



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular

Jeann Ricardo da Costa Bahia

**ESTUDO TEÓRICO DAS INTERAÇÕES ENTRE INIBIDORES DA INHA, ENOIL-  
ACP REDUTASE DO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*.**

Belém

2017

Jeann Ricardo da Costa Bahia

**ESTUDO TEÓRICO DAS INTERAÇÕES ENTRE INIBIDORES DA INHA, ENOIL-ACP REDUTASE DO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Pará, para qualificação, como requisito final para obtenção do grau de Mestre em Química Medicinal e Modelagem Molecular.

Orientador: Dr. Agnaldo da Silva Carneiro.

Área de concentração: Química Teórica

Belém

2017

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará**  
**Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

---

B151e Bahia, Jeann Ricardo da Costa.  
ESTUDO TEÓRICO DAS INTERAÇÕES ENTRE INIBIDORES DA INHA, ENOIL-ACP REDUTASE  
DO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS / Jeann Ricardo da Costa Bahia, . — 2017.  
60 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Agnaldo da Silva Carneiro  
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular,  
Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2017.

1. Triclosano. 2. isoniazida. 3. Enoil-ACP redutase. 4. InhA. 5. Mycobacterium tuberculosis. I. Título.

CDD 615.19

---

Jeann Ricardo da Costa Bahia

**ESTUDO TEÓRICO DAS INTERAÇÕES ENTRE INIBIDORES DA INHA, ENOIL-ACP REDUTASE DO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Pará, para qualificação, como requisito final para obtenção do grau de Mestre em Química Medicinal e Modelagem Molecular.

Área de concentração: Química Teórica

---

Prof. Dr. Agnaldo da Silva Carneiro – UFPA (Orientador)

---

Prof. Dr. Anderson Henrique Lima e Lima - IFPA (Banca Examinadora)

---

Profa. Dra. Barbarella Macchi – UFPA (Banca Examinadora)

Belém, 29 de setembro de 2107.

## DEDICATÓRIA

A Deus, minha mãe, minha filha, Ana Luiza,  
minha mulher, minha família.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por todas as bênçãos concedidas a mim.

A Nossa Senhora de Nazaré pela intercessão e pelo colo acolhedor de mãe.

A minha mãe, Rosilene Pinheiro da Costa, por ser um exemplo de mãe, guerreira incansável na busca de minha felicidade e de meus irmãos. Que também aproveito para agradecer por todo companheirismo auxílio, amo demais todos vocês.

A minha namorada, Monique Souza da Silva, por todo apoio, amor a mim dedicados e que me deu um dos meus maiores presentes, minha filha.

Aos meus padrinhos João Batista Pinheiro Costa, *in memoriam*, e Paulo Marcos Lobato Bahia por todo apoio a mim dado, por todo o companheirismo, minha trajetória teria sido bem mais difícil sem vocês.

Ao meu pai Alonso Correa Leão que apesar de não compartilharmos o mesmo sangue, tem me dado todo apoio como todo bom pai daria ao seu filho.

Aos meus companheiros de laboratório Fábio Jorge, Henrique Vogado, Camila Souza, Clauber Henrique, Amanda, Jordano Reis e Matheus, por todo apoio e suporte no laboratório.

Aos meus companheiros de Mestrado, Lanalice, Fernanda, Vaneza, Wanessa, Edson, Rai, Amarílis, Roberto, Lucas pela trajetória durante as disciplinas.

A todos os meus professores que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento. Por cada palavra, cada ensinamento e pela dedicação ao projeto que é o PPGQMMM.

Por último e não menos importante, agradeço imensamente ao meu orientador Prof. Dr. Agnaldo da Silva Carneiro, pela confiança, pela mentoria e por todo o suporte que a mim foi dado no decorrer do curso de mestrado.

## EPÍGRAFE

“[...] Jogue sua flecha o mais longe e vá resgatar esta flecha. Porque nesse caminho você vai aprender coisas, você vai decidir coisas. E quando chegar lá, não pare, não pare! Porque a vida é uma constante busca do saber, é uma constante busca da superação. É uma constante busca da entidade homem. Sabe essa força que todos nós temos dentro de nós, que às vezes fica acobertada por dúvidas e medos? Não tenha medo, não tenha medo, NÃO TENHA MEDO!  
Jogue sua flecha!”

Milton Gonçalves  
*Ator e Diretor*

*Frase declamada no programa 3 a 1, TV Cultura, exibido no dia 16/11/2010.*

## RESUMO

A Isoniazida é o profármaco sintético mais antigo, barato e efetivo da primeira linha de tratamento da Tuberculose. Ela deve ser ativada pela catalase-peroxidase do *Mycobacterium tuberculosis*, KatG, que produz um aduto isonicotinoil-NADH, INNADH, o qual se dirige a proteína Enoil-ACP redutase do *M. tuberculosis*, InhA, a fim de interromper a cadeia de síntese de ácidos micólicos. A resistência a isoniazida, isolada ou combinada a outras drogas é uma das formas mais comuns de tuberculose resistente e representa uma ameaça ao controle dessa doença. Nesse contexto, o triclosan (TCL) surge como uma alternativa de inibidores da síntese de ácidos micólicos, já que ele também é específico da InhA. Este estudo visa avaliar as interações de inibidores da InhA através da Simulação de Dinâmica Molecular (DM) e propor possíveis novos inibidores para essa enzima. O sistema utilizado neste trabalho foi captado a partir do banco de dados PDB, código 4TRO. Foram avaliados 8 ligantes, NADH, INNADH, e os derivados do TCL, P31, P41, P52, P61, P72 e P80. Na região inferior do sítio ativo da InhA foram mais frequentes empilhamentos de carga  $\pi$  feitos por PHE41 e PHE97 com os ligantes NADH, INADH, P80, P31, P72, entretanto P41 fez uma ligação de hidrogênio (LH) com a PHE41. Na região central do sítio ativo, resíduos como A GLY96, SER20 e ILE21 fizeram LH com NADH, INNADH, P31, P41 e P80. Em relação a região superior do sítio da InhA. A PHE149 realizou EC- $\pi$  com o INNADH e P41. Já no P31 foi uma LH com este resíduo e no P80 as energias são favoráveis para interação. As energias livres de cada sistema apresentadas por ordem decrescente, são INNADH (-72,038 kcal/mol), P80 (-45,841 kcal/mol), NADH (-41,463 kcal/mol), P41 (-40,178 kcal/mol), P31 (-31,807 kcal/mol), P72 (-30,614 kcal/mol), p52 (-19,475 kcal/mol) e P61 (-12,297 kcal/mol). Estes resultados destacam P80 e P41 como candidatos promissores a inibidores da síntese de ácidos micólicos de *M. tuberculosis*, já que seu perfil energético é competitivo aos valores mostrados pelo NADH.

**Palavras-chave:** Triclosano, Isoniazida, Enoil-ACP redutase, InhA, *Mycobacterium tuberculosis*.

## ABSTRACT

Isoniazid is the oldest, cheapest and most effective synthetic prodrug of the first line of treatment for Tuberculosis. It should be activated by the *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase, KatG, which produces an isonicotinoyl-NADH adduct, INNADH, which targets the *M. tuberculosis* Enoyl-ACP reductase protein, InhA, in order to disrupt the synthesis chain of mycolic acids. Resistance to isoniazid alone or in combination with other drugs is one of the most common forms of resistant tuberculosis and poses a threat to the control of this disease. In this context, triclosan (TCL) appears as an alternative inhibitor of the synthesis of mycolic acids, since it is also specific to InhA. This study aims to evaluate the interactions of inhibitors of InhA through Molecular Dynamics Simulation (DM) and propose possible new inhibitors for this enzyme. The system used in this work was captured from the database PDB, code 4TRO. Eight ligands, NADH, INNADH, and the TCL, P31, P41, P52, P61, P72 and P80 derivatives were evaluated. In the lower region of the active site of InhA were more frequent  $\pi$  charge stacks made by PHE41 and PHE97 with the ligands NADH, INNADH, P80, P31, P72, however P41 made a hydrogen bond (LH) with PHE41. In the central region of the active site, residues such as A GLY96, SER20 and ILE21 did LH with NADH, INNADH, P31, P41 and P80. In relation to the upper region of the InhA site. The PHE149 performed EC- $\pi$  with the INNADH and P41. Already in P31 was an LH with this residue and in P80 the energies are favorable for interaction. The free energies of each system presented in descending order are INNADH (-72,038 kcal / mol), P80 (-45,841 kcal / mol), NADH (-41,463 kcal / mol), P41 (-40,178 kcal / mol), P31 (-30.614 kcal / mol), p52 (-19.475 kcal / mol) and P61 (-12.297 kcal / mol). These results highlight P80 and P41 as promising candidates for *M. tuberculosis* mycolic acid synthesis inhibitors, since being an energy profile is competitive with the values shown by NADH.

**Keywords:** Triclosan, Isoniazid, Enoyl-ACP reductase, InhA, *Mycobacterium tuberculosis*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da Parede Celular de Micobactérias.....	17
Figura 2 - Estrutura química de alguns fármacos antituberculose. 1) Isoniazida; 2) Pirazinamida; 3) Etionamida; e 4) Rifampicina. ....	18
Figura 3 - Monômero da Enoil-ACP redutase do <i>M. tuberculosis</i> , InhA (PDB 1ZID), representada em <i>New Cartoon</i> e o aduto INH-NAD em azul, a fenilalanina 149 em vermelho. ....	19
Figura 4 - Mecanismo de ação da INH. A INH é ativada pela KatG e forma o aduto INH-NAD, que se dirige a InhA e bloqueia a atividade da enzima.....	20
Figura 5 - representação do sítio da InhA com o INH-NAD. Em magenta está a porção isonicotinoil, em azul está a porção correspondente ao NADH e em rosa está ilustrado a SER94 a qual está envolvida em um dos mecanismos de resistência do bacilo de Koch. ....	21
Figura 6 - Fórmula estrutura da Triclosano. ....	23
Figura 7 - Mecanismo de ação do Triclosano frente a FabI <i>E. Coli</i> junto ao cofator NADH. A linha pontilhada amarela mostra a LH entre a TYR156 e o fenol da Triclosano. A linha dupla pontilhada representa o EC- $\pi$ entre o anel A da TCL.....	24
Figura 8 - Fluxograma geral da metodologia aplicada a esta pesquisa. ....	27
Figura 9 – Tautomeria do grupo cetoamida do fragmento isonicotinoilnicotinamida do aduto INNADH e obtenção do radical R2 dos ligantes P52, P61 e P72. ....	29
Figura 10 - Fórmulas estruturais dos ligantes avaliados neste estudo. A) Cofator NADH; B) INNADH; C) proposta P31; D) proposta P41; E) proposta P52; F) proposta P61; G) proposta P72; e, H) proposta P80.....	30
Figura 11 – Visualização das Ligações de hidrogênio das poses escolhidas para a DM gerada através do software MVD.....	38
Figura 12 - Gráfico de RMSD da trajetória dos complexos proteína-ligante deste estudo. Em 1) NADH; 2) INNADH ‘ZID’ 3) P31; 3) P41; 5) P52; 6) P61; 7) P72; e 8) P80. ....	40
Figura 13 – Gráfico de energia livre obtido pelo método MMGBSA dos ligantes avaliados no presente estudo. ....	42

Figura 14 – Visualização das principais interações (em Å) entre os resíduos do sítio ativo e o NADH. A linha dupla tracejada ao sul da imagem representa o empilhamento de cargas $\pi$ face-a-face deslocada. As linhas simples tracejadas representam as LH. Os valores destacados se referem a distância entre os átomos da LH. ....	46
Figura 15 – Visualização das principais interações (em Å) entre os resíduos do sítio ativo e o aduto INNADH. As linhas duplas tracejadas da imagem B representam o empilhamento de cargas. As linhas simples tracejadas (imagem A) representam as LH. Os valores destacados se referem a distância entre os átomos da LH. ....	47
Figura 16 – imagem do complexo P31-InhA no <i>frame</i> 8000. As linhas simples pontilhadas mostram as LH. A linha dupla pontilhada destaca o EC- $\pi$ . Os numerais são as distâncias entre os átomos em angstrom (Å).....	48
Figura 17 – Visualização de interações (em Å) entre P41-InhA. As linhas simples pontilhadas mostram as LH. A linha dupla pontilhada destaca o EC- $\pi$ . Os numerais são as distâncias entre os átomos em angstrom (Å).....	49
Figura 18 – visualização das interações do sistema P52-InhA em 75 e 80 ns. As linhas simples pontilhadas mostram as LH. A linha dupla pontilhada destaca o EC- $\pi$ . Os numerais são as distâncias entre os átomos em angstrom (Å).....	50
Figura 19 - Visualização da estrutura do sistema P61-InhA, nos instantes 70 ns e 80 ns da trajetória. As linhas simples pontilhadas mostram as LH. Os numerais são as distâncias entre os átomos em angstrom (Å).....	50
Figura 20 – Visualização da estrutura tridimensional do sistema P72-InhA em 70 ns e 80 ns. As linhas simples pontilhadas mostram as LH. A linha dupla pontilhada destaca o EC- $\pi$ . Os numerais são as distâncias entre os átomos em angstrom (Å).....	51
Figura 21 – Visualização da tridimensional do sistema P80-InhA nos instantes 65, 70 e 75 ns. As linhas simples pontilhadas mostram as LH. A linha dupla pontilhada destaca o EC- $\pi$ . Os numerais são as distâncias entre os átomos em angstrom (Å).....	52

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
2.1	Geral .....	16
2.2	Específicos .....	16
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
3.1	O Complexo Mycobacterium tuberculosis.....	17
3.2	Isoniazida .....	18
3.3	Síntese de Ácidos Graxos e Mecanismos de Ação da Isoniazida. ....	19
3.4	Outros Fármacos Antituberculose.....	22
3.5	Triclosano (TCL) .....	23
3.6	Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos.....	25
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>27</b>
4.1	Obtenção e preparação do Sistema Biológico.....	27
4.1.1	Estrutura e otimização dos ligantes .....	28
4.1.2	Docking molecular.....	31
4.1.3	Cálculos de carga RESP .....	31
4.1.4	Obtenção da estrutura da enzima InhA e cálculo de pKa.....	32
4.1.5	Construção do complexo ligante-proteína .....	32
4.2	Simulação de Dinâmica Molecular. ....	33
4.2.1	Minimização .....	35
4.2.2	Aquecimento e equilíbrio .....	36
4.2.3	Produção de Dinâmica Molecular .....	36
4.2.4	Energia Livre e espontaneidade do sistema.....	37
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
5.1	<i>Docking</i> Molecular.....	37

5.2	Simulação de dinâmica molecular .....	39
5.2.1	RMSD das simulações de dinâmica molecular dos ligantes. ....	39
5.2.2	Energia Livre e espontaneidade dos Sistemas .....	41
5.2.3	Principais interações entre os resíduos da InhA e os ligantes .....	45
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>54</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Isoniazida é o profármaco sintético mais antigo, barato e efetivo da primeira linha de tratamento da Tuberculose. Este fármaco tem destaque pela especificidade para o *M. tuberculosis* o qual apresenta concentração inibitória mínima (MIC) muito baixa, 0,02 - 0,05µg/mL (ROSSETI et al., 2002; PETRI Jr, 2010). A hidrazida do ácido isonicotínico deve ser ativada pela enzima catalase-peroxidase, KatG (ZHANG et al., 1992; ROSSETI et al., 2002). A KatG produz um radical isonicotinoil que se liga covalentemente ao NADH, este aduto dirige-se a proteína redutase transportadora de Enoil-ACP redutase dependente de NADH, InhA, a fim de bloquear em última instância a síntese de ácidos micólicos (TIMMINS et al., 2004). Qualquer mutação que promova a redução da atividade da KatG resulta na resistência a isoniazida já que ela depende da ativação mediada por essa enzima (ZHANG et al., 2005).

A resistência a isoniazida, isolada ou combinada a outros fármacos antituberculose, incluindo Rifampicina, Pirazinamida e Etionamida, constitui a forma mais comum de resistência terapêutica e representa a primeira etapa na evolução para multirresistência (MDR, resistência pelo menos a Isoniazida e Rifampicina) e em seguida a extensiva resistência (XDR), que se configura como MDR com resistência adicional a uma fluoroquinolona e um fármaco de segunda linha injetável (amicacina, kanamicina ou capreomicina) (WHO, 2016). No cenário contemporâneo de casos de tuberculose resistente cada vez mais crescentes tornam necessários maiores esforços para o controle efetivo dessa doença, que leva a óbito quase dois milhões de pessoas por ano. Dos 490.000 casos decorrentes de multirresistência, quase 200.000 morrem a cada ano (WHO, 2015). Esses esforços incluem além de detecção rápida, o desenvolvimento de medicamentos mais efetivos contra o bacilo, constituindo uma das etapas prioritárias para o controle e erradicação da tuberculose.

Nesse cenário surgiu o triclosano, (4-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol), que foi bastante utilizado na indústria de produtos de higiene pessoal como conservante (LEVY et al., 1999; SCHWEIZER, 2001). Logo foi observado seu amplo espectro contra várias bactérias e fungos, o que tornou possível elucidar a ação deste composto a qual é específica para a síntese de ácidos graxos, onde o alvo é a Enoil-ACP redutase (FabI em várias bactérias e InhA no *M. tuberculosis*) (JONES et al., 2000; MCMURRY; MCDERMOTT; LEVY, 1999; MCMURRY; OETHINGER; LEVY, 1998). Além de específico o triclosano mostra um perfil seguro, demonstrado baixa toxicidade (BHARGAVA; LEONARD, 1996).

O estudo *in silico* da estrutura de compostos é possível devido à existência de *softwares* para a abordagem química e, também, através de bancos de dados em rede, os quais surgiram como ferramentas de fundamental importância para a descoberta e planejamento de fármacos pela rapidez da análise da atividade biológica *versus* propriedades físico-químicas de uma série de moléculas de interesse, viabilizando, ainda, estudos de agentes terapêuticos já existentes e no desenvolvimento de novos medicamentos (CARVALHO et al.,2003).

Estudos têm sido realizados com a finalidade de descrever e, se possível, desenvolver um novo fármaco com índice terapêutico elevado, potência e seletividade assegurada, garantindo, assim, a eficácia do tratamento sem causar prejuízos à saúde do paciente ou a sua não adesão à terapia, o que constantemente ocorre devido ao aparecimento de reações adversas medicamentosas ou efeitos tóxicos que o obrigue a interromper a quimioterapia ou ainda desenvolvimento de resistência ao medicamento (SOBRAVIME, 2001; WHO, 2016). Ao longo dos últimos anos tem sido proposto, em média, mais de 10 mil novos candidatos a fármacos a cada ano, dos quais apenas 1 (um) chega a ser selecionado para tratamento clínico (MILARDI; PAPPALARDO, 2015).

Diante deste contexto, o presente estudo visa avaliar a as interações que conferem a isoniazida eficácia no bloqueio da síntese de ácidos micólicos e as energias envolvidas e compará-los com as proposições de derivados de triclosanos, visando o planejamento racional de um possível ligante que tenha maior eficiência no bloqueio da síntese de ácidos graxos do *Mycobacterium tuberculosis* promovendo, então, a morte destes bacilos e o controle dessa doença.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Observar a interação entre inibidores da InhA, Enoil-ACP Redutase do *Mycobacterium tuberculosis* através de simulação computacional.

### 2.2 Específicos

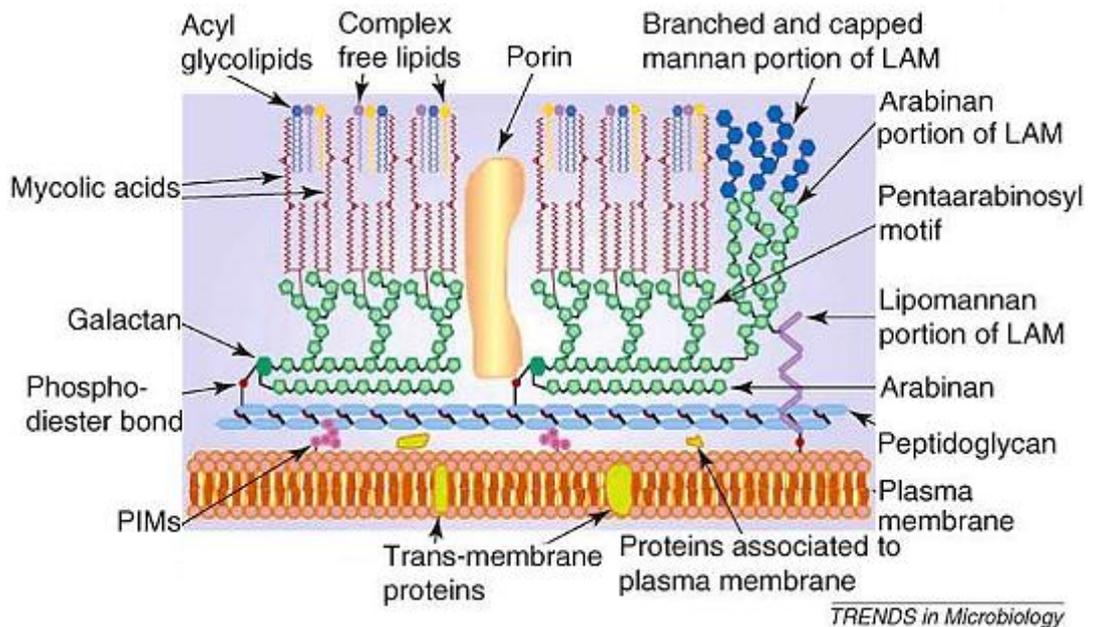
- Estudar os aspectos conformacionais e geométricos da Isonicotinoil-NADH e NADH e derivados do Triclosano;
- Verificar as interações significativas que levam a inativação da InhA;
- Estudar a espontaneidade dos sistemas em estudo por meio da realização de cálculos de energia livre de ligação entre a InhA e os ligantes;
- Propor novos derivados do triclosano, que atuem na InhA, Enoil-acil ACP Redutase.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 O Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

O gênero *Mycobacterium* é o único representante da família *Mycobacteriaceae*. A principal característica deste gênero é a presença, em grande quantidade, de ácidos graxos de cadeia longa denominados ácidos micólicos na parede celular micobacteriana (Figura 1). Esta característica confere as micobactérias a álcool-ácido resistência, podendo ser detectadas pela baciloscopia através da coloração de Ziehl-Neelsen, bem como é essa peculiaridade que dá nome à família e ao gênero *Mycobacterium* (RUNYON, 1959).

Figura 1 - Estrutura da Parede Celular de Micobactérias.



Fonte: MedJahed (2009).

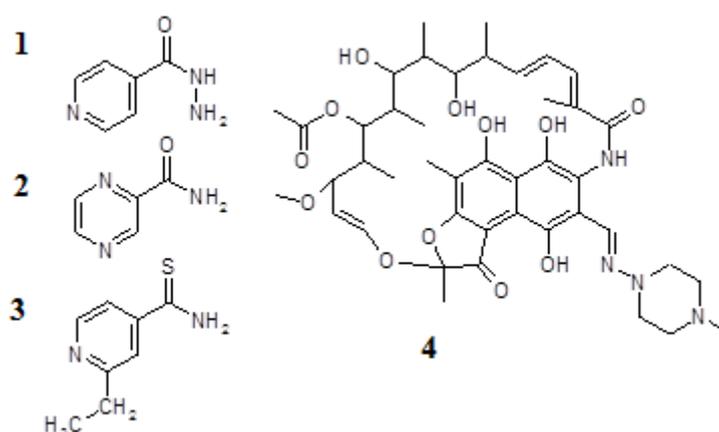
Atualmente existem 175 espécies e 13 subespécies de micobactérias (EUZÉBY, 2016). Elas são divididas em três grupos tais como o *Mycobacterium leprae*, as micobactérias não tuberculosas (MNT) e o complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Este último é representado pelo *M. tuberculosis*, agente etiológico da tuberculose em humanos, e outras espécies como o *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG, e *Mycobacterium pinnipedii* (EUZÉBY, 2016), que causam a TB em animais, possuem uma estreita relação genética, contudo se diferem quanto à patogenia, infectologia e distribuição geográfica (BROSCH et al., 2002).

### 3.2 Isoniazida

A Isoniazida é um medicamento usado para o tratamento da tuberculose no Brasil e no mundo. Sua administração é feita em conjunto com Rifampicina, Pirazinamida e Etambutol nos primeiros dois meses, objetivando a redução geométrica da população de bacilos e tentando-se evitar o desenvolvimento da (multi)resistência às drogas, seguidos de mais 4 meses junto com a Rifampicina (SBTP, 2009).

A isoniazida, Figura 2(1), é o mais antigo fármaco sintético efetivo contra a TB e um dos principais quimioterápicos de primeira linha no tratamento da doença, sendo reconhecida, já em 1952, como potente agente contra o *Mycobacterium tuberculosis* (MIDDLEBROOK, 1952; ASIF, 2012). Atualmente isoniazida ainda é a mais barata e eficaz no tratamento da tuberculose (ROUSE; MORRIS 1995, SBTP, 2009). Sua concentração inibitória mínima (MIC) é muito baixa, 0,02 a 0,05µg/mL, o que contribui para sua eficácia (MUSSER, 1995; ROSSETI et al., 2002; PETRI Jr, 2010). Este fármaco é notoriamente seletivo para micobactérias, especialmente para o *M. tuberculosis*. Para inibir outros microrganismos são necessárias doses de pelo menos 10000 (dez mil) vezes maior (Cerca de 500µg/mL) (PETRI Jr, 2010).

Figura 2 - Estrutura química de alguns fármacos antituberculose. 1) Isoniazida; 2) Pirazinamida; 3) Etionamida; e 4) Rifampicina.



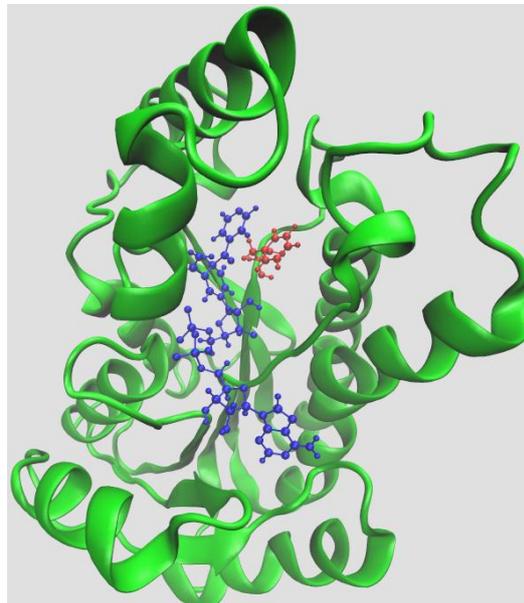
Fonte: Nogueira (2012).

Dois anos após sua introdução no tratamento da tuberculose, os primeiros mutantes de *M. tuberculosis* resistentes a isoniazida foram isolados e muitas dessas linhagens mostraram redução na ação da catalase-peroxidase (KatG) (MIDDLEBROOK, 1954). Posteriormente

constatou-se que este não é o único mecanismo de resistência. Outros mecanismos envolvem genes de enzimas como a redutase transportadora de enoil-acil dependente de NADH (InhA), alquil hidroperóxido redutase (AhpC), NADH desidrogenase (Ndh) (STOECKLE et al., 1993; ALTAMIRANO et al., 1994; ROUSE et al., 1996; CATTOIR, 2004).

A mutação mais comum no gene da catalase-peroxidase micobacteriana, *katG*, é Ser315Thr a qual está associada à resistência a Isoniazida sem redução da virulência ou transmissibilidade das cepas de *M. tuberculosis* (PYM et al., 2002; COHEN et al., 2004).

Figura 3 - Monômero da Enoil-ACP redutase do *M. tuberculosis*, InhA (PDB 1ZID), representada em *New Cartoon* e o aduto INH-NAD em azul, a fenilalanina 149 em vermelho.



Fonte: adaptado de Rozwarski et al. (1998).

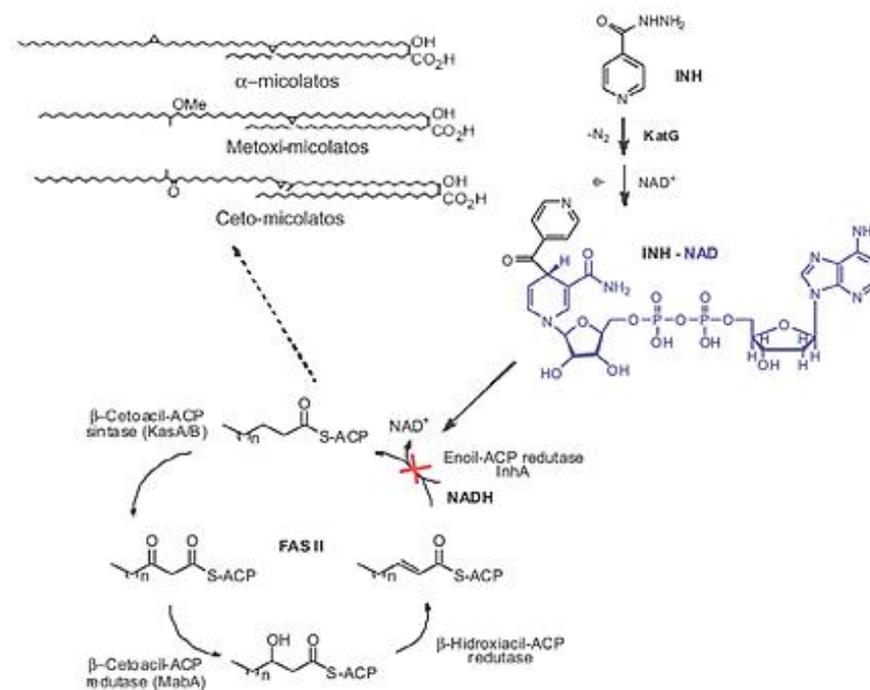
Nesse mesmo contexto, o mecanismo de resistência a isoniazida, no que tange as mutações no gene *inhA*, a mais comum é a permuta de resíduos na posição SER94ALA, ou seja, de uma serina para uma alanina. Essa mutação parece estar relacionada ao impedimento da interação da proteína com o aduto INH-NADH, ilustrado na Figura 3, na porção originada da isoniazida, todavia, sem grandes prejuízos as interações com a coenzima NADH que, por conseguinte não interfere na síntese dos ácidos micólicos da parede celular micobacteriana (ROZWARSKI et al., 1998; HARTKOORN et al., 2012).

### 3.3 Síntese de Ácidos Graxos e Mecanismos de Ação da Isoniazida.

O mecanismo biossintético de ácidos graxos é denominado sistema FAS (do inglês, *Fatty Acid Synthase*). Existem duas vias de Síntese de Ácido Graxo, FAS do tipo I e II. A

síntese de ácidos graxos pelo sistema FAS I, que ocorre em eucariotos, exceto plantas, é realizada por uma única enzima multifuncional, que sintetiza moldes para o sistema FAS II. Entretanto, no sistema FAS II cada catálise é realizada por uma enzima diferente, a qual ocorre em *P. falciparum*, plantas e bactérias (Figura 4). Assim, em ambos os casos, o substrato é continuamente ativado via ligação tioéster ao grupo prostético do cofator necessário, coenzima A ou uma proteína acil-transportadora, ACP (KUO et. al, 2003; MARRACHI et al., 2003; ANDRADE et al., 2008). Entretanto, ao se tratar de micobactérias, esta síntese é realizada das duas formas, pelo FAS I e II, sendo que o sistema FAS II utiliza os produtos da FAS I para um alongamento de cadeias maiores e mais uniformes, as quais são as precursoras dos ácidos micólicos, principais e importante componente da parede celular micobacteriana (BARRY et al., 1998; ANDRADE et al., 2008). Essa via de síntese de lipídeos pode ser cessada pelo aduto, INNADH, o qual inibe a InhA e, assim, a biossíntese de ácidos graxos (FAS I), especialmente os ácidos micólicos ( $\alpha$ -micolatos, metóxi-micolatos e ceto-micolatos), Figura 4, responsáveis pelo impedimento da maturação do fagossomo no macrófago (FRATTI et al., 2003), logo, deixando a bactéria exposta a ação bactericida do macrófago (ZHANG et al., 2003, ANDRADE et al., 2008).

Figura 4 - Mecanismo de ação da INH. A INH é ativada pela KatG e forma o aduto INH-NAD, que se dirige a InhA e bloqueia a atividade da enzima.

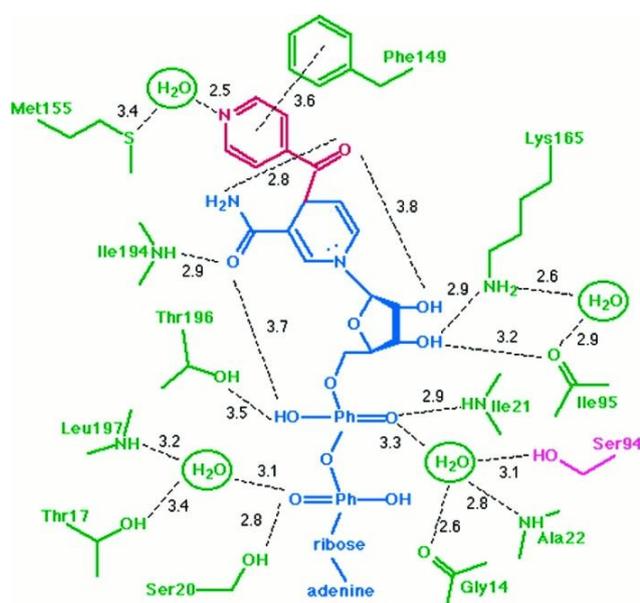


Fonte: Andrade et al. (2008).

Além disso, o aduto formado pela isoniazida e o NAD não parece ter grandes diferenças nas interações dentro do sítio da Enoil-ACP redutase em relação ao NADH. O sítio ativo quando interage com o INH-NAD possui um PHE149, que promove um  $\pi$  *stacking* (empilhamento de cargas  $\pi$ ) justamente na porção isonicotinoil (Figura 5). Ademais, há uma ligação de hidrogênio intramolecular entre a amida nicotinamida e a acila do isonicotinoil, ainda, ocorre uma troca de interação da amida da isoleucina 194 com a amida da nicotinamida pela interação com a carbonila da nicotinamida (ROZWARSKI et al., 1998; CHOLLET et al., 2015).

A isoniazida deve ser ativada por uma enzima catalase-peroxidase (ZHANG et al., 1992; ROSSETI et al., 2002). A KatG separa o grupo hidrazida (-NH-NH<sub>2</sub>) do isonicotinoil e associa com NADH para formar o aduto isonicotinoil-NADH. Este aduto liga-se fortemente à proteína redutase transportadora de enoil-acil dependente de NADH, conhecida como InhA, que acaba por bloquear o substrato natural e a ação da Sintase de Ácido Graxo, provavelmente do sistema FAS I. Este processo inibe a síntese de ácidos micólicos, necessários à parede celular de micobactérias (TIMMINS et al., 2004; TIMMINS; DERETIC, 2006).

Figura 5 - Representação do sítio da InhA com o INH-NAD. Em magenta está a porção isonicotinoil, em azul está a porção correspondente ao NADH e em rosa está ilustrado a SER94 a qual está envolvida em um dos mecanismos de resistência do bacilo de Koch.



Fonte: Rozwarski et al. (1998).

### 3.4 Outros Fármacos Antituberculose.

Outros fármacos que compõem a multidrogaterapia da tuberculose possuem estrutura derivada da nicotinamida e, portanto, semelhante ao da hidrazida do ácido isonicotínico. Um exemplo é a Pirazinamida, Figura 2 (2), que é um derivado pirazínico da nicotinamida, que tem ação sobre a síntese de ácidos micólicos, assim como a isoniazida, porém seu mecanismo de ação parece estar envolvido com a inibição na Sintase de Ácido Graxo I, sistema FAS I (PETRI Jr, 2010).

Outro mecanismo importante de ação da Pirazinamida está ligado à redução do potencial de membrana micobacteriano, através do acúmulo de ácido pirazinóico produzido pela enzima micobacteriana nicotinamidase/pirazinamidase (PZase) utilizando a pirazinamida como substrato, em pH ácido, semelhante ao ambiente interior do fagossomo do macrófago (ZHANG et al., 2003). O ácido pirazinóico não parece possuir um único alvo específico, mas existem evidências de que ele dificulta a síntese de RNA mensageiro e de proteínas, produzindo com seu principal efeito a redução do potencial de membrana e de mecanismos de efluxo da célula micobacteriana (KONNO et al., 1967; SCORPIO; ZHANG, 1996).

Uma característica interessante a respeito da atividade e eficácia da pirazinamida é o fato de seu efeito ser melhor em bacilos com pouca ou nenhuma taxa de crescimento do que em bacilos com intensa taxa de crescimento, ao contrário de outros antimicrobianos (ZHANG et al., 2002).

Outro fármaco estruturalmente semelhante à nicotinamida é a Etionamida, Figura 2 (3). Esta é um profármaco que necessita da ativação da enzima EtaA, uma monooxidase dependente de FAD e NADPH específica, que produz um sulfóxido e posteriormente uma piridina. Após sua ativação, a etionamida inibe a InhA, enoil-ACP redutase, interrompendo a cadeia de síntese de ácido graxo I, FAS I, igualmente a isoniazida, produzindo como efeito final a interrupção da síntese de ácidos micólicos (LARSEN et al., 2002; PETRI Jr; 2010).

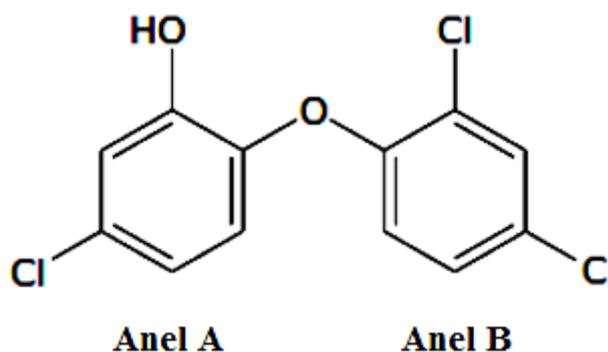
O *M. tuberculosis* exibe uma resistência cruzada entre etionamida e isoniazida, quando há a superexpressão do gene *inhA*, que codifica a enoil-ACP redutase. Essa superexpressão se dá através de mutações na região promotora do gene *inhA*, que também é conhecida como um dos mecanismos de resistência a isoniazida do bacilo da tuberculose (LARSEN et al., 2002). Outro mecanismo de resistência a etionamida, que também ocorre na isoniazida, é mutações no gene estrutural da InhA. Essas mutações modificam resíduos da proteína alterando a afinidade do fármaco com o receptor mutante da proteína, tais como SER94ALA e ILE21VAL.

A etionamida é efetiva contra o *M. tuberculosis*, todavia não é uma droga da primeira linha de tratamento desta doença, devido seus efeitos adversos serem de moderados a graves. As principais queixas que envolvem o uso da etionamida são náuseas, vômitos, anorexia, irritação gástrica, e uma variedade de sintomas neurológicos, como sonolência, depressão mental, além de distúrbios oftálmicos, olfatórios. A administração conjunta a vitamina B<sub>6</sub> (Piridoxina) alivia os sintomas neurológicos. Apresentam hepatotoxicidade a qual desaparece com a interrupção do tratamento (PETRI Jr, 2010).

### 3.5 Triclosano (TCL)

O triclosano (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol), ilustrado na Figura 6, é um composto químico não iônico pertencente a classe dos bisfenóis ou difenil éteres e amplamente utilizado há quase 50 anos como conservante em vários produtos cotidianos de higiene pessoal (LEVY et al., 1999; SCHWEIZER, 2001). Esse composto é efetivo contra um amplo espectro de bactérias e fungos (JONES et al., 2000; LEVY et al., 1999; MCMURRY; MCDERMOTT; LEVY, 1999).

Figura 6 - Fórmula estrutura da Triclosano.

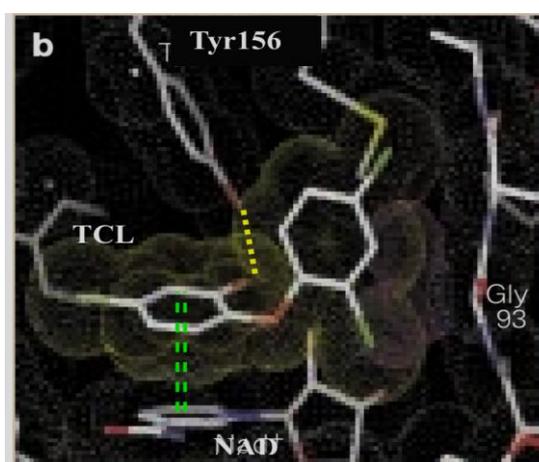


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Muitos anos após a introdução do Triclosano como conservante foi descoberto qual o alvo específico de ação dessa droga. O triclosano apresentou ação específica contra Enoil-ACP redutase de *Escherichia coli* (FabI) atuando assim diretamente na inibição da síntese de parede celular levando a célula bacteriana a lise (MCMURRY; OETHINGER; LEVY, 1998). A partir daí, foi investigada a ação desse composto contra as FabI de várias bactérias e fungos, inclusive do *Mycobacterium. smegmatis*, o qual também demonstrou ação específica a inibição da síntese de ácidos graxos assim como na *E. coli* (MCMURRY; MCDERMOTT;

LEVY, 1999). Pouco tempo depois foi elucidado através de métodos de química medicinal qual o comportamento do Triclosano frente à Enoil-ACP redutase, esse mecanismo consiste na ocupação do sítio na região nicotinamida ribose, onde ocorre um empilhamento de cargas  $\pi$  entre o anel A do TCL e a nicotinamida do NADH junto a uma ligação de hidrogênio entre a OH do TCL e a OH da TYR156 da FabI de *E. coli* (Figura 7)(LEVY et al., 1999)

Figura 7 - Mecanismo de ação do Triclosano frente a FabI *E. Coli* junto ao cofator NADH. A linha pontilhada amarela mostra a LH entre a TYR156 e o fenol da Triclosano. A linha dupla pontilhada representa o EC- $\pi$  entre o anel A da TCL.



Fonte: Adaptado de Levy et al., (1999).

Além da especificidade para o sítio das FabI (homóloga a InhA) o triclosano é um composto administrado de forma oral tem baixa toxicidade aguda, o qual só aumenta com a mudança da administração para a via intravenosa, mesmo assim continua em níveis seguros. Do mesmo modo tem baixa toxicidade subcrônica e crônica mostrando ainda baixo ou nenhum efeito carcinogênico (BHARGAVA; LEONARD, 1996; JONES et al., 2000). Essas características tornam o TCL um promissor agente antibacteriano pela sua especificidade de ação, e segurança e baixa toxicidade, visto que as reações adversas provocadas pela multidroga terapia antituberculose são um dos fatores que levam os pacientes a abandonar o tratamento, dessa forma, contribuem para o surgimento de cepas resistentes aos medicamentos anti-TB. Tudo isso aliado ao fato deste fármaco não precisar se ativado por qualquer outra enzima tal como ocorre com Isoniazida, Etionamida e Pirazinamida.

### 3.6 Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos

A integração de conhecimentos sobre tecnologia, investimento e desenvolvimento em pesquisa somado aos conhecimentos sobre a fisiologia dos organismos tem importância significativa no planejamento racional de fármacos, pela contribuição expressiva para segurança, eficácia e seletividade dos fármacos por seus receptores-alvos (GUIDO; ANDRICOPULO, 2008). Este processo de planejamento é dividido em duas fases: I - pré-clínica, na qual estão inseridas as etapas de identificação, otimização e estudos de relação estrutura-atividade de moléculas; e II - clínica é a etapa de desenvolvimento propriamente dito (GODIM, 2007).

A fase pré-clínica do planejamento de fármacos pode ser conduzida com o auxílio de ferramentas de triagens biológicas como a triagem de alto rendimento (HTS, do inglês, *high-throughput screening*) e triagem virtual (VS, do inglês, *virtual screening*), além daqueles realizados através de modelagem molecular (GUIDO et al., 2010). a modelagem molecular consiste no desenho, manipulação de estruturas moleculares e cálculo das propriedades físico-químicas associadas a ela sob um dado conjunto de circunstâncias, visando a construção de uma representação tridimensional dessa estrutura.

A modelagem molecular permite também, dentre outras possibilidades, prever os mecanismos moleculares envolvidos na ação e metabolismo dos fármacos (CARVALHO et al. 2003). O conhecimento das estruturas de alvos macromoleculares ou de complexos ligante-receptor permite a aplicação de estratégias de planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (SBDD, do inglês *structure-based drug design*). Contudo quando não é conhecida a estrutura do alvo, métodos de planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante (LBDD, do inglês *ligand-based drug design*) são os mais recomendados.

O uso integrado de SBDD e LBDD geram informações sinérgicas e, portanto, mais confiáveis e úteis no planejamento de NCE (*New Chemical Entities*) (GUIDO; OLIVA, 2009). O conhecimento da estrutura tridimensional do receptor é um instrumento-chave para o planejamento baseado na estrutura do receptor. Estas estruturas dos receptores atualmente encontram-se disponíveis em bancos de dados públicos, como PDB (*Protein Data Base*), InterPro, ExpASY e Relibase (GUIDO; ANDRICOPULO, 2008; GUIDO; OLIVA, 2009; GUIDO et al., 2010).

Ademais, o crescimento acelerado de hardwares com capacidade e eficiência muito superiores aos do início dessa década, permitiu o uso de uns dos principais métodos utilizados atualmente, este, consiste na Simulação de Dinâmica Molecular (MD) (MILARDI;

PAPPALARDO, 2015). Vários softwares ou pacotes de programas realizam essa metodologia, tais como NAMD (WANG et al., 2011), *pdynamo*, AMBER (CASE et al., 2005). Logo, a integração de técnicas experimentais e computacionais assume grande importância no processo de planejamento de fármacos. Isto pode ser observado nos resultados obtidos através do planejamento racional e desenvolvimento de fármacos.

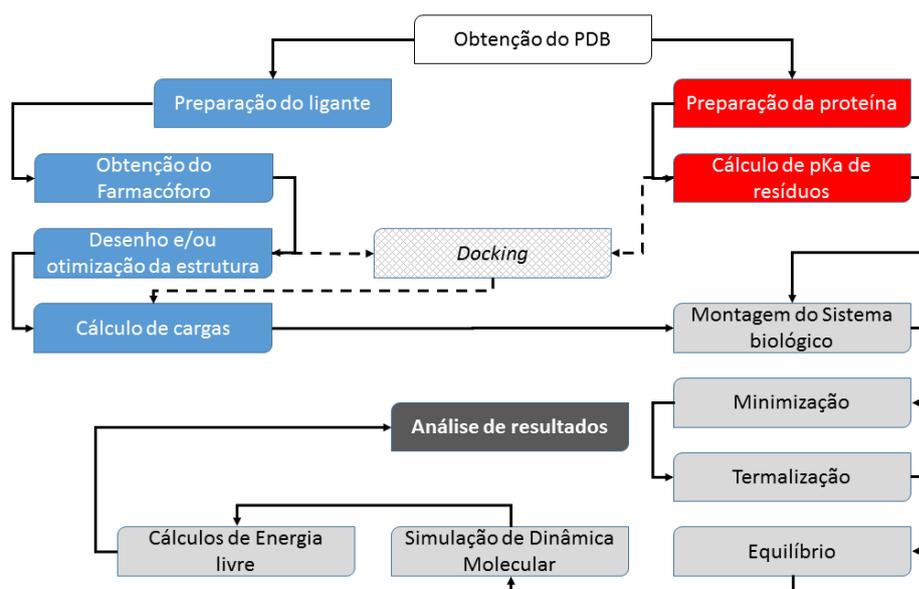
## 4 METODOLOGIA

Todas as etapas do presente foram realizadas em computadores disponíveis no Laboratório Amazônico de Computação Científica (LACC) e Laboratório Computacional Sistemas Biológicos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (LCSB), em sistema operacional Linux, plataforma Ubuntu versão 14.04 LTS.

### 4.1 Obtenção e preparação do Sistema Biológico

O sistema utilizado neste trabalho, proteína – ligante, onde a enzima é a Enoil-ACP redutase e o aduto isonicotinoil-NADH, foi captado a partir do banco de dados PDB (em inglês, *Protein Data Bank*), cujo código é 4TRO (CHOLLET et al., 2015). A estrutura base de compostos avaliados como possíveis inibidores da classe de triclosanos foram correspondentes ao PDB 3FNE (FREUNDLICH et al., 2009). Na Figura 8 é possível visualizar de forma sintética as etapas de preparação do sistema em estudo. As estruturas dos ligantes foram preparadas separadamente a proteína até a etapa de docking molecular. Depois os ligantes foram docados separadamente na InhA. A etapa posterior consistiu na preparação do sistema para os cálculos de dinâmica molecular propriamente dita. E por último a análise dos resultados obtidos.

Figura 8 - Fluxograma geral da metodologia aplicada a esta pesquisa.

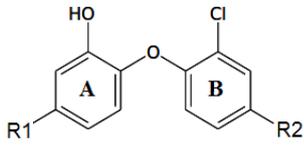
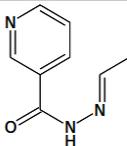
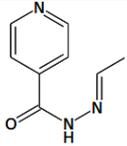
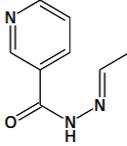
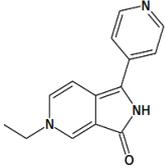
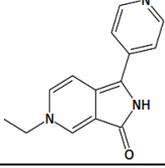
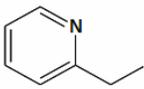
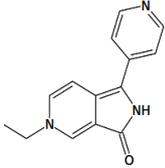
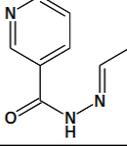
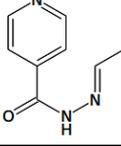


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

#### 4.1.1 Estrutura e otimização dos ligantes

Os ligantes NADH, Isonicotinoil-NADH (INNADH) (4TRO) e o Triclosano (3FNE) foram extraídos das estruturas cristalográficas obtidas no banco de dados PDB. Em seguida, foi realizada a adição de hidrogênios, no NADH e INNADH, a qual foi realizada no *software* Pymol (DELANO, 2004). Para o triclosano, foram desenhadas também no Pymol estruturas candidatas a ligante da proteína Enoil-ACP redutase a partir do Farmacóforo do inibidor do PDB 3FNE, conforme demonstrado no Quadro 1 que apresenta quais os pontos de substituição para a obtenção dos candidatos a ligante da InhA.

Quadro 1 – Ligantes derivados do triclosan.

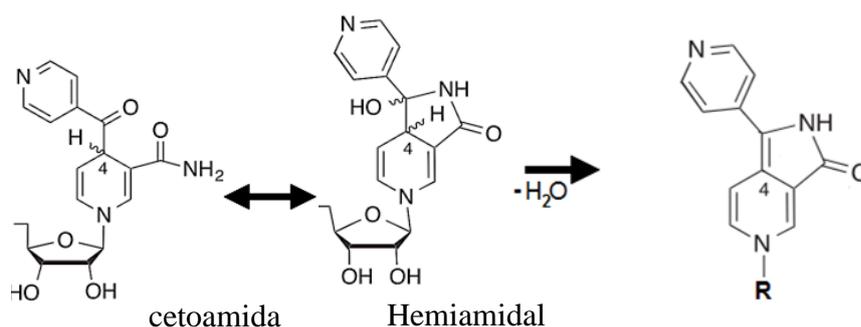
Farmacóforo		
Derivado	R1	R2
P31		Cl
P41		Cl
P52		
P61	Cl	
P72		
P80		

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Ao avaliar a estrutura química do NADH e INNADH foram desenhados ligantes derivados do TCL que possuíam substituintes com propriedades eletrônicas, motivo da escolha das hidrazonas visto que suas propriedades químicas se assemelham as das hidrazidas. Outro ponto importante é a presença de cargas  $\pi$  que têm muita importância e estreita relação com o papel da Isoniazida na inibição da InhA.

Entretanto, o substituinte R2 teve origem no possível efeito tautomérico que ocorre com a porção isonicotinoilnicotinamida do aduto INNADH, este se caracteriza pelo equilíbrio cetoamida-hemiamidal ocorrido neste composto (figura 9). Contudo, ainda existe uma possibilidade de uma desidratação na hemiamida formando o radical R2 que tem menor possibilidade de torção que o INNADH.

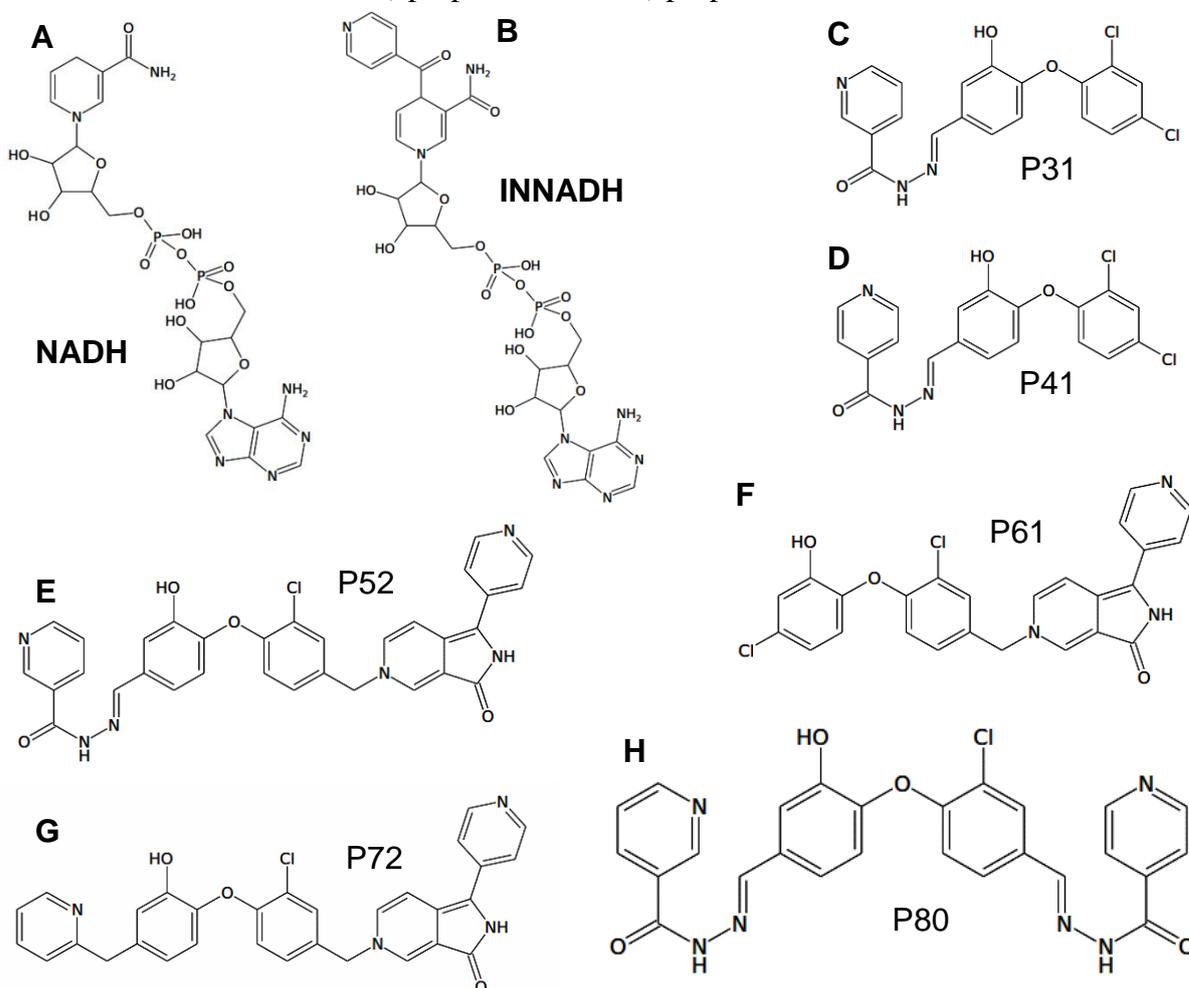
Figura 9 – Tautomeria do grupo cetoamida do fragmento isonicotinoilnicotinamida do aduto INNADH e obtenção do radical R2 dos ligantes P52, P61 e P72.



Fonte: adaptado de Chollet et al., 2015.

Após o desenho, as moléculas foram submetidas ao Pymol para avaliação das melhores poses dentro do sítio ativo da enzima. A figura 10 a seguir mostra a estrutura química de todos os ligantes avaliados neste estudo.

Figura 10 - Fórmulas estruturais dos ligantes avaliados neste estudo. A) Cofator NADH; B) INNADH; C) proposta P31; D) proposta P41; E) proposta P52; F) proposta P61; G) proposta P72; e, H) proposta P80.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Posteriormente, as estruturas desenhadas a partir do triclosano, ligante natural da enzima (NADH) e o fármaco ativo (INNADH) foram otimizadas no programa Gaussian 03 (FRISCH et al., 2003), os dois últimos feitos pelo método *frozen*, que, ligeiramente, consiste em “congelar” a cadeia carbônica principal e otimizar apenas os hidrogênios adicionados. O método empregado para a otimização das estruturas foi o método quântico DFT (*Density Functional Theory*), com funções de base 6-31g\*. O método DFT tem como propósito principal a obtenção de soluções para a equação de Schrödinger, entretanto, através da densidade eletrônica. É um método simples e muito preciso em sistemas que não tenham fluidos. Esta ferramenta foi desenvolvida por Hohenberg, Kohn e Shan (DUARTE, 2007)□. O método DFT sofreu várias inclusões de termos para deixá-lo ainda mais preciso. O método variacional, o qual pode evidenciar o mínimo de energia do sistema a partir de uma densidade eletrônica arbitrária. O funcional mais utilizado em sistemas moleculares é o híbrido B3LYP

proposto por Lee, Yang e Parr (LYP) (DUARTE, 2007). Este híbrido tem boa correlação dos resultados de otimização geométrica com os dados experimentais. Este processo tem por objetivo elucidar a estrutura de menor energia para os mais diversos compostos químicos.

#### 4.1.2 *Docking molecular*

A ferramenta de *docking* molecular, como o próprio nome já sugere, realiza um acoplamento de ligantes em estruturas polipeptídicas com o intuito de fornecer informações sobre as conformações e torções que o ligante deve assumir para uma interação com o sítio ativo ou determinada cavidade peptídica. Esta ferramenta tem utilidade em acoplar ligantes que originalmente não estão na estrutura da proteína, como em estruturas cristalográficas. Dessa forma, este método desempenha papel importante no processo de planejamento racional de fármacos.

Vários programas de computador são capazes de utilizar essa metodologia. Neste trabalho foi utilizado o *Molegro Virtual Docker* (MVD) versão 5.4 (MOLEGRO VIRTUAL DOCKER, 2011). Foram submetidos ao docking seis ligantes desenhados a partir do triclosano e numerados de 3 a 8. Para cada ligante foi gerado 5 poses as quais foram enumeradas de 0 a 4, cujo ao final forneceu ao total 30 poses que foram codificadas de acordo com o ligante e a pose gerada pelo software (ex. P31, ligante 3, pose 1; P44, ligante 4, pose 4). Todos os dockings foram realizados buscando-se a cavidade do cofator da cristalografia da InhA, código PBD 4TRO. A avaliação e escolha de uma conformação se baseia na soma da energia de interação intermolecular ( $E_{inter}$ ) entre o ligante e a proteína e a energia de interação intramolecular ( $E_{intra}$ ) do ligante (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006). No MVD, esse ajuste representa a função de pontuação de *docking*, segundo a Equação 1:

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

#### 4.1.3 *Cálculos de carga RESP*

Após o desenho e otimização das estruturas dos ligantes, é necessário extrair as informações que correspondam a distribuição de cargas dos átomos do ligante. O método utilizado para fornecer a distribuição de cargas é o método ESP (*ElectroStatic Potential*). Este é calculado pelo método de Hartree-Fock (HF), com funções de base 6-31g\*. O método Hartree-Fock tem como propósito principal a obtenção de soluções para a equação de Schroedinger de sistemas estacionários, as quais são resolvidas com cálculos aproximados,

neste caso, através de Determinante de Slater da matemática matricial que trata os elétrons de um sistema como uma matriz de dados.

Seguindo, o primeiro programa do pacote do AMBERtools 14 (CASE et al., 2014) a ser utilizado é o ANTECHAMBER. Este é capaz de inserir informações ou transformar as informações dos arquivos das etapas anteriores em arquivos legíveis aos outros programas do pacote. Além disso, esse programa realiza processo de desenvolvimento de descritores de campo de força para a maioria das moléculas orgânicas. Os ligantes são parametrizados em arquivos com informações completas de coordenadas cartesianas, distribuição de carga, ligações, tipos de átomo com a “linguagem” do campo de força do AMBER (*Assisted Model Building with Energy Refinement*), o qual é amplamente utilizado para simulações com biomoléculas e proteínas, tendo melhor *performance* na parametrização desses tipos de moléculas.

#### 4.1.4 Obtenção da estrutura da enzima InhA e cálculo de pKa

A estrutura da enzima utilizada no presente trabalho foi adquirida do PDB 4TRO (CHOLLET et al., 2015). A mesma foi submetida ao servidor online do sítio PDB2PQR ([http://nbc222.ucsd.edu/pdb2pqr\\_2.0.0/](http://nbc222.ucsd.edu/pdb2pqr_2.0.0/)) (DOLINSKY et al., 2004). Este sítio da internet é capaz de realizar cálculos de pKa e conseqüentemente o estado de protonação de cada resíduo da proteína além de ser capaz de otimizar os hidrogênios adicionados a enzima. Os arquivos gerados podem ser lidos em vários tipos de campos de força PARSE, GROMOS, AMBER e etc. Na presente pesquisa, os ficheiros criados para serem lidos no pacote de programas do AMBERtools 14 (CASE et al., 2014).

#### 4.1.5 Construção do complexo ligante-proteína

Após a parametrização do ligante no ANTECHAMBER e a construção da proteína com seu devido estado de protonação, os arquivos foram submetidos ao aplicativo LEaP do pacote AMBERtools com a finalidade de montar o sistema a ser simulado. Nesta etapa foram inseridos parâmetros do GAFF (*General AMBER Force Field*) e campo de força ff99SB. Com o LEaP é possível escrever os arquivos necessários para as etapas iniciais da simulação de dinâmica molecular. Faz-se combinação dos arquivos referentes ao ligante e a proteína e forma o complexo. Em seguida é produzido um arquivo com a topologia e outro com as coordenadas do complexo proteína-ligante. Como o sistema a ser simulado é biológico, deve-

se mimetizar esse ambiente, para isso é adicionado contra íons para neutralizar as cargas do complexo. Em seguida é adicionada uma caixa octaédrica de água TIP3PBOX com aresta de 10 Å de distância da superfície externa da proteína.

## 4.2 Simulação de Dinâmica Molecular.

A simulação de dinâmica molecular usada nessa pesquisa é baseada em Mecânica Clássica (Newtoniana), o qual requer campos de força previamente parametrizados com dados empíricos. É um método mais veloz, requer menor poder computacional, sendo assim pode ser usado em sistemas com centenas de milhares de átomos. Todavia, despreza as propriedades eletrônicas, haja vista que trata os átomos como cargas pontuais.

O campo de força AMBER é amplamente utilizado para simulações com biomacromoléculas solvatadas, tendo melhor performance na parametrização desses tipos de moléculas. O campo de força AMBER é descrito pela equação abaixo:

$$E_{total} = E_{ligação} + E_{\theta} + E_{\omega} + E_{vdW} + E_{el} \quad (\text{Equação 2}).$$

$E_{total}$  é a energia total do sistema, os três primeiros termos da equação se referem as interações ligantes, onde a  $E_{ligação}$  é a energia associada a variação do comprimento da ligação,  $E_{\theta}$  é a energia da variação dos ângulos de ligação,  $E_{\omega}$  é a energia associada a torsão dos ângulos diedros, os dois últimos termos fazem referência as interações não ligantes, cujo  $E_{vdW}$  é a energia associada a interação não ligante independente da carga,  $E_{el}$  é a energia associada a interações não ligantes devido as cargas atômicas.

a) **Energia de ligação:** pode ser descrita pela Lei de Hook (Potencial harmônico), o qual, portanto, trata a ligação como uma mola:

$$E_{ligação} = \frac{1}{2} K_{ligação} (j - j_{equilíbrio})^2 \quad (\text{Equação 3}).$$

Onde,  $K_{ligação}$  é a constante de força para os átomos envolvidos na ligação,  $j_{equilíbrio}$  é o comprimento de ligação no ponto de equilíbrio e  $j$  o comprimento de ligação num instante qualquer. Esta equação é uma aproximação do **potencial de Morse**:

$$E(r) = D_e (1 - e^{-a(r - r_e)})^2 \quad (\text{Equação 4}).$$

Aqui  $r$  é a distância entre os átomos,  $r_e$  é a distância de ligação de equilíbrio,  $D_e$  é a profundidade do poço (definida em relação aos átomos dissociados), e  $a$  controla a "largura" do potencial (quanto menor  $a$ , maior o poço);

b) **Energia angular:** pode ser igualmente descrita pela lei de Hook:

$$E_o = \frac{1}{2} V_o (\theta - \theta_{\text{equilíbrio}})^2 \quad (\text{Equação 5}),$$

Onde,  $V_o$  é a constante de força para os átomos envolvidos na ligação,  $\theta_{\text{equilíbrio}}$  é o ângulo de ligação no ponto de equilíbrio e  $\theta$  o ângulo de ligação num instante qualquer;

c) **Energia de torção dos ângulos diedros:** é a variação de energia inerente à **rotação de uma ligação química** entre os átomos **B-C** ( $E_\omega$ ), onde **B** e **C** estão ligados a outros átomos, formando desse modo um ângulo diedro entre os planos **ABC** (**A** está ligado a **B**) e **BCD** (**D** está ligado a **C**). Habitualmente, a energia associada à torção do ângulo diedro varia de forma sinusoidal com este

$$E_\omega = \frac{1}{2} \sum k_{\text{diedros}} (1 + \cos(n\omega - \gamma)) \quad (\text{Equação 6}).$$

Onde  $\omega$  corresponde ao ângulo de torção,  $k_{\text{diedros}}$  à barreira energética para que a rotação ocorra;  $n$  a número de mínimos da função (multiplicidade) e  $\gamma$  o ângulo de torção mínimo.

A energia associada a diedros impróprios é dada pela equação:

$$E_\omega = \frac{1}{2} \sum k_{\text{diedros}} (1 - \cos 2\omega) \quad (\text{Equação 7}).$$

Onde  $\omega$  (neste caso) corresponde ao ângulo não coplanar aos três ângulos planares;

d) **Energia de Van der Waals:** energia associada às interações atrativas e repulsivas não ligantes e independentes da carga dos átomos. Esta energia tende para zero quando a distância entre os átomos aumenta, e aumenta consideravelmente quando diminuimos a distância, embora exista atração a uma certa distância, devido a polarização das nuvens eletrônicas (mudança dos *spins*). Pode ser descrita de potencial de **Lennard-Jones**.

$$E_{VdW(i,j)} = 4 \epsilon_{ij} [(\sigma_{ij}/r_{ij})^{12} - (\sigma_{ij}/r_{ij})^6] \quad (\text{Equação 8}).$$

Onde **i** e **j** representam um par de átomos;  $\epsilon_{ij}$  o mínimo de energia da função (normalmente obtido por ajuste de propriedades experimentais);  $r_{ij}$  a distância entre os átomos **i** e **j**;  $\sigma_{ij}$  a distância entre os átomos onde a energia é mínima;  $4 \epsilon_{ij} [(\sigma_{ij}/r_{ij})^{12}]$  corresponde a força repulsiva e  $- 4 \epsilon_{ij} [(\sigma_{ij}/r_{ij})^6]$  a força atrativa.

e) **Energia Eletrostática:** é calculada com base na **lei de Coulomb**, corresponde energia das interações não ligantes do tipo Coulômbica, caracterizada pelas cargas dos átomos ou por dipolos permanentes:

$$E_{el(i,j)} = q_i q_j / 4\pi\epsilon r_{ij} \quad (\text{Equação 9}).$$

Onde  $i$  e  $j$  representam um par de átomos;  $\epsilon$  a constante dielétrica do meio;  $r_{ij}$  a distância entre os dois átomos,  $q_i$  e  $q_j$  as cargas dos átomos.

A mecânica molecular, neste caso usando o campo de forças AMBER, permite calcular a energia do sistema em cada ponto no tempo ( $E_{total}$ ), logo, força aplicada em cada átomo em cada instante pode ser calculada através da derivada da energia calculada pela mecânica molecular ( $E_{total}$ ) em cada posição de cada átomo:

$$-(dE_{total}/dr) = F(r) \quad (\text{Equação 10}).$$

Como se trata da mecânica newtoniana, as velocidades podem ser obtidas através da aplicação da 2ª Lei de Newton, cuja será obtida a aceleração de cada átomo:

$$a(t_0) = dF(t_0)/m \quad (\text{Equação 11}).$$

Dessa forma, tornou-se é possível determinar a posição de cada átomo no instante  $t_0 + \Delta t$ :

$$r(t_0 + \Delta t) = r(t_0) + v_0(t_0) + 1/2a(t_0)\Delta t^2 \quad (\text{Equação 12}).$$

Bem como suas respectivas velocidades:

$$v(t_0 + \Delta t) = v_0(t_0) + a(t_0)\Delta t \quad (\text{Equação 13}).$$

Estes cálculos são repetidos para cada microestado. A duração de cada microestado,  $\Delta t$ , é suficientemente pequena para que a força se mantenha praticamente constante durante esse intervalo de tempo. Dessa maneira, as trajetórias obtidas serão tão mais exatas quanto menor for o intervalo de tempo  $\Delta t$ .

#### 4.2.1 Minimização

Antes da simulação de Dinâmica Molecular (DM), é essencial minimizar, ou seja, relaxar o sistema a fim de diminuir as tensões e também as sobreposições de resíduos. Isto se torna indispensável visto que na etapa de preparação da proteína no servidor PDB2PQR foram adicionados Hidrogênios aos resíduos, assim como foi adicionado solvente (água) e contra íons no aplicativo LEaP, então este sistema pode não corresponder aos mínimos reais no campo de força AMBER.

Assim, de posse dos arquivos de topologia (\*.prmtop) e os de coordenada (\*.crd) foi usado o SANDER (*Simulated Annealing with NMR-Derived Energy Restraints*) para executar os comandos de minimização. Esta etapa foi estratificada em dois ciclos de três minimizações. A primeira etapa consistiu na minimização das moléculas de água do sistema em 500 ciclos

totais, sendo 250 pelo *steepest descent*, com raio de corte de 9 Å para as interações não ligadas. A segunda etapa tem como propósito o relaxamento dos H do sistema com os mesmos parâmetros da primeira etapa. Na terceira etapa foi a vez de minimizar todo o sistema com ciclos totalizando 5000 sendo que destes 3000 foram pelo *steepest descent* e 2000 pelo gradiente conjugado, permanecendo o mesmo raio de corte para as interações não ligadas. As etapas 4, 5 e 6 são a repetição das etapas 1, 2 e 3, respectivamente.

#### 4.2.2 *Aquecimento e equilíbrio*

Uma vez terminada a etapa de minimização, os arquivos gerados serão submetidos também ao SANDER para iniciar a etapa de aquecimento do sistema até que este chegue nas condições ambiente (em torno de 300 K). Assim como a minimização, a aquecimento também é realizada por etapas. Para se ter a produção de dinâmica é indispensável que esta seja feita em temperatura e pressão constante, com o intento de mimetizar as condições biológicas ou mesmo as condições laboratoriais. Contudo estas etapas são curtas demais (25 ps) para fornecer informações precisas a respeito da pressão do sistema, por este motivo estas serão realizadas a volume constante.

O aquecimento do sistema foi feito de forma gradual (50-100, 100-150, 150-200, 200-250 e 250-300 K), o ajuste da energia cinética em cada etapa foi calculado usando o reescalonamento da velocidade conforme a distribuição de Maxwell-Boltzmann.

Em seguida, após o término do aquecimento, foram retiradas todas as restrições do sistema e finalmente deixar o sistema a pressão constante para executar uma ligeira produção de dinâmica durante 250 ps a 300 K. Todas as etapas de aquecimento e equilíbrio foram realizadas com raio de corte para interações não ligadas de 10 Å.

#### 4.2.3 *Produção de Dinâmica Molecular*

Depois da fase de equilíbrio do sistema foram removidas as restrições artificiais, permitindo assim que o sistema se mova livremente no solvente. O controle de temperatura (ntt = 3) foi mantido. Um passo de tempo de 2 fs também é necessário para evitar uma grande variação de temperatura. Além disso, foi executado 100 ns de DM, em intervalos de 5 ns (5.000.000 de passos), salvando-se as coordenadas para o arquivo de trajetória a cada 500 passos.

#### 4.2.4 Energia Livre e espontaneidade do sistema

Foram realizados cálculos de energia Livre para avaliação da espontaneidade da interação ligante-receptor durante a simulação de DM, o método utilizado foi de MM/GBSA (do inglês *Molecular Mechanics of Generalized Born Surface Area*) no AMBER14 (CASE et al., 2014; HOU et al., 2011). Para este cálculo de energia livre foram usadas as equações:

$$\Delta G_{\text{ligação}} = G_{\text{complexo}} - (G_{\text{receptor}} + G_{\text{ligante}}) \quad (\text{Equação 14}),$$

$$\Delta G_{\text{ligação}} = \Delta H - T\Delta S \approx \Delta E_{\text{vácuo}} + \Delta G_{\text{solvatado}} - T\Delta S \quad (\text{Equação 15}),$$

$$\Delta E_{\text{vácuo}} = \Delta E_{\text{eletrostática}} + \Delta E_{\text{vdW}} \quad (\text{Equação 16}),$$

$$\Delta G_{\text{solvatado}} = \Delta G_{\text{polar}} + \Delta G_{\text{npolar}} \quad (\text{Equação 17}),$$

onde o  $\Delta G_{\text{ligação}}$  é a energia livre de ligação total entre o ligante e o receptor, e  $G_{\text{complexo}}$ , é a energia do complexo,  $G_{\text{receptor}}$  é a energia do receptor e  $G_{\text{ligante}}$  é a do ligante. A energia livre de ligação é dividida em vários termos: a entalpia ( $\Delta E_{\text{vácuo}}$ ) que corresponde a soma da energia eletrostática ( $\Delta E_{\text{eletrostática}}$ ) e Van der Waals ( $\Delta E_{\text{vdW}}$ ). O outro termo é a energia livre de solvatação ( $\Delta G_{\text{solvatado}}$ ) que corresponde aos termos de energia polar ( $\Delta G_{\text{polar}}$ ) e a não polar ( $\Delta G_{\text{npolar}}$ ), e a entropia ( $T\Delta S$ ) que é a contribuição das mudanças conformacionais para a energia livre de ligação e espontaneidade do sistema.

Após, o cálculo da energia total do sistema, foi realizado cálculos de decomposição por resíduo. Este cálculo, por sua vez, contribui para quantificar as interações de cada resíduo da proteína com o ligante, o que é muito útil para determinar que aminoácidos interajam mais com o ligante. Também foi aplicado o método de MM/GBSA usando o protocolo de decomposição padrão no AMBER 14 (CASE et al., 2014).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Docking Molecular

O Molegro Virtual *Docker* (MVD) é um software de acoplamento molecular que busca conformações através da combinação de algoritmos de evolução diferencial e de predição de cavidade. A avaliação das poses geradas foi realizada de acordo com o *MolDock score* (Tabela 1) e as ligações de hidrogênio que tais poses realizavam com aminoácidos

importantes para a inibição da InhA., como o resíduo de PHE149, ILE194, LYS164, THR196, PHE41, por exemplo.

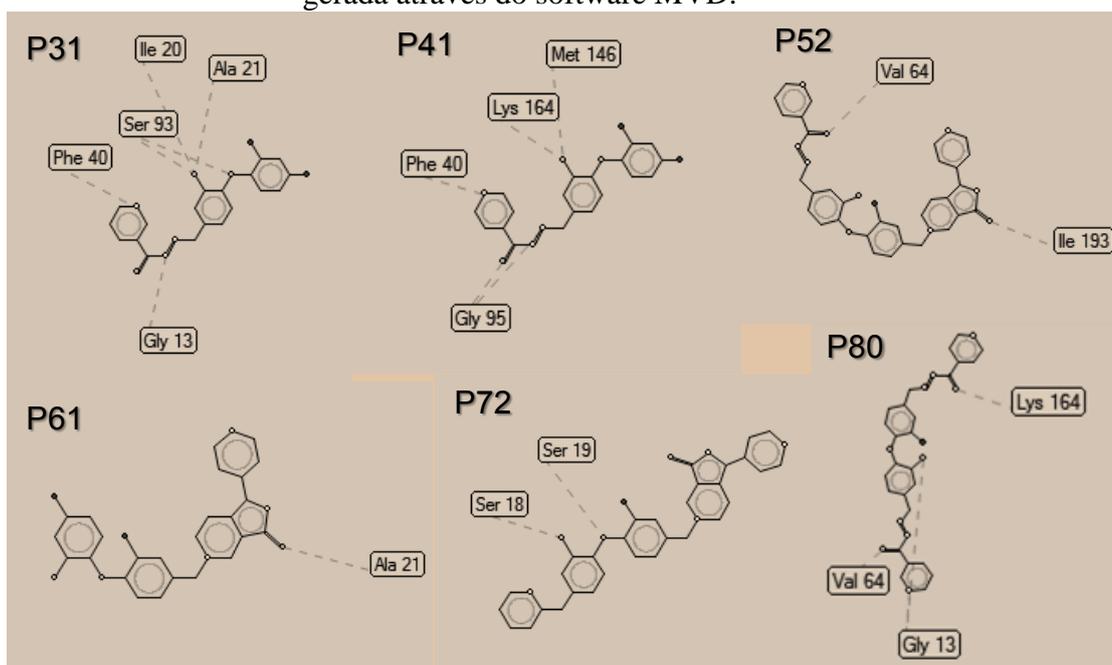
Tabela 1 – Scores de energia obtidas para cada ligante derivado do triclosano suas respectivas poses.

Ligante	<i>MolDock</i> Score (kJ/mol)	Torsões	Ligante	<i>MolDoc</i> k Score (kJ/mol)	Torsões	Ligante	<i>MolDoc</i> k Score (kJ/mol)	Torsões
P30	-136,338	5	P50	-190,550	8	P70	-167,814	7
P31	-130,556	5	P51	-176,239	8	P71	-166,106	7
P32	-129,804	5	P52	-167,452	8	P72	-152,071	7
P33	-125,130	5	P53	-161,405	8	P73	-144,161	7
P34	-124,615	5	P54	-159,055	8	P74	-142,474	7
P40	-133,473	5	P60	-142,923	5	P80	-165,703	8
P41	-130,280	5	P61	-139,344	5	P81	-162,925	8
P42	-129,453	5	P62	-138,924	5	P82	-161,197	8
P43	-126,282	5	P63	-135,067	5	P83	-159,467	8
P44	-122,655	5	P64	-134,336	5	P84	-150,013	8

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

A Figura 11 mostra as ligações de hidrogênios realizadas pelas poses escolhidas de cada ligante com aminoácidos importantes para a inibição da InhA.

Figura 11 – Visualização das Ligações de hidrogênio das poses escolhidas para a DM gerada através do software MVD.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

## 5.2 Simulação de dinâmica molecular

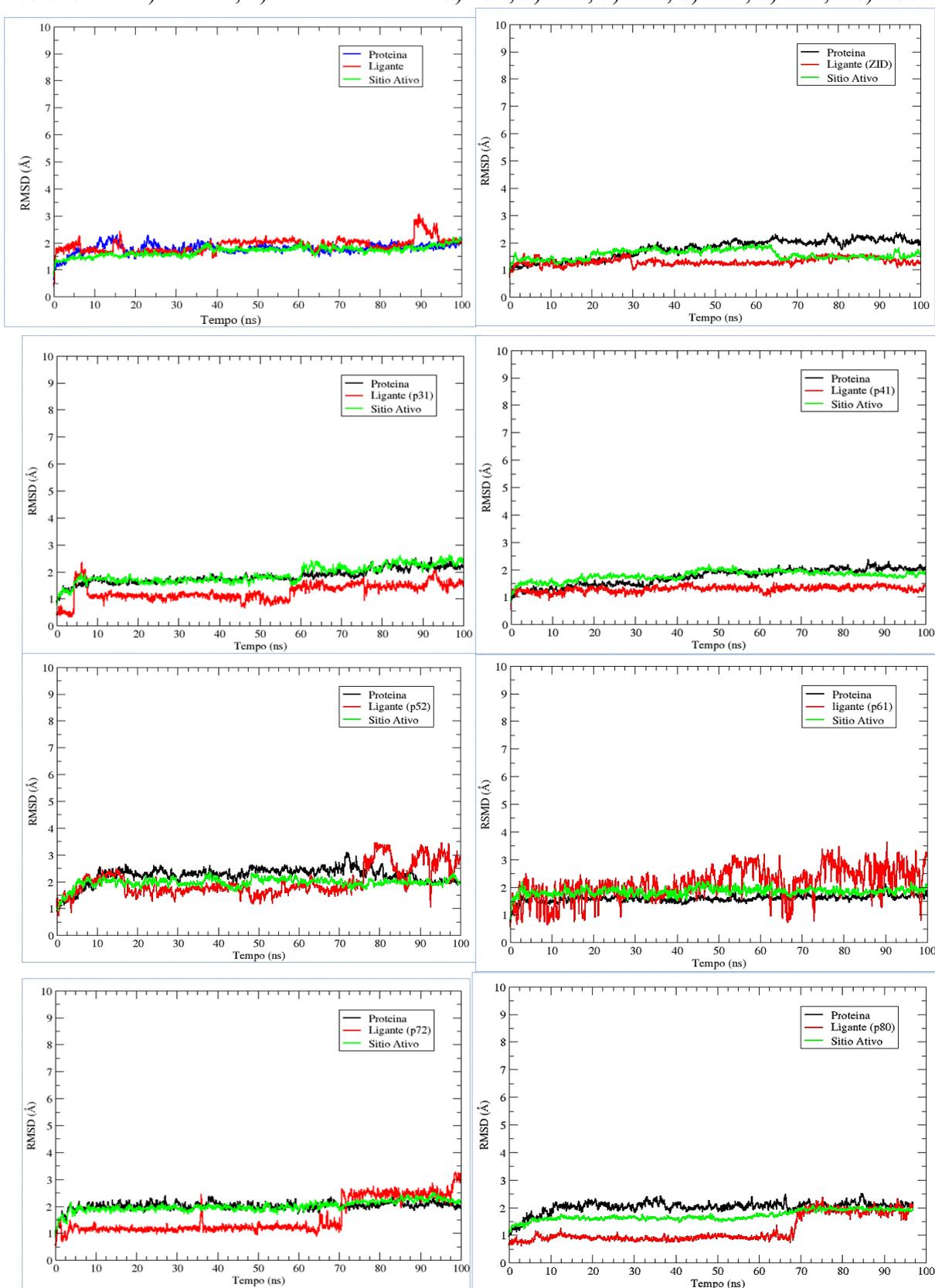
### 5.2.1 RMSD das simulações de dinâmica molecular dos ligantes.

A enzima InhA é o alvo principal para desenvolvimento de fármacos que inibam a síntese de ácidos micólicos da parede celular micobacteriana. Diferentes alvos foram propostos como potenciais inibidores dessa importante enzima do ciclo de síntese de micolatos (ANDRADE et al., 2008; FREUNDLICH et al., 2009; HE; ALIAN; MONTELLANO, 2007). As simulações de DM dos 8 sistemas avaliados neste estudo (NADH; INNADH “ZID”; P31; P41; P52; P61; P72; P80) foram realizados com a mesma cristalografia da Enoil-ACP redutase, a qual foi extraída do PDB 4TRO (CHOLLET et al., 2015a).

Após as simulações foi obtido o RMSD (*Root Mean Square Deviation*) de cada sistema para avaliar a variação em angstroms das trajetórias do complexo enzima-ligante e estão ilustrados a seguir na Figura 12. Vale ressaltar que não houve variações significativas de temperatura e pressão durante todas as simulações. Além disso, a enzima e o seu sítio ativo permaneceram estáveis durante toda a trajetória das simulações de todos os ligantes avaliados aqui, mesmo a InhA tendo elasticidade implícita a sua estrutura como relatado em outros trabalhos (COHEN, 2010; DIAS et al., 2007; SCHROEDER, 2004).

No sistema InhA-NADH (figura 12.1) é possível observar que o sistema alcança o platô por volta de 10 ns (1000 *frames*). Em se tratando do ligante, assim como a proteína, este teve também pequenas variações na trajetória. Quanto à forma ativada do fármaco isoniazida (INNADH ou ZID), pode-se observar a estabilidade no decorrer de toda a dinâmica molecular, ilustrada na figura 12.2.

Figura 12 - Gráfico de RMSD da trajetória dos complexos proteína-ligante deste estudo. Em 1) NADH; 2) INNADH 'ZID' 3) P31; 3) P41; 5) P52; 6) P61; 7) P72; e 8) P80.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

No que diz respeito ao comportamento dos derivados do triclosano (TCL) avaliados neste estudo (quadro 1), os resultados foram diversos entre si de acordo com a simulação de DM. O primeiro composto químico avaliado foi o de codinome P31, cujo na simulação de dinâmica molecular demonstrou estabilidade em sua trajetória e o platô do RMSD da DM foi atingido em aproximadamente 10 ns de simulação (figura 12.3). Assim como o ligante, a enzima e a cavidade de interação permaneceram estáveis. De maneira semelhante o ligante P41 se comportou (figura 12.4), inclusive estes ligantes são isômeros de posição, onde a diferença reside na porção hidrazona que do P31 é uma nicotinamida e no P41 é uma isonicotinamida. Na figura 12.5 pode-se observar que durante a simulação de DM o ligante P52 apresentou comportamento com variações maiores que os ligantes P31 e P41, durante a dinâmica molecular, os últimos 30 ns foi onde mais ocorreu essa variação. Neste momento da simulação a porção R2 do P52 (quadro 1) estava projetada para parte que compreende os resíduos de PHE41 e 97. Quanto ao ligante P61 o gráfico de RMSD mostrou muitas variações no decorrer de toda a trajetória, ainda que a enzima e o seu sítio tenham apresentado menor variação no RMSD (figura 12.6). Como a diferença entre o P52 e o P61 é somente o R1 (quadro 1), pode-se presumir que o fragmento R2 não se mostra favorável para interação no sítio da Enoil-ACP redutase. Um processo muito semelhante ao que ocorreu com P52, ocorreu com P61, entretanto, este último foi expurgado de dentro do sítio da enzima.

Para o ligante P72 o substituinte R1 foi o mesmo do ligante do PDB 3FNE de autoria de Freundlich et. al (2009). O RMSD da trajetória se mostrou estável até aproximadamente 70 ns de simulação onde neste momento houve um salto no RMSD (figura 12.7). Entretanto a proteína permaneceu igualmente ao sítio ativo estável durante a simulação.

O último ligante avaliado nesta pesquisa, P80, surgiu através da substituição do R2 do ligante P31 pela hidrazona de isonicotinamida (R1 de P41). Essa substituição tornou o ligante mais apto a ocupar toda a cavidade que naturalmente é ocupada pelo NADH. Como os resultados de P41 e P31 que são ligantes menores e tiveram resultado satisfatório, todavia não ocupavam a cavidade por completo. Durante a evolução da DM até 65 ns o P80 se manteve estável, e pouco antes de chegar aos 70 ns houve um pequeno salto no RMSD do ligante e novamente se manteve estável até o final da DM, como mostra a figura 12.8.

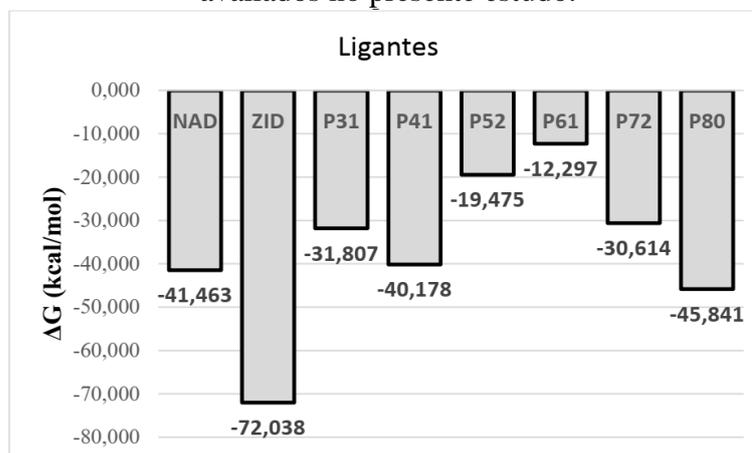
### 5.2.2 *Energia Livre e espontaneidade dos Sistemas*

A presença do ligante na cavidade de uma proteína, por si só, não garante que as interações havidas ali contribuirão ou não para a sua permanência no sítio. Para isso, é

necessário avaliar a espontaneidade do sistema e esta medida é realizada através da equação de Energia Livre de Gibbs. Assim sendo, foram comparados os valores de energia do cofator NADH, do inibidor INNADH e seis ligantes propostos neste trabalho (figura 13).

Ao compararmos as energias fica evidente que o sistema com o inibidor INNADH é o que apresenta menor valor de energia, portanto o sistema é o mais espontâneo, seguido em ordem decrescente de valores absolutos P80, NADH, P41, P31, P72, P52, P61. É importante frisar que o sistema com P80 demonstrou menor energia total (média de -45,841 kcal/mol) quando comparado ao cofator natural, NADH (-41,463 kcal/mol), o que, portanto, torna o P80 um bom candidato a inibidor da Enoil-ACP redutase do *Mycobacterium tuberculosis*, visto que ele pode competir com o NADH pelo sítio de ligação da proteína segundo estes dados. A energia do ligante P41 (-40,178 kcal/mol) é aproximadamente a mesma energia apresentada pelo sistema do NADH, isto o torna também um potencial candidato a inibidor da síntese de ácidos micólicos do bacilo de Koch. Em relação ao P31 (-31,807 kcal/mol) e P72 (média de -30,614 kcal/mol) energias superiores à do NADH. E finalmente, P52 (média de -19,475 kcal/mol) e P61 (média de -12,297 kcal/mol) os quais apresentaram os maiores valores de energia livre, o qual deve estar associado à saída desses ligantes do sítio ativo da proteína.

Figura 13 – Gráfico de energia livre obtido pelo método MMGBSA dos ligantes avaliados no presente estudo.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Além das de fornecer as posições dos átomos, ligantes, resíduos é possível extrair informações a respeito das energias envolvidas nas interações entre o ligante e todos os resíduos da proteína. A energia de interação por resíduo ou decomposição por resíduo permite analisar o comportamento energético dos aminoácidos da proteína e suas modificações conformacionais e nos permite também avaliar a espontaneidade dessas contribuições. A tabela 2 deixa mais clara o padrão da decomposição por resíduo e a intensidade dessas

interações ocorridas em cada sistema. Nela foram mostrados os principais resíduos que interagem com o NADH e INNADH e comparados também que ligantes apresentam as interações com os mesmos resíduos da InhA e as energias associadas a elas.

Dessa forma, é possível observar que o P80, P41 e P31 mostram um perfil energético muito semelhante ao do NADH, a diferença mais importante é a baixa interação que o P80, P41 e P31 tem com o resíduo de SER20, este é um dos resíduos que interagem com o Pirofosfato do NADH e do INNADH. Outro destaque é a interação entre PHE149 e o NADH (-0,329 kcal/mol), que apresenta valor maior que o calculado para os ligantes P80 (-0,727 kcal/mol), P31 (-0,380 kcal/mol), igualmente para P41 (-1,847 kcal/mol), embora, neste último, sejam valores bem menores de energia de ligação se comparado ao NADH. Entretanto, como já esperado, O INNADH (-2,874 kcal/mol) demonstrou o menor valor entre os ligantes para a interação com a PHE149.

Outros resíduos importantes do sítio da InhA são importantes também para a permanência do NADH e INNADH na enzima. A PHE41, localizada na região sul do sítio da InhA, apresentou energia espontânea na interação do tipo EC- $\pi$  com o ligante INNADH (-3,101 kcal/mol) assim como o P31 (-2,065 kcal/mol), P52 (-1,998 kcal/mol), P80 (-1,463 kcal/mol), NADH (-1,256 kcal/mol), em contraste aos anteriores, o P41 (-1,998 kcal/mol) fez uma LH com a PHE41. Por outro lado, a PHE97 mostrou maior afinidade com o P72 (-6,374 kcal/mol), seguido de P80 (-3,294 kcal/mol), NADH (-2,918 kcal/mol), entretanto com o INNADH (-0,790 kcal/mol) os valores foram maiores. Com relação a GLY96, outro importante resíduo de ancoragem do sítio da InhA, demonstrou energia de interação mais favorável ao P80 (-2,777 kcal/mol), depois o P41 (-2,028 kcal/mol) e INNADH (-1,638 kcal/mol) e P31 (-1,337 kcal/mol).

A região central do sítio da InhA, que é a região que naturalmente interage com o pirofosfato do NADH e INNADH possui aminoácidos importantes que contribuem para a permanência do ligante no sítio da enzima. A SER20 apresentou energia de interação mais intensa para o NADH (-10,121 kcal/mol), embora tenha mostrado bons valores para o INNADH (-4,771 kcal/mol). Ademais, a SER20 não mostrou energia significativa de interação com os ligantes restantes. O resíduo ILE21 também interagiu com o NADH (-4,712 kcal/mol) e INNADH (-2,186 kcal/mol) interagiu também com o P31 (-1,539 kcal/mol) e P41 (-1,792 kcal/mol). O resíduo SER94, o qual está relacionado como um dos mecanismos de resistência a INNADH através da mutação que resulte na troca da SER94 por outro aminoácido (ROZWARSKI, 1998), demonstrou bons valores de espontaneidade para as interações com INNADH (-2,835 kcal/mol), P41 (-1,529 kcal/mol) e NADH (-1,029 kcal/mol), e para o P80

(-0,494 kcal/mol), neste caso, este resultado pode representar algo favorável a este ligante, visto que a SER94 não tem grande contribuição para a permanência do P80 no sítio da InhA. Além desses resíduos citados acima, a THR196 também mostrou energia interação com INNADH (-2,965 kcal/mol), P80 (-1,429 kcal/mol) e NADH (-1,296 kcal/mol), desempenhando papel importante para ancoragem de ligantes no sítio da InhA (PARIKH et al., 1999; ROZWARSKI, 1998).

Tabela 2 – Descrição de decomposição por resíduos dos principais resíduos de todos os ligantes (kcal/mol). Em *dégradé* vermelho estão ilustradas interações espontâneas. Em *dégradé* verde interações de energia positiva. Em ordem crescente de valores absolutos.

AA*	Nº	NADH	INNADH	P31	P41	P52	P61	P72	P80
GLY	14	-0,699	-0,859	-0,916	-0,476	-0,262	0,004	0,038	-0,449
ILE	15	-1,049	-0,152	-0,187	-0,179	-0,217	0,003	0,015	-0,089
ILE	16	-3,382	-1,180	-0,902	-1,142	-1,611	-0,008	-1,036	-1,268
SER	19	-0,981	0,029	0,031	0,022	0,034	0,001	0,002	0,047
SER	20	-10,121	-4,771	-0,463	0,031	-0,062	0,011	-0,019	0,035
ILE	21	-4,712	-2,186	-1,539	-1,792	-0,095	0,001	-0,227	-0,705
ALA	22	-0,317	-0,079	-0,622	-0,110	0,020	0,002	0,022	-0,048
PHE	41	-1,256	-3,101	-2,065	-0,675	-1,998	0,002	-0,184	-1,463
ASP	42	0,112	0,003	-0,124	0,022	-0,238	-0,013	-0,094	-0,295
LEU	63	-0,407	-0,424	-0,047	-0,031	-0,388	0,001	0,019	-0,075
ASP	64	0,038	-1,119	0,037	0,014	-0,524	-0,008	-0,024	0,031
VAL	65	-1,198	-1,431	-0,061	-0,614	-1,016	0,002	0,006	-0,287
SER	94	-0,330	-2,835	-1,028	-1,529	0,068	0,013	0,057	-0,494
ILE	95	-2,677	-3,788	-3,184	-3,115	-1,854	0,005	-0,302	-2,477
GLY	96	-1,638	-2,010	-1,337	-2,028	-0,260	0,008	-0,518	-2,777
PHE	97	-2,918	-0,790	-1,072	-0,322	-2,207	-0,812	-6,374	-3,294
MET	98	-0,019	-0,026	-0,005	-0,026	-0,087	-0,871	-0,839	-0,528
ILE	122	-1,079	-1,217	-0,908	-0,197	-0,925	0,005	-0,256	-1,114
MET	147	-1,500	-1,173	-1,370	-1,365	-0,008	0,000	-0,451	-1,574
ASH	148	-0,314	-0,731	-0,387	-0,301	0,006	0,006	-0,023	-0,338
PHE	149	-0,329	-2,874	-0,380	-1,847	-0,024	-0,003	-0,222	-0,727
TYR	158	-0,055	-1,517	-0,043	-0,077	-0,088	-0,074	-0,195	-0,160
MET	161	-0,665	-0,360	-0,135	-0,853	-0,192	-0,135	-1,277	-0,884
LYS	165	2,677	-1,442	0,397	0,450	0,275	0,063	-0,504	1,258
ALA	191	-0,602	-0,508	-0,126	-0,434	0,002	0,001	-0,011	-0,340
PRO	193	-0,352	-1,341	-0,041	-0,164	0,007	0,004	-0,035	-0,773
ILE	194	-0,826	-2,377	-0,252	-0,855	0,005	-0,001	-0,269	-1,663
THR	196	-1,296	-2,965	-0,428	-0,034	-0,453	-0,008	-0,454	-1,429
LEU	197	-0,352	-2,668	-0,256	-1,592	-0,758	-0,325	-2,222	-1,707
ALA	198	-0,173	-2,512	-0,048	-1,020	-0,765	-0,270	-1,855	-0,694

\*: Aminoácido.

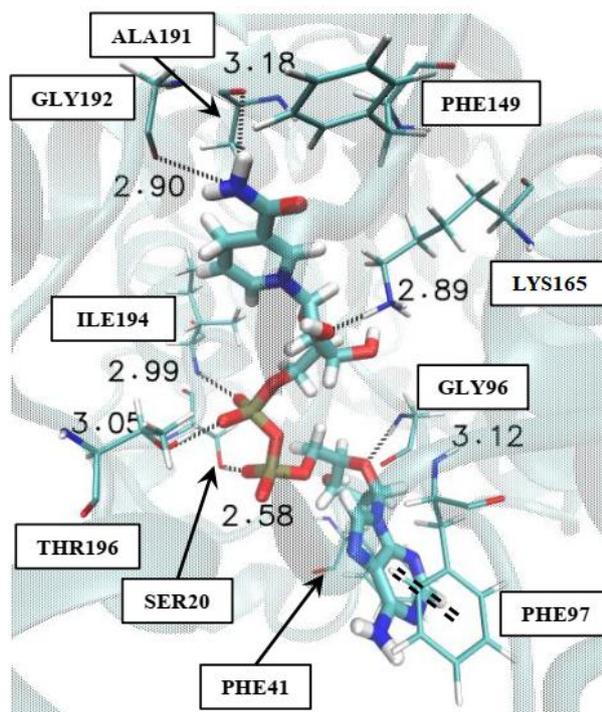
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

A região ao norte da cavidade ativa da InhA que contem os resíduos que interajam com as porções nicotinamidas do NADH e INNADH. O mais importante deles é a PHE149 já descrito acima. No entanto, outros aminoácidos têm participação importante no processo de inibição da InhA. Um deles é TYR158 que exibiu afinidade com o INNADH apenas (-1,517 kcal/mol) para o restante os valores de energia de ligação foram maiores. Vale ressaltar que a TYR158 está envolvida no processo de alongamento de cadeia em conjunto com a PHE149 (PARIKH et al., 1999; ROZWARSKI, 1998). Outro aminoácido é a ILE194 o qual apresentou valores de energia favorável à interação com o INNADH (-2,377 kcal/mol) e também com o P80 (-1,663 kcal/mol). Não teve energia de interação significativa para os demais ligantes.

### 5.2.3 Principais interações entre os resíduos da InhA e os ligantes

Para análise das ligações intermoleculares do NADH foi usado o *frame* correspondente ao 8500 (85 ns), onde foi verificada as distâncias das ligações de hidrogênio (LH) além das energias envolvidas nas interações intermoleculares. No instante 85 ns da trajetória da DM, os resíduos que fazem ligação de hidrogênio com o NADH foram SER20 (2,58 Å; -10,121 kcal/mol), ILE21(2,99 Å; -4,712 kcal/mol) e THR196 (3,05 Å; -1,296 kcal/mol) na porção pirofosfato do NADH; LYS165 (2,89 Å; 2,677 kcal/mol) na -OH da ribose ligada a nicotinamida (RN) e ALA191 (3,18 Å; -0,602 kcal/mol), GLY192 (2,90 Å; -0,459 kcal/mol), na carboxamida da nicotinamida; e GLY96 (3,12 Å; -1,638 kcal/mol) na porção adenina ribose do cofator (AR). Além das ligações de hidrogênio clássicas, outros tipos de ligação foram identificados entre o NADH e a enzima, como o empilhamento de cargas  $\pi$  ( $\pi$ -stacking) que foram realizados pelos resíduos de PHE41 (-1,256 kcal/mol) e PHE97 (-2,918 kcal/mol) que ocorrem na porção da adenina, os quais são importantes para a ancoragem do cofator no seu respectivo sítio de ação (Figura 14). Esse achado corrobora com resultados de cristalografia de outros trabalhos (CHOLLET et al., 2015a; DIAS et al., 2007; ROZWARSKI, 1998).

Figura 14 – Visualização das principais interações (em Å) entre os resíduos do sítio ativo e o NADH. A linha dupla tracejada ao sul da imagem representa o empilhamento de cargas  $\pi$  face-a-face deslocada. As linhas simples tracejadas representam as LH. Os valores destacados se referem a distância entre os átomos da LH.

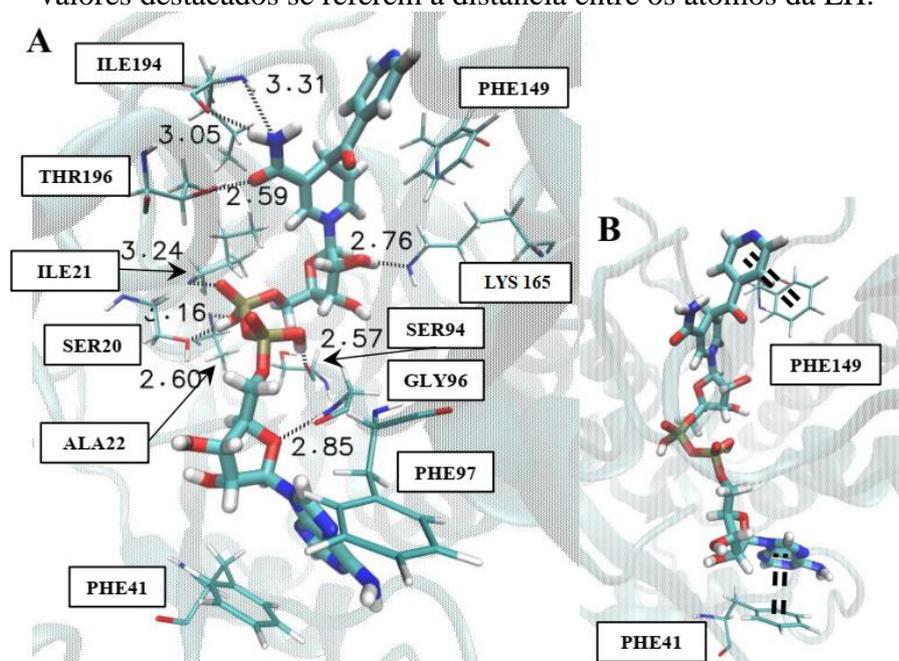


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Além de fornecer as posições dos átomos, ligantes, resíduos é possível extrair informações a respeito das energias envolvidas nas interações entre o ligante e todos os resíduos da proteína. Adiante, é possível observar na figura 15 as interações que o aduto INNADH realiza com a enzima InhA no *frame* 8500 da trajetória da DM. Dentre essas interações ocorreram ligações de hidrogênio entre os resíduos LYS165 (2,76 Å; -1,442 kcal/mol), ILE194 (3,05 Å; -2,377 kcal/mol), THR196 (2,59 Å; -2,965 kcal/mol) e a porção isonicotinoilnicotinamida-ribose (INR), dos quais a ILE194 e THR196 se conectaram ao fragmento amida da nicotinamida e a lisina ao oxigênio 4 da ribose. É importante frisar que a LYS165 demonstrou energia favorável à interação com o INNADH e P72 apenas, ao contrário do que ocorreu no NADH e demais ligantes. LH também ocorreu com os aminoácidos SER20 (2,60 Å; -1,180 kcal/mol), ILE21 (3,24 Å; -2,186 kcal/mol), ALA22 (3,16 Å; -0,079 kcal/mol), SER94 (2,57 Å; -2,835 kcal/mol) na porção pirofosfato do aduto. Vale ressaltar que estas interações são responsáveis pela flexibilidade do cofator dentro da cavidade da proteína (SCHROEDER et al., 2005). Além dessas interações, ainda houve outras duas LH na região AR, VAL65 (3,18 Å; -1,431 kcal/mol) no N4 da adenina e GLY96 (2,85 Å; -2,010 kcal/mol) no O1 da ribose. Estes perfis de interações concordam com resultados

apresentados por outros estudos (DIAS et al., 2007; PARIKH et al., 1999; ROZWARSKI, 1998; SCHROEDER et al., 2005).

Figura 15 – Visualização das principais interações (em Å) entre os resíduos do sítio ativo e o aduto INNADH. As linhas duplas tracejadas da imagem B representam o empilhamento de cargas. As linhas simples tracejadas (imagem A) representam as LH. Os valores destacados se referem a distância entre os átomos da LH.

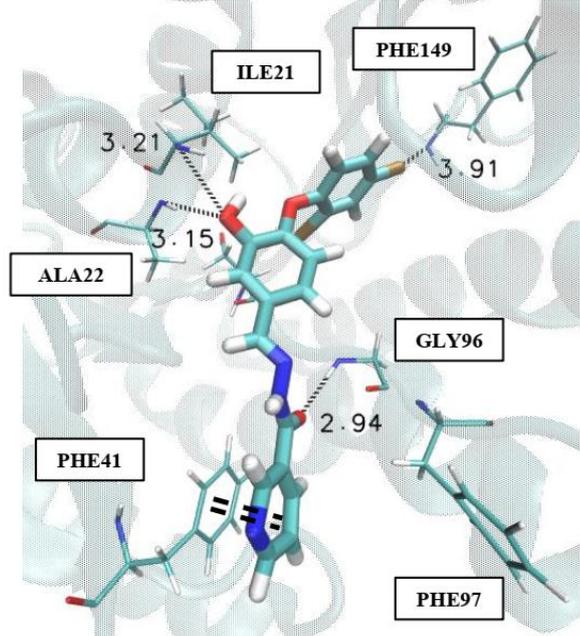


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Em relação aos derivados de triclosanos avaliados neste estudo, foi possível observar que o farmacóforo bis-fenil éter triclorado tem boa afinidade com o sítio da enzima como já mencionado em diversos estudos (FREUNDLICH et al., 2009; LEVY et al., 1999; MASSENGO-TIASSÉ; CRONAN, 2009; MCMURRY; MCDERMOTT; LEVY, 1999; MORE et al., 2014; PAN; TONGE, 2012; PARIKH; XIAO; TONGE, 2000; STEWART et al., 1999; WARD et al., 1999). Ao avaliar a foto do *frame* 8000, foi possível observar as interações do complexo P31-InhA, onde os resíduos de ILE21 (3,21 Å; -1,539 kcal/mol) e ALA22 (3,15 Å; -0,622 kcal/mol) fizeram LH com a hidroxila do fenol, esta porção do sítio da enzima é a mesma que interagem com a porção pirofosfato do NADH e INADH, esta mesma é responsável por lhes ancorar e lhes dar flexibilidade dentro do sítio da enzima, então, arcabouço HO-Ar-O- acabar por se comportar de forma semelhante ao pirofosfato do cofator natural da Enoil-ACP redutase. Ademais, o aminoácido GLY96 fez uma LH com a porção nicotinamida do substituinte nicotinoil hidrazona (NH) de 2,94 Å (-1,337 kcal/mol). Além disso, pode-se notar a presença de empilhamento de cargas  $\pi$  (EC- $\pi$ ) entre o resíduo

PHE41 e a nicotinamida do ligante (Figura 16), que por sua vez é semelhante ao ocorrido no NADH e INNADH, onde este mesmo aminoácido realiza essa interação na adenina (Figura 14).

Figura 16 – imagem do complexo P31-InhA no *frame* 8000. As linhas simples pontilhadas mostram as LH. A linha dupla pontilhada destaca o EC- $\pi$ . Os numerais são as distâncias entre os átomos em angstrom (Å).

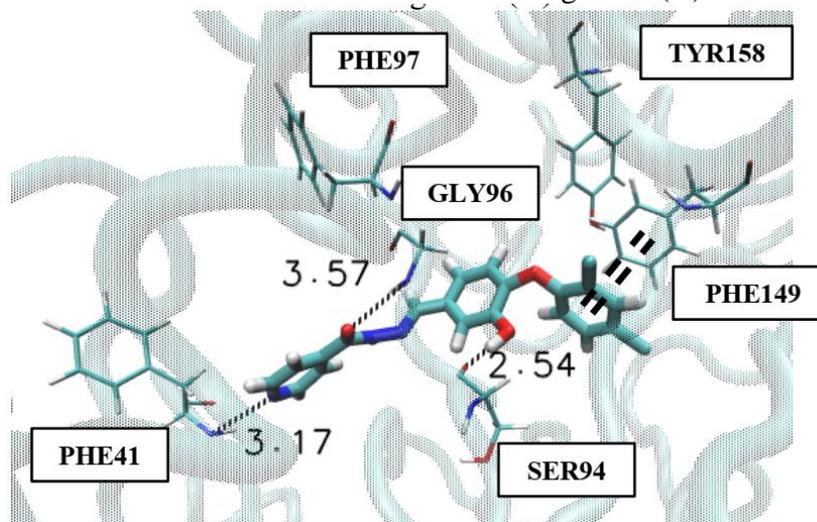


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Quando visualizada as interações no *frame* 8500 da DM do P41, é possível constatar a presença de uma LH do resíduo SER94 (2,54 Å; -1,529 kcal/mol) com a -OH da porção fenólica, neste caso mais semelhante ao comportamento do INNADH (figura 15) que manifestou tal LH no pirofosfato, que equipara esta região do cofator ao arcabouço HO-Ar-O do triclosano. Diferente do P31, o P41 fez uma LH (-0,675 kcal/mol) com a PHE41 na região isonicotinoil hidrazona (IH), em contraste ao EC- $\pi$  do P31 e das regiões AR do NADH e INNADH. A porção diclorobenzeno, desta vez foi capaz de realizar o EC- $\pi$  (-1,847 kcal/mol) com o resíduo de PHE149, a qual é sabidamente a principal diferença estrutural encontrada na InhA inibida pelo INNADH em relação ao cofator NADH. Por este motivo, esta interação entre PHE149 e a Isonicotinamida do INNADH é apontada como responsável pelo efeito farmacológico da isoniazida (CHOLLET et al., 2015a; DIAS et al., 2007; ROZWARSKI, 1998), destacando a importância dessa interação no sucesso do efeito inibitório da InhA. Os ligantes que são capazes de interagir com a PHE149, semelhante a isoniazida, acabam se

tornando bons candidatos a inibidores da InhA (ANDRADE et al., 2008; PARIKH et al., 1999; ROZWARSKI, 1998).

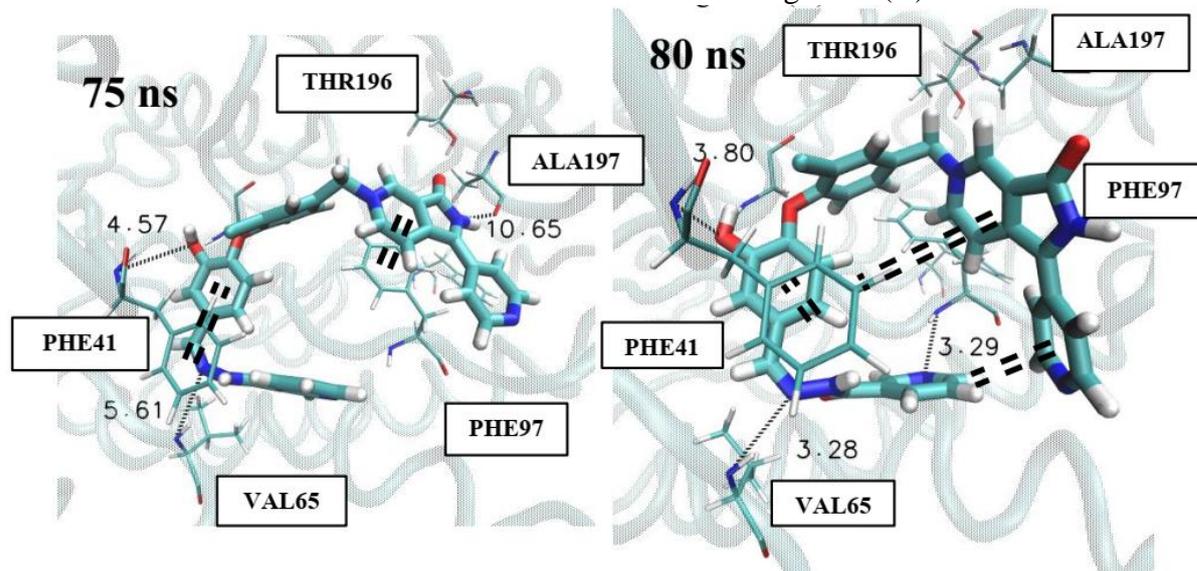
Figura 17 – Visualização de interações (em Å) entre P41-InhA. As linhas simples pontilhadas mostram as LH. A linha dupla pontilhada destaca o EC- $\pi$ . Os numerais são as distâncias entre os átomos em angstrom (Å).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Em contraste aos ligantes anteriores, o P52 não fez interações no bolsão onde se encontram os aminoácidos PHE149, TYR158, ILE194, conforme mostrado na figura 18. O choque estérico entre o ligante e os resíduos como PHE149, TYR158 e MET199, entre outros, talvez esteja relacionado aos motivos que levaram o P52 a ser direcionado a região ao sul do sítio pelos resíduos de VAL65, PHE41 e 97 do sítio da enzima. Este comportamento foi anteriormente relatado entre ligantes volumosos e as cadeias laterais dos resíduos de PHE149, TYR158 e MET199 (FREUNDLICH et al., 2009; SULLIVAN et al., 2006). No instante 75 ns o ligante assume uma forma de “U”, que explica a variação no RMSD (figura 12.5), nesse momento também havia apenas duas LH, uma entre a PHE41 e a hidroxila do fenol e outra LH entre a VAL65 e o nitrogênio ligado a amida do R1 do ligante P52 (3.28 Å). A PHE41 fez um EC- $\pi$  com o fenol e a PHE97 fez uma LH com o R2 (figura 18). Entretanto, aos 80 ns a PHE41 realizou outro empilhamento de cargas, mas agora um empilhamento do tipo T com a porção R2 do P52. A nicotinamida do R1 do P52 também fez empilhamento de cargas do tipo “T” com a isonicotinamida do R2, montando o que se assemelha a uma “rede de cargas  $\pi$ ”.

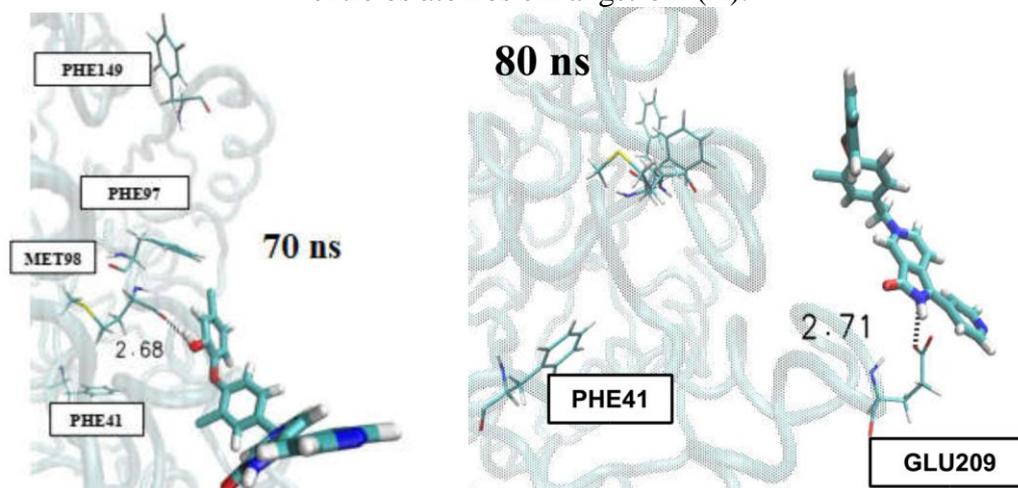
Figura 18 – visualização das interações do sistema P52-InhA em 75 e 80 ns. As linhas simples pontilhadas mostram as LH. A linha dupla pontilhada destaca o EC- $\pi$ . Os numerais são as distâncias entre os átomos em angstrom (Å).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Na figura 19 mostra o ligante P61, aos 70 ns de DM, realizava uma LH com o aminoácido MET98 (2,68 Å; -0,871 kcal/mol) na hidroxila. Este resíduo se localiza na parte mais externa ao sítio ativo. A parte que contém o substituinte do triclosano está voltada para fora do sítio e interagindo com poucos resíduos da vizinhança. Em seguida, aos 80 ns de dinâmica, o ligante faz apenas um LH com o resíduo GLU209 que está mais externo ainda ao sítio do que o resíduo MET98.

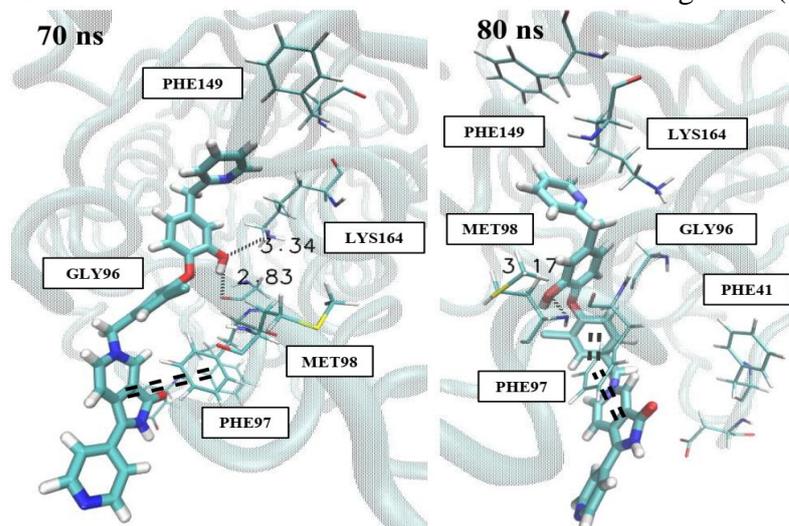
Figura 19 - Visualização da estrutura do sistema P61-InhA, nos instantes 70 ns e 80 ns da trajetória. As linhas simples pontilhadas mostram as LH. Os numerais são as distâncias entre os átomos em angstrom (Å).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

As interações realizadas pelo P72 foram avaliadas em dois momentos da DM, *frame* 7000 (70ns) e 8000 (80ns). No primeiro instante é possível perceber duas LH com os resíduos GLY96 (2,83 Å; -0,518 kcal/mol) e LYS165 (3,34 Å; -0,504 kcal/mol), ambos na OH do fenol. Entretanto, no segundo momento, 80 ns, já não há LH entre a enzima e o P72, mas em ambos os momentos a porção R2 do ligante faz empilhamento de cargas  $\pi$  face a face deslocada (EFFD) com a PHE97 (-6,374 kcal/mol), numa região semelhante ao observado no NADH e INNADH, embora tenha mostrado intensidade maior entre todos os ligantes avaliados aqui.

Figura 20 – Visualização da estrutura tridimensional do sistema P72-InhA em 70 ns e 80 ns. As linhas simples pontilhadas mostram as LH. A linha dupla pontilhada destaca o EC- $\pi$ . Os numerais são as distâncias entre os átomos em angstrom (Å).

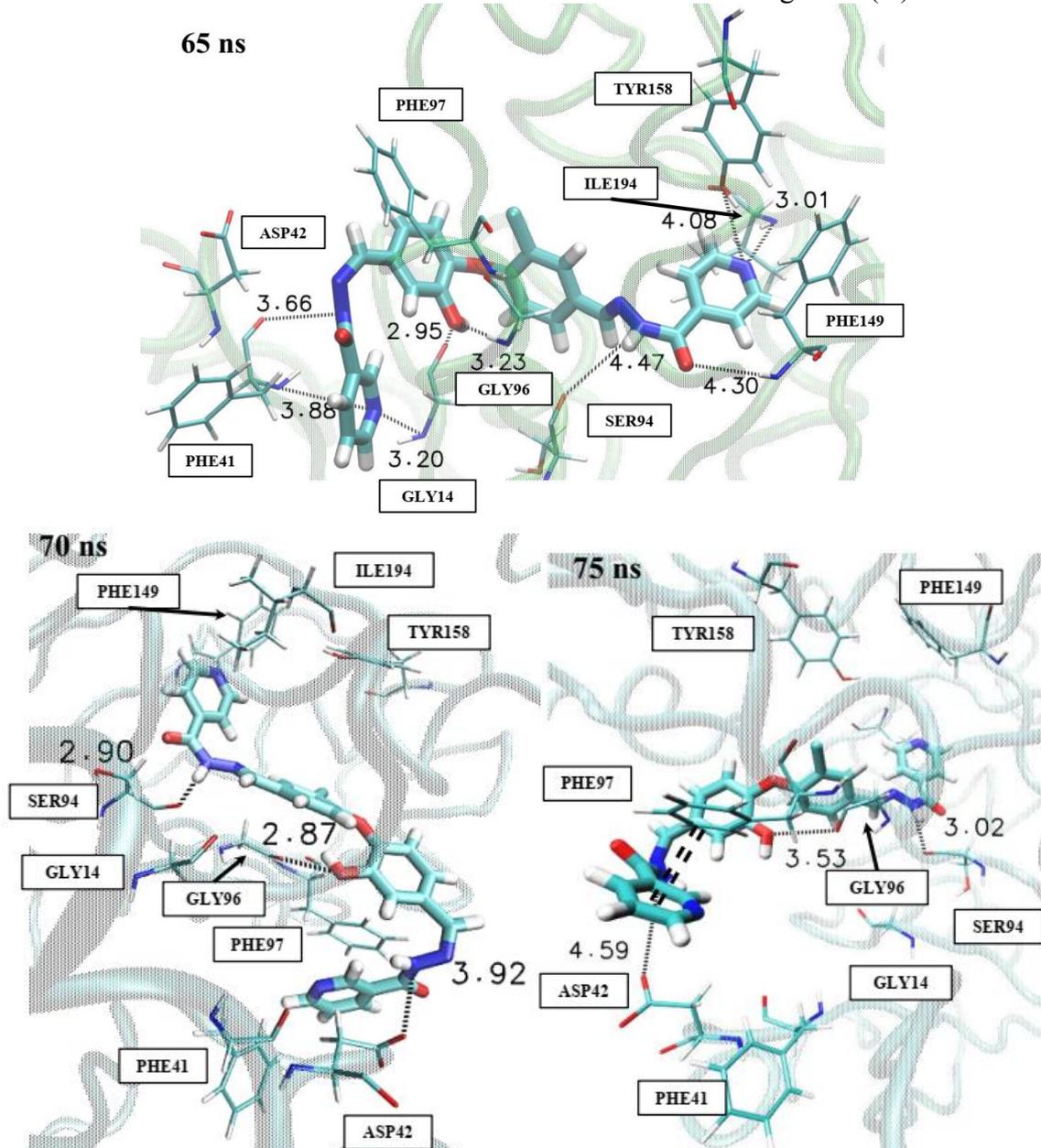


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Para o ligante P80 foram avaliadas imagens nos instantes 65 ns, 70 ns e 75 ns. As interações realizadas pelo P80 estão ilustradas na figura 21. Os resíduos da região inferior do sítio da InhA que realizaram LH com o P80 foram PHE41 (3,88 Å; -1,463 kcal/mol), o resíduo de ASP42 fez LH com o P80 (3,92Å '70ns') e Gly14 (3,20 Å; -0,449 kcal/mol), contudo estes resíduos se tiveram breve afastamento do P80. Ainda nesta região o foi possível observar o resíduo de PHE97 formando o EC- $\pi$  (-3,294 kcal/mol) com o anel A do farmacóforo do triclosano. Na região central do sítio da InhA, também houve formação de L. O aminoácido GLY14 também fez LH com a -OH do anel A de P80. A Gly96 assim como no pirofosfato do NADH e INNADH, fez LH na -OH do anel A. Na região superior do Sítio da InhA foi observada a LH entre o resíduo de SER94 e a hidrazona de P80 (3,02 Å; -0,494 kcal/mol). Da mesma forma, O resíduo de ILE194 fez uma LH com P80 (4,08 Å; -1,663 kcal/mol). Ainda naquela região, a TYR158 faz LH com a isonicotinamida. Vale ressaltar que

este aminoácido possui papel importante para o mecanismo de alongamento de cadeia lipídica desempenhado pela InhA (PARIKH et al., 1999).

Figura 21 – Visualização da tridimensional do sistema P80-InhA nos instantes 65, 70 e 75 ns. As linhas simples pontilhadas mostram as LH. A linha dupla pontilhada destaca o EC- $\pi$ . Os numerais são as distâncias entre os átomos em angstrom (Å).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Na porção adenina do NADH e INNADH permaneceram os empilhamentos de carga  $\pi$  com as PHE41 e 97, os quais são importantes para a permanência destes ligantes no sítio da InhA (CHOLLET et al., 2015b, 2015a; ROZWARSKI, 1998). Este perfil foi acompanhado pelos ligantes P80, P31 e P72. O ligante P41 também interagiu com a PHE41, mas através de

uma LH no nitrogênio do anel benzênico, além da LH realizada com ASP42 com o -NH- da hidrazona da nicotinamida. Voltando ao NADH e INNADH e abordando a ribose da adenina, o aminoácido que interagiu com essa região foi a GLY96 através de uma LH, que igualmente interagiu com a carbonila (-C=O) de P31 e P41. Entretanto, quando interagindo com o P80, o aminoácido GLY96 fez a LH com a Hidroxila do fenol contribuindo para o ancoramento do P80 no sítio ativo.

Na porção pirofosfato do NADH e INNADH os resíduos que tem maior contribuição para fixação na cavidade são SER20 e ILE21. Esses resíduos têm papel importante também na flexibilidade desses ligantes no sítio, visto a alta polaridade do grupo pirofosfato que interage facilmente com resíduos dessa região do sítio. No P31 a SER20 dá espaço para a ALA22 realizar a LH com a OH do fenol da mesma forma que a ILE21 também interage. No P41, esta função desempenhada pelos aminoácidos SER20 e ILE21 ficou a cargo da SER94 junto a OH do P41, cuja está relacionada a interações com o pirofosfato no INNADH (Figura 15). Outro fato interessante é o aparecimento de uma LH de THR196 na porção pirofosfato do NADH. Já no P80 a SER94 fez a LH com a hidrazona da isonicotinamida (-NH-) na porção superior do sítio.

Na última porção dos ligantes ocorreram LH importantes para a atividade farmacológica. Na Ribose de nicotinamida do NADH e na mesma região do INNADH a LYS165 realizou ligação de hidrogênio com a OH3 da ribose. Os ligantes P31, P41 e P80 não tiveram essa LH coma LYS165, apenas o P72 mostrou essa LH. Este aminoácido é relatado como importante para a estabilização de intermediários gerados pela redução dos precursores dos ácidos micólicos (PARIKH et al., 1999; STEWART et al., 1999; WARD et al., 1999). Ainda nesta região do sítio, os resíduos de ILE194 e THR196, realizam Ligação de hidrogênio a carboxamida do INNADH, alternativamente os resíduos de ALA191 e Gly192 realizaram as LH com a carboxamida do NADH. O P31 nessa região realizou apenas uma LH com a PHE149 através do 4-Cl do ligante. O P41 por outro lado realizou o EC- $\pi$  com a PHE149 semelhante ao que ocorre com o INNADH, inclusive apresentou perfil de energia equiparável. Como já mencionado este resíduo é um componente chave para a inibição da síntese de ácidos micólicos da parede celular micobacteriana. Quanto ao P72 não foi possível perceber esse empilhamento de cargas. Para o P80 a energia calculada para o PHE149 mostra que as energias são favoráveis para interação.

Apesar da baixa potência do triclosano frente as cepas de *M. tuberculosis*, este fármaco tem comprovada especificidade de inibição de Enoil-ACP redutase de várias bactérias (FabI, InhA) (KANA et al., 2014; SCHWEIZER, 2001; WARD et al., 1999). Muitos

estudos têm avaliado derivados do triclosano, porém muitos deles com ligantes pequenos e que sua ação está atrelada ao NADH dentro do sítio ativo. O efeito farmacológico do triclosano é tempo dependente (SULLIVAN et al., 2006), todavia, os derivados de triclosanos podem ser dezenas de vezes mais potentes que o triclosano, para isso deve ocorrer uma substituição no R1 (quadro 1) por substituintes arilas (FREUNDLICH et al., 2009; STEC et al., 2014), semelhante ao ocorrido neste estudo. Outro ponto importante é sua toxicidade baixa que inclusive permite ao triclosano ser usado como conservante em vários produtos de higiene utilizados há vários anos no nosso dia-a-dia (BHARGAVA; LEONARD, 1996).

## 6 CONCLUSÃO

Tendo em vista o mecanismo de inibição da Enoil-ACP Redutase do *M. tuberculosis* e a dependência de ativação da Isoniazida pela KatG na formação do aduto INNADH para que este iniba a InhA, além dos crescentes casos de resistência a isoniazida pela inativação da KatG, todos os esforços para o planejamento de novos fármacos que fugam desse mecanismo de resistência são necessários para ajudar no combate à tuberculose. Para os ligantes propostos neste trabalho, foi possível observar suas interações com resíduos sabidamente importantes para permanência no sítio. Nesse contexto, os resultados da DM dos ligantes P80, P41 demonstraram melhor comportamento no sítio da enzima entre ligantes avaliados. No que se refere a energia livre, P80 teve valores melhores que NADH, cofator natural da InhA, o P31 e P72 obtiveram valores intermediários, por outro lado P52 e P61 não demonstraram através da dinâmica molecular bom comportamento segundo os parâmetros desse estudo. Em relação as interações com os resíduos do sítio ativo da InhA realizadas durante a DM, os ligantes P80, P41 e P31 mostraram perfil semelhante aos perfis do NADH e do fármaco de referência INNADH. O mesmo pode ser dito quando avaliadas energias de decomposição por resíduos dos ligantes avaliados aqui. E, finalmente, este trabalho visou observar e propor ligantes derivados do triclosano capazes de promover a inibição da InhA.

## 7 REFERÊNCIAS

ALTAMIRANO, M; MAROSTENMAKI, J; WONG, A et al. Mutations in the catalase-peroxidase gene from isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. **J Infect Dis.** 1994; 169: 1162–5.

ANDRADE, C. H. et al. Abordagem racional no planejamento de novos tuberculostáticos: inibidores da InhA, enoil-ACP redutase do *M. tuberculosis*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 167–179, jun. 2008.

BERTRAND, T.; EADY, N. A. J.; JONES, J. N. et al. Crystal Structure of *Mycobacterium tuberculosis* Catalase-Peroxidase. **The Journal of Biological Chemistry**. Vol. 279, No. 37, pp. 38991–38999, 2004.

BHARGAVA, H. N.; LEONARD, P. A. Triclosan: applications and safety. **American journal of infection control**, v. 24, n. 3, p. 209–18, jun. 1996.

CARVALHO, I.; PUPO, M. T.; BORGES A. D. L.; BERNARDES, L. S. C. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Quím. Nova**, v. 26(3), 2003.

CASE, D. A. et al. **AMBER 14**. San Francisco. University of California, 2014.

CASE, D. A. et al. The Amber biomolecular simulation programs. **J. Computat. Chem.**, 2005.

CATTOIR, V. Identification moléculaire des mycobactéries et détection de la résistance aux antibiotiques. **Ann Biol Clin**. 2004, 62 : 405-13.

CHAMBERS, H. F. **Inibidores da síntese de proteínas e agentes antibacterianos diversos**. IN: GOODMAN & GILMAN. As bases farmacológicas da terapêutica. 11ª edição, editora Mc Graw Hill e Artmed, 2010, cap 46, 1844 p.

CHOLLET, A. et al. Crystal structure of the enoil-ACP reductase of *Mycobacterium tuberculosis* (InhA) in the apo-form and in complex with the active metabolite of isoniazid pre-formed by a biomimetic approach. **Journal of Structural Biology**, v. 190, n. 3, p. 328–337, 2015.

CLASSEN, D. C.; PESTOTNIK, S. L.; EVANS, R. S.; BURKE, J. P. Computerized surveillance of adverse drug events in hospitalized patients. **Journal of the American Medical Association**, 266:2847-2851, 1991.

COHEN, E. M. L. **Um estudo do efeito da flexibilidade explícita da enzima InhA de isoniazida-pentacionoferrato II**. [s.l.] Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2010.

COHEN, T.; BECERRA, M. C; MURRAY, M. B. Isoniazid resistance and the future of drug-resistant tuberculosis. *Microb Drug Resist.* 2004, 10(4):280-285.

DELANO, W. L. **The PyMOL Molecular Graphics System.** DeLano Scientific, San Carlos, SA, 2002.

DIAS, M. V. B. et al. Crystallographic studies on the binding of isonicotiny-NAD adduct to wild-type and isoniazid resistant 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Structural Biology**, v. 159, n. 3, p. 369–380, 2007.

DOLINSKY, T. et al. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup, execution, and analysis of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations *Nucleic Acids Research*, 2004.

EUZÉBY, J. P. **List of Bacterial names with Standing in Nomenclature.** Société de Bactériologie Systématique et Vétérinaire – France. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr>>. Acesso em: 13 Mai 2016.

FRATTI, R. A.; CHUA, J.; VERGNE, I.; DERETIC, V. *Mycobacterium tuberculosis* glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. **Proc Natl Acad Sci USA.** 100: 5437–5442, 2003.

FREUNDLICH, J. S. et al. Triclosan derivatives: Towards potent inhibitors of drug-sensitive and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Chem Med Chem**, v. 4, n. 2, p. 241–248, 2009.

FRISCH, M. J. et al. **Gaussian 03**, Revision B.04. Gaussian, Inc., Pittsburgh PA., 2003.

GODIM, J. R. A avaliação ética da investigação científica de novas drogas: A importância da caracterização adequada das fases da pesquisa. **Rev HCPA**, 27(1), 2007.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D. Modelagem molecular de fármacos. **Revista Processos químicos**, v. 4, p. 24-36, 2008.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. **Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas.** Estudos avançados 24 (70), 2010.

GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G. Structure-based drug design for tropical diseases. **Curr. Top. Med. Chem.**, v.9, n.9, p.824-43, 2009.

HARTKOORN, R. C.; SALA, S.; NERES, J.; POJER, F.; MAGNET, S.; MUKHERJEE, R.; UPLEKAR, S.; BOY-RÖTTGER, S.; ALTMANN, K. H.; COLE, S. T. Towards a new tuberculosis drug: pyridomycin – nature's isoniazid. **EMBO Mol Med.** 4(10): 1032–1042, 2012.

HE, X.; ALIAN, A.; MONTELLANO, P. R. O. DE. Inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl acyl carrier protein reductase InhA by arylamides. **Bioorganic Medicine Chemistry**, v. 29, n. 6, p. 6649–6658, 2007.

HEHRE, W. J.; RADOM, L.; SCHLEYER, P. V. R.; POPLE, J. A. *Ab Initio* Molecular Orbital Theory, **Wiley: New York**, 1986.

HERRERA-LEÓN, L; MOLINA, T; SAÍZ, P et al. New multiplex PCR for rapid detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. **Antimicrob Agents Chemother** 2005; 49:144–7.

HEYM, B; E. STAVROPOULOS, N. HONORÉ, P. et al. 1997. Effects of overexpression of the alkyl hydroperoxide reductase AhpC on the virulence and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.** 65:1395–1401.

HOU, T. et al. Assessing the Performance of the MM/PBSA and MM/GBSA Methods. 1. The Accuracy of Binding Free Energy Calculations Based on Molecular Dynamics Simulations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 1, p. 69–82, 24 jan. 2011.

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

JONES, R. D. et al. Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings. **American journal of infection control**, v. 28, n. 2, p. 184–96, abr. 2000.

KANA, B. D. et al. **Future target-based drug discovery for tuberculosis?** Tuberculosis (Edinburgh, Scotland), v. 94, n. 6, p. 551–6, dez. 2014.

KIM, N.W; PIATYSZEK, M.A.; PROWSE, K.R.; HARLEY, C.B; WEST, M.D.; HO, P.L.C.; COVIELLO, G.M.; WRIGHT, W.E.; WEINRICH, S.L.; SHAY, J.W. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. **Science (Wash DC)** v. 266, p. 2011–2015, 1994.

KONNO, K.; FELDMAN, F. M.; MCDERMOTT, W. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. **American Review of Respiratory Disease**. v 95, 461–9, 1967.

KUO, M. R. et al. Targeting Tuberculosis and Malaria through Inhibition of Enoyl Reductase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 23, p. 20851–20859, 6 jun. 2003.

LARSEN, M. H. et al. Overexpression of InhA, but not KasA, confers resistance to isoniazida and ethionamide in *Mycobacterium smegmatis*, *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis*. **Mol. Microbiol.**, v 46, 453-466, 2002.

LEVY, C. W. et al. Molecular basis of triclosan activity. **Nature**, v. 398, n. 6726, p. 383–4, 1 abr. 1999.

MCMURRY, L. M.; MCDERMOTT, P. F.; LEVY, S. B. Genetic evidence that InhA of *Mycobacterium smegmatis* is a target for triclosan. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 3, p. 711–3, mar. 1999.

MCMURRY, L. M.; OETHINGER, M.; LEVY, S. B. Triclosan targets lipid synthesis. **Nature**, v. 394, n. 6693, p. 531–2, 6 ago. 1998.

MIDDLEBROOK G. Isoniazid-resistance and catalase activity of tubercle bacilli. **Am Rev Tuberc.**; 69: 471–2, 1954.

MIDDLEBROOK G. Sterilization of tubercle bacilli by isonicotinic acid hydrazid and the incidence of variants resistant to the drug in vitro. **Am Rev Tuberc.** 65:765-7, 1952.

MILARDI, D.; PAPPALARDO, M. Molecular dynamics: New advances in drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 91, p. 1–3, 2015.

MUSSER, JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. **Clin Microbiol Rev.**, 8: 496-514, 1995.

MUSSER, JM; KAPUR, V; WILLIAMS, DL; KREISWIRTH, BN; van SOOLINGEN, D; van EMBDEN, JDA. Characterization of the catalase-peroxidase gene (*katG*) and *inhA* locus in isoniazid-resistant and -susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug resistance. **J. Infect. Dis.**;173:196–202, 1996.

PARIKH, S. et al. Roles of Tyrosine 158 and Lysine 165 in the Catalytic Mechanism of InhA, the Enoyl-ACP Reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. **Biochemistry**, v. 38, n. 41, p. 13623–13634, out. 1999.

PARIKH, S. L.; XIAO, G.; TONGE, P. J. Inhibition of InhA, the enoyl reductase from *Mycobacterium tuberculosis*, by triclosan and isoniazid. **Biochemistry**, v. 39, n. 26, p. 7645–50, 4 jul. 2000.

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**, Oxford, Oxford University Press, 2001.

PYM, AS; SAINT-JOANIS, B; COLE, ST. Effect of katG Mutations on the Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and the Implication for Transmission in Humans. **Infection and Immunity** 2002, 70:4955-4960.

ROSSETTI, MLR; VALIM, ARM; SILVA, MSN et al. Tuberculose resistente: revisão molecular Resistant tuberculosis: a molecular review. **Rev Saúde Pública** 36(4):525-32. 2002.

ROUSE, D. A.; DEVITO, J. Á.; LI, Z. et al. Site-directed mutagenesis of the katG gene of *Mycobacterium tuberculosis*: effects on catalase–peroxidase activities and isoniazid resistance. **Mol Microbiol.** 22:583–92, 1996.

ROUSE, D. A.; MORRIS, S. Molecular mechanisms of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. **Infect Immun.** 63:1427–1433, 1995.

ROZWARSKI, D. A. Modification of the NADH of the Isoniazid Target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 279, n. 5347, p. 98–102, 2 jan. 1998.

RUNYON, E.H. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. **Med Clin North Am.** 43:273-90, 1959.

SANT'ANNA, C. M. R. Glossário de Termos usados no Planejamento de Fármacos (RECOMENDAÇÕES DA IUPAC PARA 1997). *Quim. Nova*, vl. 25, No. 3, 505-512, 2002.

SCHROEDER, E. K. **Efeito das mutações I16T , I21V , I47T e S94A na afinidade da enzima 2- trans -Enoil-ACP ( CoA ) Redutase de *Mycobacterium tuberculosis* pelo cofator NADH : Estudos por simulação pela dinâmica molecular e docking molecular.** [s.l.] universidade federal do rio grande do sul, 2004.

SCHROEDER, E. K. et al. Drugs that inhibit Mycolic Acid Biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 3, p. 197–225, 2002.

SCHROEDER, E. K. et al. Molecular Dynamics Simulation Studies of the Wild-Type, I21V, and I16T Mutants of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Enoyl Reductase (InhA) in Complex with NADH: Toward the Understanding of NADH-InhA Different Affinities. **Biophysical Journal**, v. 89, p. 876–884, 2005.

SCHWEIZER, H. P. Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. **FEMS microbiology letters**, v. 202, n. 1, p. 1–7, 7 ago. 2001.

SCORPIO, A.; ZHANG, Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. **Nature Medicine**. v 2 , 662– 7, 1996.

SOBRVIME - SOCIEDADE BRASILEIRA DE VIGILÂNCIA DE MEDICAMENTOS AIS-LAC. **O que é uso racional de medicamentos**. São Paulo: SOBRVIME; 2001. p.13-67.

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, fev. 2006.

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, 1 jun. 2006.

TIMMINS, G. S. et al. Requirements for Nitric Oxide Generation from Isoniazid Activation In Vitro and Inhibition of Mycobacterial Respiration In Vivo Requirements for Nitric Oxide Generation from Isoniazid Activation In Vitro and Inhibition of Mycobacterial Respiration In Vivo. v. 48, n. 8, p. 3006–3009, 2004.

TIMMINS, G. S.; MASTER, S.; RUSNAK, F.; DERETIC, V. Nitric Oxide Generated from Isoniazid Activation by KatG: Source of Nitric Oxide and Activity against *Mycobacterium tuberculosis*. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**. Vol. 48, No. 8: p. 3006–3009. 2004.

VAN RIE, A; WARREN, R; MSHANGA, I et al. Analysis for a limited number of gene codons can predict drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in a high-incidence community. **J Clin Microbiol.** 39:636–41:10, 2000.

VIODÉ, C.; BETTACHE, N.; CENAS, N.; KRAUTH-SIEGEL, R. L.; CHAUVIÉRE, G.; BAKALARA, N.; PÉRIÉ, **J. Biochem. Pharm.**, v. 57, 549 p., 1998.

WANG, J.; HARRISON, C.; SCHULTEN, K; MCCAMMON, J. Implementation of accelerated molecular dynamics in NAMD. **Comp. Sci. Discov.** 4: 015002, 2011.

WARD, W. H. et al. Kinetic and structural characteristics of the inhibition of enoyl (acyl carrier protein) reductase by triclosan. **Biochemistry**, v. 38, n. 38, p. 12514–25, 21 set. 1999.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Rapid diagnostic test and shorter, cheaper treatment signal new hope for multidrug-resistant tuberculosis patients. Geneva, 12 de maio de 2016. Disponível em << <http://www.who.int/>>> acessado dia 14 mai 2016. WILLETT, P. **Similarity-based virtual screening using 2D fingerprints.** Drug Discov Today, v.11, p.1046-1053, 2006.

WISEMAN, B et al. Isonicotinic Acid Hydrazide (INH) Conversion to Isonicotinyl-NAD by Catalase-Peroxidases. **J Biol Chem.** 20;285(34):26662-73, 2010.

ZHANG, M et al. Detection of mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. **J Clin Microbiol.** 43: 5477–82, 2005.

ZHANG, Y.; PERMAR, S.; SUN, Z. Conditions that may affect the results of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. **Journal of Medical Microbiology.** v 51, 42–9, 2002.