



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA**

**ANDRÉ LACERDA BRAGA TELES**

**ESTUDO DO MECANISMO CATALÍTICO DA  
PIROFOSFORILASE DO FUNGO *MONILIOPHTHORA*  
*PERNICIOSA* POR MÉTODOS QM/MM**

Feira de Santana, BA  
2011

**ANDRÉ LACERDA BRAGA TELES**

**ESTUDO DO MECANISMO CATALÍTICO DA ENZIMA  
PIROFOSFORILASE DO FUNGO *MONILIOPHTHORA PERNICIOSA*  
POR DE MÉTODOS QM/MM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação  
em Biotecnologia UEFS/FIOCRUZ, como requisito  
parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Alex Gutterres Taranto

Feira de Santana, BA  
2011

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, não só por esse trabalho, mas por todas as dádivas que sempre me proporcionou, mais uma vez, muito obrigado.

A minha avó Maria e minha tia Vera, pelo amor e apoio. A Jéssica e a Filipe Teles, pelo carinho de irmãos. Ao meu pai Lélío pelo incentivo e carinho, também a sua esposa, a querida Adeildes.

Aos amigos do Laboratório de Modelagem Molecular, Prof. Msc. Manoelito Coelho, Rangel Leal, Renata Freitas e Ivonildo Almeida por todo o companheirismo e ajuda. Ao amigo Franco Henrique por todo o apoio e amizade.

Ao orientador professor Alex Gutterres pelo apoio na realização do trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia UEFS/FIOCRUZ-Ba pelos incentivos dados para a construção deste trabalho.

A Fundação de Amparo a Pesquisa da Bahia (FAPESB), pelos incentivos financeiros para o desenvolvimento deste trabalho.

## RESUMO

Em 1989 a cultura brasileira do cacau sofreu uma queda em sua produção, o que, em parte, pode ser explicada pelo surgimento e desenvolvimento do fungo *Moniliophthora perniciosa*, que é responsável por uma praga conhecida como vassoura-de-bruxa do cacau. Tal praga afeta as plantações de cacau levando a grandes danos sócio-econômicos e, devido a isto, o Brasil passou a importar esta matéria prima. Na busca por um controle efetivo da vassoura-de-bruxa, a rota metabólica que leva a síntese da quitina, principal constituinte da parede celular do fungo, foi analisada na perspectiva da seleção de um alvo potencial para a inibição da sua síntese. O alvo selecionado na rota metabólica foi a enzima pirofosforilase, a qual é a responsável em catalizar a reação de formação do intermediário UDP-N-acetilglicosamina. A inibição da formação de UDP-N-acetilglicosamina afetará a formação de quitina e, conseqüentemente, a síntese da parede celular, indispensável à sobrevivência do fungo. O presente trabalho consiste em um estudo do mecanismo da reação catalisada pela pirofosforilase do *M. perniciosa* para a formação da UDP-N-acetilglicosamina, através de métodos de química computacional. Foram empregados cálculos de dinâmica molecular (DM) e Mecânica Quântica/Mecânica Molecular (QM/MM) para desenvolver os estudos reacionais assumindo como mecanismo básico a substituição nucleofílica bimolecular ( $S_N2$ ). Uma estrutura de transição com um átomo de fósforo pentavalente foi elucidada, a qual realiza interações com os seguintes resíduos do sítio catalítico Gli-112, Gli-113, Arg-116, Lis-123 e Gli-225. Tais resíduos devem ser explorados para o planejamento racional de novos candidatos a inibidores da referida enzima. Foi realizado também um escaneamento da reação com a adição do cátion divalente  $Mg^{+2}$  baseando-se na literatura quanto à localização do ponto de inserção deste átomo no sistema. Esta simulação produziu uma estrutura intermediária com fosfato em caráter dissociativo, o escaneamento não demonstrou redução da energia de ativações o que como hipótese explicativa sugere-se um local inadequado para a adição do fosfato ou, em última análise, um mecanismo de catálise que não perpassa por  $S_N2$  na presença do cátion de magnésio.

**Palavras chaves:** *Moniliophthora perniciosa*, vassoura-de-bruxa, pirofosforilase, UDP-N-acetilglicosamina, QM/MM

## ABSTRACT

In 1989, the Brazilian cocoa yield suffered a breakdown, which can be explained, in part, by the rise and development of the *Moniliophthora perniciosa* fungus, which is responsible for a plague known as witch's broom. This plague affects the cocoa harvests leading to significant social and economic damages. In a search for the effective control of witch's broom, the metabolic chitin synthesis route was analysed in the search of a potential biological target to prevent its synthesis. Chitin is the main component of the fungus cellular wall. The selected target on the metabolic route is the pyrophosphorylase enzyme, which is responsible for catalyzing the reaction that forms UDP-N-acetylglucosamine-1-phosphate, one of the intermediates of the chitin synthesis route. Thus, the inhibition of this enzyme will affect the chitin production and, as a consequence, the cellular wall synthesis, vital to the fungus life. In the present work, realized by means of computational chemistry methods, the enzymatic reaction mechanism to the UDP-N-acetylglucosamine formation were studied. Molecular Dynamics and Quantum Mechanics/Molecular Mechanics (QM/MM) methods were used to develop the studies. The reaction mechanism assumed was a type 2 nucleophilic substitution (S<sub>N</sub>2). A transition structure with a pentavalent phosphorus atom was elucidated, this structure realizes interactions at the catalytic site with the residues Gly-112, 113, Arg-116, Lys-123 e Gly-225. This interaction must be explored for the rational design of new inhibitors candidates to the referred enzyme. A scan of the reaction with addition of a divalent metal Mg<sup>+2</sup> was also carried, the location of the metal insertion point in the system was obtained regarding the literature. This simulation produced a phosphate intermediate structure with a dissociative character, the scan showed no reduction in the activation energy of the reaction. As explanatory hypothesis it was suggested that the local described in the literature may be incorrect for the metal location point or, in a last analysis, a mechanism of catalysis that, in the presence of magnesium cation, do not have a S<sub>N</sub>2 path as the main mechanism.

**Key-words:** *Moniliophthora perniciosa*, witch's broom, pyrophosphorylase, UDP-N-acetylglucosamine, QM/MM

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Evolução da produção de cacau no Brasil até 2005. 12
- Figura 2** Alterações causadas nas folhas e nos frutos do cacauzeiro pela vassoura-de-bruxa; coluna da esquerda: planta saudável; coluna da direita: planta afetada pela doença. 13
- Figura 3** Segmento curto de quitina, homopolímero de unidades de N-acetil-D-glicosamina em ligação ( $\beta 1 \rightarrow 4$ ). 15
- Figura 4** Rotas de biosíntese da UDP-N-acetilglicosamina para procariotos e eucariotos. 17
- Figura 5** Reação de formação da UDP-N-acetilglicosamina via mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular –  $S_N2$ , sugerido por alguns autores. 17
- Figura 6** Diagrama de energia livre de reação hipotética com  $\Delta G^\circ$  negativa. 21
- Figura 7** Esquema para localização de estruturas de estado de transição em sistema enzimático movimentando apenas o núcleo enquanto mantendo o resto do ambiente congelado (A); e esquema micro-iterativo (B). 28
- Figura 8** Esquema do funcionamento do método ONIOM. A: representação de um sistema dividido em duas camadas (camada QM: em *ball & stick*; camada MM: em *wire*) B: representação gráfica da equação básica do método ONIOM. 29
- Figura 9** Esquema de escaneamento utilizado para o estudo das coordenadas de reação nos meios aquoso e enzimático. A: representação estrutural; B: representação tridimensional. 32
- Figura 10** Estado de transição via mecanismo  $S_N2$  adotado como mecanismo de ação da reação estudada. 34
- Figura 11** Perfil energético, em valores relativos, da reação em meio solvente: A – reagentes N-acetilglicosamina-1-fosfato + UTP, (0 kcal/mol) ; B – geometria do fosfato pentavalente, (19,28 kcal/mol); C – produto UDP-N-acetilglicosamina + pirofosfato inorgânico (3,56 kcal/mol). Energia de ativação  $\Delta G^\ddagger$  de 19,3 kcal/mol. 35
- Figura 12** Estrutura tridimensional do intermediário com o átomo de fósforo pentavalente (destaque) obtido para o escanemanto em meio solvente implícito. 36

- Figura 13** Alinhamento das sequências das pirofosforilases de *M. pernicioso* e *C. Albicans*. Em destaque os resíduos do sítio catalítico de ambas. 37
- Figura 14** A e B – diferentes representações da pirofosforilase de *M. pernicioso* evidenciando os choques da UDP-N-acetilglicosamina (amarelo) com os resíduos de Gln-304, Ala-110, Gli-111 (em vermelho) após a sobreposição com a estrutura cristalográfica da respectiva enzima de *C. Albicans*; C – posicionamento da N-acetilglicosamina-1-fosfato e UTP após otimização da UDP-N-acetilglicosamina. 38
- Figura 15** Esquema mostrando o local de separação da UDP-N-acetilglicosamina para o desenho das estruturas do UTP e N-acetilglicosamina-1-fosfato posicionadas no sítio ativo da pirofosforilase da *M. pernicioso*. 39
- Figura 16** Gráfico do desvio RMSD pelo tempo de simulação de aquecimento (100 ps): A – Complexo entre a pirofosforilase de *M. pernicioso*, UTP e N-acetilglicosamina-1-fosfato; B – somente a pirofosforilase. 40
- Figura 17** Gráfico da energia pelo tempo de simulação de aquecimento (100 ps): A – Complexo entre a pirofosforilase de *M. pernicioso* e os substratos UTP e N-acetilglicosamina-1-fosfato; B – somente a pirofosforilase. 41
- Figura 18** Esquema das principais interações intermoleculares que ocorreram entre o substrato N-acetilglicosamina-1-fosfato, a uridina-5'-trifosfato (UTP) e o sítio catalítico da pirofosforilase de *M. pernicioso* após a DM de aquecimento com duração de 100 picossegundos. 42
- Figura 19** Gráfico do desvio RMSD pelo tempo da simulação longa (1000ps): A – Complexo entre a pirofosforilase de *M. pernicioso* e UTP e N-acetilglicosamina-1-fosfato; B – somente a pirofosforilase. 43
- Figura 20** Gráfico da energia pelo tempo da simulação longa (1000 ps): A – Complexo entre a pirofosforilase de *M. pernicioso* e os substratos UTP e N-acetilglicosamina-1-fosfato; B – somente a pirofosforilase. 44
- Figura 21** Esquema das principais interações intermoleculares que ocorreram entre o substrato N-acetilglicosamina-1-fosfato, a uridina-5'-trifosfato (UTP) e o sítio catalítico da pirofosforilase de *M. pernicioso* após a DM com duração de 1 nanossegundo. 46
- Figura 22** Aspecto tridimensional das moléculas de N-acetilglicosamina-1-fosfato e UTP, ambas em vermelho, após a Dinâmica Molecular de 1 nanossegundo. Em amarelo, os resíduos de aminoácidos mais próximos a estas moléculas. 47

- Figura 23** A – Divisão das camadas no esquema ONIOM, na representação em *ball & stick* a camada com tratamento Mecânica Quântica (N-acetilglicosamina-1-fosfato e UTP), na representação em *wires*, a camada com tratamento molecular-mecânico (aminoácidos no raio de 5 Å de distância); B – detalhe do sentido da coordenada de reação estudada: aproximação do oxigênio da N-acetilglicosamina-1-fosfato sentido fósforo do fosfato  $\alpha$  do UTP. 48
- Figura 24** Correção do ângulo formado pelos átomos de oxigênio nucleofílico, fósforo e oxigênio do grupo de saída (átomos 1, 2 e 3 respectivamente, destacados em A, B, C e D) para o ataque nucleofílico: A – ângulo inicial de 98°; B – 127°; C – 148°; D – 172°. 49
- Figura 25** Mecanismos de substituição nucleofílica para fosfatos. A: associativo; B: adição-eliminação; C: Dissociativo. 50
- Figura 26** Aspecto tridimensional do ataque nucleofílico ao fosfato  $\alpha$  do UTP determinando a geometria pentavalente do átomo de fósforo (em destaque), mecanismo  $S_N2(P)$ . 51
- Figura 27** Esquema das interações entre a molécula com intermediário pentavalente e o sítio catalítico da pirofosforilase de *M. perniciososa*. 53
- Figura 28** Perfil energético, em energias relativas, da reação em meio enzimático: A – reagentes N-acetilglicosamina-1-fosfato + UTP, (0 Kcal/mol) ; B – geometria do fosfato pentavalente, (5,16 kcal/mol); C – produto UDP-N-acetilglicosamina + pirofosfato inorgânico (2,47 kcal/mol). 54
- Figura 29** Posicionamento do cátion  $Mg^{+2}$  para a realização do escaneamento das coordenadas de reação. 55
- Figura 30** Geometria da estrutura de maior energia obtida nos cálculos de escaneamento com adição do magnésio (em verde) no meio enzimático. [1], [2] e [3]: oxigênios com os quais o metal interage. Em destaque em amarelo a estrutura do fosfato planar intermediário. 55
- Figura 31** Esquema das interações entre a molécula com intermediário metafosfato, o cátion de magnésio e o sítio catalítico da pirofosforilase de *M. perniciososa*. 57
- Figura 32** Perfil energético, em energias relativas, da reação em meio enzimático com magnésio: A – reagentes N-acetilglicosamina-1-fosfato + UTP, (0 kcal/mol) ; B – geometria do fosfato pentavalente, (23,55 kcal/mol); C – produto UDP-N-acetilglicosamina + pirofosfato inorgânico (-81,01 kcal/mol). 57



## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	9
1.1	OBJETIVOS	11
1.1.1	<b>Objetivo Geral</b>	11
1.1.2	<b>Objetivos Específicos</b>	11
2	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	12
2.1	A VASSOURA-DE-BRUXA	12
2.2	O FUNGO <i>MONILIOPHTHORA PERNICIOSA</i>	14
2.3	A PAREDE CELULAR DOS FUNGOS	15
2.4	UDP-N-ACETILGLICOSAMINA PIROFOSFORILASE	16
3	<b>A QUÍMICA COMPUTACIONAL EM ESTUDOS DE REAÇÕES ENZIMÁTICAS</b>	20
3.1	TEORIA DO ESTADO DE TRANSIÇÃO	20
3.2	ABORDAGENS METODOLÓGICAS PARA ESTUDOS DE REAÇÕES ENZIMÁTICAS	22
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	31
4.1	PREPARAÇÃO DA ENZIMA	31
4.2	CÁLCULOS DE MECANISMO DE REAÇÃO	32
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	34
5.1	CÁLCULOS EM MEIO SOLVENTE	34
5.2	ACOPLAMENTO DO SUBSTRATO NA PIROFOSFORILASE DE <i>M. PERNICIOSA</i>	36
5.3	CÁLCULOS DE DINÂMICA MOLECULAR	38
5.4	CÁLCULOS DO MECANISMO DE REAÇÃO EM MEIO ENZIMÁTICO	47
6	<b>CONCLUSÃO</b>	59
	<b>REFERÊNCIAS</b>	61

## 1 INTRODUÇÃO

Em 1989 a cultura brasileira do cacau sofreu uma queda em sua produção, o que em parte pode ser explicado pelo surgimento e desenvolvimento do fungo *Moniliophthora perniciosa*, que é responsável pela praga conhecida como vassoura-de-bruxa do cacau (PEREIRA et al., 1990). Esta praga é responsável por danos que compreendem efeitos econômicos e sociais, além do impacto agrônomo imediato. Devido a isto o Brasil passou a importar o produto. Em 2000, foram importadas cerca de 71.000 toneladas de amêndoas de cacau (COMPANHIA DAS DOCAS DO ESTADO DA BAHIA, 2005).

Vários compostos químicos vêm sendo testados com o objetivo de prevenir ou erradicar a vassoura-de-bruxa, porém os resultados não têm sido satisfatórios (SOBERANIS et al., 2000). Inibidores da biossíntese da parede celular bacteriana, como penicilinas e cefalosporinas, têm apresentado bons resultados no controle de infecções bacterianas. De forma similar, a parede celular dos fungos representa um bom alvo para o desenvolvimento de novos antifúngicos (GRIFFITH, TRACY, 2002). Na busca por um controle efetivo do fungo causador da vassoura-de-bruxa, escolheu-se assim a rota metabólica que leva a síntese da quitina. O alvo nessa via metabólica é a enzima pirofosforilase, a qual é responsável em catalizar a reação que forma UDP-N-acetilglicosamina. A UDP-N-acetilglicosamina é um precursor essencial para a síntese de quitina, principal componente da parede celular fúngica (HERSCOVICS; ORLEAN, 1993). Desta forma, a principal consequência será a inibição da formação da parede celular, um componente crucial para o desenvolvimento do fungo (OLSEN; RODERICK, 2001).

O metabólito UDP-N-acetilglicosamina é formado pela atuação da enzima UDP-N-acetilglicosamina pirofosforilase sobre a acetilglicosamina-1-fosfato e UTP. Nesta reação a N-acetilglicosamina funde-se à estrutura do UTP através de dois ésteres de fosfato, produzindo a UDP-N-acetilglicosamina bem como pirofosfato inorgânico (STROMINGER; SMITH, 1959). Devido ao seu importante papel na rota metabólica da parede celular, a pirofosforilase pode representar um potencial alvo molecular para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos (POMPEO et al., 2001; YAMADA-OKABE et al., 2001).

As pirofosforilases de diferentes organismos apresentam um domínio central na forma alfa/beta/alfa. Este enovelamento característico é denominado por Rossmann *fold*, o qual é constituído de oito folhas beta rodeadas por oito alfa hélices, e nas extremidades duas pequenas regiões de folhas beta. Este pequeno domínio carboxi terminal extra é formado por

68 resíduos de aminoácidos. Em contraste, a região amino terminal é formada por seguimentos semi-conservados (PENEFF et al, 2001). No entanto, mesmo semi-conservada, esta região apresenta certo grau de identidade quando comparada com enzimas de bactérias e de outros organismos superiores. A seqüência semi-conservada inclui Leu-X<sub>2</sub>-Gly-X-Gly-Thr-X-Met-X<sub>4</sub>-Pro-Lys. Esta região é a responsável pela reação de transferência do UTP para a acetilglicosamina, sendo que esta reação é estimulada por vários cátions divalentes, incluindo Mg<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup> e Mn<sup>+2</sup> (OLSEN; RODERICK, 2001).

Uma série de recursos computacionais pode ser empregada para analisar o sítio ativo de enzimas, contribuindo na elaboração de compostos que possam se ligar a estes sítios ativos visando a inibição da atividade enzimática. Desta forma, este trabalho realizou o estudo do mecanismo de catálise da enzima pirofosforilase, objetivando subsidiar o desenvolvimento de inibidores para esta enzima. Para tanto, foram utilizados métodos computacionais de dinâmica molecular (DM) e cálculos híbridos de Mecânica Quântica/Mecânica Molecular (QM/MM).

Deste modo o presente trabalho justifica-se pela necessidade de auxílio no desenvolvimento de novos compostos direcionados à inibição das enzimas necessárias à síntese da parede e membrana celular do *M. pernicioso* e, conseqüentemente, pelo fornecimento de alternativas ao controle da vassoura-de-bruxa do cacauzeiro. Praga esta diretamente ligada à queda de produção e aumento dos gastos diretos em função do uso de medidas de controle, o que afeta os produtores que repassam esses custos para o preço do produto e, de forma indireta, o consumidor. Além destes impactos sócios econômicos, outras mudanças ainda ocorrem nas regiões produtoras afetadas pela praga como a queda no nível de emprego e danos ao meio ambiente decorrentes do uso de medidas de controle (COMPANHIA DAS DOCAS DO ESTADO DA BAHIA, 2005).

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 OBJETIVO GERAL

- Descrever o mecanismo de transferência da uridina-5-difosfato (UDP) oriunda da uridina-5-trifosfato (UTP) para a *N*-acetilglicosamina-1-fosfato na formação do produto UDP-*N*-acetilglicosamina, catalizado pela enzima pirofosforilase.

### 1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

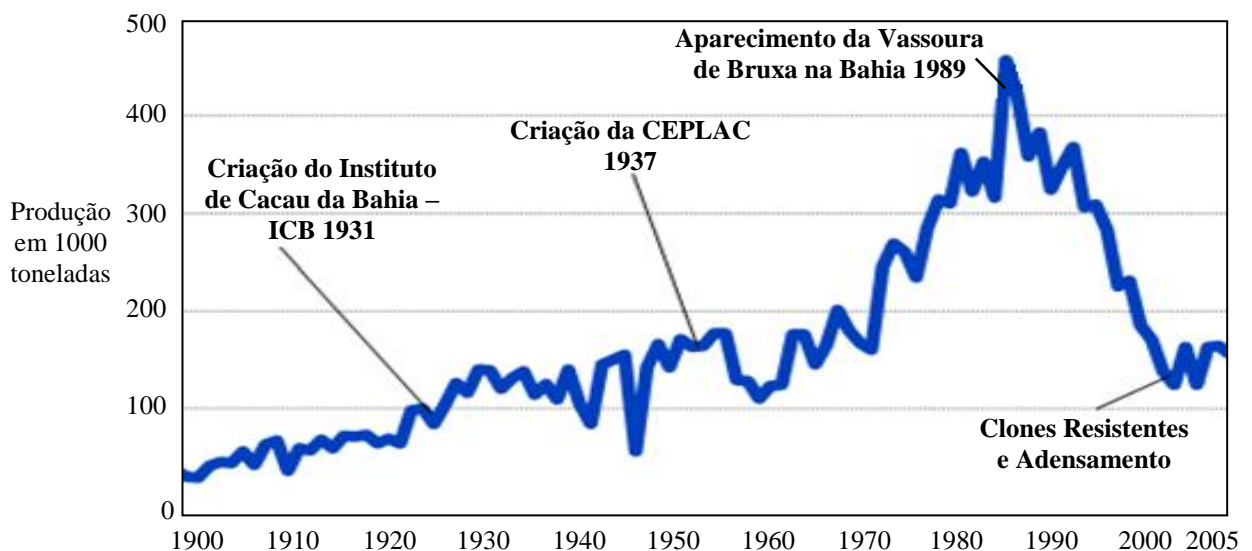
- Estudar as interações intermoleculares entre o substrato e a enzima alvo;
- Descrever o estado de transição da reação catalítica;
- Determinar a energia de interação entre a enzima e seu substrato.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 A VASSOURA-DE-BRUXA

A vassoura-de-bruxa foi descrita primeiramente no século XVIII. Mais de 100 anos se passaram até seus primeiros estudos científicos em 1985, quando o patógeno foi isolado e identificado. Tal peste devastou a produção cacaeira no Brasil causando um enorme prejuízo sócio-econômico daqueles envolvidos em sua produção. A vassoura-de-bruxa foi detectada na Bolívia (1989), Brasil (Bahia e Região da bacia Amazônica - 1989), Colômbia (1917), Equador (1921), Granada (1948), Guiana (1906), Panamá (1989), São Vicente (1988), e em Trindade e Tobago (1939) (PURDY; SCHMIDT, 1996). Atualmente distribui-se nas regiões da América do Sul e do Caribe podendo também ser encontrado no Panamá. Neste caso, a disseminação ocorreu do lado da América do Sul (PURDY, 2005).

Na região costeira da Mata Atlântica da Bahia, a incidência da vassoura-de-bruxa foi observada pela primeira vez em 1989. Após isso, pouco depois na cidade de Ilhéus-BA, uma grande área de plantações de cacau foi infectada (COMPANHIA DAS DOCAS DO ESTADO DA BAHIA, 2002). A Bahia correspondia a cerca de 80% da produção nacional e 15% da mundial de cacau. Com a ocorrência da doença na região cacaeira baiana, a produção caiu drasticamente transformando o Brasil de exportador a importador de cacau. A figura 1 ilustra a evolução da produção de cacau no Brasil até 2005, nela é possível observar a sua drástica redução após o aparecimento da doença.



**Figura 1:** Evolução da produção de cacau no Brasil até 2005.

FONTE: ZUGAIB; SANTOS; SANTOS FILHO, 2010.

A vassoura-de-bruxa é uma das mais importantes pragas do cacau, estando, principalmente nos países da América do Sul. No Brasil atingiu as lavouras cacaueiras da Bahia e da Amazônia, causando perdas de até 90% da produção (PURDY; SCHIMIDT, 1996). A doença provoca um superbrotamento das partes terminais do cacaueiro, tendo sintoma característico à formação dos brotos hipertrofiados (Figura 2), de excessivo desenvolvimento, aparentando uma vassoura, daí a origem do nome da doença. De início, seu desenvolvimento é rápido, porém depois de 5 a 6 semanas começa a secar, podendo cair ou ficar aderente à árvore (PEREIRA, 1990).



**Figura 2:** Alterações causadas nas folhas e nos frutos do cacaueiro pela vassoura-de-bruxa; coluna da esquerda: planta saudável; coluna da direita: planta afetada pela doença.

FONTE: COCOA CROP PROTECTION, 2010; NITZKE, 2010; BOTANISCHER GARDEN, 2010.

## 2.2 O FUNGO *MONILIOPHTHORA PERNICIOSA*

O fungo *M. perniciosa* é o patógeno destrutivo causador da vassoura-de-bruxa em cacau (*Theobroma cacao*). Desde a sua ocorrência na costa do Equador, em 1984, este fungo vem representando um dos principais fatores limitantes na produção de cacau na América do Sul e nas Ilhas do Caribe, tendo assumido o papel de mais importante patógeno do cacauzeiro. Além disso, sua disseminação acompanhou a do *T. cacao* na Bacia Amazônica, sendo ambos endêmicos nesta região (GRIFFITH et al, 1994). Este fungo infecta plantas da família Malvaceae, Solanaceae, Bignoniaceae, Bixácea e Malpighiaceae (RINCONES et al, 2006).

*M. perniciosa* apresenta ciclo de vida hemibiotrófico, ou seja, se hospeda durante uma fase em tecido vivo e durante outra em tecido morto. O fungo apresenta duas fases de micélios (conjunto de filamentos celulares chamados hifas): o parasítico (ou biotrófico, o qual se nutre da matéria viva) e o saprofítico (ou necrotrófico, que se alimenta da matéria morta) GRIFFITH et al, 2003.

O início da infecção da planta pelo fungo se dá quando esporos, sua fase reprodutiva, que aderem em gemas ou frutos em desenvolvimento. Ocorre então a penetração de hifas nas células vegetais, onde ficam um período em encubação sem desenvolvimento (fase parasítica). Como mecanismo de defesa, um maior aporte de nutrientes é enviado ao local da infecção, o que provoca um crescimento anormal no local de folhas (dando aspecto de uma vassoura verde, como é chamada essa etapa inicial (FIORAVANTI, 2006).

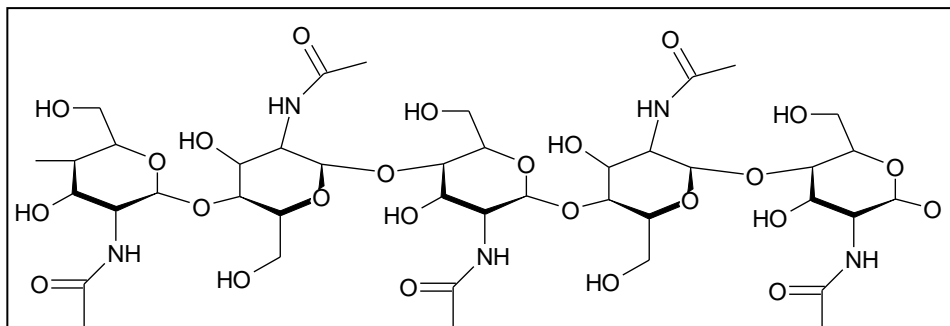
Após essa fase, a vassoura verde é necrosada pelo fungo dando lugar a vassoura-de-bruxa. A planta não consegue se restabelecer da depleção dos nutrientes desviados para as áreas afetadas. O fungo se desenvolve na área necrosada e rica em nutrientes (fase saprofítica) preferencialmente em ocasiões de alternância entre dias chuvosos e ensolarados para poderem assim formar cogumelos que contém mais esporos (também chamados de basidiósporos) infectantes (FIORAVANTI, 2006).

Basidiósporos são as únicas estruturas do *M. perniciosa* capazes de infectar em condições naturais os tecidos do *Theobroma cacao* e várias outras espécies do gênero *Theobroma* e *Herrania* (membros da família Sterculiaceae). As condições climáticas ideais para a liberação dos basidiósporos são a umidade do ar próximo a saturação e temperaturas em torno de 20 a 30 °C (GRIFFITH et al, 2003; PURDY; SHMIDT, 1996).

### 2.3 A PAREDE CELULAR DOS FUNGOS

A maioria dos fungos verdadeiros apresenta parede celular constituída principalmente por quitina, além de outros polissacarídeos em menor quantidade. Nas espécies que apresentam parede celular, a membrana plasmática é coberta externamente por três camadas de componentes da parede. De dentro para fora a primeira camada é a de quitina, a segunda consiste de polímeros de  $\beta$ -1-3-glucano e a terceira de manoproteínas, que são manoses contendo glicoproteínas (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996).

A quitina é um homopolissacarídeo composto por resíduos de N-acetil-D-glicosamina em ligação  $\beta$  (ou  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) 2-acetoamido-2-deoxi-D-glicose) (figura 3) (LENHNINGER, NELSON, COX, 2000). Trata-se de uma estrutura rígida amplamente distribuída pelos invertebrados, fungos e algas. Nos fungos filamentosos, por ser o maior componente da parede celular atua de forma marcante na resistência mecânica necessária para a manutenção da integridade celular (TAKAYA et al, 1998).



**Figura 3:** Segmento curto de quitina, homopolímero de unidades de N-acetil-D-glicosamina em ligação ( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4).

FONTE: BORGOGNONI; POLAKIEWICZ; PITOMBO, 2006.

Apesar da quitina consistir um dos mais importantes biopolímeros da natureza, o conhecimento da sua biosíntese ainda está em debate. Quatro etapas foram estabelecidas: (i) conversão da frutose-6-fosfato em glicosamina-6-fosfato, pela ação da frutose-6-fosfato aminotransferase (EC 2.6.1.16); (ii) acetilação da glicosamina-6-fosfato formando N-acetilglicosamina-6-fosfato, catalisada pela 2-acetilglicerolfosfoetanolamina acetiltransferase (EC 2.3.1.4); (iii) conversão de N-acetilglicosamina-6-fosfato em N-acetilglicosamina-1-fosfato, pela ação da N-acetilglicosamina fosfomutase (EC 5.4.2.3); (iv) conversão da N-



acetilglicosamina-1-fosfato em UDP-N-acetilglicosamina, catalisada pela ação da UDP-N-acetilglicosamina pirofosforilase (EC: 2.7.7.23) (POMPEO et al, 2001; YAMADA-OKABE et al, 2001).

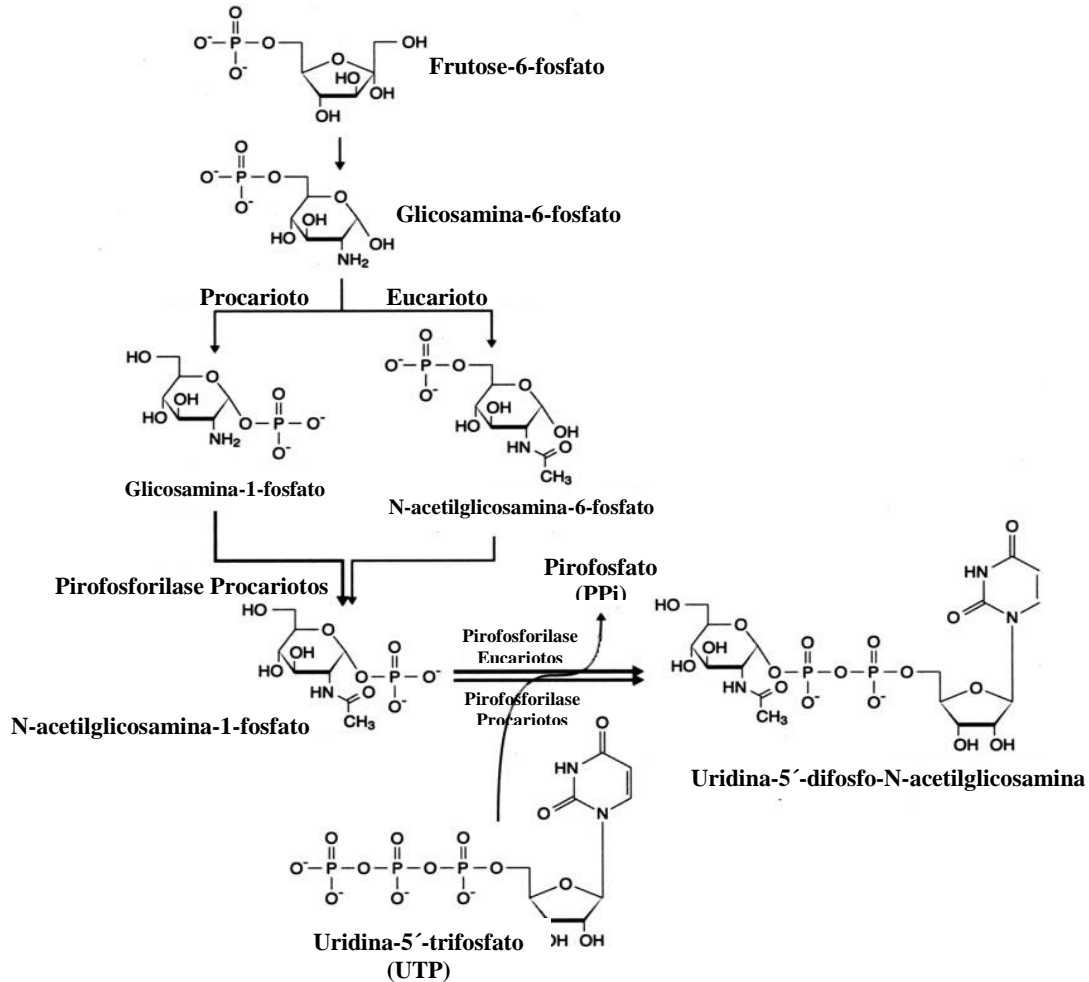
#### 2.4 UDP-N-ACETILGLICOSAMINA PIROFOSFORILASE

A enzima UDP-N-acetilglicosamina pirofosforilase (EC 2.7.7.23) pertence à superfamília das nucleotídeos-difosfo-açúcar transferases e à família UDP-glicose pirofosforilase. A constituição estrutural da enzima é de folhas beta paralelas (beta/alfa/beta) (PENEFF, 2001). Sua purificação foi realizada a partir de cepas de *Staphylococcus aureus* a cerca de 30 anos. A seqüência gênica que codifica esta enzima foi elucidada a partir de genes de *Escherichia coli*, somente em 1993 (DE LUCA et al. 1996).

UDP-N-acetilglicosamina, produto da reação catalisada pela pirofosforilase, consiste em um metabólito essencial em processos celulares, sendo utilizado não somente como precursor da quitina, mas também de lipopolissacarídeos, peptidoglicanos, glicoproteínas e proteoglicanos. Lipopolissacarídeos e peptidoglicanos são essenciais para a biosíntese da parede celular bacteriana. Glicoproteínas e proteoglicanos consistem em importantes glicoconjugados, atuam respectivamente em processos de sinalização celular e manutenção de rigidez e elasticidade de tecidos conectivos como cartilagens (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000). A figura 4 esquematiza a rota de biossíntese de UDP-N-acetilglicosamina mostrando as estruturas dos intermediários metabólicos para procariotos e eucariotos. Deve-se ressaltar que a pirofosforilase de procariotos além de catalisar a reação da UDP-N-acetilglicosamina realiza também a acetilação da glicosamina-1-fosfato em N-acetilglicosamina-1-fosfato.

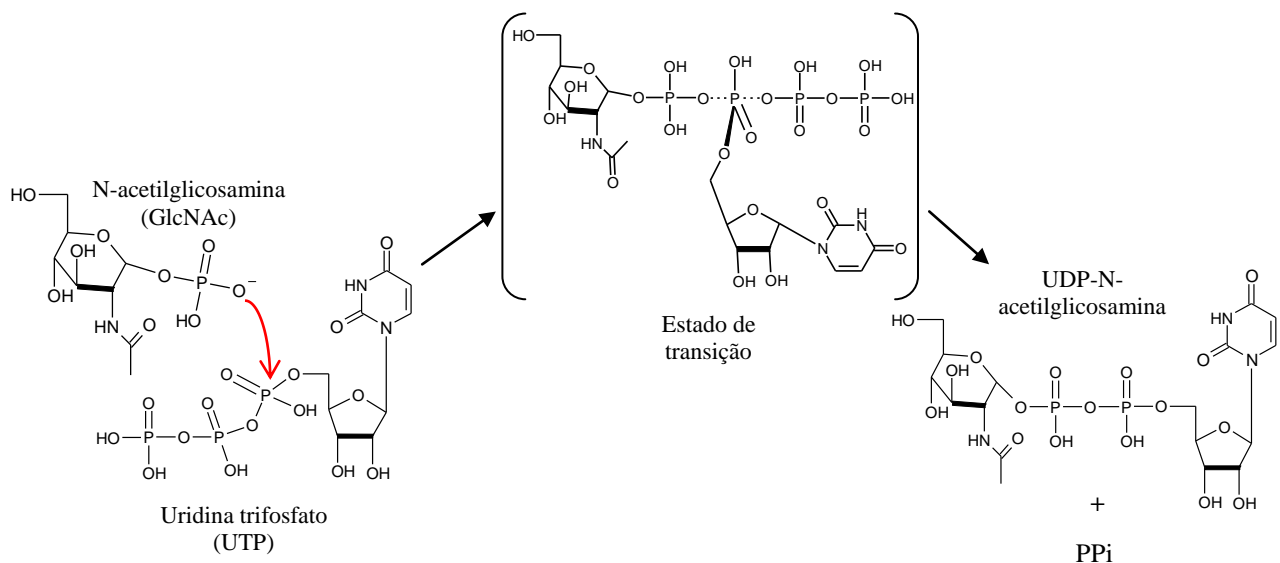
Como pode ser visualizado pela figura 4, a pirofosforilase produz UDP-N-acetilglicosamina a partir de N-acetilglicosamina-1-fosfato e uridina-5'-trifosfato (UTP). A reação inversa é também catalisada pela própria pirofosforilase. De acordo com Maruyama e colaboradores (2007), a reação procede através do mecanismo S<sub>N</sub>2 (figura 5), onde o oxigênio não esterificado do grupo fosfato da N-acetilglicosamina-1-fosfato ataca o fosfato da posição α da molécula de UTP. Os fosfatos das posições β e γ são então liberados na forma de pirofosfato (PPi). A presença de cátions divalentes, como íons de magnésio, aumentam a

atividade enzimática devido à sua ação estabilizadora das cargas negativas dos grupos fosfatos (MARUYAMA et al, 2007).



**Figura 4:** Rotas de biosíntese da UDP-N-acetilglicosamina para procariotos e eucariotos.

FONTE: adaptado de MARUYAMA et al, 2007.



**Figura 5:** Reação de formação da UDP-N-acetilglicosamina via mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular –  $S_N2$  sugerido por alguns autores.

FONTE: adaptado de MARUYAMA et al, 2007.

De acordo com Cassano, Anderson e Harris (2004), o estado protonado dos oxigênios não ligados neutraliza a sua carga negativa, o que significa uma estabilização eletrônica do grupo fosfato, fazendo-o similar a um fosfotriéster que possui um efeito indutivo dos carbonos ligados. Essa estabilização pode favorecer a reação na medida em que diminui a repulsão do grupo nucleófilo atacante pelos oxigênios ligados ao fosfato.

Esses mesmos autores ainda sugerem que em microambientes enzimáticos seja muito provável que estas cargas sejam neutralizadas com o mesmo propósito de facilitar a ocorrência da reação. A neutralização dos oxigênios em enzimas pode ocorrer pela simples protonação ou pela estabilização eletrostática realizada por resíduos de cargas opostas presentes no sítio catalítico.

As enzimas de procariotos e eucariotos apresentam algumas particularidades significativas. Além de grandes diferenças nas sequências de aminoácidos, a pirofosforilase de procariotos, como já ressaltado, é bifuncional realizando tanto a acetilação da glicosamina-1-fosfato em N-acetilglicosamina-1-fosfato quanto à conversão desta a UDP-N-acetilglicosamina. Em contraste, a enzima de eucariotos não catalisa essa acetilação. Dentro da classe dos eucariotos, existe uma classificação entre pirofosforilases de mamíferos e não-mamíferos. Esta última classe, apesar de conservar semelhança na sequência de aminoácidos com pirofosforilases de mamíferos, não apresentam uma região de loop de cerca de 10 aminoácidos. Devido a essa diferença, as pirofosforilases de não-mamíferos apresentam-se na forma monomérica para a realização da sua atividade biológica, ao contrário da forma dimerica ocorrente em mamíferos (MARUYAMA et al, 2007).

O modo com o qual o nucleotídeo se liga no sítio ativo da pirofosforilase é similar em todas as enzimas. O complexo açúcar-nucleotídeo acopla-se na região central da enzima, estabelecendo contato com a primeira metade desta região (resíduos 68-260) e em particular com a região de alça composta pelos resíduos Asp221-Leu226. O açúcar é estabilizado principalmente por ligações de hidrogênio formadas com os resíduos da segunda metade da alça central (PENEFF et al, 2001).

Através de modelagem comparativa, Santos Júnior e colaboradores (2009) determinaram a estrutura tridimensional da pirofosforilase de *Moniliophthora perniciosa*. O molde utilizado para a elucidação estrutural foi a estrutura de pirofosforilase de humanos descrita por PENEFF et al, (2001), depositada no PDB com código 1JV1. O modelo definitivo apresentou Desvio Médio Quadrado (RMSD) de 1,2 Å em relação ao molde,

apresentando 94,9% de aminoácidos em regiões energeticamente favoráveis após a validação pelo software PROCHECK.

### 3 A QUÍMICA COMPUTACIONAL EM ESTUDOS DE REAÇÕES ENZIMÁTICAS

A maioria das funções biológicas é realizada através da interação de ligantes com proteínas ou DNA/RNA e, subsequentemente, uma série de reações químicas catalisadas por enzimas (LEHNINGER; NELSON, 2000). A investigação da origem do poder catalítico de enzimas ajuda a decifrar eventos-chave e leva ao melhor entendimento de processos biológicos correlacionados. O estudo da catalise enzimática é também essencial para o desenho de novas moléculas moduladoras da atividade enzimática e utilização de enzimas para importantes aplicações práticas, indo desde o desenvolvimento de novos fármacos até melhoramento de processos industriais.

Estudos experimentais provêm informações indispensáveis sobre a estrutura, termodinâmica e cinética de reações enzimáticas. Porém, dados experimentais freqüentemente ainda não são capazes de fornecer evidências detalhadas sobre os mecanismos reacionais. Particularmente, estudos experimentais não podem determinar diretamente a estrutura de estados de transição, cruciais não somente para caracterização de mecanismos de reação, mas também para a pesquisa biomédica e biotecnológica tais como as aplicadas no desenvolvimento de compostos biologicamente ativos (HU; YANG, 2009).

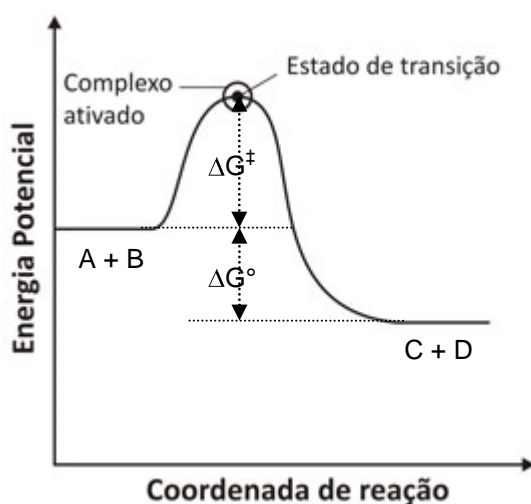
De forma complementar aos estudos experimentais, simulações computacionais são capazes de produzir informações atomísticas, até mesmo em termos eletrônicos, considerando os efeitos das interações sítio-específicas sobre o processo de reação, o caminho da reação e a estrutura do estado de transição. Estudos de simulações de muitos processos enzimáticos têm direcionado para a elucidação de importantes questões como mecanismos de catálise covalente e contribuição energética da estrutura protéica pré-organizada. Dessa forma, métodos precisos de simulação têm e terão importantes papéis na compreensão das complexas interações nas catálises enzimáticas (HU, YANG, 2009).

#### 3.1 TEORIA DO ESTADO DE TRANSIÇÃO

A compreensão e proposição de mecanismos para uma reação química são dependentes de hipóteses teóricas, relacionadas aos acontecimentos em escala atômica. Tais abordagens permitem a avaliação de parâmetros como velocidade e preferências relativas

entre reações concorrentes. São dois os principais modelos teóricos para descrição de uma reação química: a teoria das colisões moleculares e a teoria do estado de transição. A teoria das colisões, aplicável aos gases, supõe a não existência de forças intermoleculares, sendo menos aplicada em reações em meio solvente ou em ambiente enzimático (DEL PINO et al, 2010).

A teoria do estado de transição foi primeiramente descrita por Eyring e Polanyi em 1935. A explicação desta teoria envolve o conceito de complexo ativado e estado de transição, o qual se baseia no aspecto geral da variação da energia livre de uma reação de reagentes A e B formando os produtos C e D (figura 6). Mesmo para uma reação exergônica, com variação negativa de energia livre, o rompimento de ligações covalentes deve elevar a energia dos reagentes antes que esta possa alcançar um nível menor que o inicial (DEL PINO, et al, 2010).



**Figura 6:** Diagrama de energia livre de reação hipotética com  $\Delta G^\circ$  negativa.

FONTE: adaptado de DEL PINO et al, 2010.

A barreira energética formada entre os reagentes e produtos corresponde à energia de ativação,  $\Delta G^\ddagger$ . Na região próxima ao ponto máximo da barreira os átomos assumem a conformação do complexo ativado. No ponto máximo encontra-se a geometria de deformação cuja mínima variação atômica faz o sistema avançar para os produtos. Esta configuração crítica é o estado de transição. O estado de transição tem uma existência curta, dura somente o tempo necessária para uma vibração molecular, cerca de  $10^{-12}$ s (SOLOMONS; FRYHLE, 2009).

De forma similar a uma variação global de energia livre, a energia livre de ativação pode ser descrita pela equação  $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$ . A entalpia de ativação,  $\Delta H^\ddagger$ , corresponde a energia necessária para reunir os reagentes provocando o rompimento parcial das ligações que ocorrem no estado de transição. A maior ou menor necessidade de reorientação dos reagentes se reflete na entropia de ativação,  $\Delta S^\ddagger$  a qual é multiplicada pela temperatura, T (DEL PINO, et al, 2010).

Existe um número infinito de caminhos que levam dos reagentes até os produtos, mas o estado de transição está no topo da via que exige a menor energia de ascensão. Existe uma importante relação entre a velocidade de uma reação e o valor da energia livre de ativação. A relação entre a constante de velocidade (k) e  $\Delta G^\ddagger$  é uma relação exponencial:  $k = k_0 e^{-\Delta G^\ddagger/RT}$ , sendo *e* a base dos logaritmos neperianos e  $k_0$  a constante de velocidade absoluta de conversão do estado de transição para os produtos. Essa relação mostra que uma reação com uma energia livre de ativação mais baixa ocorrerá com maior velocidade que uma reação com uma a energia livre de ativação mais alta (SOLOMONS; FRYHLE, 2009).

### 3.2 ABORDAGENS METODOLÓGICAS PARA ESTUDOS DE REAÇÕES ENZIMÁTICAS

A simulação de uma reação enzimática precisa partir de um sistema cujas coordenadas atômicas estejam suficientemente próximas de uma estrutura real. Dessa forma, coordenadas de proteínas obtidas tanto por métodos experimentais quanto teóricos, como por homologia comparativa, são submetidas a cálculos de dinâmica molecular (DM) com o objetivo de refinar a estrutura para um modelo o mais fidedigno possível da realidade (ISHITANI; TERADA; SHIMIZU, 2008)

O objetivo da DM é simular a evolução do sistema através de equações clássica de movimento, durante um determinado período de tempo, sob um estímulo cinético, mensurado por uma determinada temperatura. A agitação das moléculas causada pelo fornecimento de energia ao sistema acarreta na alteração nos posicionamentos dos átomos. Ao longo do período simulado, várias conformações são exploradas possibilitando a obtenção de geometrias moleculares energeticamente favoráveis, chegando o mais próximo do ponto

energético de equilíbrio global do sistema, e desse modo, de um modelo mais real (RINO; STUDART, 2001).

A DM consiste numa simulação numérica onde átomos e moléculas são submetidas à interação, sob uma dada temperatura e por um período de tempo, sob leis clássicas da física:  $F_I = m_I a_I$ , sendo  $F$  a força,  $m$  a massa e  $a$  aceleração. A força de cada átomo é calculada a partir da mudança na sua energia potencial,  $dE$ , (geralmente obtida pela adoção de campos de força baseados em mecânica molecular) entre a atual e a nova posição:  $F_I = -(dE/r_I)$ , em que  $r$  é a distância entre as posições. Forças atômicas e massas são então utilizadas para determinar as posições atômicas sobre uma série de passos de curta duração:  $F_I = m_I(d^2 r_I/dt^2)$ , em que  $t$  é tempo. Estes cálculos fornecem a trajetória de mudanças nas posições atômicas ao longo do tempo. De modo prático, é mais fácil determinar a posição atômica dependente do tempo pelo cálculo prévio da aceleração  $a_I$  das forças e massa, então a velocidade  $v_I$  de  $a_I = dv_I/dt$  e, no fim das contas, posições a partir das velocidades  $v_I = dr_I/dt$  (KITCHEN et al, 2004).

Dentre os diversos softwares de DM, destaca-se o AMBER, descrito por Case e colaboradores (2006). Este é composto basicamente de um banco de dados de estruturas biológicas, um conjunto de campos de força parametrizados e de um conjunto de programas. Estes últimos, necessários tanto para a execução das simulações quanto para a análise dos resultados produzidos.

Partindo de um sistema substrato-enzima geometricamente coerente, simular reações neste meio enzimático requer uma função de energia precisa e computacionalmente eficiente. A idéia inicial é tratar todos os componentes do sistema molecular com a mesma abordagem teórica de alta precisão com, por exemplo, química quântica. Porém, essa abordagem se torna impraticável devido à grande quantidade de graus de liberdade das moléculas do sistema, as quais requerem enorme suporte computacional para sua simulação (MONARD, MERZ, 1999).

As reações em sistemas enzimáticos, em geral, revelam algumas características em comum. Com exceção de certas reações de transferência eletrônica que podem ocorrer a grandes distâncias dentro do sistema molecular, em muitas reações enzimáticas somente um pequeno número de átomos participa diretamente nos eventos de formação ou quebra de ligações. Assim, as interações desse pequeno subconjunto de átomos devem ser descritas de



forma precisa. Para os demais átomos do sistema, seus estados de valência não sofrem mudança contribuindo minimamente para qualquer alteração da estrutura eletrônica dos átomos no sítio ativo. Estes átomos, tais como resíduos de aminoácidos distantes ou moléculas de solventes na solução, contribuem para a reação na forma de um ambiente eletrostático para influenciar as propriedades e reatividade do sítio ativo (HU, YANG, 2009).

Uma boa teoria para simular essas reações precisa considerar o balanço entre a precisão para os eventos químicos no sítio ativo e modelar eficientemente a contribuição do ambiente químico ao redor. Um método efetivo consiste na abordagem multi-resolução: o sítio ativo do sistema molecular é descrito com maior acurácia através de um tratamento quântico, enquanto a contribuição do resto do sistema é descrita por teorias empíricas, porém efetivas, como mecânica molecular. Esta abordagem, denominada Mecânica Quântica/Mecânica Molecular (QM/MM) foi primeiramente empregada por Washel e Levitt (1976), e permite a descrição satisfatória do fenômeno enzimático com menor custo computacional, por tomar vantagem da aplicabilidade e precisão do método QM para os sítios de reações envolvendo algumas dezenas de átomos, e da eficiência computacional dos métodos MM para o resto da enzima e solvente, que normalmente consistem de centenas a milhares de átomos (SENN, THIEF, 2007).

De acordo com o nível teórico da camada QM utilizada, a abordagem QM/MM pode ser classificada em dois tipos. O primeiro emprega métodos semi-empíricos para a parte Mecânica Quântica tais como, MNDO, AM1, PM3, ou os mais recentes PM6 e a Função de Ligação de Carga Auto-Consistente (SCC-DFTB) (STEWART, 2007). O segundo tipo emprega diretamente os métodos *ab initio* para a camada QM. Métodos *ab initio* se valem de Teorias de Função de Onda ou de Funcional de Densidade (DFT).

Esquemas com métodos semi-empíricos são mais frequentemente empregados. Tais métodos têm evoluído constantemente ao longo dos anos alcançando lugar de destaque, sendo utilizados principalmente devido a sua versatilidade, confiabilidade e rapidez (SENN; THIEF, 2007).

Métodos semi-empíricos fornecem dados geométricos e termodinâmicos dos sistemas estudados através de soluções aproximadas para a equação de Schrödinger.. Os métodos semi-empíricos são assim denominados por apresentarem em sua estrutura um grau de fundamentação na teoria *ab initio*, e outra parte empiricamente ajustada para que os resultados produzidos pela metodologia reproduzam os parâmetros observados experimentalmente.

Devido a simplificações e substituições de termos mais difíceis por outros mais fáceis de calcular, o seu custo computacional acaba sendo bem mais reduzido do que métodos *ab initio*. Suas principais deficiências residem nas aproximações incorporadas em sua rotina e numa possível utilização de parâmetros experimentais incorretos como base.

Os métodos semi-empíricos de uso mais frequente baseiam-se na aproximação do tipo *Zero Differential Overlap* (ZDO). Exemplos de aproximações ZDO incluem os métodos *Complete Neglect of Differential Overlap* (CNDO), *Intermediate Neglect of Differential Overlap* (INDO) e *Neglect of Diatomic Differential Overlap* (NDDO), sendo este último o mais extensivamente utilizado. Estes três métodos apresentam em comum a substituição de termos de sobreposição diferencial por zero. Como resultado, essa simplificação elimina alguns cálculos integrais que, no formalismo *ab initio*, seriam extremamente custosos. Métodos semi-empíricos como MNDO, AM1 e PM3 apresentam a rotinas de aproximação NDDO (LASCHUK, 2005).

Cada método semi-empírico tem uma aplicação na qual é mais indicado. Alguns são melhor parametrizados para cálculos de calor de formação, outros para obtenção de geometrias moleculares, transições eletrônicas, dentre outras aplicações. Métodos semi-empíricos são também utilizados em cálculos que envolvem eventos reacionais com quebra e formação de ligações.

Em uma recente atualização da metodologia NDDO, Stewart (2007) realizou uma extensiva revisão de parâmetros termodinâmicos experimentais utilizados como referência para o método bem como das aproximações utilizadas neste. O resultado foi um novo método semi-empírico com substituição de dados de referências incorretos e alguns melhoramentos nas aproximações. O método desenvolvido recebeu a denominação de *Parametric Method number 6* (PM6).

Em testes com o PM6, Stewart (2009) determinou a geometria e valores termodinâmicos para um estado de transição da reação proteolítica da enzima quimi tripsina. A reação de rompimento da ligação peptídica em questão envolve formação de um intermediário quaternário que diminui a energia de ativação da reação. A metodologia PM6 foi capaz de refinar o sistema até este estado estacionário cujo cálculo da frequência revelou a existência de um único vetor imaginário, condição suficiente para atestar que se trata de um estado de transição. Cálculos de coordenadas intrínsecas de reação (IRC) validaram que o estado de transição obtido mediava a formação do intermediário quaternário.

Dentro de um sistema QM/MM, o tratamento da camada de menor precisão é comumente realizado com métodos de Mecânica Molecular (MM). Cálculos em MM definem tipos atômicos para determinar as funções e parâmetros que compõem o campo de força de interação. Para um único elemento, como um carbono, podem existir muitos tipos atômicos diferentes, cada um apresenta uma forma de hibridização, ambiente químico, dentre outros.

O pacote de programas Gaussian dispõe de diferentes campos de força de MM, como Amber e *Universal Force Field* (UFF). O campo de força UFF, descrito por RAPPÉ e colaboradores (1992), é amplamente utilizado. Para uma determinada geometria a energia do sistema,  $E$ , tratado pelo campo de força UFF, é obtida através da relação:

$$E = E_R + E_\theta + E_\phi + E_\omega + E_{vdw} + E_{el}$$

Onde as interações de valência consistem nos estiramentos de ligação,  $E_R$ , e nas torções angulares. Torções angulares por sua vez incluem as flexões de ângulos de ligação,  $E_\phi$ , torções de ângulo diedro,  $E_\omega$ , e termos de inversão,  $E_\omega$ . As interações intermoleculares são descritas pelas forças de dispersão (ou de van der Waals:  $E_{vdw}$ ) e os termos eletrostáticos representados por  $E_{el}$ .

Um parâmetro importante para a camada MM, sobretudo para estudos de reações em meio enzimático, é a carga atômica. Esse parâmetro interfere diretamente na contribuição eletrostática da camada MM sobre o subsistema QM. Na ausência de cargas atômicas para a camada MM é possível em alguns programas solicitar que se calcule tais cargas. Essa função atribui a carga para cada átomo do sistema com base em seu tipo atômico, caso o tipo não esteja especificado no arquivo das coordenadas, o programa parametriza tanto o tipo quanto a carga dos átomos. Um programa muito utilizado e que apresenta essa função é o Gaussian (FRISCH et al, 2009).

De acordo com Hu e Yang (2009), considerando um sistema dividido em duas camadas pelo método QM/MM, temos  $\{r_{QM}\}$  como sendo o subsistema QM contendo o sítio ativo e  $\{r_{MM}\}$  a porção que inclui o resto das moléculas do sistema. A energia potencial total de um sistema QM/MM pode ser descrita esquematicamente com uma soma de diferentes interações:

$$E_{QM/MM}(r_{QM}, r_{MM}) = E_{QM}(r_{QM}, r_{MM}) + E_{QM/MM,ele}(r_{QM,MM}) + E_{QM/MM,nucl}(r_{QM,MM}) + E_{QM/MM,vdw}(r_{QM,MM}) + E_{QM/MM,covalente}(r_{QM,MM}) + E_{MM}(r_{MM})$$

Os primeiros dois termos representam respectivamente a energia interna da parte QM e a interação eletrostática entre os elétrons QM com o subsistema MM. O terceiro termo representa a energia eletrostática de interação entre os núcleos dos átomos QM e o subsistema MM. Os termos seguintes são respectivamente as energias de van der Waals entre os subsistemas QM e MM, a energia de interação covalente entre os dois subsistemas, e a energia de interação MM entre o subsistema MM.

Uma questão ainda discutível consiste na divisão entre as camadas QM e MM. Quando uma ligação covalente separa átomos de cada subsistema a definição Hamiltoniana da parte QM deve ser alterada para assegurar a integridade do seu estado de valência eletrônica. Desse modo algumas abordagens têm sido desenvolvidas para garantir esse fechamento do subsistema. A tática mais comum consiste na adição de átomos-*link* de hidrogênio para completar a valência do átomo QM envolvido. Outras abordagens mais recentes estão também sendo aplicadas: o método de pseudo-ligação mimetiza a ligação covalente dos átomos da fronteira através de funções diferenciais aplicadas a estes. Outra possibilidade consiste na técnica do orbital local congelado, nesta um conjunto especial de orbitais locais são designados para manter o fechamento das valências dos sistemas QM/MM (HU, YANG, 2009).

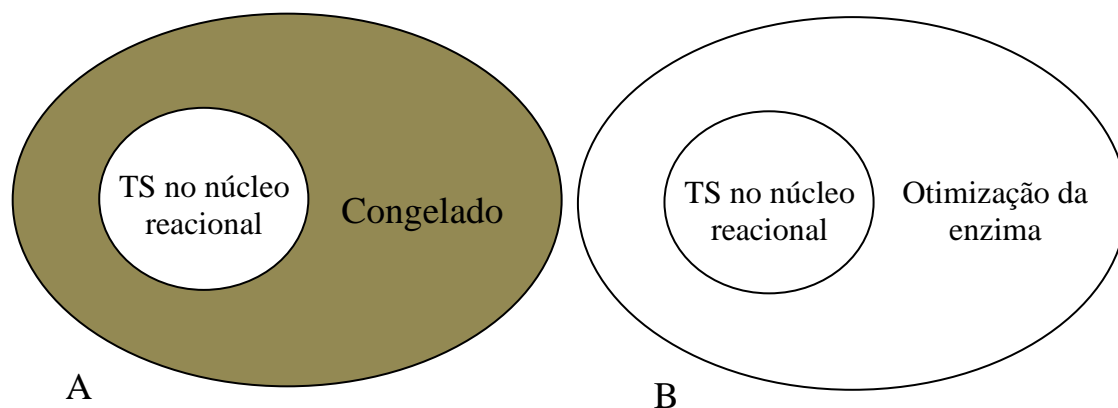
Dentre os esquemas adotados para o estudo de reações enzimáticas por subsistemas QM/MM, Prat-Resina, González-Lafont e Lluh (2003) destacam dois como sendo os mais comumente utilizadas para a localização de estados de transição nestas reações: 1 - método da coordenada de reação e 2 - método direto da segunda derivada. O método da coordenada de reação consiste num modelo relativamente simples no qual se exploram alguns poucos graus de liberdade do sistema. Um grau de liberdade consiste numa coordenada como uma distância entre dois átomos, um ângulo, um diedro ou uma combinação destes, que seja representativa da reação que se deseja estudar.

A estas coordenadas são aplicadas restrições conformacionais enquanto o restante do sistema é otimizado livremente. Desse modo, a cada diferente coordenada, do que se acredita ser o caminho entre os reagentes e os produtos, otimizações geométricas são realizadas. O resultado é um gráfico de perfil energético cuja geometria correspondente ao ponto de maior valor é considerada o estado de transição reacional. Aspectos fundamentais consistem em escolher adequadamente as coordenadas de reação e explorar ao máximo seus pontos, de forma a obter um perfil energético o mais detalhado possível. Os valores de energia do estado

de transição são então comparados com o dos reagentes e produtos, determinando dessa maneira a barreira energética da reação.

A outra estratégia apontada por Prat-Resina, González-Lafont e Lluch (2003) é denominada método direto de segunda derivada. Nesse caso procede-se com uma direta localização da estrutura do estado de transição com métodos que utilizam a segunda derivada de energia, tais como Newton Raphson (NR) ou Função de Otimização Racional (RFO). Devido ao grande custo computacional dos métodos de segunda derivada utiliza-se uma divisão no esquema de busca. Essa divisão ocorre pela busca padrão com aproximações manuais à geometria do estado de transição, utilizando um método RFO no núcleo reacional, mantendo fixas as posições dos átomos restantes da proteína.

Utilizando QM/MM, é possível realizar paralelamente a busca RFO pelo estado de transição no núcleo reacional (tratado de forma mecânica quântica), e a otimização do restante do sistema (de forma mecânica molecular) permitindo seu relaxamento, método denominado micro-iterativo (figura 7). Uma outra abordagem é combinar as metodologias. Ou seja, utilizar como *input* do método micro-iterativo uma geometria obtida a partir do método da coordenada de reação (PRAT-RESINA, GONZÁLEZ-LAFONT E LLUCH, 2003).



**Figura 7:** Esquema para localização de estruturas de estado de transição em sistema enzimático movimentando apenas o núcleo enquanto mantendo o resto do ambiente congelado (A); e esquema micro-iterativo (B).

FONTE: PRAT-RESINA, GONZÁLEZ-LAFONT E LLUCH, 2003.

O programa Gaussian é muito utilizado em aplicações da química computacional incluindo estudos de reações enzimáticas. A edição mais recente do programa é a Gaussian09 (FRISCH et al, 2009). Este programa apresenta grande gama de recursos, abrangendo desde campos de força como AMBER e UFF, passando por métodos semi-empíricos como MNDO/3 e PM6, métodos *ab initio* como Hartree-Fock e DFT como B3LYP, dentre outras.

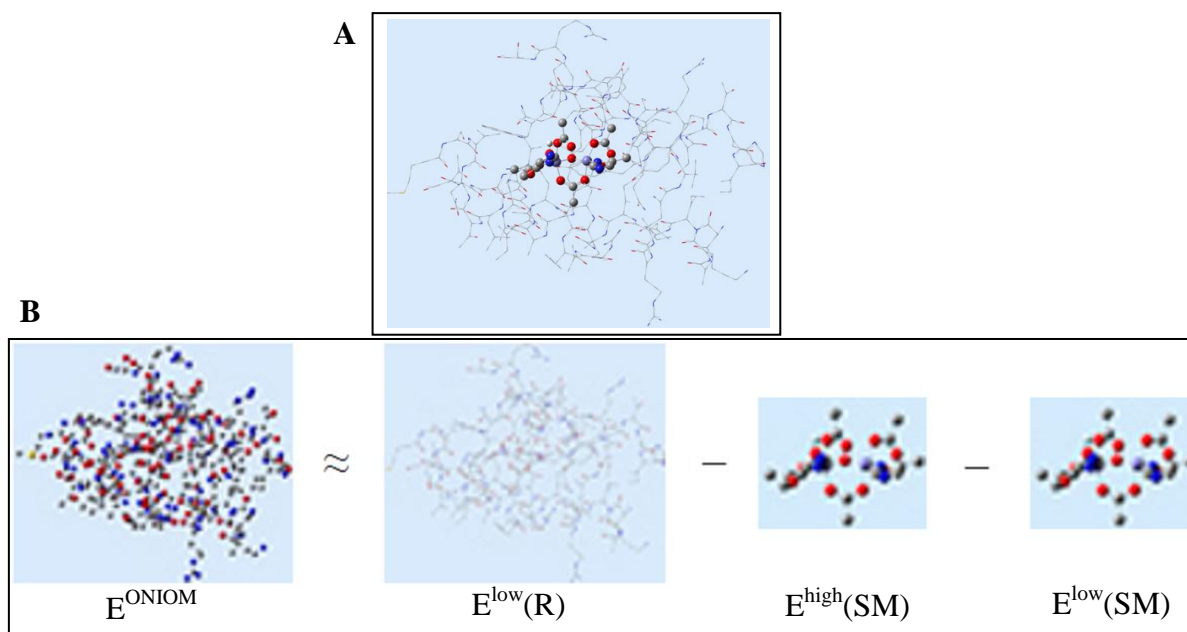
Para aplicações QMMM o Gaussian conta com o módulo ONIOM (o acrônimo deriva da expressão *Our own N-layered Integrated molecular Orbital and Molecular Mechanics*).

O ONIOM realiza a divisão do sistema estudado em camadas que são tratadas com diferentes modelos teóricos. Com o auxílio da interface gráfica do Gaussian, denominada GaussView, as camadas são discriminadas no sistema como alta, média e baixa, sendo separadas por cores, ou seja, é possível dividir o sistema em até três subcamadas. Por fim, para cada camada se pode atribuir um nível teórico para a realização dos cálculos.

O ONIOM obtém a energia do sistema simulado através da combinação das energias computadas pelos diferentes métodos teóricos. De modo mais específico, a energia fornecida é referente a todo o sistema em estudo, entretanto, esta consiste numa aproximação como se todo o sistema fosse calculado com o método de maior precisão escolhido. Portanto, o valor de energia fornecido é resultado de uma extrapolação do cálculo QM para todos os átomos. Correções para o tamanho total do sistema bem como para as diferenças de acurácia entre os métodos das diferentes camadas calculadas são aplicados (FRISCH et al, 2009). A equação abaixo apresenta, de modo simplificado, as considerações realizadas em um sistema de dupla camada calculado com uso do esquema ONIOM:

$$E^{\text{ONIOM}} = E^{\text{low}}(\text{R}) - E^{\text{high}}(\text{SM}) - E^{\text{low}}(\text{SM})$$

Para um sistema dividido em duas camadas, a equação seria representada graficamente conforme a figura 8:



**Figura 8:** Esquema do funcionamento do método ONIOM. A: representação de um sistema dividido em duas camadas (camada QM: em *ball & stick*; camada MM: em *wire*)  
B: representação gráfica da equação básica do método ONIOM

FONTE: FRISCH et al, 2009.

Na equação acima a energia final do sistema,  $E^{\text{ONIOM}}$ , corresponde a energia da porção calculada com método de maior precisão,  $E^{\text{high}}(\text{SM})$ , e da energia dessa mesma porção calculada com o método de menor precisão,  $E^{\text{low}}(\text{SM})$ , subtraídas da energia do restante do sistema calculado com o método de menor precisão  $E^{\text{low}}(\text{R})$ . O termo SM da equação refere-se a expressão “*small*”, ou seja, do sistema pequeno tratado com método QM. Já o termo R refere-se a todo o sistema e deriva da palavra “*Real*”.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo do mecanismo da reação catalisada pela enzima pirofosforilase do fungo *M. pernicioso* foi realizado através de cálculos de Dinâmica Molecular (DM) e Mecânica Quântica/Mecânica Molecular (QM/MM).

### 4.1 PREPARAÇÃO DA ENZIMA

Os substratos naturais da enzima pirofosforilase, N-acetilglicosamina-1-fosfato e UTP foram primeiramente orientados no sítio ativo da estrutura da enzima. Utilizando o software SwissPDBViewer (GUEX; PEITSCH, 1997), foram realizados alinhamento e sobreposição dos aminoácidos dos sítios ativos das pirofosforilases de *M. pernicioso* e *Candida albicans* cuja estrutura cristalográfica foi elucidada por Maruyama e colaboradores (2007).

Baseando-se nesse alinhamento e sobreposição dos dois sítios ativos, o produto da reação, UDP-N-acetilglicosamina, complexado à pirofosforilase descrita por Maruyama e colaboradores (2007), foi posicionado no sítio de ligação da pirofosforilase de *M. Pernicioso* para a obtenção das suas coordenadas atômicas.

Após a sobreposição do produto, cálculos de dinâmica molecular foram aplicados no sistema para sua estabilização. Empregando o software AMBER 9.0 (CASE, et al., 2006) executou-se uma otimização de 1500 ciclos, sendo 1000 ciclos em gradiente descendente e 500 em gradiente conjugado. Na seqüência, foi realizada uma dinâmica de aquecimento de 0 a 300 Kelvin com duração de 100 picossegundos. Por fim, seguiu-se com uma segunda dinâmica com duração de 1 nanossegundo.

Os cálculos foram realizados sob uma distância de interações, ou *cut-off*, de 14 Å, nenhuma restrição de pressão ou temperatura foi aplicada (NTB=0), o cálculo foi processado utilizando o modelo de solvente implícito descrito por Hawkins, Cramer e Truhlar (1996) (IGB=1) e, finalmente, desabilitando a opção SHAKE, que impõe restrições em comprimentos de ligações (NTC=1).

No modelo de solvente descrito por Hawkins, Cramer e Truhlar (1996) o cálculo da energia livre de solvatação é de rápida resolução, sendo adequado para simulações de

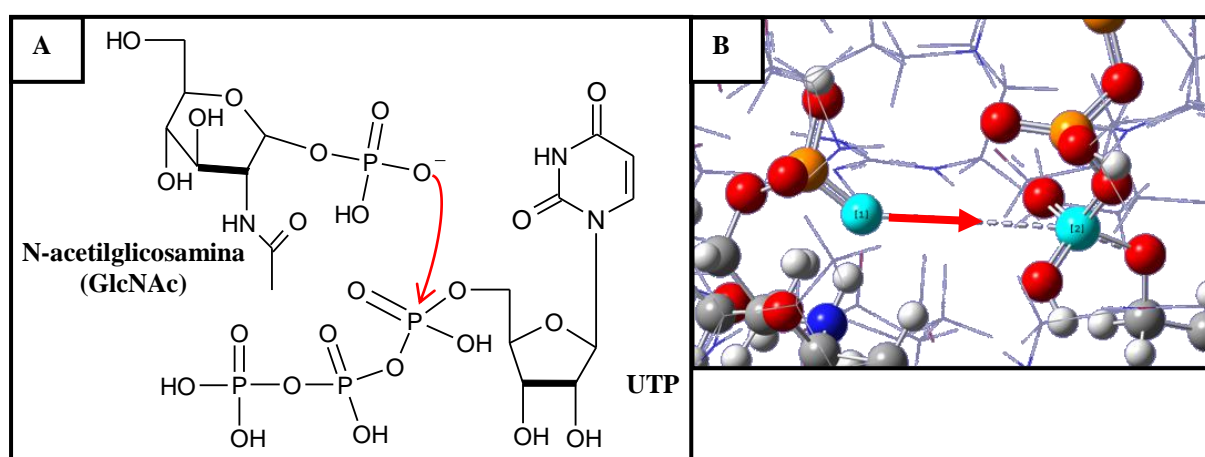


dinâmica molecular. Tal rotina emprega o modelo generalizado de Born, o qual realiza aproximações da equação de Poisson-Boltzmann. Esta última, por sua vez, descreve a energia livre de interação eletrostática do solvente com as moléculas do sistema. O cálculo desse parâmetro é necessário para a obtenção do valor da energia livre final de solvatação do sistema.

#### 4.2 CÁLCULOS DE MECANISMO DE REAÇÃO

A partir da estrutura do complexo resultante da dinâmica molecular, foram empregados cálculos QM/MM para a elucidação do mecanismo de reação no interior da enzima. De modo paralelo, a mesma reação foi simulada sem a enzima, utilizando o modelo de solvatação implícita padrão, PCM (*Polarizable Continuum Model*) descrito por Tomasi e colaboradores (2002). Um que considera a distribuição de cargas do soluto como contínua, o que confere maior realismo aos resultados obtidos.

Ambos os cálculos foram efetuados no software Gaussian09 versão W (FRISCH et al, 2009). Para a simulação da reação tanto no meio aquoso quanto enzimático, um oxigênio do grupo pirofosfato foi gradativamente aproximado do átomo de fósforo mais próximo do nucleosídeo uridina. Para cada etapa de aproximação, somente as distâncias entre o oxigênio e o fósforo permaneciam congeladas, o que permitia liberdade conformacional para o resto do sistema. A cada ponto, uma otimização pelo método semi-empírico PM6 descrito por Stewart (2007) foi realizado em todo o sistema. A figura 9 esquematiza a aproximação gradual realizada, também denominada de escaneamento.



**Figura 9.** Esquema de escaneamento utilizado para o estudo das coordenadas de reação nos meios aquoso e enzimático. A: representação estrutural; B: representação tridimensional.

Devido ao ainda elevado custo computacional requerido para simular todos os átomos do sistema, optou-se por utilizar somente os resíduos a uma distância de 5 angstroms do substrato N-acetilglicosamina-1-fosfato.

O sistema com as moléculas reacionais e os aminoácidos circundantes foi então dividido nas camadas QM e MM. As moléculas participantes da reação: N-acetil-glicosamina-1-fosfato e uridina trifosfato foram selecionadas para a camada de mecânica quântica. Assim, para os aminoácidos circunvizinhos atribuiu-se a parte tratada pelo método de menor precisão: Mecânica Molecular. O método PM6 (STEWART, 2007) foi empregado para a parte QM enquanto o campo de força UFF (RAPPÉ et al, 1992) para a parte MM.

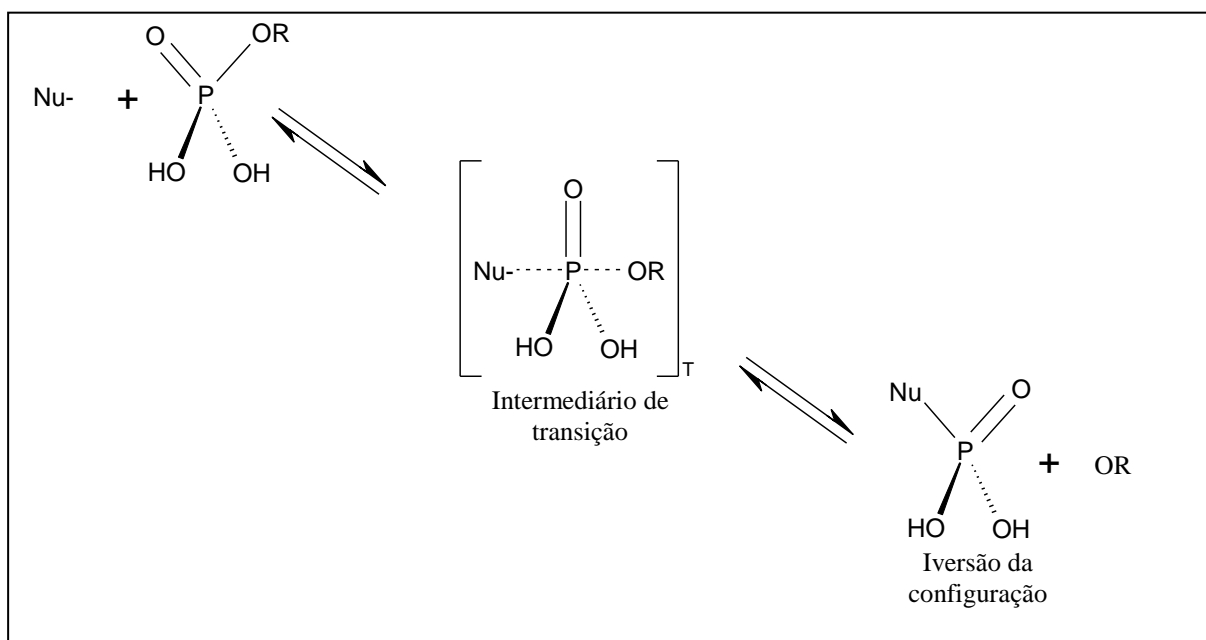
A simulação do mecanismo de ação sem a enzima foi realizada seguindo a linha de alguns autores que apontam a reação de transferência de ésteres de fosfato, a exemplo das reações envolvendo nucleosídeos mono, di e trifosfato, ocorrendo por meio do mecanismo de substituição nucleofílica-2 ( $S_N2$ ) (MARUYAMA ET AL, 2007; LEHNINGER; NELSON; COX, 2000). Para essa simulação optou-se por protonar os oxigênios ligados aos grupamentos fosfatos mantendo apenas o oxigênio de ataque, o nucleófilo, com carga negativa, como pode ser visto na figura 09 - A.

Um segundo escaneamento em meio enzimático, nos mesmos moldes do anterior, foi realizado tendo como diferencial a adição de uma cátion divalente de magnésio. Os resultados foram comparados com o escaneamento sem o metal objetivando elucidar a sua influência no sistema catalítico.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 CÁLCULOS EM MEIO SOLVENTE

Estudos com isótopos para reações de transferência de fosfodiésteres demonstraram a tendência da formação de uma geometria intermediária planar para os três oxigênios remanescentes enquanto o grupo de saída fica no pólo oposto ao nucleófilo de ataque. Conformação característica do mecanismo  $S_N2$  (figura 10) (CASSANO; ANDERSON; HARRIS, 2004).



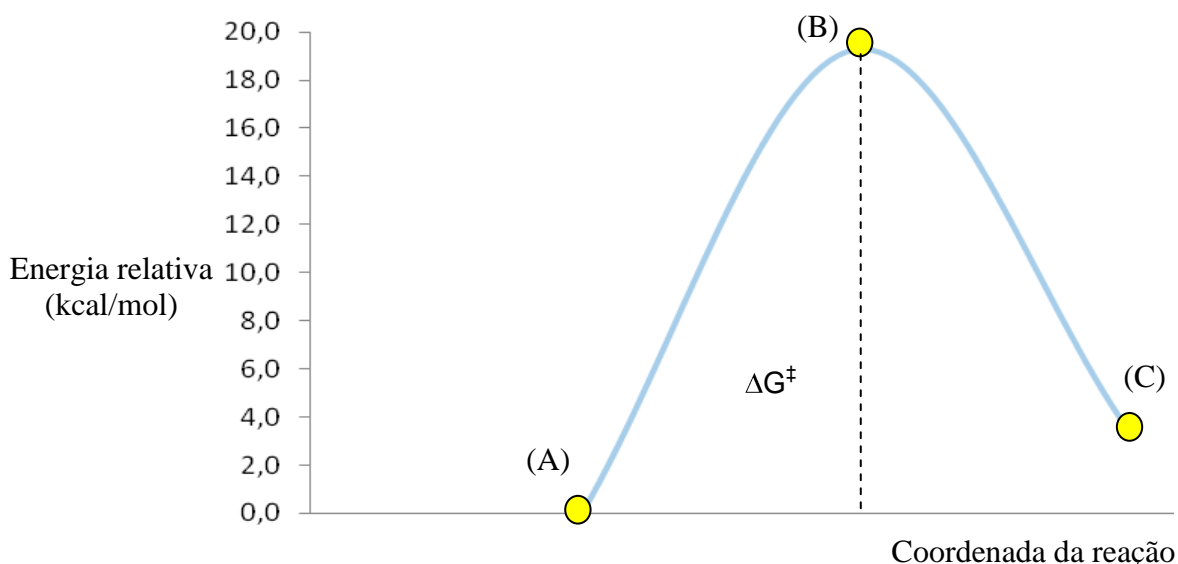
**Figura 10:** Estado de transição via mecanismo  $S_N2$  adotado como mecanismo de ação da reação estudada.

FONTE: Adaptado de CASSANO; ANDERSON; HARRIS, 2004.

Para a simulação do mecanismo descrito as estruturas UTP e N-acetilglicosamina-1-fosfato, previamente otimizadas pelo método PM6 utilizando solvatação implícita, foram analisadas ao longo das coordenadas da reação.

Como já descrito, atribuiu-se carga negativa ao oxigênio de ataque da reação, além do caráter nucleofílico conferido pela carga negativa, isto também facilita a sua orientação frente ao átomo de fósforo permitindo a repulsão dos átomos de oxigênio pertencentes ao grupamento fosfato.

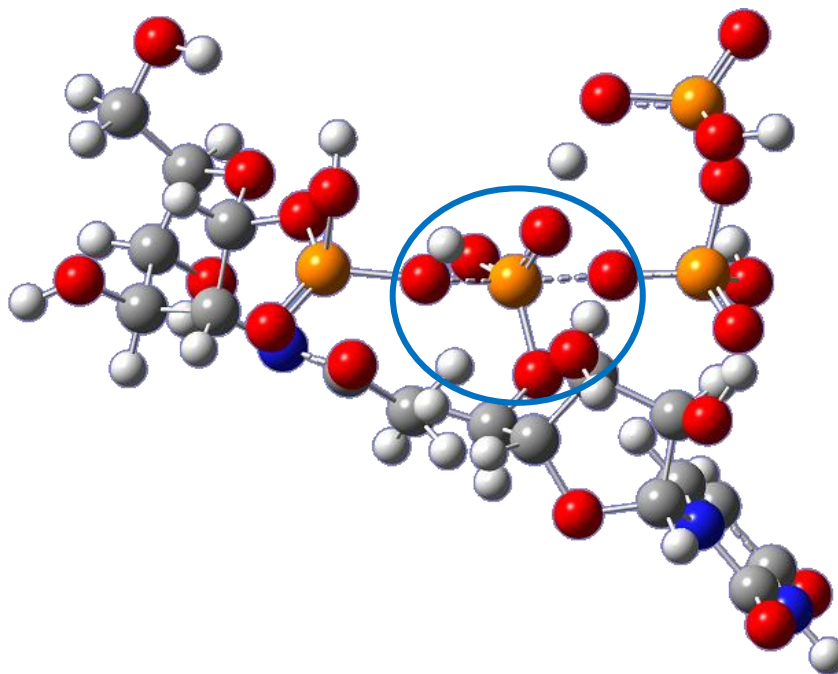
O escaneamento das coordenadas da reação conduziu a uma geometria muito próxima do que se espera ser o estado de transição. Entretanto, após exaustivas tentativas, não foi possível obter a configuração geométrica cuja presença de um único vetor negativo de frequência atômica caracterizaria a exata geometria do estado de transição. Assim, o critério para a obtenção do estado de transição reacional foi o mapa de energia potencial, ou seja, o gráfico que correlaciona as coordenadas da reação com a energia potencial do sistema. O gráfico obtido com a análise realizada para reagentes (N-acetilglicosamina-1-fosfato + UTP), estado de transição (intermediário com fosfato pentavalente) e produtos (UDP-N-acetilglicosamina + pirofosfato) no meio solvente pode ser visualizado na figura 11.



**Figura 11.** Perfil energético, em valores relativos, para a reação em meio solvente: A – reagentes N-acetilglicosamina-1-fosfato + UTP, (0 Kcal/mol) ; B – geometria do fosfato pentavalente, (19,28 Kcal/mol); C – produto UDP-N-acetilglicosamina + pirofosfato inorgânico (3,56 Kcal/mol). Energia de ativação  $\Delta G^\ddagger$  de 19,3 kcal/mol.

Os dados obtidos sugerem que o ataque do oxigênio presente no grupo fosfato da N-acetilglicosamina-1-fosfato, ao fósforo do grupo fosfato  $\alpha$  da uridina trifosfato resulte na formação de uma estrutura intermediária cujo átomo de fósforo atacado apresenta valência de valor 5, de forma que a valência volta ao valor 4 com a saída do grupo pirofosfato e fixação do grupo N-acetilglicosamina-1-fosfato. O estado de transição para reações de ésteres de fosfato descritas por Domingos e colaboradores (2003) apresenta esta mesma geometria pentavalente. O autor aponta ainda o caráter associativo desse mecanismo onde a espécie formada no ataque do nucleófilo apresenta geometria do tipo bipirâmide trigonal (BP.T),

conforme ilustra a figura 12. A energia de ativação para o estado pentavalente, com relação à energia dos reagentes da reação, foi de ~19,3 Kcal/mol.

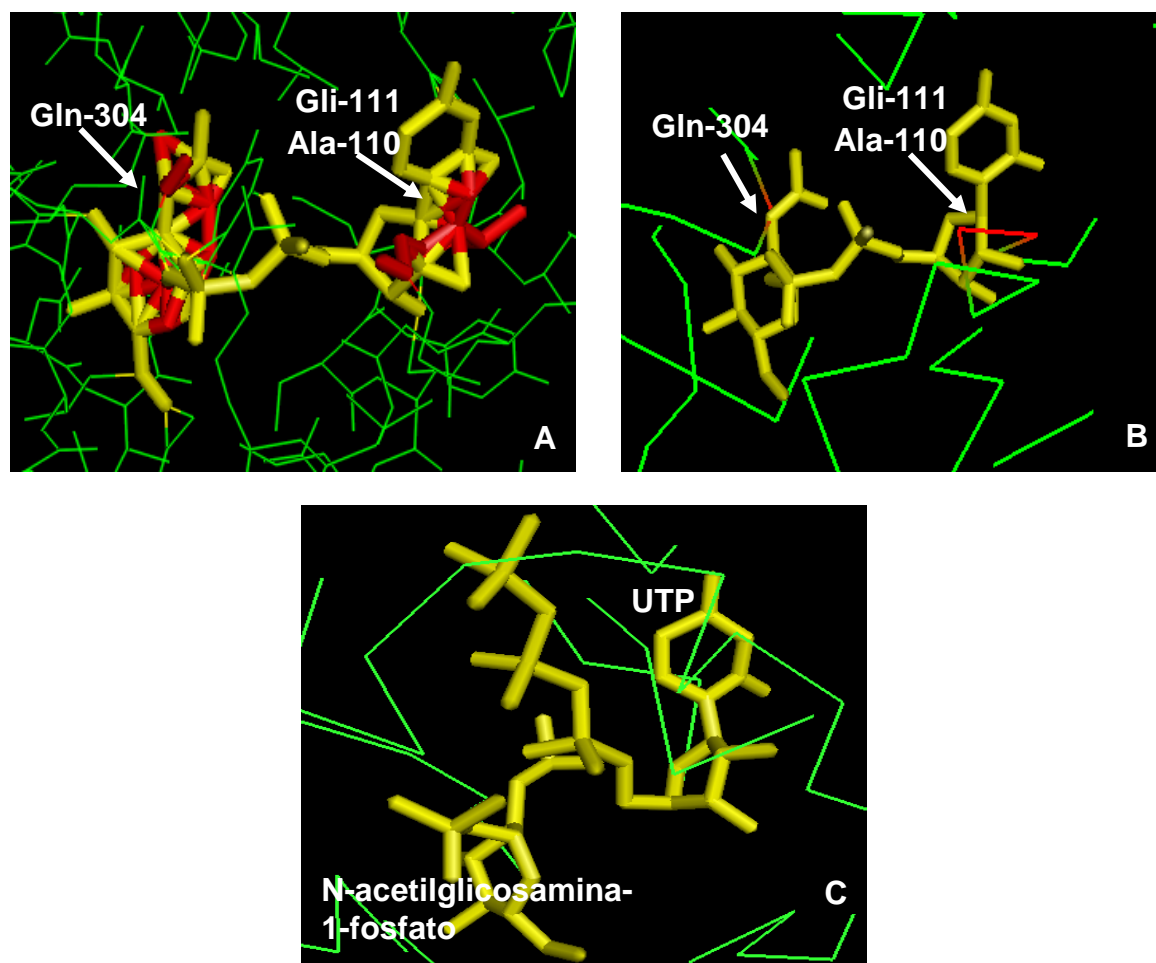


**Figura 12:** Estrutura tridimensional do intermediário com o átomo de fósforo pentavalente (destaque) obtido para o escanamento em meio solvente implícito.

## 5.2 ACOPLAMENTO DO SUBSTRATO NA ENZIMA PIROFOSFORILASE DE *M. PERNICIOSA*

O alinhamento das sequências das pirofosforilases de *M. pernicioso* e *Candida albicans* permite observar a conservação dos resíduos dos sítios ativos destas estruturas. Este fato ocorre mais acentuadamente entre as pirofosforilases de eucariotos, sendo já evidenciado em enzimas de *Homo sapiens*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Drosophila melanogaster*, dentre outros (MARUYAMA ET AL, 2007). Os resíduos adjacentes em até 5 Å de raio do produto UDP-N-acetilglicosamina, complexado à pirofosforilase da *C. albicans*, aparecem destacados na figura 13. Também em destaque nessa figura estão os resíduos do sítio ativo da enzima do fungo *M. pernicioso*, onde se pode perceber a conservação na sequência.

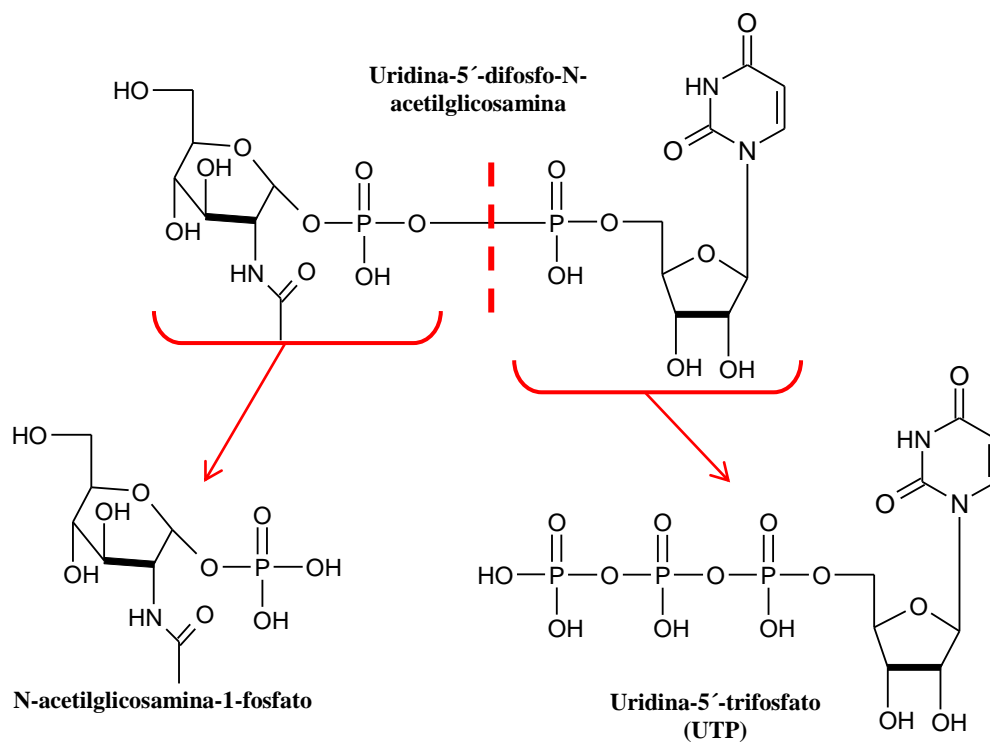




**Figura 14.** A e B – diferentes representações da pirofosforilase de *M. pernicioso* evidenciando os choques da UDP-N-acetilglicosamina (amarelo) com os resíduos de Gln-304, Ala-110, Gli-111 (em vermelho) após a sobreposição com a estrutura cristalográfica da respectiva enzima de *C. Albicans*; C – posicionamento da N-acetilglicosamina-1-fosfato e UTP após otimização da UDP-N-acetilglicosamina.

### 5.3 CÁLCULOS DE DINÂMICA MOLECULAR

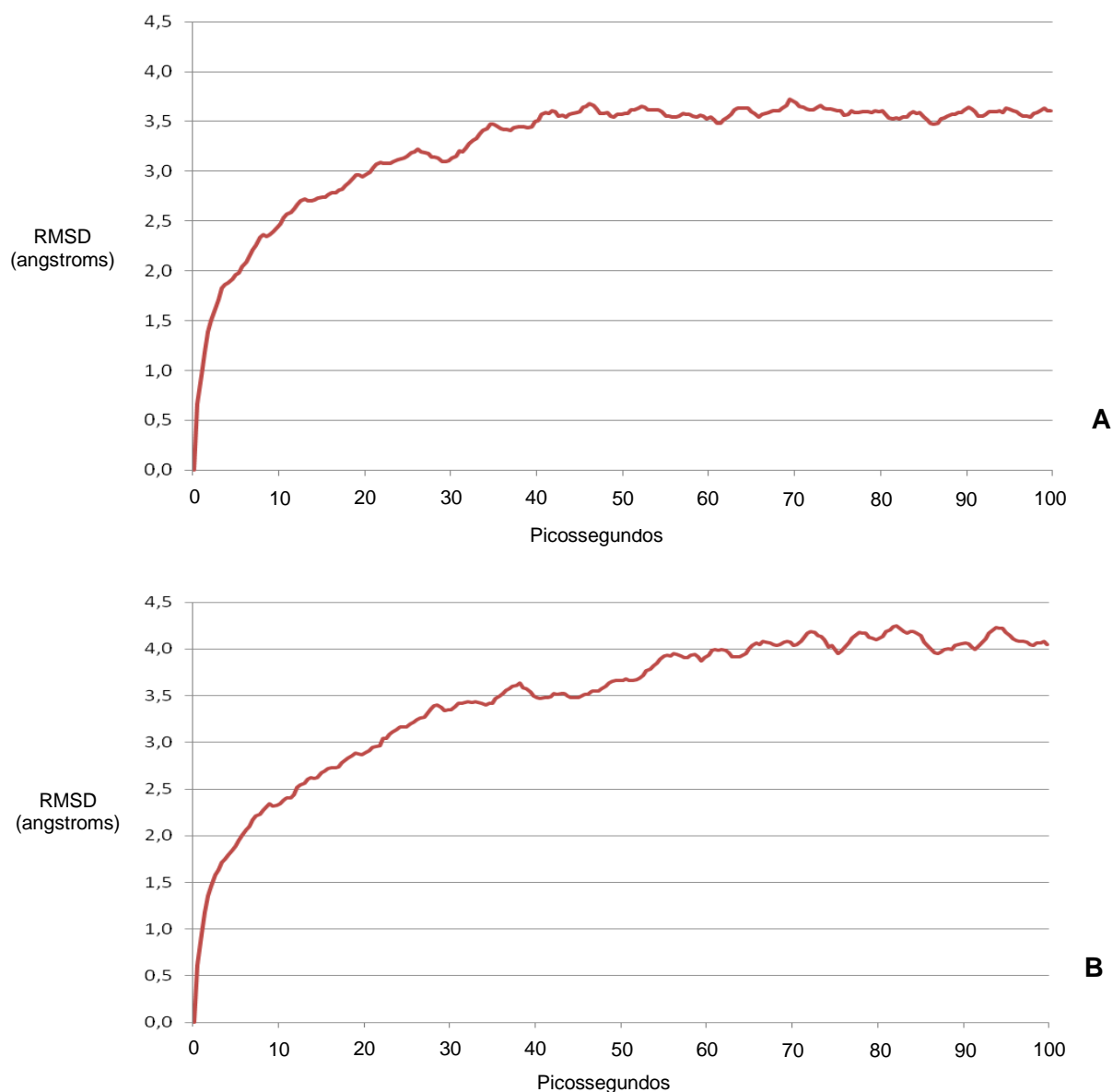
A geometria da UDP-N-acetilglicosamina no sítio ativo da pirofosforilase de *M. pernicioso*, obtida após a sobreposição e otimização descritas, foi utilizada como base para o posicionamento inicial do UTP e N-acetilglicosamina-1-fosfato utilizados como geometria de partida nos cálculos de DM. Para tanto, a estrutura do produto UDP-N-acetilglicosamina foi separada na ligação que une os dois componentes, de forma que possibilitasse o desenho estrutural destes, como está esquematizado na figura 15.



**Figura 15:** Esquema mostrando o local de separação da UDP-N-acetilglicosamina para o desenho das estruturas do UTP e N-acetilglicosamina-1-fosfato posicionadas no sítio ativo da pirofosforilase da *M. pernicioso*.

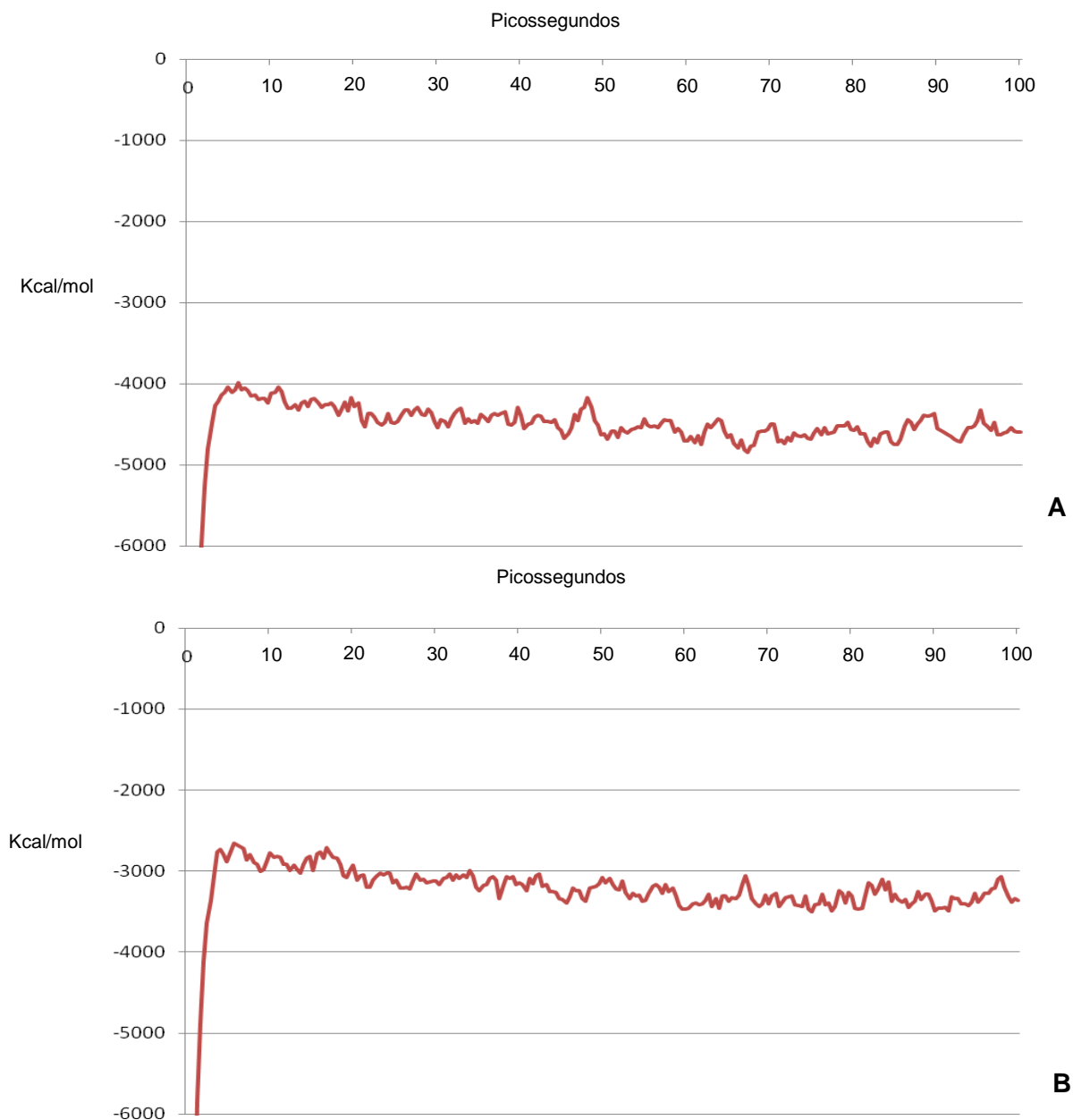
Uma vez obtida a geometria inicial do complexo enzima-substrato, este foi submetido aos dois cálculos de DM: dinâmica de aquecimento e, na seqüência, dinâmica longa (ou de produção). A simulação de DM inicial (DM de aquecimento de 0 a 300 Kelvin com duração de 100 picossegundos) evoluiu com estabilização energética do sistema. Os gráficos da figura 16 apresentam as variações da Raíz Quadrada Média de Desvio (RMSD) para a pirofosforilase com e sem substrato, em relação às respectivas geometrias iniciais, ao longo do tempo de simulação. Os gráficos da figura 17 apresentam a evolução da energia total pelo tempo para os sistemas com e sem substrato.





**Figura 16:** Gráfico do desvio RMSD pelo tempo da simulação de aquecimento (100 ps): A – Complexo entre a pirofosforilase de *M. perniciosus*, UTP e N-acetilglicosamina-1-fosfato; B – somente a pirofosforilase.

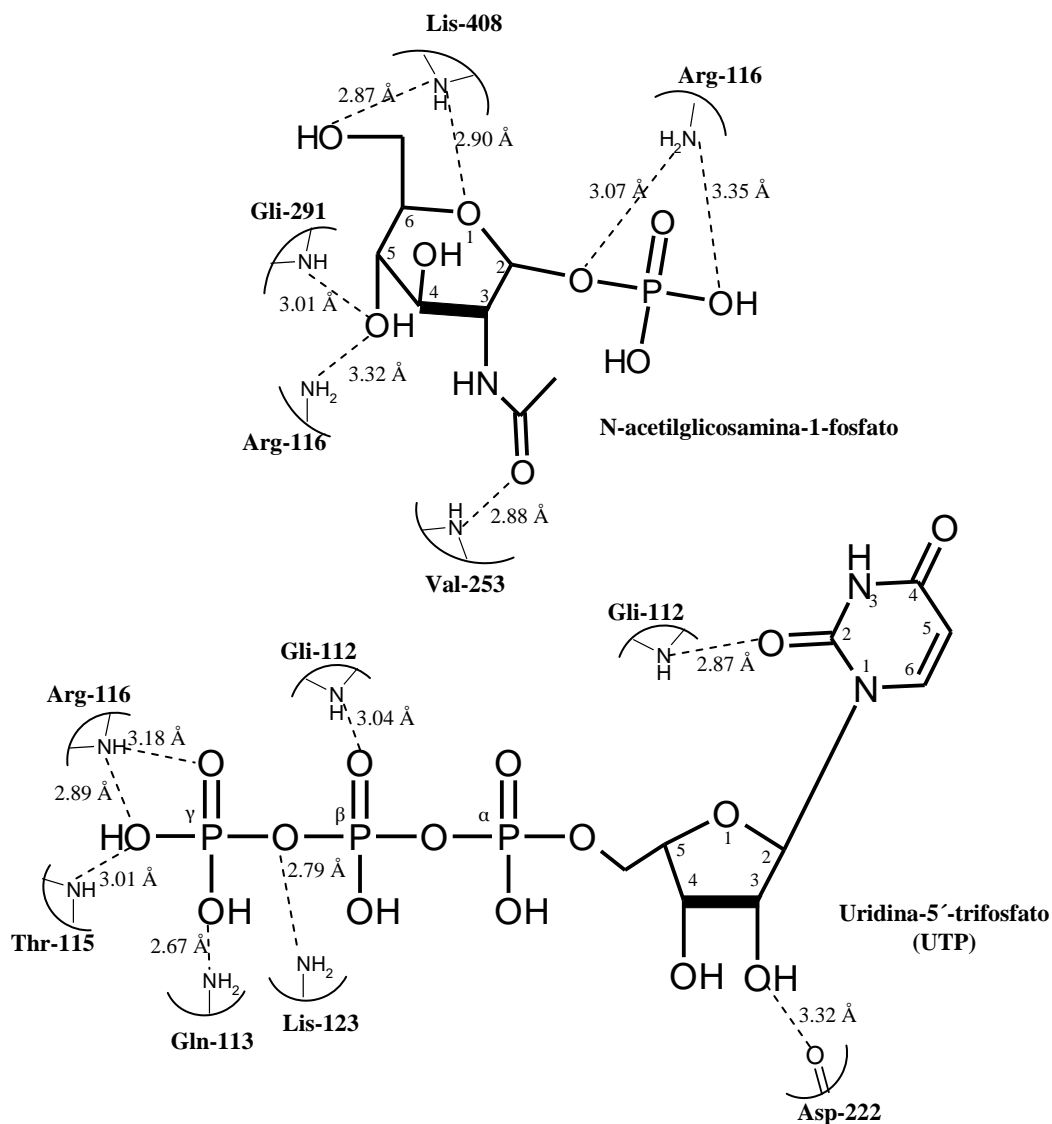
A análise dos gráficos da figura 16 permite observar que durante o curso da simulação a estrutura geométrica da pirofosforilase apresenta maiores variações quando o substrato não se encontra em seu sítio de ligação, o que se reflete nos maiores valores de RMSD apresentados. A instabilidade geométrica se reflete energeticamente através dos gráficos da figura 17. A energia média da pirofosforilase sem os substratos é de -3279,26 Kcal/mol enquanto que na sua presença, fica em -4556.5 Kcal/mol. Ambas as energias foram obtidas a partir da estrutura de equilíbrio, esta consiste numa geometria do sistema obtida considerando uma média das variações sofridas ao longo da trajetória da dinâmica molecular.



**Figura 17:** Gráfico da energia pelo tempo da simulação de aquecimento (100 ps): A – Complexo entre a pirofosforilase de *M. perniciosus* e UTP e N-acetilglicosamina-1-fosfato. B – somente a pirofosforilase.

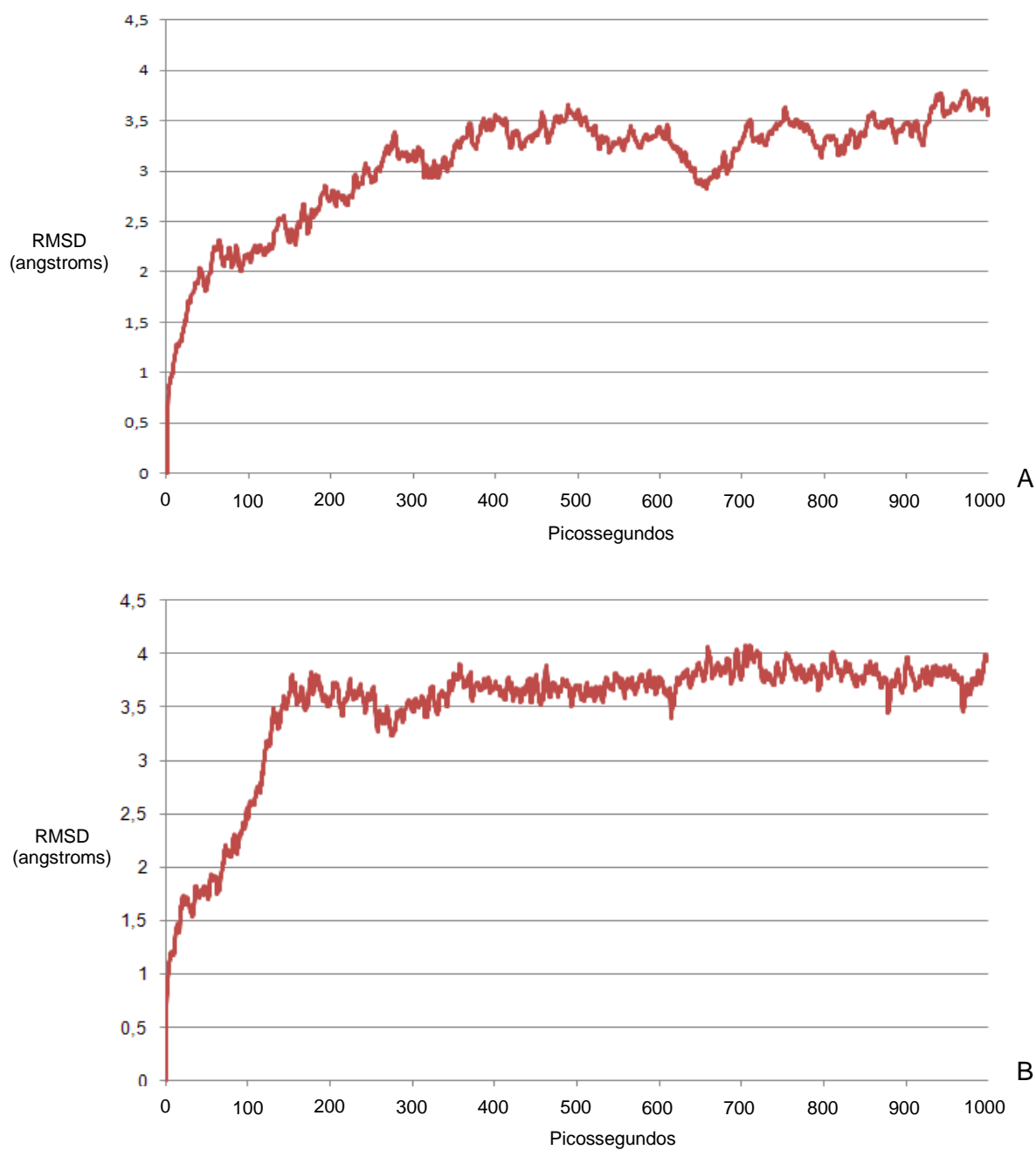
As principais interações entre o substrato, a UTP e a pirofosforilase na estrutura resultante da simulação de aquecimento são sumarizadas a seguir. Os resíduos de Gly-112, Gln-113, Gly-114, Thr-115, Arg-116, Leu-117, Lys-123 estabilizam os fosfatos da molécula de UTP através de ligações de hidrogênio. Os resíduos de Leu-200 e Leu-210 se encontram em posições favoráveis a ocorrência de interações hidrofóbicas enquanto a Gln-113 pode realizar uma ligação de hidrogênio com a uracila da uridina. A ribose é capaz de interagir com Asp-222, Gly-223, Asn-224 e Ile-355 através de ligações de hidrogênio. O açúcar da N-acetilglicosamina-1-fosfato pode ser estabilizado por interação hidrofóbica com a Cys-252 e por ligação de hidrogênio com a Gly-291, o grupo fosfato interage com a Arg-116 e a Asp-

254 através de ligações de hidrogênio. O grupamento acetil faz ligação de hidrogênio com a Val-253, sendo que a metila desse grupamento pode realizar interações hidrofóbicas com Glu-304. A figura 18 apresenta um esquema das principais interações após a dinâmica de aquecimento.

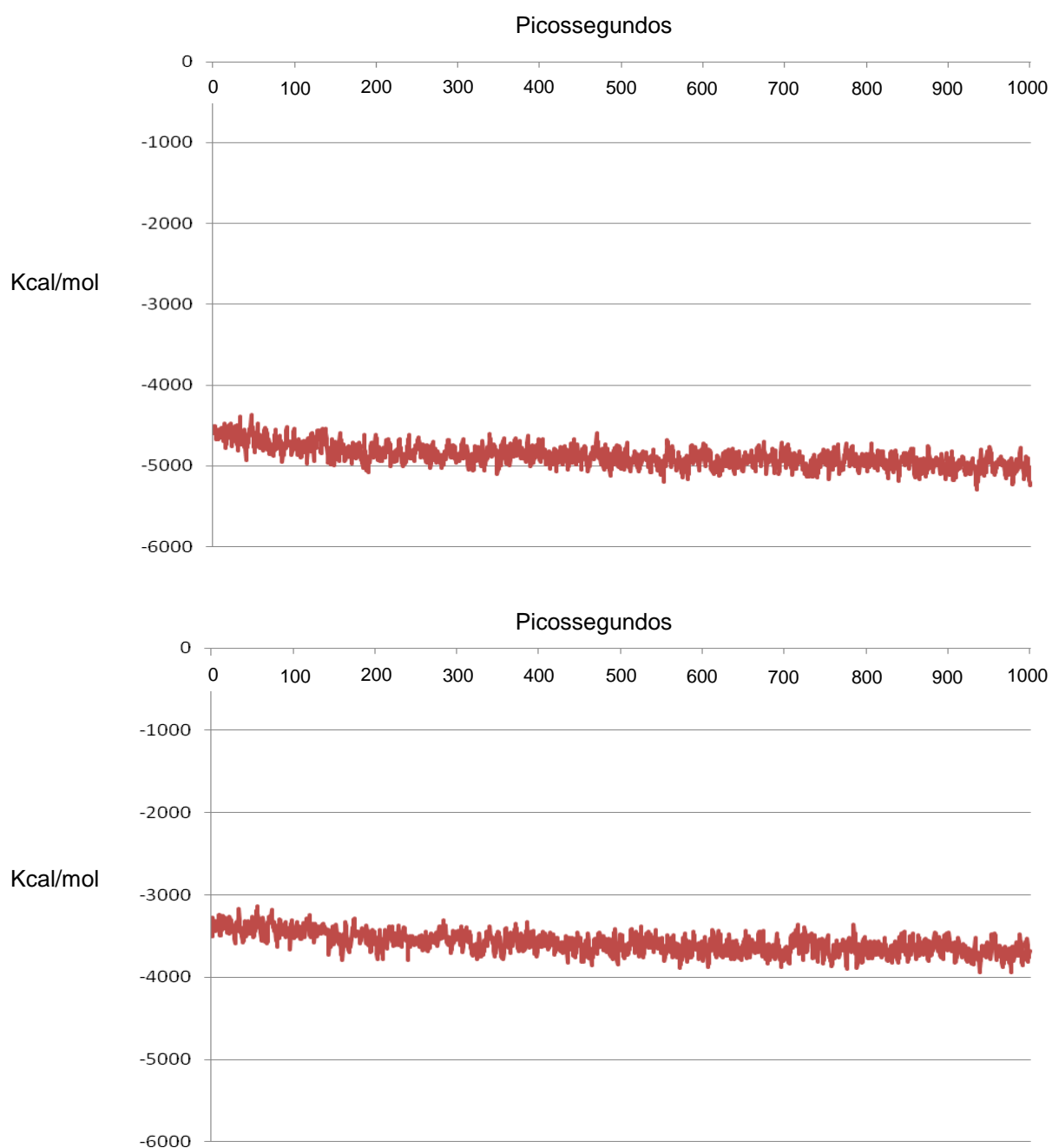


**Figura 18:** Esquema das principais interações intermoleculares que ocorreram entre o substrato N-acetilglicosamina-1-fosfato, a uridina-5'-trifosfato (UTP) e o sítio catalítico da pirofosforilase de *M. pernicioso* após a DM de aquecimento com duração de 100 picossegundos.

Os resíduos Lys-123, Gly-112, Arg-116 e Gly-291, da pirofosforilase descrita por Santos Júnios (2007), apresentam interações com o substrato semelhantes às descritas por Maruyama e colaboradores (2007). O sistema obtido após a DM de aquecimento foi submetido à uma nova simulação com duração de 1 nanossegundo. A evolução do sistema quanto ao desvio RMSD e energia são apresentados nas figuras 19 e 20 respectivamente.



**Figura 19:** Gráfico do desvio RMSD pelo tempo da simulação longa (1000 ps): A – Complexo entre a pirofosforilase de *M. pernicioso* e UTP e N-acetilglicosamina-1-fosfato; B – somente a pirofosforilase.



**Figura 20:** Gráfico do energia pelo tempo da simulação longa (1000 ps): A – Complexo entre a pirofosforilase de *M. perniciosus* e os substratos UTP e N-acetilglicosamina-1-fosfato; B – somente a pirofosforilase.

As evoluções do sistema ao longo de 1 nanossegundo apresentam um padrão que acompanha a DM de aquecimento com variações geométricas e de energia potencial um pouco mais elevadas para a pirofosforilase na ausência de substrato. A evolução energética claramente indica o efeito estabilizante da presença do substrato N-acetilglicosamina-1-fosfato e UTP.

As interações observadas após a dinâmica de 1 nanosegundo são descritas a seguir.

- Para a N-acetilglicosamina-1-fosfato:

O oxigênio da posição 1 bem como a hidroxila ligada à metila da posição 6 do anel da glicose podem realizar ligação de hidrogênio com o nitrogênio do resíduo Lis-408, distâncias de 2.90 e 2.99 Å respectivamente. O oxigênio do grupo acetil encontra-se a uma distância de 2.87 Å do nitrogênio da Val-253.

O oxigênio na hidroxila da posição 5 da glicose apresenta distância de 3.32 Å do oxigênio do grupo amida da Gln-330 e 3.46 Å do nitrogênio da amina da Gli-291. O oxigênio substituinte da posição 2 apresenta 3.17 Å de um átomo de nitrogênio da cadeia lateral da Arg-116 e 3.47 Å do nitrogênio da amina de cadeia lateral da Lis-408.

Dois dos oxigênios do grupo fosfato apresentam distâncias de 3.31 e 2.80 Å de um nitrogênio da cadeia lateral da Arg-116.

- Uridina trifosfato:

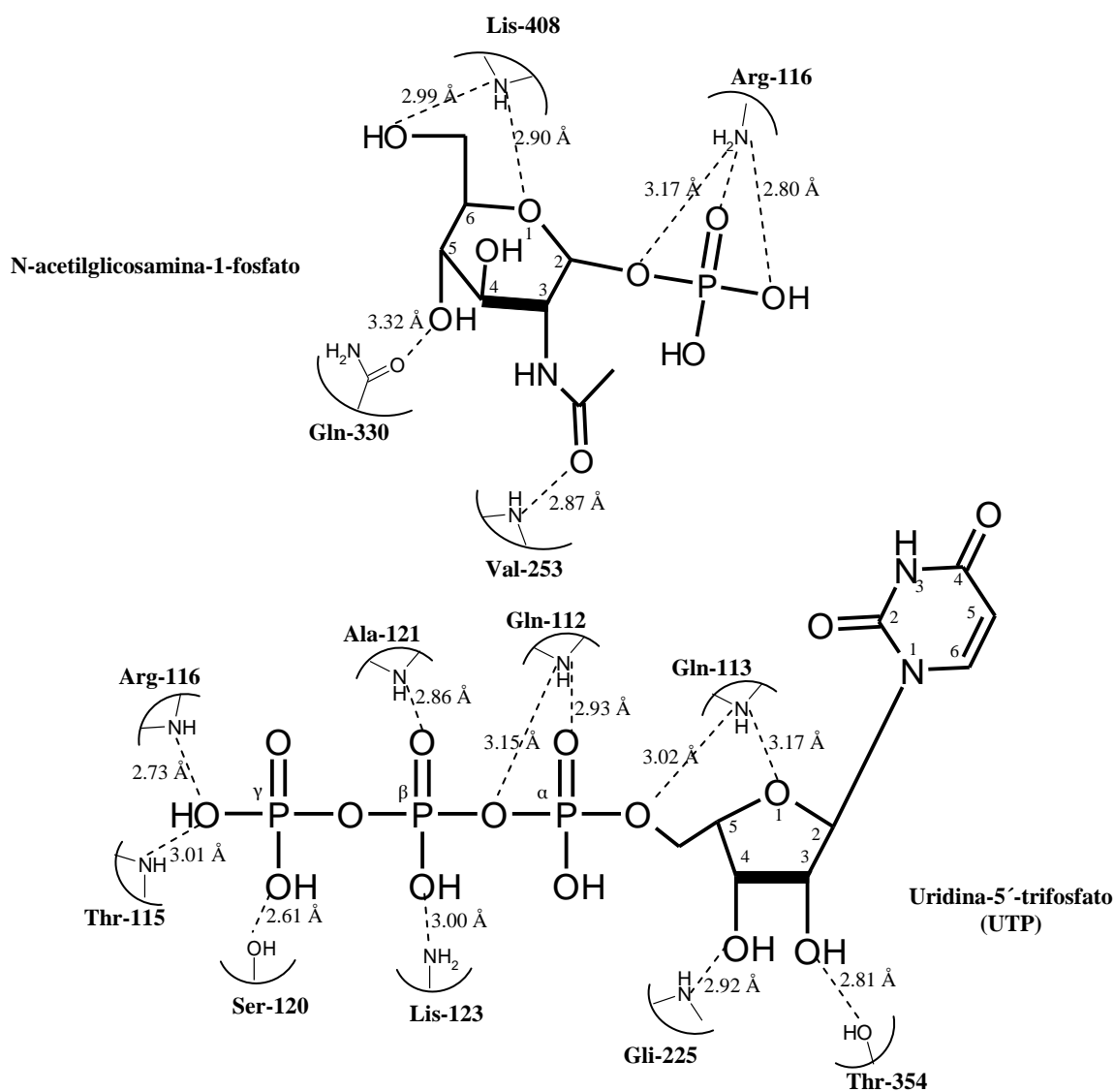
O oxigênio da posição 1 da ribose encontra-se a 3.17 Å do nitrogênio da função amina da Gln-113. O oxigênio da hidroxila substituinte da posição 3 apresenta 2.81 Å de distância do oxigênio da hidroxila de cadeia lateral da Thr-354. O oxigênio da hidroxila substituinte da posição 4 apresenta 2.92 Å de distância do nitrogênio da amina da Gli-225 e 3.27 Å do nitrogênio da amina da Asn-224.

O oxigênio que liga a ribose ao fosfato  $\alpha$  do UTP apresenta uma distância de 3.02 Å do nitrogênio do grupo amina da Gln-113 e 3.43 Å do nitrogênio amínico da Gli-114. Um oxigênio não ligado do grupamento fosfato  $\alpha$  apresenta a distância de 2.93 Å do nitrogênio amínico da Gli-112. O oxigênio que liga o fosfato  $\alpha$  ao  $\beta$  apresenta as distâncias de 3.15, 3.08 e 3.30 Å dos nitrogênios dos grupos amina dos resíduos de Gli-112, Gln-113 e Gli-114 respectivamente.

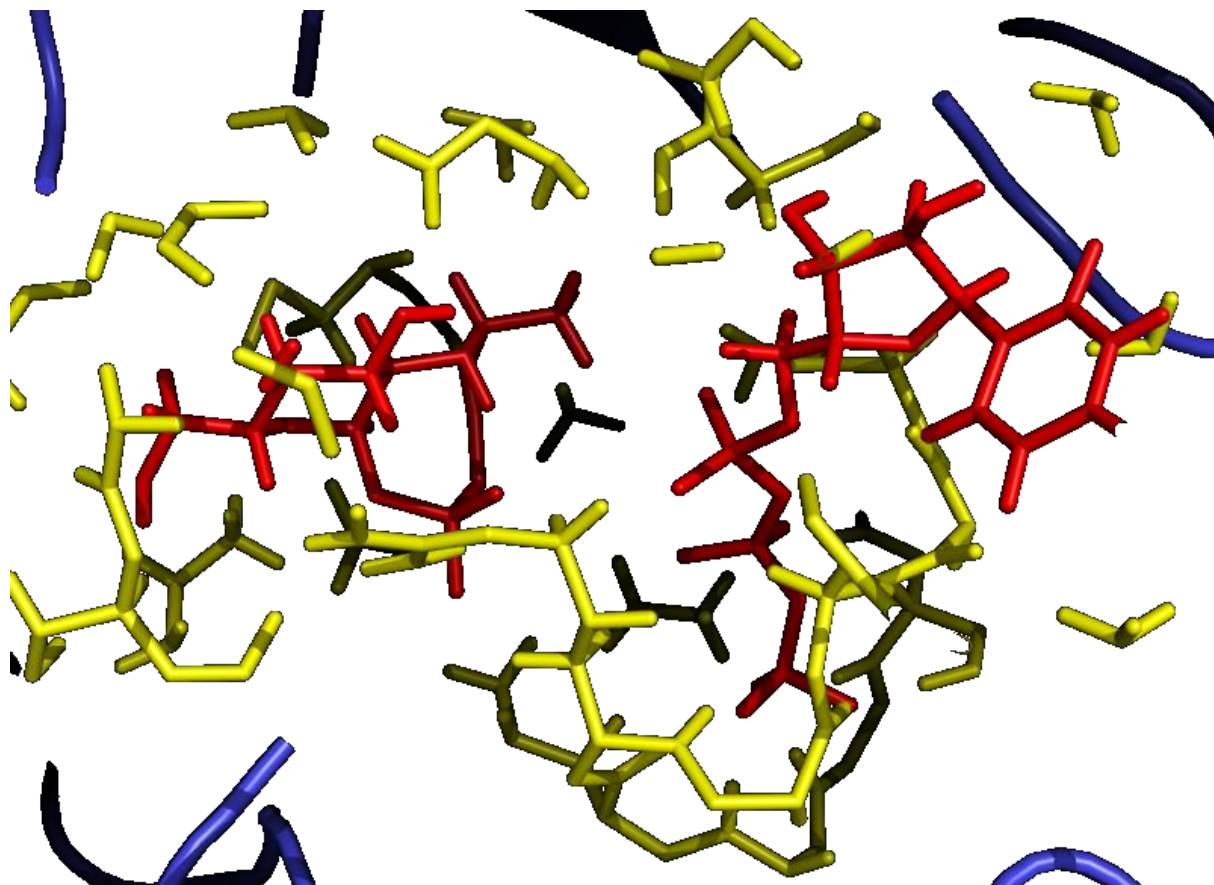
Os oxigênios livres ligados ao fosfato  $\beta$  apresentam distâncias de 2.86 e 3.00 Å para o nitrogênio da amina da Ala-121 e para o nitrogênio da cadeia lateral da Lis-123 respectivamente. O oxigênio que liga o fosfato  $\beta$  ao  $\gamma$  apresenta a distância de 2.93 Å do nitrogênio dos grupos amina da Gli-114.

Os oxigênios livres ligados ao fosfato  $\gamma$  podem realizar numerosos contatos com átomos polares de resíduos circunvizinhos. Um dos oxigênios apresenta as distâncias de 3.01, 2.73, 2.80 e 2.88 Å dos nitrogênios das que ligam os resíduos Thr-115, Arg-116, Leu-117 e Gli-118 respectivamente. O segundo oxigênio tem 3.19 e 2.90 Å dos nitrogênios dos resíduos de Ser-119 e Ser-120, apresenta também 2.61 Å de distância do oxigênio da hidroxila do ultimo resíduo.

Devido ao caráter polar das moléculas de substrato, os possíveis contatos hidrofóbicos são de pouca frequência, o resíduo de Tre-353 contém grupos apolares num raio de 3.40 Å de uma região hidrofóbica do anel da uracila. As figuras 21 e 22 apresentam esquema de interações e a representação tridimensional da geometria após a DM respectivamente.



**Figura 21:** Esquema das principais interações intermoleculares que ocorreram entre o substrato N-acetilglicosamina-1-fosfato, a uridina-5'-trifosfato (UTP) e o sítio catalítico da pirofosforilase de *M. pneumoniae* após a DM com duração de 1 nanossegundo.



**Figura 22:** Aspecto tridimensional das moléculas de N-acetilglicosamina-1-fosfato e UTP, ambas em vermelho, após a Dinâmica Molecular de 1 nanossegundo. Em amarelo, os resíduos de aminoácidos mais próximos a estas moléculas.

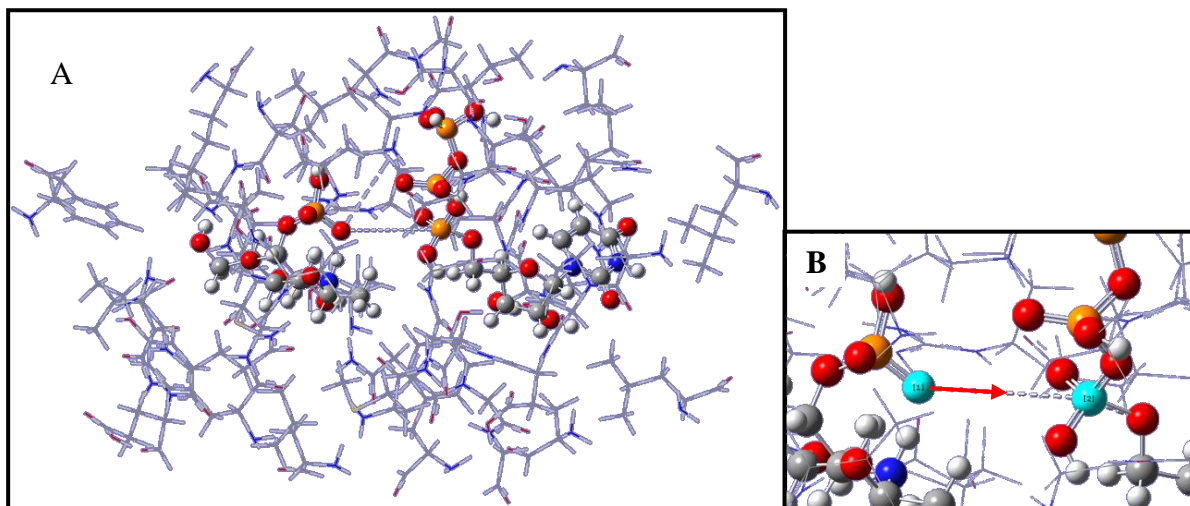
#### 5.4 CÁLCULOS DO MECANISMO DE REAÇÃO EM MEIO ENZIMÁTICO

O escaneamento das coordenadas da reação em meio enzimático, executado a partir da estrutura resultante da DM, foi realizado considerando os aminoácidos circunvizinhos às moléculas participantes da reação. Os resíduos dentro de um raio de 5 Å de cada átomo das moléculas participantes da reação foram selecionados por representarem os resíduos do sítio catalítico da pirofosforilase.

Após o recorte dos resíduos circundantes das moléculas envolvidas na reação, a divisão do sistema pelo método ONIOM pode ser visualizada na figura 23 onde a camada QM consiste nas moléculas de N-acetilglicosamina-1-fosfato e UTP definidos como alta camada e



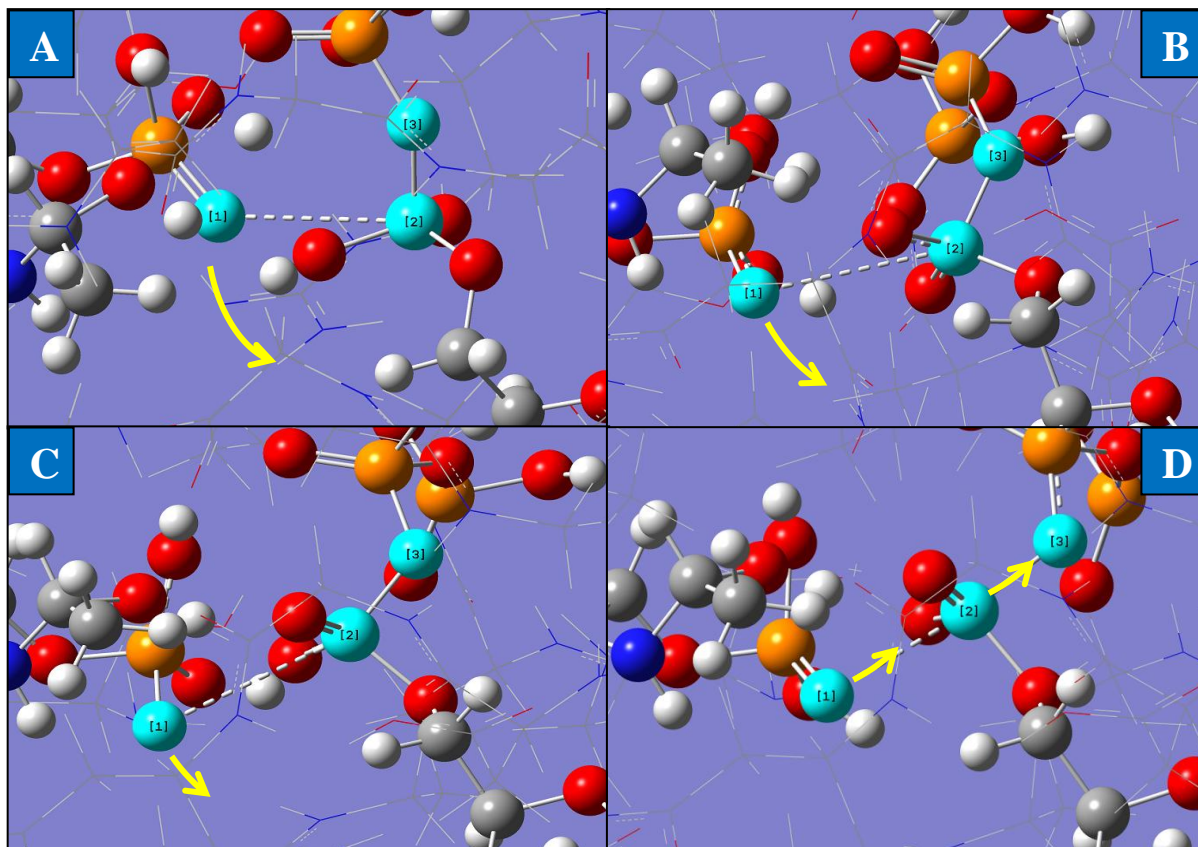
tratados com o método PM6 (STEWART, 2007). O restante do sistema foi tratado com o campo de força UFF descrito por Rappé (1992).



**Figura 23:** A – Divisão das camadas no esquema ONIOM, na representação em *ball & stick* a camada com tratamento quanto-mecânico (N-acetilglicosamina-1-fosfato e UTP), na representação em *wires*, a camada com tratamento molecular-mecânico (aminoácidos no raio de 5 Å de distância); B – detalhe do sentido da coordenada de reação estudada: aproximação do oxigênio da N-acetilglicosamina-1-fosfato sentido fósforo do fosfato  $\alpha$  do UTP.

Conforme ilustrado na figura 23-B o sentido do movimento do oxigênio nucleófilo foi explorado através da sua aproximação gradual ao átomo de fósforo do grupamento fosfato, mantendo uma geometria que permite o correto posicionamento inicial das estruturas para o ataque nucleofílico ao grupo fosfato  $\alpha$  do UTP e a saída do grupamento pirofosfato.

A figura 24 ilustra o procedimento de correção da angulação do oxigênio de ataque. Basicamente se procedeu com um escaneamento explorando o ângulo entre os átomos de oxigênio de ataque, o fósforo a ser atacado e o oxigênio do grupo de saída, este último pertencente ao pirofosfato, até que o ângulo destes átomos chegasse próximo a  $180^\circ$ . A cada mudança de angulação em  $0.7^\circ$ , a geometria do sistema era simultaneamente otimizada.

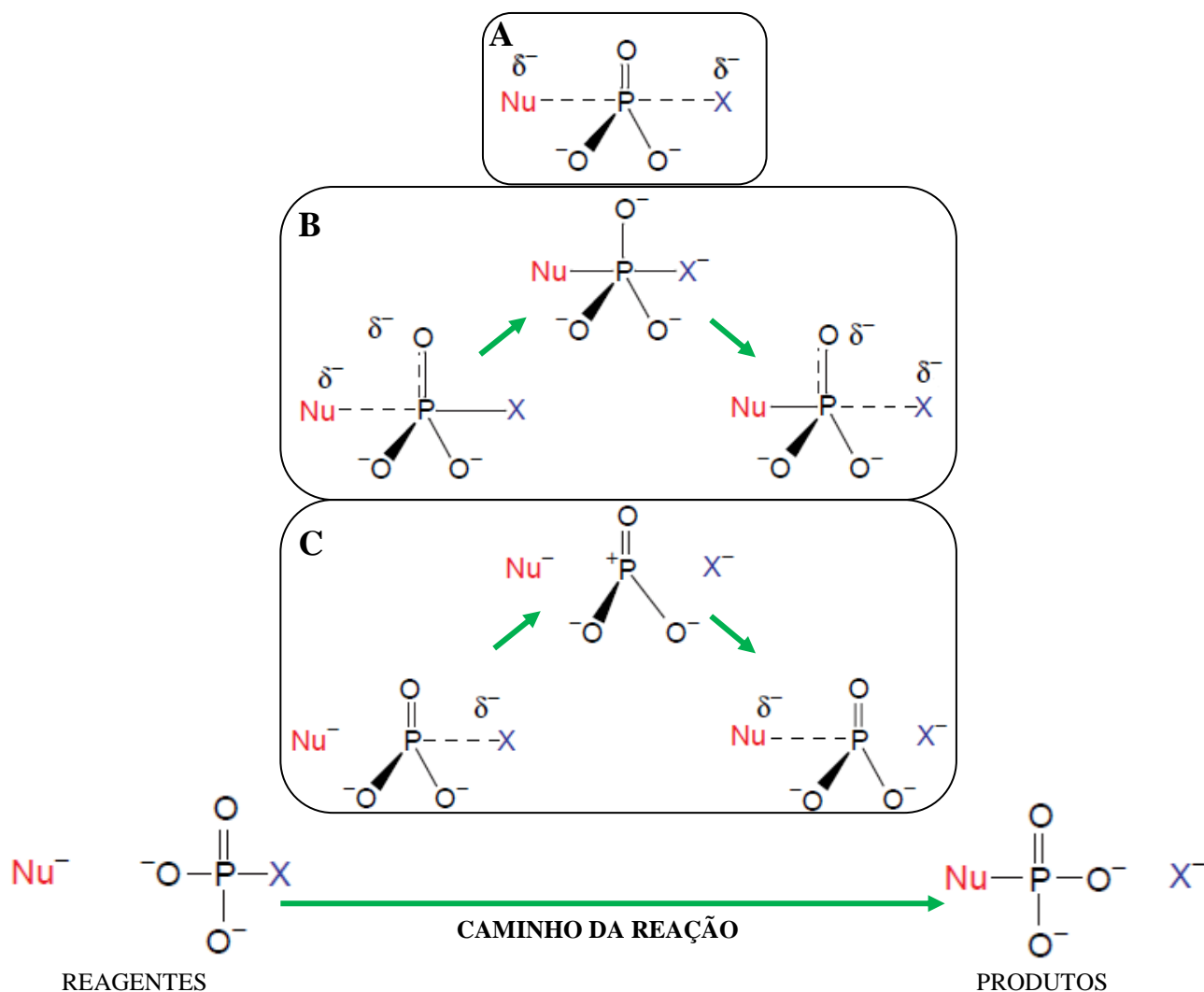


**Figura 24:** Correção do ângulo formado pelos átomos de oxigênio nucleofílico, fósforo e oxigênio do grupo de saída (átomos 1, 2 e 3 respectivamente, destacados em A, B, C e D) para o ataque nucleofílico: A – ângulo inicial de 98°; B – 127°; C – 148°; D – 172°.

Semelhante ao processo realizado em meio solvente, o ataque do oxigênio ao fosfato  $\alpha$  da estrutura do UTP promoveu a formação de um intermediário pentavalente, para a posterior liberação do pirofosfato. Domingos e colaboradores (2003) descrevem este mecanismo como  $S_N2(P)$  devido à semelhança ao processo de substituição  $S_N2$  que ocorre para carbonos tetraédricos.

É importante notificar que reações de substituição nucleofílica envolvendo transferências de grupamentos fosfatos podem se processar por diferentes mecanismos de ação, dentro de um modelo geral  $S_N2$ . Allen e Dunaway-Mariano (2004) descrevem três mecanismos possíveis para essas transferências: A - mecanismo associativo, B - de adição-eliminação e C – dissociativo. Cada mecanismo é ilustrado na figura 25.

Os mecanismos diferem entre si pelo tempo de formação da ligação do grupo de ataque e de saída. Dentre as vias de mecanismos, para um determinado sistema, uma se destaca sobre as demais prevalecendo como mecanismo principal.



**Figura 25:** Mecanismos de substituição nucleofílica para fosfatos. A: associativo; B: adição-eliminação; C: Dissociativo.

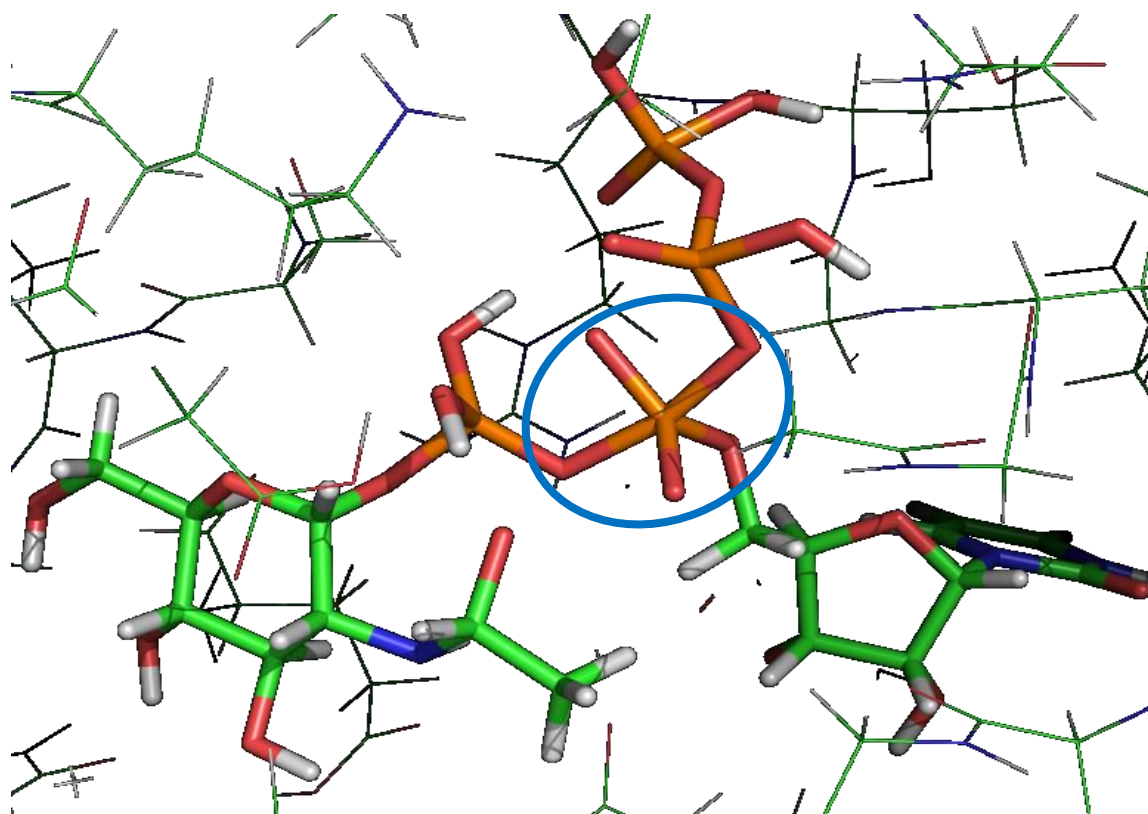
FONTE: Adaptado de ALLEN E DUNAWAY-MARIANO, 2004.

Allen e Dunaway-Mariano (2004) afirmam que em meio solvente os fatores que determinam qual via será a mais utilizada consistem nas naturezas dos nucleófilo, eletrófilo, grupos de saída e solvente. Apontam ainda que existem evidências de que enzimas que catalizam transferências de grupos fosfato realizam os três mecanismos, porém, os fatores que determinam a seletividade por uma das vias ainda não estão suficientemente claros.

O estudo das coordenadas de reação da pirofosforilase de *M. perniciosus* determinou a geometria do estado pentavalente do grupo fosfato, seu aspecto tridimensional pode ser visualizado na figura 26. A análise da estrutura do intermediário sugere um mecanismo do tipo adição-eliminação de acordo com a classificação de Allen e Dunaway-Mariano (2004).

As coordenadas de reação obtidas nos cálculos são concordantes com o mecanismo de adição-eliminação citado. O intermediário pentavalente surge após uma gradual aproximação do nucleófilo, esta aproximação provoca o distanciamento do oxigênio do grupo de saída. No mapa de energia potencial desta reação o ponto mais alto apresenta uma configuração em que o oxigênio nucleófilo apresenta uma distância de 1,8091 Å do átomo de fósforo do fosfato  $\alpha$ , e o oxigênio do grupo pirofosfato apresenta 1,7592 Å desse mesmo átomo de fósforo. Ambos encontram-se ainda ligados ao átomo de fósforo como é possível ver na figura 26.

Como ocorreu no cálculo em meio solvente, não foi possível localizar uma única frequência negativa indicando a geometria exata do estado de transição. As suas principais interações com o sítio catalítico consistem na estabilização dos oxigênios dos grupamentos fosfato por grupamentos de aminoácidos básicos como a arginina-116. Essa estabilização eletrostática é favorável uma vez que compostos orgânicos com grupos fosfatos tendem a serem ionizados por apresentarem em geral valores de constante ácida relativamente baixos (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000).



**Figura 26:** Aspecto tridimensional do ataque nucleofílico ao fosfato  $\alpha$  do UTP determinando a geometria pentavalente do átomo de fósforo (em destaque), mecanismo  $S_N2(P)$ .

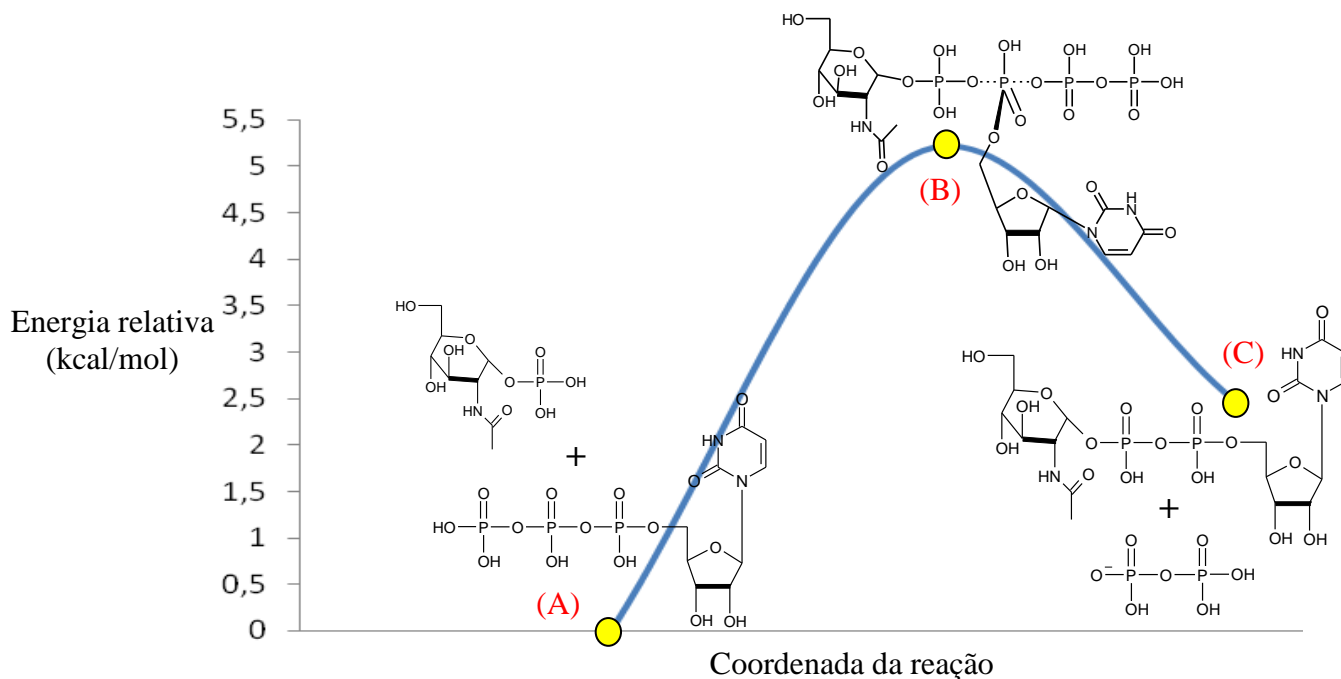
A estabilização dos oxigênios não ligados pertencentes aos grupos fosfatos pode contribuir com a catálise. Esta estabilização de carga pode ocorrer por meio eletrostático ou por via da sua protonação, a qual pode ser possível em ambientes específicos como em sítios catalíticos enzimáticos, mesmo sob um pH do meio externo mais básico. Assim, a diminuição da sua carga negativa também diminui a carga do centro do grupo fosfato, fazendo-o eletronicamente similar a um fosfotriester, onde o fosfato apresenta menor polarização pela dispersão da sua carga. Isso implicaria em menor repulsão do nucleófilo, facilitando a consecução da reação de substituição nucleofílica (CASSANO; ANDERSON; HARRIS, 2004).

Na geometria do fosfato pentavalente, a hidroxila da posição 5 da N-acetilglicosamina pode interagir com os resíduos Gli-291, Iso-329 e Tir-251, com interações polares possibilitando formação de ligações de hidrogênio. O nitrogênio substituinte da posição 3 encontra-se a 3.40 Å do oxigênio da hidroxila da Tir-251. Um dos oxigênios ligados ao grupo fosfato interage com a hidroxila da Asp-254.

O oxigênio que realiza o ataque nucleofílico no fosfato  $\alpha$  do UTP é estabilizado pelo nitrogênio da amina primária de cadeia lateral da Arg-116 (3.22 Å), este resíduo também estabiliza um oxigênio do fosfato  $\gamma$  utilizando o nitrogênio do seu grupo amina, mantendo uma distância de 3.55 Å. O resíduo de Gli-112 pode interagir com dois dos oxigênios não ligados à ribose pertencentes ao fosfato  $\alpha$  atacado, através do seu grupo amina, distâncias 3.40 e 3.21 Å. A mesma Gli-112, através do seu grupo carbonila, interage também com um oxigênio do fosfato  $\beta$ .

O fosfato  $\gamma$  tem seus oxigênios interagindo com o grupo amina da Thr-115 e hidroxila da Ser-119, com distâncias de 3.18 e 3.56 Å respectivamente. O oxigênio que liga a ribose ao fosfato  $\alpha$  apresenta 3.36 Å de distância ao nitrogênio do grupo amina da Gli-114. A Gln-113 pode interagir com o oxigênio heterocíclico da ribose através do seu nitrogênio do grupo amina que apresenta 3.45 Å. O oxigênio da hidroxila da posição 4 da ribose apresenta 3.45 Å de distância do nitrogênio do grupo amina da Gli-225, enquanto o oxigênio da hidroxila da posição 3 mantém uma distância de 3.39 Å da Thr-354. A figura 27 ilustra um esquema das interações observadas na geometria do fosfato pentavalente em meio enzimático.



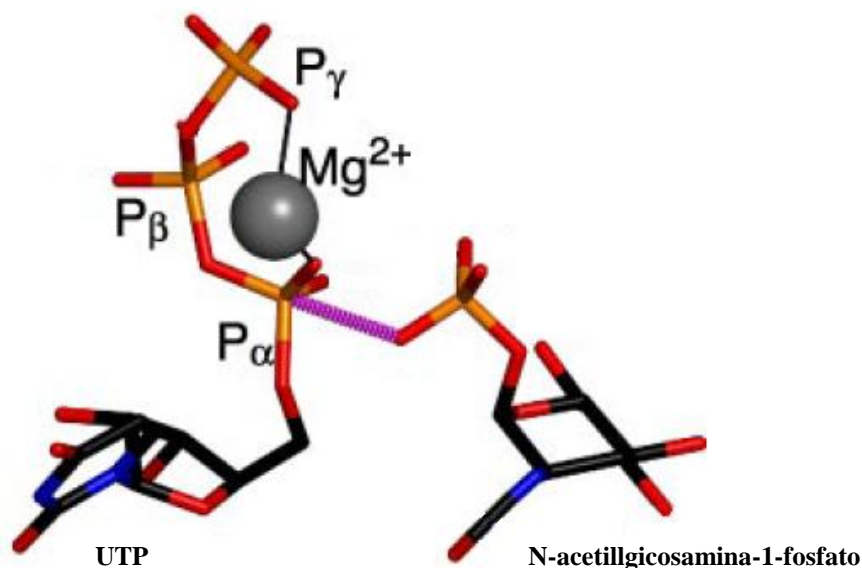


**Figura 28:** Perfil energético, em energias relativas, da reação em meio enzimático: A – reagentes N-acetilglicosamina-1-fosfato + UTP, (0 Kcal/mol) ; B – geometria do fosfato pentavalente, (5,16 Kcal/mol); C – produto UDP-N-acetilglicosamina + pirofosfato inorgânico (2,47 Kcal/mol)

O escaneamento das coordenadas da reação em meio enzimático apresentou um perfil energético que pode ser visualizado na figura 28. Esse perfil revela uma energia de ativação menor do que a observada no estado solvente, 5 kcal/mol contra 19 kcal/mol. Estes dados seriam esperados devido ao poder do sítio catalítico em diminuir tal energia. O que pode ser observado também é a importância dos resíduos Arg-116, Lis-123, Gli-113 e Gli-225 na orientação das estruturas reacionais. Estes resíduos devem ser considerados na concepção de uma nova estrutura inibitória, com destaque para o resíduo de Arg-116, que é descrito como indispensável para a atividade enzimática (MARUYAMA et al, 2007). Os resultados também sugerem o resíduo de Gli-112 como função orientadora do posicionamento da molécula de UTP no sítio catalítico, este realiza interações com três oxigênios da molécula de UTP, como não ocorreram observações de destaques em outros trabalhos, pode-se inferir que tal resíduo deve ser também considerado na confecção de inibidores da pirofosforilase de *M. perniciososa*.

A literatura aponta que a presença de cátions divalentes como  $Mg^{+2}$ ,  $Co^{+2}$  e  $Mn^{+2}$  aumentam a eficiência de formação do produto N-acetilglicosamina-1-fosfato pelas pirofosforilases (OLSEN; RODERICK, 2001). Baseando-se na localização do cátion divalente sugerida por Maruyama e colaboradores (2007) para a realização da catálise, um átomo de magnésio foi posicionado próximo aos fosfatos  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  como ilustra a figura 29. Na

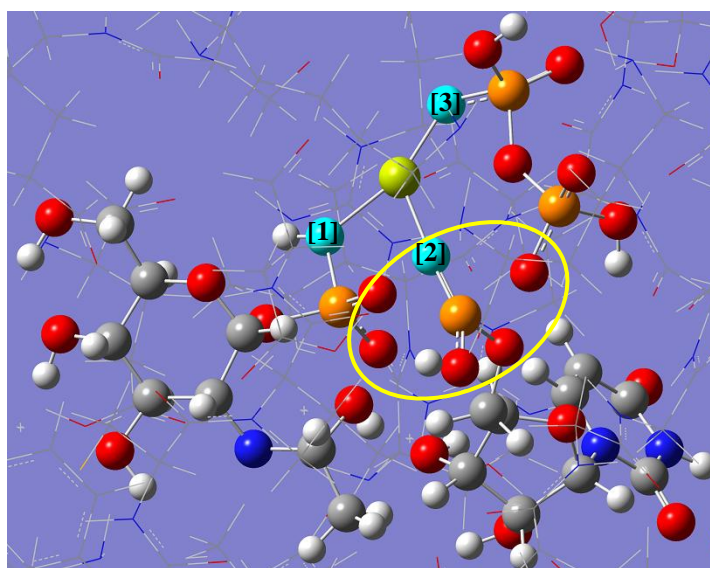
tentativa de mensurar a influência do cátion  $Mg^{+2}$  na reação, um escaneamento das coordenadas reacionais foi então realizado. Para essa simulação, o magnésio foi incluído à camada QM e optou-se por adicionar uma carga negativa em um átomo de oxigênio do fosfato  $\gamma$  de modo a contrabalancear a carga +2 do magnésio e deixar o sistema QM neutro.



**Figura 29:** Posicionamento do cátion  $Mg^{+2}$  para a realização do escaneamento das coordenadas de reação.

FONTE: Adaptado de MARUYAMA et al (2007)

De modo semelhante à reação sem magnésio, adotou-se o mecanismo  $S_N2$  para o escaneamento, o qual é proposto também por Kostrewa e colaboradores (2001). A geometria do intermediário de maior energia obtido pela reação é ilustrada na figura 30.



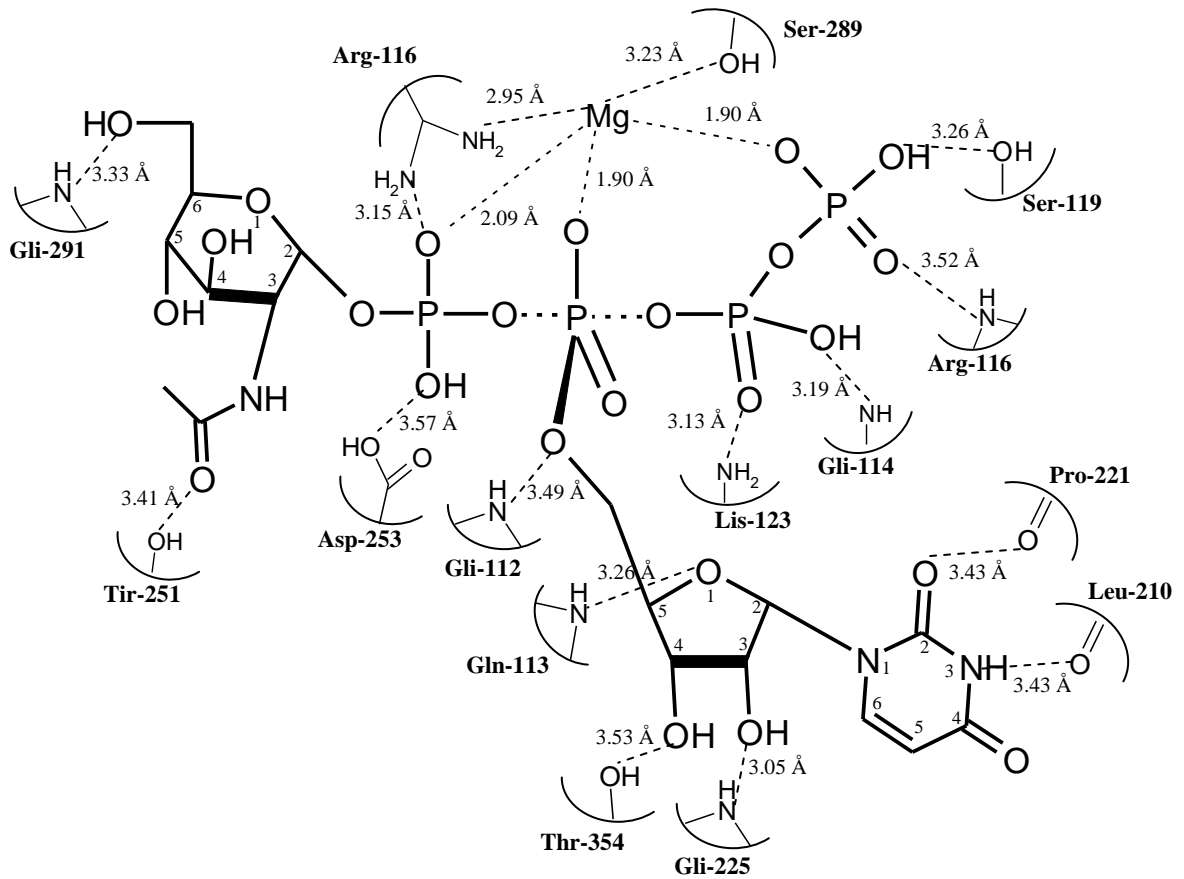
**Figura 30.** Geometria da estrutura de maior energia obtida nos cálculos de escaneamento com adição do magnésio (em verde) no meio enzimático. [1], [2] e [3]: oxigênios com os quais o metal interage. Em destaque em amarelo a estrutura do fosfato planar intermediário.



A interação da estrutura intermediária com o magnésio ocorre através dos oxigênios do fosfato da N-acetilglicosamina-1-fosfato, a uma distância 2,09 Å. O cátion também interage com um oxigênio do fosfato  $\alpha$  (1,90 Å) e um oxigênio do fosfato  $\gamma$  (também 1,90 Å). O magnésio apresenta distâncias de 2,95 e 3,23 Å dos resíduos de Arg-116 (contato com um nitrogênio de cadeia lateral) e Ser-289 (contato com oxigênio da hidroxila) respectivamente.

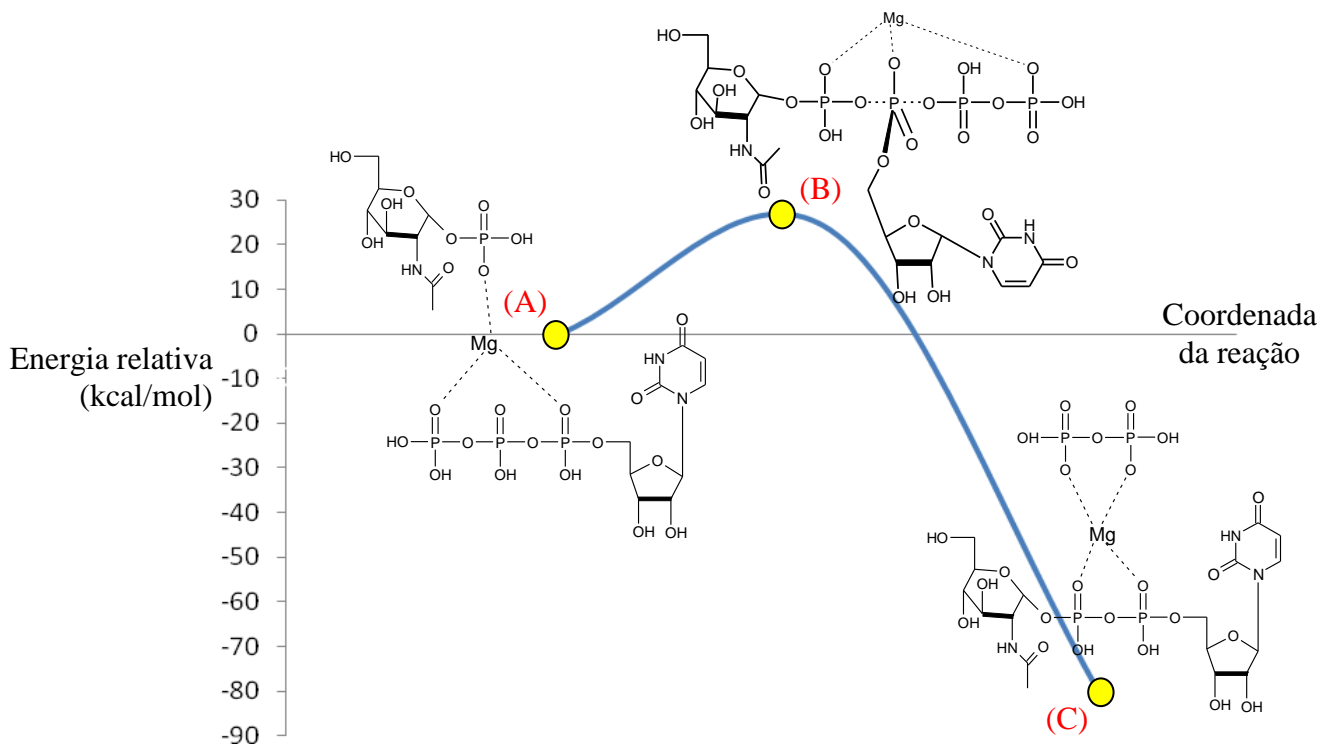
A análise da geometria do intermediário de maior energia na presença do magnésio sugere que seu mecanismo de substituição nucleofílica ocorra por dissociação, ao contrário da reação na ausência do magnésio, cuja estrutura sugere uma via de adição-eliminação. A configuração da estrutura da figura 30 revela uma distância de 2,06 Å entre o oxigênio nucleofílico e o átomo de fósforo do fosfato  $\alpha$  do UTP, e uma distância de 2,01 Å entre o oxigênio do grupo de saída e o mesmo átomo de fósforo. Essas distâncias sugerem que nenhum dos oxigênios se ligue ao grupamento fosfato, perfazendo uma estrutura também denominada de metafosfato.

O intermediário metafosfato, dentre outros contatos, apresenta estabilizações realizadas pelos resíduos, Gli-112, Gli-113, Arg-116, Lis-123 e Gli-225, resíduos já descritos como importantes para a atividade enzimática. A Gli-112 interage com o oxigênio que liga a ribose ao fosfato, esse oxigênio apresenta 3,49 Å de distância do nitrogênio do resíduo. O nitrogênio da Gli-113 e o oxigênio heterocíclico da ribose distam 3,26 Å entre si. Um nitrogênio de cadeia lateral da Arg-116 interage com o fosfato  $\alpha$  apresentando 3,15 Å de um dos seus oxigênios, o nitrogênio da amina principal deste resíduo apresenta 3,52 Å de um oxigênio do fosfato  $\gamma$ . O nitrogênio da cadeia lateral da Lis-123 apresenta 3,13 Å de um oxigênio pertencente ao fosfato  $\alpha$ . A Gli-225 pode realizar ligação de hidrogênio com a hidroxila substituinte da posição 3 da ribose com o átomo de nitrogênio da amina, que apresenta uma distância de 3,05 Å. O resíduo de Thr-354 estabiliza a hidroxila da posição 4. As principais interações realizadas com o intermediário metafosfato são esquematizadas na figura 31.



**Figura 31.** Esquema das interações entre a molécula com intermediário metafosfato, o cátion de magnésio e o sítio catalítico da pirofosforilase de *M. perniciosa*.

O perfil energético após o escaneamento pode ser visualizado na figura 32.



**Figura 32:** Perfil energético, em energias relativas, da reação em meio enzimático com magnésio: A – reagentes N-acetilglucosamina-1-fosfato + UTP, (0 kcal/mol) ; B – geometria do fosfato pentavalente, (23,55 kcal/mol); C – produto UDP-N-acetilglucosamina + pirofosfato inorgânico (-81,01 kcal/mol).

A análise dos parâmetros energéticos permite observar uma grande variação da energia do produto UDP-N-acetilglicosamina quando comparada ao escaneamento sem a adição do cátion de magnésio. Em termos comparativos, o escaneamento sem o magnésio revelou -1786,34 Kcal/mol de energia para a estrutura do produto contra -1825,53 Kcal/mol obtida com a adição do cátion, a diferença é de 39,19 Kcal/mol. Uma possível explicação para este fato pode ser o maior contato do cátion com o pirofosfato inorgânico resultante da reação. O pirofosfato concentra as duas cargas negativas do sistema as quais seriam mais eficientemente neutralizadas pelas cargas positivas do magnésio diminuindo as tensões e repulsões.

Os achados de Zea, Camci-Unal e Pohl (2008) reforçam essa hipótese. Em seu trabalho evidenciaram experimentalmente o desprendimento energético decorrente da ligação de cátions divalentes ( $Mg^{+2}$  e  $Mn^{+2}$ ) a fosfatos de uridina e seus subprodutos reacionais. Os resultados apontaram que os cátions apresentam maiores afinidades ao contato com o pirofosfato inorgânico do que com o fosfato de uridina. Essa maior afinidade pode decorrer justamente por essa neutralização de cargas.

Os resultados energéticos não apontaram um decréscimo da energia de ativação em comparação com o sistema sem o magnésio. Estes resultados são intrigantes podendo sugerir algumas hipóteses, por exemplo, que o posicionamento do cátion relatado por Maruyama e colaboradores (2007) não seria o mais provável para o processamento da reação. Muito embora Maruyama e colaboradores (2007), em concordância com Lehninger, Nelson e Cox (2000), sugeriram que o aumento da eficiência da catálise ocorra devido à estabilização das cargas negativas dos oxigênios ligados aos grupamentos fosfatos da molécula de UTP, o ponto de inserção do cátion pode não ter sido detalhadamente elucidado. Uma outra hipótese, em última análise, pode sugerir que o mecanismo reacional  $S_N2$  pode não ser a principal rota de produção da UDP-N-acetilglicosamina. Solomons e Fryhle (2009) afirmaram que a energia de ativação entre reagentes e o intermediário de transição, para um dado mecanismo, deve ser a mais baixa possível para que a reação se processe por esse mecanismo.

## 6. CONCLUSÃO

O presente trabalho consistiu na elucidação teórica do mecanismo catalítico da enzima pirofosforilase do fungo *M. pernicioso*. As etapas para o estudo consistiram no acoplamento do produto UDP-N-acetilglicosamina no sítio catalítico da enzima baseando-se na geometria da estrutura cristalográfica da pirofosforilase do fungo *Candida Albicans*, descrita por Maruyama e colaboradores (2007). A geometria do produto acoplado foi utilizada para o desenho dos reagentes que o formam, UTP e N-acetilglicosamina-1-fosfato. O sistema foi então submetido a cálculos de Dinâmica Molecular e a estrutura resultante, finalmente, foi utilizada para os estudos do mecanismo molecular de catálise.

Uma série de estudos sobre reações envolvendo ésteres de fosfatos apontam que o mecanismo de formação do produto catalítico, UDP-N-acetilglicosamina, é uma substituição nucleofílica tipo 2 ( $S_N2$ ) onde um átomo de oxigênio ataca o fosfato  $\alpha$  da molécula de uridina trifosfato formando, na sequência, um estado de transição no qual o átomo de fósforo atacado apresenta-se pentavalente, e, por fim, ocorreria a formação do produto, UDP-N-acetilglicosamina com a liberação de pirofosfato inorgânico.

Seguindo o mecanismo  $S_N2$  proposto, o estudo das coordenadas da reação elucidou a geometria do intermediário com fosfato pentavalente, o qual realiza interações para estabilização e orientação molecular com os resíduos de Arg-116, Lis-123, Gli-113 e 225, resíduos estes já descritos com a mesma função para pirofosforilases de outros organismos. Os cálculos sugeriram também importante papel no posicionamento do fosfato  $\alpha$  da molécula de UTP pela Gli-112, todos estes resíduos, em especial a Arg-116, essencial para a atividade enzimática, devem ser considerados para a confecção de novos candidatos a inibidores da enzima.

Devido ao aumento descrito da eficiência de catálise em decorrência da presença de cátions divalentes, o escaneamento das coordenadas da reação foi realizado também com a inserção de um cátion de magnésio no sistema enzimático. O cálculo elucidou um intermediário de maior energia cuja configuração geométrica sugere uma estrutura dissociativa que, ao contrário dos resultados obtidos com o sistema na ausência do magnésio, não apresentou a diminuição da energia de ativação reacional o que levou a algumas hipóteses como explicação. Uma delas baseia-se num posicionamento errôneo do cátion de magnésio na

estrutura do sistema. A hipótese de que o mecanismo de substituição pode não se passar via  $S_N2$  foi também cogitada.

Estudos de mecanismos catalíticos de sistemas biológicos de interesse, a nível molecular, representam uma das principais ferramentas para o entendimento e manipulação da sua atividade. Programas de química computacional aliados ao alto poder de processamento das máquinas atuais permitem a simulação de sistemas com números de átomos cada vez maiores, o resultado é a descrição precisa dos eventos analisados.

O planejamento racional de moléculas bioativas deriva dessa metodologia, uma vez que grande parte destes compostos é projetada com base em informações estruturais obtidas em estudos teóricos. A elucidação de mecanismos e estados de transição de reações enzimáticas é interessante para esse planejamento. O estado de transição de uma reação enzimática apresenta a geometria em que há maior afinidade entre a enzima catalisadora e seu substrato. Diante disto, o desenho de novas moléculas, considerando as interações com a enzima e a conformação observadas para o estado de transição representa uma importante estratégia para o planejamento de novos compostos, com maiores chances de inibição da enzima de interesse.

O presente trabalho representa mais uma etapa dos estudos envolvendo o fungo *M. pernicioso* com vistas ao desenvolvimento de um novo agente antifúngico que o inviabilize e, por consequência, represente uma alternativa para o controle da vassoura-de-bruxa do cacauero. As próximas etapas consistirão na proposição e testes de novos inibidores direcionados à enzima pirofosforilase de *M. pernicioso*, baseando-se, dentre outras fontes, também nas informações do mecanismo de catálise desta enzima obtidas neste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, C.J., MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. Celular Wall. In\_\_\_\_\_. *Introductory mycology*. 4. ed. New York: J. Wiley, 1996. 868 p. cap. 4.
- ALLEN, K. N.; DUNAWAY-MARIANO, D. Phosphoryl group transfer: evolution of a catalytic scaffold. **TRENDS Bioch. Sciences**. v. 29, n.9, p.495-503, 2004.
- BORGOGNONI, C. F.; POLAKIEWICZ, B.; PITOMBO, R. N. M. Estabilidade de emulsões de D-limoneno em quitosana modificada. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. v. 26, n. 3, p. 502-508, 2006.
- BOTANISCHER GARTEN, 2007. *Theobroma cacao*. Disponível em: <<http://www.botanik.uni-karlsruhe.de/garten/fotos-knoch/Theobroma%20cacao%20-Echter%20Kakaobaum%207.jpg>>, Acesso em: 20 Abr. 2010.
- CASE, D. A. et al. **Amber 9**: User Manual. San Francisco: University of California, 2006, 320 p.
- CASSANO, A. G.; ANDERSON, V. E.; HARRIS, M. E. Understanding the transition states of phosphodiester Bond cleavage: insights from heavy atom isotope effects. **Biopolymers**. v. 73, p. 110-129, 2004.
- COCOA CROP PROTECTION. **The world's worst cocoa problems**. Disponível em: <[http://www.dropdata.org/cocoa/cocoa\\_prob.htm](http://www.dropdata.org/cocoa/cocoa_prob.htm)>, acesso em: 20 Abr. 2010.
- COMPANHIA DAS DOCAS DO ESTADO DA BAHIA, 2002. **Apresenta em estatística os principais produtos movimentados**. Disponível em: <http://www.cobeda.com.br/portoilheus>. Acesso em: 25 jan. 2005.
- DE LUCA, C. et al. Overexpression, one-step purification and characterization of UDP-glucose dehydrogenase and UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase. **Biorg. Med. Chem**. v. 4, n.1, p. 131-142, 1996.
- DEL PINO, J. C. et al. Cinética Química - Mecanismos de reação. **Grupo de Pesquisa em Educação a Distância**. UFRGS. Disponível em: < <http://www.iq.ufrgs.br/ead/fisicoquimica/cineticaquimica/mecanismos.html>> acesso em: 20 abr. 2010.
- DOMINGOS, J. B. et al. A química dos ésteres de fosfato. **Quim. Nova**. v. 26, n.5, p. 745-753, 2003.
- FIORAVANTI, C. A vassoura varrida. **Revista Pesquisa FAPESP**. n. 128, 2006.
- FRISCH, M. J. et al. **Gaussian 09, Revision A.1**. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- GRIFFITH, G. W. et al. Autecology and evolution of the wicth' broom patogen (*Crinipellis pernicioso*) of cocoa. In: BLAKEMAN, J. P.; WILLIAMISON, B. **Eco. Plant Pathog**. Oxon: CAB International, 1994, p. 245-267.

GRIFFITH, G. W. et al. Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. **N. Zeland J. Bot.** v. 41, p. 423-435, 2003.

GRIFFITH, R.; TRACY, T. Antifungal drugs. In: WILLIAMS, D. A.; LEMKE, L. **Foye's principles of medicinal chemistry**. 5. ed. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins, 2002, p. 891-903.

GUEX, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**. v. 18, n. 15, p. 2714-2723, 2007.

HAWKINS, G.D.; CRAMER, C. J.; TRUHLAR, D.G. Parametrized models of aqueous free energies of solvation based on pairwise descreening of solute atomic charges from a dielectric medium. **J. Phys. Chem.** n. 100, p. 19824-19839, 1996.

HERSCOVICS, A.; ORLEAN, P. Glycoprotein biosynthesis in yeast. **FASEB Journal**, n. 7, p. 540-550, 1993.

HU, H.; YANG, W. Development and application of ab initio QMM/MM methods for mechanistic simulation of reactions in solution and in enzymes. **J. Mol. Struct.: Theochem.** n. 898, p. 17-30. 2009.

ISHITANI, R; TERADA, T; SHIMIZU, K. Refinement of comparative models of protein structure by using multicanonical molecular dynamics simulations. **Molecular Simulation**, n. 34, p. 327-336, 2008.

KITCHEN, D. B. et al. *Docking* and Scoring in Virtual Screening for Drug Discovery: Methods and Applications. **Nature Reviews**. v. 3, p. 935-949, 2004.

KOSTREWA, D. et al. Crystal structures of *Streptococcus pneumoniae* N-acetylglucosamine-1-phosphate Uridyltransferase GlmU, in apo form at 2.33 Å resolution and in complex with UDP-N-acetylglucosamine and Mg<sup>+2</sup> at 1.96 Å resolution. **J. Mol. Biol.** v. 305, p. 279-289, 2001.

LASCHUK, E. F. **Novo Formalismo Semi-Empírico para Cálculos Químico-Quânticos**. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS-BR, 2005.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Reimpressão, 2000.

MARUYAMA, D. et al. Crystal Structure of Uridine-diphospho-N-acetylglucosamine Pyrophosphorylase from *Candida albicans* and Catalytic Reaction Mechanism. **J. Bio. Chem.** v. 282, n. 23, p. 17221-17230, 2007.

MONARD, G.; MERZ, JR.K.M. Combined Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Methodologies Applied to Biomolecular Systems. **Acc. Chem. Res.** 32: 904 – 911. 1999.

NITZKE, J. A. **Tecnologia de alimentos especiais: Chocolate - Processamento**. Disponível em: <[http://www.ufrgs.br/alimentus/ita02014/chocolate/chocolate\\_processamento.htm](http://www.ufrgs.br/alimentus/ita02014/chocolate/chocolate_processamento.htm)>, acesso em: 20 Abr. 2010.

OLSEN, L. R.; RODERICK, S. L. Structure of *Escherichia coli* GlmU pyrophosphorylase and acetyltransferase active sites. **Biochem.** n. 40, p. 1913-1921, 2001.

PENEFF, C. et al. Crystal structures of two human pyrophosphorylase isoforms in complexes with UDPGlc(Gal)NAc: role of the alternatively spliced insert in the enzyme oligomeric assembly and active site architecture. **The EMBO J.** v. 20, n. 22, p. 6191-6202, 2001.

PEREIRA, J. L. et al. First occurrence of witches' broom disease in the principal cocoa-growing region of Brazil. **Trop. Agric.** v. 67, n. 2, p. 188-189, 1990.

POMPEO, F. et al. Dissection of the bifunctional *Escherichia coli* N-Acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase enzyme into autonomously functional domains and evidence that trimerization is absolutely required for glucosamine-1-phosphate acetyltransferase activity and cell growth. **J. Bio. Chem.** v. 276, p.3833-3839, 2001.

PRAT-RESINA, X.; GONZÁLEZ-LAFONT, À.; LLUCH, J. M. How important is the refinement of transition state structures in enzymatic reactions? **J. Mol. Struct.: Theochem**, n. 632, p. 297-307, 2003.

PURDY, L. H.; SCHMITDT, R. A. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology and management. **Ann. Rev. Phytopath.**, v. 34, p. 573-594, 1996.

RAPPÉ, A. K., et al. UFF, a full periodic table force field for Molecular Mechanics and Molecular Dynamics Simulations. **J. Am. Chem. Soc.** n. 114, n. 25, p. 10024-35, 1992.

RINCONES, J. et al. Genetic variability and chromosome-length polymorphisms of the witches' broom pathogen *Crinipellis pernicioso* from various plant hosts in South America. **Myco. Res.**, p. 821-832, 2006.

RINO, J. P.; STUDART, N. Um potencial de interação para o estudo de materiais e simulações por Dinâmica Molecular. **Quim. Nova**, v. 24, n. 6, p. 838-845, 2001.

SANTOS JÚNIOR, M. C. et al. A. Homology modelling of pyrophosphorylase, enzyme involved in chitin pathway of *Moniliophthora pernicioso*. **Int. J. Bioinf. Res. App.** v.5, n.2, 133-153, 2009.

SENN, H. M.; THIEF, W. QM/MM studies of enzymes. **Curr. Op. Chem. Bio.** n. 11, p. 182-187, 2007.

SOBERANIS, W. Increased frequency of phytosanitary pod removal in cocoa (*Theobroma cacao* L.) increases yield economically in eastern Peru. **Crop Protection**, v. 18, p. 667-685, 2000.

SOLOMONS, T. W. G; FRYHLE, C. B. **Química orgânica**. 9. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2009.

STEWART. J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. **J. Mol. Model.** n. 13, p. 1173-1213, 2007.

STEWART. J. J. P. Application of the PM6 method to modeling proteins. **J Mol Model.** n 15, p. 765-805, 2009.



STROMINGER, J. L.; SMITH, M. S. Uridine diphosphoacetylglucosamine pyrophosphorylase. **J. Bio. Chem.** v. 234, n. 7, p. 1822-1827, 1959.

TAKAYA, N. et al. Intracellular chitinase gene from *Rhizopus oligosporus*: molecular cloning and characterization. **Microbiology**, n. 144, p. 2647-2654, 1998.

TOMASI, J. et al. Molecular properties in solution described with a continuum solvation model. **Phys. Chem.Chem. Phys.** n. 4, **2002**, p. 5697-5710.

WARSHEL, A; LEVITT, M. Theoretical studies of enzymic reactions: Dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. **J. Mol. Biol.** 103: 2: 227 – 249. 1976.

YAMADA-OKABE, T. et al. Identification and characterization of the genes for N-Acetylglucosamine kinase and N-Acetylglucosamine-phosphate deacetylase in the pathogenic fungus *Candida albicans* **Euro. J. Biochem.**, v. 268, p. 2498-2505, 2001.

ZEA, C. J.; CAMCI-UNAL, G.; POHL, N. L. Thermodynamics of binding of divalent magnesium and manganese to uridine phosphates: implications for diabetes-related hypomagnesaemia and carbohydrate biocatalysis. **Chem. Central J.** v.2, n. 15, 2008.