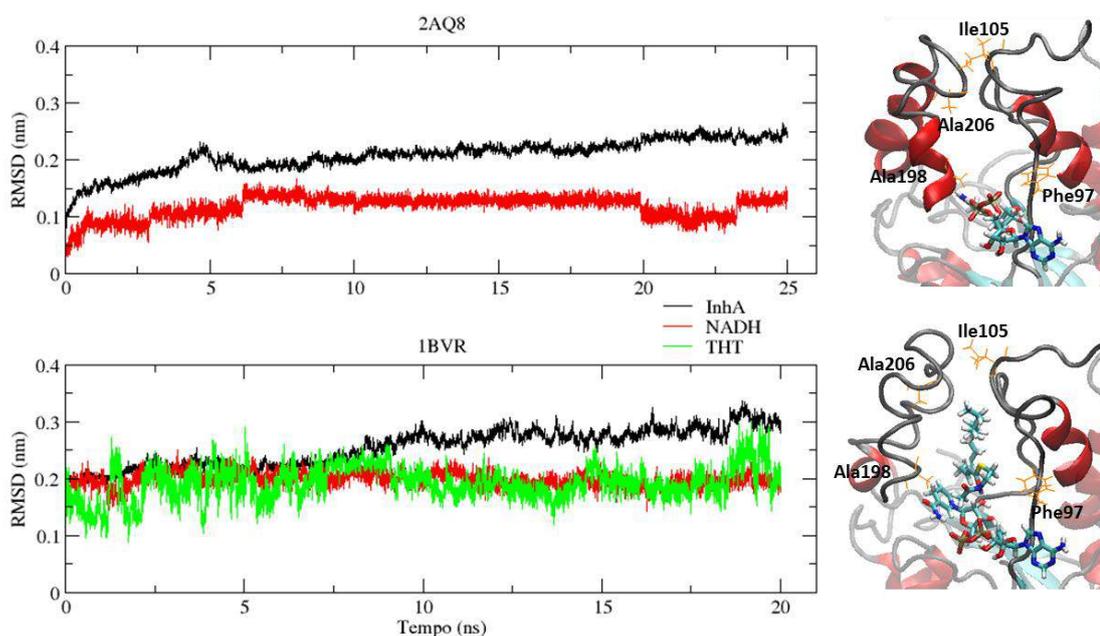


Figura 23. Gráfico de RMSD para os complexos 2AQ8 e 1BVR com suas respectivas representações do *cluster* mais populoso para os 5ns finais de simulação.

Para avaliar a mobilidade estrutural da proteína no cristal e na estrutura média obtida por DM, comparamos os valores de fator-B obtido por difração de raios-X (experimental) e calculado. O complexo 2AQ8 apresenta uma alta estabilidade nos resíduos (C_{α}) mais internos do sítio de ligação do substrato, enquanto os resíduos Pro107-Asp110, e Glu209, Glu210, Ala213 e Gln216 apresentam maior mobilidade devido à exposição ao solvente (**Figura 24**).

A presença do substrato no sítio de ligação (1BVR) diminui a mobilidade do domínio ULP-4, quando comparado com a holoenzima, mas aumenta a mobilidade do domínio LP-6 e da região inicial de AH-7 (Glu209-Ala213), devido ao alto grau de liberdade conformacional do THT (**Figura 25**).

Para avaliar a mobilidade na ausência e na presença do substrato, calculou-se a diferença do fator-B entre os complexos holoenzima e holoenzima-substrato, sendo que na ausência de substrato, os resíduos Pro107-Phe109 apresentam maior mobilidade, enquanto que os domínios LP-6 e a região inicial de AH-7 adquirem alta mobilidade quando o substrato está ligado (**Figura 26**).

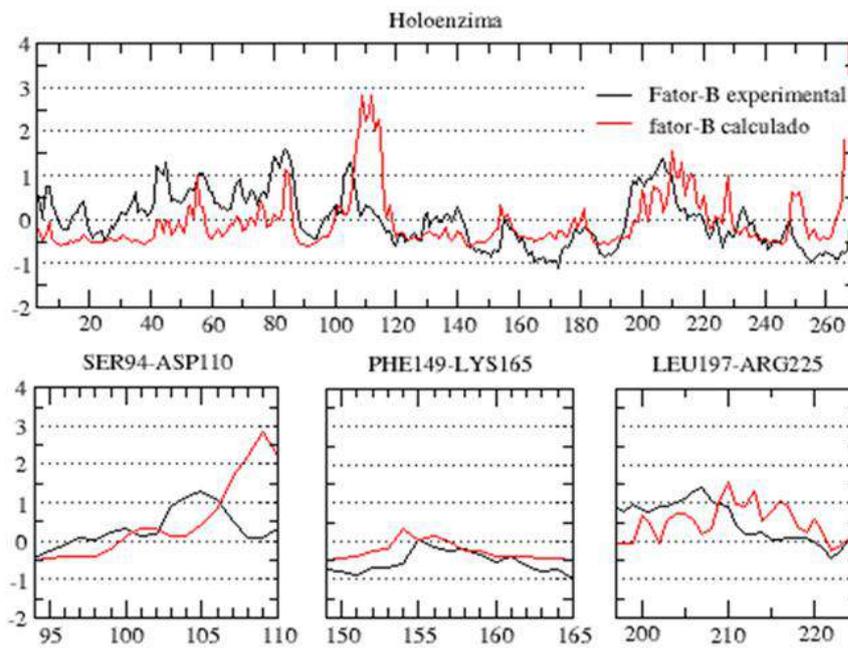


Figura 24. Gráfico da variação do fator-B experimental e calculado para o complexo 2AQ8.

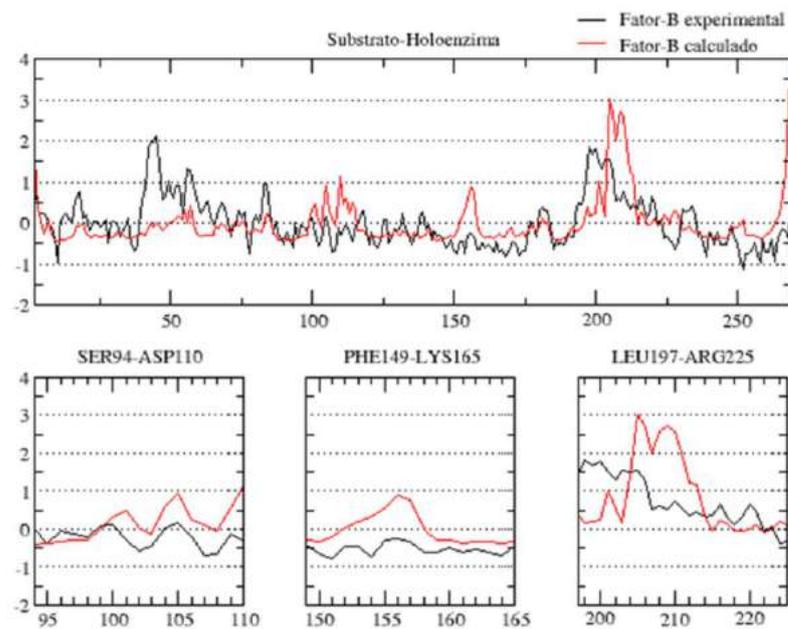


Figura 25. Gráfico da variação do fator-B experimental e calculado para o complexo 1BVR.

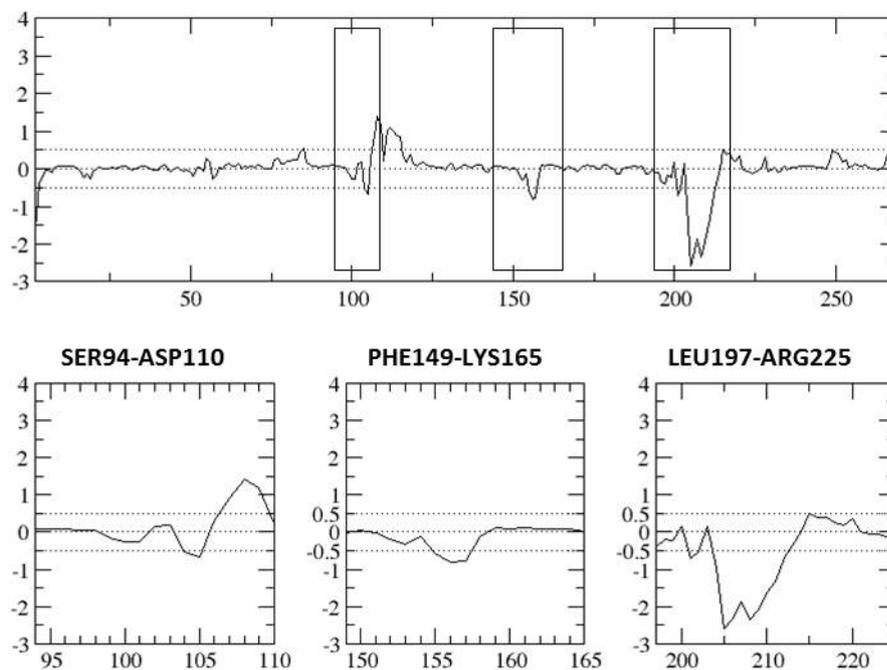


Figura 26. Gráfico da diferença de variação do fator-B calculado para o complexo 2AQ8 e 1BVR. Os retângulos mostram as regiões que compõem o sítio de ligação.

A análise do RMSD espacial (**Figura 27**) mostra que o aumento da mobilidade na presença do substrato ocasiona a desnaturação parcial do domínio AH-6 que assume uma conformação hélice-3₁₀ (Leu197-Ser200), enquanto o domínio AH-7 apresenta desnaturação parcial entre Glu209-Ile215. No complexo 1BVR, o substrato mimético THT parece influenciar na mobilidade de LP-6 e AH-7 sem alterar a estrutura secundária de AH-6.

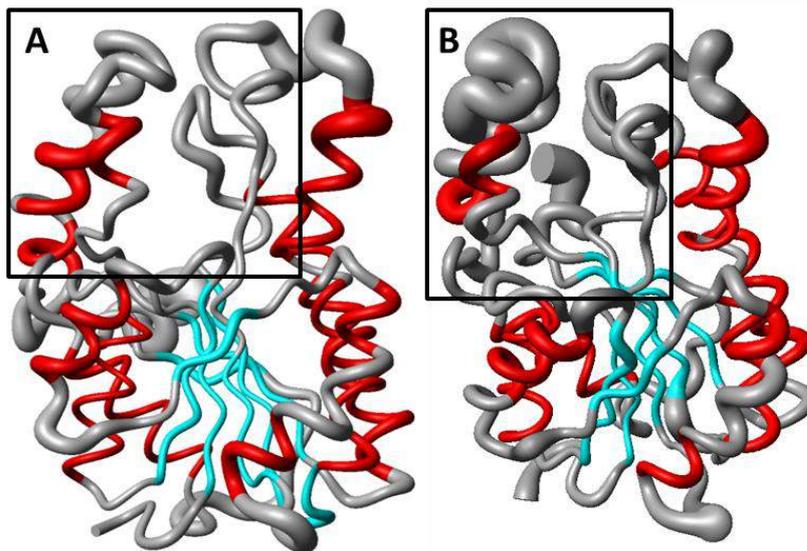


Figura 27. Gráfico do RMSD espacial para os 5ns finais de simulação dos complexos (A) 2AQ8 e (B) 1BVR. Vermelho = hélice- α ; ciano = folhas- β ; cinza = alça.

A maior mobilidade da interseção entre LP-6 e AH-7 (Gly204-Ile215), que parece funcionar como uma tampa, aumenta ou diminui a exposição dos resíduos catalíticos (Lys165, Phe149 e Tyr158) e do grupo nicotinamida do cofator, facilitando ou dificultando o acesso de solvente ao sítio de ligação. Esse comportamento foi descrito para as enzimas homólogas EcFabI-NADH-TCL e FtuFabI-NAD-TCL (MEHBOOB et al., 2010; STEWART et al., 1999), enquanto que para a InhA, existe uma divergência se a abertura/fechamento do portão formado pelas regiões LLP-4/AH-6 está correlacionada às formas aberta e fechada da enzima (KAMSRI et al., 2014a; KUMAR, SOBHIA, 2013, 2014; PAN et al., 2014).

Para monitorizar a abertura/fechamento do portão (LLP-4/AH-6) e da tampa (MLP-4/LP-6) que caracteriza os diferentes estados conformacionais da enzima, foram medidas as distâncias interatômicas entre os átomos de C_{α} dos pares Phe97/Ala198 (LLP-4/AH-6) e Ile105/Ala206 (MLP-4/LP-6) durante os 5ns finais de simulação, que estão representados sobrepostos na **Figura 28**. As distâncias entre LLP-4/AH-6 e MLP-4/LP-6 são menores na holoenzima (9,71 Å e 7,19 Å, respectivamente) do que no complexo substrato-holoenzima (14,95 Å e 10,06 Å, respectivamente), indicando uma conformação fechada para o complexo InhA-NADH, onde a tampa protege a cavidade de ligação do substrato. No caso do complexo InhA-NADH-THT, observamos uma conformação aberta que deixa o substrato exposto a interações com o solvente devido a distância entre os domínios MLP-4 e LP-6.

Ao analisarmos as estruturas médias para os *clusters* mais populosos dos complexos holoenzima e InhA-NADH-substrato, o InhA-NADH apresenta quatro interações por ligação

hidrogênio, sendo que duas moléculas de água realizam interação por ligação hidrogênio reforçada por carga com Lys165 por um tempo de persistência > 90% (**Figura 28**).

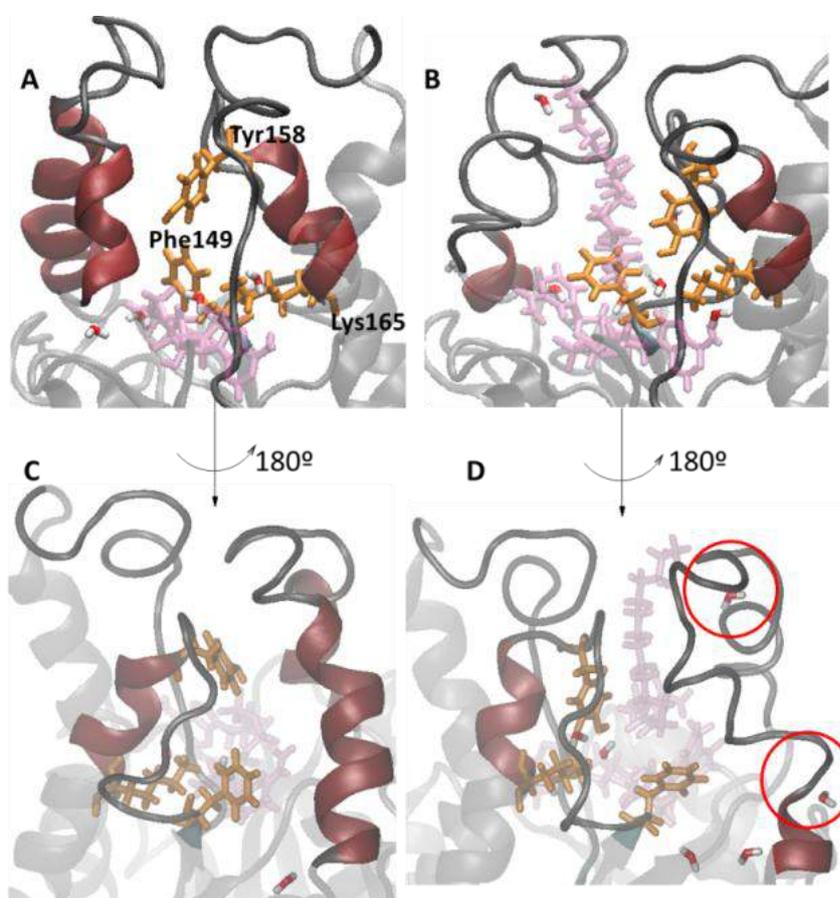


Figura 28. Representação das estruturas médias para os *clusters* mais populosos dos complexos 2AQ8 (A) e 1BVR (B), destacando a tríade catalítica e as moléculas de água numa visão frontal (C) e após um giro de 180° (D).

Na presença do THT (**Figura 28**), observamos cinco moléculas de água interagindo com a proteína por ligação hidrogênio, sendo que duas moléculas de água próximas a Lys165 apresentam o mesmo comportamento descrito na holoenzima, com tempos de persistência também superiores a 90% do tempo de simulação. Além disso, observamos ligações hidrogênio mediadas por água entre os resíduos Leu207 e Gly208 (95 e 89%, respectivamente) e Gly221 e Asp223 (89 e 94%, respectivamente), responsáveis pela alta mobilidade descrita na análise do RMSD espacial, resultando na perda da estrutura secundária de AH-7.

Outro fato interessante é que o cofator altera sua conformação na presença do substrato, assumindo uma conformação dobrada, diferente da conformação estendida

observada na holoenzima, indicando que esta mudança conformacional favorece a aproximação do grupo nicotinamida da ligação dupla (C=C) do substrato, arranjo espacial que irá favorecer a transferência de um hidreto para a ligação dupla do substrato mimético.

Ao analisarmos a **Figura 29**, observamos que os resíduos Phe149 e Tyr158 apresentam alterações conformações importantes na ausência (2AQ8) ou presença (1BVR) do substrato ligado no sítio de ligação. O resíduo Phe149, segundo ROZWARSKI e colaboradores (1999), tem a função de limitar a cavidade hidrofóbica, forçando o substrato mimético a assumir uma conformação em “U”, além de controlar a entrada de moléculas do solvente na cavidade. O resíduo Tyr158, é responsável pela estabilização do enolato proposto como intermediário formado logo após a etapa de transferência de hidreto, deslocando $\sim 60^\circ$ para fora do sítio de ligação na presença do substrato (ROZWARSKI et al., 1999).

De fato, o resíduo Phe149 realiza uma torção de aproximadamente 45° , permitindo que o substrato realize uma interação hidrofóbica do tipo sigma-pi, além de aumentar o volume da cavidade, acomodando melhor substratos com cadeia alifática maiores. Além disso, a mudança conformacional permite que uma molécula de água interaja com a Met155 por ligação hidrogênio (84% de persistência), localizada no domínio UAH-5 (**Figura 29**).

No caso da Tyr158, ela realiza um movimento de saída da cavidade de ligação, permitindo que o substrato se acomode próximo ao cofator. Esse movimento foi descrito primeiro por ROZWARSKI e colaboradores (1999) e depois por SHIRUDE e colaboradores (2013), como sendo fundamental para o aumento da atividade biológica. Portanto, avaliou-se a distribuição dos ângulos diedros φ (Phi; $C_{i-1}-N_i-C_{\alpha i}-C_i$), ψ (Psi; $N_i-C_{\alpha i}-C_i-N_{i+1}$), χ_1 (Chi1; $N_i-C_{\alpha}-C_{\beta}-C_{\gamma}$) e χ_2 (Chi2; $C_{\alpha}-C_{\beta}-C_{\gamma}-C_{\delta 1}$) dos resíduos Phe149 e Tyr158 (**Figura 29**).

Para o resíduo Phe149, observamos que a presença do substrato promove deslocamento da cadeia principal, permitindo que o plano do anel aromático adquira uma orientação perpendicular ao C_{α} (χ_2), evitando colisões estéricas com a cadeia principal da proteína. Esse deslocamento provoca um aumento da mobilidade dos resíduos que compõe o domínio UAH-5, provavelmente, devido à troca da interação na ligação hidrogênio entre Met155(O) e Tyr158(N), com 71% de persistência, por outra entre Met155 e uma molécula do solvente (Met155-HOH, 84,2%).

A perda da interação via ligação hidrogênio entre Met155-Tyr158 pode ser notada pelo aumento da mobilidade do diedro φ da Tyr158, onde esse ângulo de torção passa a variar de -90° a -150° , aproximadamente. No caso do diedro ψ , esse ângulo passa de aproximadamente, -30° para $+30^\circ$, indicando a saída da cadeia secundária da Tyr158 do

interior da cavidade para a periferia. Essa mudança de conformação é acompanhada pela perda da ligação hidrogênio com Met161 (80,0%), sendo substituída pela interação por ligação hidrogênio com o substrato (87%). Para os diedros χ_1 e χ_2 , observamos pequenas diferenças na disposição da cadeia lateral, onde para χ_1 existe uma disposição de $\sim 90^\circ$ tanto na holoenzima ($87,0^\circ$) quanto na substrato-holoenzima ($75,4^\circ$). No caso do diedro χ_2 , a interação com o substrato promove diminuição do valor de χ_2 de $57,8^\circ$ para $35,4^\circ$, forçando a cadeia lateral a assumir uma conformação quase eclipsada com a cadeia principal, que seria desfavorável devido às colisões estéricas.

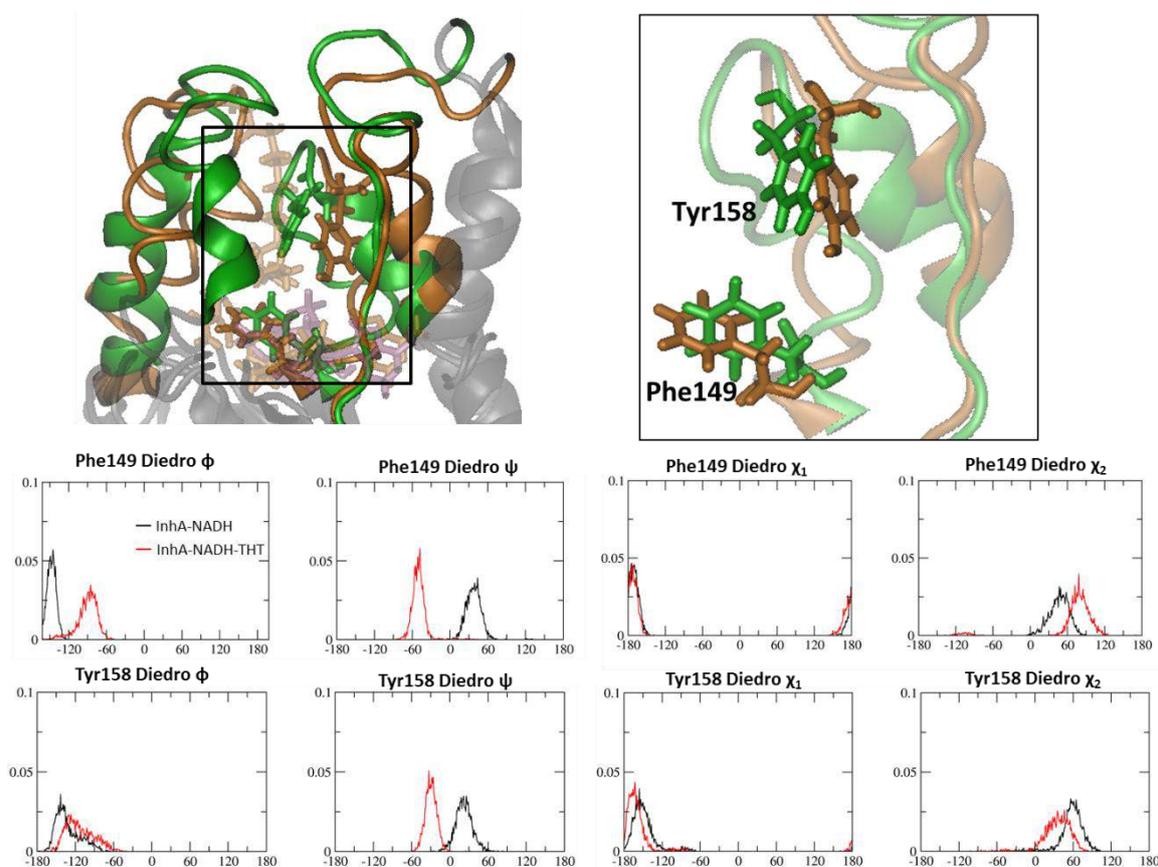


Figura 29. Representação gráfica da mobilidade dos resíduos Phe149 e Tyr158 considerando os diedros ϕ , ψ , χ_1 e χ_2 nos complexos 2AQ8 (verde) e 1BVR (laranja).

De fato, as movimentações de Phe149 e Tyr158 são críticas para a interação ligante-enzima, sendo que o aumento do sítio de ligação favorece um maior número de contatos entre o ligante e a enzima, porém, a saída da Tyr158 é desfavorável estericamente, apesar de manter uma interação via ligação hidrogênio que se contrapõe a interação desfavorável.

Os sistemas holoenzima e holoenzima-substrato são exemplos onde diversos fatores podem influenciar na afinidade da enzima, como perda de estrutura secundária, aumento de

interações com o solvente e movimentações desfavoráveis, principalmente, aquelas relacionadas ao resíduo Tyr158.

4.4.2. ANÁLISE DAS MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS NAS SIMULAÇÕES DE DM PARA HOLOENZIMA-INIBIDORES

Nas simulações de DM dos sistemas holoenzima-inibidores, foram utilizadas como estruturas de partida os complexos dos EDA com as coordenadas da InhA, obtidas do complexo 2X23, que contém o composto mais ativo da série. Portanto, uma análise preliminar comparando este complexo com a holoenzima revelou que enzima, cofator e inibidor estabilizam antes dos primeiros 10ns, sendo que os critérios estabelecidos só foram alcançados após 25ns de simulação (**Figura 30**).

Ao analisarmos a estrutura média obtida nos últimos 5ns de simulação, observamos a manutenção da estrutura secundária dos domínios AH-6 e AH-7, onde as distâncias médias referentes entre os domínios LLP-4/AH-6 e MLP-4/LP-6 foram 9,12 e 6,16Å, respectivamente, indicando que o complexo apresenta uma conformação similar a da holoenzima, ou seja, fechada.

A seguir, comparou-se a mobilidade dos resíduos do complexo InhA-NADH-ATV05 pela diferença do fator-B calculado entre os complexos 2AQ8 e 2X23 (**Figura 31**), demonstrando que as regiões que compõem o sítio de ligação estão mais estabilizadas do que na holoenzima, exceto na interseção LP-6/AH-7, na qual o Gly212 apresenta mobilidade moderada. Esta estabilidade pode ser verificada quando avaliamos o RMSD espacial do C_{α} , quando realmente se observa uma mobilidade moderada na interseção LP-6/AH-7.

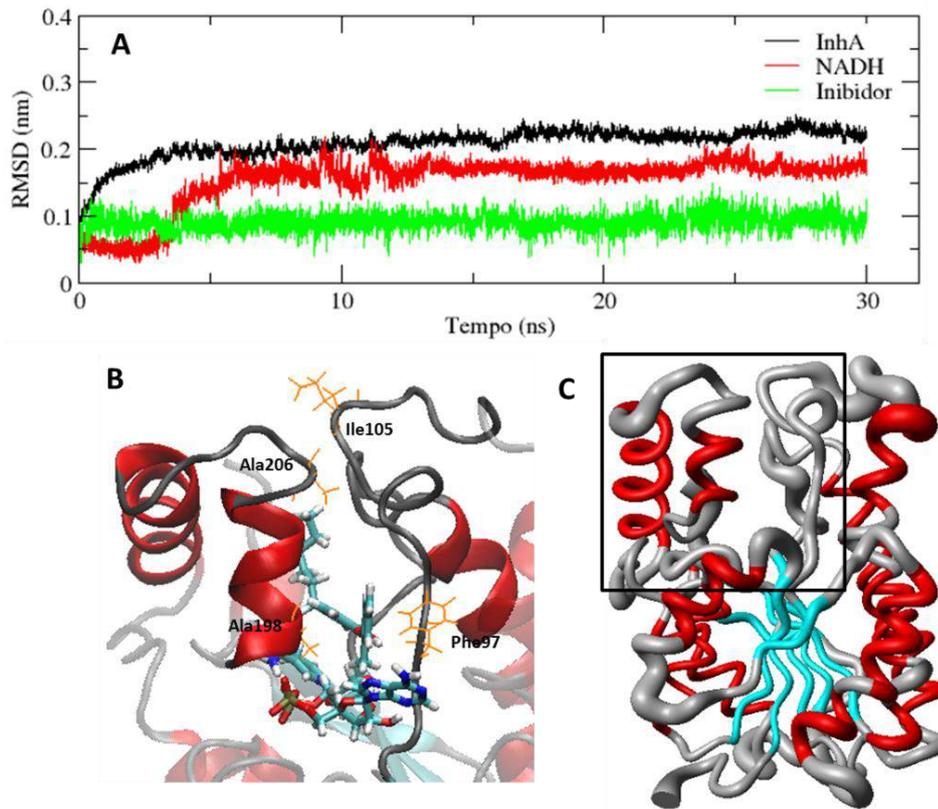


Figura 30. (A) Gráfico de RMSD para o complexo 2X23 (holoenzima-ATV05) durante os 30ns de simulação. (B) Estrutura média do *cluster* mais populoso do complexo 2X23 durante os 5ns finais. (C) Representação do RMSD espacial do complexo 2X23.

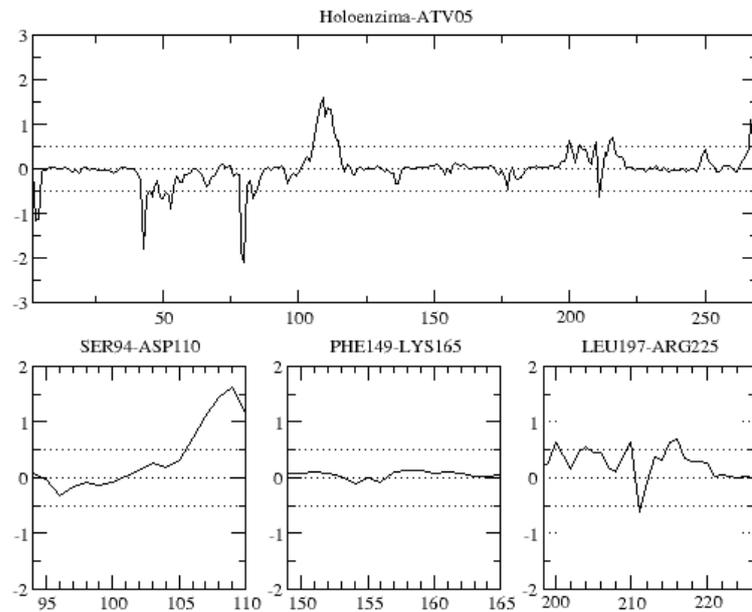


Figura 31. Gráfico da diferença de variação do fator-B calculado para os complexos 2A98 e 2X23.

Portanto, o complexo 2X23 seria a situação onde o inibidor possui maior afinidade pela enzima, por isso, durante o estudo de docagem molecular não foi possível detectar diferenças importantes, além da orientação e conformação no sítio ativo, que pudessem ser correlacionadas com a atividade biológica.

Ao analisarmos as interações via ligação hidrogênio nas estruturas secundárias do sítio de ligação no complexo InhA-NADH-ATV05, observamos interações entre os domínios ULP-4 e LP-6 (Ile105N...Ala206O) com tempo de persistência de 80%. Além disso, a interação por ligação hidrogênio entre Glu210N...Gly204O (74,5%) diminui a mobilidade dos seis resíduos que compõe essa volta, justificando a aproximação dos domínios MLP-4/LP-6.

Ao analisarmos a interação da enzima com o solvente, observamos a presença de moléculas de água fora da cavidade, o que justificaria a baixa mobilidade dos C_{α} e a manutenção das estruturas secundárias de AH-6 e AH-7 (**Figura 32**).

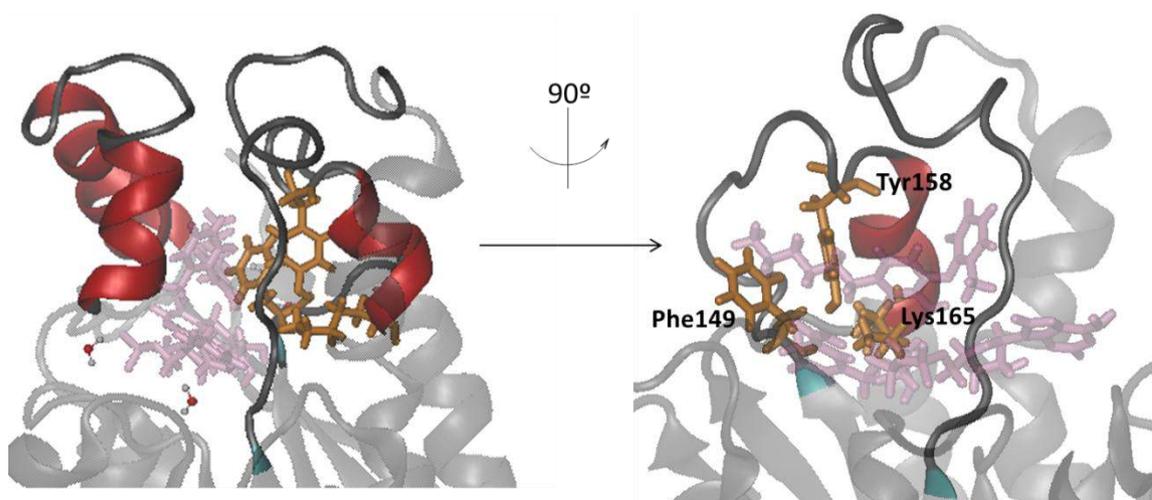


Figura 32. Representação da estrutura média para o *cluster* mais populoso do complexo InhA-NADH-ATV05 (2X23), destacando a tríade catalítica e as moléculas de água, numa visão frontal (esquerda) e após um giro de 90° (direita).

Ao compararmos a movimentação da Phe149 nos complexos holoenzima e InhA-NADH-ATV05 (**Figura 33**), observamos que quase não há alteração do diedro ϕ , visto que a cadeia principal desse resíduo interage fortemente com Asp148 por ligação hidrogênio, diminuindo a mobilidade desse diedro. No caso do diedro ψ , o valor do ângulo de torção passa de 30° para 120°, um aumento de cerca de 90°, permitindo a interação da cadeia principal da Phe149 com Tyr158 (TyrOH...Phe149O, 87,9%). A variação do diedro χ_2 (de ~50° para -90°), onde o anel aromático adquire uma orientação perpendicular ao C_{α} , ocorre para evitar possíveis colisões estéricas com a cadeia principal da proteína, como relatado para

o substrato. A interação por ligação hidrogênio entre Phe149 e Tyr158 diminui a mobilidade dos resíduos da alça, além de facilitar a interação por ligação hidrogênio entre Tyr158N...Met155O (79,0%), conferindo mais rigidez ao domínio UAH-5.

No caso dos ângulos de torção da Tyr158, o diedro ϕ passa de -150° para -90° , adquirindo uma conformação ortogonal ($\sim 90^\circ$), com redução da mobilidade, permitindo a interação da cadeia lateral com a cadeia principal de Phe149. O diedro ψ passa de 30° para -30° , indicando a saída da cadeia lateral para o exterior da cavidade com a manutenção da ligação hidrogênio com Met161 (Met161N...Tyr158O, 84,0%). Não há alteração significativa na disposição das cadeias laterais diedros χ_1 e χ_2 .

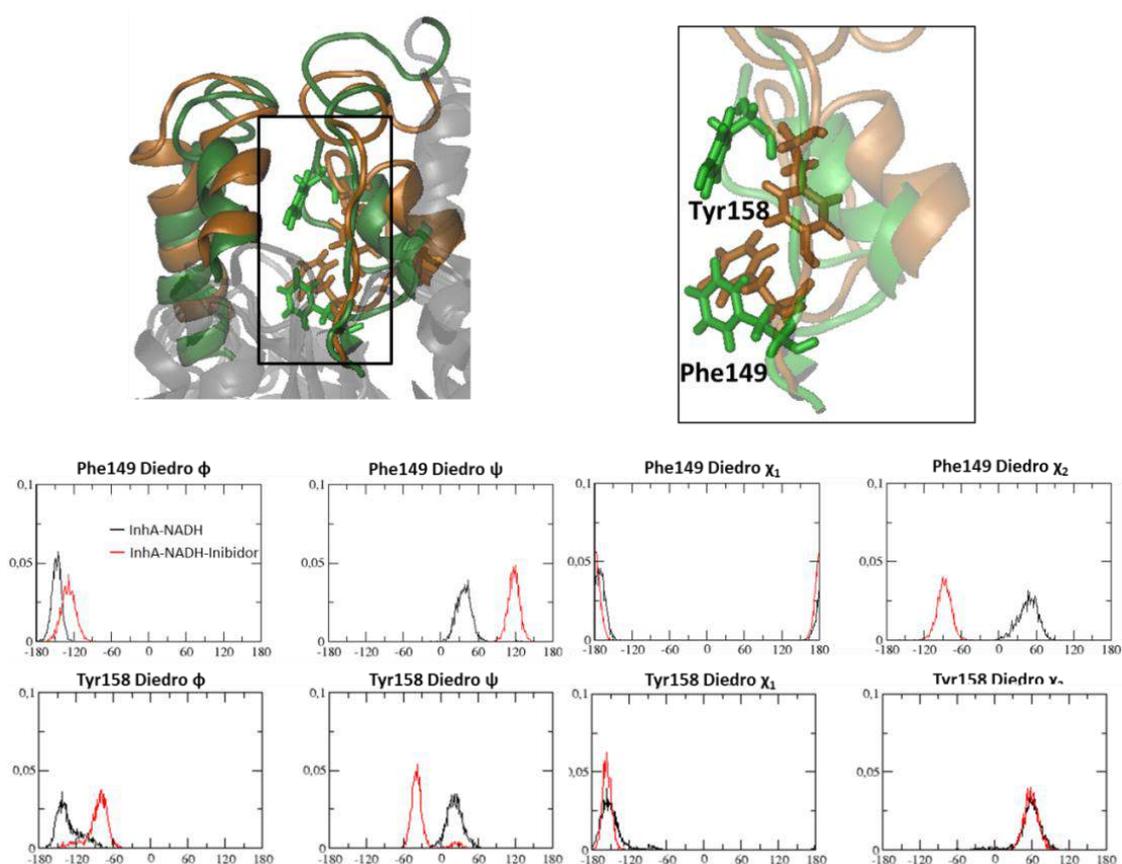


Figura 33. Comparação da mobilidade dos resíduos Phe149 e Tyr158 referente aos diedros ϕ , ψ , χ_1 e χ_2 para os complexos 2AQ8 (verde) e InhA-NADH-ATV05 (laranja).

Com o intuito de facilitar a compreensão das alterações que cada inibidor possa promover na InhA-NADH, utilizou-se o mesmo critério adotado durante o estudo de docagem molecular, separando as moléculas em grupos e avaliando as modificações pontuais que por ventura possam ocorrer.

Ao compararmos os complexos com os inibidores ATV06 ($pK_i = 8,47$ M), ATV04 ($pK_i = 8,11$ M) e ATV03 ($pK_i = 7,91$ M), que são os mais ativos dos compostos sem

substituinte no anel B, observaram-se diferenças significativas entre as estruturas médias para os agrupamentos mais populosos (**Figura 34**).

De fato, o aumento da cadeia lateral do substituinte alquila ligado à posição 5 do fenol (anel A) induz a perda da estrutura secundária do domínio AH-6, como no caso do ATV06 (R= octila), enquanto que o inibidor ATV04 (R = hexila) mantém, parcialmente, a estrutura. No caso do inibidor ATV03 (R = pentila), apesar do domínio AH-6 ter perdido a estrutura secundária, observaram-se interações fortes por ligação hidrogênio entre os resíduos Thr196O...Ser200N (94,6%), Met199O...Val203N (98%), Ile202O...Leu207N (94,4%), indicando que esta região mantém uma conformação próxima a uma hélice- α .

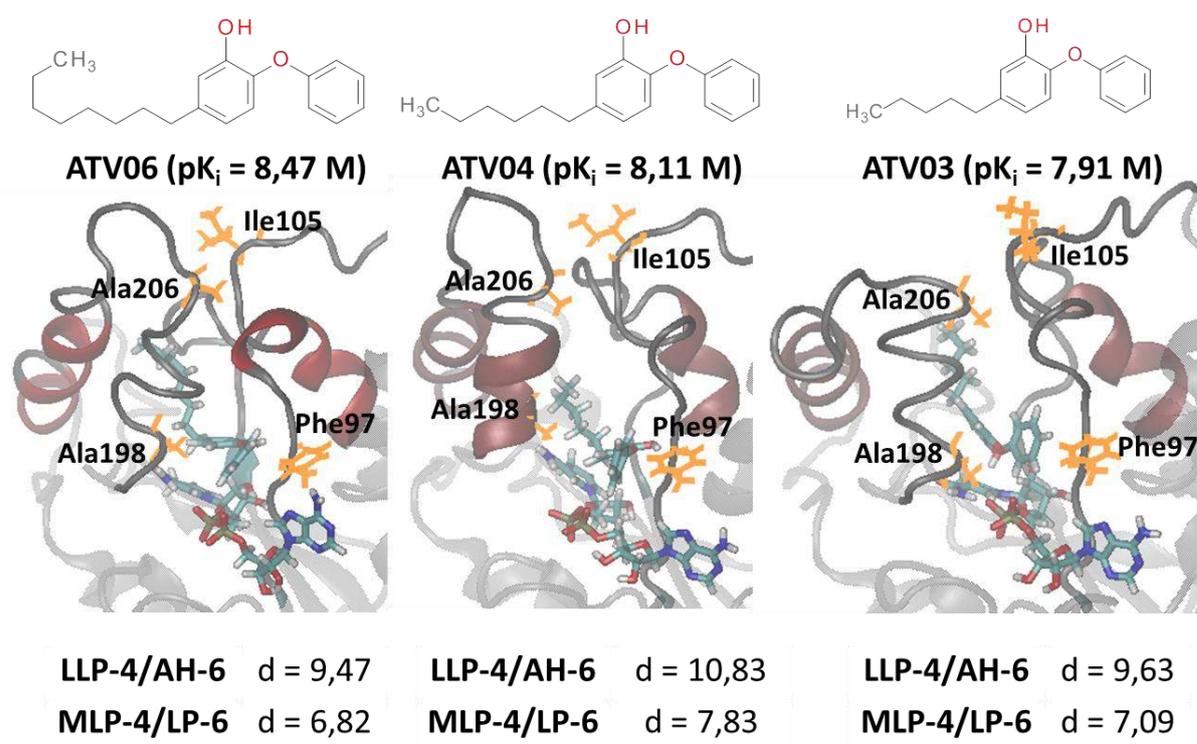


Figura 34. Representação da estrutura média para o *cluster* mais populoso dos complexos holoenzima-inibidor (ATV06, ATV04 e ATV03), com suas respectivas distâncias (d, Å) do portão (LLP-4/AH-6) e da tampa (MLP-4/LP-6).

Ao analisarmos as distâncias médias referentes aos domínios LLP-4/AH-6 e MLP-4/LP-6 (**Figura 34**), o sítio de ligação encontra-se numa conformação fechada, pois os valores obtidos são próximos ao descrito para a holoenzima. Contudo, a diferença de mobilidade da holoenzima com o complexo InhA-NADH-ATV06 (**Figura 35**) mostra que o sítio de ligação apresenta alta estabilidade quando comparado com a holoenzima, exceto para os resíduos Asp110 e Glu209, enquanto que no complexo InhA-NADH-ATV04, os resíduos dos domínios AH-6 e LP-6 apresentam maior mobilidade do que na holoenzima. No caso do

complexo InhA-NADH-ATV03, a enzima apresenta maior mobilidade nas regiões MLP-4 (101 e 105) e ULP-4 (107-110) (**Figura 35**).

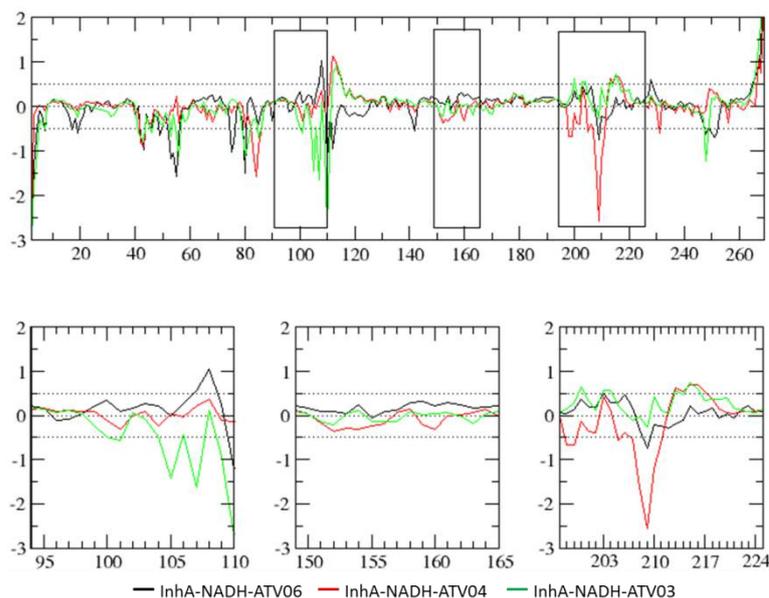


Figura 35. Gráfico da diferença de variação do fator-B calculado para entre os complexos 2AQ8 e holoenzima-inibidor (ATV06, ATV04 e ATV03). Os retângulos mostram as regiões que compõem o sítio de ligação.

Ao analisar o complexo holoenzima-ATV06 (**Figura 36**), observamos ligações hidrogênio mediadas por água entre o inibidor e os resíduos Gly204N (97%), Ile202N (88,4%) e Met103O (79%), que são responsáveis pela mobilidade de Glu209. É interessante observar que a interação do solvente com Gly204 e Ile202 contribui para a perda da estrutura secundária do domínio AH-6, entretanto, a interação ligação hidrogênio mediada por água com Met103 (79%) diminui a mobilidade desta região. Portanto, a interação media por água entre os domínios LP-6 e MLP-4 diminui a mobilidade da cadeia principal no complexo holoenzima-ATV06 em comparação com a holoenzima, além de manter a conformação da enzima fechada.

A mobilidade do domínio UAH-5 é baixa porque o resíduo Asp150 participa de duas interações mediadas por água: Asp150-HOH-Arg153 (78% e 91%) e Asp150-HOH-Ala191 (81% / 95%).

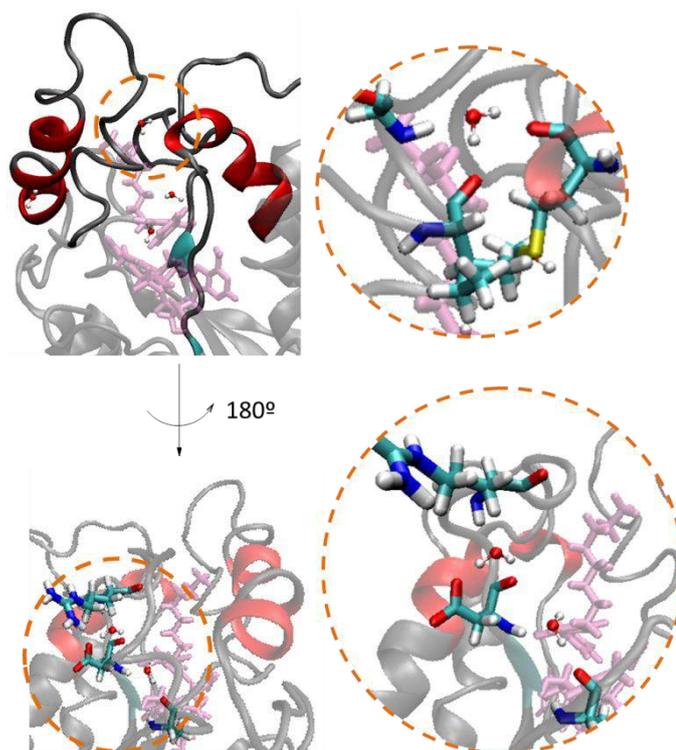


Figura 36. Representação das interações por ligação hidrogênio mediadas por água entre o inibidor e a enzima no complexo holoenzima-ATV06.

No caso do complexo holoenzima-ATV04, cujo inibidor é análogo ao composto mais ativo, observamos a presença de moléculas de água no interior do sítio de ligação mediando interações por ligação hidrogênio com Tyr158OH (98,8%) e Asp150O (94,4%) e entre Trp160N (94,2%) e Gly102O (82,6%) (**Figura 37**). Estas interações com a água não influenciam na manutenção ou perda de estrutura secundária, sendo que nenhuma outra interação relevante foi identificada que pudesse explicar a alta mobilidade dos resíduos Gly208, Glu209 e Glu210.

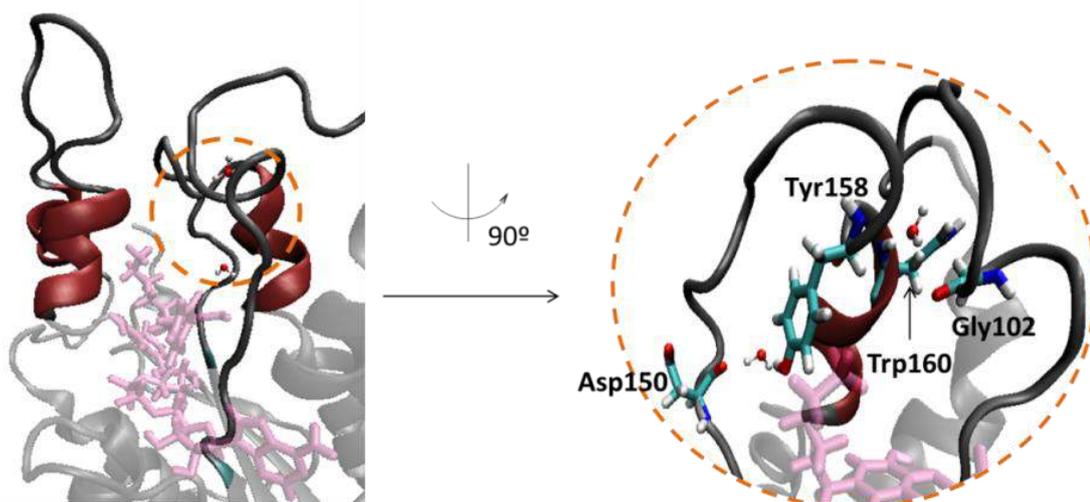


Figura 37. Representação das interações por ligação hidrogênio mediadas por água entre o inibidor e a enzima no complexo holoenzima-ATV04.

No caso do complexo com o inibidor ATV03, também foram observadas duas moléculas de solvente, sendo que uma das interações por ligação hidrogênio mediada por água é a mesma relatada para o complexo com o inibidor ATV04, envolvendo os resíduos Trp160N (92%) e Gly102O (77%), mas com um tempo um pouco menor de persistência. A outra interação mediada pelo solvente envolve os resíduos catalíticos Tyr158OH (99%) e Lys165NZ (95,6%), sendo uma interação mais forte porque é reforçada por carga (**Figura 38**).

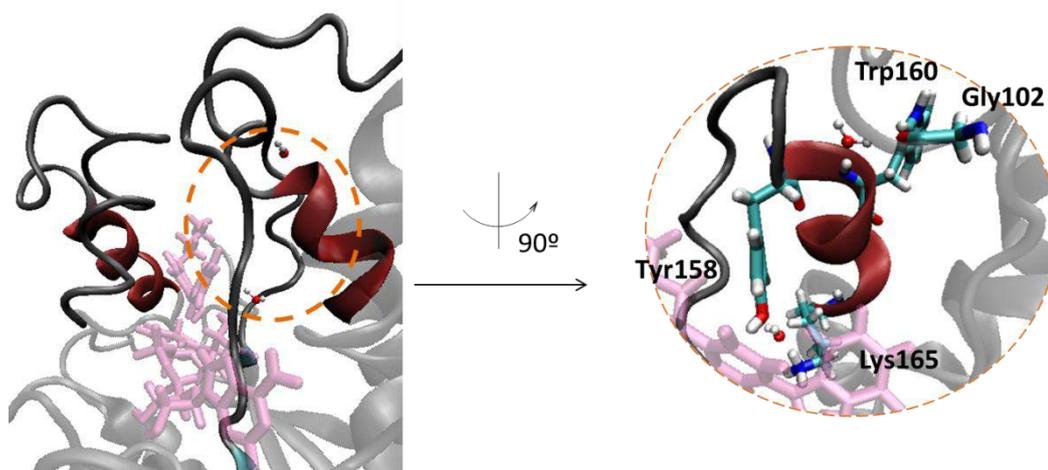


Figura 38. Representação das interações por ligação hidrogênio mediadas por água entre o inibidor e a enzima no complexo holoenzima-ATV03.

A análise do ângulo de torção ϕ do resíduo Phe149 mostra que todos os complexos apresentam a mesma estabilidade descrita para o sistema holoenzima, devido às interações por

ligação hidrogênio de sua cadeia principal com Asp148 que pertence à estrutura secundária de uma folha- β (**Figura 39**).

No complexo holoenzima-ATV06, observamos que o diedro ψ do resíduo Phe149 varia aproximadamente 90° , enquanto que nos complexos InhA-NADH-ATV04 e InhA-NADH-ATV03 a variação é de aproximadamente 120° , indicando uma conformação antiperiplanar. A diferença entre estas conformações facilita a interação de Tyr158 com água, sendo que não são observadas interações entre Phe149 e Tyr158 no complexo com o inibidor ATV06. Para os diedros χ_1 e χ_2 , as alterações observadas são as mesmas descritas anteriormente, o anel aromático da Phe149 adquire uma orientação perpendicular ao carbono- α , facilitando a acomodação da cadeia alifática do inibidor.

No caso dos ângulos de torção ϕ e ψ da Tyr158, a ausência de moléculas de água próximas à alça (formada pelos resíduos Phe149 e Tyr158) permite que a Tyr158 realize o movimento de saída do interior do sítio de ligação, visto que as variações observadas no complexo holoenzima-ATV06 são similares às do complexo holoenzima-ATV05. No caso dos complexos InhA-NADH-ATV04 e InhA-NADH-ATV03, a presença de moléculas de água mediando interações via ligação hidrogênio entre Tyr158-Asp150 e Tyr158-Lys165, permite que a Tyr158 assumira uma posição intermediária no sítio de ligação, onde uma conformação *gauche* (-60°) do diedro ϕ favorece a saída desse resíduo, enquanto que uma conformação antiperiplanar (-150°) do diedro ϕ favorece a entrada da Tyr158.

Para os diedros χ_1 e χ_2 , não há diferenças significativas na disposição da cadeia lateral, evidenciando a importância nas variações dos diedros ϕ e ψ dos resíduos Phe149 e Tyr158 para a determinação da interação com o solvente e da posição relativa da Tyr158.

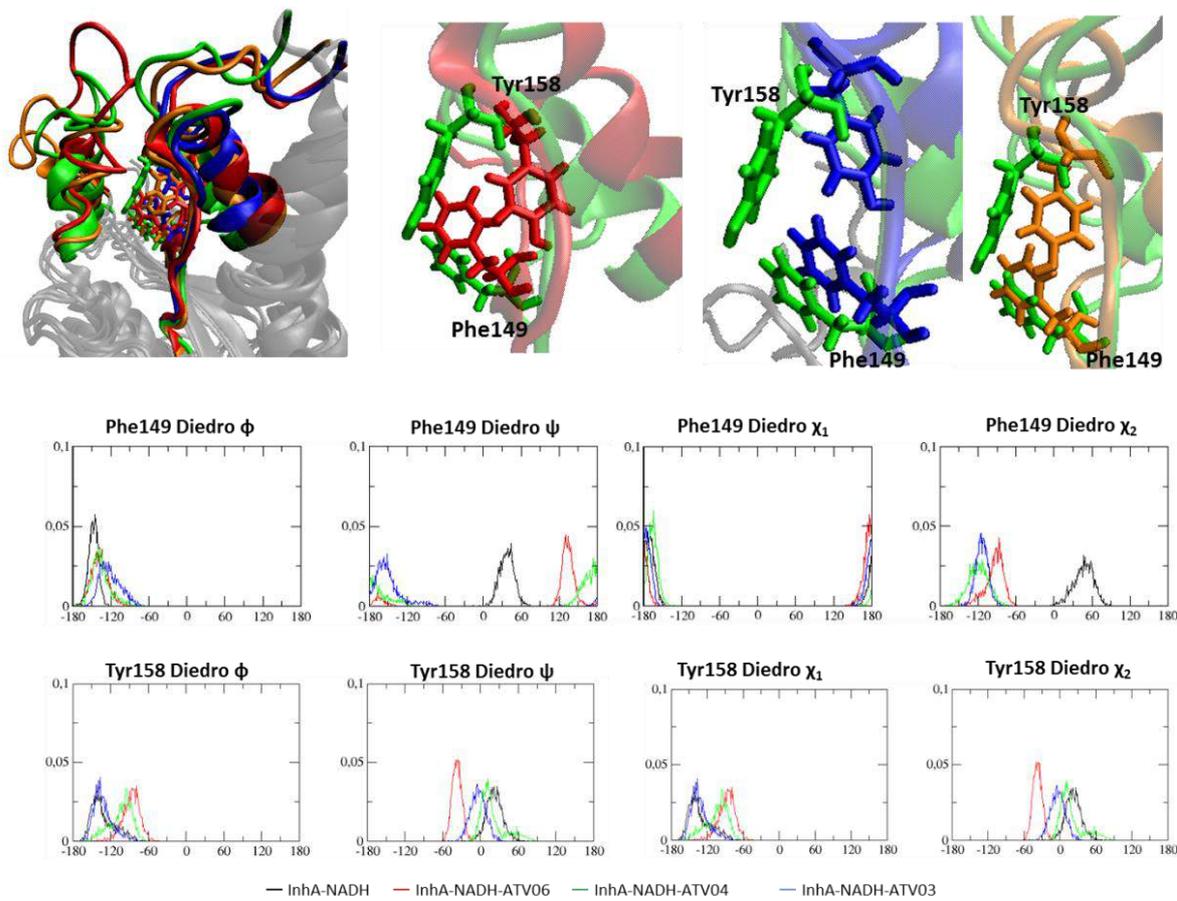


Figura 39. Comparação da mobilidade dos resíduos Phe149 e Tyr158 referente aos diedros φ , ψ , χ_1 e χ_2 para os complexos 2AQ8 e holoenzima-inibidor (ATV06, vermelho); ATV04, verde e ATV03, azul).

Para o grupo dos compostos monossustituídos no anel B, avaliamos ATV33 ($pK_i=8,26M$), que apresenta o grupo amino (doador de densidade eletrônica por ressonância), ATV47 ($pK_i=8,04 M$), que possui o grupo CF_3 (um bioisómero do CH_3 , mas que é retirador de elétrons por efeito indutivo), e ATV30 ($pK_i= 7,22 M$), que apresenta o grupo NO_2 (um retirador de densidade eletrônica por efeito indutivo e de ressonância) (**Figura 40**).

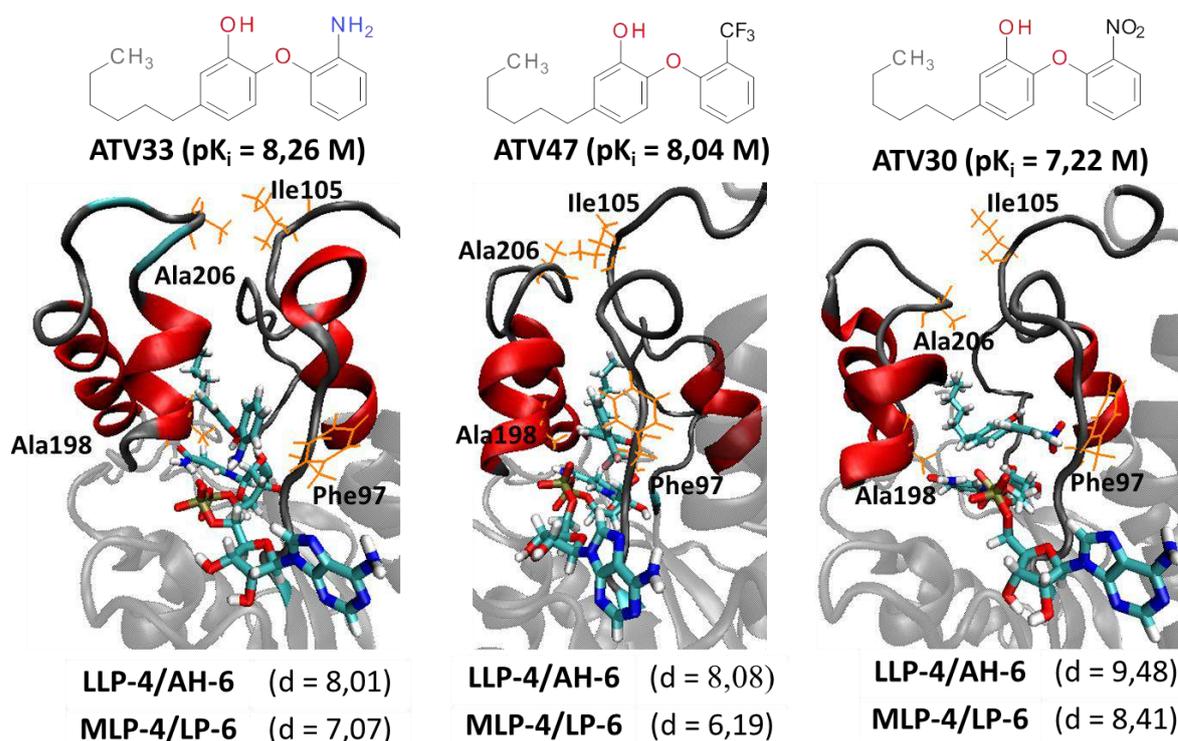


Figura 40. Representação da estrutura média para o *cluster* mais populoso dos complexos holoenzima-inibidor (ATV33, ATV47 e ATV30) com suas respectivas distâncias (d, Å) entre o portão (LLP-4/AH-6) e da tampa (MLP-4/LP-6).

Ao analisarmos a estrutura média do agrupamento mais populoso, todos os complexos apresentam o domínio AH-6 estável e as distâncias médias referentes aos domínios LLP-4/AH-6 e MLP-4/LP-6 apresentam valores próximos aos da holoenzima. No complexo InhA-NADH-ATV33, observamos uma interação por ligação de hidrogênio entre Gly205-Gly208 (76%), aumentando a mobilidade da região Gly205-Ala213, enquanto que no complexo InhA-NADH-ATV49, não há a formação da volta- β , diminuindo a mobilidade da região Gly205-Gly208 (**Figura 41**).

No complexo InhA-NADH-ATV47, não foi observada a interação por ligação de hidrogênio entre os domínios LP-6 e AH-7, no entanto, os resíduos Glu209-Ala211 apresentam maior mobilidade do que na holoenzima. Além disso, os domínios MLP-4 e LP-6 interagem por ligação de hidrogênio (Ile105N...Ala206, 99%) da mesma forma que no complexo InhA-NADH-ATV05, por isso, os dois complexos apresentam valores de distância da tampa (MLP-4/LP-6) similares. Para o complexo InhA-NADH-ATV30, observamos a interação por ligação de hidrogênio entre a cadeia principal dos domínios LP-6 e AH-7 (Gly214N...Gln204O; 97%) e entre a cadeia principal Leu207 e a cadeia lateral de Gly214

(84%). Apesar da interação adicional entre Leu207 e Gly214, ela não é suficiente para diminuir a mobilidade da volta com dez aminoácidos (Gln204-Gly214).

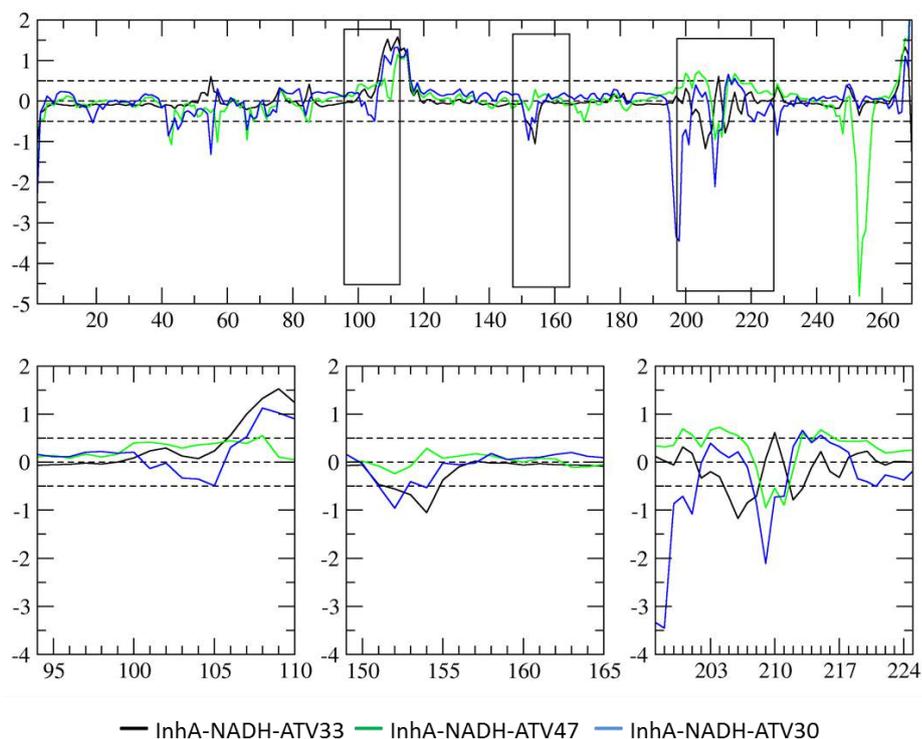


Figura 41. Gráfico da diferença de variação do fator-B calculado entre os complexos 2AQ8 e holoenzima-inibidor (ATV33, ATV47 e ATV30). Os retângulos mostram as regiões que compõem o sítio de ligação.

Ao analisarmos a interação da holoenzima com o solvente (**Figura 42**), observamos a presença de água no interior do sítio de ligação do complexo InhA-NADH-ATV33, onde uma das moléculas de água interage com a cadeia principal dos resíduos Gly102 (97,2%), Ala157 (98,6%) e Met161 (91,2%) e a outra com a cadeia principal de Ser123 (97,8%) e a cadeia lateral da Lys165 (99,4%). No caso de InhA-NADH-ATV30, também foram observadas duas moléculas de água, a primeira interagindo com Asp150 (85,8%) e Ala191 (80,6%) e a segunda interagindo com Ser123 (82,2%) e a cadeia lateral da Lys165 (100%), enquanto que no complexo InhA-NADH-ATV47, não foi observada a entrada de água no sítio de ligação.

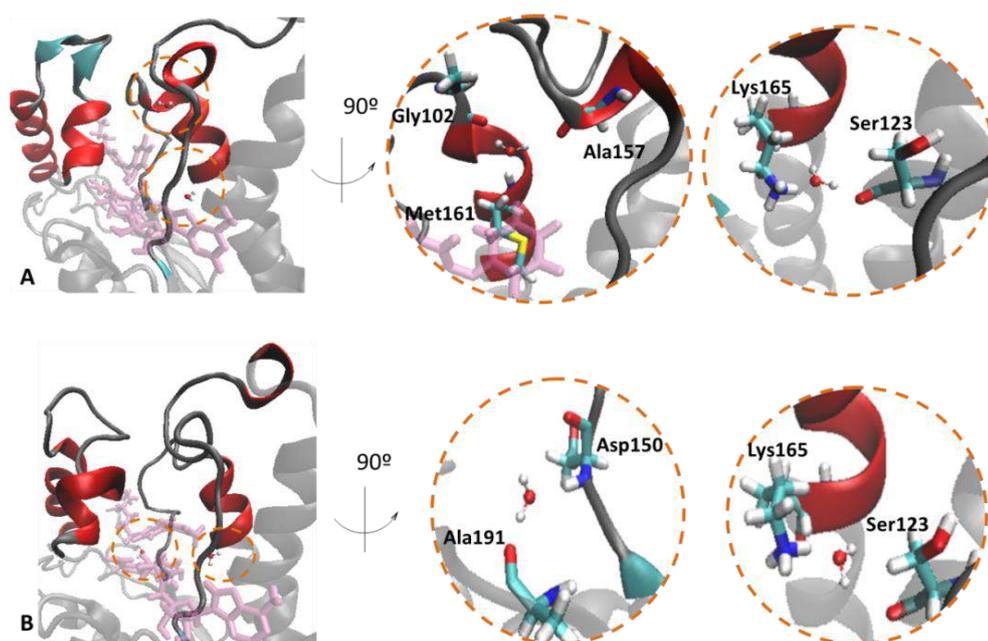


Figura 42. Representação das interações por ligação hidrogênio mediados por água nos complexos (A) InhA-NADH-ATV33 e (B) InhA-NADH-ATV30.

Ao avaliarmos os ângulos diedros de Phe149, observamos que todos os complexos mantêm a mesma movimentação descrita para os compostos anteriores, onde destacamos o diedro ψ que mantêm a conformação eclipsada ($\sim 120^\circ$) observada na presença dos inibidores, impedindo a interação do solvente com o LP-5 (Phe149-Ala157) (**Figura 43**).

No caso dos ângulos diedros do resíduo Tyr158 no complexo InhA-NADH-ATV33, a perda da interação por ligação hidrogênio Tyr158-Met161 promove a conformação eclipsada para o diedro ψ , indicando que a saída desse resíduo não é favorável. No complexo InhA-NADH-ATV30, a interação mediada por água parece não influenciar na conformação da Tyr158, visto que o diedro ψ , próximo de -30° , leva a uma situação menos eclipsada do que a descrita anteriormente. No caso dos complexos InhA-NADH-ATV47 e InhA-NADH-ATV49, a ausência de moléculas de água nos domínios LP-5 e UAH-5 resulta em uma conformação mais alternada (diedro ψ), levando a uma situação onde a saída da Tyr158 é favorecida (**Figura 43**).

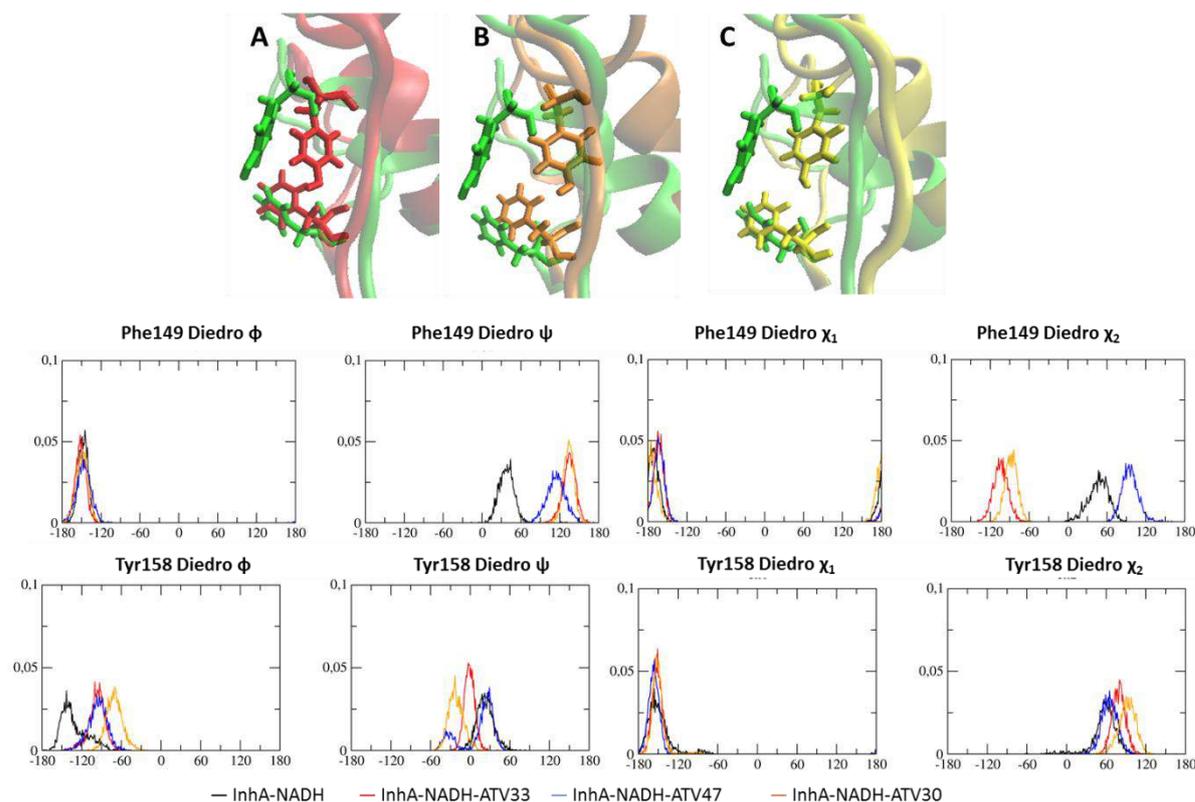


Figura 43. Comparação da mobilidade dos resíduos Phe149 e Tyr158 referente aos diedros φ , ψ , χ_1 e χ_2 para os complexos 2AQ8 (verde) e holoenzima ligada ao ATV33 (A, vermelho), ATV47 (B, laranja) e ATV30 (C, amarelo).

Para o grupo dos compostos dissustituídos no anel B, a variação do substituinte na posição 5 do anel A não resulta em alta afinidade pela enzima. De fato, a maioria desses compostos apresenta atividade intermediária, pK_i entre 7,93 a 7,09M. Assim, analisamos os dois compostos mais ativos deste grupo, ATV23 e ATV17, com pK_i de 7,93M e 7,78 M, respectivamente, que apresentam grupos volumosos, contendo anéis aromáticos com um ou dois grupos metileno como separador do anel A (**Figura 44**).

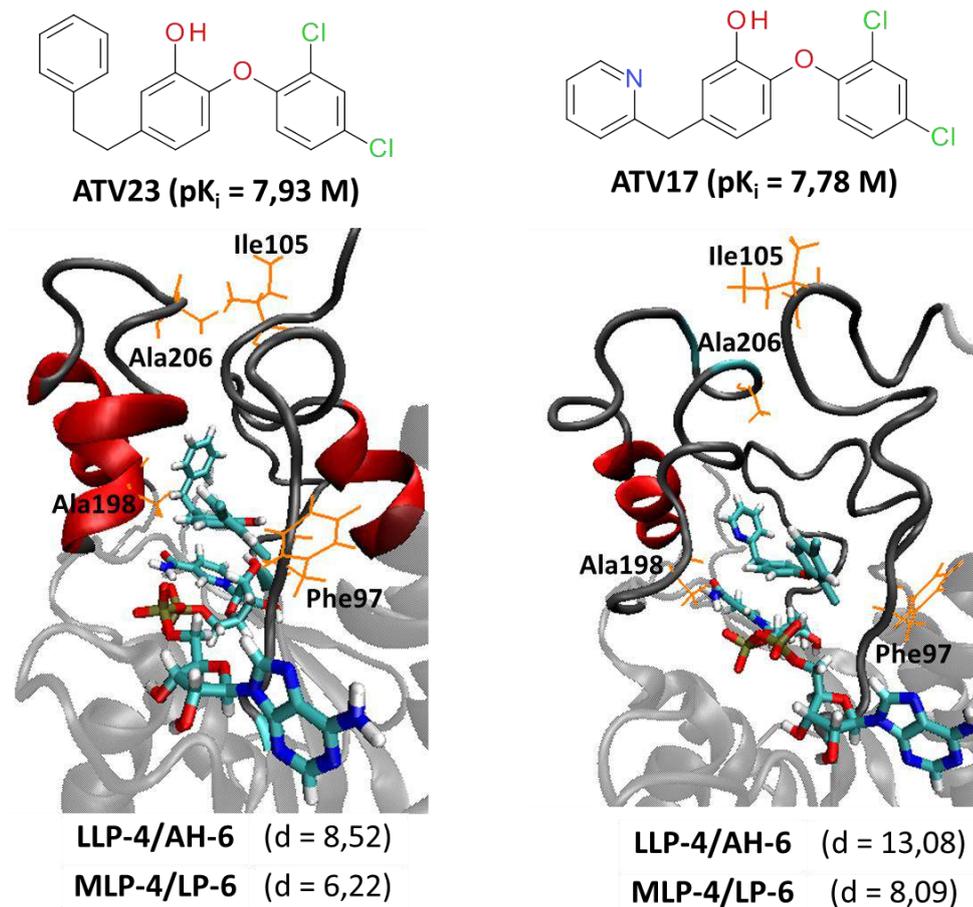


Figura 44. Representação da estrutura média para o *cluster* mais populoso dos complexos holoenzima ligado aos compostos ATV23 e ATV17, com suas respectivas distâncias (d, Å) do portão (LLP-4/AH-6) e da tampa (MLP-4/LP-6).

Ao analisarmos as estruturas médias dos *clusters* mais populosos, observamos que o InhA-NADH-ATV23 mantém a estrutura secundária de AH-6, enquanto que no complexo InhA-NADH-ATV17, que apresenta um grupo metileno como espaçador, ocorre a desnaturação de AH-6. A perda da estrutura AH-6 no InhA-NADH-ATV17 promove a abertura do sítio ativo, com o afastamento dos domínios LLP-4 e AH-6, enquanto que nos complexos com os compostos mais ativos (ATV05 e ATV33) a conformação fechada do sítio de ligação é mantida.

No caso da mobilidade do C_{α} da enzima, o complexo com ATV23 apresenta baixa mobilidade dos resíduos que compõe o sítio ativo, quando comparado à holoenzima, sendo que não foram observadas interações por ligação hidrogênio entre os domínios que justifique a estabilidade do sítio ativo (**Figura 45**).

No caso do complexo holoenzima-ATV17, observamos o aumento da mobilidade dos resíduos Met103-Pro107 e Leu207-Glu209, quando comparado à holoenzima, contudo, a

estabilidade relativa do sítio ativo ocorre pela perda de interações por ligação hidrogênio, principalmente, nas regiões UAH-5 (Tyr158-Met161), AH-6 (197-203) e AH-7 (Glu208-Ile215).

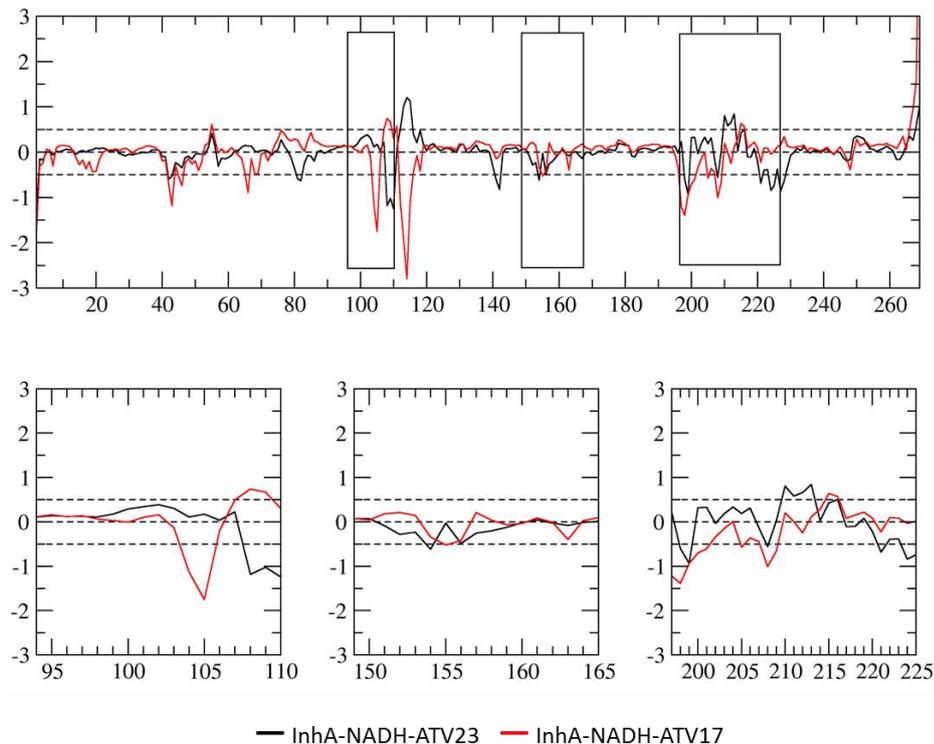


Figura 45. Gráfico da diferença de variação do fator-B calculado entre os complexos 2AQ8 e holoenzima ligada à ATV23 e ATV17. Os retângulos mostram as regiões que compõem o sítio de ligação.

No caso da interação da proteína com o solvente, o complexo InhA-NADH-ATV23 não apresenta moléculas de água no interior do sítio de ligação, enquanto que no InhA-NADH-ATV17, observamos que a perda da estrutura secundária de UAH-5 facilita a interação por ligação hidrogênio mediada por água entre Asp148-Tyr158 (81 e 99%, respectivamente) e Trp160-Met161 (82 e 76%, respectivamente) (**Figura 46**).

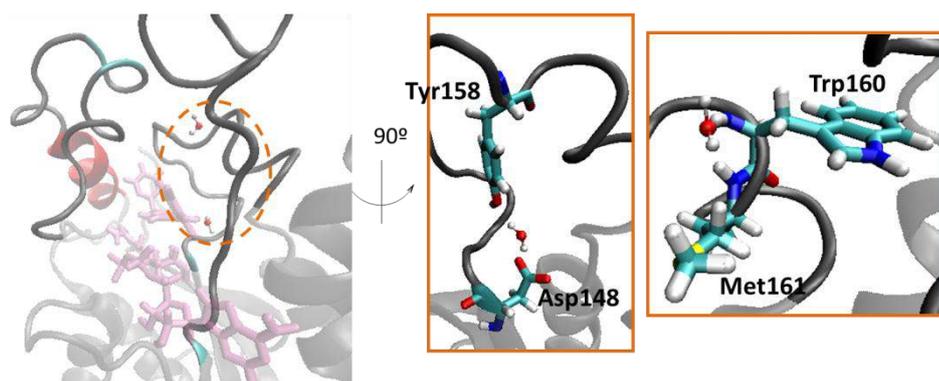


Figura 46. Representação das interações por ligação hidrogênio mediadas por água entre o inibidor e a enzima no complexo InhA-NADH-ATV17.

Ao avaliarmos os ângulos diedros do resíduo Phe149, observamos a mesma movimentação quando o inibidor está ligado à InhA e não há interações entre o domínio LP-5 com moléculas de água, no entanto, a presença de água mediando as interações por ligação hidrogênio com os resíduos Asp148 e Tyr158 ocorre devido a desnaturação do domínio UAH-5 (**Figura 47**). Neste caso, observamos uma modificação significativa na distribuição do diedro ψ do resíduo Tyr158, porque a perda da interação por ligação hidrogênio da Met161 permite que o mesmo assumira uma conformação *gauche*.

Para os compostos cujo anel B é um anel heteroaromático, apenas dois compostos apresentam atividade intermediária frente à enzima InhA (**Figura 48**). Ao avaliarmos a estrutura média do agrupamento mais populoso para os complexos InhA-NADH-ATV26 e InhA-NADH-ATV27, observamos que a estrutura secundária de AH-6 é mantida, apresentando distâncias médias similares às descrita para a holoenzima (9,71 Å). Contudo, observamos um afastamento significativo para os domínios MLP-4/LP-6, que é a região que forma uma tampa acima do anel nicotinamida do cofator, indicando a abertura da tampa, expondo o ligante ao solvente.

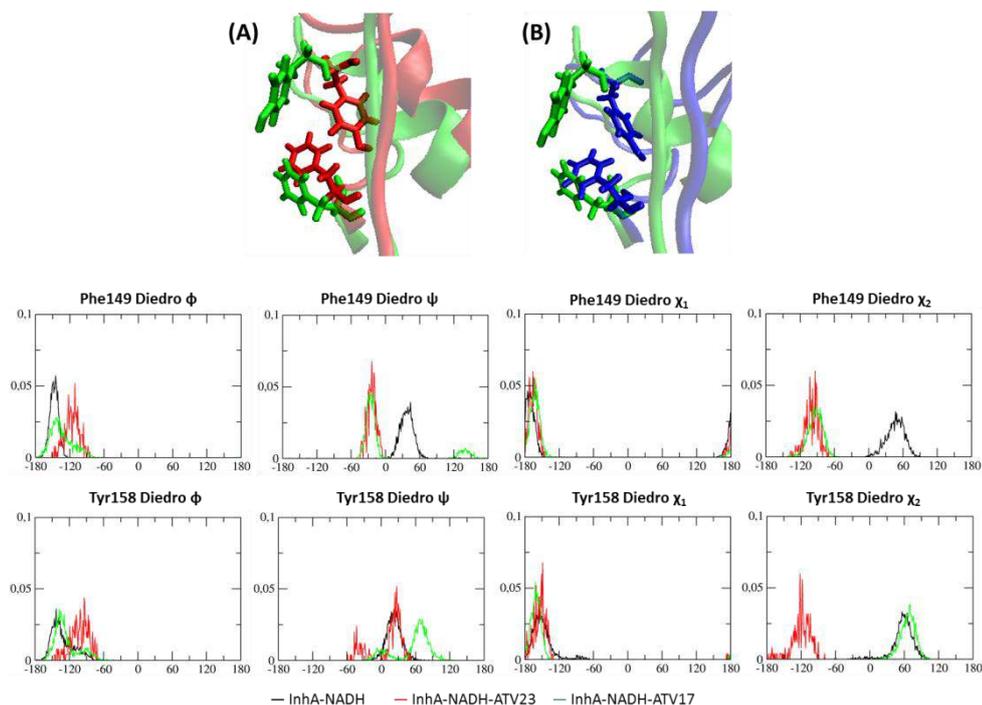


Figura 47. Comparação da mobilidade dos resíduos Phe149 e Tyr158 referente aos diedros ϕ , ψ , χ_1 e χ_2 para os complexos 2AQ8 (verde) e holoenzima ligado ao ATV23 (A, vermelho) e ATV17 (B, azul).

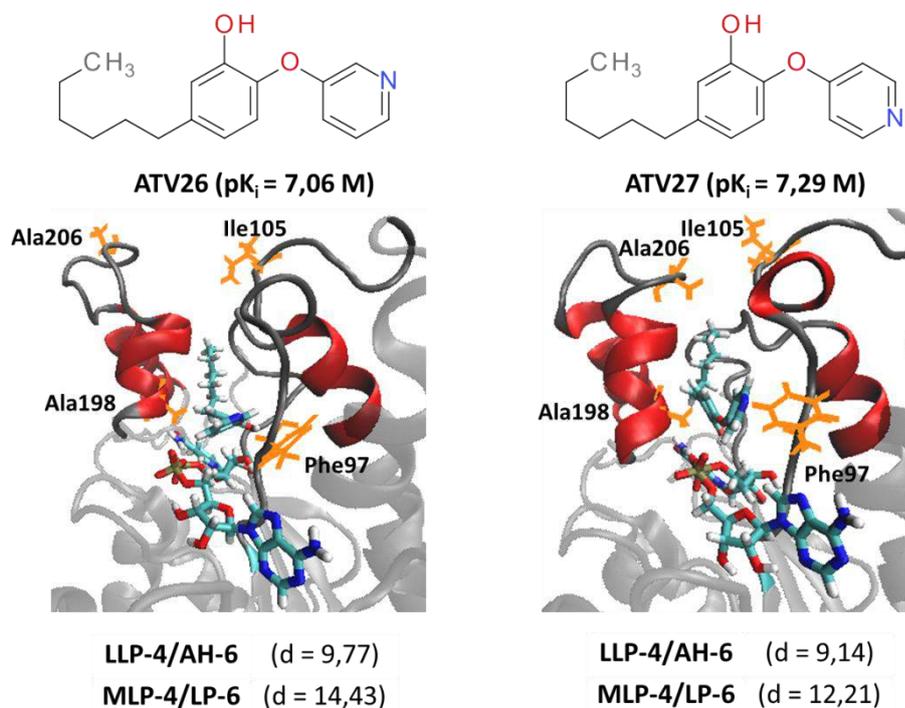


Figura 48. Representação da estrutura média para o *cluster* mais populoso dos complexos holoenzima ligado aos compostos ATV26 e ATV27, com suas respectivas distâncias (d, Å) do portão (LLP-4/AH-6) e da tampa (MLP-4/LP-6).

Ao analisarmos a mobilidade da cadeia principal (carbono- α) da InhA (**Figura 49**), observamos que o complexo com o composto mais ativo (ATV27) apresenta mobilidade similar à da holoenzima, mostrando uma estabilidade do sítio ativo, enquanto que para o complexo com ATV26, observamos uma alta mobilidade entre os resíduos Ala206-Glu209.

No caso das interações por ligação hidrogênio, as estruturas secundárias do sítio de ligação no complexo InhA-NADH-ATV27 não apresentaram interações entre os domínios que compõe o sítio ativo. No entanto, no complexo InhA-NADH-ATV26, foi observada uma interação por ligação hidrogênio entre Glu205N...Gly211O (78%) que aumenta a mobilidade dos seis resíduos que compõe essa volta.

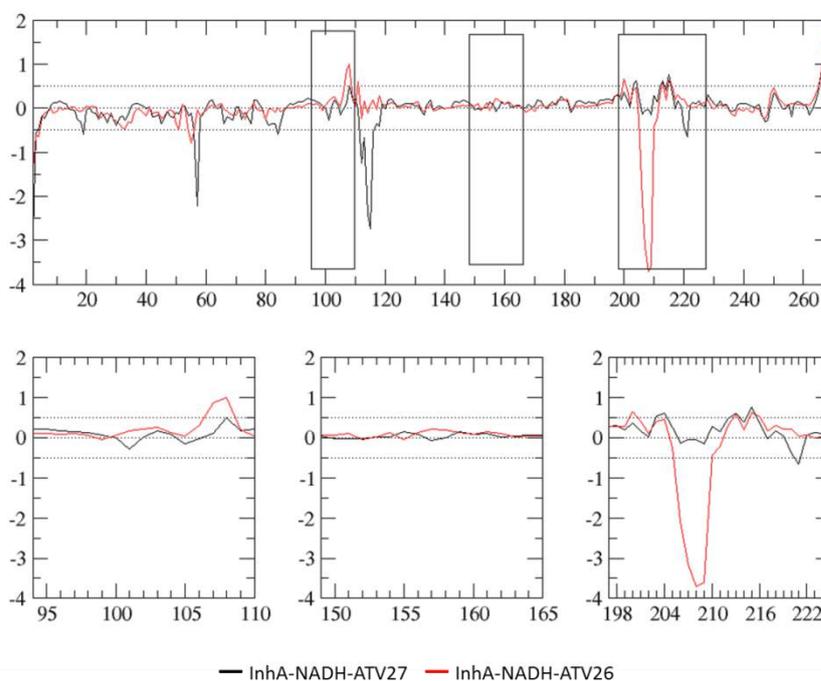


Figura 49. Gráfico da diferença de variação do fator-B calculado entre os complexos 2AQ8 e holoenzima ligada à ATV27 e ATV26. Os retângulos mostram as regiões que compõem o sítio de ligação.

No caso da interação entre a proteína e o solvente, observamos uma molécula de água no interior da cavidade do complexo InhA-NADH-ATV26, enquanto observamos três moléculas de água no complexo InhA-NADH-ATV27 (**Figura 50**).

No complexo com ATV26, há uma ligação hidrogênio mediada por uma molécula de água entre as cadeias principais dos resíduos Ala191 (99%) e Asp150 (94%), contribuindo para a perda da interação entre Tyr158 e a cadeia principal de Met155. No complexo com o composto ATV27, há interações por ligação hidrogênio mediada por uma molécula de água entre as cadeias principais dos resíduos Asp150 (94%) e Arg153 (92%) e a cadeia lateral de

Arg225 (100%) e uma segunda molécula interage com as cadeias principais dos resíduos Ala191 (96%) e Asp150 (86%). Estas interações também ocasionam a perda da interação entre Met155 e Tyr158, mas conferem uma rigidez maior ao domínio LP-5, uma vez que aparece uma interação entre Met155N...Pro151O com alta persistência (99%). A terceira molécula de água interage somente com a cadeia secundária de Lys165 (89%).

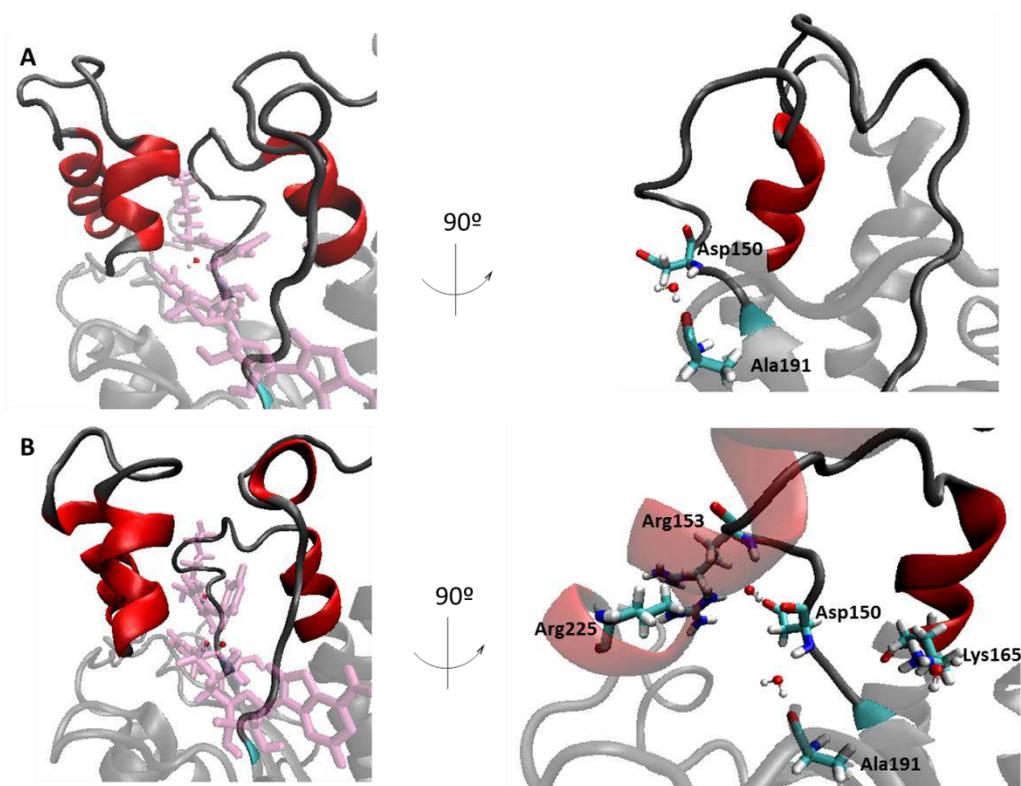


Figura 50. Representação das interações por ligação hidrogênio mediadas por moléculas de água nos (A) complexos holoenzima-ATV26 e (B) holoenzima-ATV27.

Anteriormente, observamos que o diedro ψ do resíduo Phe149 assume uma conformação eclipsada na presença do inibidor sem água, e.g. InhA-NADH-ATV05. Na presença de água, a conformação altera para *anti*, e.g., InhA-NADH-ATV04 (**Figura 51**).

No caso dos complexos com os compostos ATV26 e ATV27, o diedro ψ do resíduo Phe149 assume uma conformação eclipsada, semelhante ao observado quando não há moléculas de água interagindo com o domínio LP-5, entretanto, a presença de moléculas de água mediando interações por ligação hidrogênio entre os domínios parece ser a razão da manutenção desta conformação.

Para o diedro ψ do resíduo Tyr158, a conformação alternada assumida no complexo com ATV26 indica a saída desse resíduo do centro do sítio ativo, além disso, essa conformação se torna favorável devido a interação por ligação hidrogênio entre

Tyr158OH...Phe149O com um tempo de persistência de 88%. No caso do complexo com ATV27, o diedro ψ assume uma conformação eclipsada, ou seja, o resíduo está mais no centro do sítio de ligação.

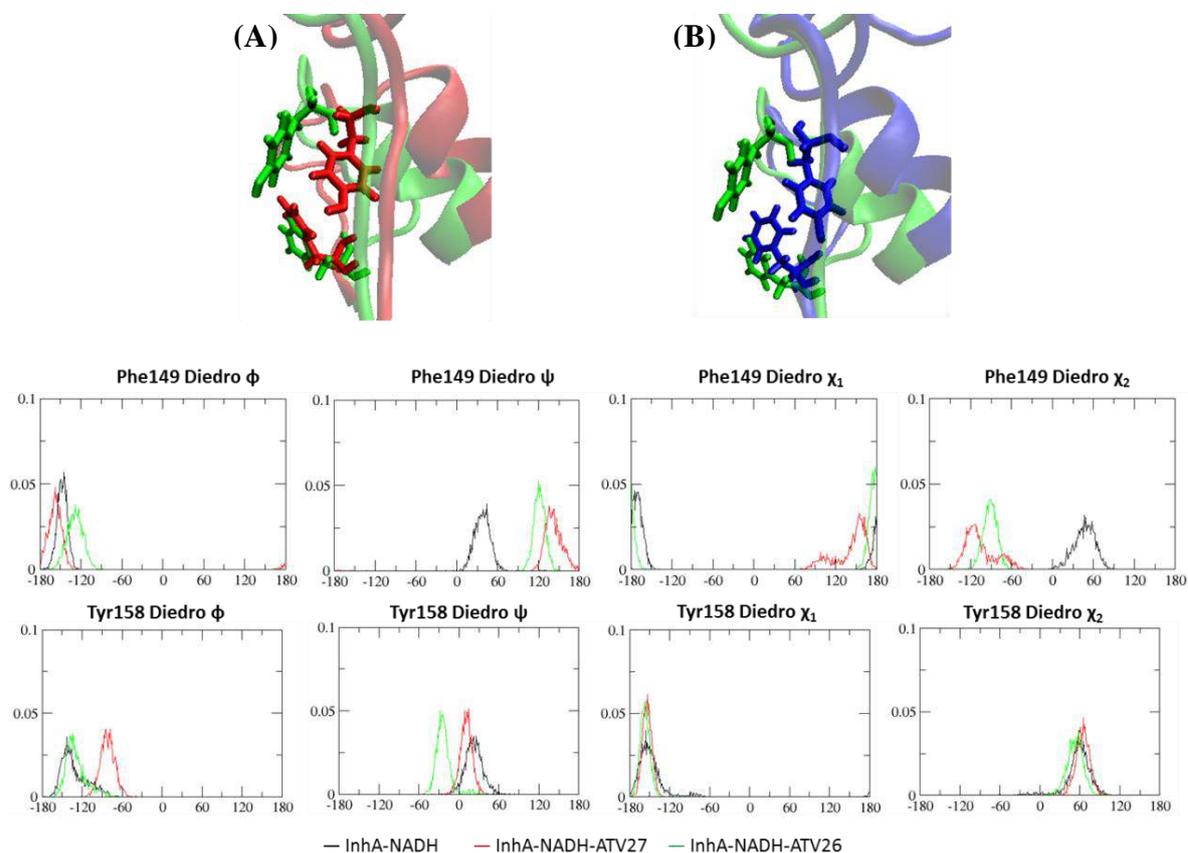


Figura 51. Comparação da mobilidade dos resíduos Phe149 e Tyr158 referente aos diedros ϕ , ψ , χ_1 e χ_2 para os complexos 2AQ8 (verde), holoenzima-ATV27 (A, vermelho) e holoenzima-ATV26 (B, azul).

4.4.3. ANÁLISE DAS INTERAÇÕES POR LIGAÇÃO HIDROGÊNIO E CONTATOS HIDROFÓBICOS ENTRE A HOLOENZIMA E OS INIBIDORES

A análise das interações por ligação hidrogênio e dos contatos hidrofóbicos que ocorrem entre a holoenzima e os inibidores é de crucial importância para entender as mudanças estruturais observadas e descritas anteriormente. De fato, diversos autores destacam a Tyr158, localizada no domínio LP-5, como responsável pela interação por ligação hidrogênio, e onze resíduos distribuídos pelos domínios LP-5 (Phe149, Met155, Pro156 e Ala157), AH-5 (Met161), AH-6 (Ala198, Met199, Ile202 e Val203) e AH-7 (Leu218 e Trp222) como responsáveis pelos contatos hidrofóbicos (FREUNDLICH et al., 2009; SULLIVAN et al., 2006).

Portanto, com o intuito de obter maiores detalhes sobre o modo de ligação destes compostos e entender como que essas interações atuam na modificação da conformação do sítio de ligação, identificando resíduos que possam realmente contribuir para explicar o perfil de atividade biológica desta série, o tempo de persistência foi avaliado para as interações por ligação hidrogênio e os contatos hidrofóbicos. No caso dos inibidores, todas as interações, independente do tempo de persistência, foram monitoradas e reunidas na **Tabela 6** de acordo com os grupos discutidos anteriormente, mantendo a ordem decrescente de atividade biológica.

O complexo InhA-NADH-ATV05 (conformação fechada) apresenta interação por ligação hidrogênio com a cadeia principal de Gly96 com persistência de 26,5% e interações hidrofóbicas com os domínios MLP-4 (Met103, 92%) e AH-6 (Ala198, 25,2% e Ile202, 25,6%).

Tabela 6. Interações por ligação hidrogênio e contatos hidrofóbicos entre os inibidores e a holoenzima.

# ^a	Ligação hidrogênio ^b			Contato Hidrofóbico ^c		
	Doador	Aceptor	Tempo (%) ^d	Resíduo	Distância	Tempo (%) ^d
05 (9,86)	OH	Gly96	26,5	Met103	3,49(±0,26)	92
				Ile202	3,80(±0,14)	25,6
				Ala198	3,83(±0,15)	25,2
06 (8,47)	Lys165	OH	4,8	Met103	3,91(±0,34)	99
				Val203	3,57(±0,26)	76,7
04 (8,11)	OH	Phe97 O	4,2	Met161	3,27(±0,31)	97,8
				Ala198	3,81(±0,19)	2,6
				Ile202	3,55(±0,30)	30,3
03 (7,91)	NADH O43	OH	87,6	Tyr158	3,20(±0,25)	95,4
	OH	NADH N46	28,3	Ile202	3,88(±0,13)	3,4
	Tyr158	OH	5,5			
33 (8,26)	Tyr158	OH	84,6	Tyr158	3,11(±0,26)	100
	OH	NADH O43	78,0	Ile202	3,60(±0,27)	46,5
	NH2	NADH O31	44,0			
	OH	NADH N46	34,5			
	NADH O43	O	10,6			
	NH2	NADH O65	3,2			
47 (8,04)	OH	Tyr158	62,3	Met103	3,71(±0,21)	52,3
	OH	NADH O43	11,0	Tyr158	3,85(±0,11)	3,2
				Met161	3,67(±0,28)	5,8
30 (7,22)	Tyr158	OH	91,4	Met161	3,70(±0,19)	82,4
				Val203	3,71(±0,19)	37
23 (7,93)	OH	NADH O43	21,8	Met103	2,88(±0,25)	100
	OH	Tyr158	21,4	Met199	3,77(±0,16)	27,2
17 (7,78)	OH	HOH	98,5	Met161	3,42(±0,32)	92
	HOH	Tyr158	96,2	Ile202	3,74(±0,18)	30,5
	HOH	Asp148	76,2			
	HOH	NADH O51	65,29			
	HOH	N1	57,7			
	HOH	Ile194	38			
27 (7,29)	OH	NADH O33	79,8	Met103	3,63(±0,27)	53,1
	HOH	OH	53,3	Tyr158	3,49(±0,29)	81,3
	Met98	N1	41,0			
	Tyr158	OH	28,1			
	Lys165	HOH	89,0			
26 (7,06)	Met98	N1	52,1	Ile202	3,51(±0,24)	91,0
	OH	NADH O40	10,4	Met103	3,30(±0,26)	90,0
	Lys165	OH	4,8			

^a Número do inibidor (pK_i, M). ^b Ligação hidrogênio (D-H...A) foi mensurada considerando a distância até 3,5Å e ângulo (H-D-A) até 30°. ^c Valor de corte considerado entre átomos diferentes de hidrogênio e o resíduo foi até 4,0 Å. ^d Tempo de persistência (%) considerando somente os últimos 5ns de simulação de DM.

Para o complexo InhA-NADH-ATV06 (conformação fechada), ocorre uma interação por ligação hidrogênio reforçada por carga entre o grupo hidroxila ($-OH$) do fenol, que é um aceptor e doador de ligação hidrogênio neutro, e o grupo amino protonado ($-NH_3^+$) da Lys165, que é o doador de ligação hidrogênio carregado positivamente, com baixo tempo de persistência, porém, com maior estabilidade do que uma interação de ligação hidrogênio neutra. No caso das interações hidrofóbicas, o inibidor mantém interações com o domínio MLP-4 (Met103, 92%), enquanto que com o domínio AH-6, há forte interação com Val203 (76,7%), que pode ser a responsável pela desestabilização das ligações hidrogênio que compõe AH-6, ocasionando a perda da estrutura secundária.

No caso do complexo InhA-NADH-ATV04, a interação por ligação hidrogênio do grupo hidroxila do fenol com a cadeia principal de Phe97, mesmo que por um curto período de tempo (4,2%), promove o afastamento dos domínios LLP-4/AH-6, influenciando no tempo de persistência da interação hidrofóbica do domínio AH-6 com o inibidor (Ala198, 2,6% e Ile202, 30,3%), conseqüentemente, mantendo a sua estrutura secundária. Além disso, observamos a interação com o domínio UAH-5 (Met161, 97,8%) devido ao aumento da cavidade de ligação, enquanto que a interação hidrofóbica com o domínio MLP-4 deixa de ser observada.

No complexo InhA-NADH-ATV03, o grupo hidroxila do fenol interage por ligação hidrogênio, principalmente, com NADH (O43, doador, 87,6%; N46, aceptor, 28,3%) e, ocasionalmente, com Tyr158 (OH, doador, 5,5%). De fato, a Tyr158 está associada à interação hidrofóbica (95,4%), enquanto que a interação com o domínio AH-6 ocorre ocasionalmente (Ile202, 3,4%).

Para os inibidores monossubstituídos, todos apresentam interação por ligação hidrogênio do grupo hidroxila do fenol com Tyr158 com alto (ATV33, 84,6% e ATV30, 91,4%) ou médio (ATV47, 62,3% e ATV49, 59,7%) tempo de persistência. Para o composto mais ativo, observa-se a possibilidade de interações hidrofóbicas, preferencialmente, com Tyr158 (100%), enquanto que os demais compostos realizam interações com os domínios ULP-4 (Met103) e UAH-5 (Met161), sendo que as interações hidrofóbicas com o domínio AH-6 apresentam média ou baixa persistência.

Para o complexo InhA-NADH-ATV23 (conformação fechada), o inibidor realiza a mesma interação por ligação hidrogênio com NADH (21,8%) e Tyr158 (21,4%), mas ambos com baixa persistência durante os últimos 5ns de simulação. Por outro lado, o inibidor ATV23 realiza interações hidrofóbicas com Met103 (100%), provavelmente, porque o grupo

fenetila possui uma maior liberdade conformacional, permitindo um arranjo do tipo sanduíche que compreende Met103, Tyr158 e o grupo fenetila.

Para InhA-NADH-ATV17 (conformação aberta), existem duas ligações hidrogênio mediadas por água, uma composta pelo grupo hidroxila do fenol (-OH...HOH, 98,5%), o grupo carboxilato do Asp148 (HOH...Asp148, 76,2%) e Tyr158 (HOH...Tyr158, 96,2%), e outra de menor intensidade, do grupo nicotinamida do NADH (HOH...NADH, 65,29%), do átomo de nitrogênio da piridina (HOH...N1, 57,7%) e a cadeia principal de Ile194 (HOH...Ile194, 38%). Embora a interação HOH...Asp148 corresponda a uma ligação hidrogênio reforçada por carga, não existe nenhuma interação entre o inibidor e a enzima. Além disso, existem contatos hidrofóbicos de elevada persistência com Met161 (UAH-5, 92%) e ambos os anéis (fenol e piridina) do inibidor, enquanto que o contato hidrofóbico com Ile202 (30,5%) pode contribuir para o desenovelamento parcial de AH-6.

Para InhA-NADH-ATV27 (conformação aberta), o inibidor realiza interação por ligação hidrogênio com média persistência com NADH (79,8%) e duas interações de baixa persistência, uma entre o átomo de nitrogênio da piridina e a cadeia principal da Met98 (41%) e a outra entre o grupo hidroxila do fenol e a Tyr158 (28,1%). Além disso, observa-se uma ligação hidrogênio com baixa persistência entre o grupo hidroxila do fenol (HOH...OH, 53,3%) e Lys165 ($\text{NH}_3^+ \dots \text{HOH}$, 89,0%). Os contatos hidrofóbicos ocorrem, principalmente, entre o grupo hexila e os resíduos Met103 (53,1%) e Tyr158 (81,3%).

No caso InhA-NADH-ATV26 (conformação aberta), a substituição do anel 4-piridina por 3-piridina intensificou a interação por ligação hidrogênio com a enzima pelo aumento do tempo de persistência dessa interação entre o grupo hidroxila do fenol e a cadeia principal de Met98 (52,1%) e pela troca de uma interação mediada por água com a Lys165 por uma interação direta, mesmo com baixo valor de persistência (4,8%). Além disso, os contatos hidrofóbicos ocorrem, principalmente, entre o anel piridina e a Met103 (90%), enquanto a Ile202 interage tanto com o anel fenol e a cadeia hexila (91%). A falta de interação com o domínio AH-6 em InhA-NADH-ATV27 promove o afastamento dos domínios MLP-4 e LP-6, sendo que essa abertura fica mais pronunciada no complexo InhA-NADH-ATV26 devido a alta interação com o resíduo Ile202.

4.5. INTERAÇÕES ESTÉRICAS E ELETROSTÁTICAS DOS COMPLEXOS HOLOENZIMA-INIBIDORES – QSAR-3D DR

4.5.1. SELEÇÃO DOS COMPOSTOS PARA OS CONJUNTOS TREINAMENTO E TESTE

Com o intuito de compreender as correlações quantitativas entre a estrutura tridimensional e a atividade biológica desta série de compostos, avaliamos a variação das energias de interação estérica (E_{es}) e eletrostática (E_{el}) entre inibidor, cofator e resíduos que formam o sítio de ligação obtidas durante os últimos 5ns da DM, com a variação da atividade biológica.

Primeiramente, avaliou-se a distribuição dos valores de atividade biológica dos compostos com $pK_i > 6,95$. Observamos que o composto mais ativo, ATV05 ($pK_i=9,86M$), possui uma diferença maior do que uma unidade logarítmica em relação ao segundo composto mais ativo (ATV06, $pK_i=8,47M$), portanto, o ATV05 foi removido do banco de dados que será utilizado durante o estudo de QSAR (PERKINS et al., 2003a).

A remoção de ATV05 resultou em um conjunto contendo 31 compostos com valores de atividade biológica variando de 8,47 até 6,95, ou seja, a variação entre os compostos mais e menos ativos é menor do que duas unidades logarítmicas ($\Delta pK_i = 1,52$). Tanto a diferença relatada para o composto ATV05, quanto à descrita para o conjunto total, influenciam diretamente na qualidade do modelo estatístico a ser obtido para esta série de compostos. Portanto, inclui-se no banco de dados mais nove compostos com pK_i variando entre 6,93 M até 6,23 M, resultando numa variação de pK_i (entre o mais e menos ativo) de 2,21. No caso dos compostos que possuem pK_i abaixo de 6,23 M, a não inclusão deles no banco de dados é devido aos valores de IC_{50} estarem na magnitude de micromolar, i.e., esses compostos inibem a enzima por saturação do sítio ativo. Portanto, considerou-se 39 compostos para realizar o estudo QSAR-3D DR.

Neste trabalho, o método de Kennard-Stone foi utilizado para a seleção dos compostos para os conjuntos de treinamento e teste, onde os compostos que apresentam alta dissimilaridade em relação às variáveis independentes (descritores) são separados como conjunto de teste (SNAREY et al., 1997). A aplicação de um método supervisionado é necessária, pois existe uma grande quantidade de compostos com valores próximos de atividade inibitória. Portanto, realizou-se a construção de quatro bancos de dados (BD),

utilizando como critério de cortes as variâncias (0,001, 0,005, 0,01 e 0,05) das variáveis independentes (**Figura 52 e 53**).

A partir do BD total, contendo 184 variáveis independentes, o corte por variância $>0,001$ gerou um banco de dados contendo apenas 140 descritores (BDA), sendo que os compostos que apresentam alto coeficiente de dissimilaridade estão agrupados entre os valores de pK_i 6,32 M (ATV34) e 7,93 M (ATV23) ($\Delta pK_i=1,61$). No banco de dados com corte de variância $>0,005$ (BDB), observamos que o conjunto teste apresenta a maioria dos compostos distribuídos entre valores de pK_i de 6,92 M (ATV34) e 8,26 M (ATV33) ($\Delta pK_i=1,94$).

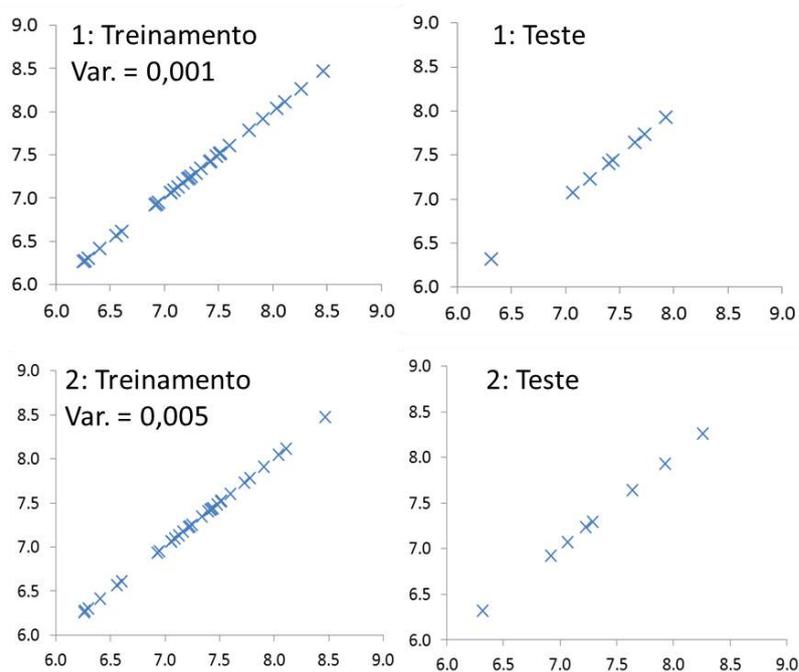


Figura 52. Gráfico da distribuição dos valores de atividade biológica (pK_i , M) dos compostos dos conjuntos treinamento (N=31) e teste (N=8) obtidos pelo método Kennard-Stone com cortes de variância de 0,001 (BDA) e 0,005 (BDB).

Nos bancos de dados com corte de variância $>0,01$ (BDC) e $>0,05$ (BDD), observamos a mesma distribuição descrita para BDA, com o conjunto teste apresentando os compostos distribuídos entre valores de pK_i de 6,92M (ATV34) e 7,93M (ATV23) ($\Delta pK_i=1,61$). Portanto, o BDB apresenta a melhor distribuição dos compostos do conjunto teste, favorecendo a diversidade estrutural dos compostos selecionados e evitando possíveis problemas durante a etapa de validação dos modelos de QSAR devido ao favorecimento de uma região específica.

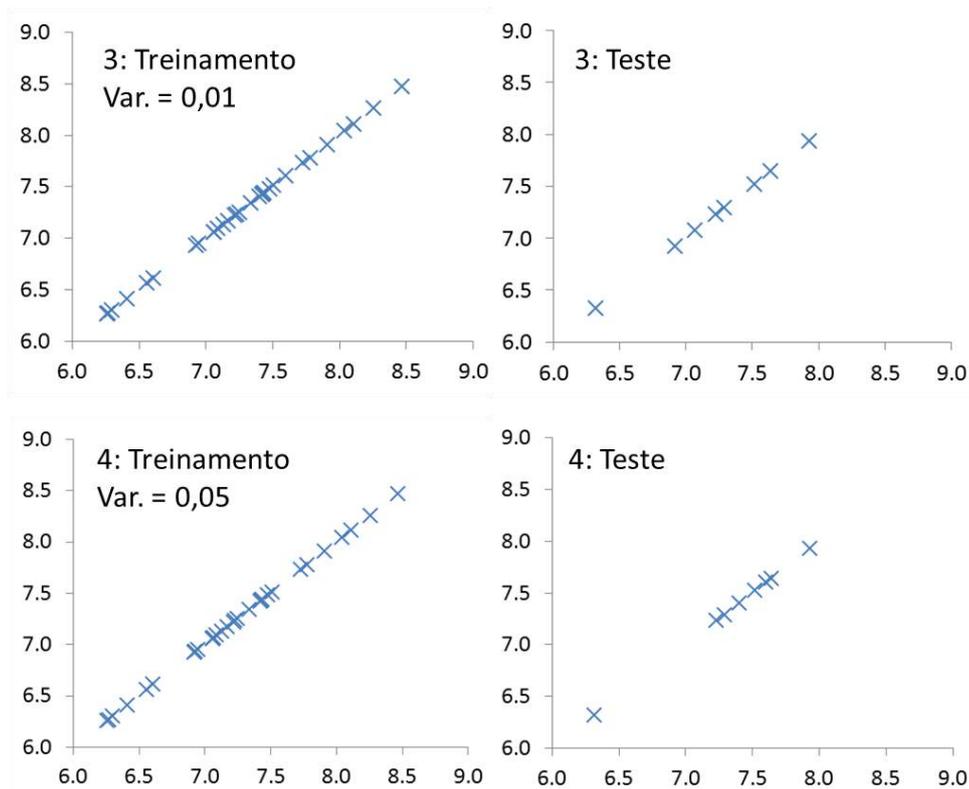


Figura 53. Gráfico da distribuição dos valores de atividade biológica (pK_i , M) dos conjuntos treinamento ($N=31$) e teste ($N=8$) obtidos pelo método Kennard-Stone com cortes de variância de 0,01 (BDC) e 0,05 (BDD).

4.5.2. AVALIAÇÃO DOS BANCOS DE DADOS

A partir do BDB (BDB-A01), que apresenta os descritores com variância $>0,005$, construíram-se quatro novos bancos de dados com novos cortes de variância de 0,03 (BDB-B02), 0,06 (BDB-B03), 0,09 (BDB-B04) e 0,12 (BDB-B05), considerando a variância da atividade biológica para os compostos do conjunto treinamento.

As melhores equações de QSAR para cada banco de dados avaliado, contendo até 6 termos, que é 20% do número de compostos do conjunto treinamento, foram obtidas usando o programa Wolf, variando fator de ajuste (0,1, 0,5 e 1,0), o número de operações de cruzamento (50000, 100000 e 500000) e o tamanho das populações iniciais (600, 800 e 1000), mantendo a taxa de mutação em 100%, totalizando 27 corridas por banco de dados.

Essas equações foram selecionadas a partir dos valores do coeficiente de determinação (R^2), sendo avaliados quanto à potência predita, seus respectivos valores residuais para os conjuntos de treinamento e de teste, a presença de compostos *outliers*, o domínio de aplicação e a capacidade preditiva para novos compostos (**Tabela 7**).

Tabela 7. Melhor equação para cada banco de dados (BDB-A01 a BDB-A05) com o número total de variáveis independentes, número de termos selecionados, coeficiente de determinação (R^2), erro padrão da estimativa (SEE), raiz do desvio médio quadrático da estimativa (RMSEE) e a correlação de Spearman (ρ).

Equação	Descritores	Termos	R^2	SEE	RMSEE	ρ
A01	132	6	0,70	0,27	1,17	0,82
A02	117	6	0,59	0,32	0,34	0,67
A03	106	6	0,56	0,33	0,36	0,71
A04	100	6	0,59	0,32	0,34	0,67
A05	90	6	0,57	0,32	0,31	0,66

4.5.3. ANÁLISE DAS EQUAÇÕES DE QSAR-3D

Diversos trabalhos de QSAR publicados (ARAÚJO et al., 2011b; LEAL et al., 2015; LIU et al., 2011) discutem a capacidade preditiva das equações de QSAR através de parâmetros estatísticos de validação cruzada (q^2) ou o cálculo de R^2 através da origem (ROY, KAR, 2014; TROPSHA, 2010). A validação cruzada consiste na remoção de compostos do conjunto treinamento, gerando um novo modelo e as propriedades dos compostos omitidos são preditos, sendo esse processo repetido varias vezes, dependendo do número de compostos do conjunto treinamento. De fato, Golbraikh e Tropsha (2002) demonstraram que um valor elevado de q^2 não é um critério rigoroso para determinação da capacidade preditiva do modelo, indicando que outros testes estatísticos aplicados ao conjunto teste seriam mais confiáveis para esta avaliação.

Neste contexto, diversos autores relatam a importância da avaliação do conjunto teste utilizando o conceito de R^2 (GOLBRAIKH, TROPSHA, 2002; ROY, KAR, 2014), sendo que em todas as abordagens a soma dos resíduos ao quadrado do conjunto teste é avaliada em função da diferença da atividade pela média do conjunto treinamento. Nessa abordagem, se os valores preditos do conjunto teste forem iguais à média do conjunto treinamento, $R^2_{pred} \geq 0$, entretanto, se os valores preditos forem diferentes dos utilizados durante o ajuste do modelo, $R^2_{pred} < 0$, o que pode ocasionar interpretações equivocadas a cerca do modelo avaliado (ALEXANDER, TROPSHA, WINKLER, 2015).

Nesse trabalho, não serão avaliados os termos estatísticos q^2 ou R^2_{pred} para determinar a capacidade preditiva do modelo, mas sim os valores de RMSEE do conjunto teste. Portanto,

a equação BDB-A01 não será avaliada visto que RMSEE >1,0, indicando uma alta diferença entre os valores preditos e observados.

4.5.4. ANÁLISE DAS EQUAÇÕES BDB-A02 e BDB-A04

Estas equações apresentam 6 termos, onde cada um é representado pelo código de três letras do resíduo de aminoácido selecionado acompanhado do código, correspondente à contribuição de energia estérica (Coulomb, C) ou eletrostática (Lennard-Jones, LJ), ou não ter código, correspondendo à soma das duas contribuições (**Tabela 8**).

Tabela 8. Melhores equações selecionadas para BDB-A02 e BDB-A04

BDB	Equação
A02	$pK_i = 6,198 - 0,0804\text{Phe149LJ} + 0,058\text{Met155} + 1,016\text{Ala164C} + 0,278\text{Leu197LJ} - 0,064\text{Ile202LJ} - 0,193\text{Ile215LJ}$
A04	$pK_i = 6,195 + 1,023\text{Ala164C} - 0,081\text{Phe149LJ} + 0,277\text{Leu197LJ} - 0,064\text{Ile202LJ} + 0,058\text{Met155} - 0,196\text{Ile215}$

A Tabela 8 mostra que apenas um termo, que aparece nas duas equações, representa a energia individual de Coulomb (Ala164C), três termos, que também aparecem nas duas equações, representam a energia individual de Lennard-Jones (Phe149LJ, Leu197LJ e Ile202LJ) e um termo, também presente nas duas equações, representa o somatório das duas contribuições (Met155). A principal diferença entre estas duas equações é presença do resíduo Ile215 que é representado no modelo A02 pela energia da contribuição individual de Lennard-Jones (Ile215LJ), e no modelo A04 pelo somatório das energias de Coulomb e Lennard-Jones (Ile215).

Para avaliar se as Eq. A02 e Eq. A04 apresentam informações similares quanto às interações com a holoenzima, avaliamos a matriz de correlação cruzada dos descritores destas equações (**Tabela 9**).

Tabela 9. Tabela da matriz de correlação cruzada dos descritores das Eq. A02 e A04.

	Phe149LJ	Met155	Ala164C	Leu197LJ	Ile202LJ	Ile215LJ	Ile215
Phe149LJ	1,00						
Met155	-0,30	1,00					
Ala164C	0,29	-0,38	1,00				
Leu197LJ	-0,12	-0,13	-0,14	1,00			
Ile202LJ	-0,39	0,20	-0,34	0,24	1,00		
Ile215LJ	0,08	0,19	0,24	-0,10	-0,48	1,00	
Ile215	0,08	0,19	0,24	-0,10	-0,47	1,00	1,00

De acordo com a **Tabela 9**, os termos Ile215 e Ile215LJ estão fortemente correlacionados, pois apresentam uma correlação maior do que $|0,70|$ ($r=1,00$), indicando que esses termos contribuem com o mesmo tipo de informação nas duas equações. Portanto, a Eq. A02 foi selecionada para futuras análises, pois ela descreve que a contribuição de Lennard-Jones é preponderante para o resíduo Ile215.

Para avaliar a contribuição de cada termo para a potência predita dos compostos, avaliou-se o sinal do coeficiente de cada termo da equação, visto que para aumentar o valor de pK_i predito, os termos com coeficientes de sinal positivo (Met155, Ala164C e Leu197C) deverão apresentar valores de energia de interação positivos, enquanto que os de sinal negativo (Phe149LJ, Ile202LJ e Ile215LJ) deverão apresentar valores negativos de energia de interação.

Portanto, ao considerarmos a energia média referente aos compostos do conjunto treinamento (**Figura 54**), podemos agrupar os termos em dois grupos: i) termos com energias de interação média menor do que $|5,0|$ KJ/mol (Ala164C, Leu197LJ e Ile215LJ) e; ii) termos com energias de interação média maior do que $|5,0|$ KJ/mol (Phe149LJ, Met155 e Ile202LJ). Em geral, os compostos do conjunto treinamento interagem fortemente com resíduos dos domínios UAH-5 (Phe149 e Met155) e LP-6 (Ile202), entretanto, a energia de interação ponderada mostra uma compensação da importância desses resíduos, onde os resíduos Phe149, Ile202 e Ile215 contribuem para o aumento da potência predita.

$$pKi = 6,198 - 0,0804Phe149LJ + 1,016Ala164C + 0,058Met155 + 0,278Leu197LJ - 0,064Ile202LJ - 0,193Ile215LJ$$

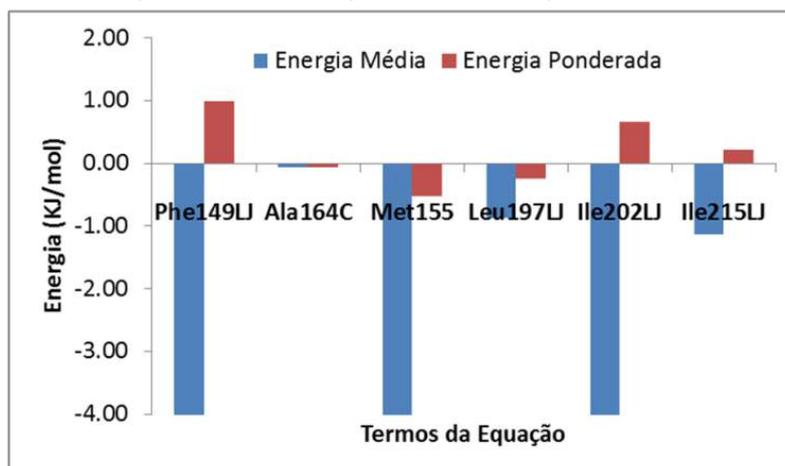


Figura 54. Energias de interação médias dos resíduos selecionados da Eq. A02 para o conjunto treinamento e as energias de interação ponderadas. O gráfico foi truncado em -4,0KJ/mol. O valor de energia média referente aos termos Phe149LJ, Ile202LJ e Met155 é de -12,42, -10,34 e -9,16 KJ/mol, respectivamente.

No caso dos compostos mais (ATV06) e menos (ATV21) potentes (**Figura 55**), observamos que o mais ativo apresenta interações fortes com Phe149 e Ile215, provavelmente devido a presença da cadeia alquila ligada ao anel A, enquanto que o menos ativo apresenta menor interação com esses dois resíduos. Além disso, observamos, também, que as interações com os resíduos Leu197 e Met155 contribuem negativamente para a potência predita, possivelmente induzindo mudanças conformacionais tanto no cofator (Leu197) e no domínio UAH-5.

$$pK_i = 6,198 - 0,0804\text{Phe149LJ} + 1,016\text{Ala164C} + 0,058\text{Met155} + 0,278\text{Leu197LJ} - 0,064\text{Ile202LJ} - 0,193\text{Ile215LJ}$$

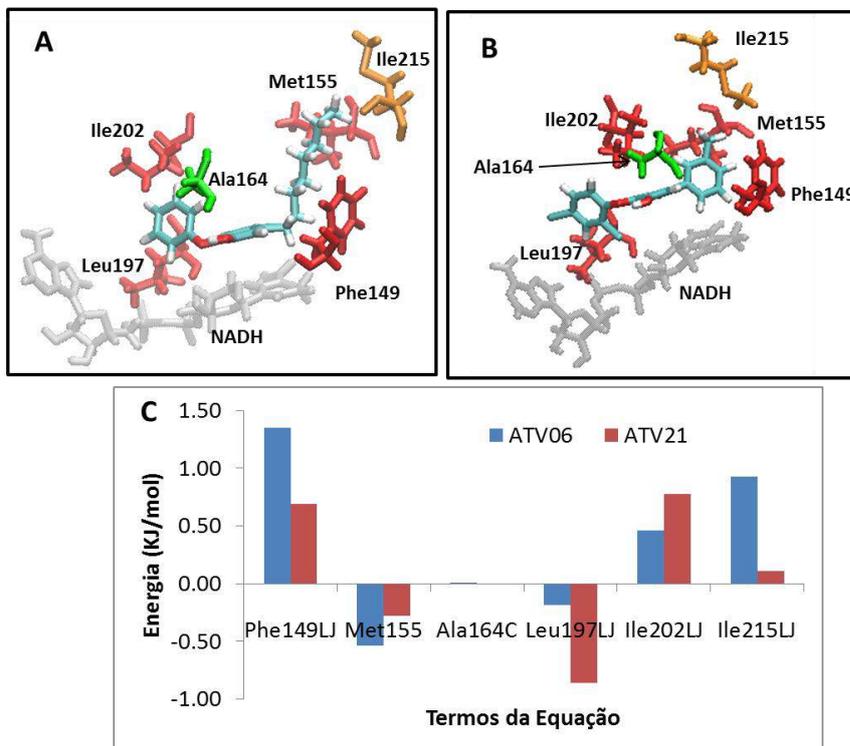


Figura 55. Representação dos resíduos selecionados na Eq. A02 para ATV06 (A; mais ativo) e ATV21 (B; menos ativo). Verde = interação por Coulomb; Vermelho = interação por Lennard-Jones e Laranja = somatório das interações. (C) Gráfico das energias de interação ponderadas para a holoenzima-ATV06 e holoenzima-ATV21.

4.5.5. ANÁLISE DA EQUAÇÃO BDB-A03

A Eq. A03 apresenta o mesmo número de termos da Eq. A02, onde um termo representa a energia individual de Coulomb (Ala164C), quatro termos representam a energia individual de Lennard-Jones (Phe149LJ, Met155LJ, Pro156LJ e Ala198LJ) e um termo representa o somatório das duas contribuições (Leu197).

Ao compararmos as Eq. A02 e A03, observamos a manutenção dos resíduos Ala164 e Phe149, mantendo o mesmo tipo de interação descrito anteriormente, enquanto para os resíduos Met155 e Leu197, as interações consideradas são a de Lennard-Jones e o somatório das energias de Coulomb e Lennard-Jones, respectivamente.

A análise das energias médias referentes aos compostos do conjunto treinamento (**Figura 56**) possibilitou a divisão dos termos em dois grupos: i) termos com energias de interação média menor do que $|5,0|$ KJ/mol (Pro156LJ, Ala164C e Leu197) e; ii) termos com energias de interação média maior do que $|5,0|$ KJ/mol (Phe149LJ, Met155LJ e Ala198LJ). Entretanto, ao avaliarmos as energias de interação ponderada, observamos que os coeficientes favorecem os termos do segundo grupo, aumentando o peso deles dentro da Eq. A03.

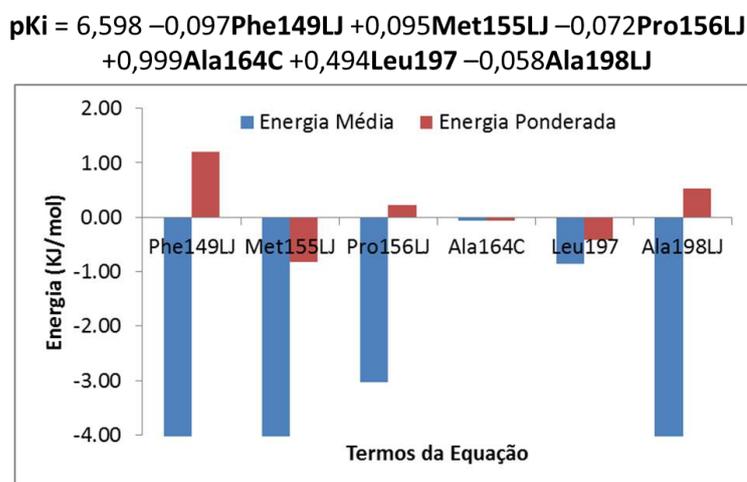


Figura 56. Energias de interação médias dos resíduos selecionados na Eq. A03 para o conjunto treinamento e as energias de interação ponderadas. O gráfico foi truncado em $-4,0$ KJ/mol. O valor de energia média referente aos termos Phe149LJ, Met155LJ e Ala198LJ é de $-12,42$, $-8,63$ e $-9,08$ KJ/mol, respectivamente.

Devido à presença de dois termos próximos espacialmente, i. e., Leu197 e Ala198, avaliamos a matriz de correlação cruzada entre as variáveis independentes (**Tabela 10**), sendo

que estes termos apresentam correlação maior do que $|0,70|$ ($r=0,84$), ou seja, eles trazem informações redundantes para a equação, por isso, a Eq.A03 foi descartada.

Tabela 10. Tabela da matriz de correlação cruzada dos descritores da Eq. A03.

	Phe149LJ	Met155LJ	Pro156LJ	Ala164C	Leu197	Ala198LJ
Phe149LJ	1,00					
Met155LJ	-0,24	1,00				
Pro156LJ	-0,48	0,61	1,00			
Ala164C	0,29	-0,40	-0,17	1,00		
Leu197	-0,12	-0,11	-0,13	-0,13	1,00	
Ala198LJ	-0,18	-0,01	-0,11	-0,23	0,84	1,00

4.5.6. ANÁLISE DA EQUAÇÃO BDB-A05

A Eq. A05 apresenta o mesmo número de termos das equações anteriores, onde um termo representa a energia individual de Coulomb (Val203C), três termos representam a energia individual de Lennard-Jones (Thr162LJ, Leu197LJ e Ile215LJ) e dois termos representam o somatório das duas contribuições (Lys165 e Ile202) (**Figura 57**).

$$pKi = 6,104 + 0,958Val203C + 0,509Thr162LJ + 0,346Leu197LJ - 0,128Ile215LJ - 0,046Lys165 - 0,095Ile202$$

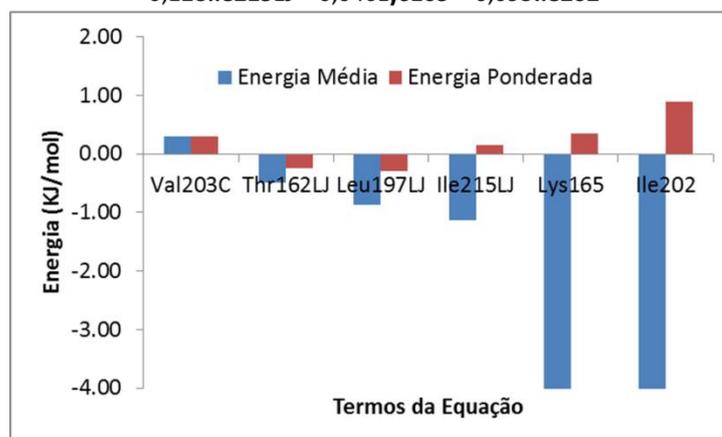


Figura 57. Energias de interação médias entre os resíduos selecionados da Eq. A05 para o conjunto treinamento e as energias de interações ponderadas. O gráfico foi truncado em $-4,0$ KJ/mol. O valor de energia média referente aos termos Lys165 e Ile202 é de $-7,8$ e $-9,47$ KJ/mol, respectivamente.

A análise das energias médias referentes aos compostos do conjunto treinamento possibilitou a divisão dos termos em dois grupos: i) termos com energias de interação média menor do que $|5,0|$ KJ/mol (Val203C, Thr162LJ, Leu197LJ e Ile215LJ) e; ii) termos com energias de interação média maior do que $|5,0|$ KJ/mol (Lys165 e Ile202). Quando avaliamos as energias de interação ponderada, observamos que os coeficientes da equação favorecem os

termos do segundo grupo, aumentando o peso deles dentro da Eq. A05. Além disso, o termo Val203C foi o único cuja energia de interação média foi positiva, indicando uma interação desfavorável para o complexo holoenzima-inibidor, no entanto, ela contribui para aumentar a atividade predita.

Ao compararmos as energias ponderadas dos compostos mais (ATV06) e menos (ATV21) ativos (**Figura 58**), observamos que a presença de um grupo alquila ligado ao anel A do composto ATV06 favorece as interações com os resíduos Ile215, situado no domínio AH-7, e Lys165, situado no domínio UAH-5. Como o composto mais ativo é mais volumoso do que ATV21, ele interage mais com o resíduo Val203, que desestabiliza o complexo. No entanto, essa interação desfavorável é compensada pelas interações citadas anteriormente com os resíduos Ile215 e Lys165. Provavelmente, essa maior interação desfavorável com Val203 justificaria a perda da estrutura secundária do domínio AH-6, discutida no tópico sobre DM. No caso do composto menos ativo, a interação com o resíduo Leu197 contribui negativamente para a potência predita, possivelmente, a interação com esse resíduo force a mudança conformacional do cofator.

$$pK_i = 6,104 + 0,509\text{Thr162LJ} - 0,046\text{Lys165} + 0,346\text{Leu197LJ} - 0,095\text{Ile202} + 0,958\text{Val203C} - 0,128\text{Ile215LJ}$$

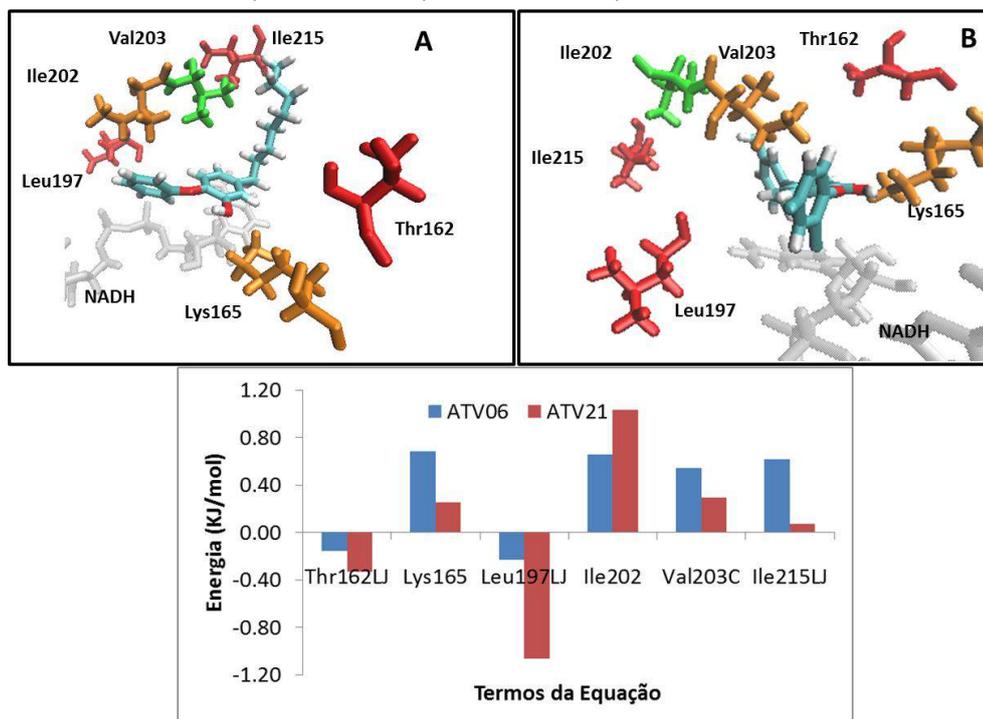


Figura 58. Representação dos resíduos selecionados na Eq. A05 para ATV06 (A; mais ativo) e ATV21 (B; menos ativo). Verde = interação por Coulomb; Vermelho = interação por Lennard-Jones e Laranja = somatório das interações. (C) Gráfico das energias de interação ponderadas para a holoenzima-ATV06 e holoenzima-ATV21.

4.5.7. ANÁLISE DOS RESÍDUOS DAS EQUAÇÕES BDB-02 E BDB-05

A capacidade preditiva das equações selecionadas pode ser analisada pelo valor residual ($pK_{iExp} - pK_{iPred}$) calculado tanto para o conjunto teste quanto para o conjunto treinamento, como discutido anteriormente. Portanto, na **Tabela 11** e **12** estão descritos os valores de atividade experimental (pK_{iExp}) e predita (pK_{iPred}) e os valores residuais para o conjunto treinamento e teste, segundo as Eq.A02 e Eq.A05, respectivamente. Os gráficos comparativos entre os valores de pK_{iExp} e pK_{iPred} dos conjuntos treinamento e teste para as Eq. A02 e A05 são mostrados nas **Figuras 59** e **60**, respectivamente.

Tabela 11. Valores da atividade biológica experimental (Exp), predita (Pred) e os resíduos ($pK_{iExp} - pK_{iPred}$) dos compostos da classe das EDA, utilizando a Eq. A02. Os compostos do conjunto teste estão sublinhados.

<u>ATV</u>	<u>pK_{iExp}</u>	<u>pK_{iPred}</u>	<u>Resíduo</u>	<u>ATV</u>	<u>pK_{iExp}</u>	<u>pK_{iPred}</u>	<u>Resíduo</u>
<u>2</u>	7,23	7,26	-0,03	<u>27</u>	7,29	6,66	0,63
<u>3</u>	7,91	8,06	-0,15	<u>29</u>	6,56	7,04	-0,48
<u>4</u>	8,11	7,53	0,58	<u>30</u>	7,22	7,29	-0,07
<u>6</u>	8,47	8,23	0,24	<u>32</u>	7,73	7,48	0,25
<u>7</u>	6,95	7,02	-0,07	<u>33</u>	8,26	7,49	0,77
<u>9</u>	6,3	7,13	-0,83	<u>34</u>	6,32	7,44	-1,12
<u>10</u>	7,17	7,41	-0,24	<u>40</u>	6,61	6,82	-0,21
<u>11</u>	7,13	7,46	-0,33	<u>43</u>	6,27	6,32	-0,05
<u>12</u>	7,25	7,10	0,15	<u>44</u>	7,43	7,35	0,08
<u>13</u>	7,48	7,06	0,42	<u>46</u>	6,93	7,21	-0,28
<u>14</u>	7,23	6,96	0,27	<u>47</u>	8,04	7,24	0,80
<u>15</u>	7,42	7,16	0,26	<u>50</u>	7,07	7,81	-0,74
<u>16</u>	7,09	7,39	-0,30	<u>51</u>	7,64	7,54	0,10
<u>17</u>	7,78	7,73	0,05	<u>53</u>	7,4	7,28	0,12
<u>18</u>	7,6	7,22	0,38	<u>54</u>	7,34	6,90	0,44
<u>21</u>	6,26	6,63	-0,37	<u>55</u>	7,44	7,78	-0,34
<u>22</u>	7,51	7,35	0,16	<u>56</u>	6,92	7,39	-0,47
<u>23</u>	7,93	6,92	1,01	<u>57</u>	6,41	6,31	0,10
<u>24</u>	7,52	7,53	-0,01	<u>58</u>	7,06	7,06	0,00
<u>26</u>	7,06	7,58	-0,52				

Tabela 12. Valores da atividade biológica experimental (Exp), predita (Pred) e os resíduos ($pK_{iExp} - pK_{iPred}$) dos compostos da classe das EDA, utilizando a Eq. A05. Os compostos do conjunto teste estão sublinhados.

ATV	pK_{iExp}	pK_{iPred}	Resíduo	ATV	pK_{iExp}	pK_{iPred}	Resíduo
<u>2</u>	7,23	7,30	-0,07	<u>27</u>	7,29	7,53	-0,24
3	7,91	7,72	0,19	29	6,56	7,13	-0,57
4	8,11	7,39	0,72	30	7,22	7,02	0,20
6	8,47	8,22	0,25	32	7,73	7,37	0,36
7	6,95	7,25	-0,30	<u>33</u>	8,26	7,01	1,25
9	6,30	6,87	-0,57	<u>34</u>	6,32	7,44	-1,12
10	7,17	7,61	-0,44	40	6,61	6,82	-0,21
11	7,13	6,90	0,23	43	6,27	6,69	-0,42
12	7,25	7,25	0,00	44	7,43	7,24	0,19
13	7,48	7,45	0,03	46	6,93	7,38	-0,45
14	7,23	7,50	-0,27	47	8,04	7,38	0,66
15	7,42	7,05	0,37	<u>50</u>	7,07	8,00	-0,93
16	7,09	7,33	-0,24	<u>51</u>	7,64	7,38	0,26
17	7,78	7,93	-0,15	53	7,40	7,08	0,32
18	7,60	7,36	0,24	54	7,34	6,69	0,65
21	6,26	6,36	-0,10	55	7,44	7,32	0,12
22	7,51	7,84	-0,33	<u>56</u>	6,92	7,46	-0,54
<u>23</u>	7,93	7,98	-0,05	57	6,41	6,40	0,01
24	7,52	7,37	0,15	58	7,06	7,31	-0,25
26	7,06	7,45	-0,39				

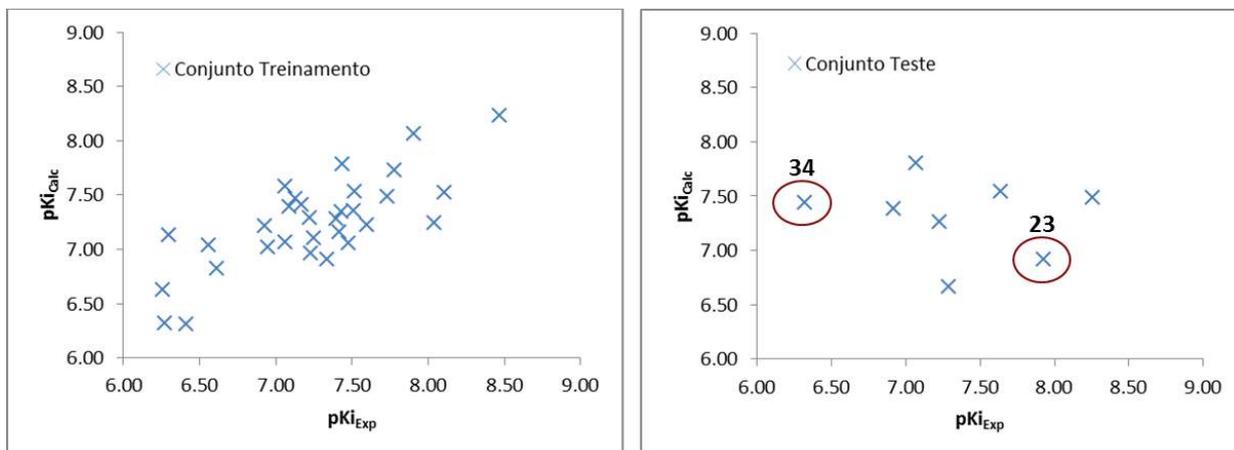


Figura 59. Gráfico dos valores de pK_i experimentais *versus* os valores de pK_i calculados para o grupo de treinamento e de teste, utilizando a Eq. A02.

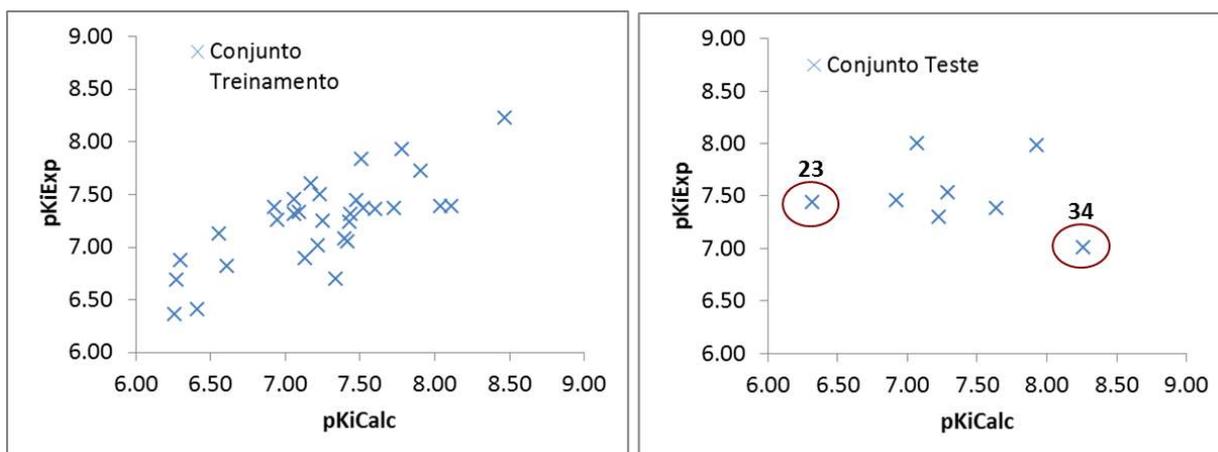


Figura 60. Gráfico dos valores de pK_i experimentais *versus* os valores de pK_i calculados para o grupo de treinamento e de teste, utilizando a Eq. A05.

Considerando a Eq. A02, a análise dos resíduos (**Tabela 11** e **Figura 59**) dos compostos do conjunto treinamento mostra que 71% dos compostos apresentam resíduos menores do que $|\pm 0,5|$, sendo que nenhum desses compostos apresentou valor residual maior do que uma unidade logarítmica, indicando uma excelente capacidade preditiva interna. Para o conjunto teste, cerca de 37% dos compostos apresentam valores residuais menores do que $|\pm 0,5|$, enquanto dois compostos apresentaram resíduos maior do que uma unidade logarítmica (ATV23 e ATV34).

Considerando a Eq. A05, (**Tabela 12** e **Figura 60**), observamos que cerca de 84,0% dos compostos do conjunto treinamento apresentaram valores residuais menores do que $|\pm 0,5|$ e nenhum desses compostos foi classificado como *outlier*. No caso do conjunto teste, 50% dos compostos apresentam valores residuais menores do que $|\pm 0,5|$, enquanto dois compostos apresentaram resíduos maiores do que uma unidade logarítmica (ATV33 e ATV34).

Comparando as Eq. A02 e Eq. A05, observamos que a Eq. A05 é mais preditiva do que Eq. A02 devido ao maior número de compostos com variações residuais menores do que $|\pm 0,5|$ tanto para o conjunto treinamento quanto para o conjunto teste. É interessante observar que tanto o desvio padrão (DP) dos resíduos do conjunto treinamento, quanto os valores de RMSEE do conjunto teste foram similares, 0,32 e 0,71 para Eq. A02 e 0,32 e 0,72 para Eq. A05, respectivamente, ou seja, a análise somente dos valores de DP e RMSEE indicariam que ambas as equações possuem capacidade preditiva aceitável, em vez de diferenciar as equações.

4.5.8. ANÁLISE DOS *OUTLIERS* E DO DOMÍNIO DE APLICAÇÃO DA EQUAÇÃO BDB-05

A confiabilidade da Eq. A05 foi inferida pela determinação de compostos *outliers*, i.e., compostos do conjunto treinamento que não são bem preditos dentro do espaço químico avaliado, e do domínio de aplicação, i.e., o espaço amostral que o modelo obtido é capaz de prever a resposta biológica, sendo determinado pelo conjunto teste.

Na literatura existem diversos métodos para a determinação do domínio de aplicação (ROY, KAR, AMBURE, 2015), sendo o método do intervalo da variável resposta amplamente empregado em diversos estudos (ARAÚJO et al., 2011b; LEAL et al., 2015; SOLOMON, SUNDARARAJAN, ABIRAMI, 2009).

Para a Eq.A05 não foram detectados *outliers* no conjunto treinamento, no entanto, os compostos **ATV33** e **ATV34**, pertencentes ao conjunto teste, foram identificados como fora do domínio de aplicação. A **Figura 61** mostra a estrutura desses compostos, assim como seus correspondentes valores de atividade biológica experimental, predita e os valores residuais.

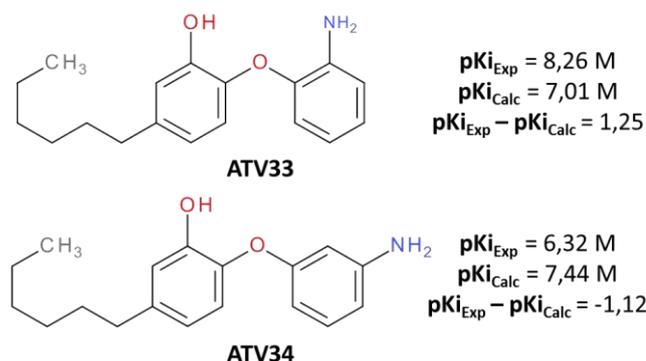


Figura 61. Estruturas químicas, valores de pK_i experimentais, preditos e valores residuais dos compostos ATV33 e ATV34.

Ao avaliarmos as energias de interação ponderada para cada termo da equação (**Figura 62**), os resíduos Ile202 e Val203 influenciam significativamente a potência dos compostos ATV33 e ATV34, respectivamente. Para ATV33, o produto da interação (-10,35KJ/mol) com o seu respectivo coeficiente (-0,095) para o resíduo Ile202 contribui para o aumento da potência predita. Para ATV34, o produto da interação (+0,84 KJ/mol) com o seu respectivo coeficiente (+0,958) para o resíduo Val203 contribui para o aumento da potência predita, sendo assim, a interação por Coulomb com esse resíduo seria desfavorável para a interação com a holoenzima.

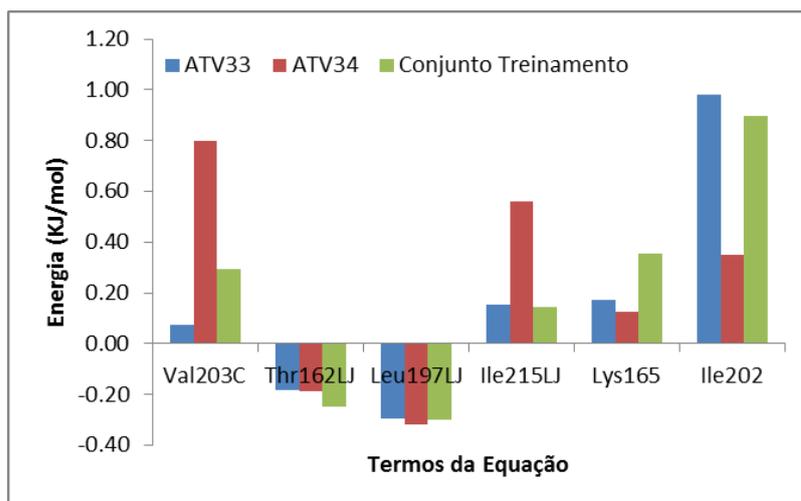


Figura 62. Gráfico das energias de interação ponderadas para a holoenzima-ATV33, holoenzima-ATV34 e para o conjunto treinamento.

De fato, é possível que os resíduos selecionados no modelo não descrevam bem a atividade destes compostos, uma vez que para ATV33 foi relatada anteriormente a alta interação hidrofóbica com Tyr158 ($d=3,11(\pm 0,26)$ Å; persistência=100%) e ATV34 apresenta uma alta interação hidrofóbica com Met103 ($3,11 (\pm 0,26)$ Å; persistência=99,2%), o que resultaria numa interação de Lennard-Jones de -14,24 e -12,26 KJ/mol, respectivamente. Portanto, a Eq.A05 teria uma aplicabilidade restrita, onde compostos que apresentam interações hidrofóbicas com alta persistência não teriam sua potência bem predita.

4.5.9. CAPACIDADE DE PREDIÇÃO DA EQ. A05

Os tópicos anteriores tiveram como proposta avaliar a capacidade preditiva dos modelos obtidos pela análise dos valores residuais da atividade biológica, avaliação dos compostos *outliers* e o domínio de aplicação. Entretanto, é ideal que os modelos de QSAR capturem o máximo de correlações entre as variáveis independentes (conjunto treinamento) e a atividade biológica (ALEXANDER, TROPSHA, WINKLER, 2015).

Em geral, a capacidade de classificação do modelo pode ser determinada pela análise dos valores de ρ , onde valores próximos de 1,0 indicam uma perfeita correlação entre o valor experimental e o predito. No caso da Eq.A05, ela apresenta um ótimo poder de classificação ($\rho=0,66$) e com uma boa precisão nos valores de atividade predita (RMSEE = 0,31), indicando que esta equação captura bem a tendência entre os valores experimentais e preditos.

4.5.10. PREDIÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO COMPOSTO ATV19

Neste trabalho, o composto ATV19 foi excluído da composição dos conjuntos treinamento e teste devido à incerteza no modo de ligação na holoenzima, uma vez que duas soluções foram obtidas durante o estudo de docagem molecular.

A **Figura 63** mostra a estrutura 2D do composto ATV19 e os modos de ligação obtidos por DM, partindo das soluções obtidas no estudo de docagem molecular, com suas respectivas atividades biológicas calculadas a partir da Eq.A05 e os respectivos resíduos.

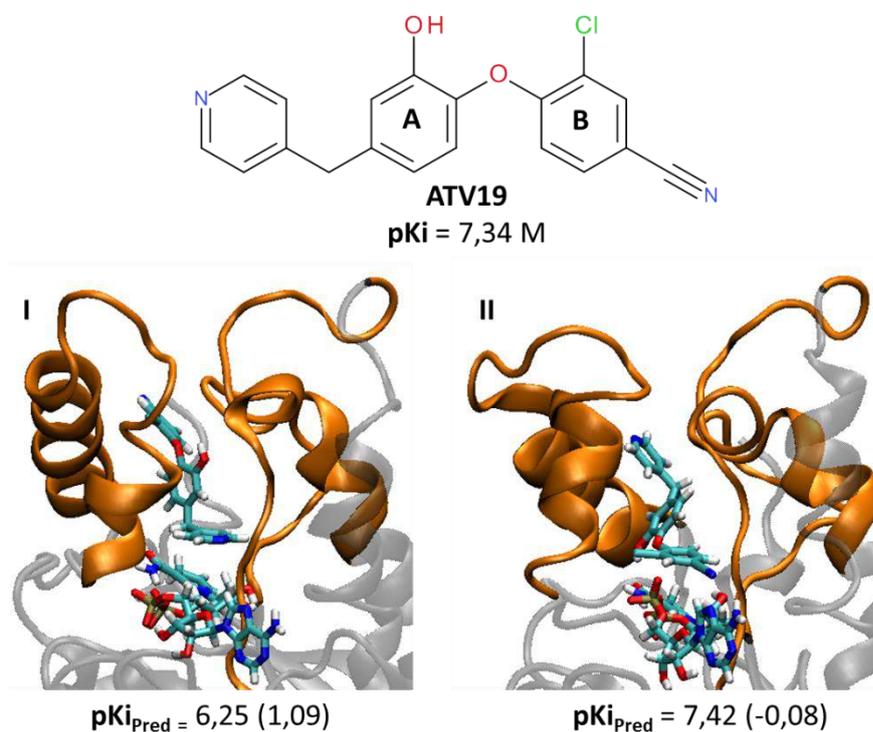


Figura 63. Estrutura química de ATV19 e os modos de ligação obtidos por DM com seus respectivos valores de pK_i calculados e os resíduos entre parênteses.

De acordo com a **Figura 63**, no modo de ligação I, o anel 4-piridina está localizado próximo ao cofator, enquanto que no modo de ligação II, o anel B assume essa posição. Ao analisarmos as potências preditas, observamos que a Eq. A05, é capaz de discriminar os dois modos de ligação, uma vez que o resíduo encontrado para o modo de ligação I é maior do que uma unidade logarítmica, enquanto que o resíduo para o modo de ligação II é próximo de zero, indicando que o modo de ligação II dever ser o mais provável. Além disso, o modo de ligação II do composto ATV19 é semelhante a maioria dos compostos da série, no qual o anel B está localizado próximo aos domínios LLP-4 e AH-6.

4.6. PROPOSTA DE NOVOS CANDIDATOS A INIBIDOR DA INHA

4.6.1. TRIAGEM VIRTUAL

A partir das informações obtidas pelo estudo de QSAR, utilizou-se o composto mais ativo utilizado para a obtenção da Eq. A05 (ATV06) e o mais ativo desta série (ATV05) para construir um mapa farmacofórico, no intuito de selecionar compostos que possam interagir com os resíduos Val203, Thr162, Leu197, Ile215, Lys165 e Ile202 (**Figura 64**). A utilização desse método permite a seleção de moléculas com funções químicas diferentes, mas que apresentem complementaridade em relação ao receptor-alvo (RICHMOND et al., 2006; YANG, 2010).

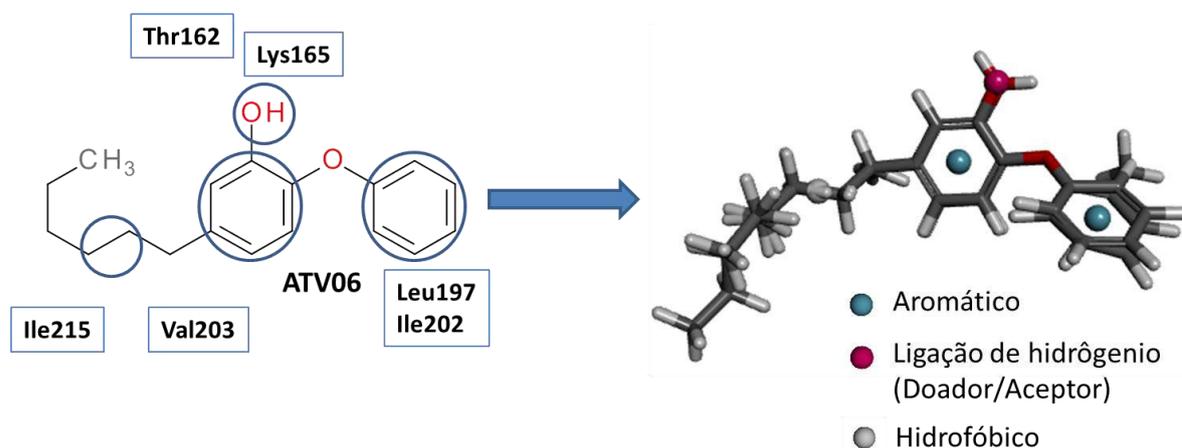


Figura 64. Mapa farmacofórico destacando os resíduos selecionados pela Eq. A05 e as características principais desejáveis para os candidatos a inibidores da enzima InHA.

Após a construção do mapa farmacofórico, realizou-se a triagem virtual utilizando o servidor ZINCPharmer (<http://zincpharmer.csb.pitt.edu>), aplicando os pré-filtros descritos anteriormente, retornando 100 moléculas. Desse total, removeram-se todos os compostos que apresentavam centro de quiralidade, resultando em 32 candidatos. A seguir, aplicou-se o método de docagem molecular, onde foram selecionados os compostos que tiveram consenso nas pontuações MolDock e Rerank, resultando em 10 candidatos.

Para a análise das propriedades ADME/Tox, selecionou-se quatro compostos que apresentaram orientação e interação por ligação hidrogênio semelhantes aos compostos ATV05 e ATV06 (**Figura 65**).

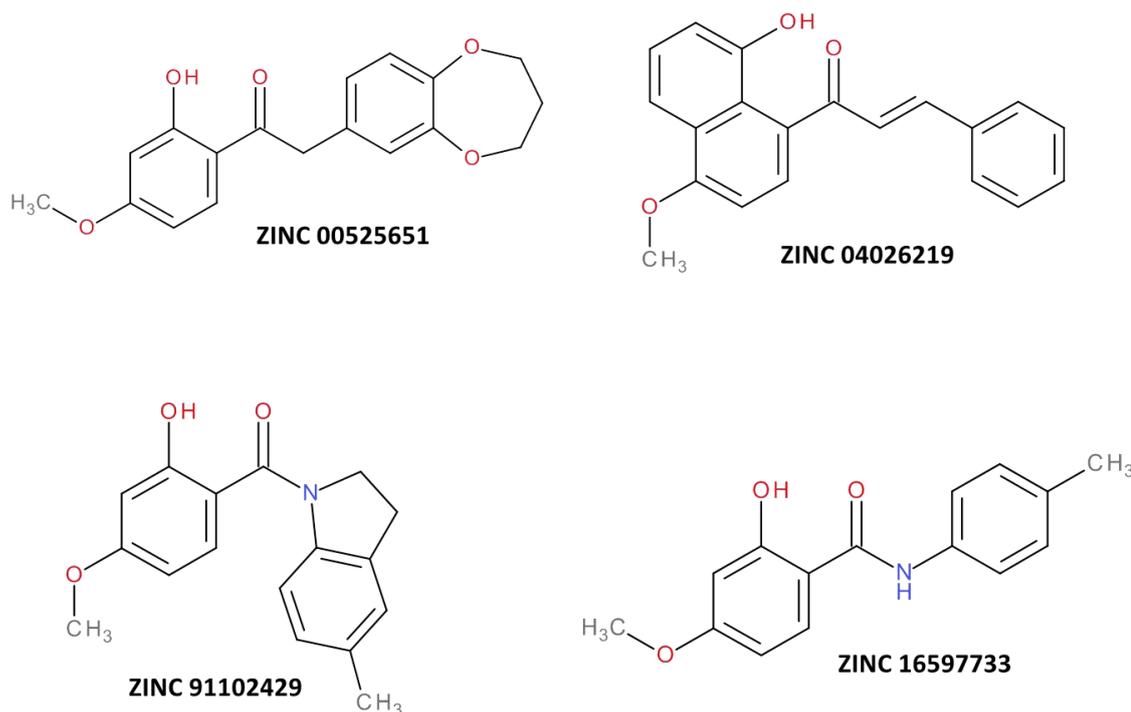


Figura 65. Estruturas químicas dos compostos ZINC 00525651 (ZINC51), ZINC 04026219 (ZINC19), ZINC 91102429 (ZINC29) e ZINC16597733 (ZINC33) selecionados por triagem virtual.

Para os candidatos selecionados após o estudo de docagem molecular e os compostos **ATV06** e **ATV05**, calculou-se as propriedades ADME/Tox (**Tabela 13**), mostrando que esses compostos apresentam menor lipofilicidade (cLogP) quando comparados ao composto mais ativo.

Os candidatos ZINC51, ZINC33 e ZINC29 apresentam melhor solubilidade em água, enquanto que o candidato ZINC19 tem solubilidade comparável a do composto **ATV05**. O parâmetro de topologia da área de superfície polar (TPSA) está relacionado à permeabilidade por transporte passivo em membranas, sendo assim, os candidatos ZINC51 e ZINC33 apresentaram valores, aproximadamente, duas vezes maiores do que o do composto de referência, enquanto o candidato ZINC29 foi aproximadamente 1,5 vezes maior.

Com relação à predição de toxicidade (**Tabela 13**), o programa OSIRIS localiza fragmentos dentro da molécula, que indica um potencial risco de toxicidade. No caso dos candidatos ZINC29, ZINC51 e ZINC33, a presença da subunidade *orto*-hidróxi-fenila pode formar benzoquinonas, através de um processo radicalar (AVENDAÑO, MENÉNDEZ, 2008; FRAGA, BARREIRO, 2006), sendo esse fragmento responsável pelo efeito tumorigênico, enquanto que o composto ZINC19 apresentaria efeito tóxico reprodutivo devido o fragmento naftila (**Figura 66**).

Tabela 13. Compostos selecionados após a triagem virtual e docagem molecular.

#	Risco de toxicidade				Biodisponibilidade					
	MUT	TUM	IRR	EP	HBD	HBA	PM	cLogP	LogS	TPSA
ATV05	+++	+++	++	+++	1	2	284	5,63	-5,54	29,46
ATV06	+++	+++	+++	+++	1	2	298	6,2	-5,74	29,46
ZINC51	+++	+++	+++	++	1	5	314	2,88	-3,61	64,99
ZINC19	+++	++	+++	+++	1	3	304	4,08	-5,17	46,53
ZINC33	+++	+++	+++	++	2	4	257	2,74	-3,19	58,56
ZINC29	+++	+++	+++	++	1	4	283	3,12	-3,52	49,77

+ = não tóxico; ++ = levemente tóxico; +++ = altamente tóxico; MUT = Mutagênico; TUM = tumorigênico; IRR = irritante; EP = efeito reprodutivo; HBD = Doador de ligação hidrogênio; HBA = Aceptor de ligação hidrogênio; MM = massa molar; cLogP = coeficiente de lipofilicidade calculado; LogS = coeficiente de solubilidade; TPSA = topologia da área de superfície polar.

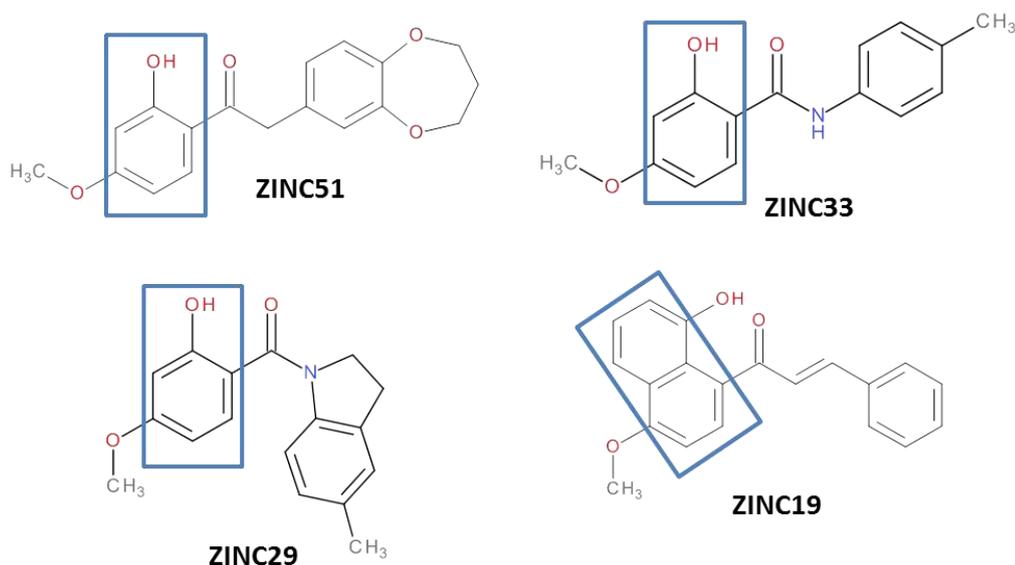


Figura 66. Destaque dos fragmentos que estão associados à efeitos carcinogênicos (ZINC51, ZINC33 e ZINC29) e reprodutivos (ZINC19).

4.6.2. SELEÇÃO DOS COMPOSTOS OBTIDOS POR TRIAGEM VIRTUAL PARA ESTUDOS DE DINÂMICA MOLECULAR

Ao analisarmos as estruturas químicas dos compostos selecionados por triagem virtual, observamos que eles estão compreendidos em três grupos: (a) amidas (ZINC33 e ZINC19); (b) chalconas (ZINC19) e (c) 1,5-benzodioxepina (ZINC51).

O grupo aril-amida está presente em diversos compostos avaliados contra a TB contendo núcleos heteroaromáticos, e. g. pirazinamida e seus análogos (BISPO et al., 2012;

LIMA, BISPO, SOUZA, 2011) e 2-tiofeno (DE SOUZA et al., 2008b) ou derivados salicilamidas (PARASKEVOPOULOS et al., 2015) (**Figura 67**).

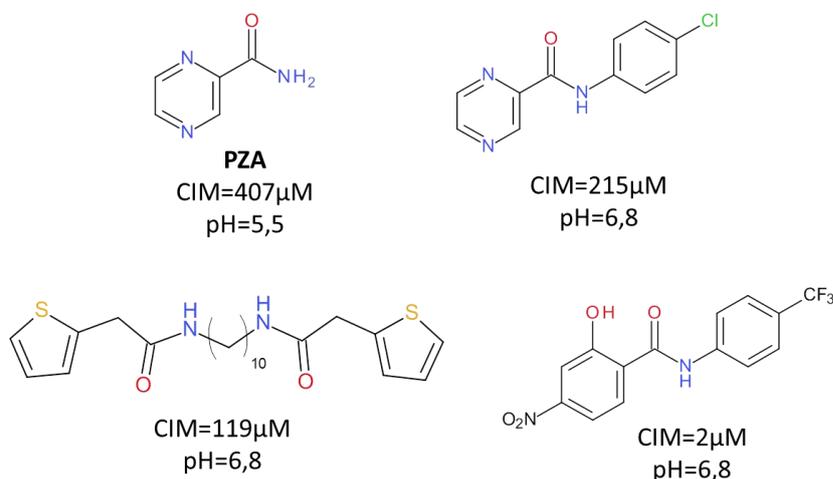


Figura 67. Derivados aril-amidas descritos na literatura com suas respectivas atividades antimicobacterianas e o pH do teste *in vitro*.

No caso das salicilamidas, a atividade *in vitro* frente ao *M. tuberculosis* foi determinada por incubação do bacilo com cada derivado por um período de 14 a 21 dias, onde a CIM encontrada varia de 2 μ M até 1000 μ M (KRÁTKÝ, VINŠOVÁ, STOLAŘÍKOVÁ, 2012; PARASKEVOPOULOS et al., 2015; WAISSER et al., 2003).

O mecanismo de ação proposto por LEE et al. (2013) para os derivados salicilamidas, consiste na hidrólise da hidroxila fenólica, formando o íon carboxilato que é eliminado do bacilo. A seguir, esse íon é protonado, retornando para o interior do bacilo, acidificando seu citoplasma. No entanto, essa proposta desconsidera dois pontos importantes: (i) a possibilidade de que amidas secundárias podem ser mais resistentes à clivagem por enzimas pirazinamidase/nicotinamidase, possibilitando a interação com diversos alvos celulares (LIMA, BISPO, SOUZA, 2011; RUEDA et al., 2014; ZHANG, MITCHISON, 2003) e (ii) devido à similaridade com a PZA, podemos supor que a hidrólise proposta por LEE et al. (2013) aconteça na ligação amida, sendo facilitada pela ligação intramolecular entre a hidroxila fenólica e a carbonila, gerando o ânion do ácido salicílico, que atuaria como o ânion do ácido pirazínico, carregando H^+ para dentro do bacilo (LIMA, BISPO, SOUZA, 2011), e uma amina aromática, que pode gerar danos tanto ao bacilo quanto às células humanas devido a formação de espécies reativas de nitrogênio (MA et al., 2013) (**Figura 68**).

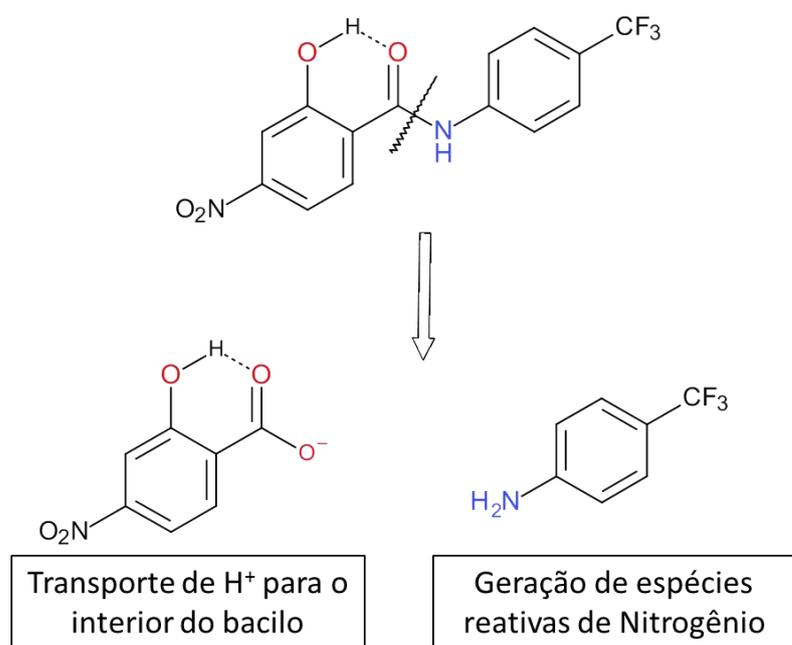


Figura 68. Produtos da hidrólise grupo aril-amida e os seus respectivos mecanismos de ação.

O grupo das chalconas é considerado precursor das classes de produtos naturais flavonóides e isoflavonóides, sendo que apresentam atividade para diferentes alvos biológicos, e. g. anti-HIV, anti-câncer, doenças subtropicais como filariose e malária, inibição da produção de biofilmes e anti-TB (MAHAPATRA, BHARTI, ASATI, 2015; SINGH, ANAND, KUMAR, 2014).

Com relação à atividade anti-TB, diversos estudos relatam a atividade biológica de chalconas sem especificar um alvo específico (HANS et al., 2010; LI et al., 2015; LIN, 2002; SIVAKUMAR et al., 2007; VENTURA et al., 2015), sendo que, recentemente centenas de moléculas foram avaliadas frente à proteína tirosina fosfatase A do *M. tuberculosis* (MtbPtpA) e proteína tirosina fosfatase humana (HumPtp) (CHIARADIA et al., 2008, 2012), uma enzima envolvida em diversos processos regulatórios, como metabolismo, apoptose e resposta imune (**Figura 69**) (ZHOU et al., 2010).

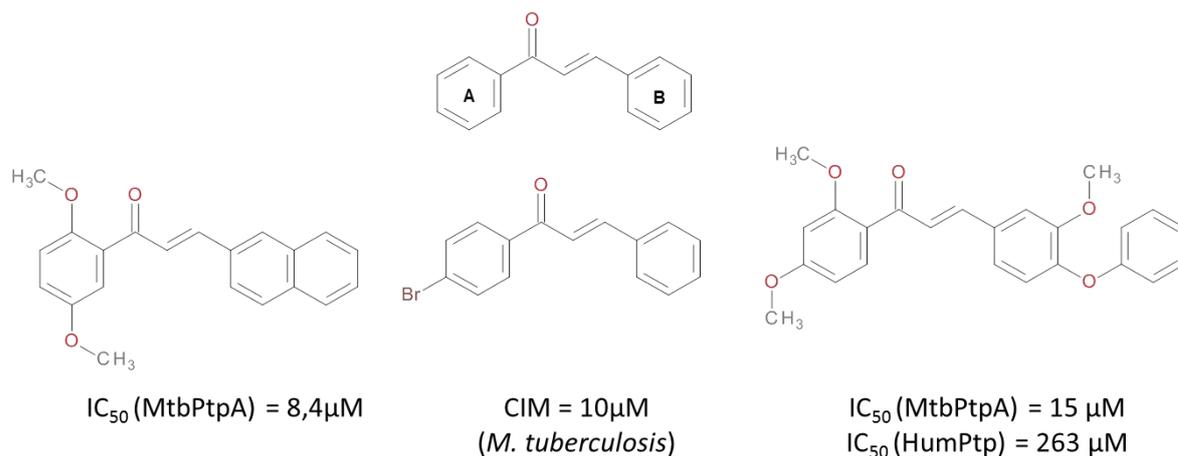


Figura 69. Derivados chalconas descritos na literatura com suas respectivas atividades biológicas frente a proteína tirosina fosfatase do MTB (MtbPtpA) e humana (HumPtpA humana).

O grupo 1,5-benzodioxepina (**Figura 70**) é amplamente encontrado compostos presentes em produtos marinhos (DREVERMANN et al., 2007; HÜGEL et al., 2008) e como intermediário na preparação de análogos de isoflavonóides encontrados em *Trifolium pratense*, encontrada na Europa, e *Cordyla africana* (AITMAMBETOV, GRISHKO, KHILYA, 1993), encontrada nas áreas central e sul da África (AITMAMBETOV, TLEGENOV, TOKHTYBAEVA, 2006).

Contudo, esse arcabouço molecular é pouco explorado quanto a sua ação farmacológica, sendo encontrado em composto com ação anti-câncer (LUO et al., 2013), anti-HIV (LIU et al., 2010) e antagonistas de receptores muscarínicos do tipo M₃ (SONDA et al., 2007).

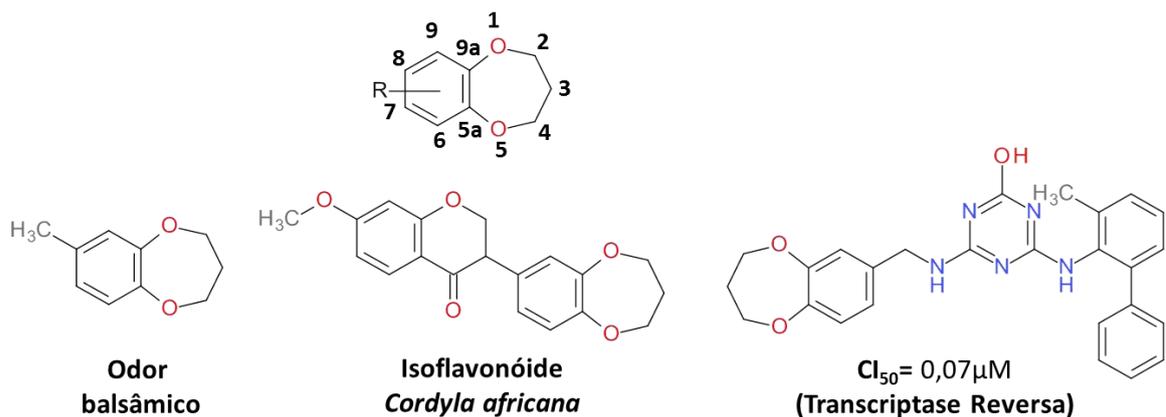


Figura 70. Grupo 1,5-benzodioxepina e alguns compostos com propriedades olfativas, iso-flavonóide e com atividade anti-HIV.

Portanto, devido à possibilidade do grupo aril-amida atuar por um mecanismo inespecífico e com a possibilidade de gerar espécies tóxicas para células humanas, os compostos ZINC33 e ZINC19 não foram avaliadas por DM, enquanto os compostos ZINC19 e ZINC51 foram selecionados para análise por DM.

4.6.3. ANÁLISE POR DINÂMICA MOLECULAR DO COMPOSTO ZINC19

Ao avaliar a estabilidade do complexo holoenzima-ZINC19 durante 30ns de simulação (**Figura 71**), observamos uma variação do RMSD da cadeia principal da InhA de, aproximadamente, 0,25nm, sendo que a partir de 20ns ocorreu uma estabilização da movimentação dos átomos da InhA. No caso do RMSD dos átomos diferentes de hidrogênio do cofator, a variação da estrutura de partida foi de, aproximadamente, 0,15nm, estabilizando após os 5ns iniciais, enquanto o RMSD do ZINC19 permanece estável durante o tempo de simulação.

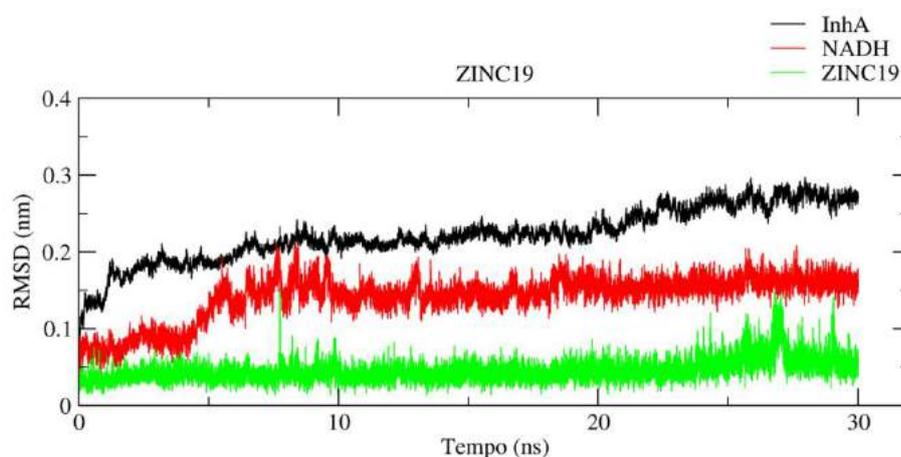


Figura 71. Gráfico de RMSD para os complexos holoenzima-ZINC19 durante 30ns de simulação de DM.

Ao compararmos a mobilidade da cadeia principal (carbono- α) entre a holoenzima (2AQ8) e a holoenzima-ZINC19 (**Figura 72**), observamos uma maior mobilidade dos resíduos que compõe o domínio MLP-4 (Gly104-Gln106), LP-6 (Gly204-Gly208) e a região inicial de AH-7 (Glu209 e Glu210), o que indica a desestabilização do sítio de ligação. Essa tendência pode ser observada quando analisamos a distância dos domínios LLP-4/AH-6 e MLP-4/LP-6 (**Figura 73**), onde observamos a conformação aberta.

Com a abertura da cavidade, observamos a entrada de moléculas de água próximo aos domínios LP-5 e UAH-5, realizando interações por ligação hidrogênio entre os resíduos Asp150-Ala191 (N...HOH e HOH...O, 86,4 e 90,6%, respectivamente) e Tyr158-Asp148-Phe149 (OH...HOH, HOH...OD2 e HOH...O, 85,2, 82,6 e 76,6%, respectivamente) (**Figura 74**).

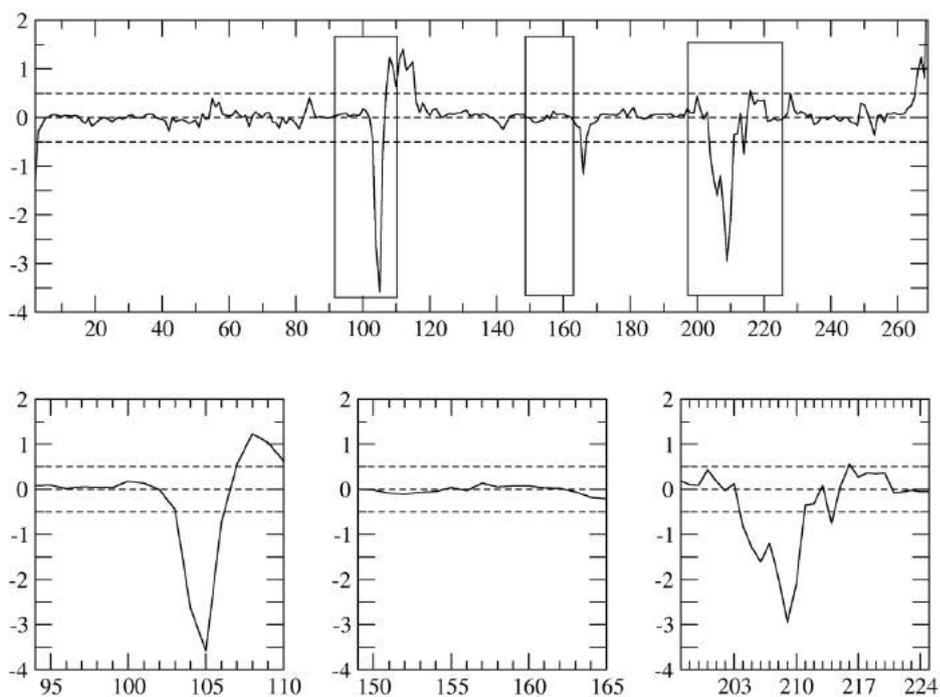


Figura 72. Gráfico da diferença de variação do fator-B calculado para o complexo 2AQ8 e holoenzima-ZINC19. Os retângulos mostram as regiões que compõem o sítio de ligação.

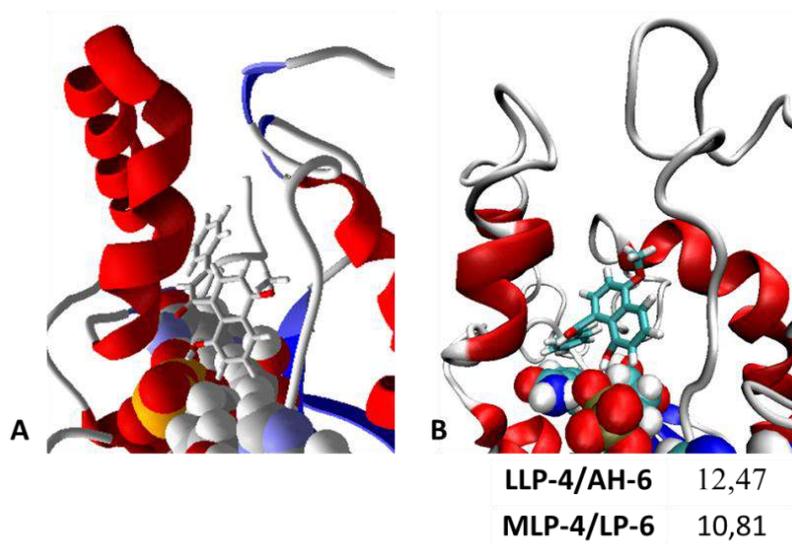


Figura 73. Comparação das estruturas obtidas pelo (A) estudo de docagem molecular e (B) a estrutura média do *cluster* mais populoso obtido nos 5ns finais de simulação e a distância dos domínios LLP-4/AH-6 e MLP-4/LP-6.

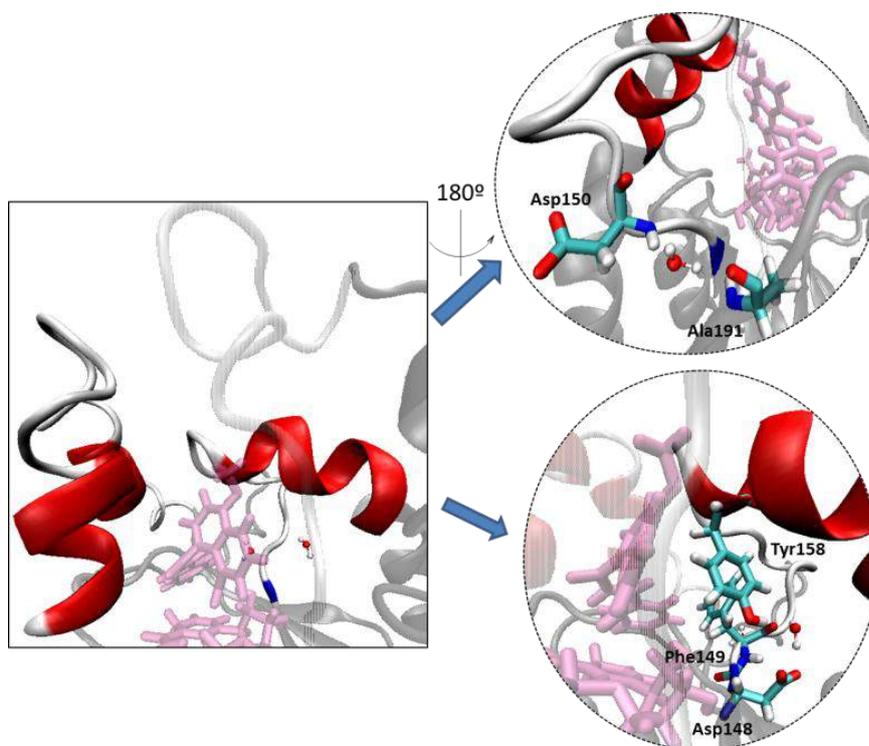


Figura 74. Representação da estrutura média para o *cluster* mais populoso do complexo holoenzima-ZINC19, destacando as moléculas de água presentes no interior do sítio de ligação.

Ao avaliarmos a movimentação do resíduo Phe149, tanto na holoenzima quanto no complexo holoenzima-ZINC19 (**Figura 75**), observamos que a faixa de variação do diedro φ diminui quando comparado com a holoenzima, indicando a restrição do carbono- α dentro do sítio ativo, enquanto que o deslocamento dos diedros ψ e χ_2 de aproximadamente 60° e 150° , respectivamente, favorece o acesso de moléculas de água ao domínio LP-5.

No caso do resíduo Tyr158, as variações de cerca de 90° e 60° dos diedros φ e ψ , respectivamente, contribuem para a saída desse resíduo de dentro do sítio de ligação. Além disso, essa mudança conformacional da Tyr158 é favorecida pela ligação hidrogênio mediada por água descrita anteriormente.

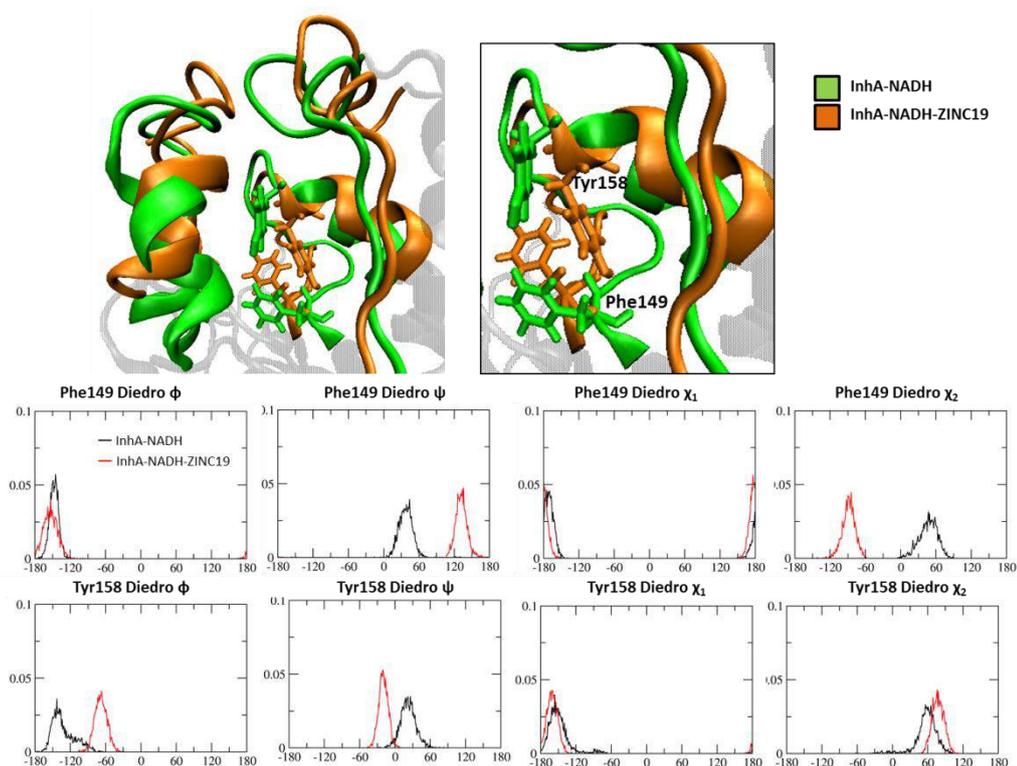


Figura 75. Representação gráfica da mobilidade dos resíduos Phe149 e Tyr158 referente aos diedros ϕ , ψ , χ_1 e χ_2 para holoenzima (verde) e holoenzima-ZINC19 (laranja).

4.6.4. ANÁLISE POR DINÂMICA MOLECULAR DO COMPOSTO ZINC51

Ao avaliar a estabilidade do complexo holoenzima-ZINC51 durante 40ns de simulação (**Figura 76**), observamos uma variação do RMSD da cadeia principal da InhA de aproximadamente 0,25nm, sendo que a partir de 10ns ocorreu uma estabilização da movimentação dos átomos da InhA. No caso do RMSD dos átomos diferentes de hidrogênio do cofator e do ZINC51, eles atingem a estabilidade logo nos primeiros 5ns de simulação.

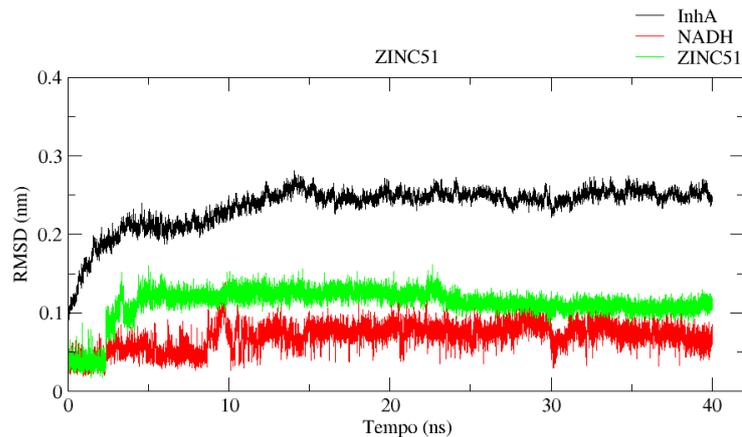


Figura 76. Gráfico de RMSD para os complexos holoenzima-ZINC51 durante 40ns de simulação de DM.

Ao compararmos a estrutura obtida pelo estudo de docking molecular e a estrutura média do *cluster* mais populoso dos últimos 5ns finais da simulação (**Figura 77**), observamos a manutenção da estrutura secundária de AH-6 e a perda da estrutura secundária do início de AH-7 devido a formação de uma interação por ligação de hidrogênio entre Leu207 e Glu210 (Leu207N...Glu210O, 84,0%). A interação entre os resíduos Leu207 e Glu210 resulta em uma volta com quatro resíduos, permitindo a interação por ligação de hidrogênio entre a interseção LP-6/AH-7 e o domínio MLP-4 (Gly208N...Gly104O, 72,1%). Essa interação por ligação de hidrogênio entre domínios influencia no fechamento do sítio de ligação, onde a tampa (MLP-4/LP-6) e o portão (LLP-4/AH-6) apresentam distâncias similares ao complexo holoenzima e ao complexo holoenzima-ATV05 (6,06 e 8,33 Å, respectivamente).

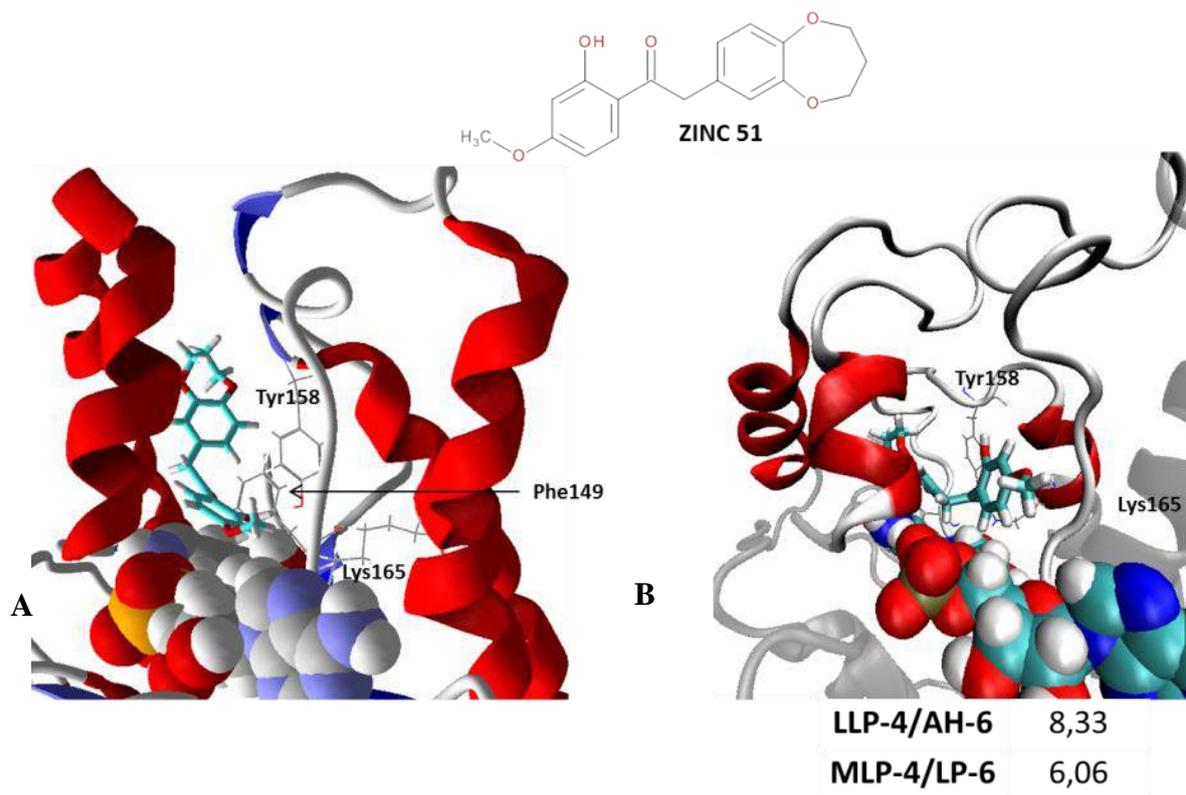


Figura 77. Comparação das estruturas obtidas pelo (A) estudo de docagem molecular e (B) a estrutura média do *cluster* mais populoso obtido nos 5ns finais de simulação e a distância dos domínios LLP-4/AH-6 e MLP-4/LP-6.

Considerando a interação entre o sítio de ligação com moléculas de água, observamos que o fechamento da tampa aprisiona quatro moléculas de água que interagem com os resíduos Gln100 (HOH...OE1 e NE2...HOH, 96,6 e 85,4%, respectivamente), Trp160 (N...HOH, 97,0%) e Met161 (N...HOH, 92,0%) e uma molécula de água fora da cavidade, mediando interações via ligação hidrogênio entre os resíduos Gly104 (N...HOH, 72,1%) e Ile105 (N...HOH, 83,0%) (**Figura 78**).

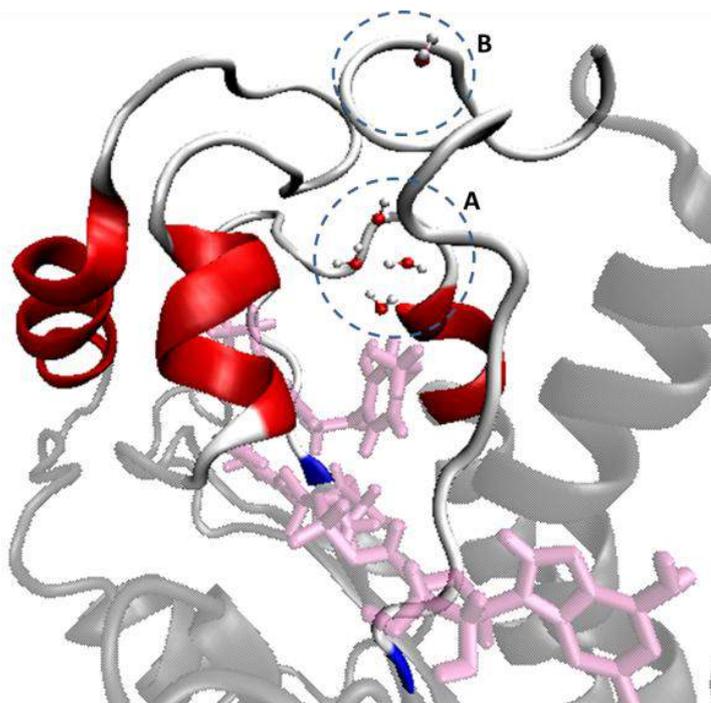


Figura 78. Representação do sítio de ligação mostrando as moléculas de água dentro (A) e fora (B) da cavidade.

A presença dessas moléculas de água dentro da cavidade de ligação não influencia na mobilidade dos resíduos LP-5 (Phe149-Ala157) e UAH-5 (Tyr158-Lys165) quando comparado com a holoenzima (2AQ8), enquanto que a interação com a água fora da cavidade aumenta a mobilidade do resíduo Ile105. No caso do resíduo Gly104, a mobilidade do carbono- α é comparável a holoenzima devido a interação por ligação hidrogênio com a interseção LP-6/AH-7 (**Figura 79**).

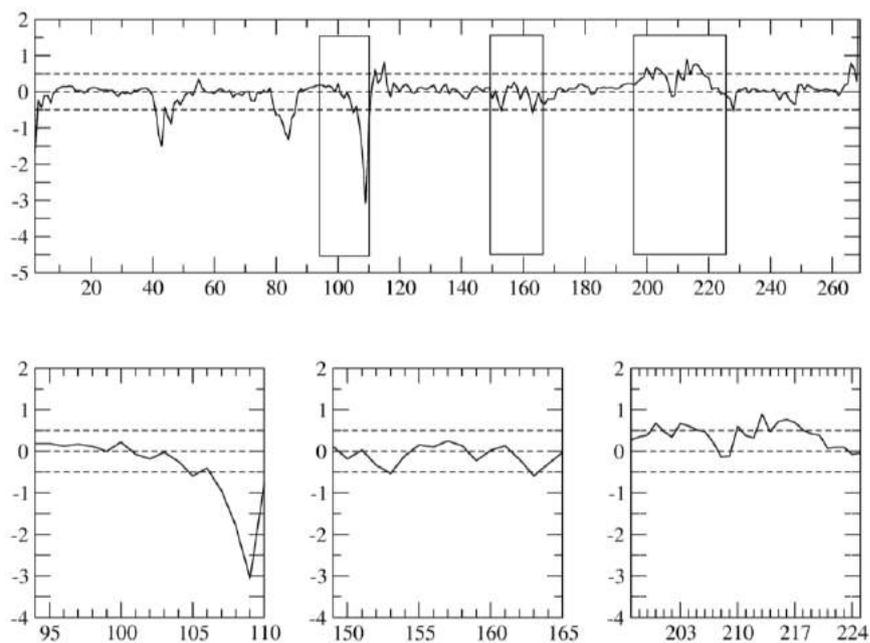


Figura 79. Gráfico da diferença de variação do fator-B calculado para entre os complexos 2AQ8 e holoenzima ligada à ZINC51. Os retângulos mostram as regiões que compõem o sítio de ligação.

Ao avaliarmos a movimentação do resíduo Phe149, tanto na holoenzima quanto no complexo holoenzima-ZINC51 (**Figura 80**), observamos que o diedro ϕ apresenta o mesmo deslocamento em ambos os sistemas, indicando a manutenção da posição do carbono- α dentro do sítio ativo, enquanto que o diedro ψ indica a mobilidade do domínio LP-5. A variação do diedro χ_2 , onde o anel aromático adquire uma orientação perpendicular ao carbono- α , ocorre para evitar possíveis colisões estéricas com a cadeia principal da proteína, como relatado anteriormente.

No caso dos ângulos de torção da Tyr158, o diedro ϕ diminui sua mobilidade, enquanto o diedro χ_1 assume uma conformação mais eclipsada ($\sim 120^\circ$), possivelmente, as mudanças desses diedros estão relacionadas à interação por ligação hidrogênio reforçada por carga com a cadeia secundária de Lys165 (Lys165NZ...Tyr158OH, 93,6%). As variações conformacionais do resíduo Tyr158, principalmente dos diedros ϕ e χ_1 , favorecem a saída desse resíduo de dentro do sítio de ligação.

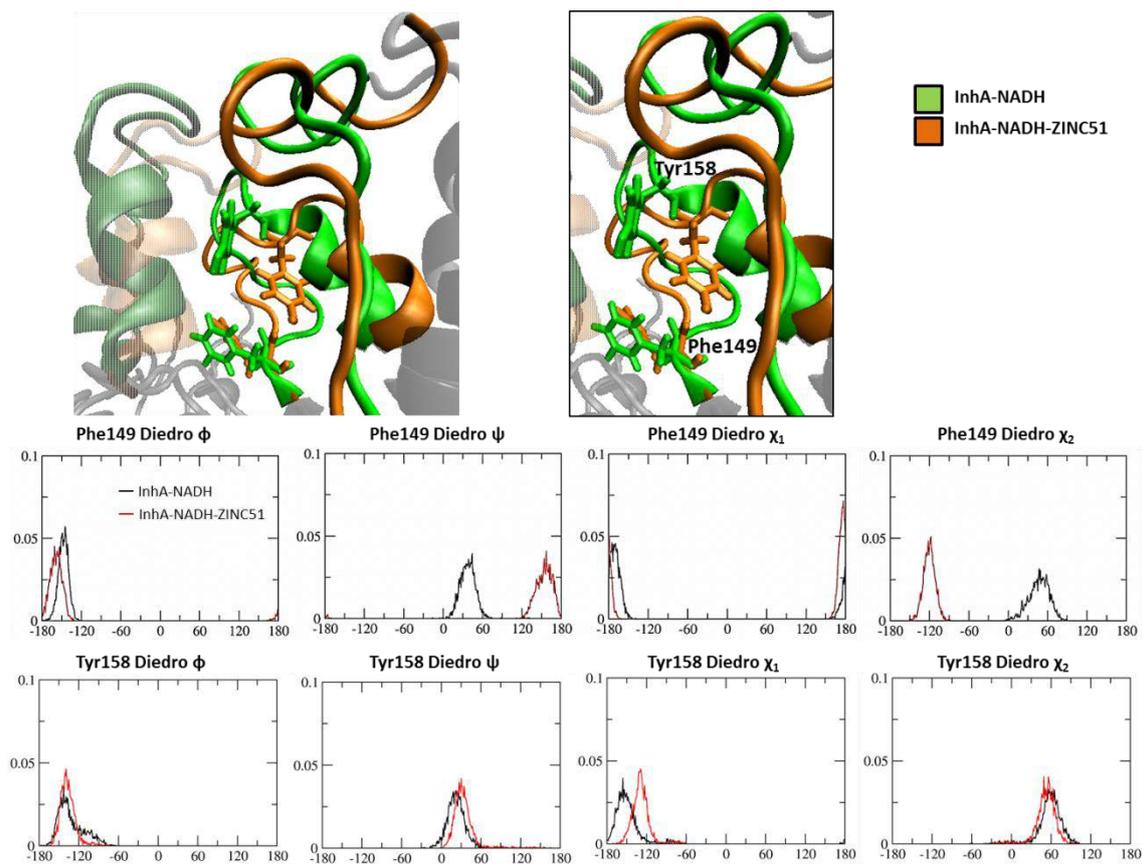


Figura 80. Representação gráfica da mobilidade dos resíduos Phe149 e Tyr158 referente aos diedros ϕ , ψ , χ_1 e χ_2 para holoenzima (verde) e holoenzima-ZINC51 (laranja).

4.6.5. ANÁLISE DAS INTERAÇÕES POR LIGAÇÃO HIDROGÊNIO E CONTATOS HIDROFÓBICOS DOS COMPLEXOS HOLOENZIMA-ZINC19 E HOLOENZIMA-ZINC51

A **Tabela 14** reúne as principais interações por ligação hidrogênio e os contatos hidrofóbicos para os compostos ZINC19 e ZINC51. O complexo holoenzima-ZINC19 (**Figura 81**, conformação aberta), apresenta interações por ligação hidrogênio preferencialmente com o cofator com um alto tempo de persistência (99,2%), enquanto o contato hidrofóbico ocorre com Tyr158 com baixo tempo de persistência (37,7%).

Tabela 14. Interações por ligação hidrogênio e contatos hidrofóbicos entre a holoenzima e os compostos ZINC19 e ZINC51.

ZINC ^a	Ligação hidrogênio ^b			Contato Hidrofóbico ^c		
	Doador	Aceptor	Tempo (%) ^d	Resíduo	Distância	Tempo (%) ^d
19	O2	NADH O70	99,2	Tyr158	3,70(±0,21)	37,7
	O4	HOH	97,4	Tyr158	3,73(±0,16)	77,5
51	HOH	Gln100OE1	96,6	Ala198	3,88(±0,10)	11,2
	Met98N	O5	46,9	Ile202	3,20(±0,22)	100
	Tyr158OH	O1	37			

^a Código do inibidor. ^b Ligação hidrogênio (D-H...A) foi mensurada considerando a distância (D...A) até 3,5Å e ângulo (H-D-A) até 30°. ^c Valor de corte considerado entre átomos diferentes de hidrogênio e o resíduo foi até 4,0 Å. ^d Tempo de persistência (%) considerando somente os últimos 5ns de simulação de DM.

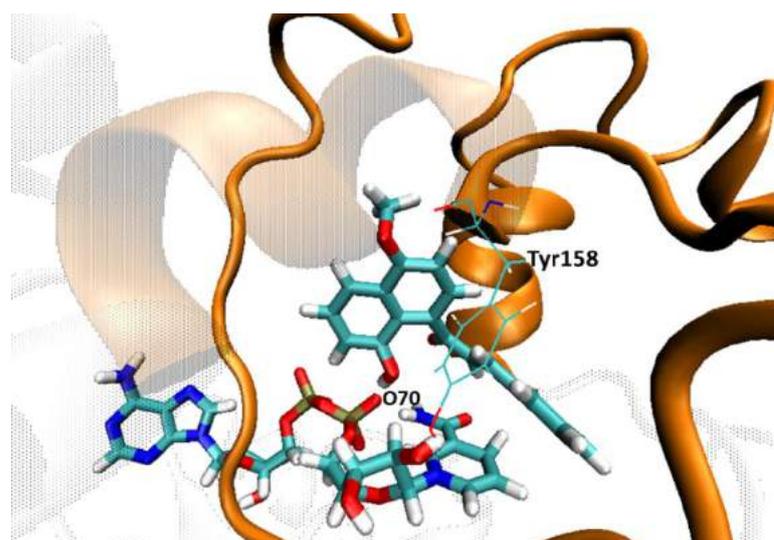


Figura 81. Representação 3D das principais interações no complexo holoenzima-ZINC19.

Comparando esse perfil de interações com os complexos em que as enzimas apresentaram conformação aberta, e.g., holoenzima-ATV27 e holoenzima-ATV26, a preferência por interagir com o cofator e o baixo número de contatos hidrofóbicos indicam que o composto ZINC19 teria baixa afinidade pela InhA.

No complexo holoenzima-ZINC51 (**Figura 82**, conformação fechada), observamos um maior número de interações por ligação hidrogênio com a proteína, destacando a interação com a cadeia principal de Met98 (N...O5, 46,9%), pois ela mimetiza a interação observada para ATV05 (OH...Gly96O, 26,6%), que é o composto mais ativo da classe dos EDAs. Além disso, as interações hidrofóbicas ocorrem com os domínios UAH-5 (Tyr158, 77,5%) e AH-6 (Ala198, 11,2% e Ile202, 100%), destacando que a interação com AH-6 também ocorre no complexo holoenzima-ATV05, sendo com maior intensidade na presença de ZINC51.

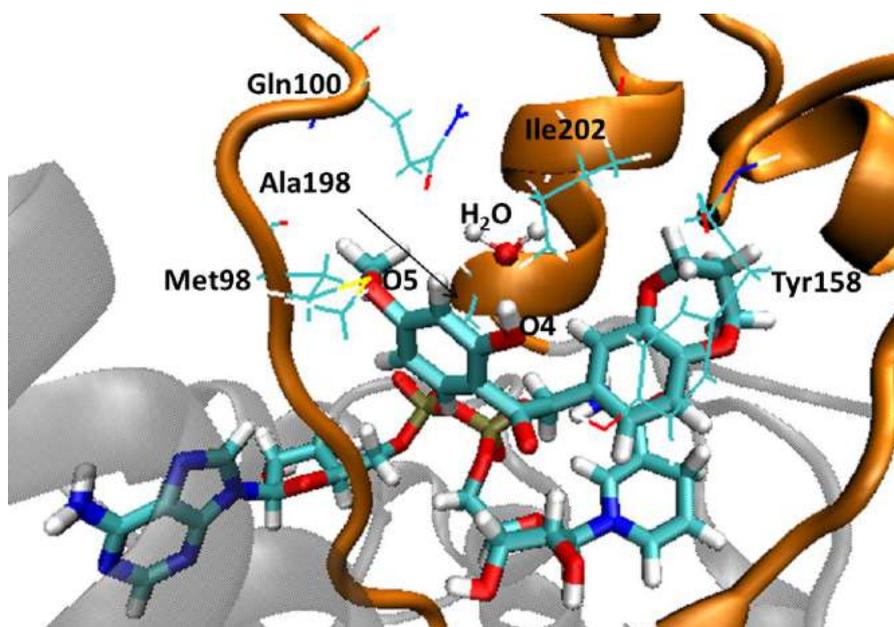


Figura 82. Representação 3D das principais interações no complexo holoenzima-ZINC51.

Portanto, a partir das comparações realizadas com o complexo holoenzima-ATV05 e também observando outros complexos com a conformação fechada, e.g., holoenzima-ATV06, podemos pressupor que ZINC51 apresentaria boa afinidade pela enzima InhA.

4.6.6. PREDIÇÃO DA POTÊNCIA BIOLÓGICA DOS COMPOSTOS ZINC19 E ZINC51

Cada um dos compostos foi avaliado utilizando a melhor equação obtida pelo estudo de QSAR3D (Eq. A05) e suas potências biológicas foram preditas (**Tabela 15**). Na **Figura 83** estão descritas a contribuição de cada resíduo, bem como sua média ponderada.

Tabela 15. Valores de pK_i (M) preditos para os compostos ZINC19 e ZINC51 de acordo com a Eq.A05.

ZINC	$pK_{i\text{pred}}$
19	7,43
51	8,00

Como esperado, o composto ZINC19 apresentou um menor valor de potência predita do que ZINC51. Esse fato se deve, primeiramente, a conformação aberta observada durante o estudo de DM, resultando numa baixa interação com os resíduos pertencentes aos domínios AH-6 (Leu197 e Val203) e UAH-5, principalmente, o resíduo Lys165. No caso do ZINC51, devido à conformação fechada do sítio ativo, ele apresenta uma maior energia de interação com os domínios AH-6 e UAH-5. Apesar da energia de interação por Coulomb com o resíduo Val203 ser desfavorável, ela é compensada pelo aumento da energia de interação com Leu197, bem como a manutenção da interação com Ile202. Além disso, durante o estudo das interações dos compostos que apresentam conformação fechada, duas ou mais interações com resíduos do domínio AH-6 favorecem a manutenção da estrutura secundária, enquanto que interações fortes com um resíduo desse domínio favorecem o aumento da mobilidade desta região, resultando na abertura do sítio ativo com a perda da estrutura secundária.

$$pK_i = 6,104 + 0,509\text{Thr162LJ} - 0,046\text{Lys165} + 0,346\text{Leu197LJ} - 0,095\text{Ile202} + 0,958\text{Val203C} - 0,128\text{Ile215LJ}$$

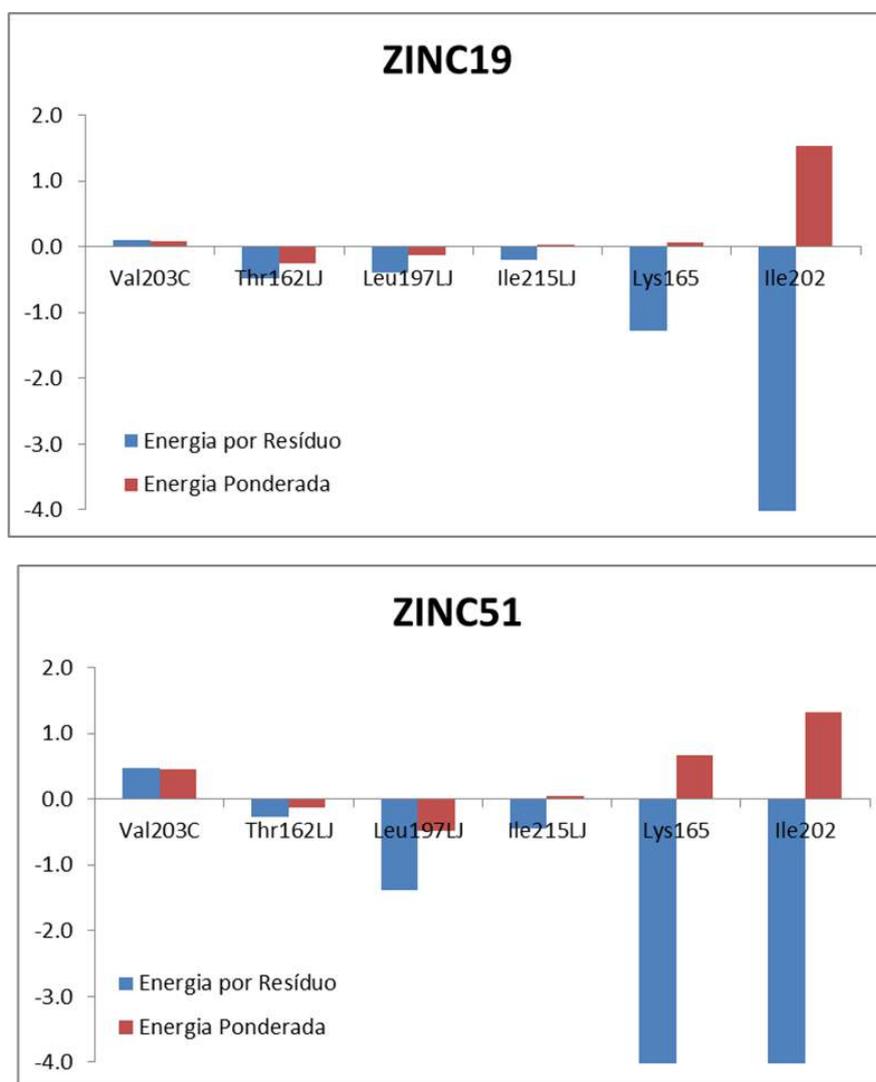


Figura 83. Energias de interação dos resíduos seleccionados da Eq. A05 para os compostos ZINC19 e ZINC51 e as energias de interações ponderadas. O gráfico foi truncado em -4,0KJ/mol. O valor de energia para ZINC19 referente ao termo Ile202 é de -16,22 KJ/mol e para ZINC51 referentes aos termos Lys165 e Ile202 é de -14,49 e -13,97 KJ/mol, respectivamente.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho, realizamos a docagem molecular de diversos compostos da classe EDA, sendo possível observar que alguns complexos apresentaram diferenças estruturais referentes aos ligantes e a própria enzima, apesar da resolução do cristal ser menor do que 2,5Å. Durante o estudo de docagem observamos do estado de oxidação do cofator, uma vez que durante o ensaio biológico utiliza-se o cofator na forma reduzida (NADH), enquanto na obtenção do cristal, a enzima é saturada com o cofator na forma oxidada (NAD⁺). Como o objetivo do trabalho é avaliar as possíveis interações que acontecem durante o ensaio biológico, optou-se por utilizar o cofator na forma reduzida.

Além disso, foi possível identificar que para alguns complexos, a conformação do sítio ativo encontrava-se fechada ou aberta, indicando a flexibilidade que a proteína pode apresentar mesmo para substâncias similares. Portanto, identificou-se as possíveis poses comparando as melhores soluções, utilizando o MVD, classificadas por duas funções de pontuação diferentes: MolDock e o Rerank.

Ao aplicar esse método, somente o ATV19 apresentou soluções bem pontuadas pelas funções de pontuação MolDock e o Rerank com conformação e orientação diferente dentro do sítio ativo. Ademais, ao avaliarmos as interações por ligação hidrogênio e os contatos hidrofóbicos, não foi possível determinar interações que pudessem diferenciar a potência biológica dessa classe de compostos.

A partir das poses selecionadas durante o estudo de docagem molecular foi possível analisar as principais movimentações das estruturas secundárias que formam o sítio de ligação, bem como a influência da solvente, em função do tempo.

Em geral, observou-se que a atividade biológica da série EDA é influenciada pelos seguintes fatores: (1) manutenção da estrutura secundária de AH-6 e a desnaturação da porção inicial de AH-7 (Glu209-Gln214), (2) abertura/fechamento AH-6/LLP-4 (portão) e LP-6/MLP-4 (tampa), (3) movimentação dos resíduos Phe149 e Tyr158 e (4) presença de água no interior da cavidade.

A desnaturação da estrutura secundária de AH-6 aumenta a exposição da cavidade ao solvente, mas não foi observado relação da perda da estrutura secundária com a abertura do portão AH-6/LLP-4. Entretanto, a desnaturação da porção inicial de AH-7 (Glu209-Gln214), aumenta a mobilidade do domínio LP-6, facilitando o afastamento dos domínios LP-6 e MLP-4. Portanto, os compostos mais ativos tendem a manter o sítio de ligação na sua conformação

fechada, com a diminuição da atividade biológica dos compostos, observamos conformações intermediárias para o sítio de ligação, principalmente com o aumento de mobilidade dos domínios LP-6 e a porção inicial de AH-7. Além disso, a presença de grupos doadores de elétrons por efeito indutivo ou de ressonância ligados ao anel B parece influenciar na manutenção da conformação fechada do sítio de ligação.

Com relação a movimentação dos resíduos Phe149 e Tyr158, observa-se que a movimentação de Phe149 ocorre para facilitar a interação com grupos hidrofóbicos ligados ao anel B dos derivados EDA, enquanto que a movimentação de saída do resíduo Tyr158 visa aumentar o espaço do sítio de ligação para acomodar melhor o ligante.

Finalmente, a interação dos domínios com o solvente pode estar associado ao aumento da mobilidade dos resíduos, mas também podem auxiliar na estabilização da proteína, principalmente quando moléculas de água medeiam interações hidrogênio com mais de três resíduos.

Neste trabalho, foram construídos e avaliados modelos de QSAR-3D dependente do receptor (DR) de uma série de 39 inibidores éteres diarila da enoil-ACP redutase do *M. tuberculosis* (InhA). A seleção do conjunto treinamento e de teste foi realizado utilizando o método supervisionado de Kennard-Jones, resultando em um banco de dados onde o conjunto teste foi bem distribuído comparando com a variação de atividade biológica do conjunto treinamento. A seguir, cinco banco de dados foram submetidos a uma abordagem que combina mínimos quadrados parciais e algoritmos genéticos, disponíveis no programa Wolf, para obter equações de QSAR 3D DR. As variáveis nesse estudo são as energias de interação estéricas (Lennard-Jones) e eletrostáticas (Coulomb), calculadas entre cada ligante, cofator e os resíduos da InhA que compõem sítio de ligação.

O melhor modelo foi a Eq. A05 ($R^2 = 0,57$, $SSE = 0,32$, $RMSEE = 0,31$, $\rho = 0,66$), no qual a energia de interação estérica e também a soma das contribuições estéricas e eletrostáticas são mais importantes que a contribuição da energia eletrostática para a relação estrutura-atividade, indicando que resíduos hidrofóbicos do sítio ativo da InhA sejam mais relevantes que as polares na interação com esta série de inibidores. Analisando os termos da Eq. A05, observamos que a interação com o domínio AH-6 (Leu197LJ, Ile202 e Val203C) é importante para a atividade desses inibidores. Adicionalmente, o modelo Eq. A05 auxiliou na identificação da pose que estaria relacionada com a atividade biológica de ATV19, mostrando que esse composto segue a tendência dos outros compostos, onde o anel B está próximo do cofator.

Para a identificação de novos inibidores que possam atuar frente à InhA, utilizamos os compostos mais ativos (ATV05 e ATV06) para a construção de um mapa farmacofórico que possa interagir com os resíduos identificados durante o estudo de QSAR-3D. Após a identificação de 100 novos candidatos a inibidores, aplicou-se o método de docagem molecular para identificação das poses, sendo selecionado 4 compostos que apresentaram modo de ligação semelhante aos compostos ATV05 e ATV06. Dentro desse total, dois compostos foram selecionados pertencentes as classes chalconas (ZINC19) e 1,5-benzodioxepina (ZINC51), realizando a seguir os estudos de DM.

Para o composto ZINC19, observamos a manutenção da estrutura secundária de AH-6, no entanto, a conformação do sítio ativo encontra-se aberta, com afastamento dos domínios AH-6/LLP-4 e LP-6/MLP-4. No caso do composto ZINC51, também observamos a manutenção da estrutura secundária de AH-6, sendo que a conformação do sítio ativo encontra-se fechada.

Ambos os compostos apresentam a saída do resíduo Tyr158, permitindo a acomodação deles dentro do sítio ativo, além disso, observamos que para o composto ZINC51, existe moléculas de água mediando interações via ligação hidrogênio com a enzima. De fato, a predição da atividade biológica, utilizando o modelo A05, gerou bom resultado para ZINC51, indicando que ele seria um bom candidato para inibir a InhA.

6. PERSPECTIVAS

- Síntese dos compostos ZINC19 e ZINC51
- Testes da atividade enzimático e frente ao bacilo *M. tuberculosis*
- Testes de citotoxicidade
- Proposição de modificações estruturais melhorando as características farmacocinéticas e toxicológicas mantendo o arcabouço chalcona e 1,5- benzodioxepina;
- Simulações por DM com enzimas mutantes;

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHARYA, C. et al. Recent Advances in Ligand-Based Drug Design: Relevance and Utility of the Conformationally Sampled Pharmacophore Approach. **Current Computer Aided-Drug Design**, v. 7, n. 1, p. 10–22, 1 mar. 2011.
- AITMAMBETOV, A.; GRISHKO, L. G.; KHILYA, V. P. Synthetic and modified isoflavonoids IV. Synthesis of benzodioxepane analogues of pseudobaptigenin. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 29, n. 6, p. 726–730, nov. 1993.
- AITMAMBETOV, A.; TLEGENOV, R. T.; TOKHTYBAEVA, A. M. A convenient method of isoflavonone synthesis. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 32, n. 4, p. 400–401, jul. 2006.
- ALBANNA, A. S. et al. Fixed-dose combination antituberculosis therapy: a systematic review and meta-analysis. **The European respiratory journal**, v. 42, n. 3, p. 721–32, set. 2013.
- ALEXANDER, D. L. J.; TROPSHA, A.; WINKLER, D. A. Beware of R(2): Simple, Unambiguous Assessment of the Prediction Accuracy of QSAR and QSPR Models. **Journal of chemical information and modeling**, v. 55, n. 7, p. 1316–22, 27 jul. 2015.
- AM ENDE, C. W. et al. Synthesis and in vitro antimycobacterial activity of B-ring modified diaryl ether InhA inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 3029–3033, 2008.
- ANG, M. L. T.; MURIMA, P.; PETHE, K. Next-generation antimicrobials: from chemical biology to first-in-class drugs. **Archives of pharmacal research**, v. 38, n. 9, p. 1702–17, set. 2015.
- ARAÚJO, J. Q. et al. Docking of the alkaloid geissospermine into acetylcholinesterase: A natural scaffold targeting the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Molecular Modeling**, v. 17, p. 1401–1412, 2011a.
- ARAÚJO, J. Q. et al. Receptor-dependent (RD) 3D-QSAR approach of a series of benzylpiperidine inhibitors of human acetylcholinesterase (HuAChE). **European journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 1, p. 39–51, jan. 2011b.
- ARBEX, M. A. et al. Drogas antituberculose: interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais - parte 1: fármacos de primeira linha. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, n. 5, p. 626–640, out. 2010a.
- ARBEX, M. A. et al. Drogas antituberculose: interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais - parte 2: fármacos de segunda linha. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 36, n. 5, p. 641–656, out. 2010b.

AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. Alkylating and Non-Alkylating Compounds Interacting with the DNA Minor Groove. In: **Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs**. 1. ed. Miamisburg: Elsevier, 2008. p. 177–198.

BERENDSEN, H. J. C.; VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEN, R. **GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation** *Computer Physics Communications*, 1995.

BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000.

BISPO, M. DE L. F. et al. Synthesis and Antitubercular Evaluation of N -Arylpyrazine and N,N' -Alkyl-diylpyrazine-2-carboxamide Derivatives. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 1317–1322, 10 nov. 2012.

BLOMBERG, B. et al. The rationale for recommending fixed-dose combination tablets for treatment of tuberculosis. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 79, n. 1, p. 61–8, jan. 2001.

BONNAC, L. et al. Synthesis of 4-phenoxybenzamide adenine dinucleotide as NAD analogue with inhibitory activity against enoyl-ACP reductase (InhA) of Mycobacterium tuberculosis. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 17, n. 16, p. 4588–91, 15 ago. 2007.

BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I. D. Molecular recognition and docking algorithms. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 32, p. 335–373, 2003.

BROOKS, B. R. et al. CHARMM: the biomolecular simulation program. **Journal of computational chemistry**, v. 30, n. 10, p. 1545–614, 2009.

BROUSSY, S. et al. The first chemical synthesis of the core structure of the benzoylhydrazine-NAD adduct, a competitive inhibitor of the Mycobacterium tuberculosis enoyl reductase. **The Journal of organic chemistry**, v. 70, n. 25, p. 10502–10, 9 dez. 2005.

BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. **Journal of Chemical Physics**, v. 126, 2007.

CANTALOUBE, S. et al. The Mycobacterium tuberculosis FAS-II dehydratases and methyltransferases define the specificity of the mycolic acid elongation complexes. **PloS one**, v. 6, n. 12, p. e29564, jan. 2011.

CASE, D. A. et al. The Amber biomolecular simulation programs. **Journal of computational chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1668–88, 2005.

CDC/JANICE HANEY CARR. **microbiologyinpictures.com** [microbiologyinpictures.com](http://www.microbiologyinpictures.com), [s.d.]. Disponível em: <http://www.microbiologyinpictures.com/bacteria_photos/mycobacterium_tuberculosis_photos/MYTU20.html>

CER, R. Z. et al. IC50-to-Ki: A web-based tool for converting IC50 to Ki values for inhibitors of enzyme activity and ligand binding. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. SUPPL. 2, 2009.

CHAKRABORTY, S.; RHEE, K. Y. Tuberculosis Drug Development: History and Evolution of the Mechanism-Based Paradigm: Figure 1. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 8, p. a021147, ago. 2015.

CHENG, T. et al. Comparative assessment of scoring functions on a diverse test set. **Journal of chemical information and modeling**, v. 49, n. 4, p. 1079–1093, abr. 2009.

CHIARADIA, L. D. et al. Synthetic chalcones as efficient inhibitors of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpA. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 18, n. 23, p. 6227–30, 1 dez. 2008.

CHIARADIA, L. D. et al. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of chalcone derivatives as potent inhibitors of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatases (PtpA and PtpB). **Journal of medicinal chemistry**, v. 55, n. 1, p. 390–402, 12 jan. 2012.

CLCBIO. **Molegro Virtual Docker User Manual**. [s.l: s.n.].

CRAMER, R. D.; PATTERSON, D. E.; BUNCE, J. D. Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 110, n. 18, p. 5959–5967, ago. 1988.

DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An N log(N) method for Ewald sums in large systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, p. 10089, 1993.

DAURA, X. et al. Peptide Folding: When Simulation Meets Experiment. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, p. 236–240, 1999.

DAVIS, M. C.; FRANZBLAU, S. G.; MARTIN, A. R. Syntheses and evaluation of benzodiazaborine compounds against M. tuberculosis H37Rv in vitro. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 8, n. 7, p. 843–846, abr. 1998.

DE SOUZA, M. V. N. et al. Synthesis and biological aspects of mycolic acids: an important target against Mycobacterium tuberculosis. **TheScientificWorldJournal**, v. 8, p. 720–751, jan. 2008a.

DE SOUZA, M. V. N. et al. Synthesis and Biological Evaluation of N-(Alkyl)-2-Thiophen-2-Ylacetamides Series As A New Class of Antitubercular Agents. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 5, n. 3, p. 221–224, 1 abr. 2008b.

DELAINE, T. et al. Development of isoniazid-NAD truncated adducts embedding a lipophilic fragment as potential bi-substrate InhA inhibitors and antimycobacterial agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 10, p. 4554–61, out. 2010.

DEWAR, M. J. S. et al. AM1: A New General Purpose Quantum Mechanical Molecular Model. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, n. 6, p. 3902–3909, 1985.

DIACON, A. H. et al. Bactericidal Activity of Pyrazinamide and Clofazimine Alone and in Combinations with Pretomanid and Bedaquiline. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 15 abr. 2015.

DREVERMANN, B. et al. Synthesis of Benzodioxepinone Analogues via a Novel Synthetic Route with Qualitative Olfactory Evaluation. **Helvetica Chimica Acta**, v. 90, n. 5, p. 1006–1027, maio 2007.

DUNN, C. et al. The Contributions of Onchocerciasis Control and Elimination Programs toward the Achievement of the Millennium Development Goals. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 5, p. e0003703, 21 maio 2015.

DURRANT, J. D.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations and drug discovery. **BMC Biology**, v. 9, p. 71, 2011.

DYE, C. et al. After 2015 : infectious diseases in a new era of health and development After 2015 : infectious diseases in a new era of health and development. n. May 2014, 2015.

ELSEVIER. **Scopus**. Disponível em: <www.scopus.com>. Acesso em: 1 dez. 2015.

ESPOSITO, E. X.; HOPFINGER, A. J.; MADURA, J. D. Methods for applying the quantitative structure-activity relationship paradigm. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 275, p. 131–214, jan. 2004.

ESSMANN, U. et al. A smooth particle mesh Ewald method. **J Chem Phys**, v. 103, p. 8577–8593, 1995.

FECHNER, W. **Robert_Koch1**, 1900. Disponível em: <<http://www.lindau-nobel.org/today-is-world-tuberculosis-day/>>

FEHER, M. **Consensus scoring for protein-ligand interactions** **Drug Discovery Today**, 2006.

FERREIRA, L. et al. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13384–13421, 22 jul. 2015.

FORRELLAD, M. A et al. Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex. **Virulence**, v. 4, n. 1, p. 3–66, 2013.

FRAGA, C.; BARREIRO, E. Medicinal Chemistry of N-Acylhydrazones: New Lead-Compounds of Analgesic, Antiinflammatory and Antithrombotic Drugs. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 167–198, 1 jan. 2006.

FREUNDLICH, J. S. et al. Triclosan derivatives: Towards potent inhibitors of drug-sensitive and drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. **ChemMedChem**, v. 4, p. 241–248, 2009.

FRIESNER, R. A. et al. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. **Journal of medicinal chemistry**, v. 47, n. 7, p. 1739–1749, mar. 2004.

GAO, Q.; YANG, L.; ZHU, Y. Pharmacophore based drug design approach as a practical process in drug discovery. **Current computer-aided drug design**, v. 6, n. 1, p. 37–49, mar. 2010.

GEMAL, A. et al. Can Brazil play a more important role in global tuberculosis drug production? An assessment of current capacity and challenges. **BMC public health**, v. 13, n. 1, p. 279, 27 jan. 2013.

GEPPERT, H.; VOGT, M.; BAJORATH, J. Current Trends in Ligand-Based Virtual Screening: Molecular Representations, Data Mining Methods, New Application Areas, and Performance Evaluation. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 2, p. 205–216, 22 fev. 2010.

GINSBERG, A. M. Tuberculosis drug development: progress, challenges, and the road ahead. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 90, n. 3, p. 162–7, maio 2010.

GOLBRAIKH, A.; TROPSHA, A. Beware of q2! **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 20, n. 4, p. 269–276, jan. 2002.

GOMES, D. E. B. et al. **HbMap2Grace**, 2009. Disponível em: <<http://lmdm.biof.ufrj.br/software/hbmap2grace/index.html>>

GOUDE, R. et al. The arabinosyltransferase EmbC is inhibited by ethambutol in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 10, p. 4138–46, 1 out. 2009.

GRINTER, S.; ZOU, X. Challenges, Applications, and Recent Advances of Protein-Ligand Docking in Structure-Based Drug Design. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 10150–10176, 11 jul. 2014.

HALGREN, T. A. et al. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 7, p. 1750–1759, 2004.

HALPERIN, I. et al. Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. **Proteins**, v. 47, n. 4, p. 409–443, jun. 2002.

HANS, R. H. et al. Synthesis, antimalarial and antitubercular activity of acetylenic chalcones. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 20, n. 3, p. 942–4, 1 fev. 2010.

HE, X. et al. Pyrrolidine carboxamides as a novel class of inhibitors of enoyl acyl carrier protein reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of medicinal chemistry**, v. 49, n. 21, p. 6308–23, 2006.

HE, X.; ALIAN, A.; ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. Inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl acyl carrier protein reductase InhA by arylamides. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 21, p. 6649–6658, 2007.

HEATH, R. J.; WHITE, S. W.; ROCK, C. O. **Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents** *Progress in Lipid Research*, nov. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11591436>>. Acesso em: 17 abr. 2015

HEATH, R. J.; WHITE, S. W.; ROCK, C. O. Inhibitors of fatty acid synthesis as antimicrobial chemotherapeutics. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 58, n. 6, p. 695–703, maio 2002.

HESS, B. et al. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, p. 1463–1472, 1997.

HUANG, S. Y.; ZOU, X. **Advances and challenges in Protein-ligand docking** *International Journal of Molecular Sciences*, jan. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2996748&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 dez. 2014

HÜGEL, H. M. et al. Marine Fragrance Chemistry. **Chemistry & Biodiversity**, v. 5, n. 6, p. 1034–1044, jun. 2008.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33–38, 1996.

JACKSON, M.; MCNEIL, M.; BRENNAN, P. Progress in targeting cell envelope biogenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. **Future microbiology**, v. 8, n. 7, p. 855–75, jul. 2013.

JAKALIAN, A.; JACK, D. B.; BAYLY, C. I. Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation. **Journal of Computational Chemistry**, v. 23, p. 1623–1641, 2002.

JONES, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of molecular biology**, v. 267, n. 3, p. 727–748, 1997.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. **Journal of Molecular Biology**, v. 245, n. 1, p. 43–53, 1995.

KAMINSKI, G. A. et al. Evaluation and reparametrization of the OPLS-AA force field for proteins via comparison with accurate quantum chemical calculations on peptides. **Journal of**

Physical Chemistry B, v. 105, p. 6474–6487, 2001.

KAMSRI, P. et al. Elucidating the structural basis of diphenyl ether derivatives as highly potent enoyl-ACP reductase inhibitors through molecular dynamics simulations and 3D-QSAR study. **Journal of Molecular Modeling**, v. 20, 2014a.

KAMSRI, P. et al. Rational design of InhA inhibitors in the class of diphenyl ether derivatives as potential anti-tubercular agents using molecular dynamics simulations. **SAR and QSAR in environmental research**, v. 25, n. 6, p. 473–88, jan. 2014b.

KARPLUS, M.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. **Nature structural biology**, v. 9, n. 9, p. 646–52, set. 2002.

KARTHIKEYAN, M.; VYAS, R. Role of Open Source Tools and Resources in Virtual Screening for Drug Discovery. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 18, n. 6, p. 528–43, 2015.

KOES, D. R.; CAMACHO, C. J. ZINCPharmer: Pharmacophore search of the ZINC database. **Nucleic Acids Research**, v. 40, 2012.

KONTOYIANNI, M.; MCCLELLAN, L. M.; SOKOL, G. S. Evaluation of Docking Performance: Comparative Data on Docking Algorithms. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 558–565, 2004.

KORADI, R.; BILLETER, M.; WÜTHRICH, K. MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 51–55, 1996.

KRÁTKÝ, M.; VINŠOVÁ, J.; STOLAŘÍKOVÁ, J. Antimycobacterial assessment of Salicylanilide benzoates including multidrug-resistant tuberculosis strains. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 17, n. 11, p. 12812–20, 31 jan. 2012.

KUMAR, V.; SOBHIA, M. E. Characterisation of the flexibility of substrate binding loop in the binding of direct InhA inhibitors. **International journal of computational biology and drug design**, v. 6, n. 4, p. 318–42, jan. 2013.

KUMAR, V.; SOBHIA, M. E. Insights into the bonding pattern for characterizing the open and closed state of the substrate-binding loop in Mycobacterium tuberculosis InhA. **Future medicinal chemistry**, v. 6, n. 6, p. 605–16, abr. 2014.

KUO, M. R. et al. Targeting tuberculosis and malaria through inhibition of enoyl reductase: Compound activity and structural data. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 23, p. 20851–20859, 2003.

LEACH, A. R. **Molecular Modelling: Principles and Applications**. 5th. ed. New York: Longman, 2011.

LEAL, F. D. et al. Hologram QSAR models of a series of 6-arylquinazolin-4-amine inhibitors of a new Alzheimer's disease target: dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase-1A enzyme. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 3, p. 5235–53, 6 jan. 2015.

LEE, I.-Y. et al. Structure-activity relationships of antitubercular salicylanilides consistent with disruption of the proton gradient via proton shuttling. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 21, n. 1, p. 114–26, 1 jan. 2013.

LI, H. et al. Dibenz[b,f]oxepin and Antimycobacterial Chalcone Constituents of *Empetrum nigrum*. **Journal of natural products**, 16 out. 2015.

LI, H. J. et al. A structural and energetic model for the slow-onset inhibition of the mycobacterium tuberculosis ENoyl-ACP reductase InhA. **ACS Chemical Biology**, v. 9, n. 4, p. 986–993, 18 abr. 2014.

LI, X. et al. Molecular docking, molecular dynamics simulation, and structure-based 3D-QSAR studies on estrogenic activity of hydroxylated polychlorinated biphenyls. **The Science of the total environment**, v. 441, p. 230–8, 15 dez. 2012.

LIMA, C. H. DA S. **Planejamento, Síntese E Avaliação Farmacológica De Novos Candidatos A Agentes Tuberculostáticos Contendo O Núcleo Pirazínico**. Rio de Janeiro: Dissertação de Mestrado, 2011.

LIMA, C. H. DA S.; BISPO, M. D. L. F.; SOUZA, M. V. N. DE. Pyrazinamide: An Essential Drug in the Tuberculosis Treatment. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 3, 2011.

LIN, Y. Chalcones and flavonoids as anti-Tuberculosis agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 8, p. 2795–2802, ago. 2002.

LIU, B. et al. Discovery and SAR of a series of 4,6-diamino-1,3,5-triazin-2-ol as novel non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors of HIV-1. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 20, n. 22, p. 6592–6, 15 nov. 2010.

LIU, J. et al. Combined 3D-QSAR, molecular docking and molecular dynamics study on derivatives of peptide epoxyketone and tyropeptin-boronic acid as inhibitors against the $\beta 5$ subunit of human 20S proteasome. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 3, p. 1807–35, jan. 2011.

LU, X. Y.; YOU, Q. D.; CHEN, Y. D. Recent progress in the identification and development of InhA direct inhibitors of Mycobacterium tuberculosis. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 10, p. 181–192, 2010.

LUCKNER, S. R. et al. A slow, tight binding inhibitor of InhA, the enoyl-acyl carrier protein reductase from Mycobacterium tuberculosis. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, p. 14330–14337, 2010.

LUO, Y. et al. Synthesis, biological evaluation, 3D-QSAR studies of novel aryl-2H-pyrazole derivatives as telomerase inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 23, n. 4, p. 1091–5, 15 fev. 2013.

MA, H. et al. Induction of base excision repair enzymes NTH1 and APE1 in rat spleen following aniline exposure. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 267, n. 3, p. 276–283, 15 mar. 2013.

MACALINO, S. J. Y. et al. Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. **Archives of Pharmacal Research**, v. 38, n. 9, p. 1686–1701, 25 set. 2015.

MAHAPATRA, D. K.; BHARTI, S. K.; ASATI, V. Chalcone scaffolds as anti-infective agents: structural and molecular target perspectives. **European journal of medicinal chemistry**, v. 101, p. 496–524, 28 ago. 2015.

MANJUNATHA, U. H. et al. Direct inhibitors of InhA are active against Mycobacterium tuberculosis. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 269, p. 269ra3–269ra3, 7 jan. 2015.

MEHBOOB, S. et al. Structure of the Francisella tularensis enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI) in complex with NAD + and triclosan. **Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 66, n. 11, p. 1436–1440, 1 nov. 2010.

MENG, M. et al. Simultaneous quantitation of delamanid (OPC-67683) and its eight metabolites in human plasma using UHPLC-MS/MS. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 1002, p. 78–91, 1 out. 2015.

MENG, X.-Y. et al. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. **Current Computer Aided-Drug Design**, v. 7, n. 2, p. 146–157, 1 jun. 2011.

MILÁN-SEGOVIA, R. C. et al. Relative bioavailability of rifampicin in a three-drug fixed-dose combination formulation. **The international journal of tuberculosis and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease**, v. 14, n. 11, p. 1454–60, nov. 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Rede Brasileira de Avaliação de Tecnologias em Saúde**. Disponível em: <<http://rebrats.saude.gov.br/membros-cat/82-centro-de-desenvolvimento-tecnologico-em-saude-cdts-fiocruz>>. Acesso em: 28 nov. 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Tratamento diretamente observado (TDO) da tuberculose na atenção básica: protocolo de enfermagem**. 1^a edição ed. Brasília-DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Detectar, tratar e curar: desafios e estratégias brasileiras frentes à tuberculose**. [s.l.: s.n.]. v. 46

Molinspiration. Disponível em: <www.molinspiration.com>. Acesso em: 20 dez. 2014.

MORRIS, G. M. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1639–1662, nov. 1998.

MYINT, K. Z.; XIE, X.-Q. Recent advances in fragment-based QSAR and multi-dimensional QSAR methods. **International journal of molecular sciences**, v. 11, n. 10, p. 3846–66, jan. 2010.

NAMBA, A. M.; SILVA, V. B. DA; SILVA, C. H. T. P. DA. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química**, v. 33, n. 4, p. 13–23, dez. 2008.

NERES, J. et al. 2-carboxyquinoxalines kill mycobacterium tuberculosis through noncovalent inhibition of DprE1. **ACS chemical biology**, v. 10, n. 3, p. 705–14, 20 mar. 2015.

NTIE-KANG, F. et al. Binding of pyrazole-based inhibitors to Mycobacterium tuberculosis pantothenate synthetase: docking and MM-GB(PB)SA analysis. **Molecular bioSystems**, v. 10, n. 2, p. 223–39, mar. 2014.

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**, v. 359, n. 3, p. 646–66, 9 jun. 2006.

ORTIZ, A. R. et al. Prediction of drug binding affinities by comparative binding energy analysis. **Journal of medicinal chemistry**, v. 38, n. 14, p. 2681–2691, 1995.

OSIRIS Property Explorer. Disponível em: <<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>>. Acesso em: 20 dez. 2014.

PAN, P. et al. Time-dependent diaryl ether inhibitors of InhA: Structure-activity relationship studies of enzyme inhibition, antibacterial activity, and in vivo efficacy. **ChemMedChem**, v. 9, p. 776–791, 2014.

PAN, P.; TONGE, P. J. Targeting InhA, the FASII Enoyl-ACP Reductase: SAR Studies on Novel Inhibitor Scaffolds. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 672–693, 1 mar. 2012.

PARASKEVOPOULOS, G. et al. Novel derivatives of nitro-substituted salicylic acids: Synthesis, antimicrobial activity and cytotoxicity. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 23, n. 22, p. 7292–301, 15 nov. 2015.

PARIKH, S. L.; XIAO, G.; TONGE, P. J. Inhibition of InhA, the enoyl reductase from Mycobacterium tuberculosis, by triclosan and isoniazid. **Biochemistry**, v. 39, p. 7645–7650, 2000.

PARK, C. K.; KWON, Y. S. Respiratory review of 2014: tuberculosis and nontuberculous mycobacterial pulmonary disease. **Tuberculosis and respiratory diseases**, v. 77, n. 4, p. 161–6, 1 out. 2014.

PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. **J. Appl. Phys.**, v. 52, p. 7182–7190, 1981.

PASQUALOTO, K. F. M. et al. Rational design of new antituberculosis agents: Receptor-independent four-dimensional quantitative structure-activity relationship analysis of a set of isoniazid derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 15, p. 3755–3764, 15 jul. 2004.

PERKINS, R. et al. QUANTITATIVE STRUCTURE–ACTIVITY RELATIONSHIP METHODS: PERSPECTIVES ON DRUG DISCOVERY AND TOXICOLOGY. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, n. 8, p. 1666, 2003a.

PERKINS, R. et al. Quantitative structure-activity relationship methods: perspectives on drug discovery and toxicology. **Environmental toxicology and chemistry / SETAC**, v. 22, n. 8, p. 1666–79, ago. 2003b.

PRONK, S. et al. GROMACS 4.5: A high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. **Bioinformatics**, v. 29, p. 845–854, 2013.

PUNKVANG, A. et al. Investigating the structural basis of arylamides to improve potency against M. tuberculosis strain through molecular dynamics simulations. **European journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 12, p. 5585–93, dez. 2010.

RIBEIRO, A. A. S. T.; HORTA, B. A. C.; DE ALENCASTRO, R. B. MKTOP: A program for automatic construction of molecular topologies. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, p. 1433–1435, 2008.

RICHMOND, N. J. et al. GALAHAD: 1. pharmacophore identification by hypermolecular alignment of ligands in 3D. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 20, n. 9, p. 567–87, set. 2006.

ROCHA, G. B. et al. RM1: A reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I. **Journal of Computational Chemistry**, v. 27, n. 10, p. 1101–1111, 2006.

ROY, K.; KAR, S. The rm2 metrics and regression through origin approach: Reliable and useful validation tools for predictive QSAR models (Commentary on “Is regression through origin useful in external validation of QSAR models?”). **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 62, p. 111–114, out. 2014.

ROY, K.; KAR, S.; AMBURE, P. On a simple approach for determining applicability domain of QSAR models. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 145, p. 22–29, jul. 2015.

ROZWARSKI, D. A et al. Crystal structure of the Mycobacterium tuberculosis enoyl-ACP reductase, InhA, in complex with NAD⁺ and a C16 fatty acyl substrate. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 22, p. 15582–15589, 1999.

RUEDA, D. et al. Nicotinamidase/pyrazinamidase of Mycobacterium tuberculosis forms homo-dimers stabilized by disulfide bonds. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 94, n. 6, p. 644–8, dez. 2014.

RUSTOMJEE, R.; ZUMLA, A. Delamanid expanded access novel treatment of drug resistant tuberculosis. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 8, p. 359, 29 out. 2015.

SCHAMES, J. R. et al. Discovery of a Novel Binding Trench in HIV Integrase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 1879–1881, 2004.

SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D. et al. PharmaGist: a webserver for ligand-based pharmacophore detection. **Nucleic acids research**, v. 36, 2008.

SHIMOKAWA, Y. et al. Metabolic Mechanism of Delamanid, a New Anti-Tuberculosis Drug, in Human Plasma. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, v. 43, n. 8, p. 1277–83, 29 ago. 2015.

SHIRUDE, P. S. et al. Methyl-thiazoles: a novel mode of inhibition with the potential to develop novel inhibitors targeting InhA in Mycobacterium tuberculosis. **Journal of medicinal chemistry**, v. 56, n. 21, p. 8533–42, 14 nov. 2013.

SINGH, P.; ANAND, A.; KUMAR, V. Recent developments in biological activities of chalcones: a mini review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 85, p. 758–77, 6 out. 2014.

SIVAKUMAR, P. M. et al. Synthesis, antimycobacterial activity evaluation, and QSAR studies of chalcone derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 17, n. 6, p. 1695–700, 15 mar. 2007.

SLAMA, N. et al. Negative regulation by Ser/Thr phosphorylation of HadAB and HadBC dehydratases from Mycobacterium tuberculosis type II fatty acid synthase system. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 412, n. 3, p. 401–6, 2 set. 2011.

SLIWOSKI, G. et al. Computational methods in drug discovery. **Pharmacological reviews**, v. 66, n. 1, p. 334–95, jan. 2014.

SNAREY, M. et al. Comparison of algorithms for dissimilarity-based compound selection. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 15, n. 6, p. 372–385, dez. 1997.

SOLOMON, K. A.; SUNDARARAJAN, S.; ABIRAMI, V. QSAR studies on N-aryl derivative activity towards Alzheimer's disease. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 14, n. 4, p. 1448–55, jan. 2009.

SONDA, S. et al. 1,5-Benzodioxepin derivatives as a novel class of muscarinic M3 receptor antagonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 4, p. 925–931, fev. 2007.

STAMBULCHIK, E. **Grace** Cambridge, USA, 1996. Disponível em: <<http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>>

STEWART, M. J. et al. Structural basis and mechanism of enoyl reductase inhibition by triclosan. **Journal of Molecular Biology**, v. 290, n. 4, p. 859–865, abr. 1999.

STORN, R.; PRICE, K. Differential Evolution – A Simple and Efficient Heuristic for Global Optimization over Continuous Spaces. **Journal of Global Optimization**, v. 11, n. 4, p. 341–359, dez. 1997.

SULLIVAN, T. J. et al. High affinity InhA inhibitors with activity against drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **ACS chemical biology**, v. 1, n. 1, p. 43–53, 17 mar. 2006.

TB ALLIANCE. **TB Alliance**. Disponível em: <<http://www.tballiance.org/>>. Acesso em: 28 nov. 2015.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: A new technique for high-accuracy molecular docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 3315–3321, 2006.

TROPSHA, A. Best Practices for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation. **Molecular Informatics**, v. 29, n. 6-7, p. 476–488, 6 jul. 2010.

VAN DER SPOEL, D. et al. **GROMACS: Fast, flexible, and free** **Journal of Computational Chemistry**, 2005.

VENTURA, T. L. B. et al. Antimycobacterial and anti-inflammatory activities of substituted chalcones focusing on an anti-tuberculosis dual treatment approach. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 20, n. 5, p. 8072–93, 5 jan. 2015.

VERMA, J.; KHEDKAR, V. M.; COUTINHO, E. C. 3D-QSAR in drug design-a review. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 10, n. 1, p. 95–115, 2010.

WAISSER, K. et al. Relationship between the structure and antimycobacterial activity of substituted salicylanilides. **Archiv der Pharmazie**, v. 336, n. 1, p. 53–71, mar. 2003.

WANG, J. et al. Development and testing of a general Amber force field. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, p. 1157–1174, 2004.

WANG, J. et al. Hierarchical database screenings for HIV-1 reverse transcriptase using a pharmacophore model, rigid docking, solvation docking, and MM-PB/SA. **Journal of medicinal chemistry**, v. 48, n. 7, p. 2432–2444, abr. 2005.

WANG, J. et al. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 25, p. 247–260, 2006.

WERMUTH, C. G. et al. Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998). **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, n. 5, p. 1129–1143, 1998.

WHO. **WHO: Global Tuberculosis Report 2015**. Switzerland: [s.n.].

YANG, S.-Y. Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances. **Drug discovery today**, v. 15, p. 444–450, 2010.

YANG, Y. et al. Molecular dynamics simulation, free energy calculation and structure-based 3D-QSAR studies of B-RAF kinase inhibitors. **Journal of chemical information and modeling**, v. 51, n. 3, p. 680–92, 28 mar. 2011.

ZHANG, Y. et al. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature**, v. 358, n. 6387, p. 591–593, 13 ago. 1992.

ZHANG, Y.; MITCHISON, D. The curious characteristics of pyrazinamide: A review. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 7, n. 1, p. 6–21, 2003.

ZHOU, B. et al. Targeting mycobacterium protein tyrosine phosphatase B for antituberculosis agents. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 10, p. 4573–8, 9 mar. 2010.

ZSOLDOS, Z. et al. eHiTS: an innovative approach to the docking and scoring function problems. **Current protein & peptide science**, v. 7, n. 5, p. 421–435, 2006.

ZUMLA, A. I. et al. New antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: needs, advances, and future prospects. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 14, n. 4, p. 327–40, abr. 2014.